



Neue Naturstoffe aus endophytischen Pilzen und einem Bodenzpilz – Chemische und biologische Charakterisierung

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Lena Hammerschmidt

aus Holzminden

Düsseldorf, November 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. P. Proksch

Korreferent: Prof. Dr. M. Kassack

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2015

Inhalt

| | |
|--|-----|
| 1 Abstract | i |
| 2 Zusammenfassung | iv |
| 3 Einleitung..... | 1 |
| 3.1 Die Bedeutung von Pilzen für die Wirkstoffforschung..... | 1 |
| 3.2 Pilze und ihre besonderen ökologischen Nischen | 6 |
| 3.3 Endophytische Pilze und ihre Besonderheiten | 7 |
| 3.3.1 Definition | 7 |
| 3.3.2 Anpassungsfähigkeit endophytischer Pilze..... | 8 |
| 3.3.3 Quellen für endophytische Pilze | 10 |
| 3.4 Regulierung des Sekundärstoffwechsels von Pilzen..... | 11 |
| 3.5 Zielsetzung..... | 12 |
| 4 Ergebnisse | 14 |
| 4.1 Publikation 1: <i>Penicillium glabrum</i> | 14 |
| 4.1.2 Supporting information of compounds isolated from <i>Penicillium glabrum</i> | 19 |
| 4.2 Publikation 2: <i>Acremonium strictum</i> | 44 |
| 4.2.1 Supporting information of compounds isolated from <i>Acremonium strictum</i> | 51 |
| 4.3 Publikation 3: <i>Xylaria</i> sp..... | 87 |
| 4.3.1. Supporting information of compounds isolated from <i>Xylaria</i> sp..... | 104 |
| 4.4 Publikation 4: <i>Gymnascella dankaliensis</i> | 130 |
| 4.4.1. Supporting information of compounds isolated from <i>Gymnascella dankaliensis</i> | 141 |
| 5 Diskussion | 197 |
| 5.1 Polyketide und ihre Wirkungen..... | 197 |
| 5.1.1 Polyketidsynthesen | 197 |
| 5.1.2 Pyron- und Lactonderivate | 199 |
| 5.1.3 Weitere Polyketide | 203 |
| 5.1.4 Polyketid-Hybride..... | 209 |
| 5.2 Horizontaler Gentransfer und Co-Entwicklung | 216 |
| 6 Ausblick..... | 218 |
| 7 Referenzen | 220 |
| 8 Abkürzungen..... | 230 |
| 9 Wissenschaftliche Leistungen..... | 232 |
| 10 Danksagung..... | 233 |
| 11 Erklärung | 235 |

1 Abstract

The number of resistances towards the antibiotic and cytotoxic drugs used nowadays increases continuously. Therefore, the exploitation of new and effective substances is of high benefit. Endophytic and soil derived fungi have already proved to be a promising source of new and potentially bioactive natural products due to their high variety of secondary metabolites. The investigation and cultivation of these fungi is of great interest since their metabolites have shown high potential for different pharmacological effects. Recent approaches like the selective change of cultivation conditions pursue the strategy to activate cryptic biosynthesis clusters both to increase the amount of constitutively present compounds and to induce the synthesis of new metabolites.

The scope of this thesis was the isolation, structure elucidation and the analysis of the bioactivity of secondary metabolites from fungi. In this context endophytic fungi were isolated from different plant tissues and one fungus was derived from a soil sample. Each of these was cultivated under standardized conditions. Afterwards, the cultures were extracted with ethyl acetate and the extracts were fractionized and purified using different chromatographic methods. The pure compounds were elucidated based on HPLC, LCESIMS, UV and 1D and 2D NMR spectroscopic properties as well as stereochemically elucidated with the help of optical rotation, Mosher ester analysis, Marfey's reaction and circular dichroism. In total 33 purified compounds could be isolated and structurally elucidated. Twelve new natural products were gained. Antibacterial and cytotoxic activities were analyzed using standardized assays.

In this dissertation the results published in or submitted to scientific journals are presented as the manuscripts:

Penicillium glabrum

The endophytic fungus *Penicillium glabrum* was isolated from pomegranate fruits (*Punica granatum*, Lythraceae) collected in Uzbekistan. Extracts of the fungus grown on rice yielded two new styrylpyrones, namely 3-methyl-desmethoxyyangonin and 3-methyl-bisnoryangonin, together with four known metabolites. The structures of the isolated compounds were elucidated on the basis of comprehensive spectral analysis (1D and 2D NMR and MS).

Abstract

Acremonium strictum

Five new polyketide derivatives, 6'-hydroxypestalotiopson C, acropyrone, bicytosporone D, waol acid, and pestalotiopene C, together with seven known metabolites, were obtained from extracts of the endophytic fungus *Acremonium strictum*, isolated from the tall-stilt mangrove (*Rhizophora apiculata*, Rhizophoraceae). The structures of the isolated compounds were elucidated on the basis of comprehensive NMR and MS analysis. Compounds waol A, pestalotiopene A and cytosporone E showed moderate cytotoxic activity against human cisplatin-sensitive (IC₅₀ values 27.1, 76.2, and 8.3 μM, respectively) and resistant A2780 cell lines (IC₅₀ values 12.6, 30.1, and 19.0 μM, respectively). Furthermore, only cytosporone E exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC value 14.3 μM).

Xylaria sp.

The endophytic fungus *Xylaria* sp. was isolated from healthy leaves of the javanic turmeric (*Curcuma xanthorrhiza*, Zingiberaceae), collected on the island of Timor, Indonesia. Two new compounds arugosin J and xylarugosin, together with the known resacetophenone, were isolated and their structures were elucidated on the basis of comprehensive NMR and mass spectral analysis. The enantiomers of *rac*-arugosin J were separated by chiral HPLC and their HPLC-ECD spectra were recorded to determine the absolute configuration on the basis of TDDFT-ECD calculations. The (3*R*,3*aR*,9*aR*) absolute configuration of the optically active xylarugosin was established by comparing the experimental solution ECD spectrum with the TDDFT ones computed for the gas phase and solution (PCM solvent model) conformers.

Gymnascella dankaliensis

The soil fungus *Gymnascella dankaliensis* was collected in the vicinity of the Giza pyramids, Egypt. When grown on solid rice medium the fungus yielded four new compounds including 11'-carboxygymnastatin N, gymnastatin S, dankamide, and aranorosin-2-methylether, the latter having been reported previously only as a semisynthetic compound. In addition, six known metabolites were isolated. Addition of

Abstract

NaCl or KBr to the rice medium resulted in the accumulation of chlorinated or brominated compounds as indicated by LC-MS analysis due to the characteristic isotope patterns observed. From the rice medium spiked with 3.5 % NaCl the known chlorinated compounds gymnastatin A and gymnastatin B were obtained. All isolated compounds were unambiguously structurally elucidated on the basis of comprehensive spectral analysis (1D and 2D NMR, and mass spectrometry), as well as by comparison with the literature. Compounds aranorosin-2-methylether, aranorosin and gymnastatin A showed potent cytotoxicity against the murine lymphoma cell line L5178Y (IC₅₀ values 0.44, 0.58 and 0.64 μM, respectively), whereas gymnastatin B exhibited moderate activity with an IC₅₀ value of 5.80 μM.

2 Zusammenfassung

Die Zahl an Resistenzen gegenüber antibiotischen und zytotoxischen Arzneimitteln steigt kontinuierlich. Daher ist die Gewinnung neuer und wirksamer Substanzen von großem Interesse. Endophytische Pilze und Bodenpilze haben die Fähigkeit, eine Vielzahl chemisch diverser Metabolite zu bilden. Da sich ihre Metabolite durch unterschiedliche pharmakologische Wirkungen auszeichnen, ist ihre Erforschung und Kultivierung von großem Interesse. Das pilzliche Potenzial ist weiterhin eine vielversprechende Quelle neuer, wirksamer Arzneistoffe. Neuste Ansätze, wie die gezielte Veränderung von Kultivierungsbedingungen, verfolgen die Strategie, kryptische Biosynthesecluster zu aktivieren, um sowohl die Metabolitmenge zu erhöhen als auch die Synthese neuer Verbindungen zu induzieren.

Das Ziel dieser Arbeit war die Isolierung, Strukturaufklärung und Bioaktivitätstestung sekundärer Metabolite aus Pilzen. Im Rahmen dessen wurden Endophyten aus verschiedenen pflanzlichen Geweben isoliert, sowie ein Bodenpilz aus einer Bodenprobe gewonnen und unter Standardbedingungen kultiviert. Anschließend wurden diese Kulturen mit Ethylacetat extrahiert und die Extrakte mittels verschiedener chromatografischer Methoden fraktioniert und aufgereinigt. Die Reinsubstanzen wurden daraufhin basierend auf ihren HPLC, LCESIMS, UV und 1D und 2D NMR spektroskopischen Eigenschaften und stereochemisch mittels optischer Rotationsdispersion, Mosher-Ester-Analyse, Marfey-Reaktion und Circular dichroismus aufgeklärt. Insgesamt konnten 33 Reinsubstanzen gewonnen und aufgeklärt werden. Davon stellten 12 neue Substanzen dar. Antibiotische und zytotoxische Aktivitäten wurden mittels standardisierter Testsysteme untersucht.

In der vorliegenden Dissertation werden die in wissenschaftlichen Fachjournalen veröffentlichten oder zur Publikation eingereichten Ergebnisse in Form der jeweiligen Manuskripte dargestellt:

Penicillium glabrum

Der endophytische Pilz *Penicillium glabrum* wurde aus der Granatapfelsfrucht (*Punica granatum*, Lythraceae), der in Usbekistan gesammelt wurde, isoliert. Der Pilzextrakt, auf Reis kultiviert, lieferte neben zwei neuen Styrylpyronen, 3-Methyl-desmethoxyyangonin

Zusammenfassung

und 3-Methylbisnoryangonin, noch vier bekannte Substanzen. Die Strukturen der isolierten Metabolite wurden mittels 1D und 2D NMR und Massenspektrometrie aufgeklärt.

Acremonium strictum

Fünf neue Polyketide, 6'-Hydroxypestalotiopson C, Acropyron, Bicytosporon D, Waolsäure und Pestalotiopen C wurden zusammen mit sieben bekannten aus dem Extrakt des endophytischen Pilzes *Acremonium strictum*, der aus der lang gestelzten Mangroven *Rhizophora apiculata* (Rhizophoraceae) isoliert wurde, gewonnen. Die Strukturen der isolierten Substanzen wurden auf Basis von vergleichender NMR- und MS-Analysen aufgeklärt. Die Substanzen Waol A, Pestalotiopen A und Cytosporon E zeigten moderate zytotoxische Aktivität gegenüber der humanen Cisplatin-sensitiven (IC₅₀-Werte von 27,7, 76,2 und 8,3 µM) und der resistenten A2780-Zelllinie (IC₅₀-Werte von 12,6, 30,1 und 19,0 µM), wohingegen nur Cytosporon E auch antibakterielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* (MHK-Wert von 14.3 µM) aufwies.

Xylaria sp.

Der endophytische Pilz *Xylaria* sp. wurde aus den gesunden Blättern der Gelbwurz *Curcuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae) isoliert, die auf der Insel Timor, Indonesien gesammelt wurde. Zwei neue Substanzen Arugosin J und Xylarugosin wurden zusammen mit dem bekannten Resacetophenon isoliert und strukturell durch umfassende NMR- und massenspektrometrische Analysen aufgeklärt. Die Enantiomere von *rac*-Arugosin J wurden mittels chiraler HPLC getrennt und ihre HPLC-ECD-Spektren wurden, um die absolute Konfiguration auf Basis von TDDFT-ECD-Kalkulationen zu bestimmen, aufgenommen. Die absolute Konfiguration des optisch aktiven Xylarugosins konnte durch den Vergleich des experimentellen, in Lösung aufgenommenen ECD-Spektrums mit den TDDFT-Spektren, der in Gasphase und Lösung berechneten Konformere, als (3*R*,3*aR*,9*aR*) ermittelt werden.

Zusammenfassung

Gymnascella dankaliensis

Der Bodenzpilz *Gymnascella dankaliensis* wurde in der Umgebung der Gizeh-Pyramiden in Ägypten gesammelt. Der Pilz auf Reismedium kultiviert, erbrachte vier neue Substanzen (11'-carboxygymnastatin N, Gymnastatin S, Dankamid und Aranorosin-2-methylether). Über letztere wurde vorher nur als semisynthetische Substanz berichtet. Zusätzlich wurden noch sechs weitere Substanzen isoliert. Die Zugabe von NaCl oder KBr zum Reismedium resultierte in der Akkumulation von chlorierten oder bromierten Metaboliten, was durch LC-MS-Analyse aufgrund der charakteristischen Isotopenmuster gezeigt werden konnte. Aus dem mit 3,5 % NaCl versehenen Reismedium wurden Gymnastatin A und Gymnastatin B isoliert. Alle isolierten Substanzen wurden eindeutig strukturell sowohl basierend auf umfassenden 1D und 2D NMR spektroskopischen und Massen spektrometrischen Analysen, als auch durch Literaturvergleiche aufgeklärt. Aranorosin-2-methylether, Aranorosin und Gymnastatin A zeigten gute Zytotoxizität gegenüber der murinen Lymphomzelllinie L5178Y mit IC₅₀-Werten von 0,44, 0,58 bzw. 0,64 µM, wohingegen Gymnastatin B moderate Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 5,80 µM aufwies.

3 Einleitung

3.1 Die Bedeutung von Pilzen für die Wirkstoffforschung

Es gibt fossile Funde, die das Auftreten einer Mykorrhiza, einer Symbiose zwischen Pflanze und Pilz, auf das frühe Devon datieren (Remy et al., 1994; Schwendemann et al., 2011). Das heißt, bereits vor ca. 400 Millionen Jahren zeigten Pilze ihre Anpassungsfähigkeit und ihr Potential, die Überlebensfähigkeit von Pflanzen zu erhöhen. Diese von der Natur vor Jahrtausenden gebildeten Fähigkeiten haben vermutlich die Besiedlung der Erde durch Landpflanzen gefördert. Heute machen wir Menschen uns Pilze in vielen Bereichen unseres Lebens zu Nutze.

Ein großer Einsatzbereich ist die Lebensmittelindustrie. So dienen Champignons, Steinpilze und Pfifferlinge als Lebensmittel. Darüber hinaus werden Pilze in der Lebensmittelherstellung in Form von Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) für die Brot- und Schimmelpilze (z. B. *Penicillium roqueforti*) für die Käseherstellung genutzt. Auch aus der Agrarwirtschaft sind Pilze und Pilzmetabolite nicht mehr wegzudenken (Kück et al., 2009). Aufgrund der zunehmenden Weltbevölkerung steigt der Bedarf an Nahrung wie Mais und Weizen an. Um besonders den Bedarf in ärmeren Regionen, in denen wenig Wasser vorhanden ist und wenig gedüngt wird, zu decken, muss der Ertrag pro Fläche gesteigert werden. Die bereits erwähnte Mykorrhiza ist eine mutualistische Symbiose zwischen Pilz und Pflanze (Vgl. Kapitel 3.3.1 Definition). Sie sorgt dafür, dass Nutzpflanzen wie Mais, Weizen oder Leguminosen Wasser, Phosphat und Mineralien effektiver aufnehmen können (Becking, 1965; Campbell and Reece, 2009; Morrison and English, 1967). Es gibt zwei Formen der Interaktion zwischen Pilz und Pflanze: Entweder bildet der Pilz einen Mantel um die Wurzeln herum (Ektomykorrhiza) oder er verweilt in „Röhren“, die durch Eindringen der Zellwände entstehen (Endomykorrhiza) (Campbell and Reece, 2009). Die arbuskuläre Mykorrhiza, die häufigste Form der Endomykorrhiza, kommt bei mehr als 80% aller Pflanzen vor (Brachmann and Parniske, 2006). Die Hyphen bilden eine Bäumchenstruktur aus, die sogenannten Arbuskeln. Sie dringen in die Zellen ein, zerstören jedoch nicht die Plasmamembran, und erhöhen dadurch die Austauschzone zwischen sich und der Pflanze. Durch die Oberflächenvergrößerung und zusätzliche pilzliche Produktion von Wachstumsfaktoren kann die Pflanze mehr Wasser und damit auch mehr Mineralien aufnehmen. Vor allem die Stickstoff- und Phosphataufnahme ist durch eine Mykorrhiza verbessert. Arbuskuläre Mykorrhizapilze erhöhen zusätzlich durch die Produktion von Glomalin die

Einleitung

Luftdurchlässigkeit und Wasserspeicherkapazität des Bodens (Rillig, 2004). Dadurch ist die Qualität des Bodens verbessert, was zu einem höheren Ertrag und weniger Einsatz von Düngemittel führt (Campbell and Reece, 2009; Rillig, 2004). Jedoch ist der Anbau von Pflanzen ohne Mykorrhiza wie Brassicaceen ebenso wichtig, damit nicht zu viele Pilzsporen in den Boden gelangen.

Auch die Biotechnologie macht sich Pilze zu Nutze. Hier sind vor allem die Schlauchpilze im Einsatz. Schon 1919 entwickelte Pfizer Inc. eine Methode zur Produktion von Zitronensäure durch *Aspergillus niger*, die heute in der Lebensmittelindustrie und in Medikamenten verwendet wird (Kück et al., 2009). Pilze (u. a. *Aspergillus niger*) werden in Fermentationsanlagen für die Produktion von Enzymen wie Amylase und Lipase verwendet. *Trichoderma reesei* bildet amphiphile Substanzen wie Hydrophorbin für (nano-)technische und medizinische Anwendungen (Meyer, 2008).

Pilze sind seit langem für ihre pharmakologischen Wirkungen auf den Menschen bekannt. In Asien werden höhere Pilze wie der Shiitakepilz seit über 2000 Jahren verwendet, weil er immunmodulierende Wirkung besitzt (Lindequist et al., 2010). Es wird davon ausgegangen, dass die Einnahme des pathogenen Pilzes *Claviceps purpurea* im antiken Griechenland während der „Mysterien von Eleusis“ zu Visionen führte (Wasson et al., 2008). Dieser Pilz befällt Getreidesorten wie Roggen und bildet zum Überdauern von Trockenheit und Kälte ein hartes, längliches Myzelgeflecht, genannt Mutterkorn oder Sklerotium. Im Mittelalter führte Mutterkorn zu Epidemien mit gangränösem Ergotismus, dem sogenannten „Sankt Antonius Feuer“ mit Absterben der peripheren Körperteile durch Mangeldurchblutung, oder konvulsivem Ergotismus mit Spasmen und Halluzinationen (Eadie, 2003). Im schlimmsten Fall kann die Aufnahme von Mutterkorn zum Tod durch Atemlähmung und Kreislaufversagen führen (ebenda). Mutterkorn enthält eine sehr große Anzahl Ergotalkaloide (Hofmann, 1964; Wallwey and Li, 2011), die unterschiedliche Wirkungen als Serotonin- und Dopamin-Rezeptoragonisten haben. Eines der bekanntesten Ergotalkaloide ist das halluzinogene LSD, Lysergsäurediethylamid, das Albert Hofmann 1943 im Zuge seiner Suche nach einem Kreislaufstimulanz aus der im Mutterkorn enthaltenen Lysergsäure (**1**) (siehe *Abbildung 1*) herstellte (Hofmann, 1964). Von den Ergotalkaloiden werden heute zwei als Arzneistoff verwendet: Ergotamin (**2**) (Ergo-Kranit®) ist aufgrund seiner stark Gefäß verengende Wirkung durch Serotonin-Agonismus gegen Migräne und das Ergokryptin-Derivat Bromocriptin (Kirim®, Pravidel®), das ein Dopamin-

Einleitung

Rezeptoragonist ist, gegen Parkinson und das Restless-legs-Syndrom im Handel (Mutschler et al., 2001).

Das wichtigste Beispiel, dass Pilze sehr gute Arzneistoffproduzenten sind, ist das Penicillin. 1928 isolierte Alexander Fleming Penicillin G (3) (siehe *Abbildung 1*) aus dem Schlauchpilz *Penicillium chrysogenum* (Fleming, 1980) und läutete dadurch die Ära der β -Lactamantibiotika ein. 1945 wurde mit Cephalosporin C (4) ein weiteres β -Lactamderivat aus *Acremonium chrysogenum* von Guiseppe Brotzu isoliert (Hamilton-Miller, 2000). Dem Bericht des Zentralinstituts für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland von 2010 ist zu entnehmen, dass Antibiotika auf Basis der Penicilline weiterhin den ersten Rang unter den Antiinfektiva belegen. Diese Antibiotikaklasse zeichnet sich dadurch aus, dass sie selektiv Bakterien tötet. Ihr Angriffspunkt ist die bakterielle *D*-Alanin-*D*-alanin-Transpeptidase, die für die peptidische Quervernetzung der Glykanstränge zuständig ist und nur in Bakterien vorkommt. Das β -Lactamgerüst weist hohe strukturelle Ähnlichkeit zu *D*-Alanin-*D*-alanin des Mureingerüsts der Bakterienzellwand auf; durch Öffnung des Lactamrings bildet sich eine kovalente Bindung zum Serinrest des aktiven Zentrums der Transpeptidase aus und hemmt dadurch das Enzym irreversibel (Mutschler et al., 2001). Dadurch wird die Zellwandsynthese gehemmt, was zum Fehlen oder nicht vollständigem Aufbau der Zellwand führt, die für Einzeller für die Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks unverzichtbar ist (Forth et al., 1998; Mutschler et al., 2001). Jedoch wurden schon früh Resistenzen gegen Penicillin erkannt. So berichteten Abraham und Chain 1940 zum ersten Mal von einer Penicillinase, die den Lactamring aufspaltet und somit unwirksam macht (Abraham and Chain, 1940).

Auch in der Antimykotikaklasse sind Arzneistoffe pilzlicher Herkunft bekannt. Griseofulvin (5) (siehe *Abbildung 1*), erstmals isoliert aus *Penicillium griseofulvum* (Grove et al., 1952), schädigt die Mitosespindel und stört so die Mikrotubulienbildung während der Metaphase der Mitose (Singh et al., 2008). Neuere Antimykotika gehören zur Klasse der Echinocandine und Pneumocandine. Diese sind Lipopeptide, die die β -1,3-Glucansynthase hemmen. β -1,3-Glucan ist ein Hauptbestandteil der Pilzzellwand. Zum ersten Mal wurde Echinocandin B aus *Aspergillus nidulans* isoliert (Benz et al., 1974). Heute sind die halbsynthetischen Derivate Caspofungin (Cancidas®), Anidulafungin (Ecalta®) und Micofungin (Mycamine®) im Handel. Anders als die Azol-Antimykotika zielen die Candine nicht auf die Ergosterolsynthese ab. So können sie auch gegen Azol-

Einleitung

resistente Hefepilze eingesetzt werden. Allerdings sind bereits *in vitro* Mutationen für die Glucansynthese und Effluxpumpen als Resistenzmechanismen bekannt und schon klinisch aufgetreten (Bachmann et al., 2002; Chen et al., 2011; Douglas et al., 1997).

Neben den antibakteriellen und antifungalen Arzneistoffen, die auf Schutzmechanismen der Pilze gegenüber potentiellen Feinden hindeuten, ist auch das Immunsuppressivum Ciclosporin A (Cilcoral®) zu nennen. Es ist ein zyklisches Peptid, das aus dem Schlauchpilz *Tolyocladium inflatum* gewonnen wird (Pritchard, 2005). Auch bei den sogenannten Volkskrankheiten wie Adipositas und Hypercholesterinämie sind die Leitstrukturen der Cholesterinsenker pilzlichen Ursprungs. Die Gruppe der Statine wurde durch die Isolierung von Mevastatin (**6**) (siehe *Abbildung 1*) aus *Penicillium citrinum* und Lovastatin aus *Aspergillus terreus* gegründet (Alberts et al., 1980; Endo et al., 1976). Diese hemmen die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) und bewirken damit eine Hemmung der Neusynthese des Cholesterins. Da den Zellen daraufhin das Cholesterin fehlt, werden mehr LDL-Rezeptoren gebildet. Diese nehmen dann das LDL (low density lipoprotein) vermehrt aus dem Blut auf, wodurch die Konzentration des Cholesterin im Blut sinkt (Forth et al., 1998; Mutschler et al., 2001). Der Pilzmetabolit Myriocin aus *Isaria sinclairii* führte durch synthetische Veränderung zu Fingolimod (Gilenya®), das seit 2010 zur Behandlung der hochaktiven schubförmig-remittierenden Multiplen Sklerose im Handel ist (Fujita et al., 1994a; Pelletier and Hafler, 2012).

Auch in der Krebstherapie ist der Bedarf an neuen, effektiven Substanzen aufgrund von Resistenzentwicklungen hoch (Gottesman, 2002). Dass auch hier Pilze Wirkstoffe liefern können, zeigt das Paclitaxel (**7**) (Taxol®) (siehe *Abbildung 1*), das einen Meilenstein der Endophyten-Forschung setzte. Dieses Taxan, seit 1993 im Handel erhältlich, wurde zuerst aus der Pazifischen Eibe *Taxus brevifolia* isoliert und stellte die Forscher vor eine Herausforderung: Die natürliche Gewinnung aus der Rinde des Baumes konnte den jährlichen Bedarf von etwa 100-200 kg nicht decken (Cragg, 1998). Auch die Synthese erwies sich als sehr schwierig und teuer (Nicolaou et al., 1994). Stierle *et al.* isolierten diese Substanz aus dem mit einer Eibe assoziierten endophytischen Pilz *Taxomyces andreanae* und später aus *Pestalotiopsis microspora* und anderen Endophyten (Li et al., 1996; Stierle et al., 1993). Hier war die effektive Fermentation im großen Stil nicht möglich, da die Ausbeute zu gering war. 1990 wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem 10-Deacetyl-Baccatin III, das aus den Nadeln von *Taxus baccata* (Europäische Eibe)

Einleitung

gewonnen wird, als Vorstufe in der Semisynthese zu Taxol umgesetzt wird (Holton, 1990). Heutzutage wird das Baccatin-Derivat aus Pflanzencellkulturen von *Taxus*-Arten gewonnen (Bringi et al., 1995).

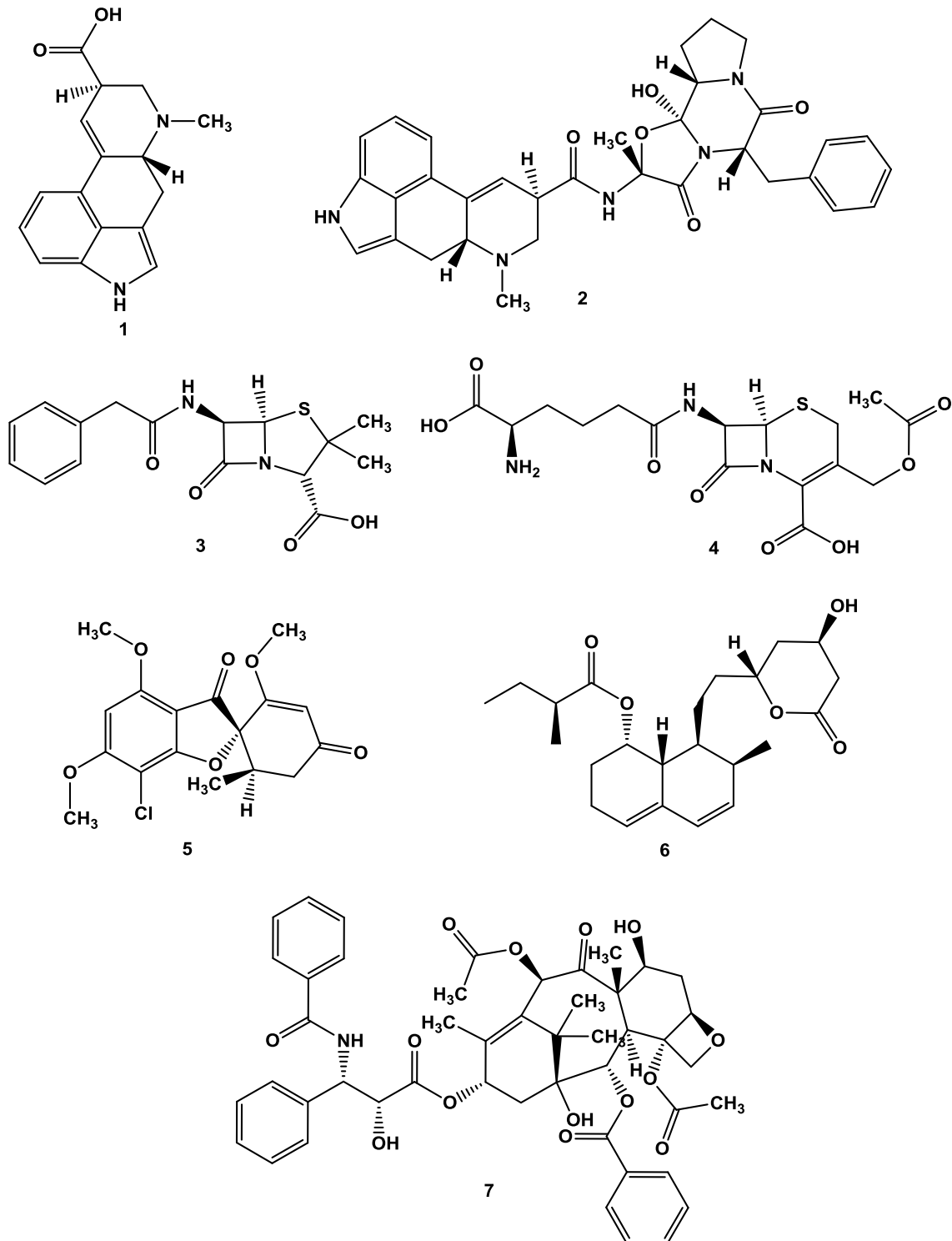


Abbildung 1: Strukturen einiger wichtiger aus Pilzen isolierten Substanzen und Derivate, von links oben nach rechts unten: Lysergsäure (1), Ergotamin (2), Penicillin G (3), Cephalosporin C (4), Griseofulvin (5), Mevastatin (6) und Paclitaxel (7).

Einleitung

Dies zuletzt genannte Beispiel zeigt die Herausforderungen der Isolierung von relevanten Wirkstoffen aus Pilzen. Dennoch sind Pilze, wie die Beispiele davor deutlich machen, eine sehr vielversprechende Quelle für neue Arzneistoffe.

3.2 Pilze und ihre besonderen ökologischen Nischen

Pilze sind Überlebenskünstler und können sich auch an extreme oder „stressexponierte“ Standorte anpassen. So kommen sie in Wüsten (Baptista-Rosas et al., 2007), heißen Quellen (Redman et al., 1999), in der Tiefsee (Niu et al., 2014), aber auch im ewigen Eis vor (Cantrell et al., 2011). Darüber hinaus können sie sich an hohe Salzkonzentrationen in Salzseen wie den Urmia See anpassen (Niknejad et al., 2013). Die Konzentration an Salz ist im Urmia See (Iran) viermal höher als die Salinität im Meer (Eimanifar and Mohebbi, 2007). Im Boden bzw. Sedimenten haben Pilze eine hohe Interaktion mit anderen Mikroorganismen und müssen sich und ihren Standort gegenüber Bakterien und anderen Pilzen verteidigen. Laut Schulz *et al.* gibt es folgende Kriterien, die die Suche nach neuen bioaktiven Metaboliten optimieren können: Die sekundären Metabolite, die ein Pilz synthetisiert, hängen von der jeweiligen ökologischen Nische ab. Zusätzlich kann die metabolische Interaktion die Synthese von sekundären Inhaltsstoffen erhöhen (Schulz et al., 2002). Die ökologische Nische beschreibt die Gesamtheit der biotischen und abiotischen Faktoren, die für das Leben und Überleben einer Art wichtig sind. Zu den abiotischen Faktoren zählen Temperatur, Wassergehalt, pH-Wert des Bodens, zu den biotischen andere Lebewesen.

Einer der hier untersuchten Pilze ist *Gymnascella dankaliensis* (siehe Publikation 4), der als Bodenpilz im ägyptischen Teil der Wüste Sahara in der Nähe der Gizeh-Pyramiden gesammelt wurde. Die Wüste Sahara ist eine der trockensten und heißesten Regionen der Erde mit Durchschnittstemperaturen von 30 °C und Höchsttemperaturen von fast 60°C (Brockhaus, 2014). Somit stellt sie einen extremen Standort dar, der sich auf die ökologische Nische von *Gymnascella dankaliensis* auswirkt. Der Pilz muss sich vor hohen Temperaturen und Wasserknappheit schützen. Daraus resultiert Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen um Ressourcen wie Wasser und Nahrung, um sein Überleben zu sichern. Der Pilz ist nicht nur als Boden- sondern auch als Schwamm-assoziiertes Pilz bekannt (Amagata et al., 1998), was eine weitere besondere ökologische Nische darstellt. Pilze, die mit Pflanzen assoziiert leben, werden als Endophyten bezeichnet.

3.3 Endophytische Pilze und ihre Besonderheiten

3.3.1 Definition

Endophyten sind Bakterien und Pilze, die inter- oder intrazellulär in jeder Pflanze leben (Bacon and White, 2000). Ihr Name setzt sich aus „endos“, griechisch für „innen“, und „phyton“, griechisch für „Pflanze“, zusammen. Mit Endophyten sind in der vorliegenden Arbeit ausschließlich endophytische Pilze gemeint. Diese ubiquitären Mikroorganismen rufen keine Krankheitssymptome hervor, was sie von den pathogenen Pilzen abgrenzt. Bei der Wechselbeziehung zwischen Pflanze und Pilz handelt es sich um eine mutualistische Symbiose von Wirt und Symbiont (Strobel and Daisy, 2003; Tan and Zou, 2001). Mutualistische Symbiose bedeutet, dass beide Partner einen Nutzen vom jeweils anderen haben. Die Pflanze gibt dem Endophyten Nährstoffe und einen Lebensraum (Schulz et al., 2002), während der Endophyt Substanzen produziert, die der Pflanze von Nutzen sind. Es gibt Studien, die beweisen, dass der Pilz eine bessere Anpassung der Pflanze an extreme Habitate ermöglicht. So können von Endophyten produzierte Substanzen zu verbessertem Wachstum, verstärkter Wasseraufnahme und verbesserter Toleranz gegenüber Salzstress führen (Redman et al., 2011; Waller et al., 2005). Das Wachstum kann z.B. durch die Phytohormone Indolyl-3-essigsäure (Knypl, 1965; Lee et al., 2003), die zu den Auxinen zählt, und Gibberellinsäure, die zu den Gibberellinen gehört, beeinflusst werden (Hamayun et al., 2009; Khan et al., 2008). Das Auxin führt zu einer vermehrten Wurzelbildung. Gibberellin bewirkt eine Verlängerung der Wurzeln. Durch diese Effekte und osmotisch aktive Substanzen kommt es zu einer verbesserten Wasseraufnahme. Osmotisch aktive Stoffe wie Mannitol vergrößern das osmotische Gefälle und die Pflanze kann knappe Wasserressourcen besser nutzen.

Neben den Wirkungen auf die abiotischen Faktoren sind auch Auswirkungen auf die biotischen zu nennen. Der endophytische Pilz sichert sein Überleben, indem er seinen Wirt vor Fressfeinden, Bakterien aber auch pathogenen Pilzen schützt. Schutz vor Fressfeinden kann durch zytotoxische Substanzen wie die Alternariole, Neoechinulin A und Aranorosin erhalten werden (Aly et al., 2008; Nakashima et al., 2008; Wijesekara et al., 2013). Antibakterielle Wirkungen wurden z. B. für Flavomannin A und Enniatine nachgewiesen (Bara et al., 2013; Ola et al., 2013) und als Antimykotika sind Xyolid, die Echinocandine und Stobilurin A und B zu nennen (Baraban et al., 2013; Benz et al., 1974; Dai et al., 2009; Schramm et al., 1978). Nodulisporin A, Nodulisporinsäure und Derivate hemmen einen für Invertebraten spezifischen Glutamat abhängigen Chloridkanal

Einleitung

(Meinke et al., 1996; Meinke et al., 2009; Ondeyka et al., 1997), was sie als Insektizide auszeichnet.

Die Symbiose beruht auf einem fein eingestellten Gleichgewicht zwischen Pilz und Pflanze (Eaton et al., 2011). Aufgrund starker ökologischer Änderungen oder Altersschwäche der Pflanze, kann der Pilz Überhand nehmen und pathogen wirken. Wie sensibel dieses Gleichgewicht ist, zeigt das Beispiel einiger Gräser. Wenn sie sich auf die Infloreszenz vorbereiten, bildet ihr endophytischer Pilz so viele Hyphen aus, dass er die Infloreszenz unterdrückt: Der Pilz geht von einem mutualistischen, asexuellen in einen pathogenen, sexuellen, proliferierenden Lebenszyklus über (Eaton et al., 2011; Schardl et al., 2004). Eaton *et al.* nehmen an, dass ROS (reactive oxygen species) das Hyphenwachstum von proliferierendem Wachstum zu einem angepassten, nicht pathogenen umschalten. Wenn eine Mutation, die Bildung der ROS unterdrückt, wird aus einem endophytischen, mutualistischen Pilz ein pathogener (Eaton et al., 2011). Genauso kann aber auch durch Mutation aus einem pathogenen Pilz ein endophytischer werden (Eaton et al., 2011; Freeman and Rodriguez, 1993).

3.3.2 Anpassungsfähigkeit endophytischer Pilze

Das von Charles Darwin formulierte Prinzip „survival of the fittest“, welches die Anpassungsfähigkeit und das Überleben in besonderen Situationen beschreibt, lässt sich auch auf Endophyten anwenden. Sie passen sich optimal an ihren Wirt und die äußeren Umwelteinflüsse an. Die enge Wechselbeziehung zwischen Pflanze und Endophyt ist der Grund, warum Endophyten eine so gute Quelle für neue und wirksame Leitsubstanzen darstellen (Schulz et al., 2002). Die Pflanzen werden durch extreme Umweltfaktoren wie Kälte, Hitze, Salzgehalt oder den Standort Tropen, der durch Artenvielfalt eine hohe Interaktion hervorruft, beeinflusst und beeinflussen dadurch wiederum ihre „Bewohner“. Diese Beeinflussung und die Notwendigkeit der Anpassung lässt die Endophyten immer wieder neue Substanzen kreieren. Diese können dann isoliert, erforscht und im besten Fall als Arzneistoffe eingesetzt werden (Aly et al., 2013; Debbab et al., 2013; Kusari et al., 2009; Redman et al., 2011; Schulz et al., 2002; Tan and Zou, 2001).

Eine weitere bemerkenswerte Anpassung ist, dass Endophyten auch solche Substanzen selbst synthetisieren, die ihre Wirte produzieren können. Neben dem bereits erwähnten

Einleitung

Paclitaxel wurde das Spindelgift Podophyllotoxin (Condylox®), ursprünglich aus Fußblatt (*Podophyllum peltatum*) bekannt, aus dem endophytischen *Phialocephala fortinii* isoliert. Ebenso konnten der Topoisomerase-I-Hemmer Camptothecin, der ursprünglich aus *Camptotheca acuminata* isoliert wurde, und Hypericin, das ursprünglich von *Hypericum perforatum* bekannt war, aus Endophyten wie *Trametes hirsuta* und *Thielavia subthermophila* isoliert werden (Eyberger et al., 2006; Kusari et al., 2008; Puri et al., 2005; Puri et al., 2006; Stierle et al., 1993). Als Ursache für diese Entdeckung wird ein horizontaler Gentransfer (HGT) diskutiert, der allerdings in einigen Studien widerlegt wurde (Hedden et al., 2001; Kusari et al., 2009). Ein horizontaler Gentransfer ist ein Austausch von Genen außerhalb der geschlechtlichen Fortpflanzung und über die Artengrenze hinaus. Im Gegensatz dazu findet beim vertikalen Gentransfer ein Austausch zwischen gleichen Arten statt (Campbell and Reece, 2009; Rosewich and Kistler, 2000). Darüber hinaus wurden auch solche Substanzen aus endophytischen Pilzen isoliert, deren Wirte nicht für diese Metabolite bekannt sind. So konnten auch weitere Paclitaxel produzierende Endophyten aus Pflanzen isoliert werden, die selber kein Paclitaxel produzieren und auch nicht zur Familie der Eibengewächse gehören (Gangadevi and Muthumary, 2009). Deshalb wird eine Co-Entwicklung zwischen Wirtspflanze und Endophyt bzw. Pflanzen und Endophyten vermutet, die auf simultane Umweltfaktoren zurückzuführen ist (Kusari et al., 2009). Als Beispiel für diese Co-Entwicklung aber auch für die Komplexität des Zusammenlebens lässt sich der Pilz *Fusarium solani* und sein Wirt *Camptotheca acuminata* heranziehen. Beide produzieren den Wirkstoff Camptothecin und der Pilz schützt sich vor der zytotoxischen Wirkung durch eine Veränderung des Aminosäurerestes der Topoisomerase-I-Bindestelle, die als Topoisomerase-I-DNA-Komplex von Camptothecin angegriffen wird (Kusari et al., 2011).

Dies führt zu einer weiteren Theorie, dass die endophytischen Pilze die ursprünglichen Produzenten von bekannten pflanzlichen Metaboliten seien (Cassady et al., 2004; Kusari et al., 2012). Als Beispiel können die Alkaloide des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* aufgeführt werden. Diese wurden in weiteren Pilzen wie *Aspergillus* sp. und *Penicillium* sp. aber auch in Pflanzenfamilien der Poaceae und Convolvulaceae gefunden. Hier zeigten Studien, dass bei Zugabe eines Fungizids diese Pflanzen keine Ergotalkaloide mehr produzieren. Das deutet darauf hin, dass die Alkaloide durch den Endophyten

produziert in der Pflanze akkumuliert vorlagen (Kucht et al., 2004; Leistner and Steiner, 2009; Wallwey and Li, 2011).

3.3.3 Quellen für endophytische Pilze

Unabhängig davon, welcher Weg zur Entstehung vielfältiger Substanzen geführt hat, eignen sich Arzneipflanzen und Pflanzen extremer Standorte besonders gut als Quelle für endophytische Pilze mit neuen, potentiellen Arzneistoffen (Aly et al., 2010; Eyberger et al., 2006; Gurib-Fakim, 2006). Aufgrund der Anpassungsfähigkeit an den Wirt und der Wichtigkeit des Standortes wurden in der vorliegenden Dissertation die Arzneipflanze *Curcuma xanthorrhiza* (Roxb.) (Javanische Gelbwurz) von der Insel Timor, Indonesien, als Endophytenlieferant gewählt (siehe Publikation 3). Auf Timor herrscht tropisches Klima, das mit ausgeprägten Regen- und Trockenzeiten charakterisiert ist. Die Javanische Gelbwurz wird bei dyspeptischen und gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt. Sie hat gallentreibende, Cholesterin senkende, aber auch antimikrobielle und antioxidative Wirkung (Hentschel et al., 1996; Ozaki, 1990; Rasyid et al., 2002). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ihr Hauptinhaltsstoff Curcumin NF- κ B hemmt und somit entzündungshemmend wirkt (Strasser et al., 2005).

Des Weiteren wurde der Granatapfel *Punica granatum* (L.) als Quelle gewählt (siehe Publikation 1), der bei Taschkent in Usbekistan gesammelt wurde, welches sich durch kontinentales Klima mit heißen Sommern und kalten Wintern auszeichnet. Der Granatapfel wurde als medizinische Ernährung bei Entzündungen und bakterieller Infektionen im Mittleren Osten vor Tausenden von Jahren angewendet (Johanningsmeier et al., 2011).

Die lang gestelzte Mangrove (*Rhizophora apiculata*, Rhizophoraceae) zeichnet sich als Endophytenquelle durch ihren speziellen Standort aus (siehe Publikation 2). Sie wird durch salzhaltiges Wasser und durch das auf der Insel Cat Ba, Vietnam herrschende tropische Monsunklima beeinflusst. Im „Weltatlas der Mangroven“ werden diese als tropische Salzpflanzen bezeichnet, die einem sehr hohen Salzgehalt und durch die Gezeiten unterschiedlichen Wasserständen ausgesetzt sind. Sie haben sich an diese abiotischen Faktoren z. B. durch Stelzwurzeln mit Aerenchym angepasst. Auch gibt es selektivere Ionenkanäle im Caspary'schen Streifen als in Nicht-Halophyten. Als weitere Anpassungen entwickelten sich zum einen sukkulente Blätter, in die sich umso mehr

Wasser einlagert, je höher der Salzgehalt ist. Zum anderen entwickelten sich Salzausscheidungsorgane und osmotisch aktive zyklische Zuckeralkohole (Spalding et al., 2010). Debbab *et al.* haben gezeigt, dass viele bioaktive Stoffe aus endophytischen Pilzen, die aus Mangroven isoliert wurden, gewonnen werden können (Debbab et al., 2013).

3.4 Regulierung des Sekundärstoffwechsels von Pilzen

Die Anpassungsfähigkeit der Endophyten an Standort, Klima oder Feinde wird heutzutage gezielt ausgenutzt. Hierfür werden Co-Kultivierungen mit anderen Mikroorganismen oder Pflanzenzellen durchgeführt, um „stille“ oder kryptische Biosynthesewege zu aktivieren. „Still“ bzw. kryptisch bedeutet in diesem Zusammenhang ungenutzte, nicht aktivierte Biosynthesewege.

Ein Co-Kultivierungsexperiment der Arbeitsgruppe Proksch konnte zeigen, dass *Bacillus subtilis* die Produktion von antibakteriellen Enniatinen induziert (Ola et al., 2013). Die Co-Kultivierung mit Bakterien veranlasst den Pilz dazu, antibiotisch aktive Substanzen zu bilden. Die Co-Kultivierung von Pilzen mit Pflanzenzellen konnte belegen, dass dadurch zytotoxische Substanzen vermehrt erzeugt werden. Als Beispiel kann die Co-Kultivierung von *Fusarium mairei* mit einer Zellsuspension von *Taxus chinensis* var. *mairei* genannt werden, wodurch die Synthese von Paclitaxel erhöht wurde (Li et al., 2009).

Ein weiterer Ansatz das Produktionsmuster zu vergrößern ist die Epigenetik bzw. das „metabolic engineering“. Unter „metabolic engineering“ versteht man die Veränderung des Produktionsmusters (in diesem Fall) eines Pilzes, indem man Einfluss auf bestimmte Biosynthesewege nimmt. Hierfür müssen allerdings Kenntnisse über den Stoffwechsel vorhanden sein (Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie, 2013; Journal of Metabolic engineering, 2013). Epigenetik beschreibt die Veränderung der Genexpression, ohne die DNA-Sequenz zu verändern (Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik, 2013; Portal epigenetischer Forschung in Deutschland, 2013). Hierfür werden „epigenetic modifier“ verwendet. Diese bewirken eine Enzymaktivierung bzw. Deaktivierung der Transkription. Hierzu gehören die Histon-Acetyltransferase (HAT) und Histon-Deacetylase (HDAC). Die HAT bewirkt eine Acetylierung der Lysin-Reste der Histone, wodurch die Wechselwirkung zwischen

Einleitung

Histon und DNA geschwächt ist und es leichter zur Transkription und Zelldifferenzierung kommt. Die HDAC bewirkt das Gegenteil und so kommt es zu Zellwachstum (Campbell and Reece, 2009; Goodsell, 2003). Daher wurde der Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitor Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) bei der Kultivierung eines Endophyten zugesetzt und erzeugte so durch Aktivierung stiller Biosynthesewege bzw. vereinfachte Transkription zwei neue Fusarinsäurederivate (Chen et al., 2013).

Amagata *et al.* zeigten, dass bei Zugabe von Salzen in das Kultivierungsmedium Halogenionen in die Substanzen eingebaut werden können (Amagata et al., 2010). Auch die gezielte Zugabe von Ausgangsstoffen, um die Produktion bestimmter Substanzen zu erhöhen, wurde untersucht (Wang et al., 2013). Der „OSMAC“-Ansatz (**O**ne **S**train - **M**any **C**ompounds) zeigt, dass ein Pilz viele Metabolite produzieren kann, wenn die Kultivierungsbedingungen entsprechend verändert werden (Bode et al., 2002). So kann durch Austausch der Medien, von flüssig zu fest, von Reis zu Bohne oder durch Veränderung des pH-Wertes der Pilz angeregt werden, weitere, z. T. auch neue Substanzen zu produzieren (Bode et al., 2002; Hewage et al., 2014, Wang et al., 2014). Dass der einfache Wechsel des Kulturmediums einen großen Einfluss auf das Substanzmuster der Pilze haben kann, konnte durch frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe Proksch gezeigt werden (Bara, 2012; Roensberg, 2013).

3.5 Zielsetzung

Pilze sind extrem anpassungsfähige Lebewesen, die in vielen Bereichen unseres Lebens Anwendung finden: Sie finden Einsatz in der Medizin als antibiotische, zytotoxische oder antimykotische und in der Agrarwirtschaft als fungizide Sekundärstofflieferanten. In der Lebensmittelindustrie werden sie zur Produktion von Zitronensäure oder Käse verwendet. Dieses breite Einsatzspektrum zeigt deutlich, wie unterschiedlich Pilze aufgrund der Vielfältigkeit ihrer Sekundärmetabolite einsetzbar sind. Die Isolierung dieser Metabolite wird bereits seit ca. hundert Jahren betrieben. Daher wird es zunehmend schwieriger neue Substanzen zu entdecken. Gleichzeitig nimmt die Zahl der Resistenzen gegenüber Medikamenten zu. Deswegen ist die Forschung dazu übergegangen, die Suche nach Pilzen in neue „extreme“ Habitats, wie Wüsten und Eis zu verlegen oder nach Pflanzen-assoziierten Pilzen zu suchen, da hier Pflanzen durch Interaktionen großen Einfluss auf die Metabolite der Pilze haben. Darüber hinaus wird

Einleitung

die Aktivierung bestimmter Stoffwechselwege durch Co-Kultivierung u. ä. vorgenommen. Diese Vorgehensweisen haben in den letzten Jahren ein großes Spektrum neuer Substanzen hervorgebracht. Das deutet darauf hin, dass das volle Potential der endophytischen und anderer Pilze noch lange nicht ausgeschöpft ist. Die Anpassung an biotische und abiotische Faktoren geht stetig voran, so dass ihre Untersuchung weiterhin von großem Nutzen für die Medizin sein kann.

Ziel dieser Arbeit war es, neue zytotoxische oder antibakterielle Substanzen zu identifizieren. Dazu wurden Endophyten aus Pflanzen verschiedener, extremer Standorte und ein Bodenzpilz aus einer Wüstenprobe isoliert. Die gewonnenen Pilze wurden identifiziert, kultiviert und durch Extraktion und Aufreinigung wurden ihre Metabolite isoliert. Die Metabolite wurden strukturell aufgeklärt und auf ihr pharmazeutisches Potenzial hin getestet. Die Pilze wurden dafür auf verschiedenen Medien wie Reis und Bohnen kultiviert, mittels Ethylacetat extrahiert und die Extrakte per unterschiedlicher analytischer Methoden von Säulenchromatografie bis semipräparativer HPLC bis zur Reinsubstanz aufgearbeitet. Die Reinsubstanzen wurden mittels massenspektrometrischer, UV- und NMR-spektroskopischer Methoden strukturell aufgeklärt und in verschiedenen Bioassays auf ihre zytotoxische und antibakterielle Wirkung hin getestet. Die absolute Konfiguration kann für die Wirkung bzw. Nebenwirkung von entscheidender Bedeutung sein. Deswegen wurde diese mittels unterschiedlicher Techniken wie CD-Spektroskopie, Mosher- und Marfey-Reaktionen untersucht.

4 Ergebnisse

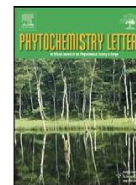
4.1 Publikation 1: *Penicillium glabrum*

Veröffentlicht in „Phytochemistry Letters“

Impact factor: 1.179

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

“Reprinted from Phytochemistry Letters, 5, Lena Hammerschmidt, Victor Wray, WenHan Lin, Elena Kamilova, Peter Proksch, Amal H. Aly, New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*, 600 – 603, 2012, with permission from Elsevier.”



New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*

Lena Hammerschmidt^a, Victor Wray^b, WenHan Lin^c, Elena Kamilova^d, Peter Proksch^{a,*}, Amal H. Aly^{a,*}

^a Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstraße 1, Geb. 26.23, D-40225 Düsseldorf, Germany

^b Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig, Germany

^c National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, People's Republic of China

^d Institute of Genetics and Plant Experimental Biology, Academy of Sciences Republic of Uzbekistan, Kibrai District, P.O. Yukori-Yuz, 1021505 Tashkent Region, Uzbekistan

ARTICLE INFO

Received 13 March 2012
Received in revised form 25 May 2012
Accepted 1 June 2012
Available online 27 June 2012

Keywords:

Penicillium glabrum
Endophytic fungi
Styrylpyrones
Punica granatum
Natural products

ABSTRACT

The endophytic fungus *Penicillium glabrum* was isolated from pomegranate fruits (*Punica granatum*) collected in Uzbekistan. Extracts of the fungus grown on rice yielded two new styrylpyrones, namely 3-methyl-desmethoxyyangonin (**1**) and 3-methyl-bisnoryangonin (**2**), together with four known metabolites. The structures of the isolated compounds were elucidated on the basis of comprehensive spectral analysis (1D and 2D NMR and MS).

©2012 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved

1. Introduction

Endophytes are microorganisms that exist in nearly every plant on earth. They live in the internal tissues of their host plants without causing any apparent disease symptoms (Tan and Zou, 2001; Strobel and Daisy, 2003). Instead, endophytes are often described to have positive effects on their hosts including growth enhancement and protection against pathogens and feeding damage (Cheplick et al., 1989; Popay et al., 2003). Furthermore, endophytic fungi proved over the last decades to be a rich source of new secondary metabolites with great medicinal potential (Eyberger et al., 2006; Xu et al., 2010; Proksch et al., 2010; Aly et al., 2010, 2011a; Debbab et al., 2010, 2011). Several studies could prove the production of medicinally important plant secondary metabolites, such as paclitaxel, vincristine, podophylotoxin and camptothecin, by endophytic fungi thus raising the prospect of using these organisms as alternative sources of these metabolites (Stierle et al., 1993; Lingqi et al., 2000; Puri et al., 2005, 2006; Eyberger et al., 2006; Priti et al., 2009). Furthermore, endophytic fungi were found to produce a wide variety of bioactive natural products and potential drug leads that are clearly different from plant metabolites,

as for instance nodulisporic acid A and its derivatives (Aly et al., 2011b). The compounds were isolated from *Nodulisporium* sp. endophytic in the Hawaiian plant *Bontia daphnoides* (Ondeyka et al., 1997; Hensens et al., 1999). Nodulisporic acid A exhibits systemic efficacy against fleas by modulating an invertebrate specific glutamate-gated ion channel and was thus used to develop N-tert-butyl nodulisporamide, a potent and effective oral agent to be given once monthly for the control of fleas and ticks on dogs and cats (Shoop et al., 2001; Meinke et al., 2009).

The genus *Penicillium* comprises more than 300 species (Kirk et al., 2008) which produce a wide range of bioactive compounds. Important drug leads include the β -lactam antibiotic penicillin produced by *P. chrysogenum* (Martin, 2000) as well as the antifungal griseofulvin produced by *P. griseofulvum* (syn. *P. patulum*) (Broadbent et al., 1975). *P. glabrum* (syn. *P. frequentans* Westling) is known for the production of the bioactive metabolites asteric acid and its derivative sulochrin (Mahmoodian and Stickings, 1964; Ohashi et al., 1992; Lee et al., 2002).

During our ongoing search for bioactive secondary metabolites from endophytic fungi we investigated the endophytic fungus *Penicillium glabrum*, which was isolated from pomegranate fruits (*Punica granatum*) collected in Uzbekistan. The host plant *Punica granatum* is recently recognized as one of the most powerful antioxidant sources available

*Corresponding author. Tel.: +49 211 81 14163; fax: +49 211 81 11923.

** Corresponding author. Tel.: +49 211 81 14173.

E-mail addresses: proksch@uni-duesseldorf.de (P. Proksch), amal.hassan@uni-duesseldorf.de (A.H. Aly).

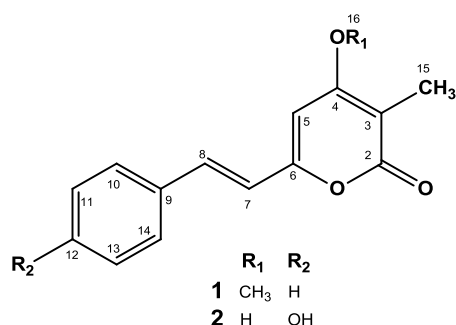


Fig. 1. Chemical structures of compounds **1** and **2**.

from plants (Gil et al., 2000; Johanningsmeier and Harris, 2011). However, only few fungal species were reported from *Punica granatum*, including endophytic *Guignardia* (anamorph: *Phyllosticta*) species (Okane et al., 2003; Naik et al., 2008) and the epiphytic *Pseudocercospora punica* (Freire, 2005).

In this study, two new styrylpyrones, named 3-methyl-desmethoxyyangonin (**1**) and 3-methyl-bisnoryangonin (**2**), together with four known compounds were isolated. The structural elucidation of the new styrylpyrones is described.

2. Results and discussion

The EtOAc extract of a solid rice culture of endophytic *Penicillium glabrum* was partitioned between *n*-hexane and 90% aqueous MeOH. The resulting MeOH phase was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel followed by size exclusion chromatography over Sephadex LH20 and semi-preparative reversed-phase HPLC to yield two new styrylpyrones, 3-methyl-desmethoxyyangonin (**1**) and 3-methyl-bisnoryangonin (**2**) (Fig. 1), and four known compounds.

The molecular formula of **1** was determined as C₁₅H₁₄O₃ on the basis of the [M+H]⁺ signal appearing at *m/z* 243.1014 in the HRESIMS. The UV spectrum, revealing absorbances at λ_{max} (MeOH) 220, 273, and 376 nm, suggested a styrylpyrone as the basic structure (Bu'Lock et al., 1962; He et al., 1997). Inspection of the ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** (Table 1) revealed the presence of a methoxy group resonating at δ_H 4.05 (δ_C 57.3) ppm, and an aromatic methyl group at δ_H 1.90 (δ_C 8.7) ppm, in addition to the typical set of signals corresponding to the styrylpyrone skeleton. The latter includes an aromatic proton appearing as a singlet at δ_H 6.70 (δ_C 98.0) ppm (H-5), and an AB system comprised of two olefinic protons (δ_H 6.90 (δ_C 120.4) and

7.50 (δ_C 136.0) assigned to H-7 and H-8, respectively) showing a coupling constant of 16.0 Hz consistent with *E*-configuration of the double bond. Further signals corresponded to a monosubstituted aromatic ring moiety. ¹³C NMR and DEPT spectra revealed signals for five sp² quaternary carbons, of which one was attributed to the ester carbonyl group at C-2 (δ_C 167.1 ppm), and four to the aromatic carbons (C-3, C-4, C-6 and C-9). The deshielded signals for C-4 and C-6 (δ_C 168.8 and 159.2 ppm, respectively) indicated their oxygenated nature. The structure of **1** was deduced by inspection of the COSY and HMBC spectra. In the former (Table 1), spin systems corresponding to the olefinic protons H-7 and H-8, as well as the monosubstituted aromatic ring (H-10 to H-14), were evident. The HMBC spectrum (Table 1) verified the styrene moiety as indicated by correlations observed from H-7 to C-8 and C-9, from H-8 to C-7, C-9 and C-10/14, from H-10/14 to C-8 and C-12, from H-11/13 to C-9, and from H-12 to C-10/14. The α-pyrone core structure was confirmed through correlations from CH₃-15 to C-2, C-3 and C-4, from OCH₃-16 to C-4, and from H-5 to C-3, C-4 and C-6. Both substructures were connected at C-6 based on correlations from H-5 to C-7, from H-7 to C-5 and C-6, and from H-8 to C-6. Further structural confirmation was achieved by comparison of the NMR data of **1** with those of related styrylpyrones e.g. yangonin and desmethoxy-yangonin isolated from *Piper methysticum* (Dharmaratne et al., 2002), which also revealed that **1** differs from desmethoxyyangonin (Dharmaratne et al., 2002) only by the presence of an additional methyl substituent at C-3. Thus, **1** was identified as a new natural product for which the name 3-methyl-desmethoxyyangonin is proposed.

Compound **2** displayed similar spectroscopic data to those of **1**, suggesting that both compounds have the same basic molecular framework (λ_{max} (MeOH) 218, 270, and 365 nm). HRESIMS indicated the molecular formula C₁₄H₁₂O₄, in accordance with the [M+H]⁺ signal at *m/z* 245.0804, thus revealing a 2 amu increase in the molecular weight compared to **1**.

Comparison of ¹H and ¹³C NMR spectra (Table 1) of **2** to those of **1** showed close similarity between both compounds except for the absence of the methoxyl group at C-4 and the presence of a free hydroxyl group instead, as well as the replacement of the monosubstituted aromatic ring moiety by a *para*-substituted phenol moiety. The aromatic AA'BB' system of the latter appeared as two aromatic doublets each integrating for two protons (*J* = 8.6 Hz), which resonated at δ_H 6.83 and 7.47 (δ_C 116.8 and 130.1) ppm (H-11/13 and H-10/14), respectively. This was further corroborated by the appearance of an additional oxygenated aromatic carbon signal in the ¹³C NMR spectrum at δ_C 160.1 ppm, assigned to C-12,

Table 1. NMR spectroscopic data of **1** and **2** at 600 (¹H) and 150 (¹³C) MHz in MeOH-*d*₄ (δ in ppm, integration, multiplicity, *J* in Hz).

| Position | 1 | | | | 2 | | | |
|----------|--------------------|--------------|----------------|----------------|--------------------|-------|---------------|----------------|
| | δ _H | COSY | HMBC | δ _C | δ _H | COSY | HMBC | δ _C |
| 2 | | | | 167.1 | | | | 168.3 |
| 3 | | | | 103.0 | | | | 100.0 |
| 4 | | | | 168.8 | | | | 158.8 |
| 5 | 6.70, 1H, s | 16 | 3, 4, 6, 7 | 98.0 | 6.16, 1H, s | | 2, 3, 4, 6, 7 | 101.7 |
| 6 | | | | 159.2 | | | | 158.8 |
| 7 | 6.90, 1H, d (16.0) | 8 | 5, 6, 8, 9 | 120.4 | 6.64, 1H, d (15.9) | 8 | 5, 6, 8, 9 | 117.0 |
| 8 | 7.50, 1H, d (16.0) | 7 | 6, 7, 9, 10/14 | 136.0 | 7.35, 1H, d (15.9) | 7 | 6, 7, 10/14 | 135.7 |
| 9 | | | | 136.8 | | | | 128.5 |
| 10/14 | 7.65, 2H, d (7.4) | 11/13, 12 | 8, 10/14, 12 | 128.5 | 7.47, 2H, d (8.6) | 11/13 | 8, 10/14, 12 | 130.1 |
| 11/13 | 7.40, 2H, t (7.4) | 10/14, 12 | 9, 11/13 | 129.9 | 6.83, 2H, d (8.6) | 10/14 | 9, 11/13, 12 | 116.8 |
| 12 | 7.35, 1H, t (7.4) | 10/14, 11/13 | 10/14, 11/13 | 130.4 | | | | 160.1 |
| 15 | 1.90, 3H, s | 5 | 2, 3, 4 | 8.7 | 1.94, 3H, s | | 2, 3, 4 | 8.6 |
| 16 | 4.05, 3H, s | | 4 | 57.3 | | | | |

which indicated C-12 to be hydroxylated. The HMBC spectrum (Table 1) revealed a similar set of correlations for the α -pyrone core structure and the two neighboring olefinic protons H-7 and H-8 as in 1. In addition, correlations from H-11/13 to C-9 and C-12, and from H-10/14 to C-8 and C-12 confirmed the 4-vinylphenol moiety. The upfield chemical shift of C-7 in 2 compared to 1 may be explained by the positive mesomeric effect of the additional hydroxyl group at C-12 in 2. Accordingly, 2 was characterized as a new natural product and was named 3-methylbismoryangonin.

The remaining compounds were identified on the basis of their NMR and mass spectrometric data as well as by comparison with published data as astrictic acid (Ohashi et al., 1992), sulochrin (Hargreaves et al., 2002; Lee et al., 2002), indolyl-3-acetic acid (Lee et al., 2003), and questinol (Kimura et al., 1983).

The new metabolites reported in this study are members of the class of styrylpyrones and show close resemblance to yangonin and desmethoxyyangonin, two of the most abundant kavalactones of the herbal drug Kava Kava (*Piper methysticum*, Piperaceae) (Dharmaratne et al., 2002). Kava Kava is traditionally used as a remedy for stress and anxiety and its effect was proven by recent studies showing that Kava extract is as effective as the standard therapy of anxiety disorders involving diazepam derivatives (Dharmaratne et al., 2002). Among the diverse metabolites from Kava Kava, kavalactones were reported to be responsible for the biological activity (Singh, 1992; Dharmaratne et al., 2002). Nevertheless, compounds 1 and 2 show also a close similarity to other styrylpyrone derivatives, which are common constituents of fungi belonging to the Hymenochaetales family (Basidiomycetes) (Fiasson, 1982), as well as of primitive angiosperm families such as the Piperaceae, Lauraceae, Annonaceae, Ranunculaceae and Zingiberaceae (Shibata et al., 1972; Barbosa-Filho et al., 1987; Yu, 1999; Dharmaratne et al., 2002; Boukouvalas and Wang, 2008).

Many natural products originally isolated from plants were in recent years reported to be also synthesized by endophytic fungi. Examples include paclitaxel originally obtained from the yew tree *Taxus brevifolia* and found to be produced by endophytic *Taxomyces andreanae*, as well as hypericin originally isolated from St. John's wort (*Hypericum perforatum*) and later detected in endophytic *Thielavia subthermophila* (Stierle et al., 1993; Kusari et al., 2008, 2009; Aly et al., 2010). The close structural similarity of fungal styrylpyrones as reported in this study to the kavalactones from *P. methysticum* raises the question whether kavalactones are also products of endophytic fungi. This remains to be investigated.

3. Experimental

3.1. General experimental procedures

^1H , ^{13}C and 2D NMR spectra were recorded in deuterized solvents on Bruker ARX 500 or AVANCE DMX 600 NMR spectrometers. Mass spectra were measured with a LC-MS HP1100 Agilent Finnigan LCQ Deca XP Thermoquest and high-resolution mass spectroscopy (HRESIMS) spectra were recorded with a FTIRMS-Orbitrap (Thermo Finnigan) mass spectrometer. HPLC analysis was performed with a Dionex P580 system coupled to a photodiode array detector (UVD340S). The detection was at 235, 254, 280 and 340 nm. The used column (125 x 4 mm, L x ID) was prefilled with Europhere 10 C18 (Knauer, Germany). HPLC separation was

performed on a semi-preparative HPLC system of Lachrom-Merck Hitachi (Pump L7100 and UV detector L7400; Europhere 100 C18, 300 x 8 mm, Knauer, Germany) with a flow rate of 5.0 mL/min. Column chromatography was performed using Merck MN Silicagel 60 M (0.04–0.063 mm) or Sephadex LH20 as stationary phases. For TLC analyses and preparative TLC pre-coated Silica Gel 60 F254 plates (Merck) were used followed by detection under UV at 254 and 366 nm or after spraying with anisaldehyde reagent, respectively. Solvents were distilled before use, and spectral grade solvents were used for spectroscopic measurements.

3.2. Fungal material

The fungus (strain no. EK7.5) was isolated from small tissue samples aseptically cut from the inner tissues of a fresh healthy fruit of pomegranate *P. granatum* (Lythraceae) collected in Uzbekistan in 2010 according to Aly et al. (2008) and Kjer et al. (2010). To distinguish remaining epiphytic fungi from endophytic fungi, an imprint of the fruit surface on biomalt agar was performed. The identification was performed according to a molecular biological protocol by DNA amplification and sequencing of the ITS region (GenBank accession no. HM776431.1) as described previously (Kjer et al., 2010). A voucher strain is kept in one of the author's laboratory (P.P.).

3.3. Cultivation

Mass growth of the fungus was carried out in six Erlenmeyer flasks (1 L each) on solid rice medium (100 mL distilled water added to 100 g commercially available rice and autoclaved) at 21 °C under static conditions for 30 days.

3.4. Extraction and isolation

Each fungal culture was extracted with 400 mL ethyl acetate. The obtained crude extract (6 g) was partitioned between *n*-hexane and 90% aqueous MeOH. The MeOH phase (3.5 g) was fractionated with vacuum liquid chromatography (VLC) on 210 g silica gel 60 using *n*-hexane/ethyl acetate and DCM/MeOH step gradient elution. An eluting volume of 300 mL was used for each step. Elution started with *n*-hexane/ethyl acetate gradient in 20% steps, when 60% *n*-hexane was reached 10% steps were employed till 100% EtOAc (F1–F9), then DCM/MeOH gradient was applied in 20% steps till 100% MeOH (F10–F15). F4 (185.7 mg) was subjected to size exclusion chromatography over Sephadex LH 20 using MeOH as eluting solvent. Fractions were combined according to TLC monitoring and further purified by semi-preparative HPLC (Merck, Hitachi L7100) using a Eurosphere 100-10 C₁₈ column (300 x 8 mm) with an eluting gradient of MeOH/H₂O to yield 1 (4.8 mg). Similarly, the combined fractions F7 and F8 (127.1 mg) were purified by chromatography on Sephadex LH-20 followed by semi-preparative HPLC to yield 2 (1.5 mg) and questinol (1.1 mg). Astrictic acid (11.2 mg), sulochrin (3.9 mg), and indolyl-3-acetic acid (2.8 mg) were obtained by chromatographic separation of F6 (133.7 mg) on Sephadex LH20 using DCM/MeOH (1:1) for elution followed by purification of the resulting fractions using semi-preparative HPLC.

3.4.1. 3-Methyl-desmethoxyyangonin (1)

Yellow powder; UV λ_{max} (PDA) 220, 273, 376 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; ESIMS (rel. int.) m/z 506.9 [2M+Na]⁺ (100), 243.1 [M+H]⁺ (30), 241 [M-H]⁻ (30), HRESIMS m/z [M+H]⁺ 243.1014 (calcd for C₁₅H₁₅O₅, 243.1015).

3.4.2. 3-Methylbismoryangonin (2)

Yellow powder; UV λ_{max} (PDA) 218, 270, 365 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; ESIMS (rel. int.) m/z 754.3 [3M+Na]⁺ (80), 510.8 [2M+Na]⁺ (100), 245.0 [M+H]⁺ (65), 730.8 [3M-H]⁻ (90), 486.6 [2M-H]⁻ (70), 243.1 [M-H]⁻ (100), HRESIMS m/z [M+H]⁺ 245.0804 (calcd for C₁₄H₁₃O₄, 245.0808).

Acknowledgements

Support of the BMBF (to P.P.) and of MOST (2010DFA31610 to WHL.) is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2012.06.003>.

References

- Aly, A.H., Edrada-Ebel, R.A., Indriani, I.D., Wray, V., Müller, W.E.G., Totzke, F., Zirrgiebel, U., Schächtele, C., Kubbutat, M.H.G., Lin, W.H., Proksch, P., Ebel, R., 2008. Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *J. Nat. Prod.* 71, 972–980.
- Aly, A.H., Debbab, A., Kjer, J., Proksch, P., 2010. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Divers.* 41, 1–16.
- Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P., 2011a. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1829–1845.
- Aly, A.H., Debbab, A., Proksch, P., 2011b. Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Divers.* 50, 3–19.
- Barbosa-Filho, J.M., Yoshida, M., Gottlieb, O.R., Barbosa, R., Giesbrecht, A.M., Young, M.C., 1987. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* 26, 2615–2617.
- Boukouvalas, J., Wang, J.X., 2008. Structure revision and synthesis of a novel labdane diterpenoid from *Zingiber ottensii*. *Org. Lett.* 10, 3397–3399.
- Broadbent, D., Mabelis, R.P., Spencer, H., 1975. 3,6,8-Trihydroxy-1-methylxanthone – an antibacterial metabolite from *Penicillium patulum*. *Phytochemistry* 14, 2082–2083.
- Bu'Lock, J.D., Leeming, P.R., Smith, H.G., 1962. Pyrones. Part II. Hispidin, a new pigment and precursor of a fungus "lignin". *J. Chem. Soc.* 2085–2089.
- Cheplick, G.P., Clay, K., Marks, S., 1989. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses *Lolium perenne* and *Festuca arundinacea*. *New Phytol.* 111, 89–97.
- Debbab, A., Aly, A.H., Lin, W.H., Proksch, P., 2010. Bioactive compounds from marine bacteria and fungi. *Microb. Biotechnol.* 3, 544–563.
- Debbab, A., Aly, A.H., Proksch, P., 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Divers.* 49, 1–12.
- Dharmaratne, H.R.W., Nanayakkara, N.P.D., Khan, I.A., 2002. Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry* 59, 429–433.
- Eyberger, A.L., Dondapati, R., Porter, J.R., 2006. Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* 68, 1121–1124.
- Fiasson, J.L., 1982. Distribution of styrylpyrones in the basidiocarps of various Hymenochaetales. *Biochem. Syst. Ecol.* 10, 289–296.
- Freire, F.C.O., 2005. An updated list of plant fungi from Ceará State (Brazil) – I Hymenycetes. *Revista Ciênc. Agron.* 36, 364–370.
- Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4581–4589.
- Hargreaves, J., Park, J.O., Ghisalberti, E.L., Sivasithamparan, K., Skelton, B.W., White, A.H., 2002. New chlorinated diphenyl ethers from an *Aspergillus* species. *J. Nat. Prod.* 65, 7–10.
- He, X.G., Lin, L.Z., Lian, L.Z., 1997. Electrospray high performance liquid chromatography–mass spectrometry in phytochemical analysis of Kava (*Piper methysticum*) extract. *Planta Med.* 63, 70–74.
- Hensens, O.D., Ondeyka, J.G., Dombrowski, A.W., Ostlind, D.A., Zink, D.L., 1999. Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from a *Nodulisporium* sp. *Tetrahedron Lett.* 40, 5455–5458.
- Johanningsmeier, S.D., Harris, G.K., 2011. Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2, 181–201.
- Kimura, Y., Kozawa, M., Baba, K., Hata, K., 1983. New constituents of roots of *Polygonum cuspidatum*. *J. Med. Plants Res.* 48, 164–168.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W., Stalpers, J.A., 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed., p. 505.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A.H., Proksch, P., 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.* 5, 479–490.
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *J. Nat. Prod.* 71, 159–162.
- Kusari, S., Zühlke, S., Kosuth, J., Cellarova, E., Spiteller, M., 2009. Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. *J. Nat. Prod.* 72, 1825–1835.
- Lee, H.J., Lee, J.H., Hwang, B.Y., Kim, H.S., Lee, J.J., 2002. Fungal metabolites, asterric acid derivatives inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced tube formation of HUVECs. *J. Antibiot.* 55, 552–556.
- Lee, H.J., Kim, W.C., Jeon, S.Y., Kim, J.W., Joo, G.J., Rhee, I.K., Song, K.S., 2003. Growth inhibitors of soybean seedling from *Bacillus* sp. IJ-31. *Agric. Chem. Biotechnol.* 46, 100–104.
- Lingqi, Z., Bo, G., Haiyan, L., Songrong, Z., Hua, S., Su, G., Rongcheng, W., 2000. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. *Chin. Trad. Herbal Drugs* 31, 805–807.
- Mahmoodian, A., Stickings, C.E., 1964. Metabolites of *Penicillium frequentans* Westling: isolation of sulochrin, asterric acid, (+)-bisdechlorogeoquin and two new substituted anthraquinones, questin and questinol. *Biochem. J.* 92, 369–378.
- Martin, J.F., 2000. Molecular control of expression of penicillin biosynthesis genes in fungi: regulatory proteins interact with a bidirectional promoter region. *J. Bacteriol.* 182, 2355–2362.
- Meinke, P.T., Colletti, S.L., Fisher, M.H., Wyvratt, M.J., Shih, T.L., Ayer, M.B., Li, C., Lim, J., Ok, D., Salva, S., Warmke, L.M., Zakson, M., Michael, B.F., deMontigny, P., Ostlind, D.A., Fink, D., Drag, M., Schmatz, D.M., Shoop, W.L., 2009. Discovery of the development candidate *N*-tert-butyl nodulisporamide: a safe and efficacious once monthly oral agent for the control of fleas and ticks on companion animals. *J. Med. Chem.* 52, 3505–3515.
- Naik, B.S., Shashikala, J., Krishnamurthy, Y.L., 2008. Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. *Fungal Ecol.* 1, 89–93.
- Ohashi, H., Akiyama, H., Nishikori, K., Mochizuki, J.I., 1992. Asterric acid, a new endothelin binding inhibitor. *J. Antibiot.* 45, 1684–1685.
- Okane, I., Lumyong, S., Nakagiri, A., Ito, T., 2003. Extensive host range of an endophytic fungus, *Guignardia endophyllicola* (anamorph: *Phyllosticta capitulensis*). *Mycoscience* 44, 353–363.
- Ondeyka, J.G., Helms, G.L., Hensens, O.D., Goetz, M.A., Zink, D.L., Tsipouras, A., Shoop, W.L., Slayton, L., Dombrowski, A.W., Polishook, J.D., Ostlind, D.A., Tsou, N.N., Ball, R.G., Singh, S.B., 1997. Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. isolation, structure determination, and chemical transformations. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 8809–8816.
- Popay, A.J., Townsend, R.J., Fletcher, L.R., 2003. The effect of endophyte (*Neotyphodium uncinatum*) in meadow fescue on grass grub larvae. *N. Z. Plant Protect.* 56, 123–128.
- Priti, V., Ramesha, B.T., Singh, S., Ravikanth, G., Ganeshaiah, K.N., Suryanarayanan, T.S., Shaanker, R.U., 2009. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites? *Curr. Sci.* 97, 477–478.
- Proksch, P., Putz, A., Ortlepp, S., Kjer, J., Bayer, M., 2010. Bioactive natural products from marine sponges and fungal endophytes. *Phytochem. Rev.* 9, 475–489.
- Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N., Spiteller, M., 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *J. Nat. Prod.* 68, 1717–1719.
- Puri, S.C., Nazir, A., Chawla, R., Arora, R., Riyaz-Ul-Hasan, S., Amna, T., Ahmed, B., Verma, V., Singh, S., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Sharma, R.K., Qazi, G.N., 2006. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *J. Biotechnol.* 122, 494–510.
- Shibata, T., Shibuya, T., Doi, K., 1972. The occurrence of yangonin, 4-methoxy-6-(*p*-methoxystyryl)-2-pyrone, in Ranunculaceae. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 45, 930–931.
- Shoop, W.L., Gregory, L.M., Zakson-Aiken, M., Michael, B.F., Haines, H.W., Ondeyka, J.G., Meinke, P.T., Schmatz, D.M., 2001. Systemic efficacy of nodulisporic acid against fleas on dogs. *J. Parasitol.* 87, 419–423.
- Singh, Y.N., 1992. Kava: an overview. *J. Ethnopharmacol.* 37, 13–45.
- Stierle, A., Strobel, G.A., Stierle, D., 1993. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260, 214–216.
- Strobel, G., Daisy, B., 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 491–502.
- Tan, R.X., Zou, W.X., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18, 448–459.
- Xu, J., Ebada, S.S., Proksch, P., 2010. Pestalotiopsis a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. *Fungal Divers.* 44, 15–31.
- Yu, D.Q., 1999. Recent works on anti-tumor constituent from Annonaceae plants in China. *Pure Appl. Chem.* 71, 1119–1122.

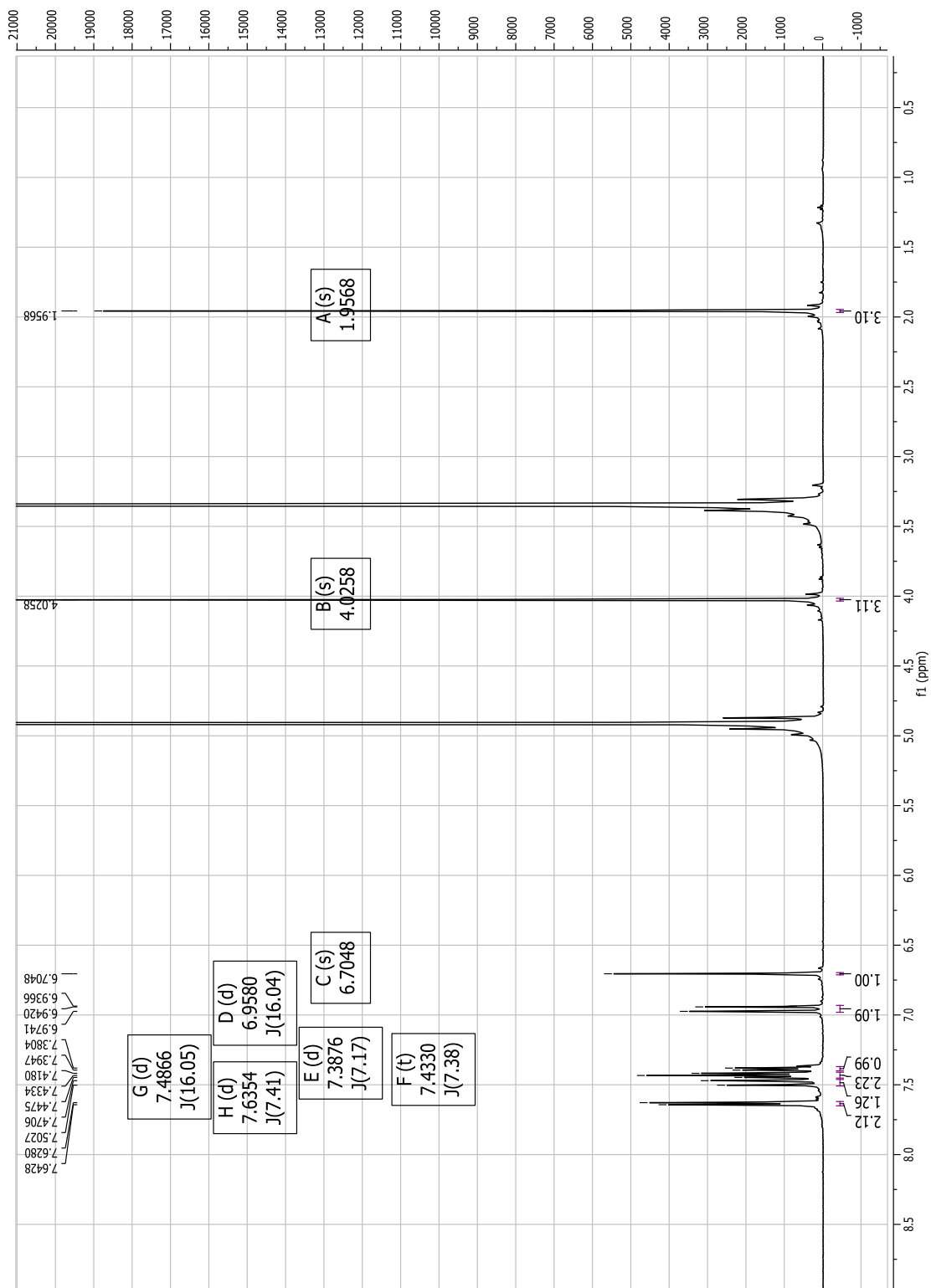
4.1.2 Supporting information of compounds isolated from *Penicillium glabrum*

| | |
|---|----|
| S1. General information of 3-methyl-desmethoxyyangonin (1), including RT, UV and mass spectra..... | 20 |
| S1.1. ¹ H NMR spectrum of 3-methyl-desmethoxyyangonin (1) (500 MHz, MeOD)..... | 21 |
| S1.1.1. Enlargement of the aromatic region (6 - 8 ppm)..... | 22 |
| S1.1.2. Enlargement of the aliphatic region (1 - 4.4 ppm)..... | 22 |
| S1.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of 3-methyl-desmethoxyyangonin (1) (500 MHz, MeOD)..... | 23 |
| S1.2.1. Enlargement of the aromatic region (6 - 8 ppm)..... | 24 |
| S1.3. HMQC spectrum of 3-methyl-desmethoxyyangonin (1) (300 and 75 MHz, MeOD)..... | 25 |
| S1.3.1. Enlargement of the aromatic region (6 - 8 ppm)..... | 26 |
| S1.4. HMBC spectrum of 3-methyl-desmethoxyyangonin (1) (300 and 75 MHz, MeOD)..... | 27 |
| S1.4.1. Enlargements of the aliphatic and aromatic region..... | 28 |
| S2. General information of 3-methyl-bisnoryangonin (2), including RT, UV and mass spectra..... | 29 |
| S2.1. ¹ H NMR spectrum of 3-methyl-bisnoryangonin (2) (500 MHz, MeOD)..... | 30 |
| S2.1.1. Enlargement of the aromatic region (6 - 8 ppm)..... | 31 |
| S2.2. ¹³ C NMR spectrum of 3-methyl-bisnoryangonin (2) (75 MHz, MeOD)..... | 32 |
| S2.3. HMBC spectrum of 3-methyl-bisnoryangonin (2) (300 and 75 MHz, MeOD)..... | 33 |
| S2.3.1. Enlargement of the aliphatic region (100 ppm - 180 ppm)..... | 34 |
| S2.3.2. Enlargement of the aromatic region (100 ppm - 180 ppm)..... | 34 |
| S3. General information of asterric acid (3), including RT, UV and mass spectra..... | 35 |
| S3.1. ¹ H NMR spectrum of asterric acid (3) (500 MHz, MeOD)..... | 36 |
| S4. General information of sulochrin (4), including RT, UV and mass spectra..... | 37 |
| S4.1. ¹ H NMR spectrum of sulochrin (4) (500 MHz, MeOD)..... | 38 |
| S5. General information of indolyl-3-acetic acid (5), including RT, UV and mass spectra..... | 39 |
| S5.1. ¹ H NMR spectrum of indolyl-3-acetic acid (5) (600 MHz, MeOD) (0 ppm - 6 ppm)..... | 40 |
| S5.1. ¹ H NMR spectrum of indolyl-3-acetic acid (5) (600 MHz, MeOD) (6 ppm - 9 ppm)..... | 41 |
| S6. General information of questinol (6), including RT, UV and mass spectra..... | 42 |
| S6.1. ¹ H NMR spectrum of questinol (6) (500 MHz, MeOD)..... | 43 |

Publikation 1: Supporting Information

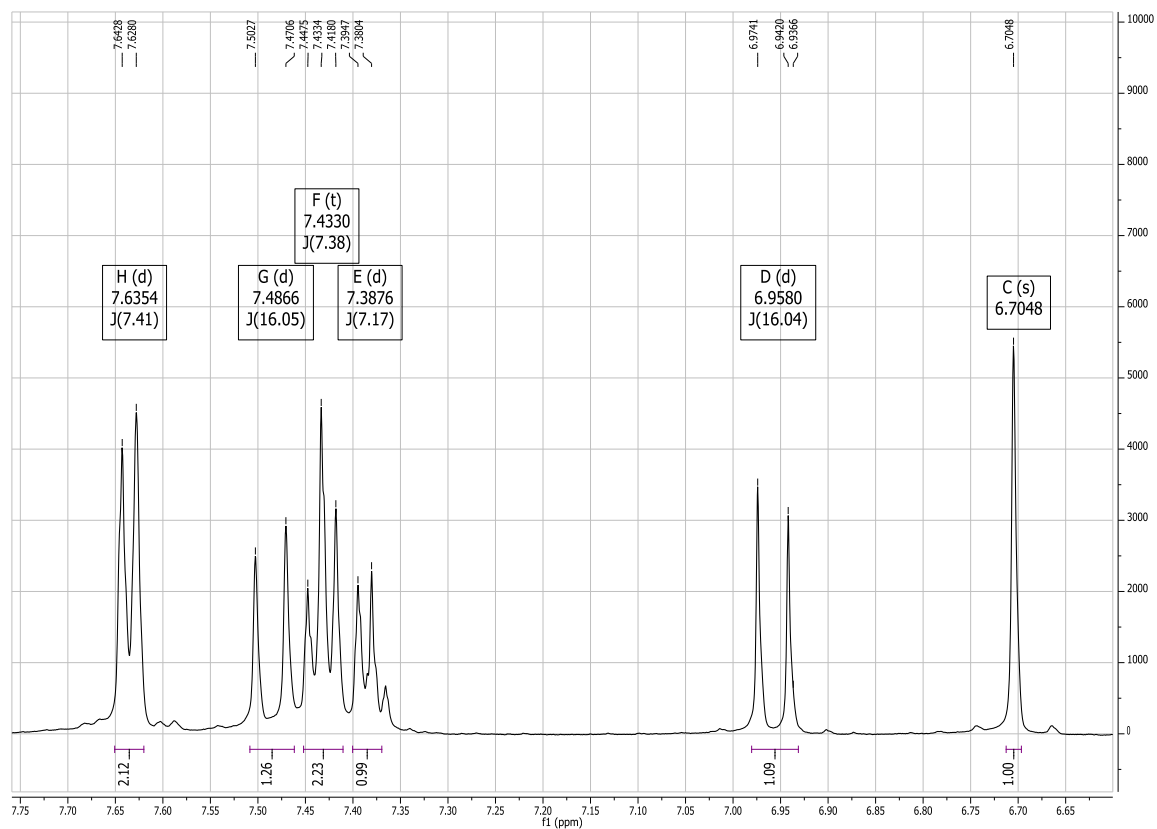
S1. General information of 3-methyl-desmethoxyyangonin (1), including RT, UV and mass spectra.

| 3-Methyl-desmethoxyyangonin | |
|------------------------------------|---|
| Synonym(s) | (<i>E</i>)-4-methoxy-3-methyl-6-styryl-2 <i>H</i> -pyran-2-one |
| Samples code | LH1, Small scale K2+3 Seph5 Semi 1+2 |
| Biological source | <i>Penicillium glabrum</i> (from <i>Punica granatum</i>) |
| Sample amount | 25.8 mg |
| Physical description | (neon)yellow |
| Molecular formula | 242 g/mol (243.1014, calcd. for C ₁₄ H ₁₃ O ₃ 243.1015) |
| Molecular weight | C ₁₅ H ₁₄ O ₃ |
| Retention time (HPLC) | 28 min |
| | UV |
| MS | Lena007 #1257 RT: 33.33 AV: 1 NL: 1.51E9 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00] |

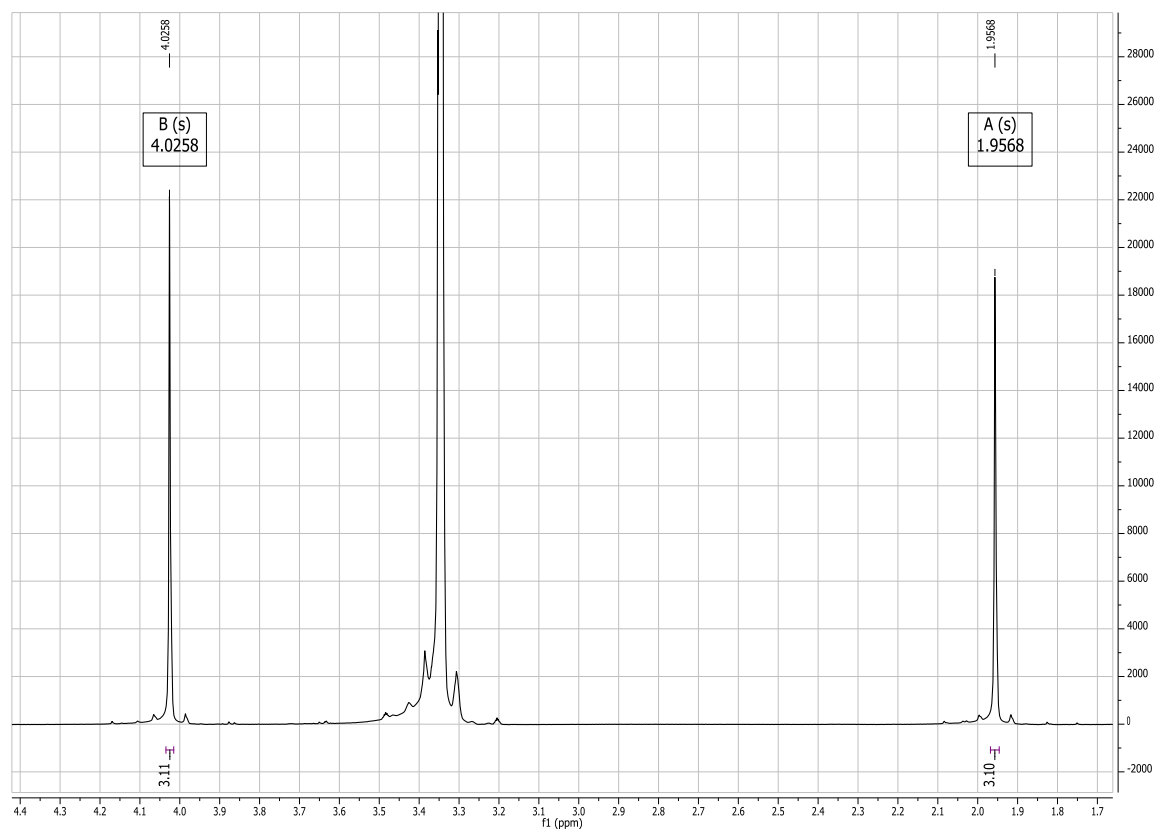


S1.1. ¹H NMR spectrum of 3-methylidesmethoxyyangonin (1) (500 MHz, MeOD).

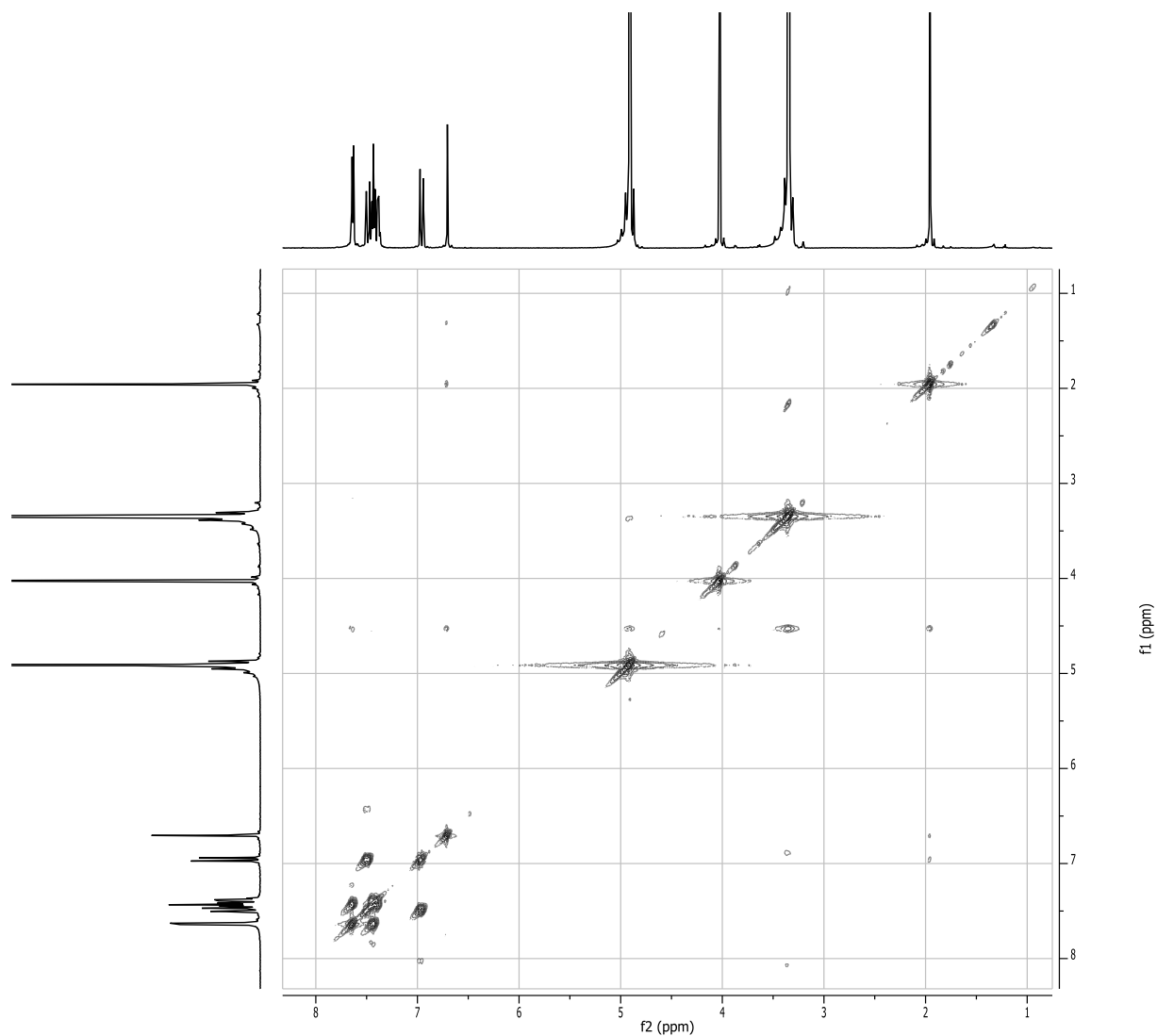
Publikation 1: Supporting Information



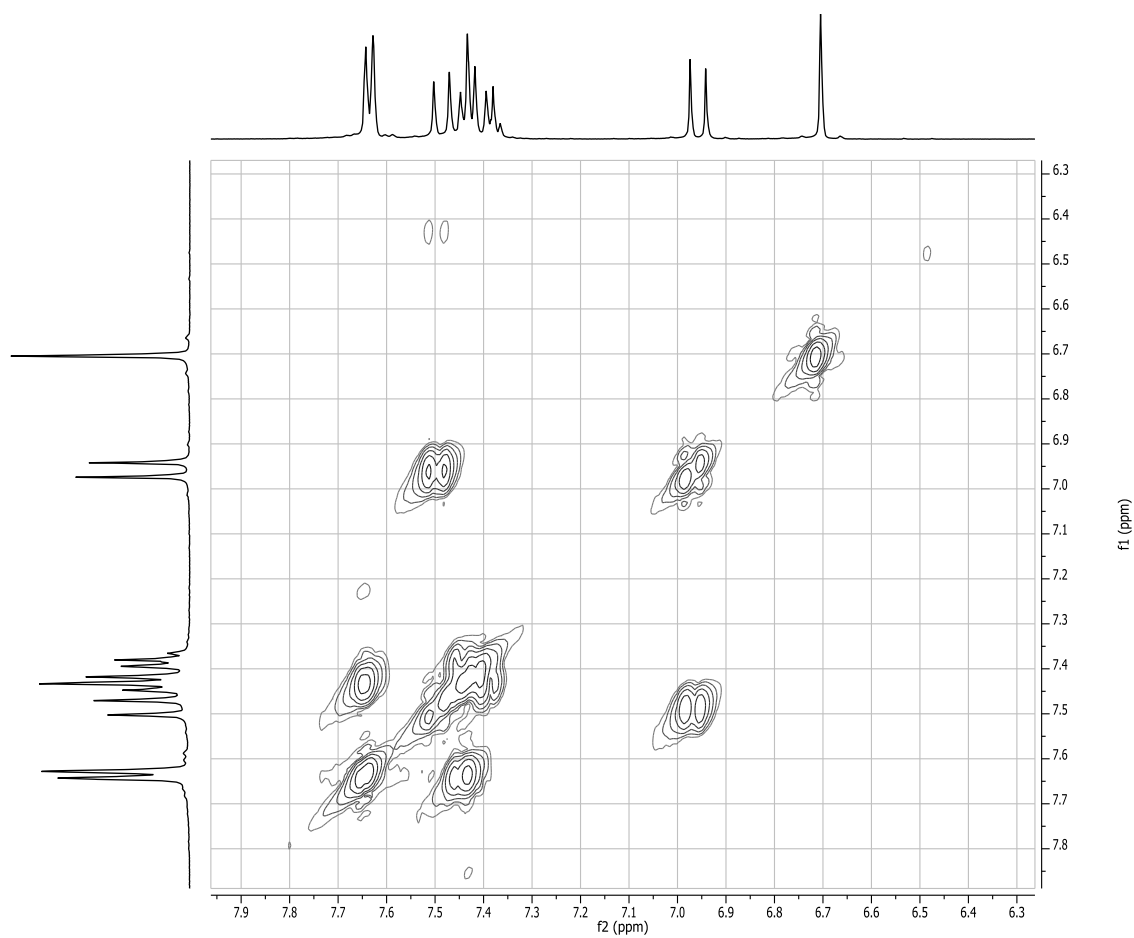
S1.1.1. Enlargement of the aromatic region (6 – 8ppm).



S1.1.2. Enlargement of the aliphatic region (1 – 4.4 ppm).



S1.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of 3-methyldesmethoxyyangonin (1) (500 MHz, MeOD).



S1.2.1. Enlargement of the aromatic region (6 – 8 ppm).

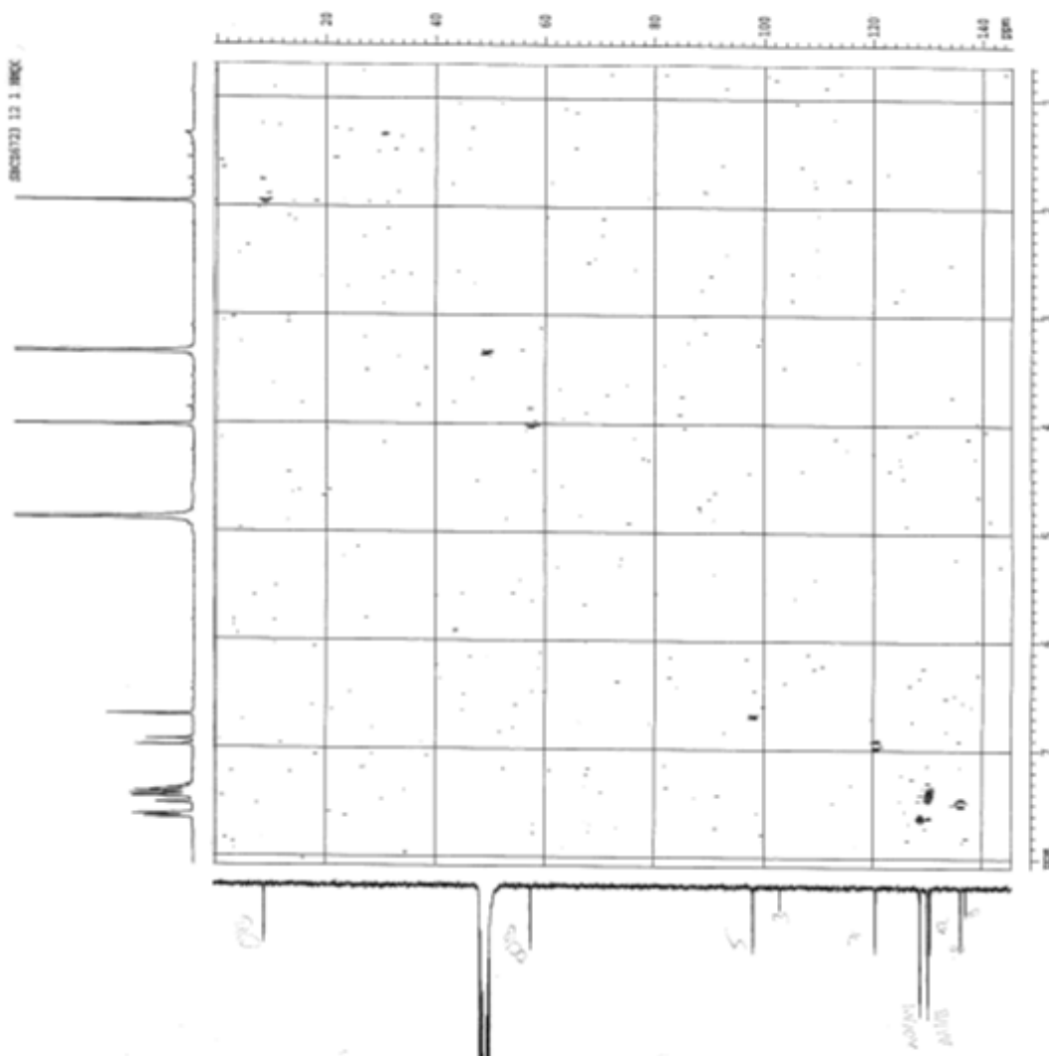
Current Data Parameters
 NAME DMS03723
 EXPNO 12
 PROCNO 1

F1 - Acquisition parameters
 MDI 4
 ID 258
 F1F2 75.47413 MHz
 F1RES 56.503316 Hz
 SFO 183.1518 ppm

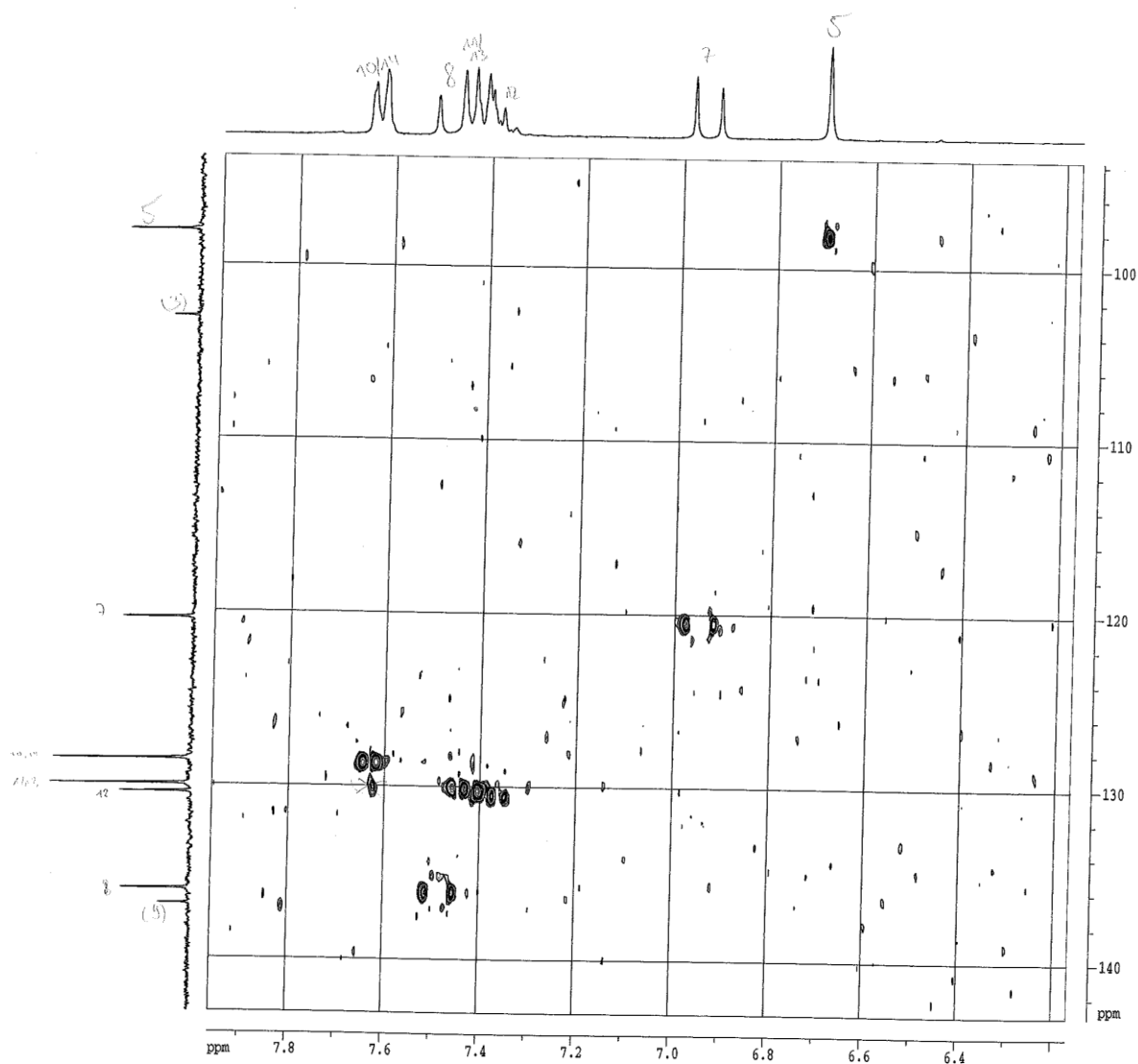
F2 - Processing parameters
 SI 2048
 SF 304.1299514 MHz
 QF 0.2328
 ISF 3
 LB 0.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F1 - Processing parameters
 SI 2048
 SF 75.4676337 MHz
 QF 0.2328
 ISF 3
 LB 0.00 Hz
 GB 0

2D NMR plot parameters
 C12 24.00 cm
 C11 24.00 cm
 F1F1A0 8.083 ppm
 F1F1A 2425.50 Hz
 F1F1B1 8.087 ppm
 F1F1B 256.34 Hz
 F1F1A0 145.311 ppm
 F1F1A 33764.31 Hz
 F1F1B1 -8.559 ppm
 F1F1B -38.40 Hz
 F2F1A0 0.34965 ppm/cm
 F2F1A 110.98820 Hz/cm
 F2F1B0 7.25132 ppm/cm
 F2F1B 550.23523 Hz/cm



S1.3. HMQC spectrum of 3-methyldesmethoxyyangonin (1) (300 and 75 MHz, MeOD).



S1.3.1. Enlargement of the aromatic region (6 – 8 ppm).

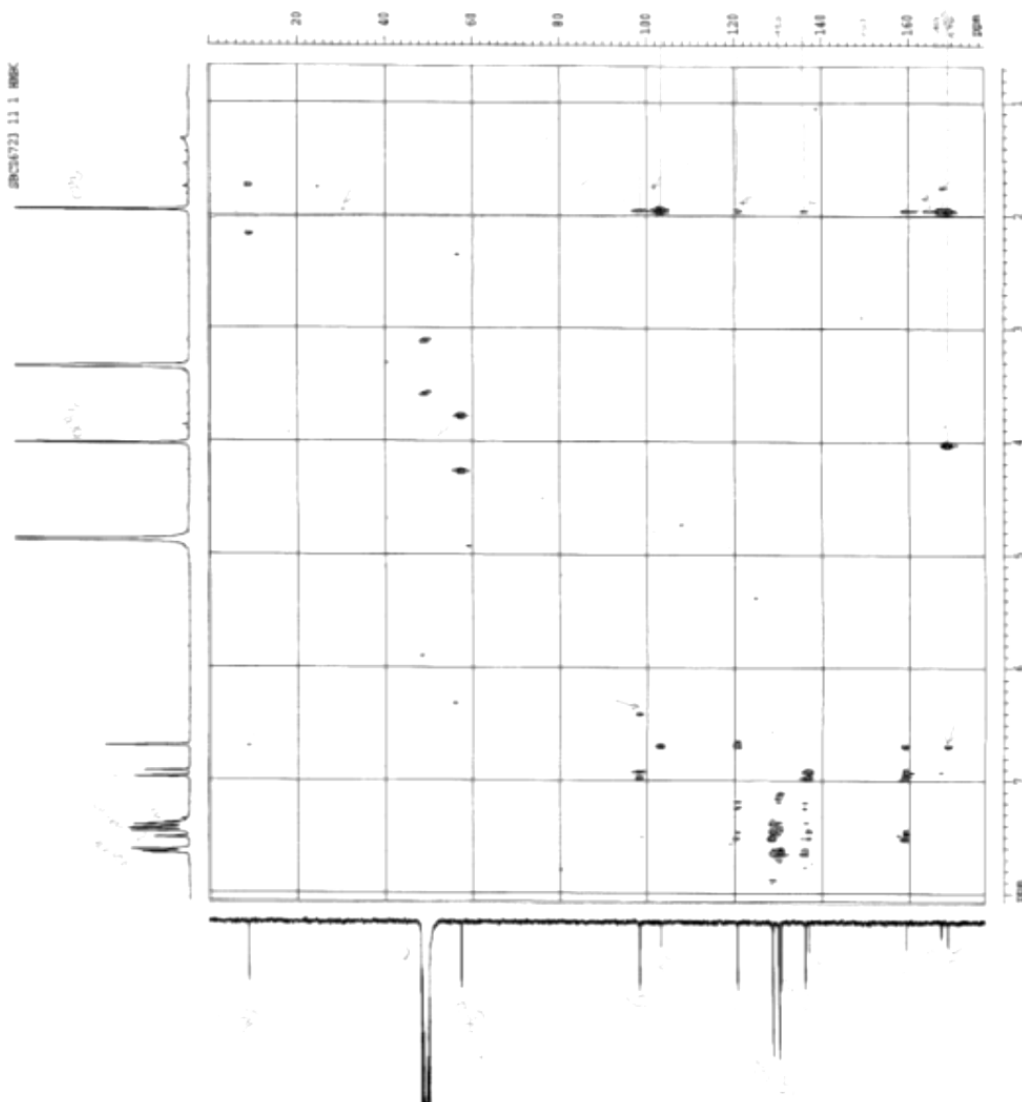
Current Data Parameters
 NAME DMSY23
 EXPNO 11
 PROCNO 1

F1 - Acquisition parameters
 NUC1 13
 PULPROG zgpg30
 F1FREQ 75.4676415 MHz
 F1RES 16.745356 Hz
 SFO 249.823 ppm

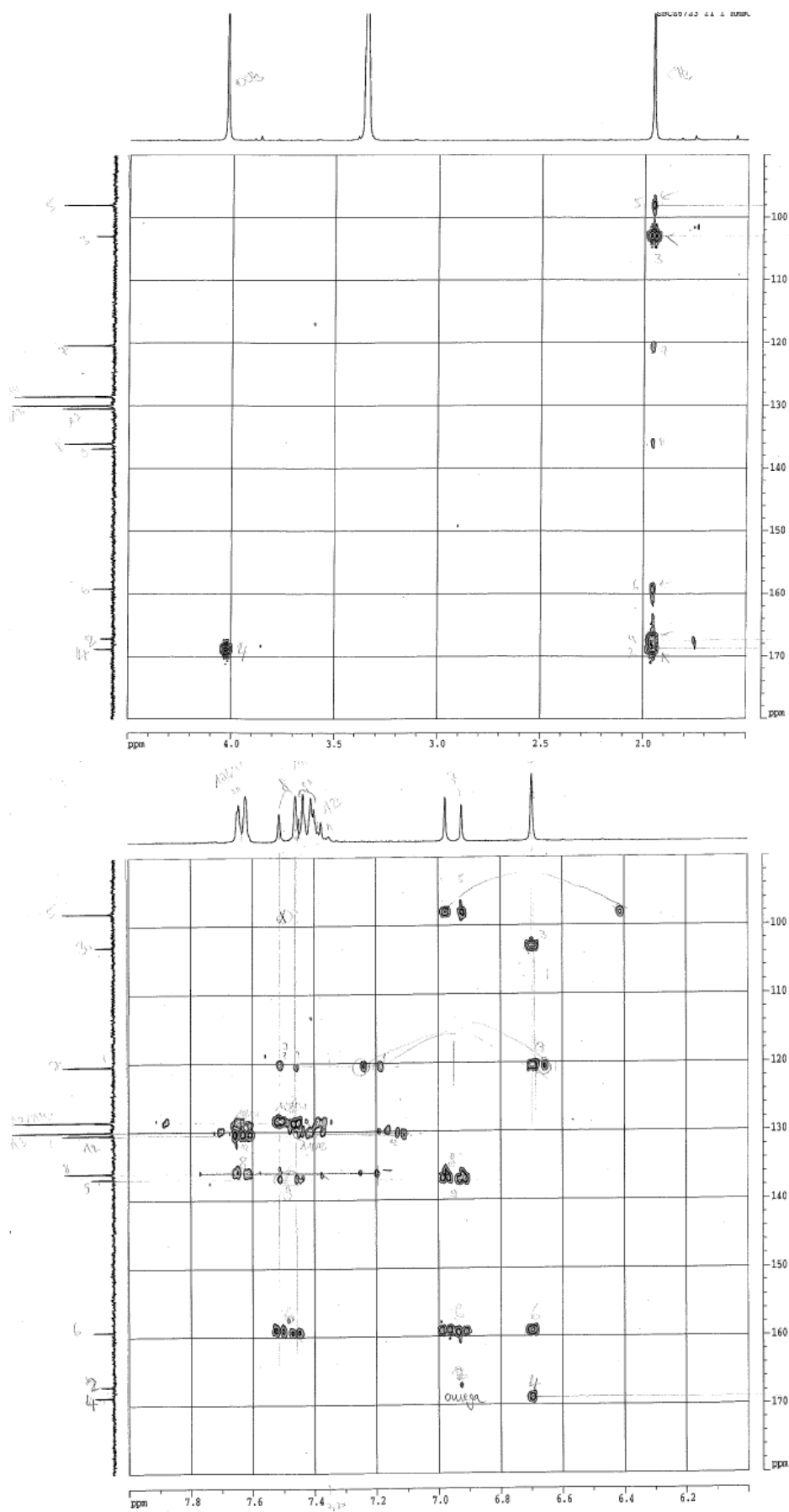
F2 - Processing parameters
 SI 16
 SF 100.628125 MHz
 SFO 249.823 ppm
 SE 0
 SF 75.4676415 MHz
 SFO 249.823 ppm
 SE 0
 SF 100.628125 MHz
 SFO 249.823 ppm
 SE 0

F3 - Processing parameters
 SI 16
 SF 100.628125 MHz
 SFO 249.823 ppm
 SE 0
 SF 75.4676415 MHz
 SFO 249.823 ppm
 SE 0
 SF 100.628125 MHz
 SFO 249.823 ppm
 SE 0

2D NMR plot parameters
 C13 20.00 cm
 C13 20.00 cm
 F2F1AQ 8.072 ppm
 F1LO 2422.56 Hz
 F2F1B1 0.676 ppm
 F2F1 202.79 Hz
 F1F1AQ 177.278 ppm
 F1LO 13378.79 Hz
 F1F1B1 -6.424 ppm
 F1F1 31.25 Hz
 F2F1MCH 0.36988 ppm/cm
 F2F1BCH 116.9823 Hz/cm
 F1F1MCH 8.86643 ppm/cm
 F1F1BCH 676.50214 Hz/cm



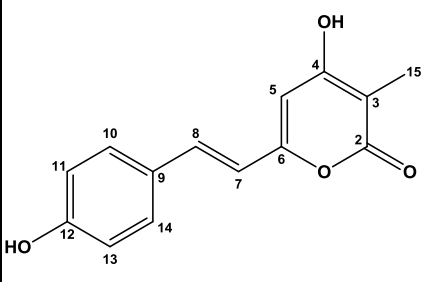
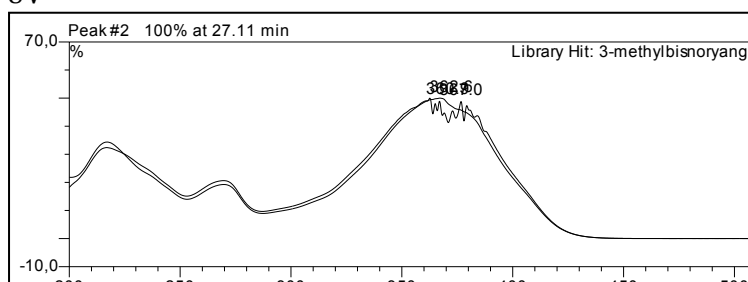
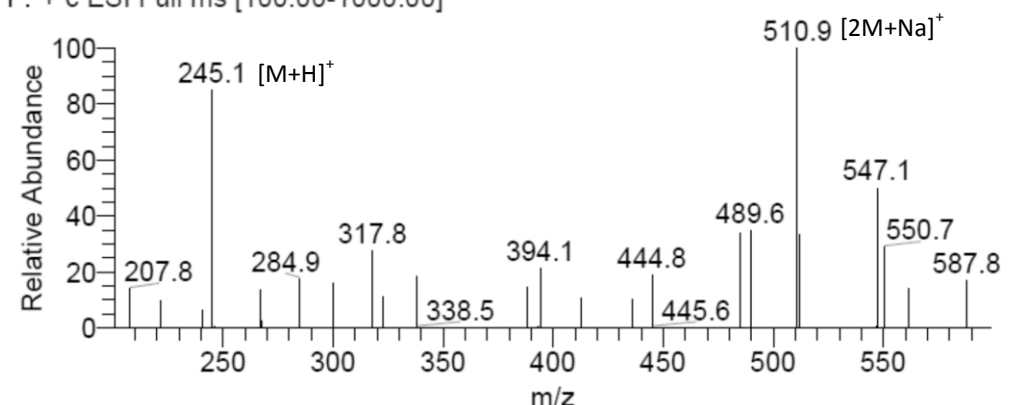
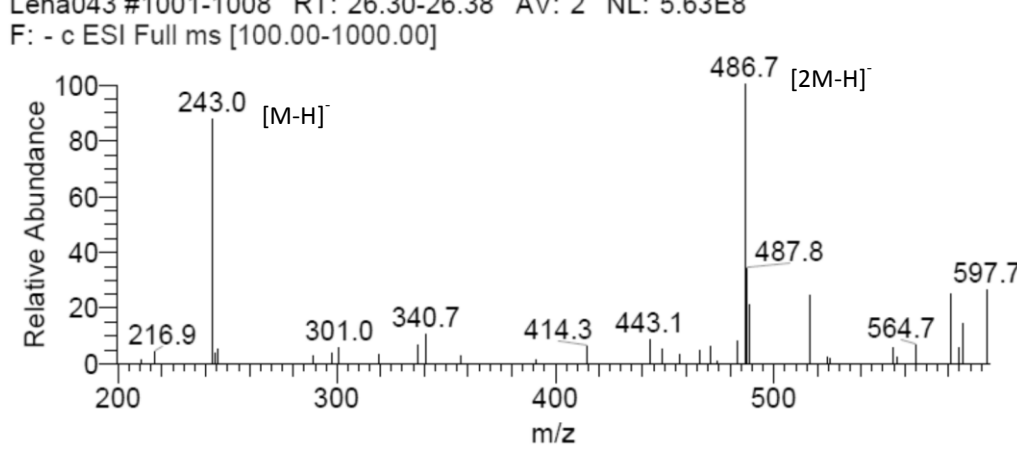
S1.4. HMBC spectrum of 3-methyldesmethoxyyangonin (1) (300 and 75 MHz, MeOD).

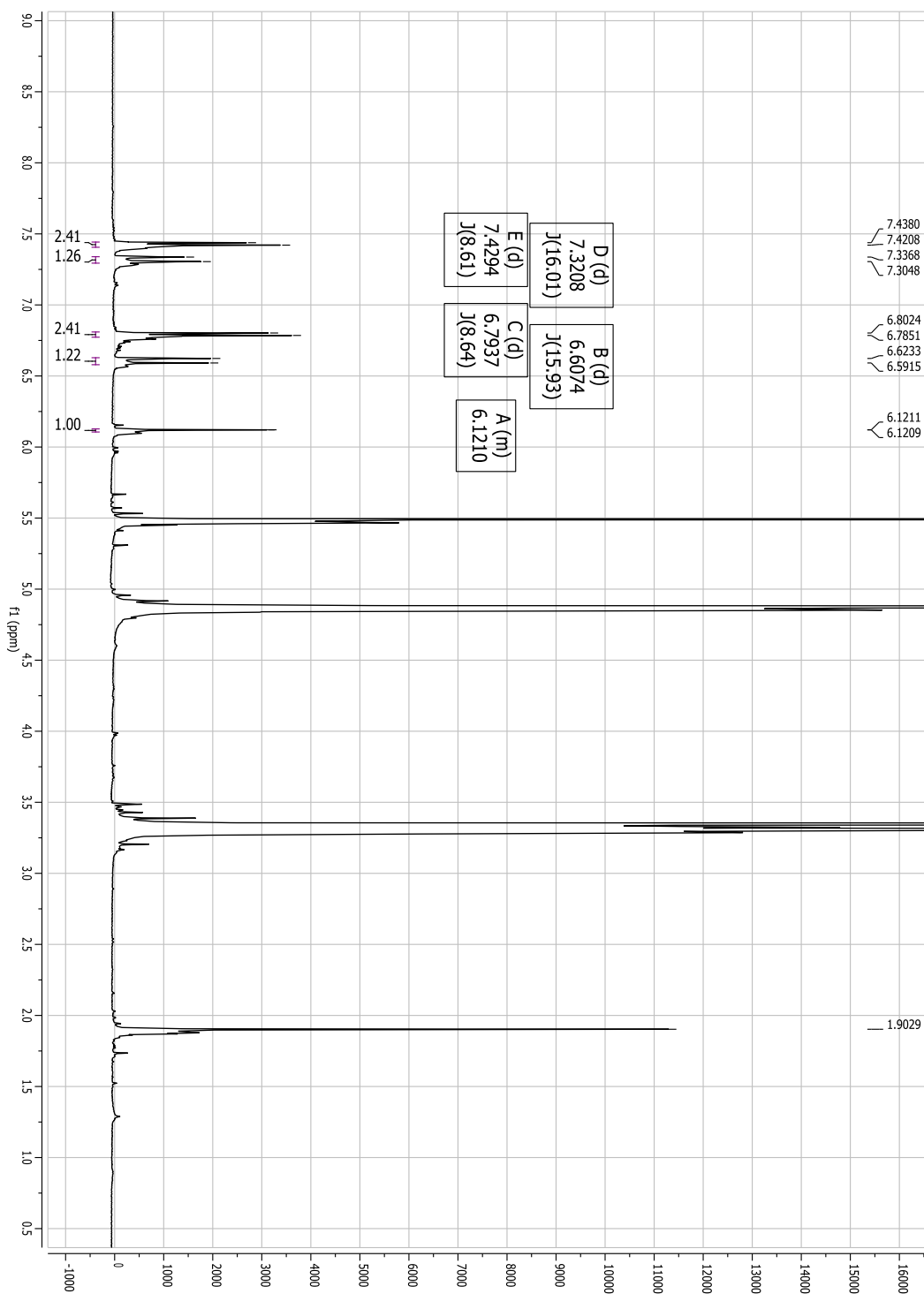


S1.4.1. Enlargements of the aliphatic and aromatic region.

Publikation 1: Supporting Information

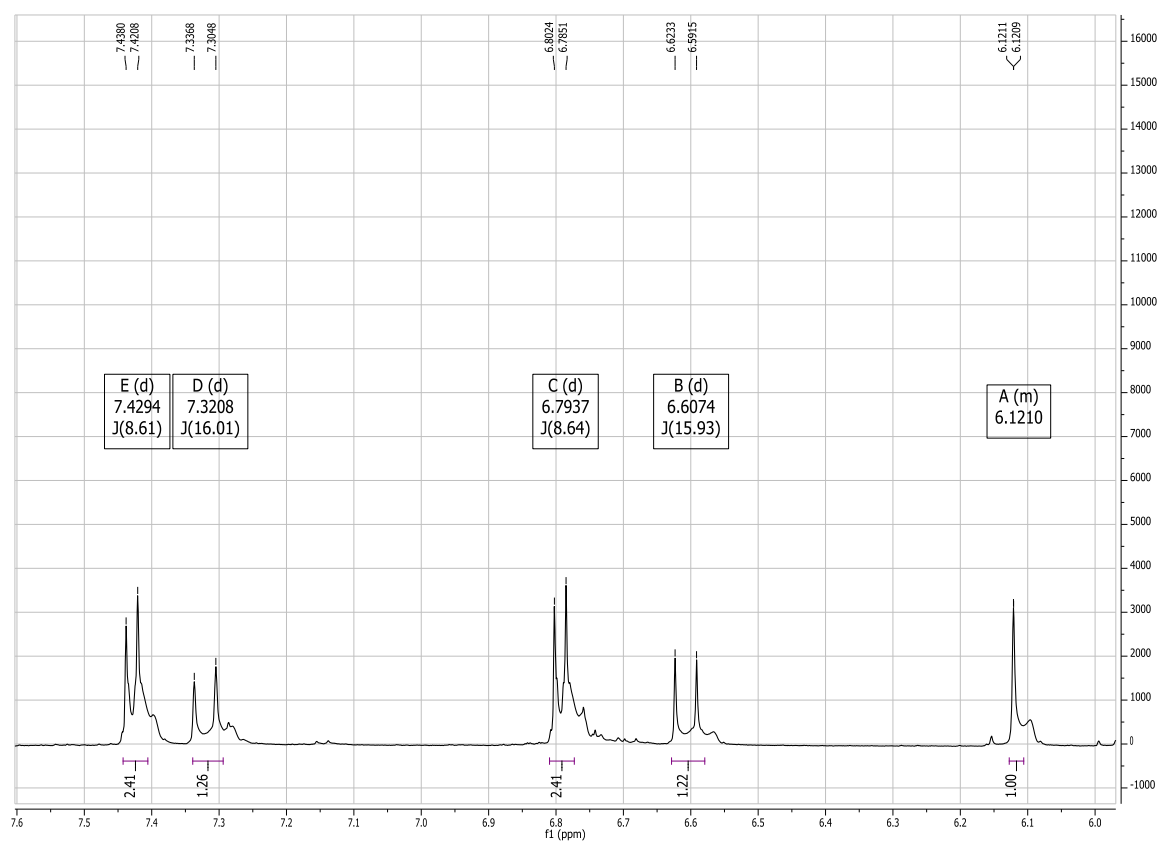
S2. General information of 3-methylbisnoryangonin (2), including RT, UV and mass spectra.

| 3-Methylbisnoryangonin | |
|--|--|
| Synonym(s) Samples code Biological source Sample amount Physical description Molecular formula Molecular weight Retention time (HPLC) | (<i>E</i>)-4-hydroxy-6-(4-hydroxystyryl)-3-methyl-2 <i>H</i> -pyran-2-one V7 S5S3 Semi4 <i>Penicillium glabrum</i> (from <i>Punica granatum</i>) 1.1 mg Yellow brown powder 244 g/mol (245.0804, calcd. for C ₁₄ H ₁₃ O ₄ 245.0808) C ₁₄ H ₁₂ O ₄ 26 min |
|  | UV  |
| MS | <p>Lena043 #1001 RT: 26.26 AV: 1 NL: 5.33E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena043 #1001-1008 RT: 26.30-26.38 AV: 2 NL: 5.63E8 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



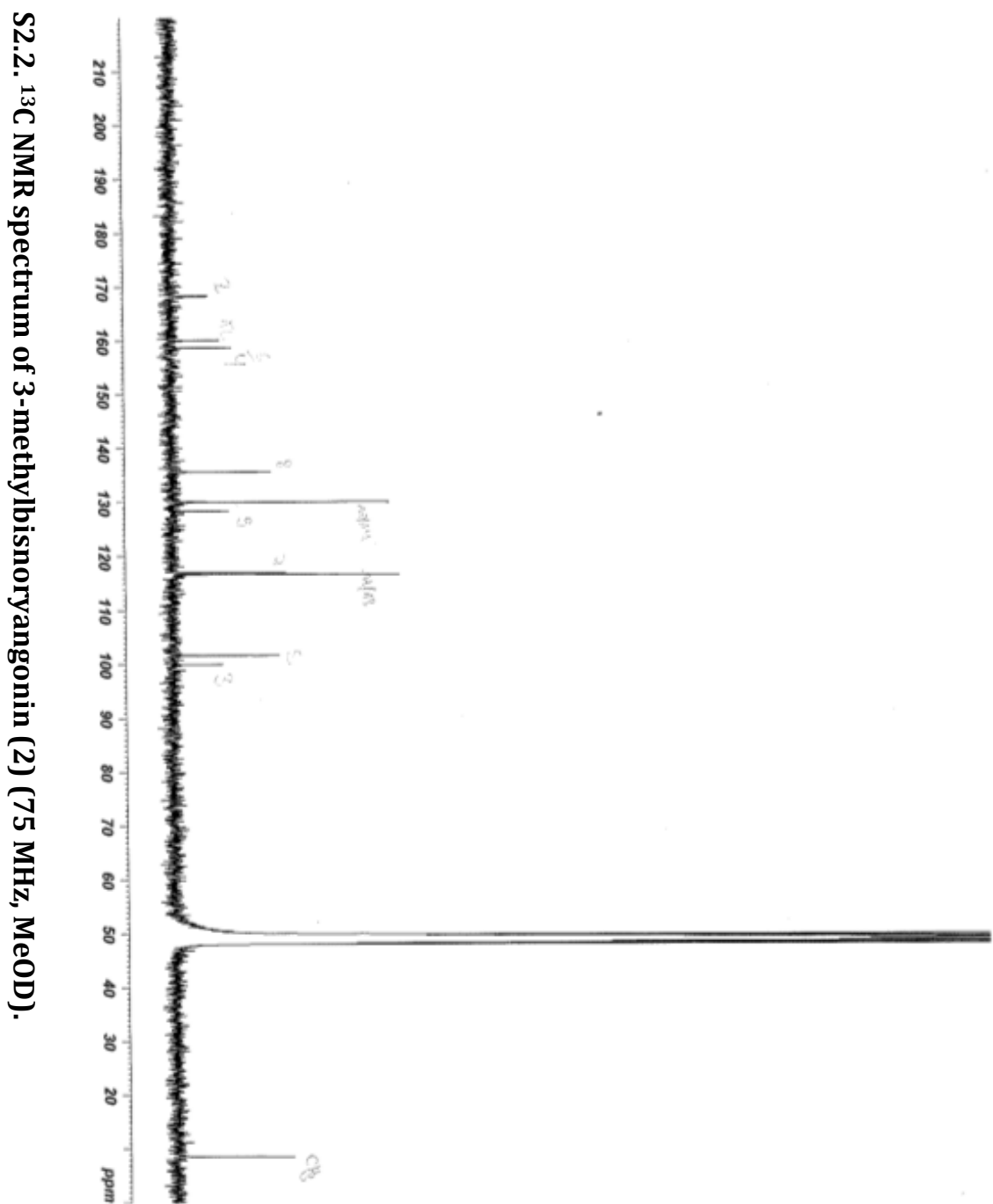
S2.1. ¹H NMR spectrum of 3-methylbisanoranganin (2) (500 MHz, MeOD).

Publikation 1: Supporting Information



S2.1.1. Enlargement of the aromatic region (6 - 8 ppm).

SB CZ7608 22 1 Hammerschmidt



CHANNEL F2: 131
 F2 - Acquisition Parameters
 Name: SB CZ7608 22 1
 Type: 1D
 Date_Time: 2022.06.22
 Time: 6.22
 Instrument: spect
 Processor: waltz16
 Acquisition Mode: 2D
 Resolution: 0.30000000
 F2 - Processing parameters
 Name: SB CZ7608 22 1
 Date_Time: 2022.06.22
 Time: 6.22
 Processing Mode: 1D
 Resolution: 0.30000000
 F2 - Reference parameters
 Name: SB CZ7608 22 1
 Date_Time: 2022.06.22
 Time: 6.22
 Processing Mode: 1D
 Resolution: 0.30000000

S2.2. ¹³C NMR spectrum of 3-methylbismoryngonin (2) (75 MHz, MeOD).

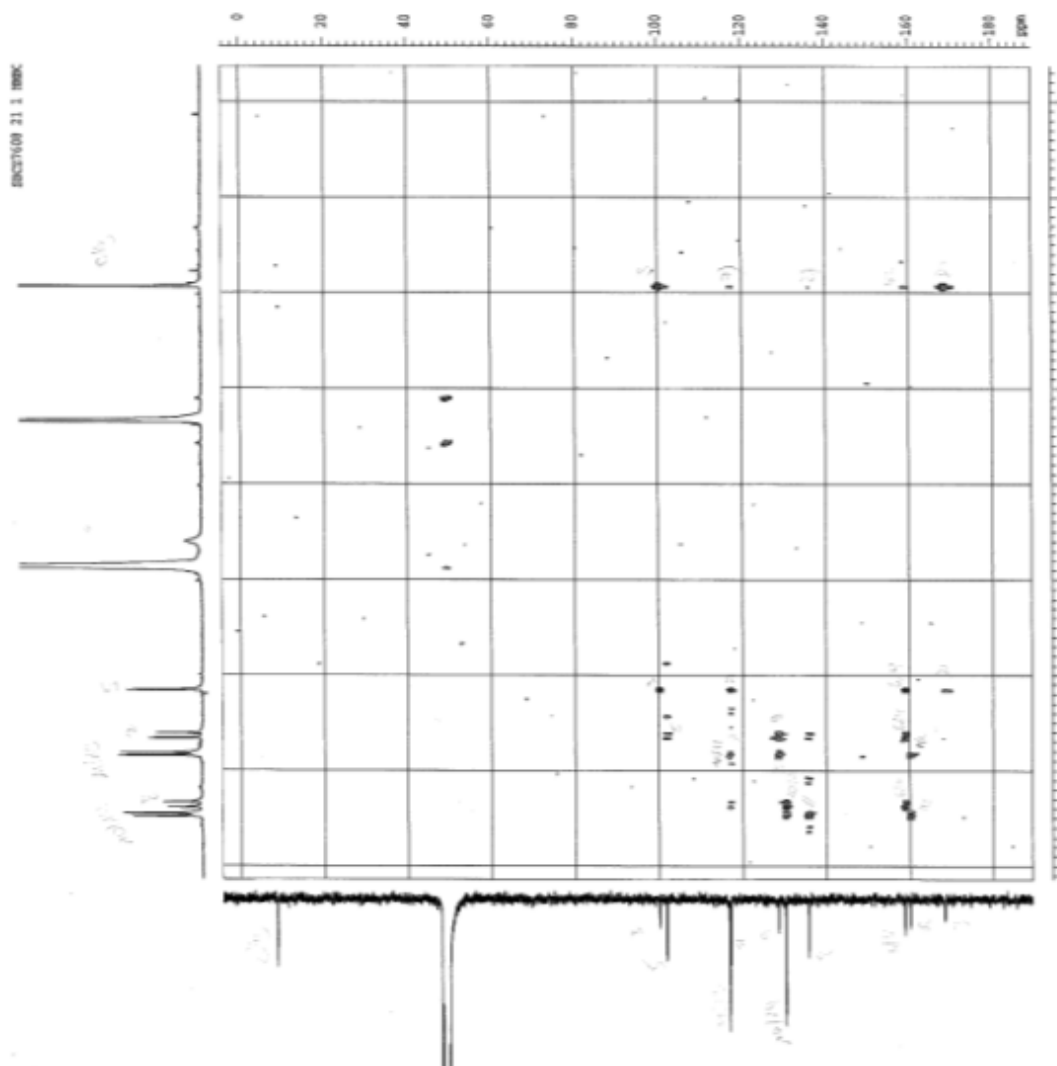
Current Data Parameters
 NAME BKCT109
 EXPNO 21
 PROCNO 1

F1 - Acquisition parameters
 NSD 2
 DS 256
 SFO1 75.47582 MHz
 F10MS 75.763354 Hz
 QM 240.023 ppm

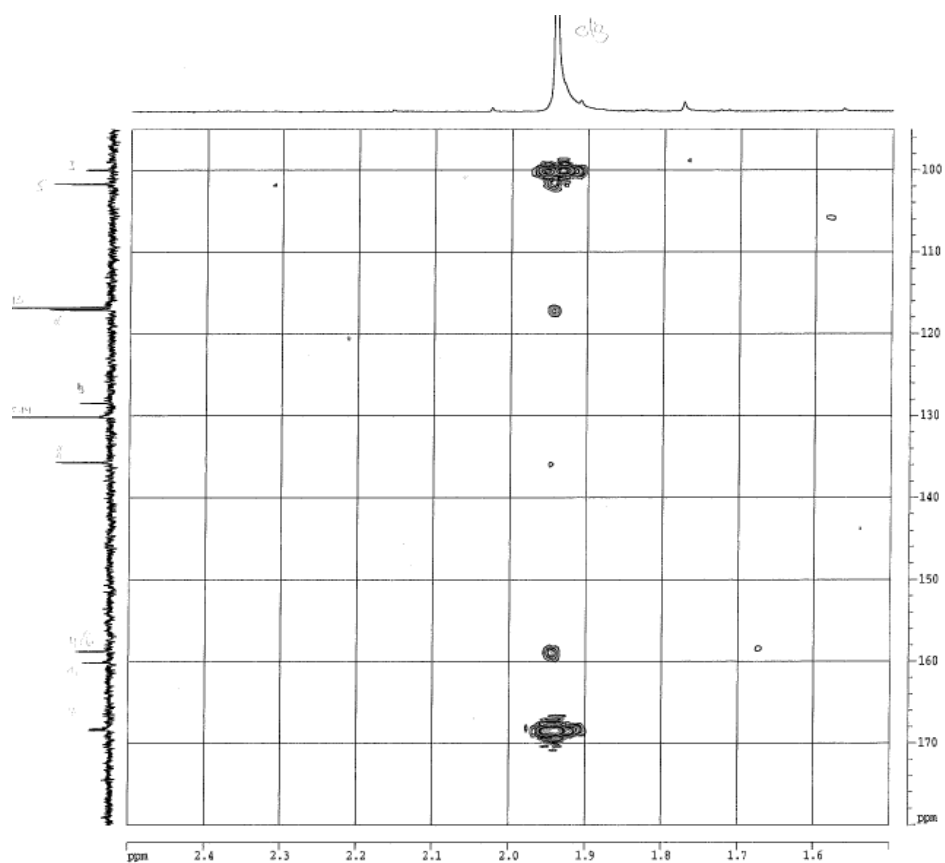
F2 - Processing parameters
 SI 2048
 SF 300.129157 MHz
 NVM 5238
 OSB 0
 LA 6.00 Hz
 GB 0
 PC 1.40

F3 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 75.4758257 MHz
 NVM 5238
 OSB 0
 LA 6.00 Hz
 GB 0

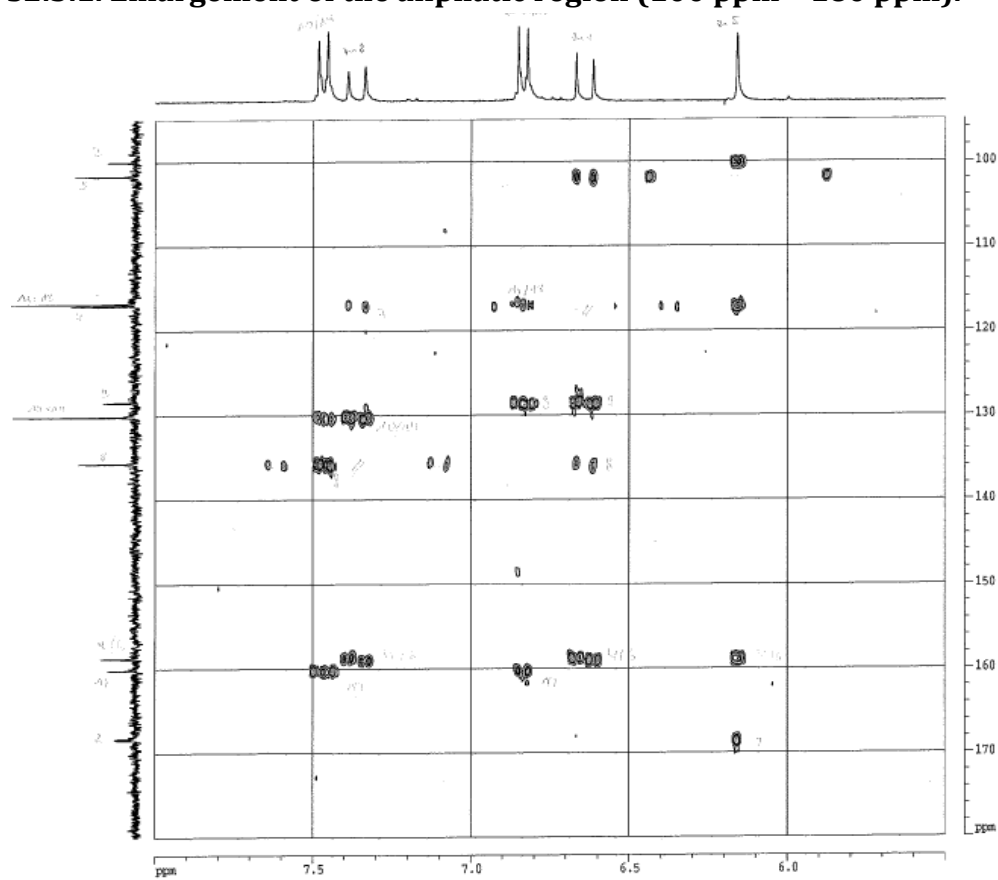
2D NMR plot parameters
 CK2 20.00 cm
 CK3 20.00 cm
 F2F60 6.337 ppm
 F2F60 2442.14 Hz
 F2F60 -6.372 ppm
 F2F60 -211.73 Hz
 F2F60 189.390 ppm
 F2F60 14332.80 Hz
 F2F60 -4.678 ppm
 F2F60 -337.95 Hz
 F2F60 0.42144 ppm/cm
 F2F60 127.49364 Hz/cm
 F2F60 9.49335 ppm/cm
 F2F60 931.33725 Hz/cm



S2.3. HMBC spectrum of 3-methylbismoryngonin (2) (300 and 75 MHz, MeOD).



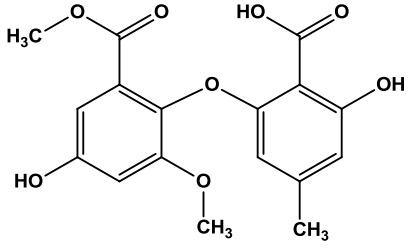
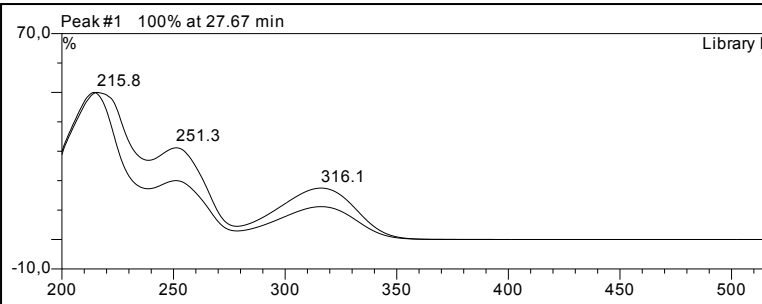
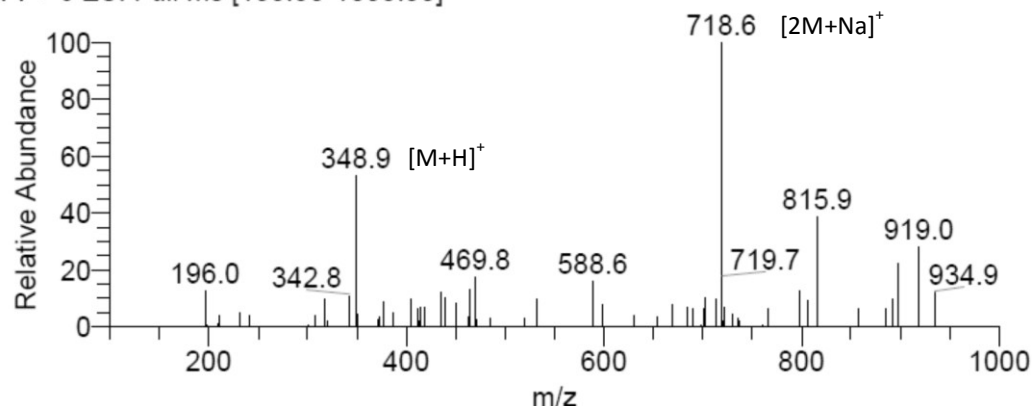
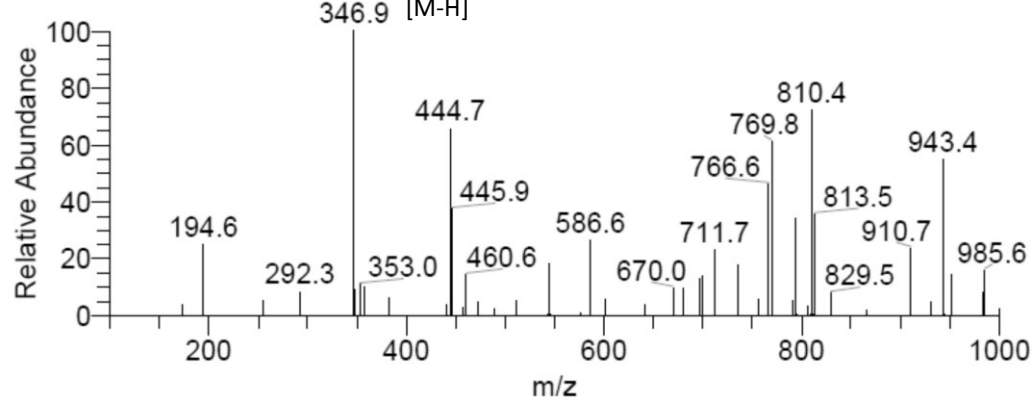
S2.3.1. Enlargement of the aliphatic region (100 ppm - 180 ppm).

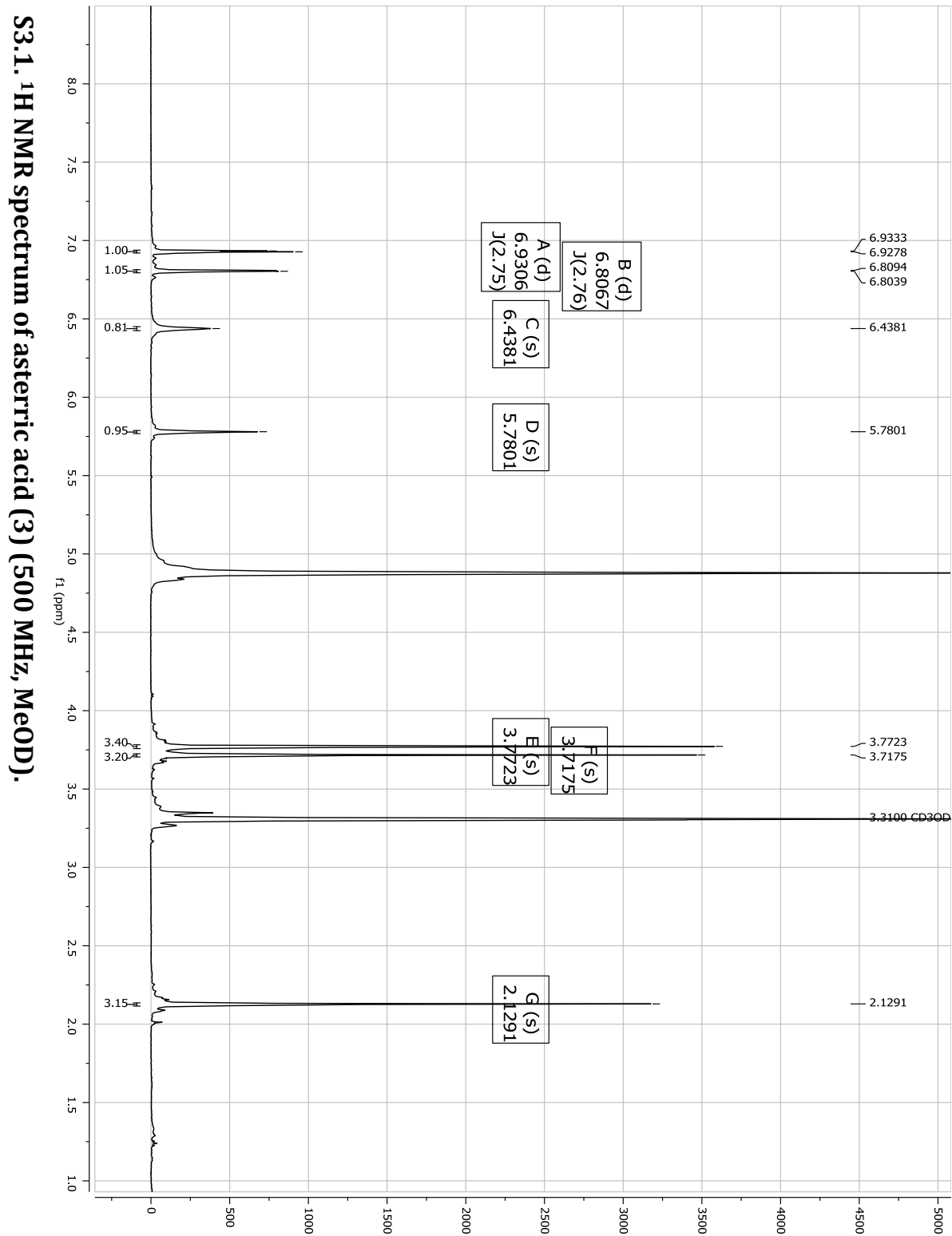


S2.3.2. Enlargement of the aromatic region (100 ppm - 180 ppm).

Publikation 1: Supporting Information

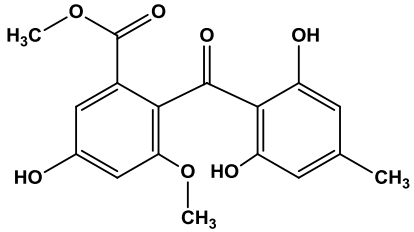
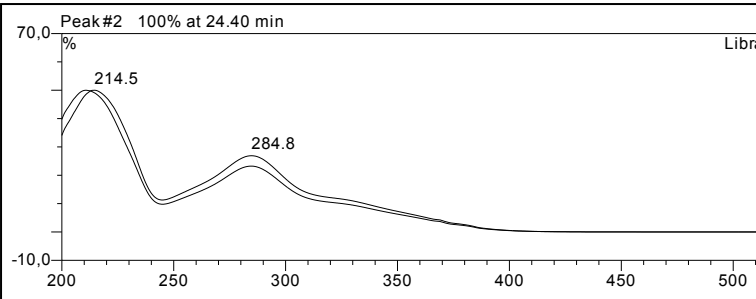
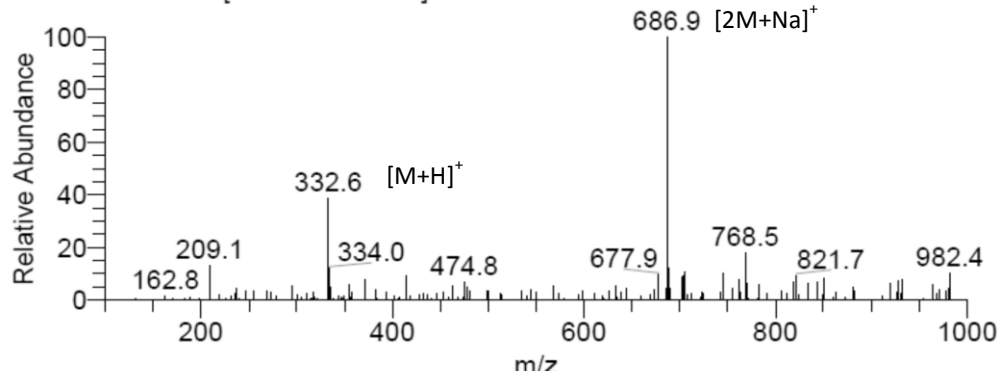
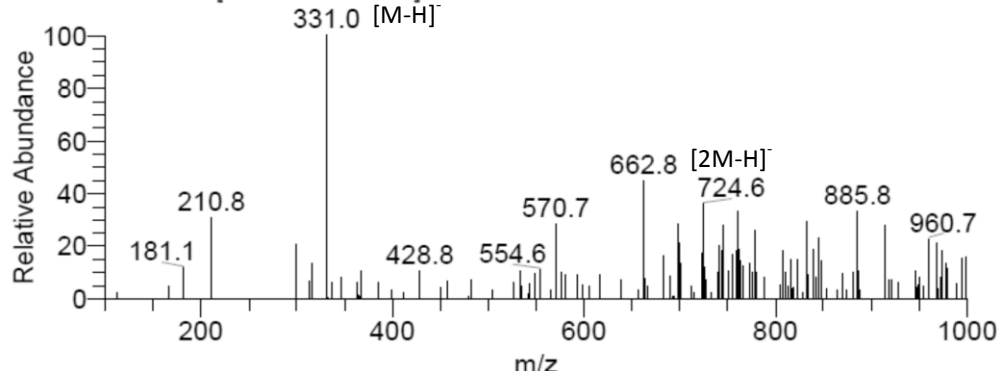
S3. General information of asterric acid (3), including RT, UV and mass spectra.

| Asterric acid | |
|---|---|
| Synonym(s) | 2-hydroxy-6-(4-hydroxy-2-methoxy-6-(methoxycarbonyl)-phenoxy)-4-methylbenzoic acid |
| Samples code | V6 S4 Semi5 |
| Biological source | <i>Penicillium glabrum</i> (from <i>Punica granatum</i>) |
| Sample amount | 9.3 mg |
| Physical description | Yellow white powder |
| Molecular formula | 348 g/mol |
| Molecular weight | C ₁₇ H ₁₆ O ₈ |
| Retention time (HPLC) | 20 min |
|  | UV  |
| MS | <p>Lena023 #701 RT: 18.80 AV: 1 NL: 6.33E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena023 #699 RT: 18.75 AV: 1 NL: 2.40E8 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

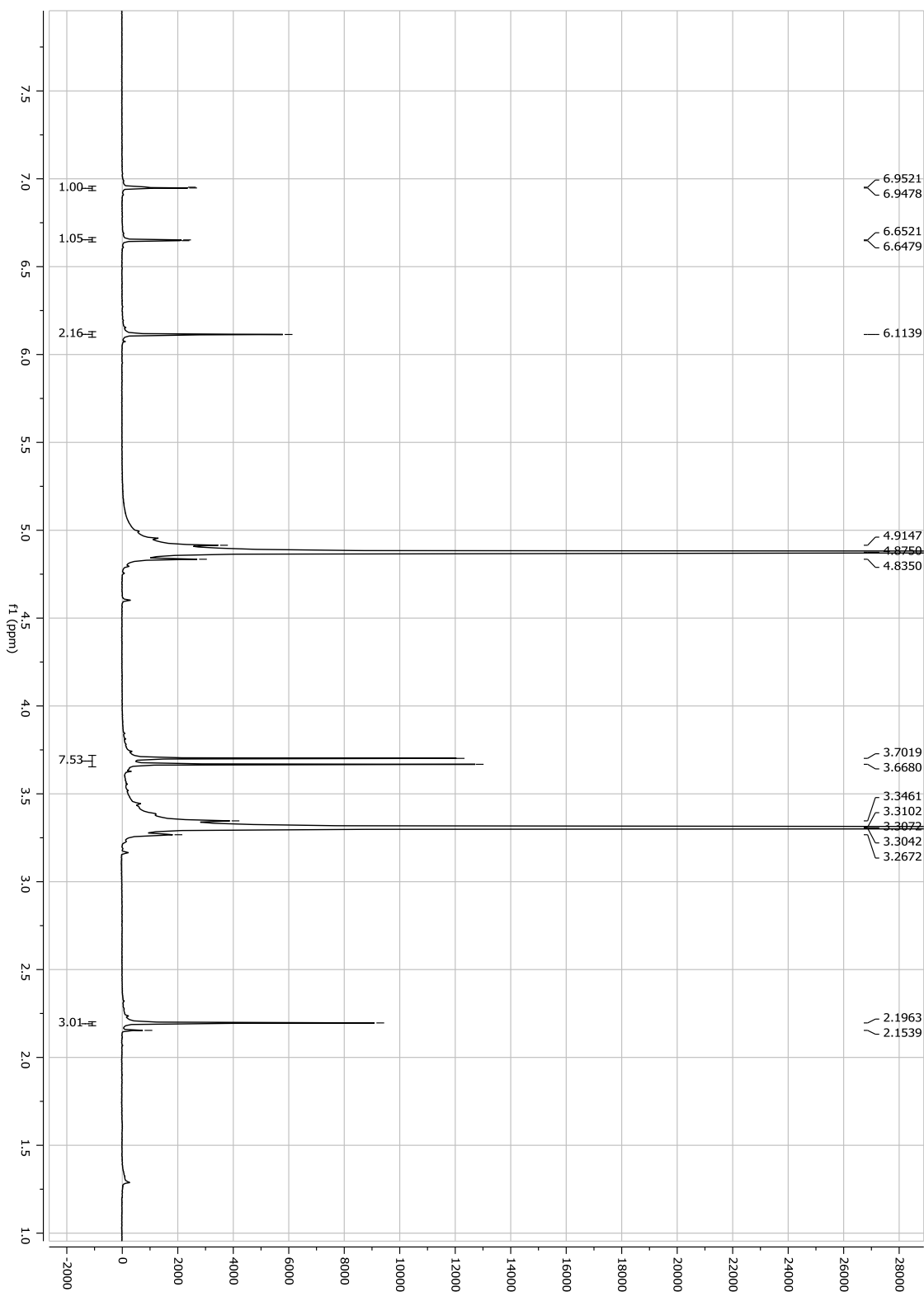


Publikation 1: Supporting Information

S4. General information of sulochrin (4), including RT, UV and mass spectra.

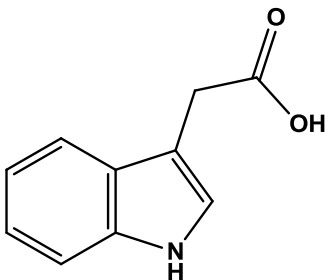
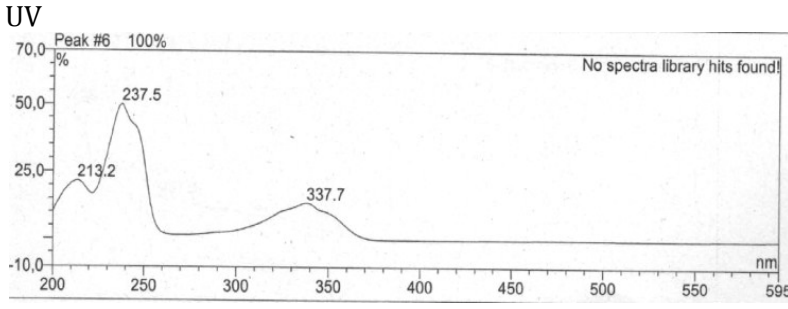
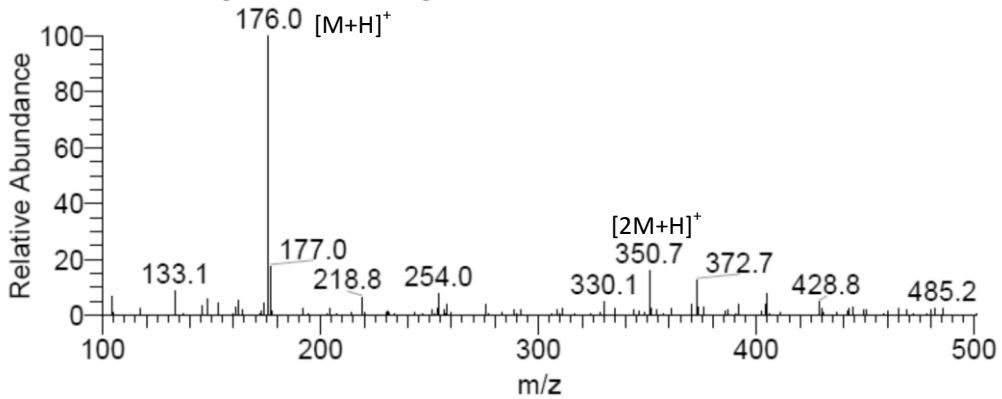
| Sulochrin | |
|---|---|
| Synonym(s) | 2-(2,6-dihydroxy-4-methylbenzoyl)-5-hydroxy-3-methoxybenzoic acid methyl ester |
| Samples code | Small scale Kiesel 7+8 Semi1 |
| Biological source | <i>Penicillium glabrum</i> (from <i>Punica granatum</i>) |
| Sample amount | 5.0 mg |
| Physical description | White-yellow |
| Molecular formula | 332 g/mol |
| Molecular weight | C ₁₇ H ₁₆ O ₇ |
| Retention time (HPLC) | 23 min |
|  | UV  |
| MS | <p>Andreas107 #841 RT: 23.69 AV: 1 NL: 2.36E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Andreas107 #839 RT: 23.64 AV: 1 NL: 6.79E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

S4.1. ^1H NMR spectrum of sulochrin (4) (500 MHz, MeOD).

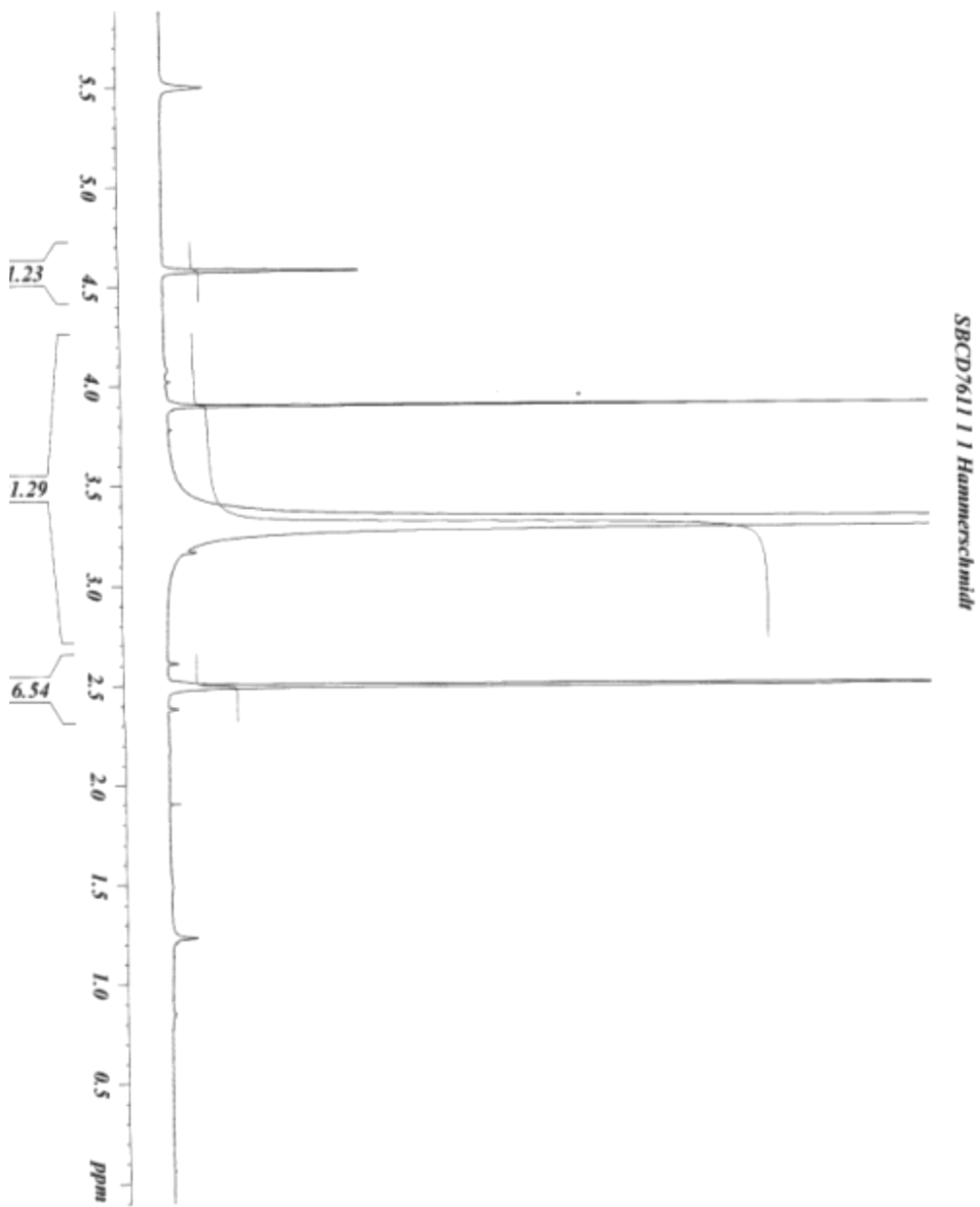


Publikation 1: Supporting Information

S5. General information of indolyl-3-acetic acid (5), including RT, UV and mass spectra.

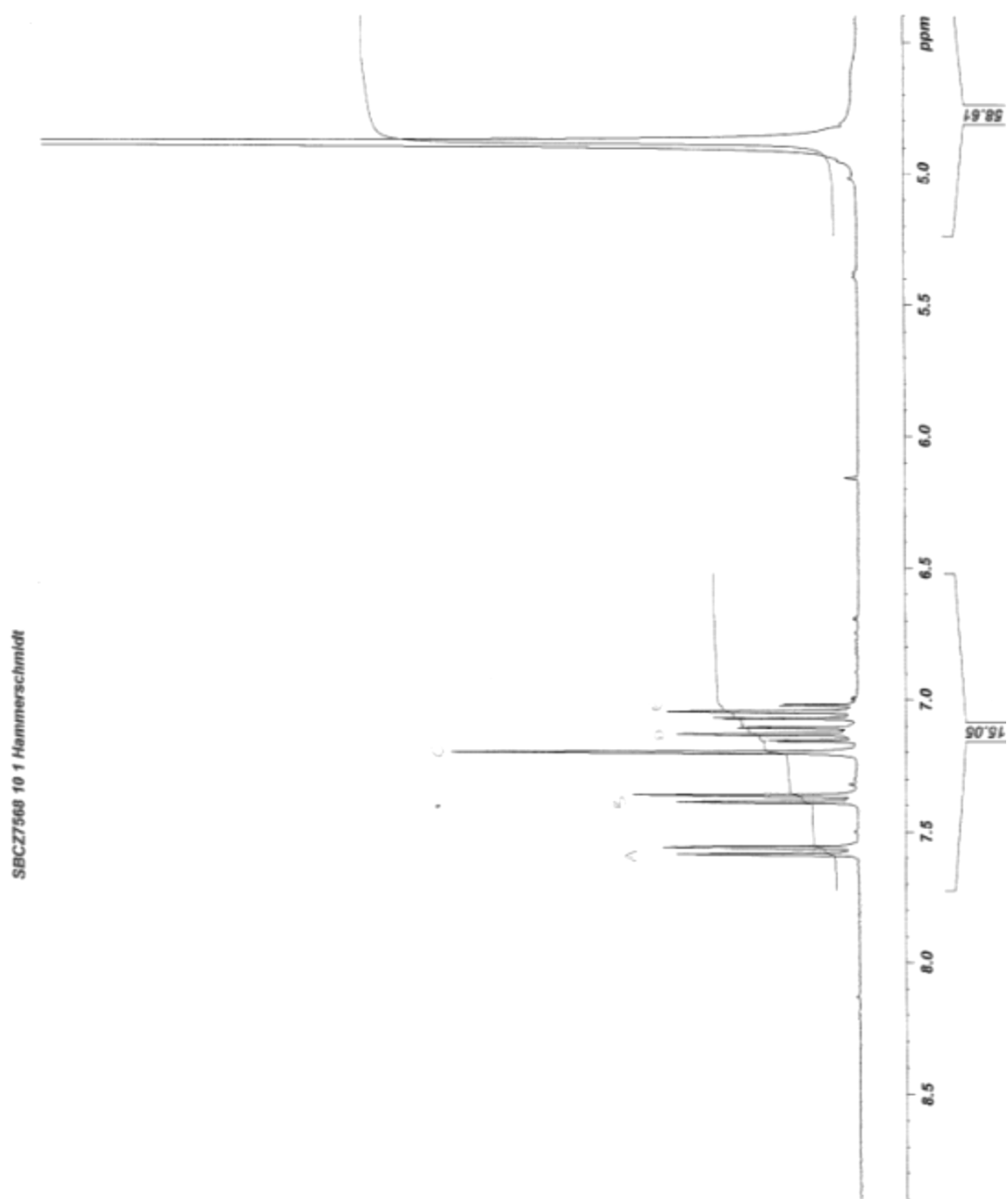
| Indolyl-3 acetic acid | |
|---|---|
| Synonym(s) | 2-(1 <i>H</i> -indol-3-yl)acetic acid |
| Samples code | V6S6S3 Semi4 |
| Biological source | <i>Penicillium glabrum</i> (from <i>Punica granatum</i>) |
| Sample amount | 2.8 mg |
| Physical description | Red brown |
| Molecular formula | 175 g/mol |
| Molecular weight | C ₁₀ H ₉ NO ₂ |
| Retention time (HPLC) | 15 min |
|  |  |
| MS | <p>Leha013 #498-509 RT: 13.31-13.54 AV: 3 NL: 3.88E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

S5.1. ¹H NMR spectrum of indoyl-3-acetic acid (5) (600 MHz, MeOD) (0 – 6 ppm).



```

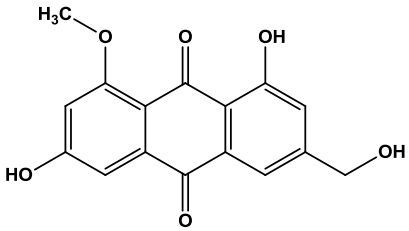
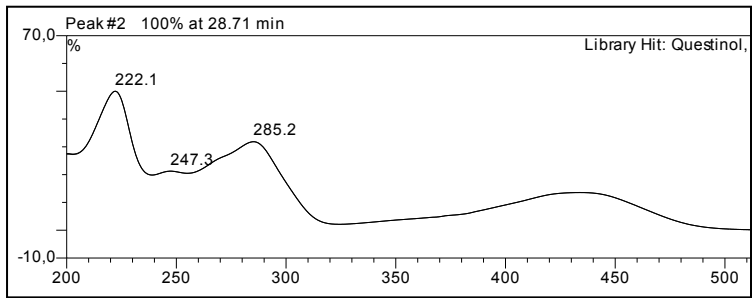
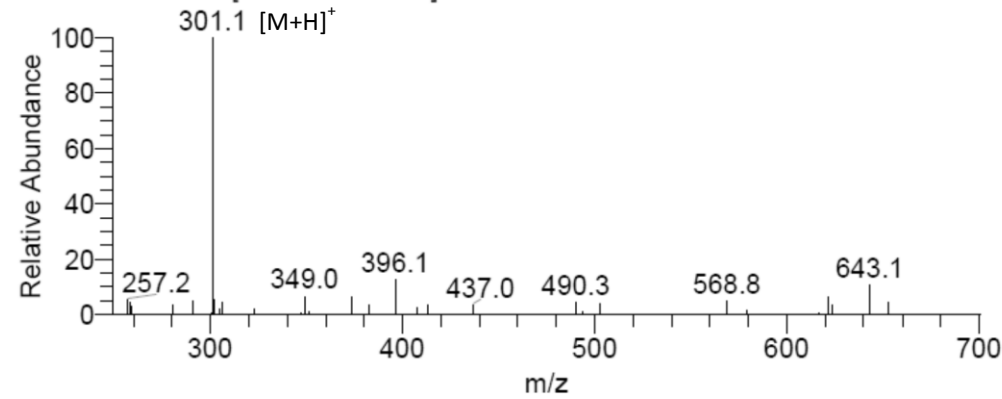
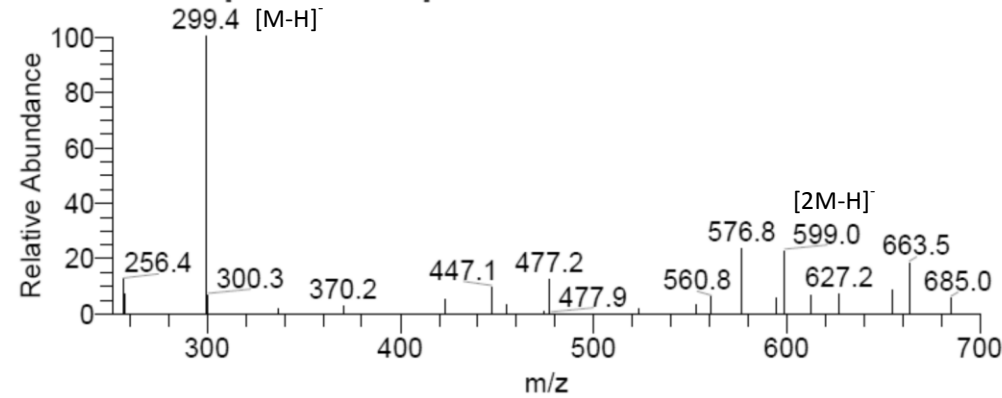
Current Data Parameters
Name: SBCD76111
EXPNO: 1
PROCNO: 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ : 20110914
Time: 16.00
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm TMS
PULPROG: zgpg30
AQ: 0.19999999
SOLVENT: DMSO
NS: 64
DS: 4
SWH: 15201.350 Hz
FIDRES: 0.386700 Hz
AQRES: 1.3821000 sec
RG: 256
AQ2: 7.9800000 sec
SFO: 600.131000 MHz
CF: 17.000000
TE: 300.2 K
SI: 1.0000000000000000
===== CHANNEL f1 =====
NUC1: 1H
P1: 12.000000
PL1: 0.000000
SFO1: 600.131000000 MHz
F2 - Processing parameters
SI: 65536.00000000000
SF: 600.131000000 MHz
WDW: EM
SSB: 0
GB: 0.000000
PC: 1.00
    
```

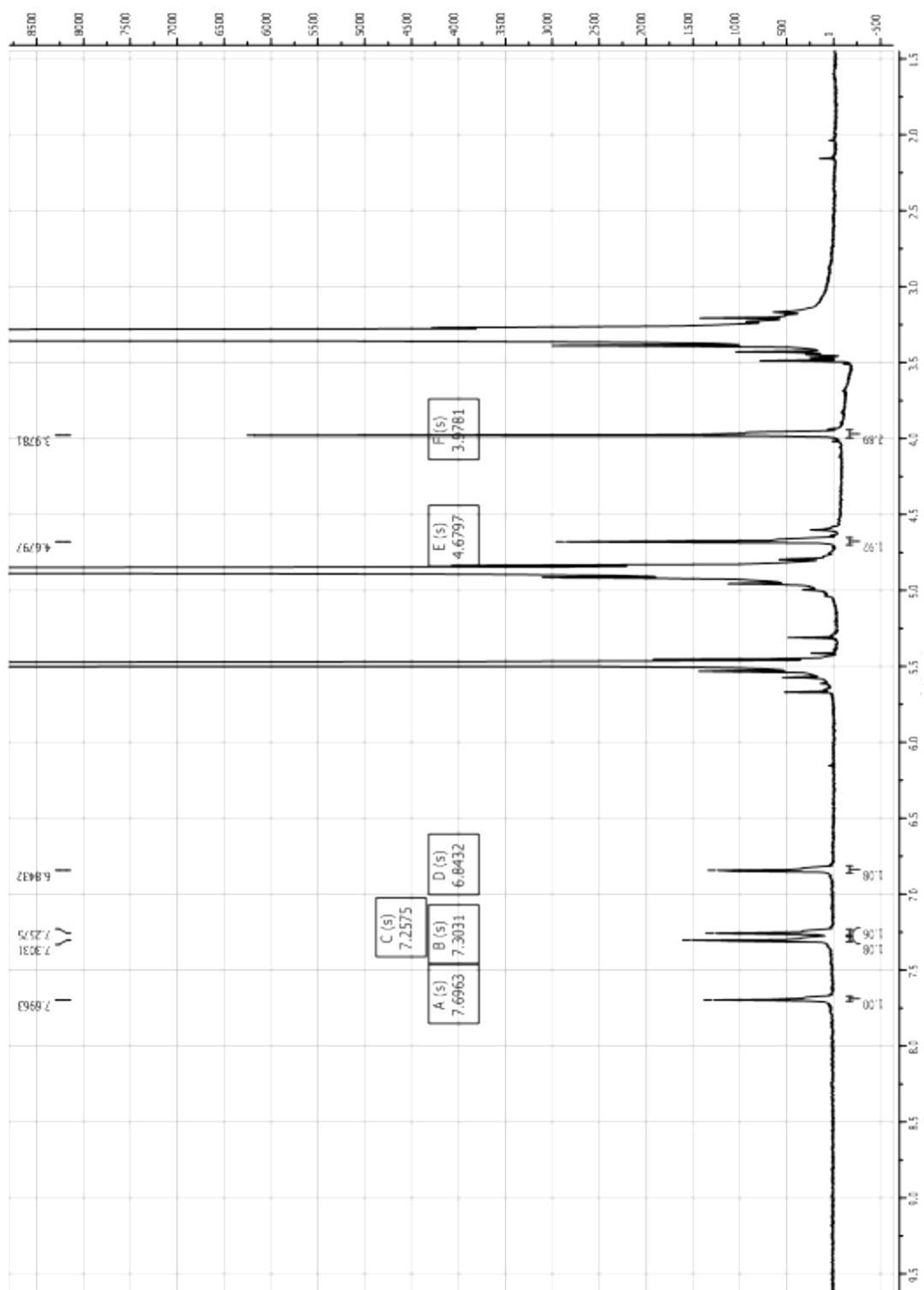


S5.1. ^1H NMR spectrum of indolyl-3-acetic acid (5) (600 MHz, MeOD) (6 - 9 ppm).

Publikation 1: Supporting Information

S6. General information of questinol (6), including RT, UV and mass spectra.

| Questinol | |
|---|---|
| Synonym(s) | 1,6-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-8-methoxyanthracene-9,10-dione |
| Samples code | V7 S5-3 Semi5 |
| Biological source | <i>Penicillium glabrum</i> (from <i>Punica granatum</i>) |
| Sample amount | 1.1 mg |
| Physical description | brownish |
| Molecular formula | 300 g/mol |
| Molecular weight | C ₁₆ H ₁₂ O ₆ |
| Retention time (HPLC) | 28 min |
|  | <p>UV</p>  |
| MS | <p>Lena034 #1017 RT: 28.47 AV: 1 NL: 3.11E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena034 #1015 RT: 28.43 AV: 1 NL: 2.61E8 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



S6.1. ¹H NMR spectrum of questinol (6) (500 MHz, MeOD).

4.2 Publikation 2: *Acremonium strictum*

Veröffentlicht in „Tetrahedron Letters“

Impact factor: 2.397

Eigener Anteil an der Arbeit: 75%, Erstautor, Durchführung der Experimente (Ausnahmen, siehe Erklärung), Schreiben des Manuskriptes

“Reprinted from Tetrahedron Letters, 55, Lena Hammerschmidt, Abdessamad Debbab, Tu Duong Ngoc, Victor Wray, Catalina Pérez Hemphill, WenHan Lin, Heike Broetz-Oesterhelt, Matthias U. Kassack, Peter Proksch, Amal H. Aly, Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*, 3463 - 3468, 2014, with permission from Elsevier.”



Contents lists available at ScienceDirect

Tetrahedron Letters

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



Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*



Lena Hammerschmidt^a, Abdessamad Debbab^a, Tu Duong Ngoc^b, Victor Wray^c, Catalina Perèz Hemphil^a, WenHan Lin^d, Heike Broetz-Oesterhelt^a, Matthias U. Kassack^e, Peter Proksch^{a,*}, Amal H. Aly^{a,*}

^a Institut fuer Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine Universitaet, Universitaetsstrasse 1, Geb. 26.23, D-40225 Duesseldorf, Germany

^b Vietnamese Academy of Science and Technology, Institute of Chemistry, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Viet Nam

^c Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig, Germany

^d National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, People's Republic of China

^e Institut fuer Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine Universitaet, Universitaetsstrasse 1, Geb. 26.23, D-40225 Duesseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2014

Revised 18 April 2014

Accepted 18 April 2014

Available online 28 April 2014

Keywords:

Acremonium strictum

Cytotoxic activity

Endophytic fungus

Polyketides

Rhizophora apiculata

ABSTRACT

Five new polyketide derivatives, 6'-hydroxypestalotiopone C (**1**), acropyrone (**2**), bicytosporone D (**3**), waol acid (**4**), and pestalotiopene C (**5**), together with seven known metabolites (**6–12**), were obtained from extracts of the endophytic fungus *Acremonium strictum*, isolated from the mangrove tree *Rhizophora apiculata*. The structures of the isolated compounds were elucidated on the basis of comprehensive NMR and MS analysis. Compounds **6**, **7**, and **9** showed moderate cytotoxic activity against human cisplatin-sensitive (IC₅₀ values 27.1, 76.2, and 8.3 μM, respectively) and resistant A2780 cell lines (IC₅₀ values 12.6, 30.1, and 19.0 μM, respectively), whereas only **9** exhibited antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* (MIC value 14.3 μM).

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Endophytic fungi are known to exist in nearly every plant on earth without causing visible disease symptoms to their host.¹ This kind of symbiotic co-existence is based on a balanced interaction between host and endophyte, which may shift toward pathogenesis if the balance is interrupted, for example, when the host plant becomes senescent or stressed.^{2–4} The symbiotic interaction between host plant and endophytic fungi was found to have a significant impact especially on the ecological success of the host. Bioactive secondary metabolites produced by endophytes are reported to increase host plant fitness and resistance to biotic and abiotic stress conditions.³ Several studies indicate a positive influence of endophytes on nutrient uptake, saline and water stress resistance, and on the growth rate of their hosts.^{5–7} Bioactive metabolites produced by endophytes are also of great interest for drug discovery.^{8–10} A well known example is paclitaxel, which was first isolated from the Pacific yew *Taxus brevifolia*, and was later found to be produced by endophytes like *Taxomyces andre-*

*anae*¹¹ and *Pestalotiopsis microspora*.¹² In the present study, we investigated the endophytic fungus *Acremonium strictum* Gams, which was isolated from the mangrove tree *Rhizophora apiculata* Blume collected on the island of CatBa, Vietnam. The mangrove tree *R. apiculata* is traditionally used in the Southeast Asian folk medicine as an antiemetic and antiseptic, as well as against diarrhea, hepatitis, and typhoid.¹³ In addition, it is well known for its antioxidant activity.^{14,15}

Mangrove-derived endophytes are attracting considerable attention in recent years due to the high incidence of bioactive and structurally unusual compounds.^{16–21} *Acremonium* species are known to produce a plethora of bioactive compounds. Prominent examples include the antibiotic cephalosporin C, isolated from *Acremonium chrysogenum*, previously known as *Cephalosporium acremonium*,²² and the immunosuppressive cyclosporin C from *Acremonium luzulae*.²³

In this study, *A. strictum* yielded five new polyketide derivatives (**1–5**), together with seven known compounds (**6–12**) (Fig. 1). Details on the structure elucidation of the new compounds by one and two dimensional NMR and MS, determination of the absolute configuration of **1** using the modified Mosher reaction, as well as results of cytotoxic and antibacterial bioassays are reported.

* Corresponding authors. Tel.: +49 211 81 14163 (P.P.); tel.: +49 211 81 14173; fax: +49 211 81 11923 (A.H.A.).

E-mail addresses: proksch@uni-duesseldorf.de (P. Proksch), amal.hassan@uni-duesseldorf.de (A.H. Aly).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.04.063>

0040-4039/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

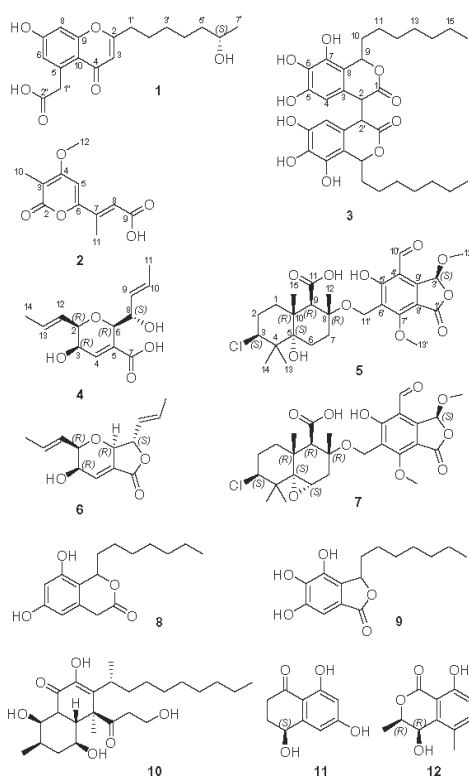


Figure 1. Structures of compounds 1–12.

Results and discussion

After partitioning the EtOAc extract between *n*-hexane and 90% aqueous MeOH, the MeOH phase was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel, followed by size exclusion chromatography and semi preparative HPLC, to yield five new polyketide derivatives (1–5) and seven known compounds (6–12).

The molecular formula of 1 was determined as C₁₈H₂₂O₆ by the prominent signal appearing at *m/z* 335.14836 [M+H]⁺ in the HRESIMS. The UV spectrum indicated a chromone derivative based on the characteristic absorbances observed at λ_{max} (MeOH) 220, 242, 249, and 290 nm.^{21,24,25} The presence of the chromone moiety was further confirmed by thorough inspection of 1D and 2D NMR spectra of 1 (Table 1). The ¹H NMR and COSY spectra revealed signals corresponding to two aromatic *meta*-coupled protons at δ_H 6.65 (H-6) and 6.72 (H-8), an olefinic proton singlet at δ_H 5.96 (H-3), a downfield shifted methylene group at δ_H 4.01 (CH₂-1''), as well as a continuous spin system composed of five methylene groups (CH₂-1'–CH₂-5'), an oxymethine proton at δ_H 3.56 (H-6'), and a methyl doublet at δ_H 1.02 (CH₃-7'). In addition, two exchangeable signals were detected at δ_H 10.69 and 11.98 and were assigned to the phenolic hydroxyl and carboxylic groups, respectively.

The HMBC spectrum showed correlations of the aromatic protons to the quaternary C-10 (δ_C 114.4). In addition, H-8 correlated with C-6 (δ_C 117.7), C-7 (δ_C 160.0), and C-9 (δ_C 158.8), and H-6 with C-8 (δ_C 101.2) and the methylene carbon C-1'' (δ_C 39.8). The corresponding methylene protons, in turn, correlated with C-5 (δ_C 137.5), C-6, C-10, and with the carboxyl carbonyl C-2'' (δ_C 171.8), thus confirming the attachment of the carboxymethyl substituent

Table 1 NMR spectroscopic data of 1 (600 MHz, DMSO-d₆, δ in ppm)

| Position | δ _C ^a type | δ _H (J in Hz) | COSY | HMBC |
|----------|----------------------------------|--------------------------|------|---------------|
| 2 | 167.0, C | – | – | – |
| 3 | 109.7, CH | 5.96, d (1.8) | – | 2, 10, 1' |
| 4 | – | – | – | – |
| 5 | 137.5, C | – | – | – |
| 6 | 117.7, CH | 6.65, d (2.4) | – | 8, 10, 1'' |
| 7 | 160.0, C | – | – | – |
| 8 | 101.2, CH | 6.72, d (2.4) | – | 6, 7, 9, 10 |
| 9 | 158.8, C | – | – | – |
| 10 | 114.4, C | – | – | – |
| 7-OH | – | 10.69, s | – | – |
| 1' | 32.8, CH ₂ | 2.55, dt (1.8, 7.5) | 2' | 2, 3, 2', 3' |
| 2' | 26.4, CH ₂ | 1.63, q (7.5) | 3' | 2, 1', 3', 4' |
| 3' | 28.5, CH ₂ | 1.28, m | 4' | – |
| 4' | 24.9, CH ₂ | 1.34, m | 5' | 6' |
| 5' | 38.7, CH ₂ | 1.31, m | 6' | 4', 6' |
| 6' | 66.3, CH | 3.56, m | 7' | – |
| 7' | 22.9, CH ₃ | 1.02, d (7.0) | – | 5', 6' |
| 1'' | 39.8, CH ₂ | 4.01, s | – | 5, 6, 10, 2'' |
| 2'' | 171.8, C | – | – | – |
| 2''-OH | – | 11.98, br s | – | – |

^a Chemical shifts deduced from HMBC correlations.

at C-5. Moreover, further correlations were observed from H-3 to C-2 (δ_C 167.0) and to the methylene carbon C-1' (δ_C 32.8). Correlations of CH₂-1' to C-3 (109.7), and of both CH₂-1' and CH₂-2' to C-2, corroborated the attachment of the heptan-2-ol side chain to C-2. Comparison of the NMR data of 1 with values reported in the literature showed a close correlation with the known compound pestalotiopsone C, previously isolated from *Pestalotiopsis* sp.,²¹ which lacks the hydroxyl group at C-6'.

The absolute configuration of the C-6' chirality center of 1 was determined using the modified Mosher method.²⁶ The observed shift differences between the (*S*)-MTPA ester and its (*R*)-MTPA ester epimer (Table 2) allowed unambiguous assignment of C-6' as (*S*). The compound was identified as a new natural product, for which the name 6'-hydroxypestalotiopsone C is proposed.

Inspection of the HRESIMS of 2 revealed the molecular formula C₁₁H₁₂O₅ ([M+H]⁺ *m/z* 225.07556). The UV spectrum, revealing absorbances at λ_{max} (MeOH) 238 and 340 nm, suggested a pyrone as the basic structure.^{27–29} The ¹H NMR spectrum indicated the presence of two olefinic protons resonating at δ_H 6.90 (H-5) and 6.50 (H-8), two olefinic methyl groups at δ_H 1.83 (CH₃-10) and 2.36 (CH₃-11), one methoxy group signal at δ_H 3.98 (OCH₃-12), and a broad singlet assigned to the carboxylic proton at δ_H 12.67 (9-OH) (Table 3). These data were in accordance with those reported for convolvulopyrone.²⁹ Correlations observed from H-5 to C-6 (δ_C 156.7) and C-7 (δ_C 141.8) in the HMBC spectrum corroborated the connection of the 2-butenic acid side chain to the pyrone moiety at C-6 (Table 3). However, correlations observed for CH₃-11 to C-6, C-7, and C-8 (δ_C 120.2) confirmed the attachment of the methyl group at C-7 and not at C-8 as in convolvulopyrone.

Table 2 NMR shift differences (600 MHz, pyridine-d₅, δ in ppm) between (*R*)- and (*S*)-MTPA esters of 1

| Position | δ _H | | | |
|----------|----------------|-------------------|-------------------|---------------------------|
| | 1 | (<i>S</i>)-MTPA | (<i>R</i>)-MTPA | Δ (<i>S</i> - <i>R</i>) |
| 7' | 1.0253 | 1.3428 | 1.3435 | -0.0007 |
| 5' | 1.3087 | 1.6245 | 1.6219 | +0.0026 |
| 4' | 1.3393 | 1.5037 | 1.5033 | +0.0004 |

Table 3
NMR spectroscopic data of **2** (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ in ppm)

| Position | δ_C^a , type | δ_H (J in Hz) | COSY | HMBC |
|----------|-----------------------|----------------------|------|---------------|
| 2 | 162.6, C | — | | |
| 3 | 102.8, C | — | | |
| 4 | 165.5, C | — | | |
| 5 | 98.1, CH | 6.90, s | | 3, 4, 6, 7 |
| 6 | 156.7, C | — | | |
| 7 | 141.8, C | — | | |
| 8 | 120.2, CH | 6.50, d (1.3) | 11 | 6, 7, 9, 11 |
| 9 | 166.8, C | — | | |
| 10 | 8.5, CH ₃ | 1.83, s | | 2, 3, 4, 5, 6 |
| 11 | 13.2, CH ₃ | 2.36, d (1.3) | 8 | 6, 7, 8 |
| 12 | 56.4, CH ₃ | 3.98, s | | 4 |
| 9-OH | | 12.67, br s | | |

^a Chemical shifts deduced from HMBC correlations.

The configuration of the double bond in **2** was established as *E* based on the ROESY correlations of CH₃-11 and H-8 to H-5, and the lack of a correlation between CH₃-11 and H-8. In addition, the long range COSY correlation between H-8 and CH₃-11 provided additional evidence. Hence, **2** was identified as a new natural product and was named acropyrone.

The HRESIMS of **3** exhibited a prominent peak at *m/z* 587.28422 [M+H]⁺, which is in accordance with the molecular formula C₃₂H₄₂O₁₀. Inspection of the ¹H and ¹³C NMR spectra of **3** (Table 4) showed signals corresponding only to 21 protons and 16 carbons, thus indicating that **3** is a symmetrical dimer. The UV spectrum showed characteristic absorbances of phenolic compounds at λ_{max} (MeOH) 208 and 290 nm.^{30,31}

The ¹H NMR and COSY spectra of **3** showed one aromatic proton singlet at δ_H 6.06 (H-4), an aliphatic methine signal at δ_H 4.18 (H-2), and a continuous spin system composed of an oxymethine group resonating at δ_H 5.21 (H-9), six methylene groups (CH₂-10–CH₂-15), and a methyl group at δ_H 0.80 (CH₃-16). In addition, three hydroxyl signals were detected at δ_H 8.40, 8.60, and 9.40 (Table 4).

HMBC correlations of H-4 to C-2 (δ_C 48.0), C-5 (δ_C 145.9), C-6 (δ_C 132.7), and C-8 (δ_C 113.7), of H-2 to C-3 (δ_C 118.0), and of H-9 to C-1 (δ_C 170.1), C-7 (δ_C 141.1), and C-8, established the isochroman-3-one moiety of **3** (Table 4). The connection of the side chain with the lactone moiety at C-9 was corroborated from the HMBC correlation of H-9 to C-10 (δ_C 36.4).

Table 4
NMR spectroscopic data of **3** (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ in ppm)

| Position | δ_C , type | δ_H (J in Hz) | COSY ^a | HMBC ^a |
|----------|-----------------------|----------------------|-------------------|--------------------------|
| 1/1' | 170.1, C | | | |
| 2/2' | 48.0, CH | 4.18, br s | | 2/2', 3/3' |
| 3/3' | 118.0, C | | | |
| 4/4' | 106.2, CH | 6.06, s | | 2/2', 5/5', 6/6', 8/8' |
| 5/5' | 145.9, C | | | |
| 6/6' | 132.7, C | | | |
| 7/7' | 141.1, C | | | |
| 8/8' | 113.7, C | | | |
| 9/9' | 79.4, CH | 5.21, dd (11.0, 2.5) | 10/10' | 1/1', 7/7', 8/8', 10/10' |
| 10/10'a | 36.4, CH ₂ | 1.52, m | 11/11' | 11/11', 12/12' |
| 10/10'b | | 1.28, m | | |
| 11/11' | 22.1, CH ₂ | 1.29, m | 12/12' | 13/13' |
| 12/12' | 25.7, CH ₂ | 1.31, m | 13/13' | 11/11', 13/13' |
| 13/13' | 28.2, CH ₂ | 1.15, m | 14/14' | 11/11', 15/15' |
| 14/14' | 28.9, CH ₂ | 1.28, m | 15/15' | 13/13', 15/15', 16/16' |
| 15/15' | 31.2, CH ₂ | 1.27, m | 16/16' | 13/13', 14/14', 16/16' |
| 16/16' | 13.8, CH ₃ | 0.80, t (7.0) | | 13/13', 14/14', 15/15' |
| OH | | 8.40, br s | | |
| OH | | 8.60, br s | | |
| 6-OH | | 9.40, s | | 6/6' |

^a Combined data from measurements in DMSO-*d*₆ and acetone-*d*₆.

Data obtained for **3** showed a good agreement with those reported for cytosporone D,³⁰ except for the absence of a methylene group at C-2 and the presence of a methine group instead. Accordingly, the C-2 resonance was shifted more downfield in **3** (δ_C 48.0) than in cytosporone D (δ_C 34.8). This together with the observed HMBC correlation of H-2 to C-2', confirmed that **3** is a dimer of two cytosporone D monomers connected through a C2–C2' linkage. Thus, **3** was identified as a new natural product and given the name bicytosporone D. Interestingly, the HRESIMS of **3** showed two additional signals at *m/z* 585.26859 (calcd 585.26942) and 583.25434 (calcd 583.25377), which were assumed to be due to the oxidized derivatives (**3a** and **3b**, respectively) (Fig. 2). A similar phenomenon is observed for the dimer emodindianthrone, which is known to undergo oxidation yielding protohypericin and hypericin under the influence of light and oxygen.^{32–34} This was also evident from the gradual loss of signals corresponding to H-2 and H-4 upon repeated ¹H NMR measurement of **3**.

Compound **4** was found to have the molecular formula C₁₃H₁₈O₅ based on the prominent signal at *m/z* 253.10815 [M–H][–] in the HRESIMS. The ¹H NMR and COSY spectra of **4** showed two continuous spin systems (Table 5). The first included an olefinic proton resonating at δ_H 6.57 (H-4), two oxymethine groups at δ_H 3.70 (H-3) and 3.64 (H-2), and a propene side chain CH(12)CH(13)CH₃(14), whereas the second incorporated an oxymethine group at δ_H 4.16 (H-6) and a but-2-en-1-ol side chain CH(8)OHCH(9)CH(10)CH₃(11). Both spin systems included *E* configured double bonds as indicated by *J*_{H-9,H-10} and *J*_{H-12,H-13} (15.2 and 15.6 Hz, respectively). Inspection of the ¹³C NMR spectrum indicated a carboxylic carbonyl at δ_C 170.8 (C-7), six olefinic (C-4, C-5, C-9, C-10, C-12, and C-13) and four oxygenated aliphatic carbons (C-2, C-3, C-6, and C-8).

The HMBC spectrum (Table 5) confirmed the established substructures and revealed correlations of H-4 to C-2 (δ_C 77.2), C-3 (δ_C 63.9), C-5 (δ_C 141.0), C-6 (δ_C 79.6), and C-7, thus confirming the attachment of the carboxylic function at C-5. Correlations of H-3 to C-2, C-4 (δ_C 131.2), and C-5, of H-2 to C-3, C-6, C-12 (δ_C 129.9), and C-13 (δ_C 126.5), and of H-13 and H-12 to C-2, established the dihydropyranol ring and the linkage of the propene side chain at C-2. Further correlations of H-8 to C-5 and C-6, and of H-6 to C-4, C-5, and C-8 (δ_C 72.7), corroborated the attachment of the butenol side chain at C-6.

Comparison of **4** with the known waol A (**6**),^{35–37} likewise isolated in this study, revealed that **4** is the corresponding open ring structure of **6**. By analogy to **6**, the ROESY spectrum of **4** showed correlations between H-2, H-3, and H-6, indicating the same relative configuration. Attempts to determine the absolute configuration of **4** by the modified Mosher method proved inconclusive, due to insignificant chemical shift differences between the (*R*-) and (*S*-)MTPA esters ($\Delta S-R$ 0.0001–0.0004 ppm). Hence, the configuration of **4** was determined by comparison with the absolute configuration reported for waol A (**6**). Based on biogenetic considerations, it could be assumed that the chirality centers of **4** have the same absolute configuration as those in **6**. Furthermore, due to the use of acidified water (0.1% trifluoroacetic acid) during semi-preparative HPLC purification of the respective compounds, waol A (**6**) may even be an artifact built by dehydration of **4**. Accordingly, **4** was identified as a new natural product and was named waol acid.

Compound **5** displayed similar spectroscopic data to those of pestalotiopene A (**7**),^{38,39} likewise isolated in this study, suggesting close structural analogy of both compounds. HRESIMS analysis revealed a molecular formula of C₂₇H₃₅ClO₁₀ ([M–H][–] at *m/z* 553.18345) for **5**, thus revealing a 2 amu increase in the molecular weight compared with **7**. The structural similarity of both compounds was further corroborated by the detection of the same

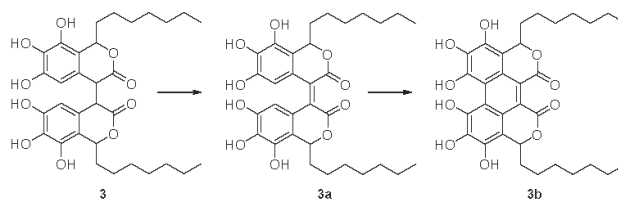


Figure 2. Proposed structures of the oxidized derivatives of 3.

Table 5
NMR spectroscopic data of 4 (600 MHz, DMSO-*d*₆, δ in ppm)

| Position | δ _C , type | δ _H (J in Hz) | COSY | HMBC |
|----------|-----------------------|--------------------------|---------|---------------|
| 1 | | — | | |
| 2 | 77.2, CH | 3.64, br d (9.3) | 3, 12 | 3, 6, 12, 13 |
| 3 | 63.9, CH | 3.70, dt (6.1, 2.1) | 4 | 2, 4, 5 |
| 4 | 131.2, CH | 6.57, dd (6.1, 1.7) | 3, 3-OH | 2, 3, 5, 6, 7 |
| 5 | 141.0, C | — | | |
| 6 | 79.6, CH | 4.16, d ^a | 8 | 4, 5, 8, 9 |
| 7 | 170.8, C | — | | |
| 8 | 72.7, CH | 4.18, dd ^a | 9 | 5, 6, 9, 10 |
| 9 | 133.0, CH | 5.57, dd (15.2, 1.1) | 10 | 8, 10, 11 |
| 10 | 123.9, CH | 5.50, dq (15.2, 6.3) | 11 | 8, 9, 11 |
| 11 | 17.8, CH ₃ | 1.60, d (6.3) | | 6, 8, 9, 10 |
| 12 | 129.9, CH | 5.55, dq (15.6, 1.3) | 13 | 2, 13, 14 |
| 13 | 126.5, CH | 5.64, dq (15.6, 6.3) | 14 | 2, 12, 14 |
| 14 | 17.9, CH ₃ | 1.66, d (6.3) | | 2, 3, 12, 13 |
| 3-OH | | 4.17, d ^a | 4 | |

^a Signals are overlapping.

mass fragments at *m/z* 267 and 269 ([M–H][–] and [M+H]⁺, respectively), corresponding to the cyclopaldic acid part of 5 and 7.⁴⁰ In addition, 7 incorporated a sesquiterpene moiety, altitoxin B, with the respective mass fragment appearing at *m/z* 301 [M–H][–].⁴¹ In contrast, the corresponding fragment in 5, with the characteristic chlorine isotopic splitting, was detected at *m/z* 303 ([M–H][–]).

The structure of 5 was tentatively elucidated by interpretation of the ¹H NMR and COSY spectra, as well as by comparison with data reported for 7 (Table 6). The ¹H NMR spectrum of 5 showed four methyl groups, two methoxy groups, five methylene groups, including an oxymethylene, two deshielded methine protons, indicating their oxygenated or chlorinated character, an aliphatic methine group, and an aldehyde proton. Inspection of the COSY spectrum revealed two spin systems corresponding to the fragments CH₂(1)CH₂(2)CH(3)Cl and CH₂(7)CH₂(6) (Table 6). The first spin system was identical to that detected in 7, whereas the latter indicated the presence of two methylene protons appearing at δ_H 2.05 and 1.97 (CH-6a and b, respectively) and thereby the loss of

Table 6
NMR spectroscopic data of 5 and 7 (600 MHz, δ in ppm)

| Position | Pestalotiopene C (5) | | | | Pestalotiopene A (7) | | | |
|----------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------|-------------------|
| | δ _C ^a type | δ _H ^b (J in Hz) | COSY ^b | HMBC ^c | δ _C ^a type | δ _H ^b (J in Hz) | COSY ^b | HMBC ^c |
| 1 | | 1.22, m | 2 | | 34.9, CH ₂ | 1.60, m | 2 | |
| 2a | | 2.07, m | 3 | | 28.9, CH ₂ | 2.15, m | 3 | |
| 2b | | 1.92, m | | | | 1.90, m | | |
| 3 | 71.0, CH | 4.51, dd (12.5, 4.8) | | | 68.4, CH | 4.01, dd (12.6, 4.2) | | 4, 13, 14 |
| 4 | 46.2, C | | | | 41.2, C | | | |
| 5 | 78.5, C | | | | 66.0, C | | | |
| 6a | 39.0, CH ₂ | 2.05, m | 7 | | 53.7, CH | 3.36, d (3.2) | 7 | 5, 8, 10, |
| 6b | | 1.97, m | | | | | | |
| 7a | 34.6, CH ₂ | 2.28, dt (13.2, 5.8) | | | 33.6, CH ₂ | 2.79, dd (17.0, 3.2) | | 5, 6, 8, 12 |
| 7b | | 1.83, m | | | | 2.05, d (17.0) | | |
| 8 | 78.5, C | | | | 74.6, C | | | |
| 9 | 56.4, CH | 3.31, s | | | 52.9, CH | 3.25, s | 12, 15 | 8, 10, 11, 12, 15 |
| 10 | | | | | 36.0, C | | | |
| 11 | | | | | 173.1, C | | | |
| 12 | 28.7, CH ₃ | 1.39, s | | 8 | 27.5, CH ₃ | 1.36, s | | 7, 8, 9 |
| 13 | 18.5, CH ₃ | 1.09, s | | 3, 4, 5, 14 | 22.6, CH ₃ | 0.95, s | 14 | 3, 4, 5, 14 |
| 14 | 25.1, CH ₃ | 1.15, s | | 3, 4, 5 | 21.1, CH ₃ | 1.25, s | 13 | 3, 4, 5, 13 |
| 15 | 17.6, CH ₃ | 1.61, s | | 5 | 17.8, CH ₃ | 1.50, s | | 1, 5, 9, 10 |
| 11-OH | | 12.26, br s | | | | 12.23, br s | | |
| 1' | | | | | 164.7, C | | | |
| 3' | | 6.75, s | | | 100.8, CH | 6.76, s | | 1', 12' |
| 4' | | | | | 113.1, C | | | |
| 5' | | | | | 167.0, C | | | |
| 6' | | | | | 122.1, C | | | |
| 7' | | | | | 162.8, C | | | |
| 8' | | | | | 111.5, C | | | |
| 9' | | | | | 151.3, C | | | |
| 10' | | 10.20, s | | | 195.2, CH | 10.22, s | | 4', 5', 6', 9' |
| 11'a | | 4.61, d (9.3) | 11' | | 51.7, CH ₂ | 4.75, d (9.4) | | 5', 6', 7', 8 |
| 11'b | | 4.58, d (9.3) | | | | 4.57, d (9.4) | | |
| 12' | 56.5, CH ₃ | 3.69, s | | | 56.8, CH ₃ | 3.70, s | | 3' |
| 13' | 62.7, CH ₃ | 4.16, s | | | 63.3, CH ₃ | 4.19, s | | 7' |

^a Chemical shift deduced from HMQC and HMBC.

^b Measured in acetone-*d*₆.

^c Combined data from measurements in DMSO-*d*₆ and acetone-*d*₆.

Table 7
Cytotoxic activity results of **6**, **7**, and **9**

| Compound | IC ₅₀ [μM] | | |
|----------|-----------------------|------------|---------|
| | A2780 sens | A2780 CisR | HCT 116 |
| 6 | 27.1 | 12.6 | 22.7 |
| 7 | 76.2 | 30.1 | 188.0 |
| 9 | 8.3 | 19.0 | 35.4 |

sens: sensitive to cisplatin; CisR: cisplatin resistant.

the epoxide function in **5**. Furthermore, C-5 was shifted more downfield (δ_C 78.5) and C-6 more upfield (δ_C 39.0) in **5** compared to the corresponding resonances observed in **7**, which provided additional evidence and corroborated the presence of a hydroxyl group at C-5. The latter was further confirmed by HMBC correlations observed for CH₃-13, CH₃-14, and CH₃-15 to C-5.

Thus, **5** and **7** share the same core structure and are obviously biogenetically closely related. Accordingly, based on biogenetic considerations we assume that **5** has the same absolute configuration as reported for **7**.³⁸ Therefore, **5** was characterized as a new natural product and was named pestalotiopene C.

Several compounds with a 5-hydroxydrimane skeleton are reported from plants. Examples include patchoulol from *Pogostemon* sp.,⁴² 1β-*p*-hydroxy-*E*-cinnamoyl-5α-hydroxydrimeninol from *Zygogynum* sp.,⁴³ the triterpene lupeol from *Rhizophora mucronata*,⁴⁴ and an abietane diterpenoid from *Salvia microstegia*.⁴⁵ It could be thus speculated that the drimane precursor of **5** and **7** was provided to the endophytic fungus by the host plant. Nevertheless, drimane bearing compounds of fungal origin are also described in the literature, such as scapanins A and B from *Scapania undulata*,⁴⁶ and diaporol B from *Diaporthe* sp.⁴⁷ Cyclopaldic acid and its derivatives are reported from *Aspergillus* and *Penicillium* species and are known to exhibit phytotoxic and plant growth regulatory effects.^{40,48–50}

The remaining compounds were identified on the basis of NMR, mass spectrometry, and optical rotation data analysis, as well as by comparison with published data, as waol A (**6**),³⁵ pestalotiopene A (**7**),^{38,39} cytosporone C (**8**) and E (**9**),³⁰ australifunginol derivative NBRI17671 (**10**),⁵¹ (4S) 6-hydroxyisoscлерone (**11**),⁵² and (3*R*,4*R*) 4-hydroxy-5-methylmellein (**12**).⁵³

All compounds, except **1** and **12** due to their limited sample amount, were subjected to preliminary cytotoxicity screening in vitro using the cellular MTT assay against L5178Y mouse lymphoma cells. The most active compounds **6**, **7**, and **9** were further tested on human ovarian and human colorectal cancer cell lines (Table 7) and were found to have moderate activity against human ovarian carcinoma sensitive (A2780) and cisplatin-resistant (A2780 CisR) cell lines. Interestingly, **6** and **7** were more potent against A2780 CisR (IC₅₀ values 12.6 and 30.1 μM, respectively) than against sensitive A2780 (IC₅₀ values 27.1 and 76.2 μM, respectively) cell lines. In contrast, **9** was more potent against sensitive A2780 with an IC₅₀ value of 8.3 μM (IC₅₀ 19.0 μM against A2780 CisR). Moreover, **6** and **9** showed moderate activity against the human colorectal cancer cell line HCT116 with IC₅₀ values of 22.7 and 35.4 μM, respectively. These results were in accordance with the cytotoxic effects reported for waol A (**6**)³⁷ and cytosporone E (**9**).⁵⁴

Compounds **2**, **4**, **6**, and **8–10** were also tested for their antibacterial activity against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Only **9** clearly inhibited the growth of *S. aureus* with a MIC value of 14.3 μM, whereas a weak inhibition of *S. aureus* was observed for **10** (MIC 146.1 μM). The antibacterial properties of cytosporone E (**9**) against *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* were previously described by Brady et al.³⁰

Acknowledgements

Financial support by Grants of BMBF, MOST, and NAFOSTED (Project 104.01-2010.30) is gratefully acknowledged. The authors wish to thank H. Goldbach-Gecke and A. Hamacher (HHU Duesseldorf, Germany) for carrying out the bioactivity screening.

Supplementary data

Supplementary data (experimental section, compound characterization, ¹H NMR spectra of **1–5**, HMBC spectra of **1** and **2**, ¹³C NMR spectra of **3** and **4**, and the HMQC spectrum of **5**) associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2014.04.063>.

References and notes

- Bacon, C. W.; White, J. *Microbial Endophytes*, 1st ed.; Marcel Dekker Inc.: New York, 2000. pp 4–5.
- Eaton, C. J.; Cox, M. P.; Scott, B. *Plant Sci.* **2011**, *180*, 190–195.
- Freeman, S.; Rodriguez, R. *J. Science* **1993**, *260*, 75–78.
- Tan, R. X.; Zou, W. X. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 448–459.
- Khan, A. L.; Hamayun, M.; Kang, S. M.; Kim, Y. H.; Jung, H. Y.; Lee, J. H.; Lee, I. J. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 3–17.
- Liu, X.; Song, W.; Zhang, K.; Ye, Y.; Dai, C. *Yuanyi Xuebao* **2011**, *38*, 335–342.
- Richardson, M. D.; Cabrera, R. I.; Murphy, J. A.; Zaurov, D. E. *J. Plant Nutr.* **1999**, *22*, 67–79.
- Aly, A. H.; Debbab, A.; Kjer, J.; Proksch, P. *Fungal Divers.* **2010**, *41*, 1–16.
- Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Mueller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirgiebel, U.; Schaehtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972–980.
- Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A. K.; Krohn, K. *Mycol. Res.* **2002**, *106*, 996–1004.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. *Science* **1993**, *260*, 214–216.
- Li, J. Y.; Strobel, G.; Sidhu, R.; Hess, W. M.; Ford, E. J. *Microbiology* **1996**, *142*, 2223–2226.
- Bandaranayake, W. M. *Mangroves Salt Marshes* **1998**, *2*, 133–148.
- Gao, M. Z.; Xiao, H. B. *Molecules* **2012**, *17*, 10675–10682.
- Loo, A. Y.; Jain, K.; Darah, I. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1151–1160.
- Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Fungal Divers.* **2013**, *61*, 1–27.
- Huang, Z. J.; Yang, R. Y.; Yin, X. H.; She, Z. G.; Lin, Y. C. *Magn. Reson. Chem.* **2010**, *48*, 80–82.
- Klaiklay, S.; Rukachaisirikul, V.; Tadpetch, K.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Buatong, J.; Sakayaroj, J. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 2299–2305.
- Liu, D.; Li, X. M.; Meng, L.; Li, C. S.; Gao, S. S.; Shang, Z.; Proksch, P.; Huang, C. G.; Wang, B. G. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 1787–1791.
- Rukachaisirikul, V.; Rodglin, A.; Sukpondma, Y.; Phongpaichit, S.; Buatong, J.; Sakayaroj, J. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 853–858.
- Xu, J.; Kjer, J.; Sendker, J.; Wray, V.; Guan, H. S.; Edrada, R.; Lin, W. H.; Wu, J.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 662–665.
- Schmidt, G. *Chem. Unserer Zeit* **1976**, *10*, 189–195.
- Moussaïf, M. J. P.; Schaarwächter, P.; Budzikiewicz, H.; Thonart, P. *Appl. Environ. Microb.* **1997**, *63*, 1739–1743.
- Kashiwada, Y.; Nonaka, G.; Nishioka, I. *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3493–3500.
- Kimura, Y.; Mizuno, T.; Nakajima, H.; Hamasaki, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1992**, *56*, 1664–1665.
- Su, B. N.; Park, E. J.; Mbwambo, Z. H.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Fong, H. H.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1278–1282.
- Hammerschmidt, L.; Wray, V.; Lin, W. H.; Kamilova, E.; Proksch, P.; Aly, A. H. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 600–603.
- Nair, M. S. R.; Carey, S. T. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 1655–1658.
- Tsantrizos, Y. S.; Ogilvie, K. K.; Watson, A. K. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 2276–2284.
- Brady, S. F.; Wagenaar, M. M.; Singh, M. P.; Janso, J. E.; Clardy, J. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 4043–4046.
- Xu, J.; Kjer, J.; Sendker, J.; Wray, V.; Guan, H. S.; Edrada, R.; Mueller, W. E. G.; Bayer, M.; Lin, W. H.; Wu, J.; Proksch, P. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 7362–7367.
- Rodewald, G.; Arnold, R.; Griesler, J.; Stęglich, W. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1977**, *16*, 46–47.
- Spitzner, D. *Angew. Chem.–Ger. Ed.* **1977**, *89*, 55–56.
- Stoll, A.; Becker, B.; Kussmaul, W. *Helv. Chim. Acta* **1949**, *32*, 1892–1903.
- Gao, X.; Snider, B. B. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5517–5527.
- Gao, X.; Nakadai, M.; Snider, B. B. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 451–454.
- Nozawa, O.; Okazaki, T.; Morimoto, S.; Chen, Z. X.; He, B. M.; Mizoue, K. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 1296–1300.
- Hemberger, Y.; Xu, J.; Wray, V.; Proksch, P.; Wu, J.; Bringmann, G. *Chem.–Eur. J.* **2013**, *19*, 15556–15564.
- Xu, J. Ph.D. Dissertation, Heinrich-Heine University, Duesseldorf, 2010; <http://d-nb.info/1004888090/34>.
- Qureshi, I. H.; Akhtar, R. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* **1983**, *26*, 128–131.
- Ichihara, A.; Kawakami, Y.; Sakamura, S. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 61–64.

42. Paul, A.; Thapa, G.; Basu, A.; Mazumdar, P.; Kalita, M. C.; Sahoo, L. *Ind. Crop. Prod.* **2010**, *32*, 366–374.
43. Devkota, K. P.; Covell, D.; Ransom, T.; McMahon, J. B.; Beutler, J. A. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 710–714.
44. Silva, C. A.; Madureira, L. A. S. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **2012**, *84*, 589–604.
45. Ulubelen, A.; Topcu, G. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2085–2086.
46. Huneck, S.; Connolly, J. D.; Harrison, L. J.; Joseph, R.; Phillips, W. R.; Rycroft, D. S.; Ferguson, G.; Parvez, M. J. *Chem. Res. Synop.* **1986**, 162–163.
47. Zang, L. Y.; Wei, W.; Guo, Y.; Wang, T.; Jiao, R. H.; Ng, S. W.; Tan, R. X.; Ge, H. M. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 1744–1749.
48. Shimada, A.; Nakaya, K.; Takeuchi, S.; Kimura, Y. Z. *Naturforsch., B* **2001**, *56*, 449–451.
49. Graniti, A.; Sparapano, L.; Evidente, A. *Plant Pathol.* **1992**, *41*, 563–568.
50. Achenbach, H.; Muhlenfeld, A.; Brillinger, G. U. *Liebigs Ann. Chem.* **1985**, 1596–1628.
51. Kawada, M.; Usami, I.; Someno, T.; Watanabe, T.; Abe, H.; Inoue, H.; Ohba, S.; Masuda, T.; Tabata, Y.; Yamaguchi, S.; Ikeda, D. *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 237–243.
52. 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.; Zhang, K. Q. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 952–956.
53. Okuno, T.; Oikawa, S.; Goto, T.; Sawai, K.; Shirahama, H.; Matsumoto, T. *Agric. Biol. Chem. Tokyo* **1986**, *50*, 997–1001.
54. Beau, J.; Mahid, N.; Burda, W. N.; Harrington, L.; Shaw, L. N.; Mutka, T.; Kyle, D. E.; Barisic, B.; van Olphen, A.; Baker, B. J. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 762–774.

4.2.1 Supporting information of compounds isolated from *Acremonium strictum*

Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*

Lena Hammerschmidt^a, Abdessamad Debbab^a, Tu Duong Ngoc^b, Victor Wray^c, Catalina Perez Hemphill^a, WenHan Lin^d, Heike Broetz-Oesterhelt^a, Matthias U. Kassack^e, Peter Proksch^{a,*}, Amal H. Aly^{a,*}

^a Institut fuer Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine Universitaet, Universitaetsstrasse 1, Geb. 26.23., D-40225 Duesseldorf, Germany

^b Vietnamese Academy of Science and Technology, Institute of Chemistry, 18 Hoang Quoc Viet Road, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

^c Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstraße 7, D-38124 Braunschweig, Germany

^d National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, People's Republic of China

^e Institut fuer Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine Universitaet, Universitaetsstrasse 1, Geb. 26.23., D-40225 Duesseldorf, Germany

Experimental section

General experimental procedures

Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter. ^1H , ^{13}C and 2D NMR spectra were recorded in deuterated solvents on Bruker Avance III-600, and Bruker Avance DMX 600 NMR spectrometers. ESIMS spectra were measured with a LC-MS HP1100 Agilent Finnigan LCQ Deca XP Thermoquest and HRESIMS spectra were recorded with a UHR-QTOF maxis 4G (Bruker Daltonics) mass spectrometers. HPLC analysis was performed with a Dionex P580 system coupled to a photodiode array detector (UVD340S). The detection took place at 235, 254, 280 and 340 nm. The used columns (125 x 4 mm, L x ID) were prefilled with Eurospher 10 C₁₈ (Knauer, Germany). HPLC separation was performed on a semi preparative HPLC system of LaChrom-Merck Hitachi (pump L7100 and UV detector L7400; column Eurospher 100 C₁₈, 300 x 8 mm, Knauer, Germany) with a flow rate of 5.0 mL/min.

Fungal material

The fungus (strain no. Mg2 Thân1) was isolated from stems of the mangrove *Rhizophora apiculata* Blume collected on the island of CatBa, Vietnam, in July 2010. The fungal strain was isolated according to previously described procedures, Aly, Kijier) and identified by the DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig). A voucher strain is kept in one of the author's laboratories (P.P.).

Cultivation and extraction

Mass growth of the fungus was achieved by cultivating it on solid rice (100 g rice and 110 mL water, autoclaved for 20 min at a temperature of 121 °C) in ten Erlenmeyer flasks (1 L each) for four weeks under static conditions.

The fungal cultures were extracted with 400 mL EtOAc and partitioned between *n*-hexane and 90% aqueous MeOH. After evaporation, the MeOH extract was fractionated by vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel 60 using an elution system of *n*-hexane and EtOAc. For further separation different column chromatographic systems using Sephadex LH20, Diol or HP20 were performed followed by semi preparative HPLC for final purification.

1. 6'-Hydroxypestalotiopsone C (**1**). Brown solid; $[\alpha]_D^{20} +19.2^\circ$ (*c* 0.04, MeOH); UV λ_{max} (PDA) 220, 242, 249 and 290 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 1; ESIMS (rel. int.) m/z 668.9 [2M+H]⁺ (100), 335.1 [M+H]⁺ (85), 333.2 [M-H]⁻ (100), 667.0 [2M-H]⁻ (30); HRESIMS m/z 335.14836 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₈H₂₃O₆, 335.14891).

Publikation 2: Supporting Information

2. *Acropyrone (2)*. Brown powder; UV λ_{\max} (PDA) 238 and 340 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 3; ESIMS (rel. int.) m/z 448.9 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 225.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (90), 447.0 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ (100), 223.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (22); HRESIMS m/z 225.07556 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{O}_5$, 225.07575).

3. *Bicytosporone D (3)*. Red brown solid; $[\alpha]_D^{20}$ -8.9° (c 0.04, MeOH); UV λ_{\max} (MeOH) 208 and 290 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 4; ESIMS (rel. int.) 587.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 585 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100); HRESIMS m/z 587.28422 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{43}\text{O}_{10}$, 587.28507).

4. *Waal acid (4)*. Yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ -48.5° (c 0.02, MeOH); UV λ_{\max} (PDA) 218 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 5; ESIMS (rel. int.) m/z 508.7 $[2\text{M}+\text{H}]^+$ (100), 506.9 $[2\text{M}-\text{H}]^-$ (100), 253.3 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (38); HRESIMS m/z 253.10815 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{O}_5$, 253.10815).

5. *Pestalotiopene C (5)*. Brown solid; $[\alpha]_D^{20}$ -6.9° (c 0.2, MeOH); UV λ_{\max} (PDA) 244, 272 and 318 nm; ^1H and ^{13}C NMR, see Table 6; ESIMS (rel. int.) m/z 579 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (35), 577.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (100), 555.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (35), 553.2 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (100), 305.3 $[\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{ClO}_4-\text{H}]^-$ (5), 303.3 $[\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{ClO}_4-\text{H}]^-$ (20); HRESIMS m/z 553.18345 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{ClO}_{10}$, 553.18460).

Chiral derivatization

For the determination of the absolute configuration of **1** and **4** the convenient Mosher ester method was performed as described by Su et al. (Su et al., 2002) The compounds (2 x 1 mg and 2 x 2 mg, respectively) were dried in NMR tubes under vacuum and were then dissolved in deuterated pyridine (0.5 mL). The (*R*)- and (*S*)-MTPA chloride were added, in a ratio of 0.14 mM of Mosher reagent to 0.10 mM of the compounds, (Dale and Mosher, 1973) separately into the NMR tubes under N_2 gas stream and mixed carefully with the samples. The NMR tubes were left to stand at room temperature and ^1H NMR spectra were recorded to monitor the reaction. When the reaction was found to be complete, COSY spectra were measured to confirm the assignment of the signals.

Cytotoxic and antibacterial assays

Cytotoxicity was tested against A2780 sens, A2780 CisR and HCT116 using a microplate 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay with cisplatin as negative control as described before. (Kreuter et al., 1992; Mueller et al., 2004) Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was tested by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) using gentamycin, ciprofloxacin and vancomycin as controls. The starting concentration was 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1:2 dilution steps were performed.

References

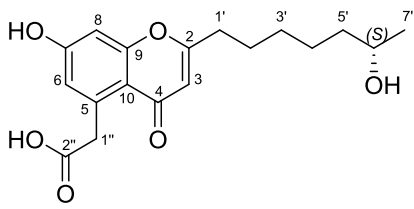
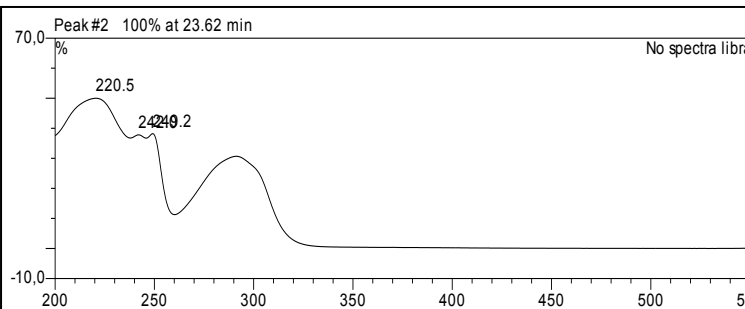
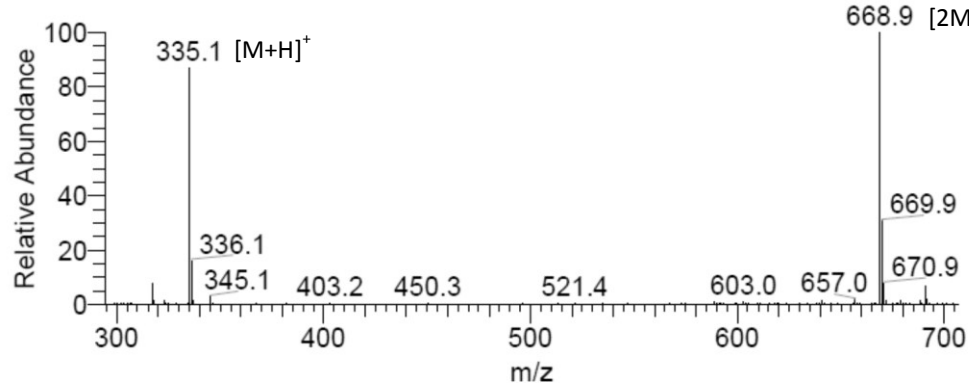
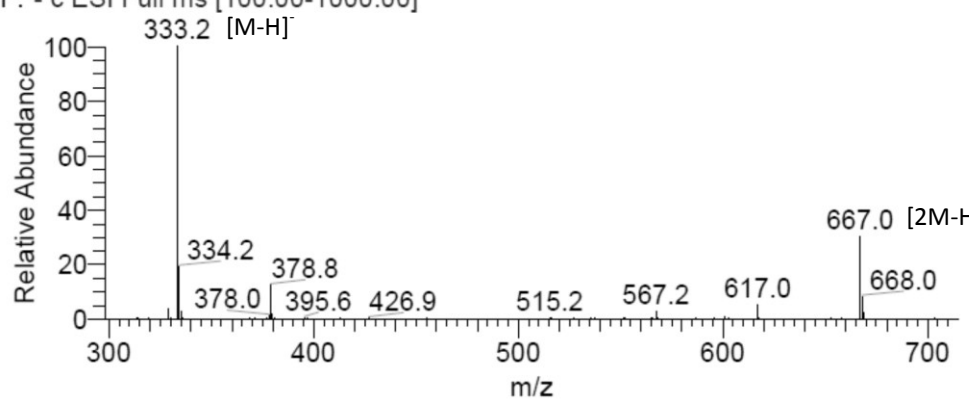
1. Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Mueller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schaechtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972-980.
2. Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 479-490.
3. Su, B. N.; Park, E. J.; Mbwambo, Z. H.; Santarsiero, B. D.; Mesecar, A. D.; Fong, H. H.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1278-1282.
4. Dale, J. A.; Mosher, H. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519.
5. Kreuter, M. H.; Robitzki, A.; Chang, S.; Steffen, R.; Michaelis, M.; Kljajic, Z.; Bachmann, M.; Schroeder, H. C.; Mueller, W. E. G. *Comp. Biochem. Phys. C: Comparative Pharmacology* **1992**, *101*, 183-187.
6. Mueller, H.; Kassack, M. U.; Wiese, M. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9*, 506-515.

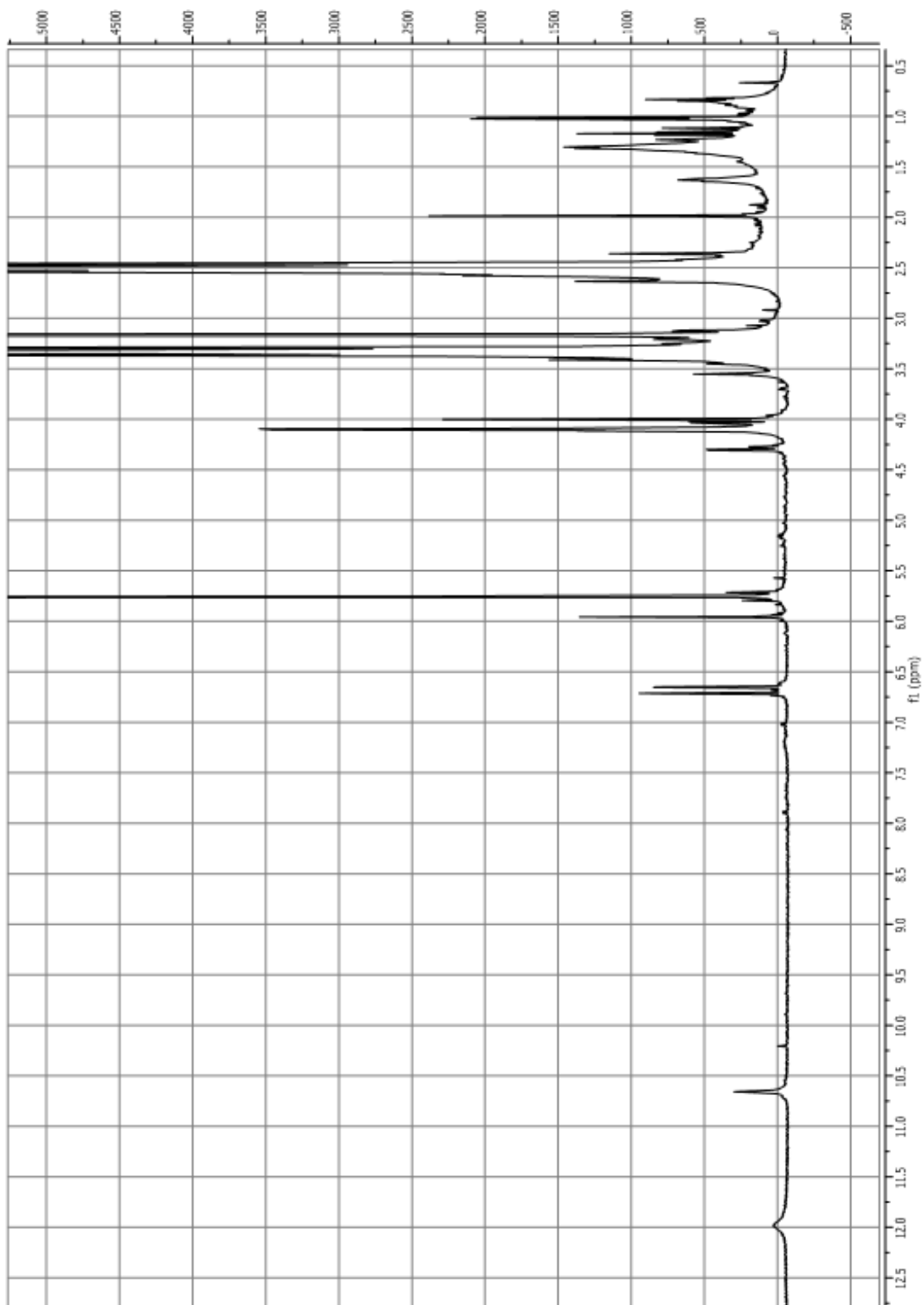
Publikation 2: Supporting Information

| | |
|--|----|
| S1. General information of 6'-hydroxypestalotiopsone C (1), including RT, UV and mass spectra..... | 56 |
| S1.1. ¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 1 | 57 |
| S1.2. HMBC NMR (600 and 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 1 | 58 |
| S2. General information of acropyrone (2) including RT, UV and mass spectra | 59 |
| S2.1. ¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 2 | 60 |
| S2.2. HMBC NMR (600 and 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 2 | 61 |
| S3. General information of bicytosporone D (3), including RT, UV and mass spectra..... | 62 |
| S3.1. ¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 3 (5.5 ppm to 0 ppm)..... | 63 |
| S3.1. ¹ H NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 3 (12 ppm to 5.5 ppm)... | 64 |
| S3.2. ¹³ C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 3 | 65 |
| S4. General information of waol acid (4), including RT, UV and mass spectra | 66 |
| S4.1. ¹ H NMR (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 4 | 67 |
| S4.2. ¹³ C NMR (150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 4 | 68 |
| S4.3. HMQC NMR (600 and 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 4 | 69 |
| S4.4. HMBC NMR (600 and 150 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 4 | 69 |
| S5. General information of pestalotiopene C (5), including RT, UV and mass spectra..... | 70 |
| S5.1. ¹ H NMR (600 MHz, Acetone- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 5 | 71 |
| S5.2. HMQC NMR (600 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of the new compound 5 | 72 |
| S6. General information of waol A (6), including RT, UV and mass spectra..... | 73 |
| S6.1. ¹ H NMR spectrum of waol A (6) (500 MHz, MeOD)..... | 74 |
| S7. General information of pestalotiopene A (7), including RT, UV and mass spectra..... | 75 |
| S7.1. ¹ H NMR spectrum of pestalotiopene A (7) (500 MHz, Acetone)..... | 76 |
| S8. General information of cytosporone C (8), including RT, UV and mass spectra | 77 |
| S8.1. ¹ H NMR spectrum of cytosporone C (8) (500 MHz, Acetone)..... | 78 |
| S9. General information of cytosporone E (9), including RT, UV and mass spectra | 79 |
| S9.1. ¹ H NMR spectrum of cytosporone E (9) (500 MHz, Acetone)..... | 80 |
| S10. General information of NBRI 17671 (australifunginol derivative) (10), including RT, UV and mass spectra..... | 81 |
| S10.1. ¹ H NMR spectrum of NBRI 17671 (10) (600 MHz, MeOD) | 82 |
| S11. General information of (4 <i>S</i>)-6-hydroxyisosclerone (11), including RT, UV and mass spectra..... | 83 |
| S11.1 ¹ H NMR spectrum of 6-hydroxyisosclerone (11) (500 MHz, MeOD)..... | 84 |
| S12. General information of (3 <i>R</i> , 4 <i>R</i>)-4-hydroxy-5-methylmellein (12), including RT, UV and mass spectra..... | 85 |
| S12.1 ¹ H NMR spectrum of 4-hydroxy-5-methylmellein (12) (500 MHz, MeOD)..... | 86 |

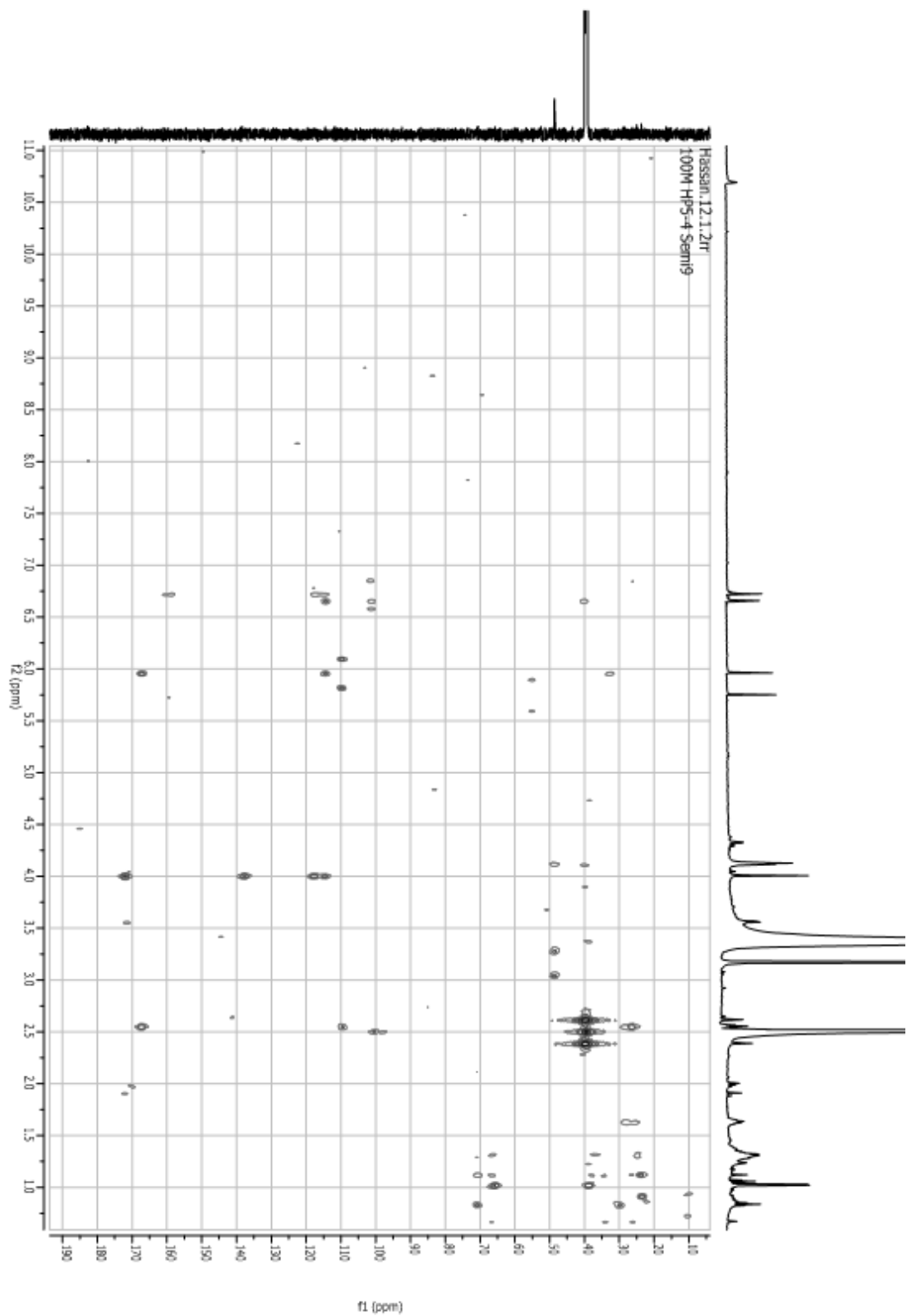
Publikation 2: Supporting Information

S1. General information of 6`-hydroypestalotiopsone C (1), including RT, UV and mass spectra.

| 6`-Hydroypestalotiopsone C | |
|---|---|
| Synonym(s) | 2-(7-hydroxy-2-(6-hydroxyheptyl)-4-oxo-4H-chromen-5-yl)acetic acid |
| Samples code | 100M HP5-4 Semi9 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 2.2 mg |
| Physical description | Colourless amorphous |
| Molecular formula | $C_{18}H_{22}O_6$ |
| Molecular weight | 334 g/mol (335.14836, calcd. for $C_{18}H_{23}O_6$ 335.14891) |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | +19.2° (c 0.04 MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 24 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  |
| MS | <p>lena294 #802 RT: 22.54 AV: 1 NL: 3.32E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena294 #800 RT: 22.48 AV: 1 NL: 2.35E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



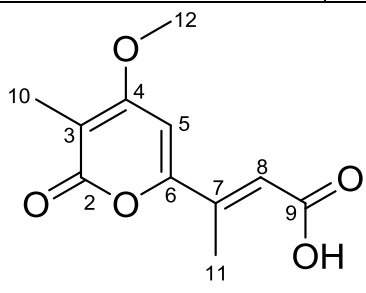
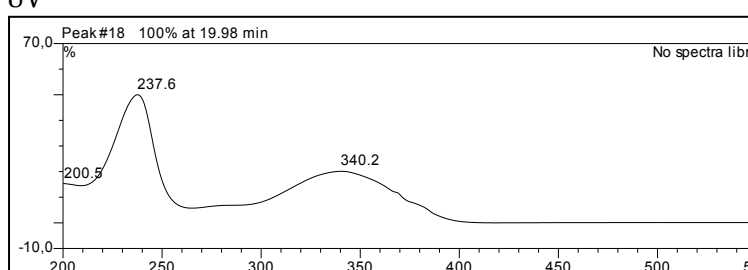
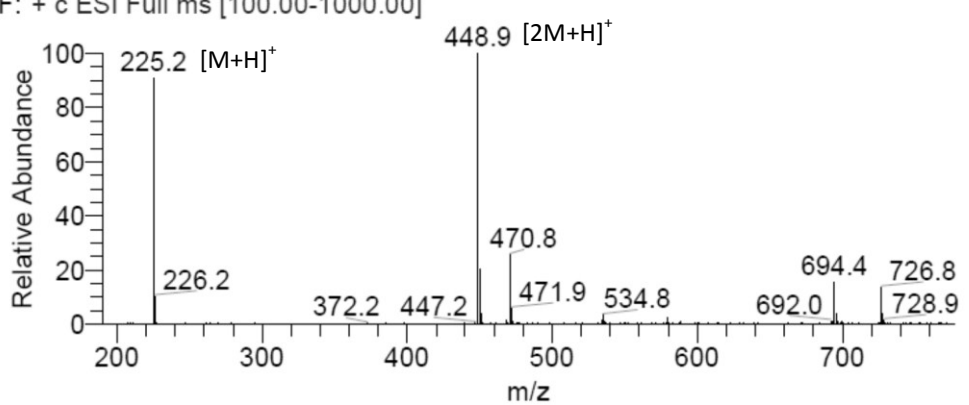
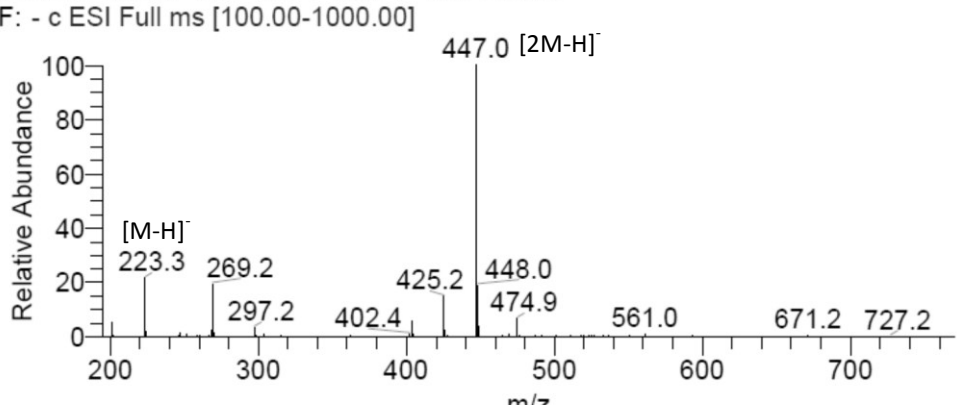
S1.1. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 1.

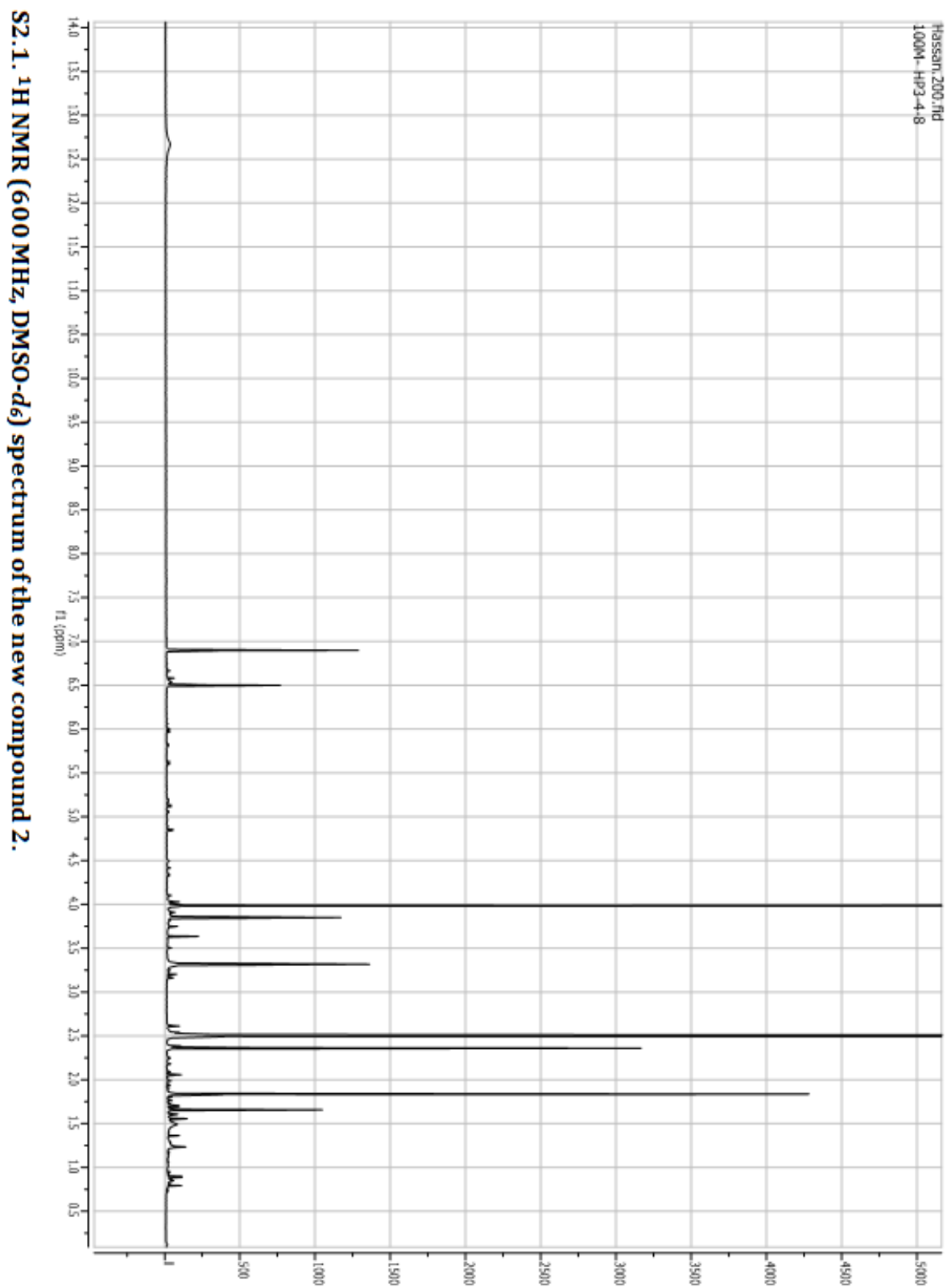


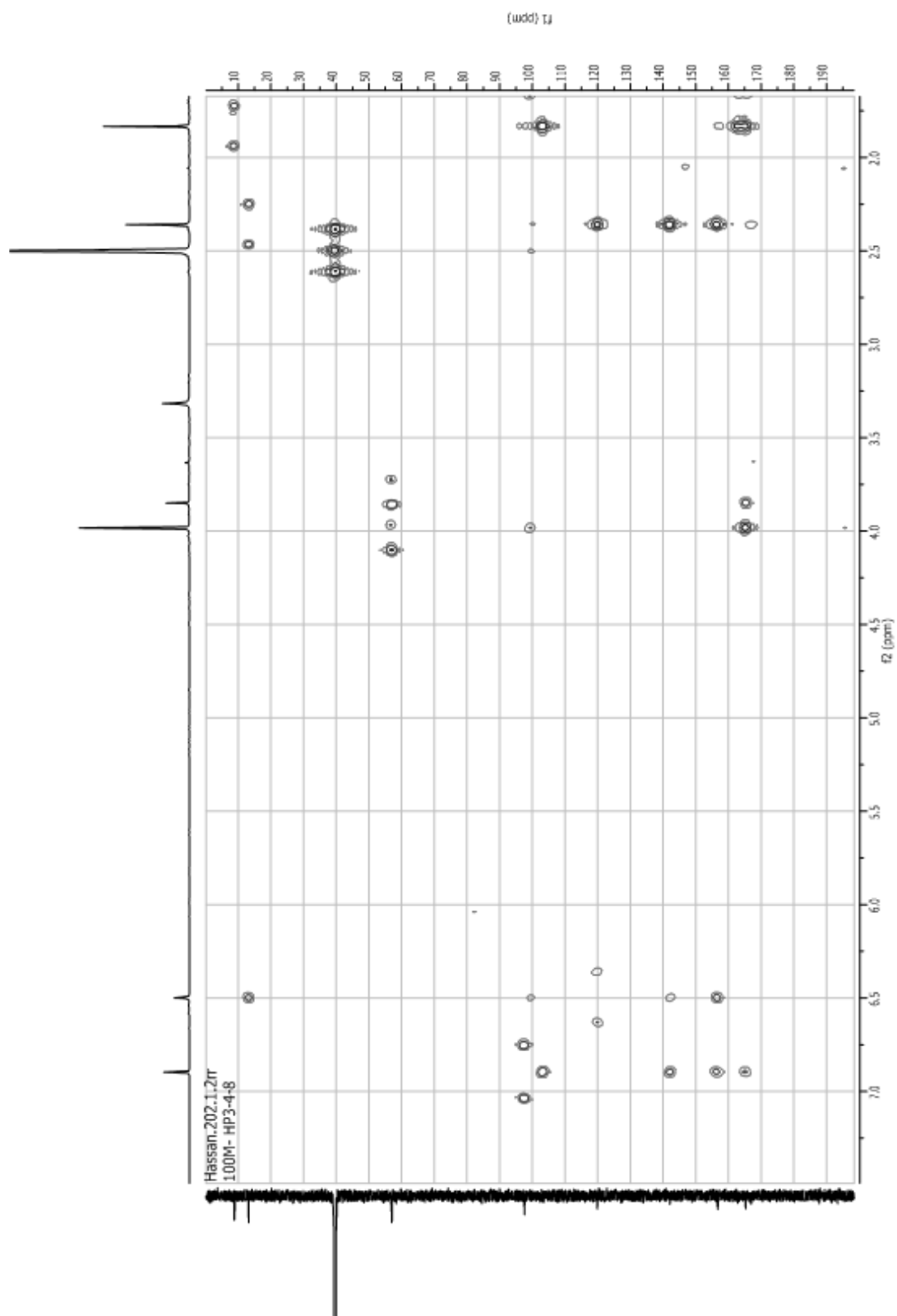
S1.2. HMBC NMR (600 and 150 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 1.

Publikation 2: Supporting Information

S2. General information of acropyrone (2), including RT, UV and mass spectra.

| Acropyrone | |
|---|--|
| Synonym(s) | 3-[4-methoxy-3-methyl- α -pyron-6-yl]-but-2-enoic acid |
| Samples code | 100M HP3-4 Semi8 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 2 mg |
| Physical description | yellow |
| Molecular formula | C ₁₁ H ₁₂ O ₅ |
| Molecular weight | 224 g/mol (225.07556 calcd. for C ₁₁ H ₁₃ O ₅ 225.07575) |
| Retention time (HPLC) | 20 min |
|  | UV  |
| MS | <p>lena206 #1538 RT: 42.68 AV: 1 NL: 1.57E9 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena206 #1540 RT: 42.74 AV: 1 NL: 1.50E8 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |





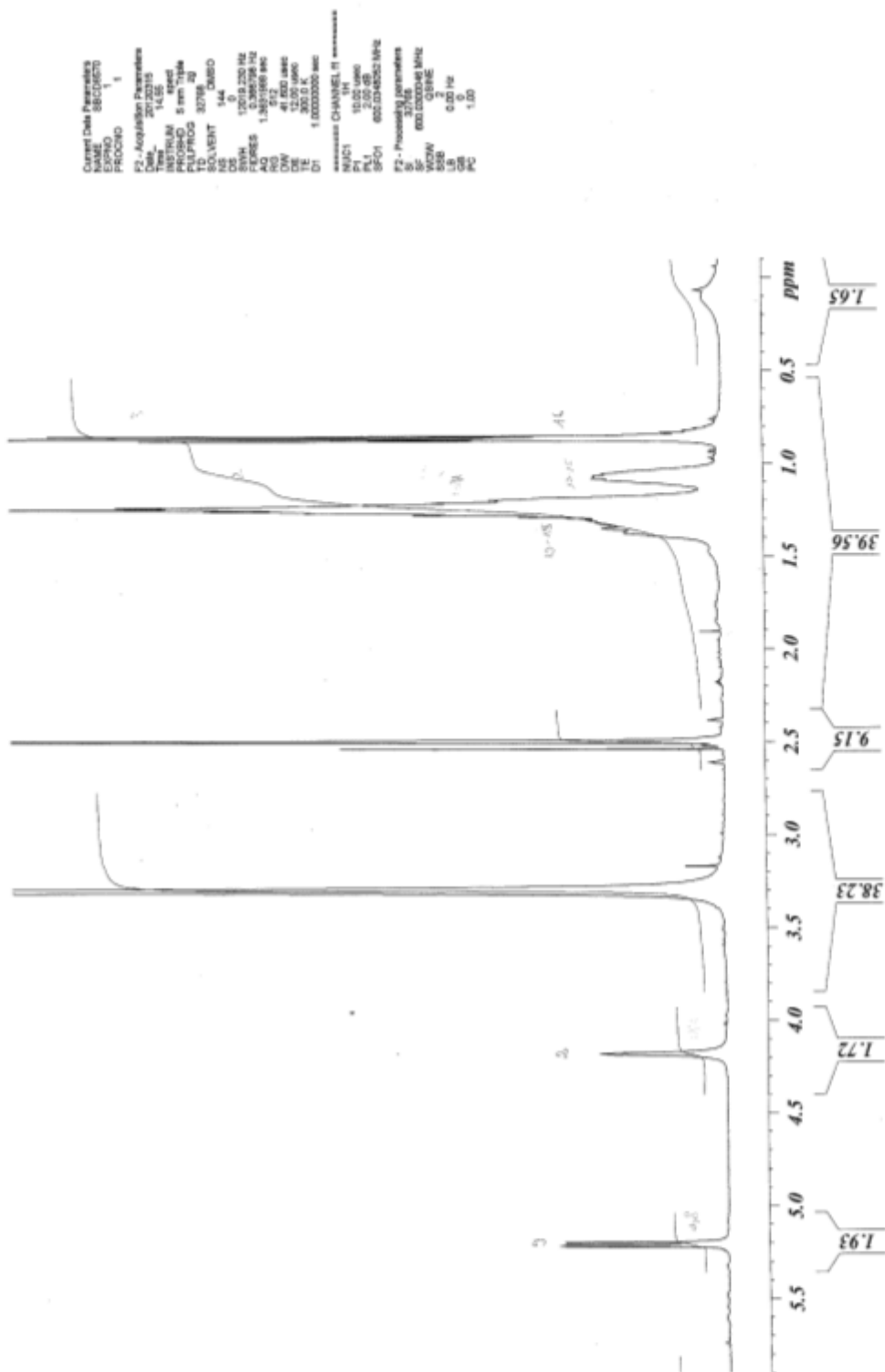
S2.2. HMBC NMR (600 and 150 MHz, DMSO- d_6) spectrum of the new compound 2.

Publikation 2: Supporting Information

S3. General information of bicytosporone D (3), including RT, UV and mass spectra.

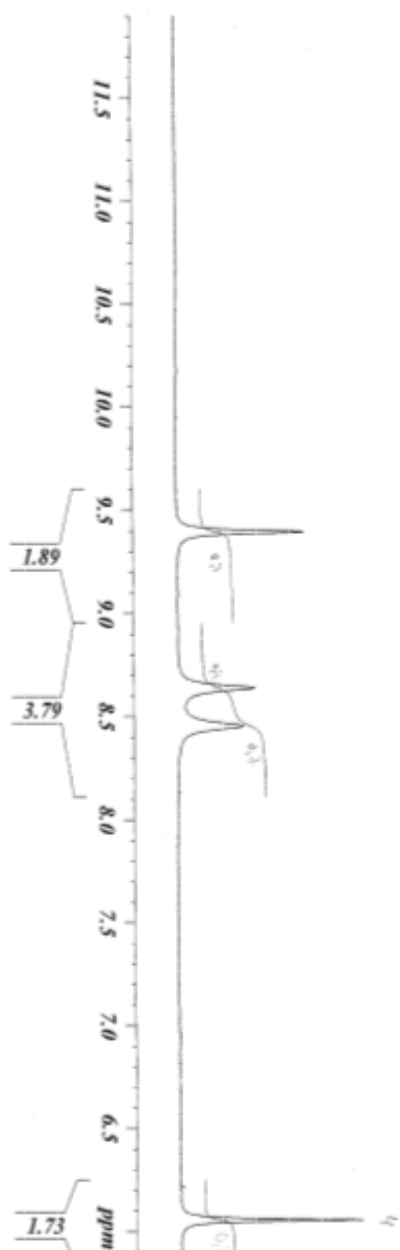
| Bicytosporone D | |
|--|---|
| Synonym(s) | 1,1'-diheptyl-6,6',7,7',8,8'-hexahydroxy-[4,4'-biisochroman]-3,3'-dione |
| Samples code | 40Hex S12 Semi2 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 2.0 mg |
| Physical description | Red brown |
| Molecular formula | $C_{32}H_{42}O_{10}$ |
| Molecular weight | 586g/mol (587.28422, calcd. $C_{32}H_{43}O_{10}$ 587.28507) |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | -8.9° (c 0.04, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 31 min |
| | <p style="text-align: center;">UV</p> |
| <p style="text-align: center;">MS</p> <p>Lena094 #1304 RT: 35.56 AV: 1 NL: 4.01E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> | <p>Lena094 #1314 RT: 35.82 AV: 1 NL: 1.91E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p> |

SBCD8570 1 | Hammerschmidt



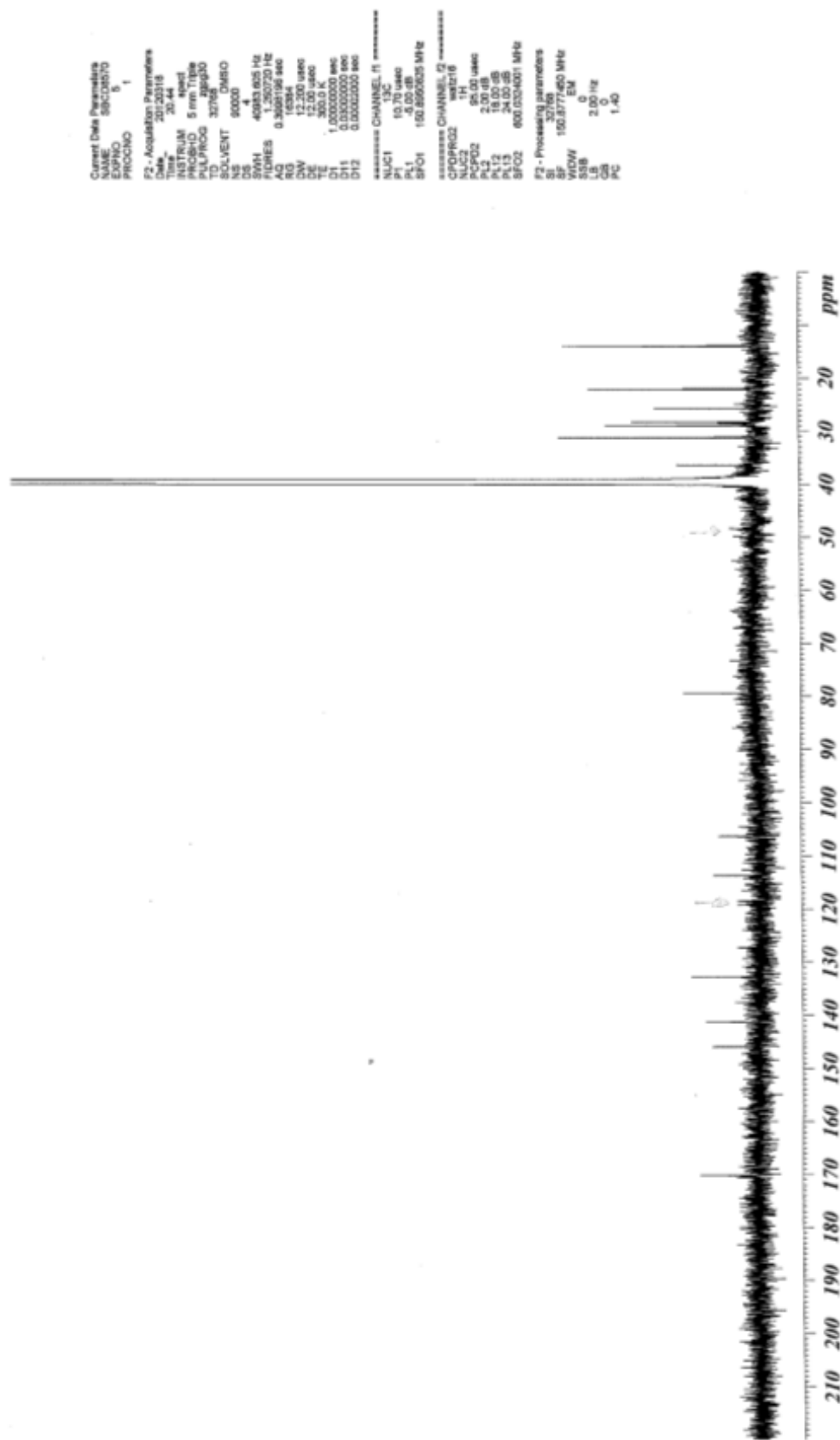
S3.1. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 3 (5.5 ppm to 0 ppm).

SBCD8570 1 Hammerschmidt



S3.1. ¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 3 (12 ppm to 5.5 ppm).

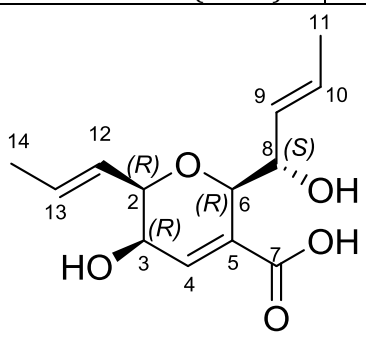
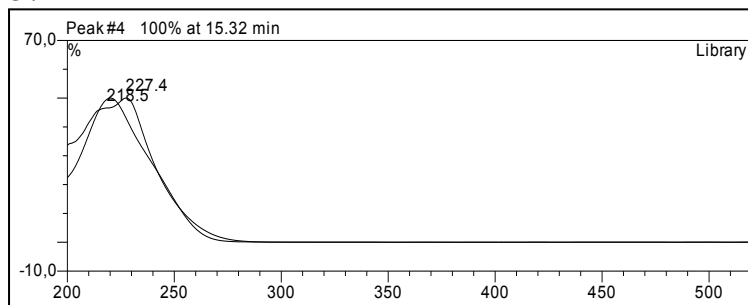
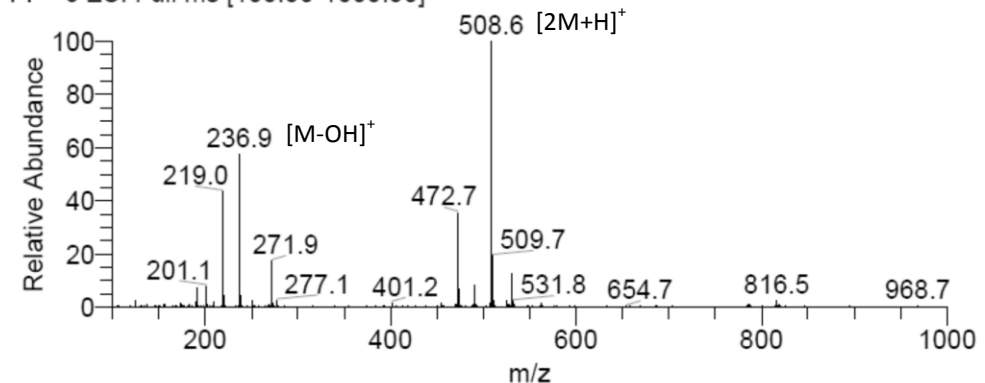
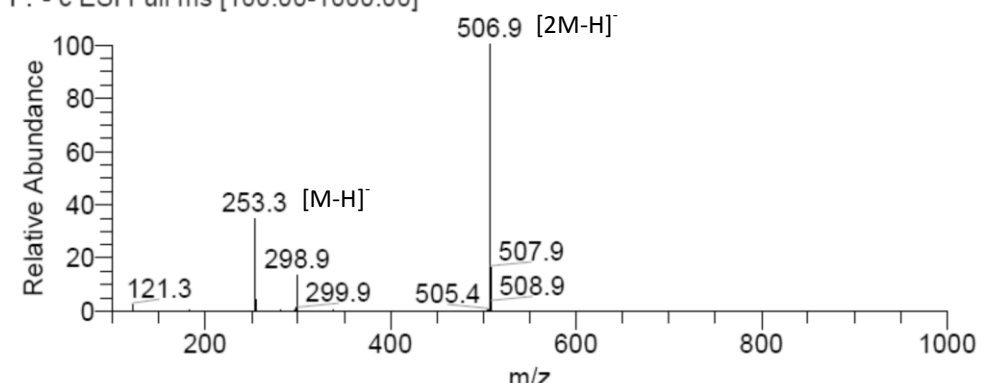
SBCD8570 5 1 Hammerschmidt

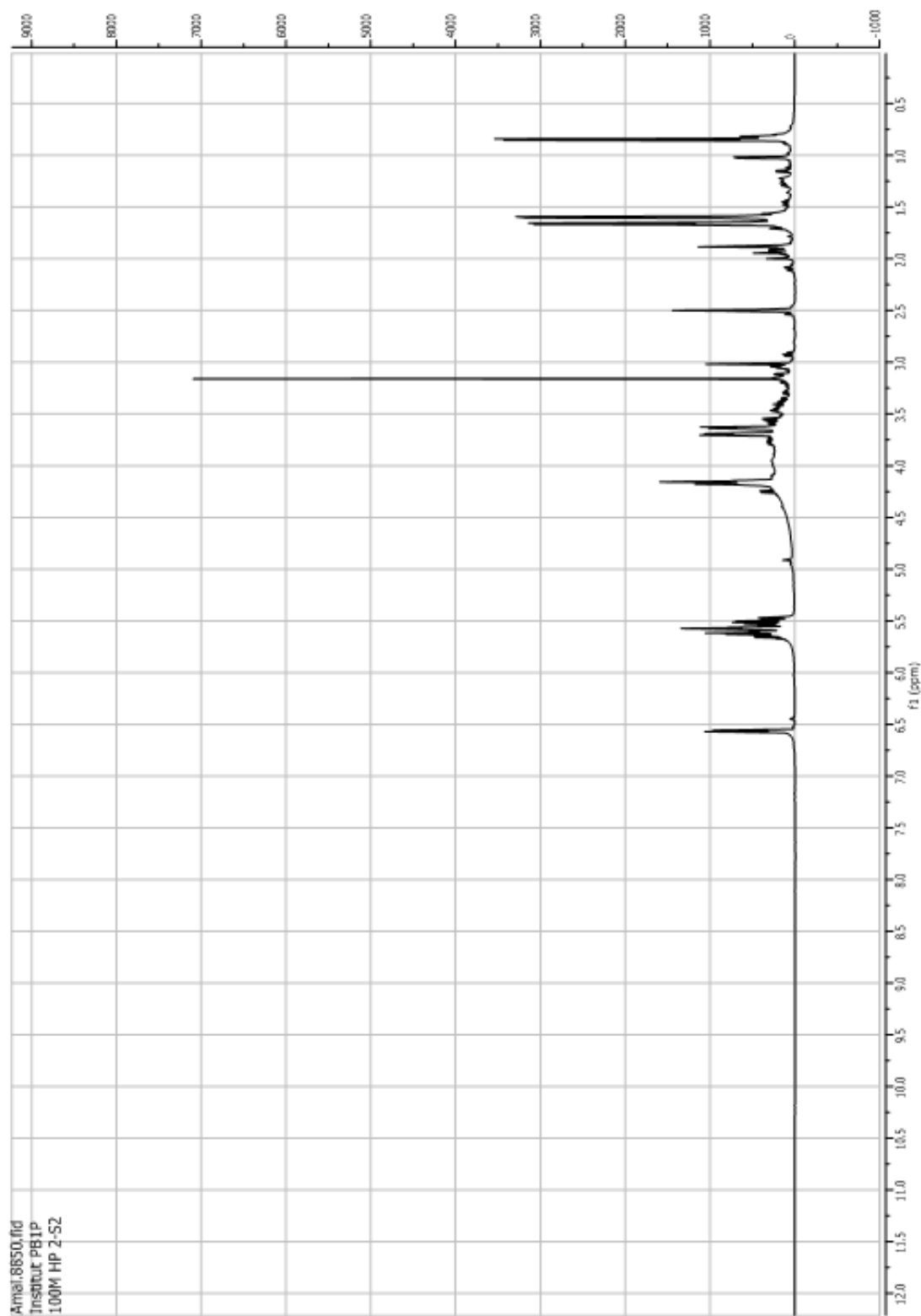


S3.2. ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 3.

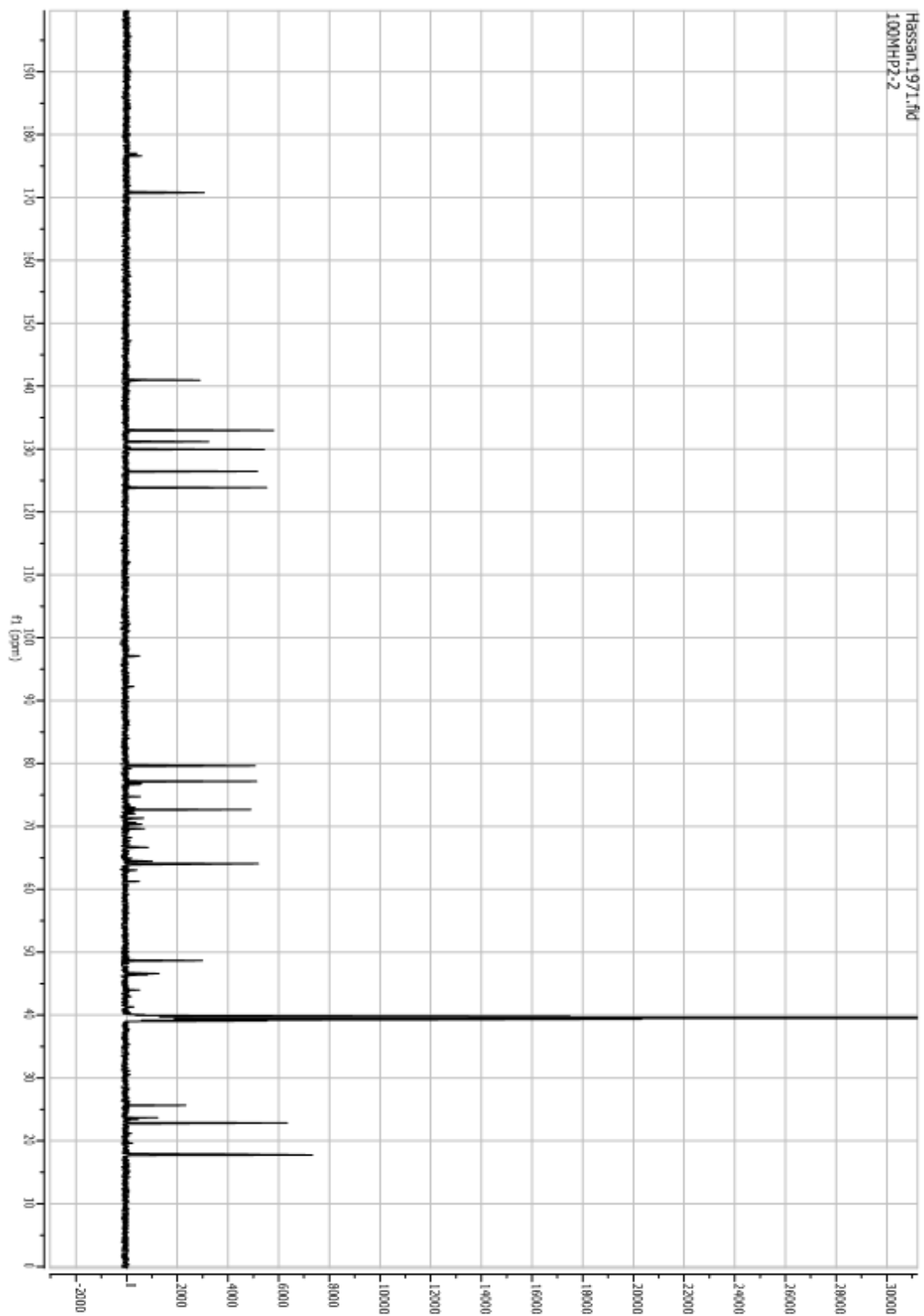
Publikation 2: Supporting Information

S4. General information of waol acid (4), including RT, UV and mass spectra.

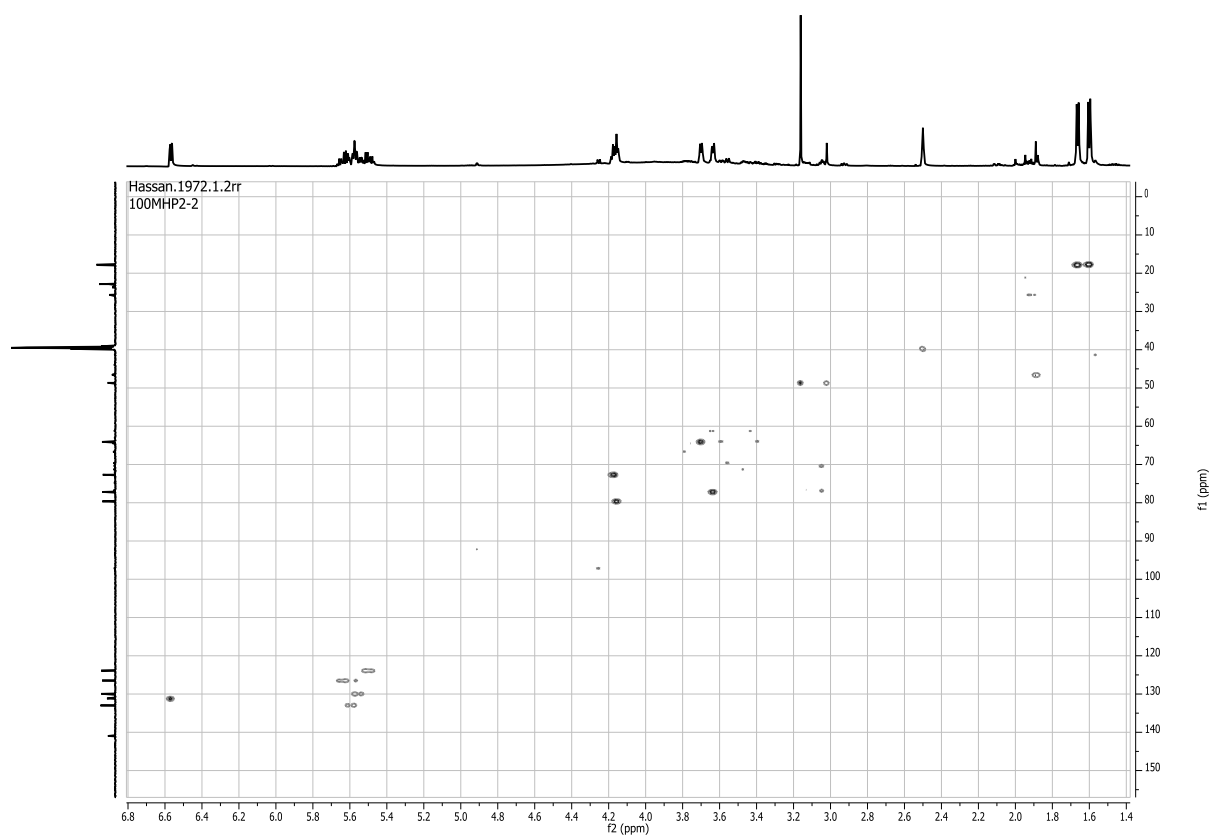
| Waol acid | |
|---|---|
| Synonym(s) | (5-hydroxy-2- ((<i>E</i>)-8-hydroxybut-9-en-8-yl)-6-((<i>E</i>)-prop-12-en-12-yl)-5,6-dihydro-2 <i>H</i> -pyran-3-carboxylic acid) |
| Samples code | 100M HP2 S2 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 10 mg |
| Physical description | yellow oil |
| Molecular formula | C ₁₃ H ₁₈ O ₅ |
| Molecular weight | 254 g/mol (253.10815, calcd. for C ₁₃ H ₁₇ O ₅ 253.10815) |
| OR [α] _D ²⁰ | -48.5° (c 0.02, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 15 min |
|  | UV  |
| MS | <p>lena281 #609 RT: 16.47 AV: 1 NL: 3.94E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena281 #607 RT: 16.43 AV: 1 NL: 1.16E8 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



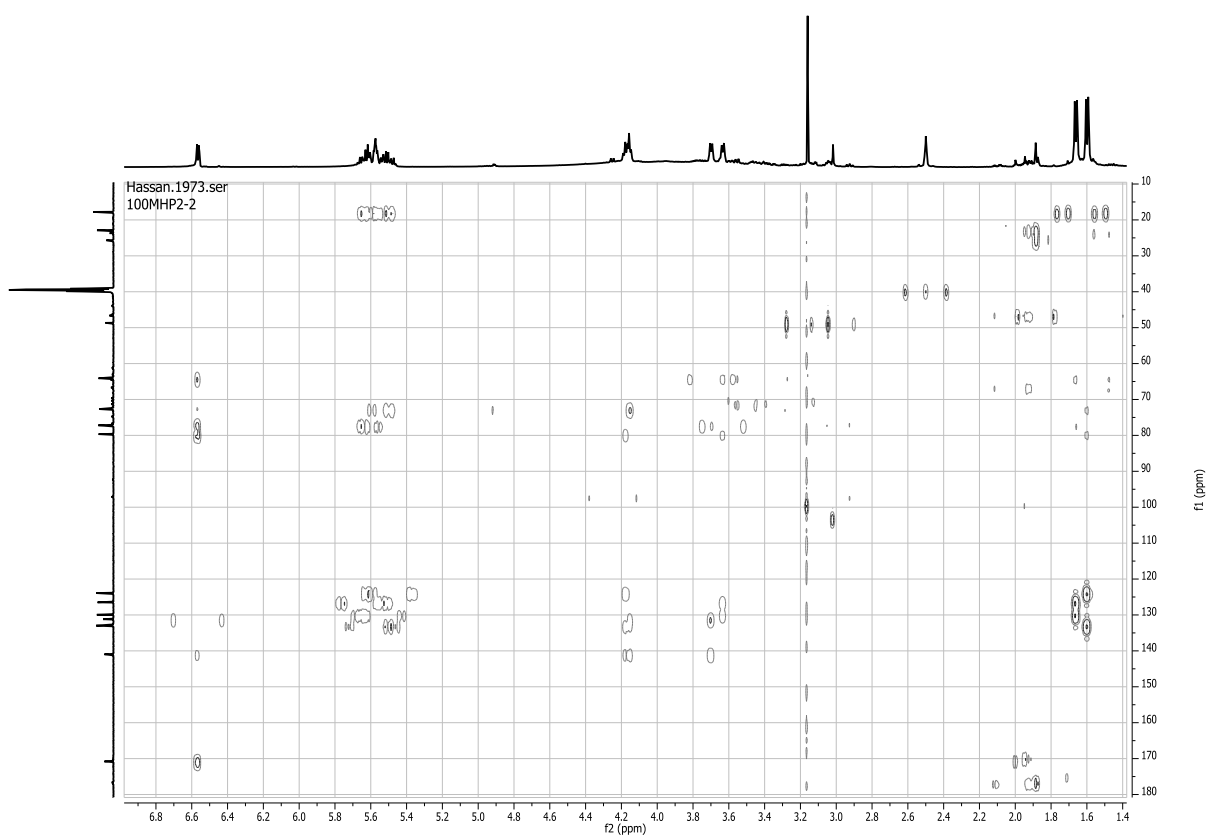
S4.1. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 4.



S4.2. ^{13}C NMR (150 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spectrum of the new compound 4.



S4.3 HMQC NMR (600 and 150 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 4.

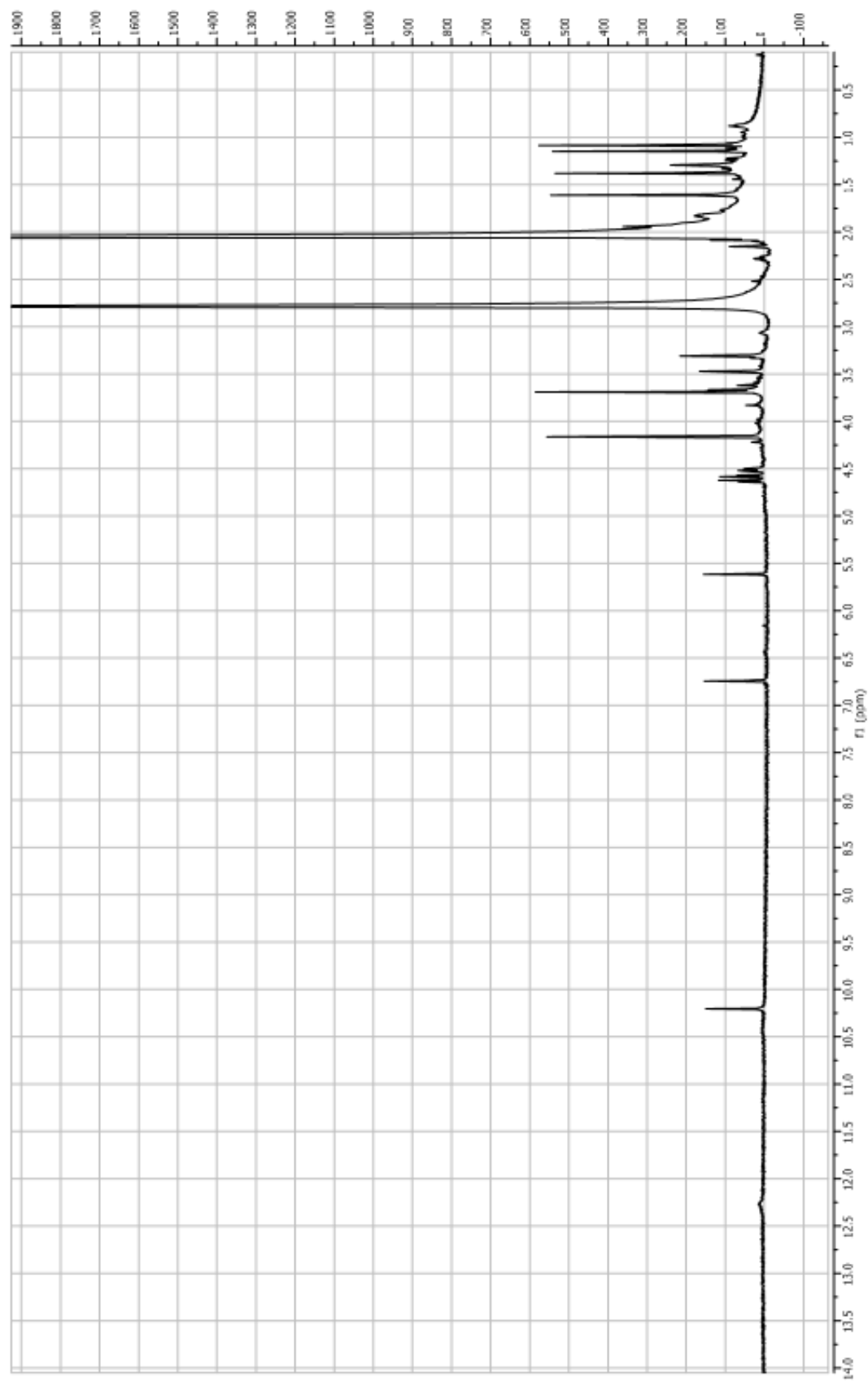


S4.4 HMBC NMR (600 and 150 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of the new compound 4.

Publikation 2: Supporting Information

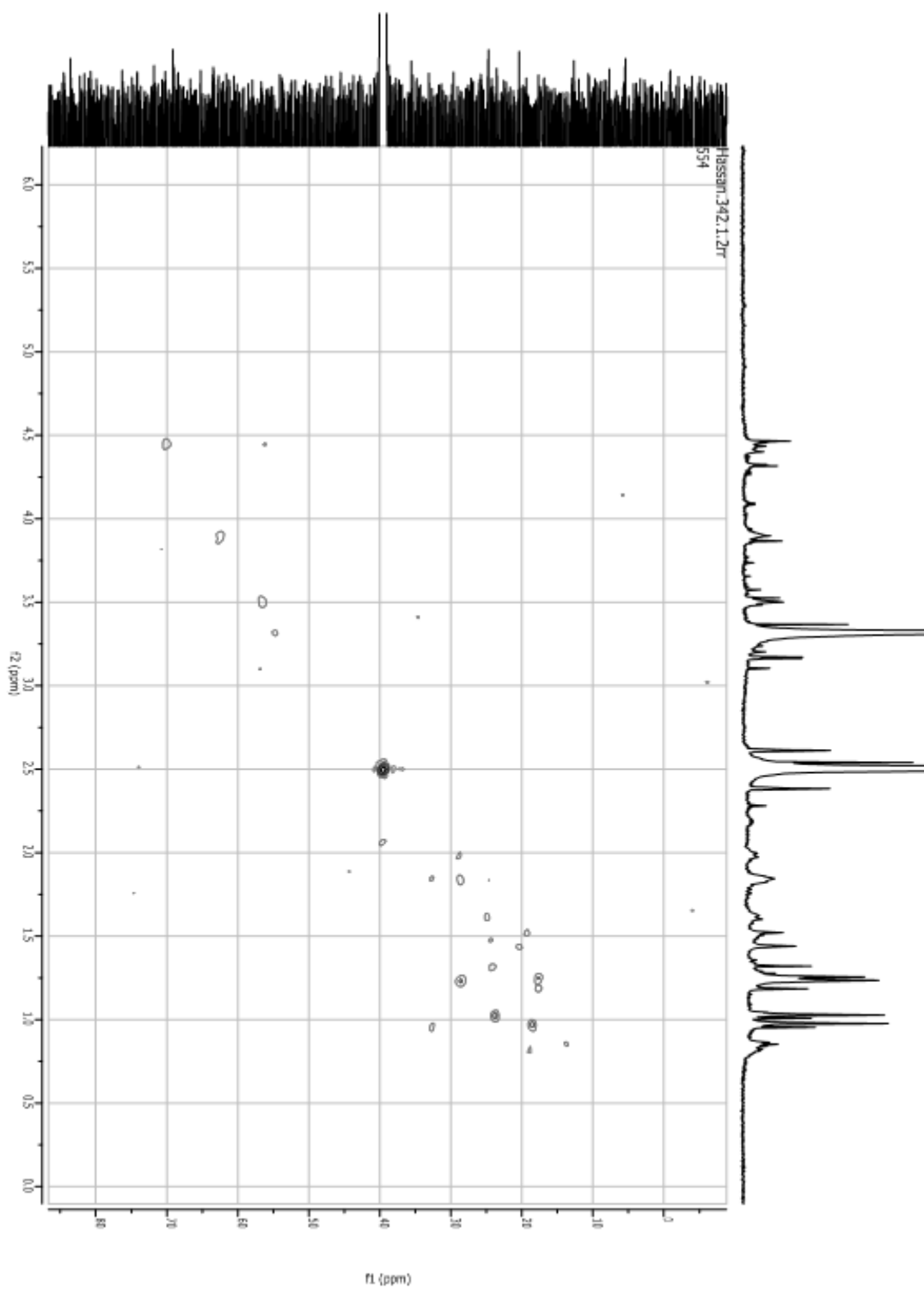
S5. General information of pestalotiopene C (5), including RT, UV and mass spectra.

| Pestalotiopene C | |
|--|--|
| Synonym(s) Samples code Biological source Sample amount Physical description Molecular formula Molecular weight OR $[\alpha]_D^{20}$ Retention time (HPLC) | (3 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>R</i> ,)-3-chloro-8-(((<i>S</i>)-4'-formyl-5'-hydroxy-3',7'-dimethoxy-1'-oxo-1',3'-dihydroisobenzofuran-6'-yl)methoxy)-5-hydroxy-4,4,8,10-tetramethyldecahydronaphthalene-9-carboxylic acid 100E S4-3 Semi1 <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) 1.1 mg brownish C ₂₇ H ₃₅ ClO ₁₀ 554 g/mol (553.18345, calcd. for C ₂₇ H ₃₄ ClO ₁₀ 553.18460) -6.9° (c 0.2, MeOH) 30 min |
| | UV |
| MS | Lena096 #1400 RT: 37.86 AV: 1 NL: 6.11E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00] |
| | Lena096 #1406 RT: 37.99 AV: 1 NL: 5.05E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00] |



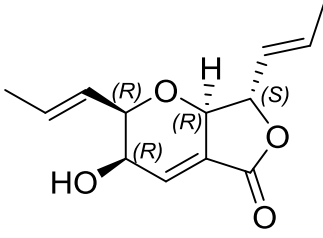
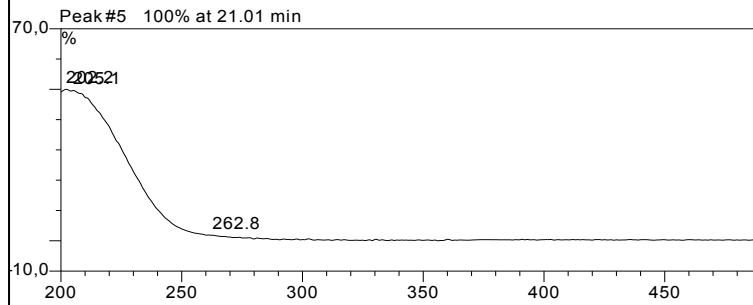
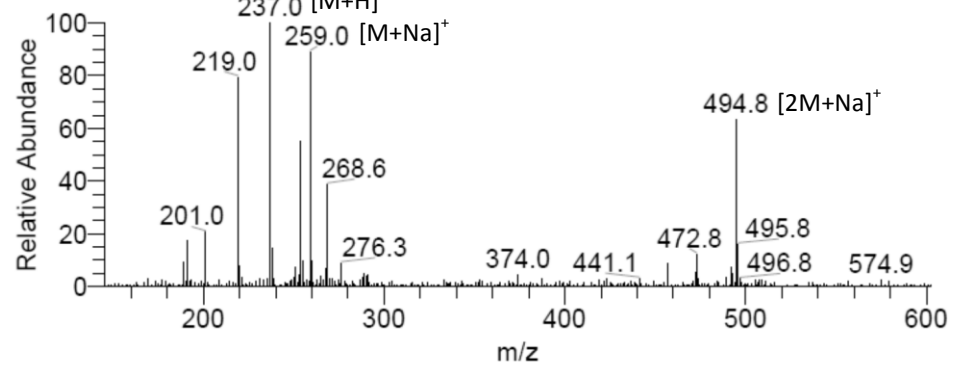
S5.1. ^1H NMR (600 MHz, Acetone- d_6) spectrum of the new compound 5.

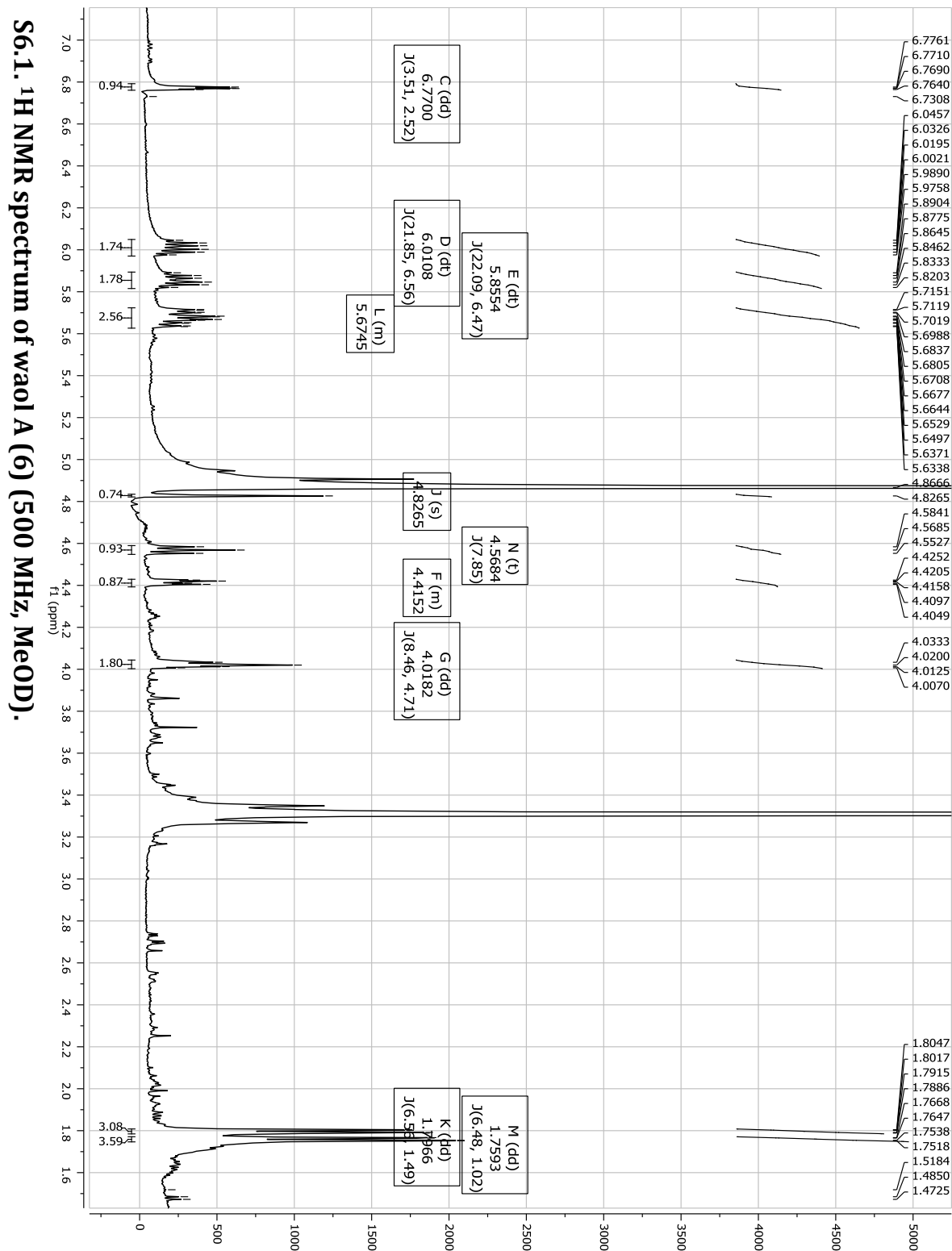
S5.2. HMQC NMR (600 MHz, DMSO- d_6) spectrum of the new compound 5.



Publikation 2: Supporting Information

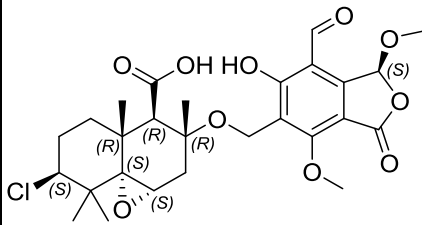
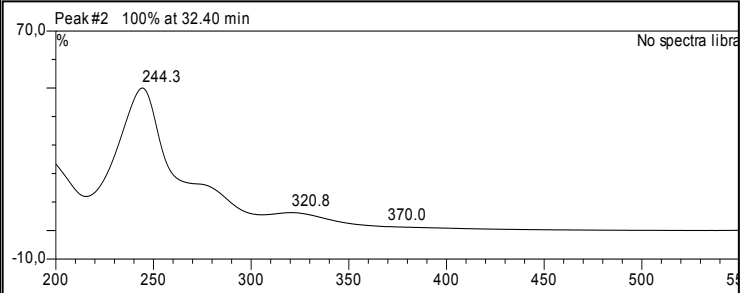
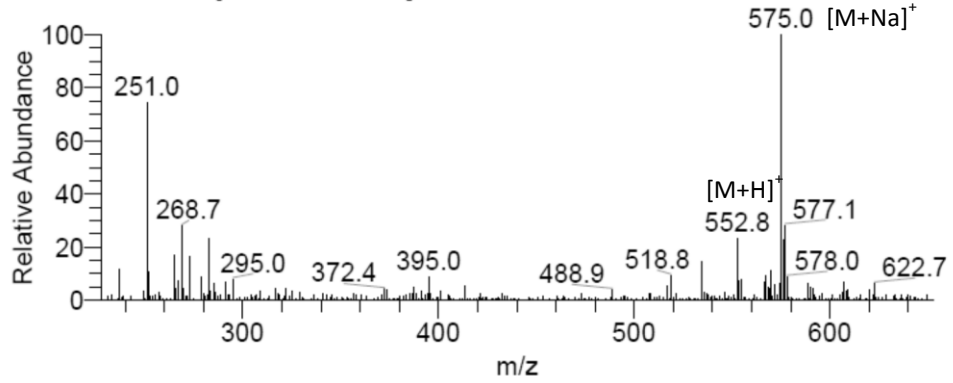
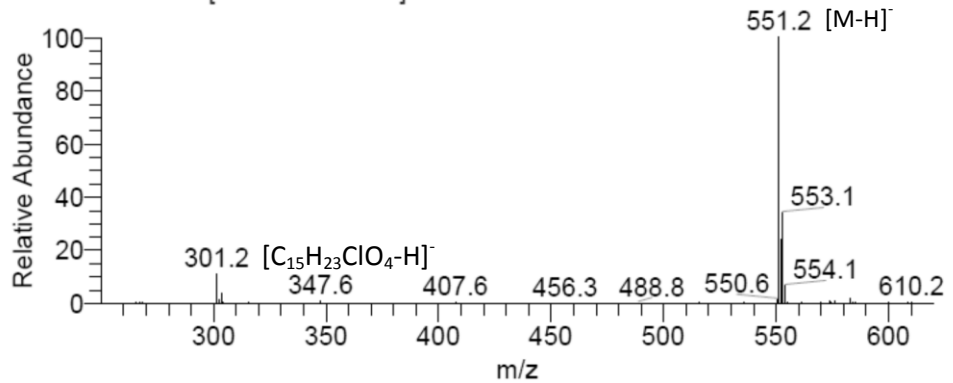
S6. General information of waol A (6), including RT, UV and mass spectra.

| Waol A | |
|---|---|
| Synonym(s) | (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,7 <i>S</i> ,7 <i>aR</i>)-3-hydroxy-2,7-di((<i>E</i>)-prop-1-en-1-yl)-2,3,7,7 <i>a</i> -tetrahydro-5 <i>H</i> -furo[3,4- <i>b</i>]pyran-5-one |
| Samples code | 60H S5 S2 Semi2, 80H S5 Semi1 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 4 mg |
| Physical description | bright yellow oil |
| Molecular formula | C ₁₃ H ₁₆ O ₄ |
| Molecular weight | 236 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -97.8° (c 0.48, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 21 min |
|  | UV  |
| MS | lena152 #1089 RT: 29.28 AV: 1 NL: 2.80E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]  |

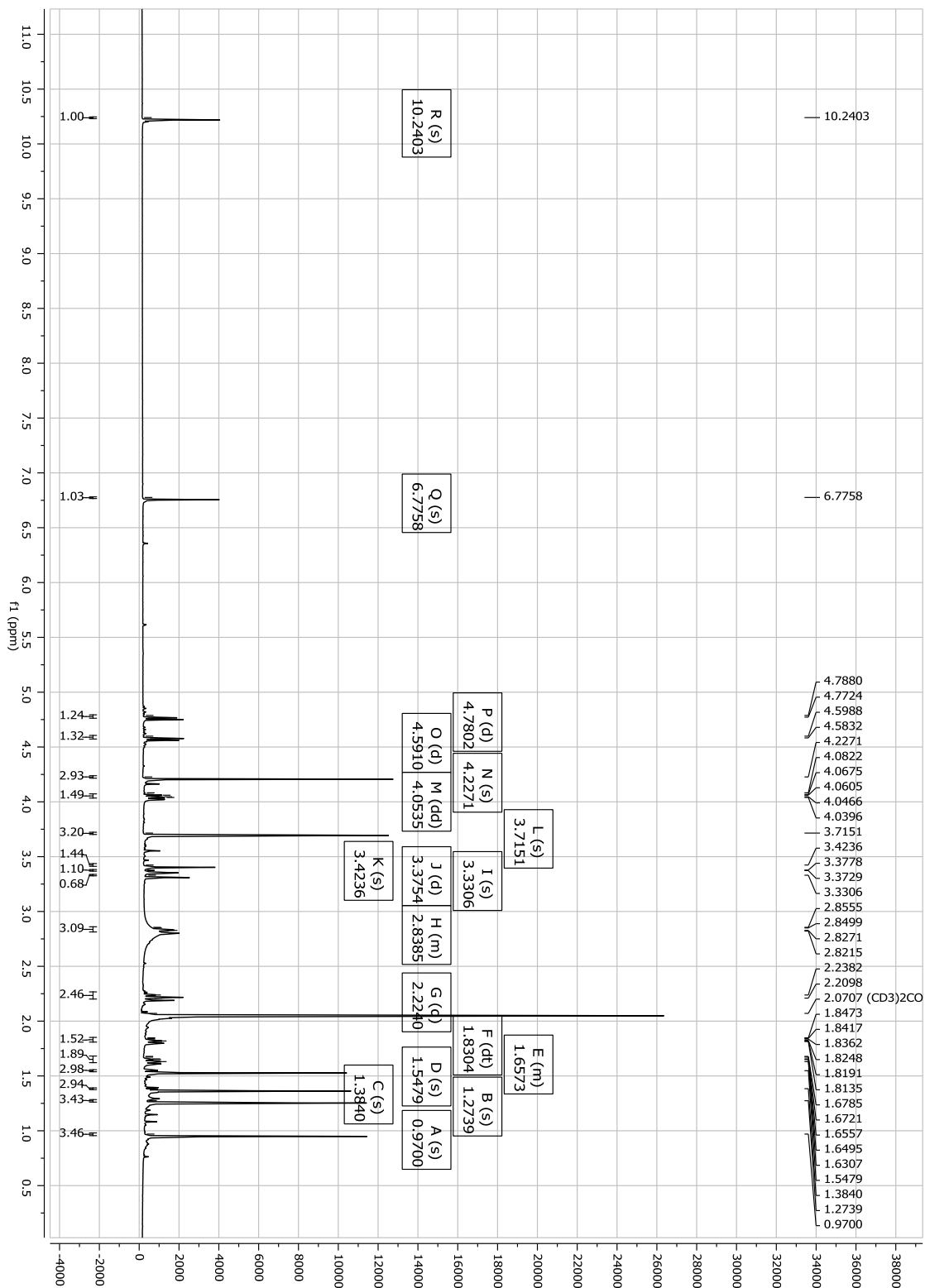


Publikation 2: Supporting Information

S7. General information of pestalotiopene A (7), including RT, UV and mass spectra.

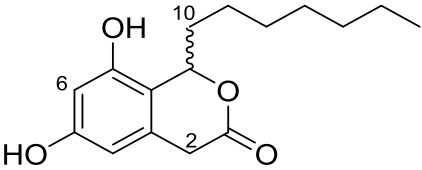
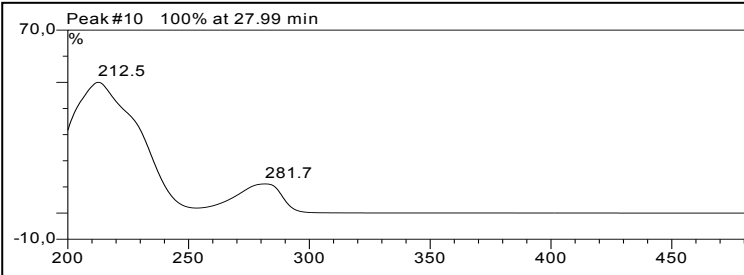
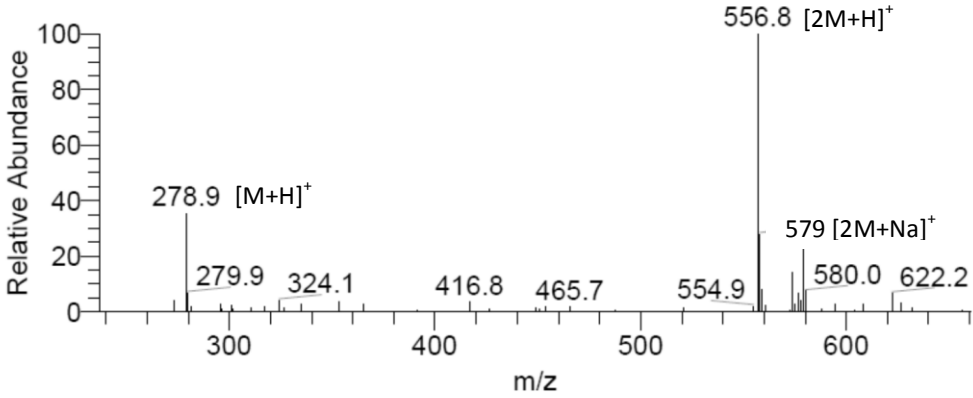
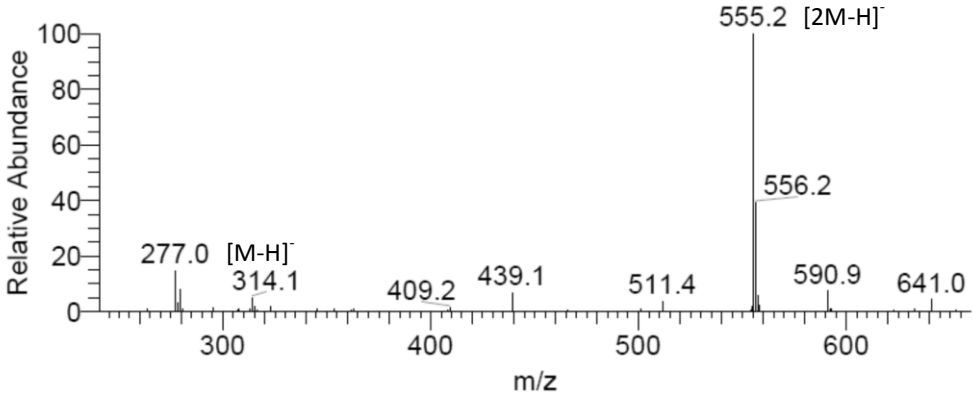
| Pestalotiopene A | |
|---|---|
| Synonym(s) | 3-((6-(chloromethyl)-4-formyl-3,7-dimethoxy-1-oxoisindolin-5-yl)oxy)-7-hydroxy-3,4a,8,8-tetramethyloctahydro-1aH-naphtho[1,8a-b]oxirene-4-carboxylic acid |
| Samples code | 100E S4 S2 Semi2 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 2 mg |
| Physical description | brownish |
| Molecular formula | C ₂₇ H ₃₄ ClO ₉ |
| Molecular weight | 552g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | +36.8° (c 1.0, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 32 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  |
| MS | <p>Lena095 #1460 RT: 39.67 AV: 1 NL: 7.63E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena095 #1458 RT: 39.63 AV: 1 NL: 7.91E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

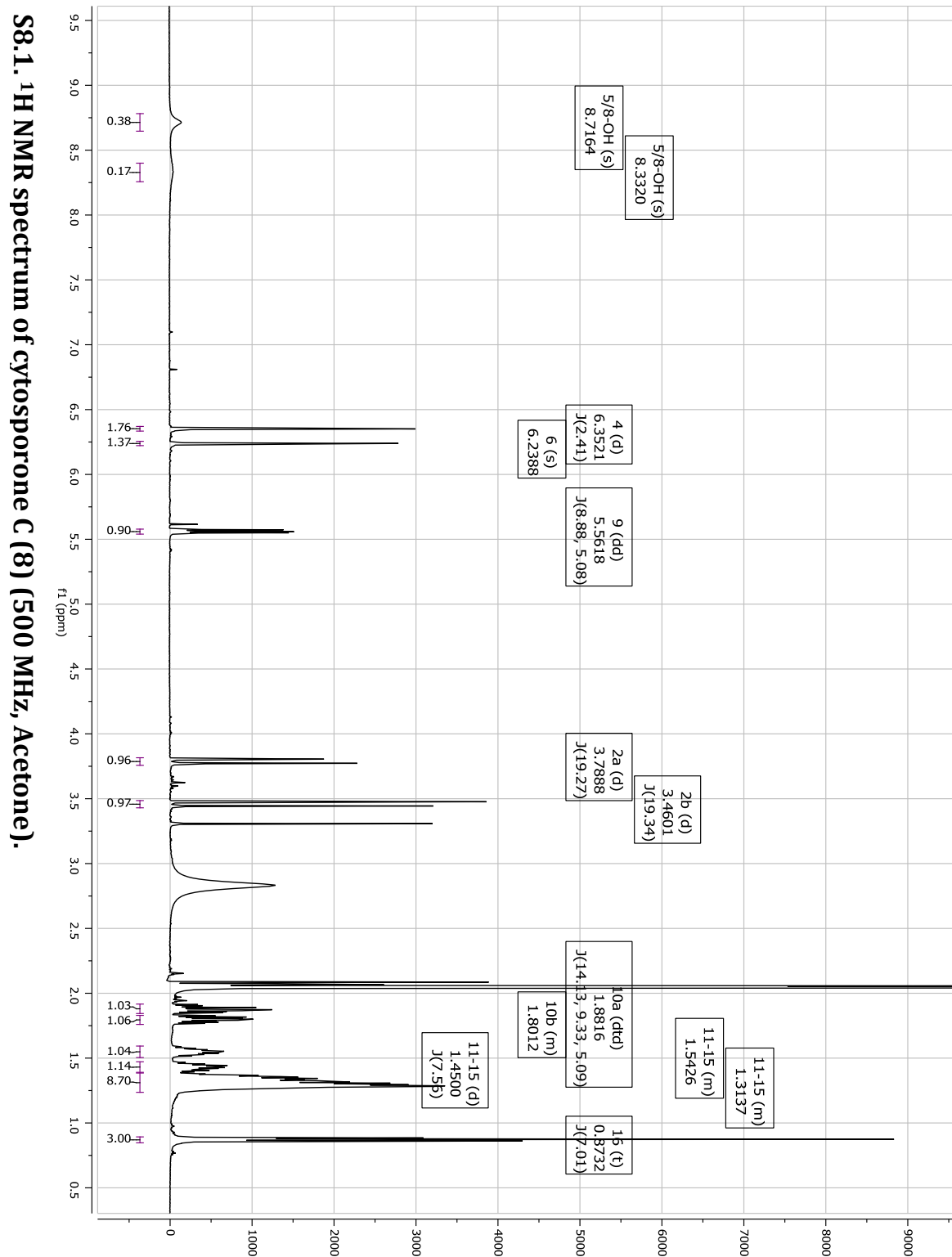
S7.1. ¹H NMR spectrum of pestalotiopene A (7) (500 MHz, Acetone).



Publikation 2: Supporting Information

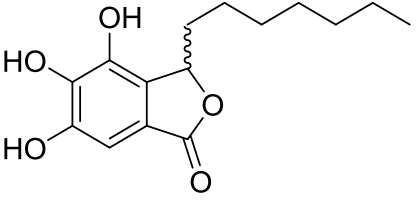
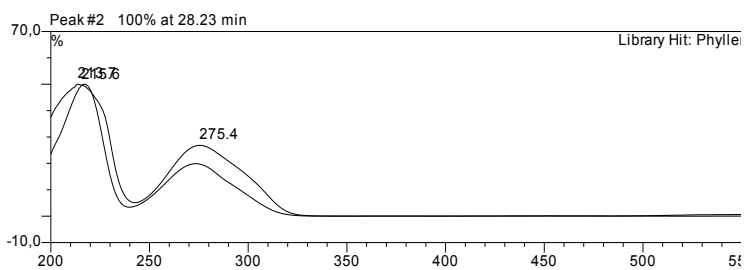
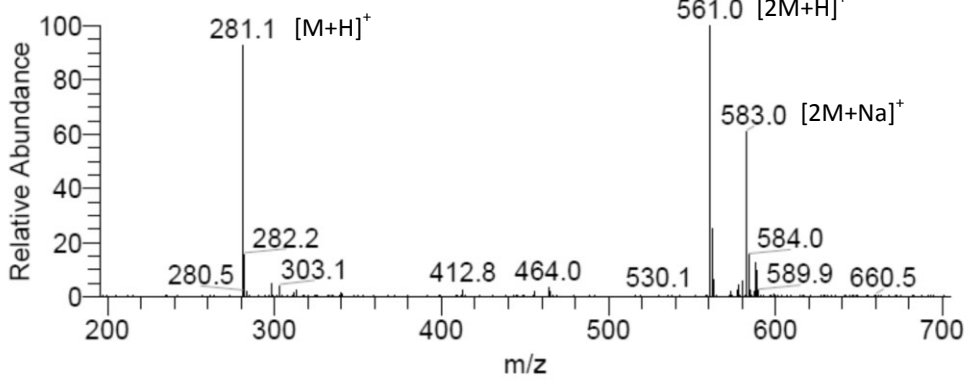
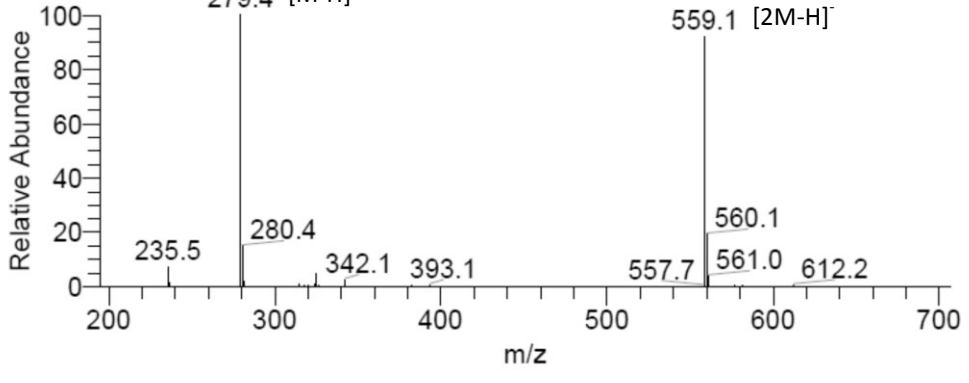
S8. General information of cytosporone C (8), including RT, UV and mass spectra.

| Cytosporone C | |
|--|--|
| Synonym(s) | 9-heptyl-5,7-dihydroxyisochroman-1-one |
| Samples code | 40H S9 Semi2 + 2' |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 4 mg |
| Physical description | yellow brown powder |
| Molecular formula | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ |
| Molecular weight | 278 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | 0° (c 0.4, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 28 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  |
| <p>MS</p> <p>Lena508 #1065 RT: 25.69 AV: 1 NL: 5.67E9 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  | <p>Lena508 #1067 RT: 25.74 AV: 1 NL: 1.91E9 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

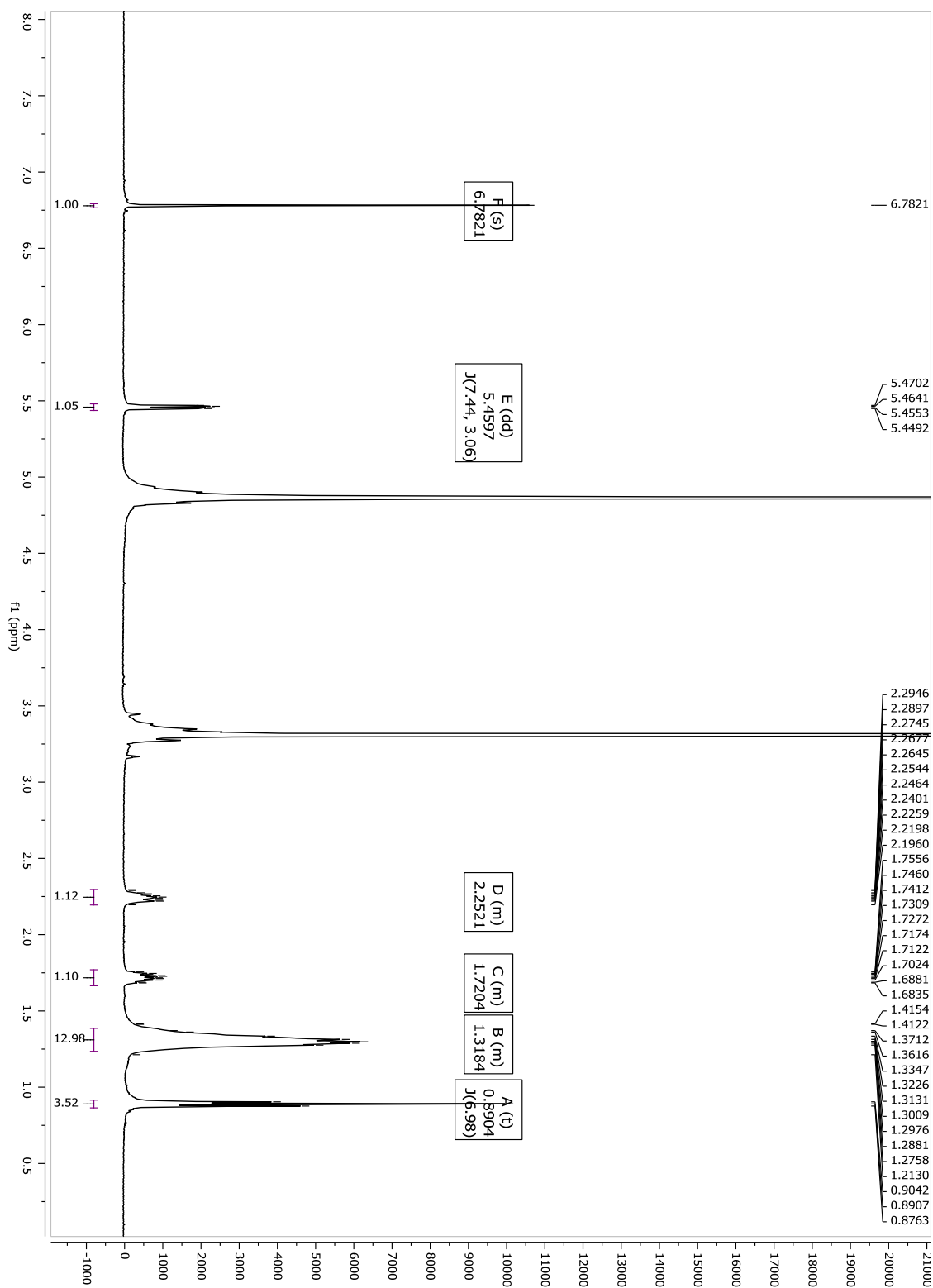


Publikation 2: Supporting Information

S9. General information of cytosporone E (9), including RT, UV and mass spectra.

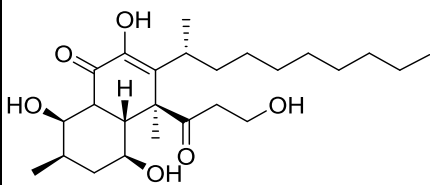
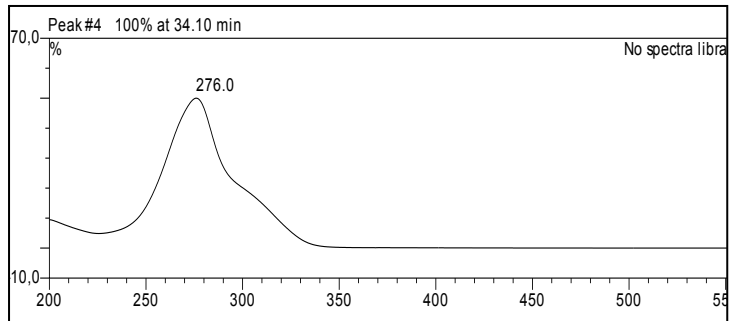
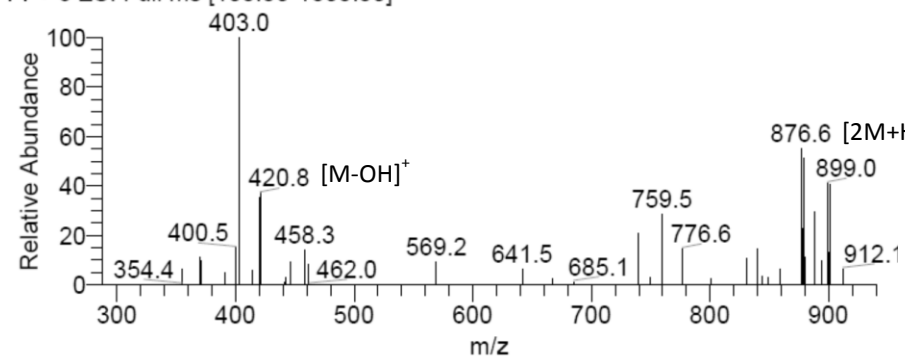
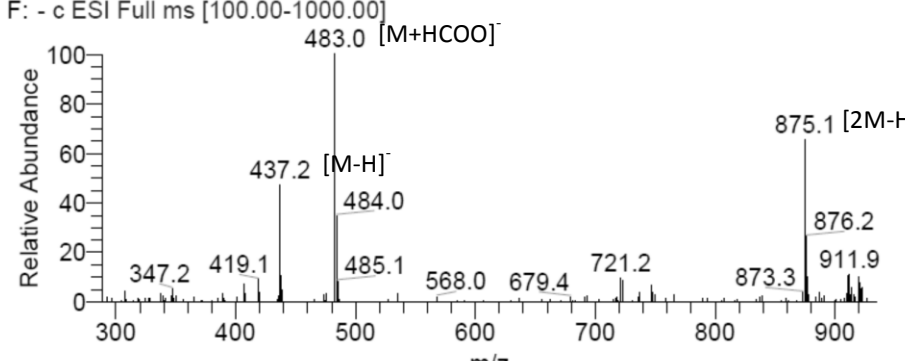
| Cytosporone E | |
|---|--|
| Synonym(s) | 9-heptyl-5,6,7-trihydroxyisobenzofuran-1(9H)-one |
| Samples code | 100E S4-5 Semi29 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 2 mg |
| Physical description | yellow brown powder |
| Molecular formula | $C_{15}H_{20}O_5$ |
| Molecular weight | 280 g/mol |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | -13.3° (c 0.5, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 28 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  <p style="text-align: right; font-size: small;">Library Hit: Phylle</p> |
| MS | <p>lena199 #1700 RT: 46.89 AV: 1 NL: 4.06E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena199 #1702 RT: 46.94 AV: 1 NL: 1.55E8 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

S9.1. ¹H NMR spectrum of cytosporone E (9) (500 MHz, Acetone).

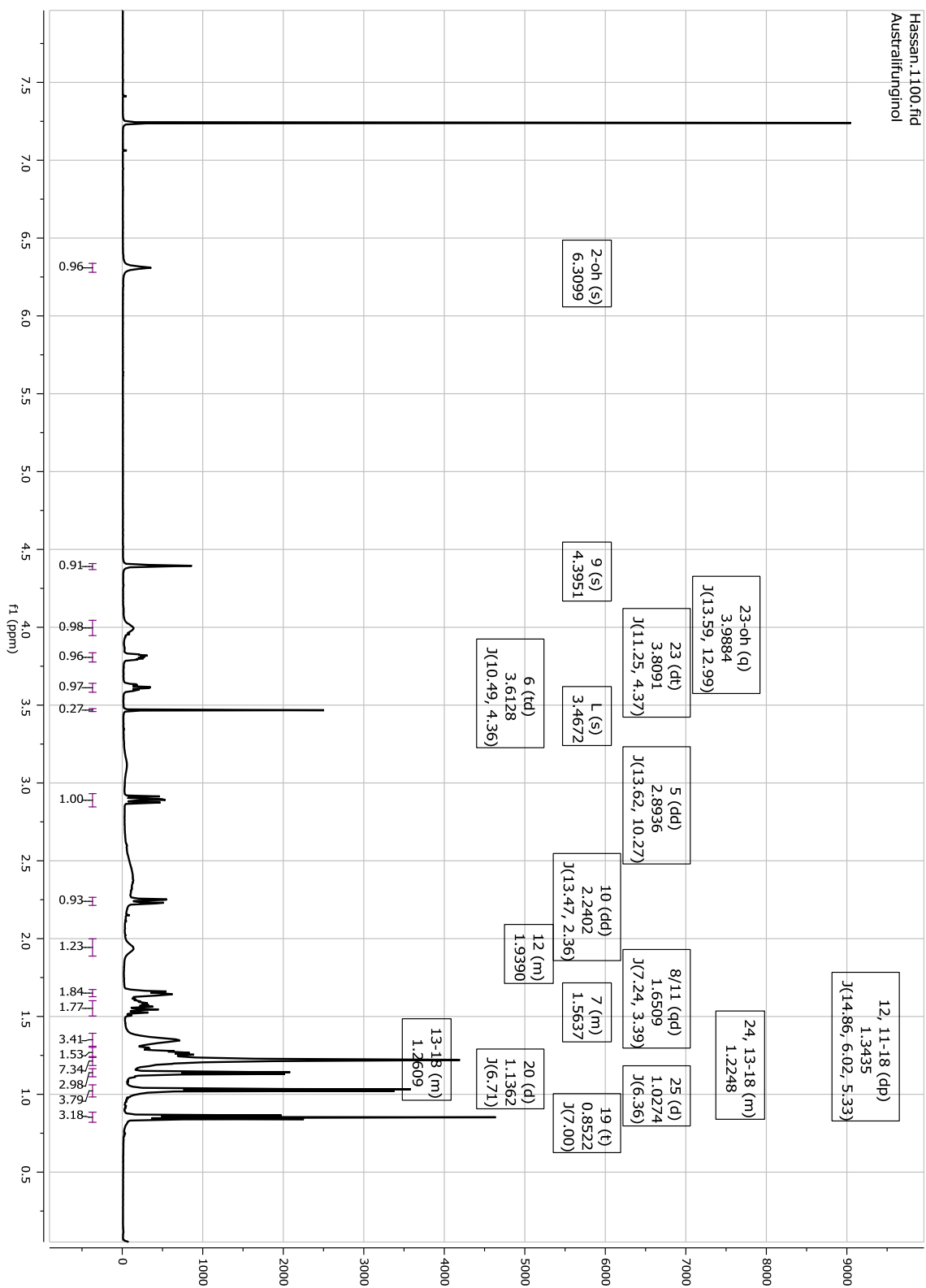


Publikation 2: Supporting Information

S10. General information of NBRI 17671 (australifunginol derivative) (10), including RT, UV and mass spectra.

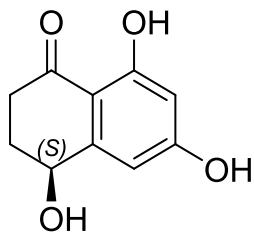
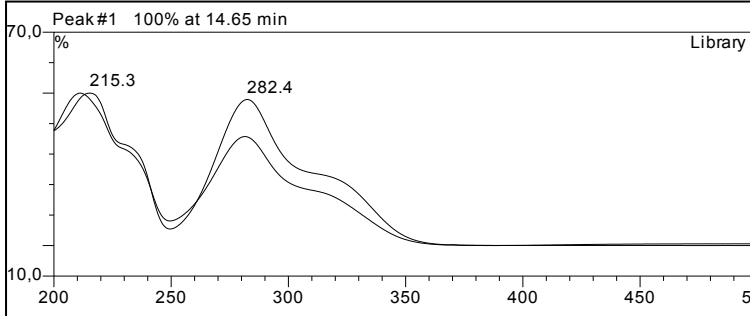
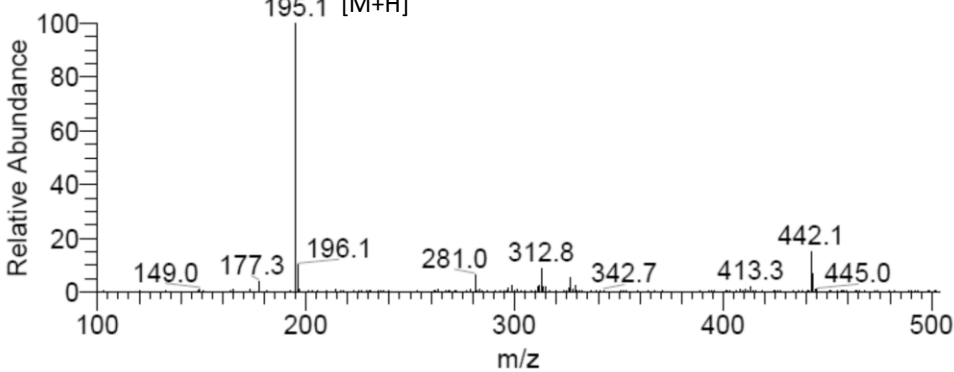
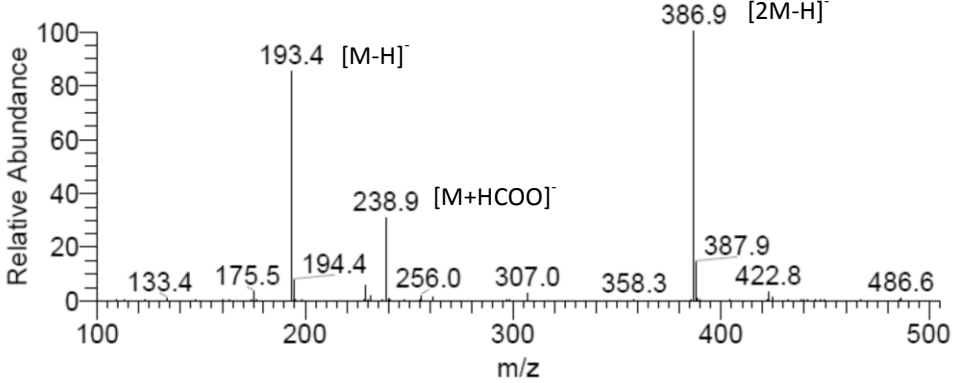
| NBRI 17671 | |
|---|---|
| Synonym(s) | 3-(decan-2-yl)-2,5,8-trihydroxy-4-(3-hydroxypropanoyl)-4,7-dimethyl-4a,5,6,7,8,8a-hexahydronaphthalen-1 (4H)-one |
| Samples code | 40H S6a D5 Semi3, 40HS6a D7 Semi1, |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 10 mg |
| Physical description | yellow brownish oil |
| Molecular formula | C ₂₅ H ₄₂ O ₆ |
| Molecular weight | 438 g/mol |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | +83.0° (c 1.0, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 33 min |
|  | <p>UV</p>  |
| MS | <p>Lena075 #1733 RT: 40.71 AV: 1 NL: 1.96E11 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena075 #1731 RT: 40.67 AV: 1 NL: 1.16E12 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

S10.1. ^1H NMR spectrum of NBRI 17671 (10) (600 MHz, CDCl_3).

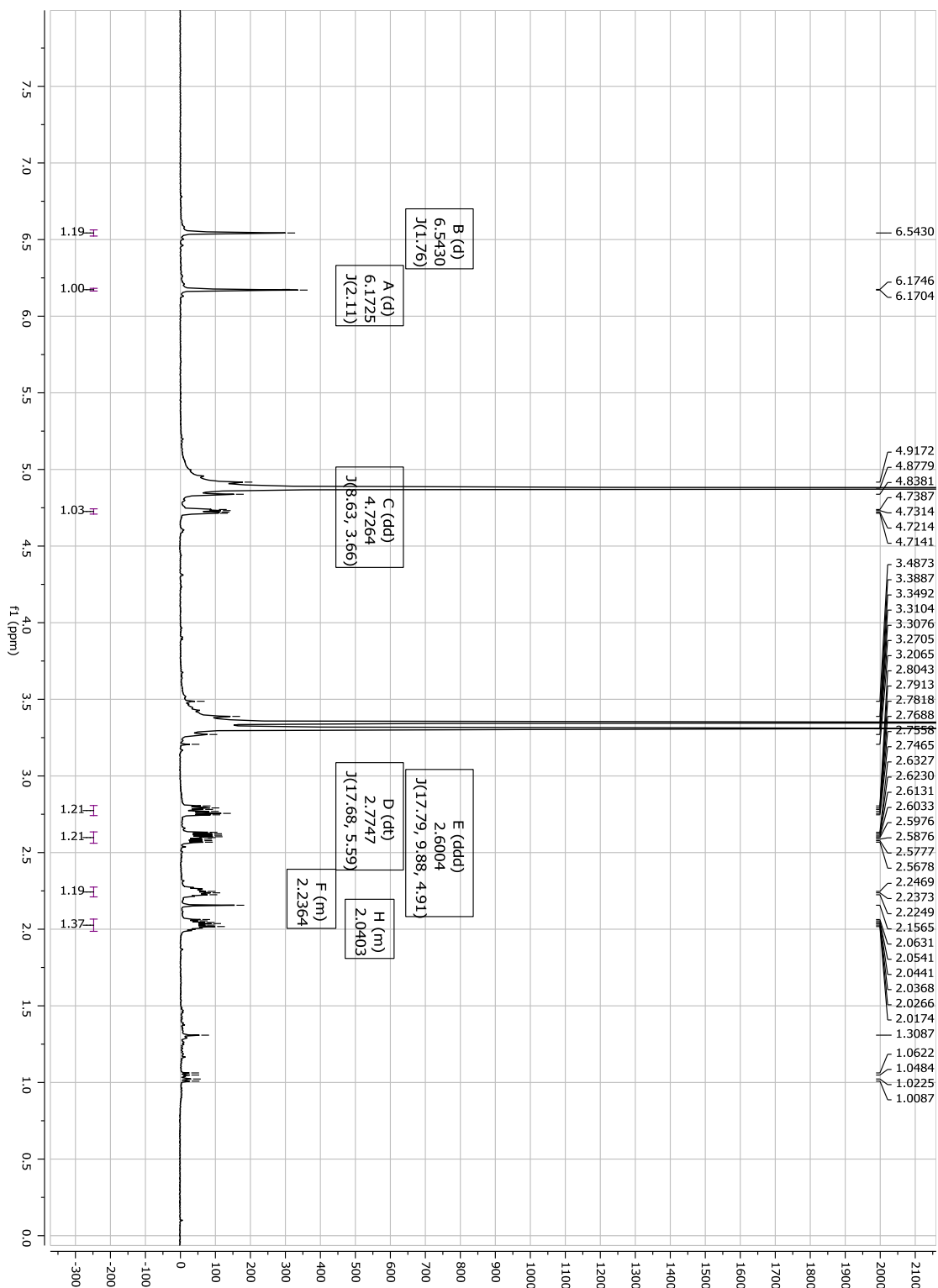


Publikation 2: Supporting Information

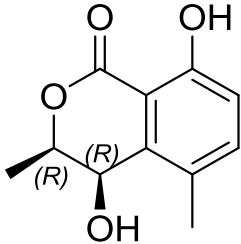
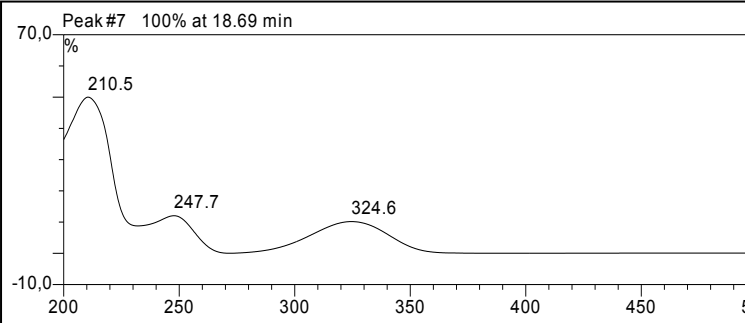
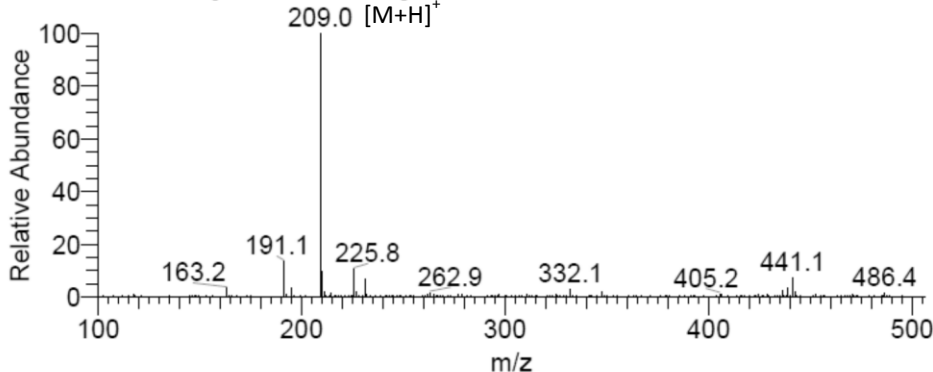
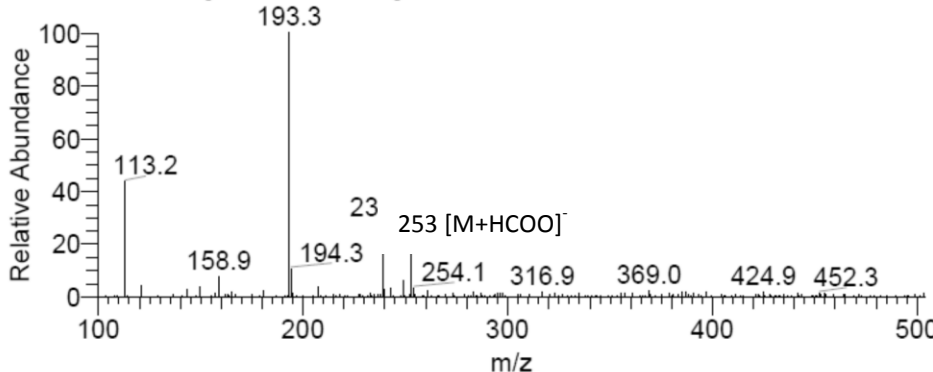
S11. General information of (4S)-6-hydroxyisoclersonone (11), including RT, UV and mass spectra.

| (4S)-6-hydroxyisoclersonone | |
|---|---|
| Synonym(s) | 4,6,8-trihydroxy-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one |
| Samples code | 100E S4-5 Semi17, 20H 98DCM HP4 Semi1 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 3.2 mg |
| Physical description | Yellow white solid |
| Molecular formula | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ |
| Molecular weight | 194 g/mol |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | -46.2° (c 0.64 in MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 15 min |
|  | UV  |
| MS | <p>lena197 #1445 RT: 40.79 AV: 1 NL: 1.41E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena197 #1447 RT: 40.83 AV: 1 NL: 1.70E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

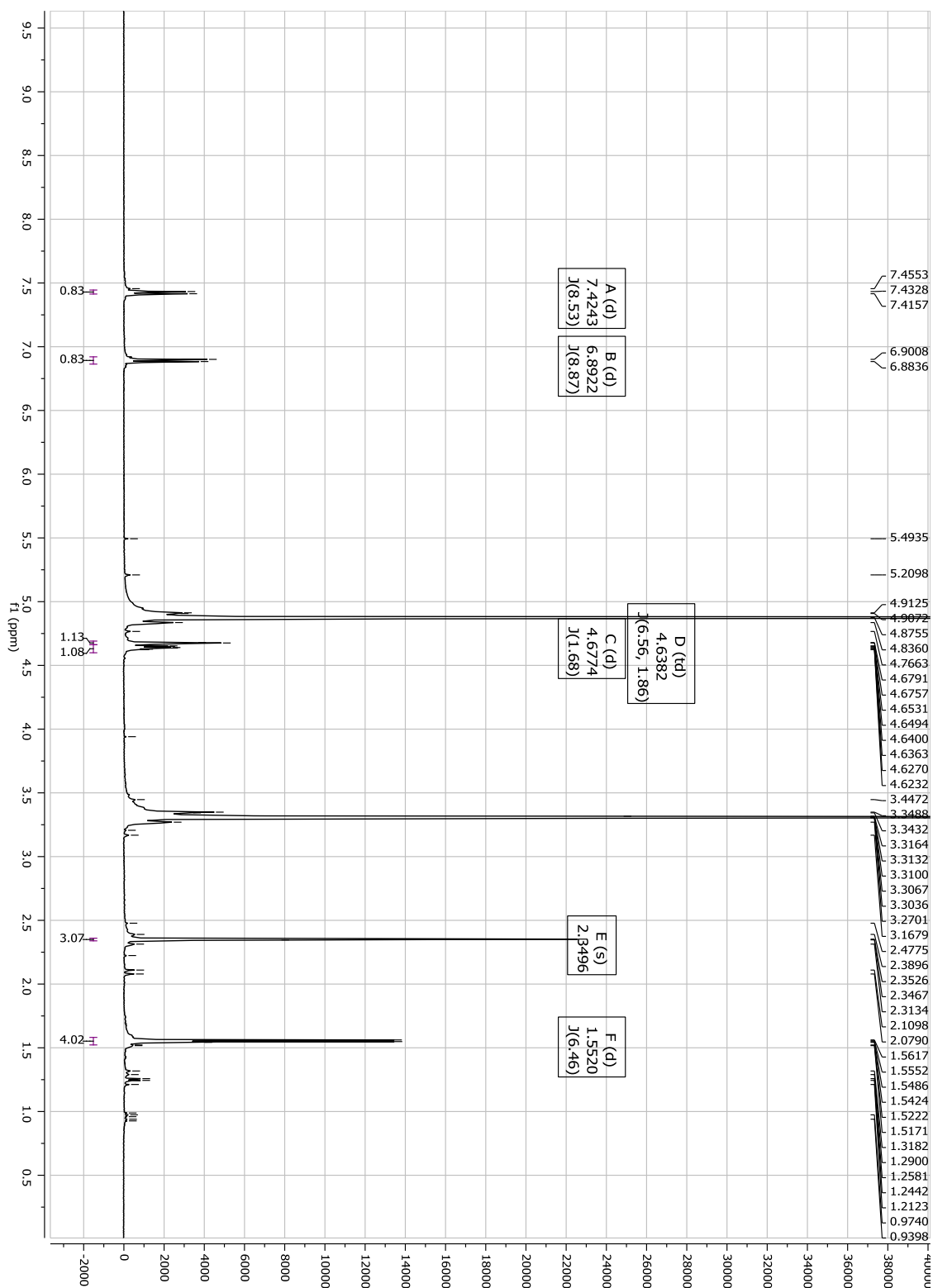
S11.1 ¹H NMR spectrum of 6-hydroxyisoscлерone (11) (500 MHz, MeOD).



S12. General information of (3*R*,4*R*)-4-hydroxy-5-methylmellein (12), including RT, UV and mass spectra.

| (3<i>R</i>,4<i>R</i>) 4-hydroxy-5-methylmellein | |
|---|---|
| Synonym(s) | 4,8-dihydroxy-3,5-dimethylisochroman-1-one |
| Samples code | 80H S7 Semi2 |
| Biological source | <i>Acremonium strictum</i> (from <i>Rhizophora apiculata</i>) |
| Sample amount | 1.2 mg |
| Physical description | Yellow white solid |
| Molecular formula | C ₁₁ H ₁₂ O ₄ |
| Molecular weight | 208 g/mol |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | -23.1° (c 0.36, Ethanol) |
| Retention time (HPLC) | 18 min |
|  | <p>UV</p>  |
| | <p>MS</p> <p>lena158 #845 RT: 22.66 AV: 1 NL: 4.05E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena158 #847 RT: 22.71 AV: 1 NL: 7.22E6 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

S12.1. ¹H NMR spectrum of 4-hydroxy-5-methylmellein (12) (500 MHz, MeOD).



4.3 Publikation 3: *Xylaria* sp.

Zur Veröffentlichung eingereicht in „Tetrahedron Letters“

Impact factor: 2.397

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

„Reprinted with permission from Tetrahedron Letters...“

Two New Metabolites from the Endophytic Fungus *Xylaria* sp. Isolated from the Medicinal Plant *Curcuma xanthorrhiza*

Lena Hammerschmidt^a, Antonius Ola^a, Werner E.G. Müller^b, WenHan Lin^c, Attila Mándi^d, Tibor Kurtán^d, Peter Proksch^{a,*}, Amal H. Aly^{a,*}

^a Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstraße 1, Geb. 26.23, D-40225 Düsseldorf, Germany

^b Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Johannes-Gutenberg-Universität, Duesbergweg 6, D-55128 Mainz, Germany

^c National Research Laboratories of Natural and Biometric Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, China

^d Department of Organic Chemistry, University of Debrecen, POB 20, 4010 Debrecen, Hungary

* Corresponding authors. Fax: +49 211 81 11923; tel: +49 211 81 14173; e-mail: amal.hassan@uni-duesseldorf.de (A. H. Aly). Tel: +49 211 81 14163; e-mail: proksch@uni-duesseldorf.de (P. Proksch).

Abstract

The endophytic fungus *Xylaria* sp. was isolated from healthy leaves of *Curcuma xanthorrhiza*, collected on the island of Timor, Indonesia. Two new compounds (**1** and **2**), together with the known resacetophenone (**3**), were isolated and their structures were elucidated on the basis of comprehensive NMR and mass spectral analysis. The enantiomers of *rac*-**1** were separated by chiral HPLC and their HPLC-ECD spectra were recorded to determine the absolute configuration on the basis of TDDFT-ECD calculations. The (3*R*,3*aR*,9*aR*) absolute configuration of the optically active **2** was established by comparing the experimental solution ECD spectrum with the TDDFT ones computed for the gas phase and solution (PCM solvent model) conformers.

Keywords

Circular dichroism; *Curcuma xanthorrhiza*; Endophytic fungus; *Xylaria* sp..

Introduction

Endophytic fungi live in the inner tissue of plants without causing any symptoms of disease to their host.^{1,2} They have attracted considerable attention, especially since the isolation of paclitaxel from an extract of *Taxomyces andreanae*, endophytic in the Pacific yew tree, in the 1990s.³ Since then endophytic fungi became a hunting ground for natural product chemists and have proven to be important sources of new metabolites with great pharmacological potential.^{4,5} Members of the genus *Xylaria* are reported to produce a high variety of unique and bioactive secondary metabolites. Examples include the antifungal nonenolide xylolide,⁶ the antibacterial eremoxylarins,⁷ and the anti-oxidative xyloketal B.^{8,9} The herein investigated *Xylaria* sp. was isolated from healthy leaf tissue of the medicinal plant *Curcuma xanthorrhiza*. This plant and the related *C. longa* have been used since ancient times as spices but are also important as medicinal plants. Both species are sources for the well-known NF- κ B inhibitor curcumin that has been currently investigated for its anti-carcinogenic properties.^{10, 11} In spite of intensive investigation of *Curcuma* spp., only few reports on *Curcuma* associated endophytes appear in the literature. The latter include studies on *Fusarium* sp. and *Giberella* sp. from *Curcuma* sp.,¹² on *Chaetomium globosum* from *C. wenyujin*,¹³ and on *Penicillium frequentans* and *P. baarnense* from *C. zedoaria*.¹⁴ However, to the best of our knowledge, this is the first report on endophytic fungi from *Curcuma xanthorrhiza*. In the present study, we report the isolation, structural elucidation and determination of the absolute configuration of two new phenolic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp., isolated from healthy leaves of *Curcuma xanthorrhiza*, collected on the island of Timor, Indonesia.

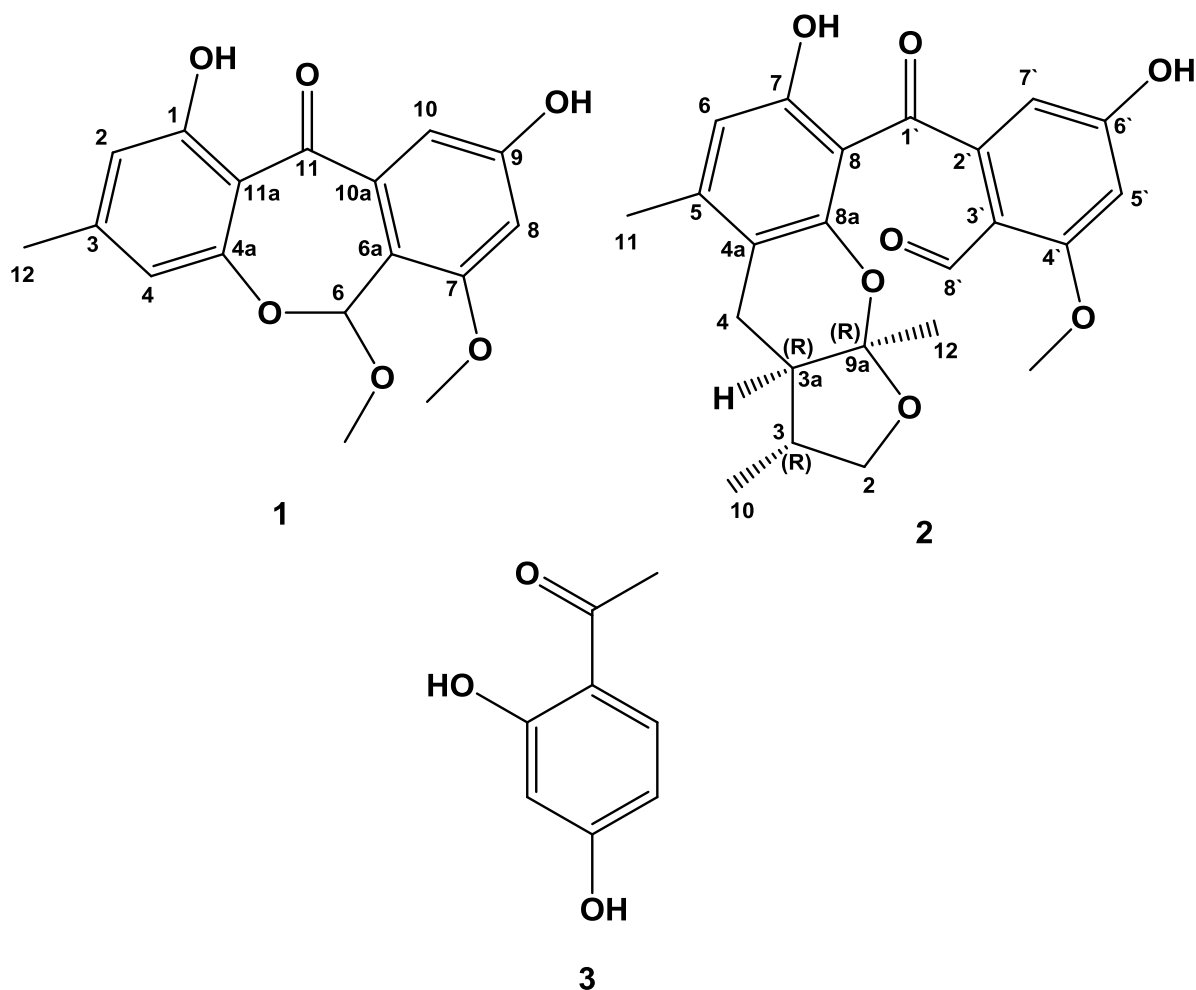


Figure 1. Structures of compounds **1-3**.

Results and discussion

The EtOAc extract of *Xylaria* sp. was partitioned between *n*-hexane and 90% aqueous MeOH. The MeOH fraction was then separated with vacuum liquid chromatography (VLC), followed by size exclusion chromatography, and finally purified by semi preparative HPLC to yield two new compounds (**1** and **2**), together with the known resacetophenone (**3**). The molecular formula of **1** was established as $C_{17}H_{16}O_6$ on the basis of the positive quasi-molecular peak appearing at m/z 317.10247 $[M+H]^+$ in the HRESIMS spectrum. Inspection of the 1H NMR spectrum (Table 1) disclosed signals assigned to two sets of *meta*-coupled aromatic protons (H-2 and H-4, $J = 1.1$ Hz; H-8 and H-10, $J = 2.5$ Hz), one aromatic methyl group (H₃-12, δ_H 2.26), one aromatic methoxy group (OCH₃-7, δ_H 3.85), and two phenolic hydroxyl groups (1-OH and 9-OH),

Publikation 3

including a chelated one at δ_{H} 12.80 (1-OH). Furthermore, one aliphatic methoxy group (OCH₃-6, δ_{H} 3.25) and a proton of an acetal function (H-6, δ_{H} 6.38) were detected. The ¹³C NMR data confirmed the presence of an acetal carbon resonating downfield at δ_{C} 96.4 (C-6), four aromatic methine carbons, three methyl groups, eight aromatic quaternary carbons, including four oxygenated ones (C-1, C-4a, C-7 and C-9), and one carbonyl carbon (C-11, δ_{C} 195.8). The HMBC spectrum (Table 1, Figure 2) corroborated the presence of two 1,2,3,5-tetrasubstituted aromatic rings based on correlations observed for CH₃-12 to C-2/C-4 (δ_{C} 111.2) and C-3 (δ_{C} 148.5), for 1-OH to C-1 (δ_{C} 162.0), C-2, C-11a (δ_{C} 110.1) and C-3. The aromatic proton H-10 (δ_{H} 6.79) showed correlations to C-9 (δ_{C} 159.2), C-8 (δ_{C} 103.4) and C-6a (δ_{C} 115.8), H-8 (δ_{H} 6.73) correlated with C-10 (δ_{C} 107.4), C-9, C-7 (δ_{C} 155.8) and C-6a, and OCH₃-7 correlated with C-7. The aromatic rings were connected through the carbonyl function based on the observed correlations of H-10, 1-OH and H-4 to C-11. The correlations observed for H-8 to C-6 and for H-6 to C-4a (δ_{C} 153.4) established the connection through the acetal function. H-6 and OCH₃-6 correlated with OCH₃-6 (δ_{C} 56.8) and C-6 (δ_{C} 96.4), respectively. H-6 further correlated with C-10a (δ_{C} 139.5), C-7 and C-6a.

Table 1. NMR Spectroscopic Data of **1** at 600 (¹H) and 150 (¹³C) MHz (DMSO-*d*₆, δ in ppm).

| Position | δ_{C} , type | δ_{H} (<i>J</i> in Hz) | HMBC |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | 162.0, C | | |
| 2 | 111.2, CH | 6.48 d (1.1) | 1, 4, 11a, 12 |
| 3 | 148.5, C | | |
| 4 | 111.2, CH | 6.44 d (1.1) | 2, 4a, 11, 11a, 12 |
| 4a | 153.4, C | | |
| 6 | 96.4, CH | 6.38 s | 4a, 6a, 7, 10a, 6-OCH ₃ |
| 6a | 115.8, C | | |
| 7 | 155.8, C | | |
| 8 | 103.4, CH | 6.73 d (2.5) | 6, 6a, 7, 9, 10 |
| 9 | 159.2, C | | |
| 10 | 107.4, CH | 6.79 d (2.5) | 6a, 8, 9, 11, |
| 10a | 139.5, C | | |
| 11 | 195.8, C | | |
| 11a | 110.1, C | | |
| 12 | 21.4, CH ₃ | 2.26 s | 2, 3, 4 |
| 6-OCH ₃ | 56.8, CH ₃ | 3.25 s | 6 |
| 7-OCH ₃ | 56.1, CH ₃ | 3.85 s | 7 |
| 1-OH | | 12.80 s | 1, 2, 3, 11, 11a |
| 9-OH | | 10.20 br s | |

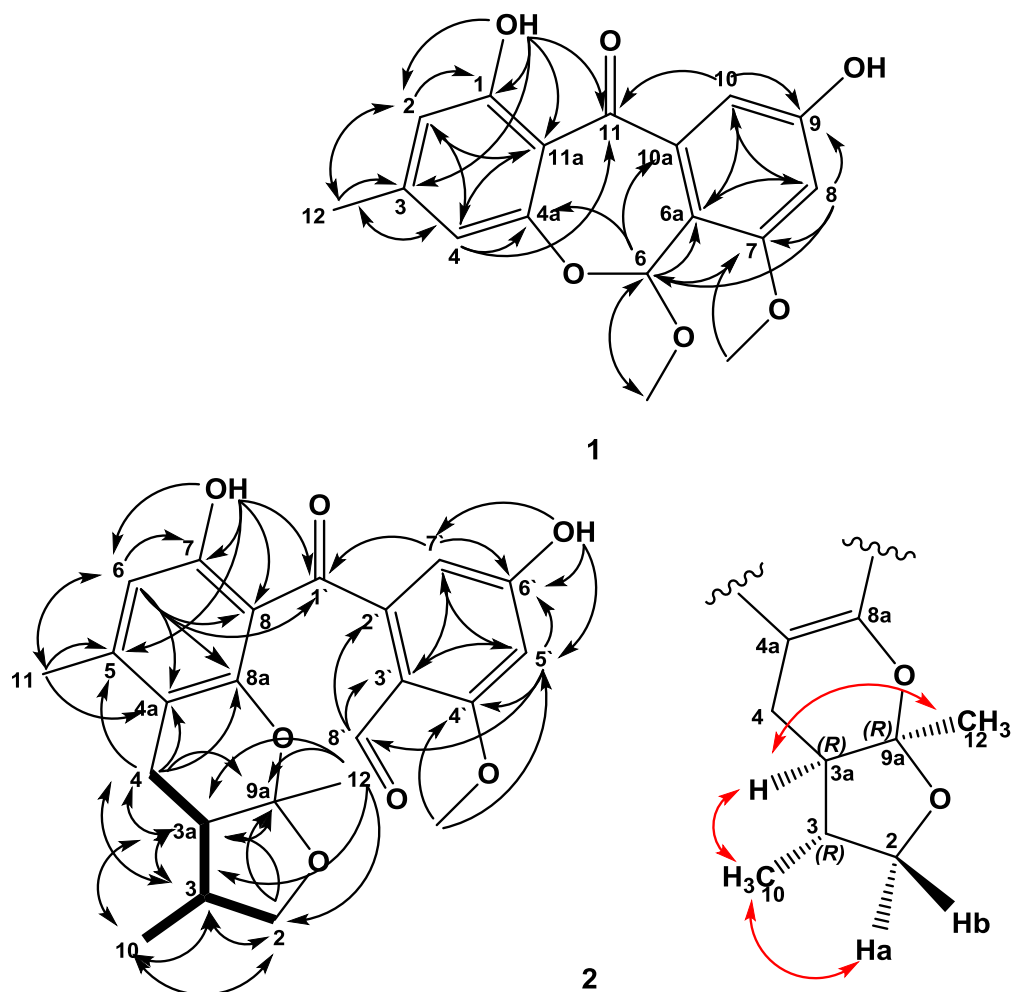


Figure 2. COSY (—) and HMBC (—) correlations observed for **1** and **2**, and ROESY (↪) correlations observed for **2**.

Due to its structural resemblance to the arugosins and especially to arugosin F,^{15, 16} we propose the name arugosin J for **1**. By analogy to arugosin F, **1** is not prenylated and it is a racemic mixture based on its baseline ECD spectrum and zero specific rotation value. This was also confirmed by the baseline separation of the enantiomers by Chiralpak IA column using hexane/propan-2-ol 80:20 as mobile phase. The two peaks had opposite signs of optical rotations in the HPLC-OR chromatogram and mirror image HPLC-ECD spectra were recorded confirming their enantiomeric relationship. It may be worth noting that the structurally related arugosin F and G having cyclic hemiacetal moiety had small negative specific rotations ($[\alpha]_D = -2.2$ (c 0.0021 g/mL, CHCl₃) for arugosin F),¹⁵ while no ECD spectra were

reported, which suggests that they are most likely also racemic derivatives. To our knowledge, the absolute configuration of the chiral dibenzo[b,e]oxepin-11(6*H*)-one skeleton of arugosin derivatives has not been studied yet. The HPLC-ECD spectrum of the first eluting enantiomer of **1** showed alternating negative and positive ECD bands; negative Cotton effects (CE) at 362 nm, 269 nm and 234 nm and positive ones at 297 nm, 254 nm and 208 nm. For the configurational assignment, TDDFT-ECD calculations were carried out on the arbitrarily chosen (6*R*)-**1** stereoisomer for comparison with the HPLC-ECD spectra, which has been proven earlier an efficient method to determine the absolute configuration of separated stereoisomers of bioactive synthetic^{17,18} and natural derivatives¹⁹⁻²¹ on the basis of their HPLC-ECD spectra. The initial MMFF conformational search of the (6*R*) enantiomer followed by DFT reoptimizations at B3LYP/6-31G(d) level *in vacuo* and at B97D/TZVP^{22,23} level with PCM solvent model for acetonitrile (MeCN) resulted in two major conformers differing only in the orientation of the 9-OH group (Figure S1). In both conformers, the central oxepinone ring adopted a twist-boat conformation with axial orientation of the 6-OMe group to reduce repulsion with the 7-OMe group. The conformation of the oxepinone ring also determined the relative arrangement of the two aryl moieties and hence the ECD spectrum. The population of the two conformers was found 90.6%/8.4% in vacuum and 77.3%/21.6% with PCM solvent model. Since the computed TDDFT-ECD spectra of the two slightly different conformers of (6*R*)-**1** were near identical and the Boltzmann-weighted computed ECD spectra reproduced well the experimental HPLC-ECD of the first eluting enantiomer (Figure 3), the absolute configuration of the first-eluting enantiomer with negative CE at 362 nm could be determined as (6*R*). The gas-phase and PCM solvent model calculations afforded the same conclusion and the use of PCM solvent model did not improve further the agreement obtained by the *in vacuo* calculations.

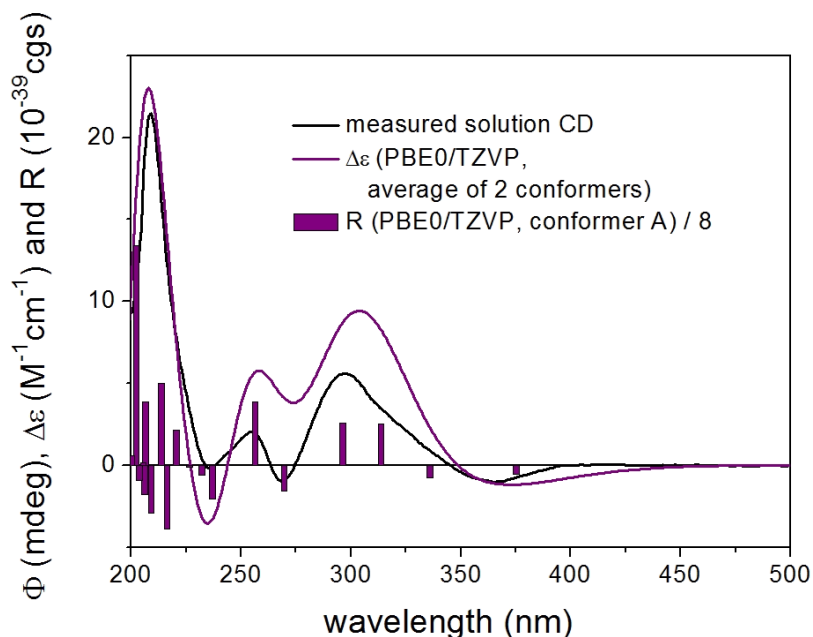


Figure 3. Experimental and PBE0/TZVP *in vacuo* ECD spectra of the low-energy B3LYP/6-31G(d) *in vacuo* conformers of (6R)-**1**. Bars represent the calculated rotational strengths of the lowest-energy conformer.

The molecular formula of **2** was established as $C_{23}H_{24}O_7$ based on the quasi-molecular peak $[M+H]^+$ at m/z 413.1594 in the HRESIMS spectrum. Inspection of 1H and ^{13}C NMR spectra (Table 2) indicated one 1,2,3,5-tetrasubstituted aromatic ring with the *meta*-coupled protons appearing at δ_H 6.53 (CH-5', δ_C 98.4) and 6.06 (CH-7', δ_C 104.8), a monoprotonated aromatic ring (CH-6, δ_H 6.39, δ_C 110.0), an aldehyde function (CHO-8', δ_H 10.04, δ_C 186.0), a carbonyl function at δ_C 200.9 (C-1'), an aromatic methoxy group (OCH₃-4', δ_H 3.89, δ_C 56.2), an aromatic methyl group (CH₃-11, δ_H 2.19, δ_C 19.7), two methylene groups (CH₂-2, δ_H 3.59/3.22, δ_C 72.9; and CH₂-4, δ_H 2.55, δ_C 20.7), two methine groups (CH-3, δ_H 1.68, δ_C 34.8; and CH-3a, δ_H 1.80, δ_C 46.7), and two methyl groups (CH₃-10, δ_H 0.94, δ_C 15.9; and CH₃-12, δ_H 1.00, δ_C 21.9). The COSY spectrum showed a continuous aliphatic spin system establishing the fragment CH₂(4)CH(3a)CH(3), with H-3 further correlating to both CH₂-2 and CH₃-10 (Figure 2).

Publikation 3

Analysis of the HMBC spectrum of **2** (Table 2, Figure 2) revealed the presence of two aromatic ring moieties similar to those detected in **1**, except for the presence of an aldehyde function attached to C-3' in **2** based on correlations of H-8' to C-2' (δ_c 146.8) and C-3' (δ_c 114.6), and a 4J correlation of H-5' to C-8'. In addition, attachment of a tetrahydro-4*H*-furo[2,3-*b*]pyran moiety at C-4a (δ_c 108.3) and C-8a (δ_c 153.8) in **2** was deduced from correlations of H₂-4 to the aromatic carbons C-4a, C-5 (δ_c 146.5) and C-8a. The tetrahydrofuropyran moiety was corroborated from correlations of H₂-2, H-3a and H₂-4 to the oxygenated carbon C-9a (δ_c 107.6 ppm). The characteristic downfield chemical shift of the latter indicated a ketal carbon. CH₃-12 was located at C-9a based on its correlations to C-3a and C-9a. A literature survey revealed that similar tetrahydrofuropyran substructures have previously been reported for alboatrin and xyloketals.^{24, 25}

Table 2. NMR Spectroscopic Data of **2** at 600 (¹H) and 150 (¹³C) MHz (DMSO-*d*₆, δ in ppm).

| Position | δ_c , type | δ_H (<i>J</i> in Hz) | COSY | HMBC |
|---------------------|-----------------------|--|-----------|----------------------|
| 2 | 72.9, CH ₂ | 3.22 (1H, t, 8.2) 3.59 (1H, t, 8.2) | 3 | 3, 3a, 9a, 10 |
| 3 | 34.8, CH | 1.68 (1H, m) | 2, 3a, 10 | 2, 3a, 4, 10 |
| 3a | 46.7, CH | 1.80 (1H, m) | 3, 4 | 3, 9a, 10 |
| 4 | 20.7, CH ₂ | 2.55 (2H, m) | 3a | 3, 3a, 4a, 5, 8a, 9a |
| 4a | 108.3, C | | | |
| 5 | 146.5, C | | | |
| 6 | 110.0, CH | 6.39 (1H, s) | | 4a, 7, 8, 11, 1' |
| 7 | 161.1, C | | | |
| 8 | 108.3, C | | | |
| 8a | 153.8, C | | | |
| 9a | 107.6, C | | | |
| 10 | 15.9, CH ₃ | 0.94 (3H, d, 6.6) | 3 | 2, 3, 3a |
| 11 | 19.7, CH ₃ | 2.19 (3H, s) | | 4a, 5, 6 |
| 12 | 21.9, CH ₃ | 1.00 (3H, s) | | 2, 3, 3a, 9a |
| 7-OH | | 12.44 (1H, s) | | 5, 6, 7, 8, 1' |
| 1' | 200.9, C | | | |
| 2' | 146.8, C | | | |
| 3' | 114.6, C | | | |
| 4' | 163.8, C | | | |
| 5' | 98.4, CH | 6.53 (1H, d, 2.0) | 7' | 3', 4', 6', 7', 8' |
| 6' | 164.5, C | | | |
| 7' | 104.8, CH | 6.06 (1H, d, 2.0) | 11 | 1', 3', 5', 6' |
| 8' | 186.0, CH | 10.04 (1H, s) | | 2', 3' |
| 4'-OCH ₃ | 56.2, CH ₃ | 3.89 (3H, s) | | 4', 5' |
| 6'-OH | | 10.71 (1H, s) | | 5', 6', 7' |

Publikation 3

The relative configuration of **2** was deduced by the analysis of its ROESY spectrum as (3*R**,3*aR**,9*aR**). Correlations of the methyl group CH₃-12 to H-3a, and of CH₃-10 to H-3a and H-2A (δ_{H} 3.22 ppm) (Figure 2) indicated their cofacial orientation in accordance with the reported relative configuration of xyloketals.²⁴

Compound **2** showed a distinct ECD curve in acetonitrile with negative CE at 352, 261 and 219 nm and positive ones at 318 and 284 and 245 nm. Similarly to arugosin J (**1**), compound **2** contains a benzophenone chromophore but one of the aryl moiety is also part of a chiral tetrahydro-4*H*-furo[2,3-*b*]chromene moiety. The initial MMFF conformers of the arbitrarily chosen (3*R*,3*aR*,9*aR*)-**2** were reoptimized at the B3LYP/6-31G(d) level in vacuum and at the B97D/TZVP level with PCM solvent model for acetonitrile affording 5 and 8 conformers above 1%, respectively (Figure S2). At both levels of the conformational analyses, individual conformers could be grouped into two different types of conformation on the basis of the relative orientation of the two aryl moieties characterized by the projection angle $\omega_{\text{C-3},\text{C-2},\text{C-8},\text{C-7}}$. With the B97D/TZVP (PCM) method, the lowest-energy conformer A had a 107.1° value for the projection angle $\omega_{\text{C-3},\text{C-2},\text{C-8},\text{C-7}}$, and similar positive values were found for conformer B, D, F, G, H in the range of 102-113°. These conformers differed in the conformation of the fused pyran ring and the 7-hydroxyl proton and their computed ECD spectra were quite similar. In contrast, conformer C and E had negative values (-120.9° and -120.2°, respectively) for the projection angle $\omega_{\text{C-3},\text{C-2},\text{C-8},\text{C-7}}$ and their computed ECD spectra were near mirror image of that of conformer A. In the B97D/TZVP (PCM) method, the total populations of the two types of conformations had 67.2%/32.2% distribution with an excess of the conformers with positive projection angle, while the B3LYP/6-31G(d) (in vacuum) method afforded 72.1%/26.5% total populations. The experimental ECD spectrum of **2** was then compared with the Boltzmann-averaged PBE0/TZVP ECD spectra of the low-energy B3LYP/6-31G(d) in vacuum conformers of (3*R*,3*aR*,9*aR*)-**2** (Figure 4), which showed good agreement above 240 nm but the negative CE at 219 nm could not be reproduced. The agreement between the experimental and computed ECD spectra significantly improved when the B97D/TZVP (PCM) conformers were used for the ECD calculation and the 240 nm negative was also reproduced (Figure 5).

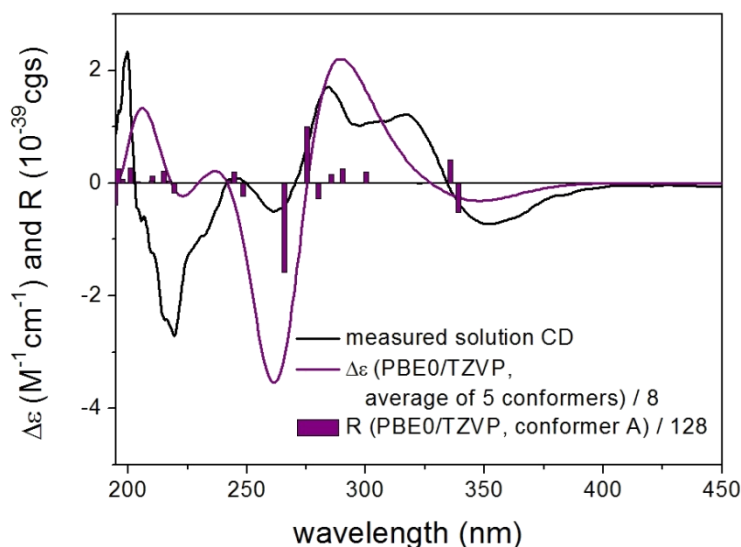


Figure 4. Experimental ECD spectrum of **2** compared with the Boltzmann-averaged PBE0/TZVP ECD spectra of the low-energy B3LYP/6-31G(d) in vacuum conformers of (3*R*,3*aR*,9*aR*)-**2**. Bars represent the calculated rotational strengths of the lowest-energy conformer.

Thus the agreement between the experimental and computed ECD spectra allowed the unambiguous assignment of the absolute configuration of **2** as (3*R*,3*aR*,9*aR*)-**2**. It is noteworthy that **2** and the related xyloketal D had the same absolute configuration but their ECD spectra are different due to the additional aryl moiety of **2**.²⁴ Hence, **2** was determined as a new metabolite and named xylarugosin due to its resemblance to arugosin E and xyloketals.^{16, 24}

The known compound (**3**) was identified as resacetophenone by comparing its data (¹H and ¹³C NMR, MS) with literature values.²⁴

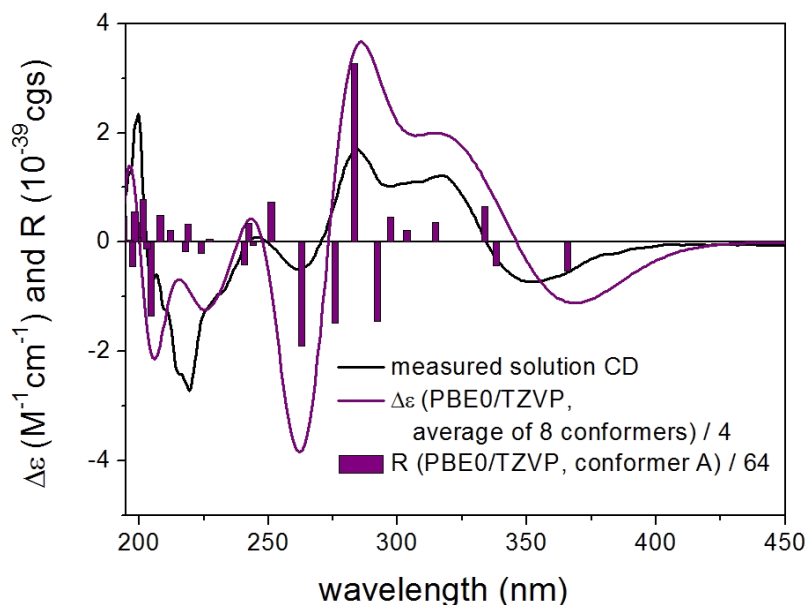
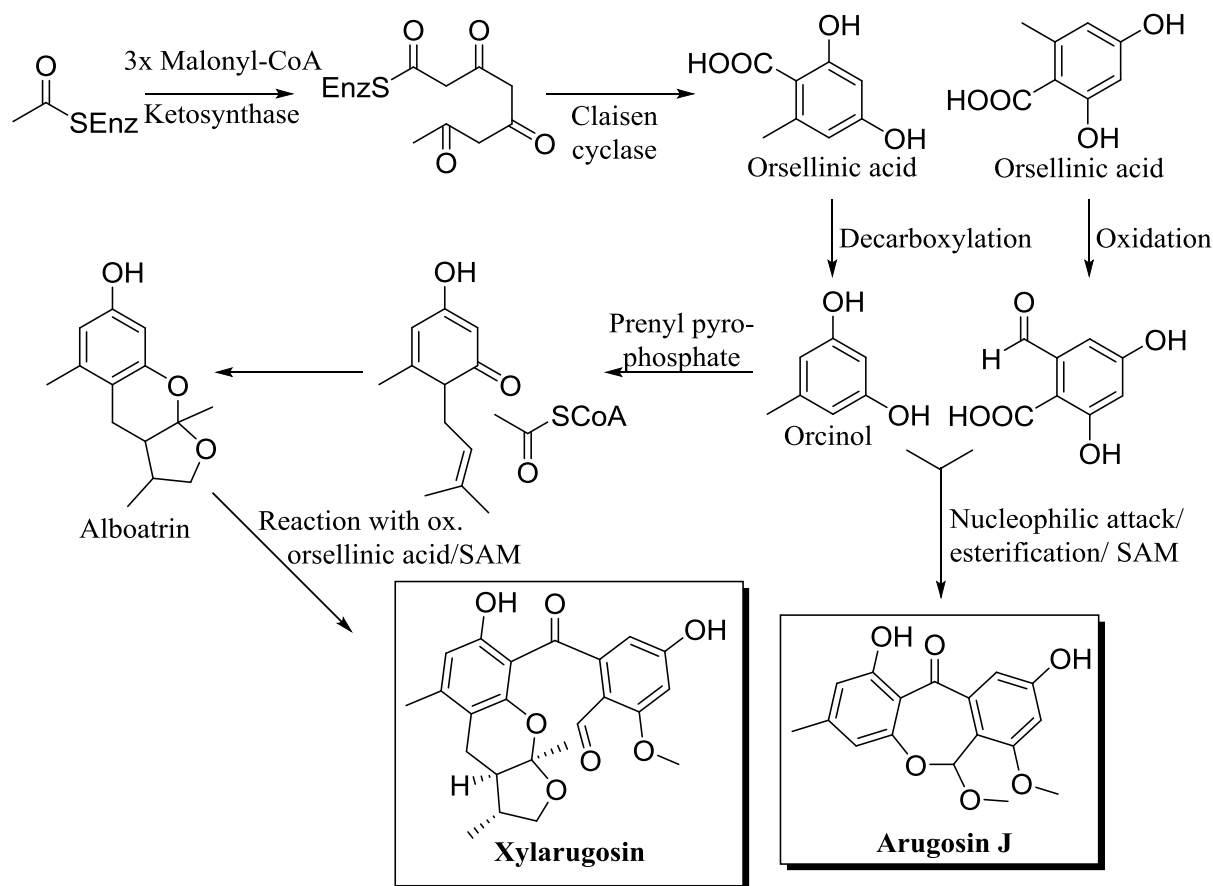


Figure 5. Experimental and Boltzmann-averaged PBE0/TZVP (PCM/MeCN) ECD spectra of the low-energy B97D/TZVP PCM/MeCN conformers of (3R,3aR,9aR)-**2**. Bars represent the calculated rotational strengths of the lowest-energy conformers.

As **1-3** share common substructures, a close biosynthetic relationship could be speculated. Furthermore, alboatrin, which was previously characterized by Ichihara *et al.*,²⁵ represents the second substructure in xylarugosin (**2**). Thus, it may be assumed that the partial structures were individually formed by PKS and then enzymatically linked. Accordingly, a biosynthetic pathway involving two orsellinic acid molecules, as confirmed for depsides and depsidones,^{26,27} could be suggested (Scheme 1).

Compounds **1-3** showed no activity when evaluated for their cytotoxic activity against the murine cancer cell line L5178Y by the MTT assay.²⁸



Scheme 1. Suggested biosynthetic pathway of arugosin J (**1**) and xylarugosin (**2**).

Acknowledgement

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

Supplementary data

Supplementary data (figures of calculated low-energy conformers of **1** and **2**, experimental section, compound characterization, as well as 1D and 2D NMR spectra of **1** and **2**) associated with this article can be found in the online version, at <http://XXXXXXXXXXXXXXXXXX>

References

1. Strobel, G.; Daisy, B. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2003**, *67*, 491-501.
2. Tan, R. X.; Zou, W. X. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 448-459.
3. Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. *Science* **1993**, *260*, 214-216.
4. Aly, A. H.; Debbab, A.; Proksch, P. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1829-1845.
5. Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Fungal Divers.* **2012**, *57*, 45-83.
6. Baraban, E. G.; Morin, J. B.; Phillips, G. M.; Phillips, A. J.; Strobel, S. A.; Handelsman, J. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 4058-4060.
7. Song, Y.; Wang, J.; Huang, H.; Ma, L.; Wang, J.; Gu, Y.; Liu, L.; Lin, Y. *Mar. Drugs* **2012**, *10*, 340-348.
8. Wang, G., Pang, J., Lin, Y., Liu, J., Xie, Y., and Liu, C. Patent CN102018699A, 2011. Sun Yat-Sen University, Peop. Rep. China. **2011**.
9. Li, Z. X.; Chen, J. W.; Yuan, F.; Huang, Y. Y.; Zhao, L. Y.; Li, J.; Su, H. X.; Liu, J.; Pang, J. Y.; Lin, Y. C.; Lu, X. L.; Pei, Z.; Wang, G. L.; Guan, Y. Y. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 504-522.
10. Strasser, E. M.; Wessner, B.; Manhart, N.; Roth, E. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 552-559.
11. Yeh, C. H.; Chen, T. P.; Wu, Y. C.; Lin, Y. M.; Lin, P. J. *J.Surg. Res.* **2005**, *125*, 109-116.
12. Shu, L.; Yi, L.; Zhang, L.; Peng, Q.; Peng, Q. *Chin. J. Microecol.* **2010**, *22*, 690-692.
13. Wang, Y. H.; Xu, L.; Ren, W. M.; Zhao, D.; Zhu, Y. P.; Wu, X. M. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 364-368.
14. Xuan, Q.; Zhang, L.; Yang, J.; Li, Y. *Nat. Prod. Res. Dev.* **2011**, *23*, 473-475.
15. Hein, S. M.; Gloer, J. B.; Koster, B.; Malloch, D. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1566-1567.
16. Kawahara, N.; Nozawa, K.; Nakajima, S.; Kawai, K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1 (1972-1999)* **1988**, 907-911.
17. Zhu, J.; Ye, Y.; Ning, M.; Mándi, A.; Feng, Y.; Zou, Q.; Kurtán, T.; Leng, Y.; Shen, J. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 1210-1223.
18. Tóth, L.; Fu, Y.; Zhang, H. Y.; Mándi, A.; Kövér, K. E.; Illyés, T. Z.; Kiss-Szikszai, A.; Balogh, B.; Kurtán, T.; Antus, S.; Mátyus, P. *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *accepted*.
19. Gulyás-Fekete, G.; Murillo, E.; Kurtán, T.; Papp, T.; Illyés, T. Z.; Drahos, L.; Visy, J.; Agócs, A.; Turcsi, E.; Deli, J. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 607-614.
20. Gao, H.; Liu, W.; Zhu, T.; Mo, X.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Li, J.; Ai, J.; Gu, Q.; Li, D. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 9501-9506.
21. Ebrahim, W.; Aly, A. H.; Mándi, A.; Wray, V.; Essassi, E. M.; Ouchbani, T.; Bouhfid, R.; Lin, W.; Proksch, P.; Kurtán, T.; Debbab, A. *Chirality* **2013**, *25*, 250-256.
22. Grimme, S. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787-1799.
23. Sun, P.; Xu, D. X.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Li, T. J.; Schulz, B.; Zhang, W. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 7030-7047.
24. Lin, Y.; Wu, X.; Feng, S.; Jiang, G.; Luo, J.; Zhou, S.; Vrijmoed, L. L. P.; Jones, E. B. G.; Krohn, K.; Steingroever, K.; Zsila, F. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6252-6256.
25. Ichihara, A.; Nonaka, M.; Sakamura, S.; Sato, R.; Tajimi, A. *Chem. Lett.* **1988**, 27-30.
26. Armaleo, D.; Sun, X. M.; Culbertson, C. *Mycologia* **2011**, *103*, 741-754.

Publikation 3

27. Nielsen, M. L.; Nielsen, J. B.; Rank, C.; Klejnstrup, M. L.; Holm, D. K.; Brogaard, K. H.; Hansen, B. G.; Frisvad, J. C.; Larsen, T. O.; Mortensen, U. H. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *321*, 157-166.
28. Kreuter, M. H.; Robitzki, A.; Chang, S.; Steffen, R.; Michaelis, M.; Kljajic, Z.; Bachmann, M.; Schroeder, H. C.; Mueller, W. E. G. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1992**, *101*, 183-187.

4.3.1. Supporting information of compounds isolated from *Xylaria* sp.

| | |
|--|-----|
| Figure S1. Structures and populations of the low-energy B3LYP/6-31G(d) <i>in vacuo</i> conformers (>1%) of (6 <i>R</i>)- 1 | 105 |
| Figure S2. Structures and populations of the low-energy B97D/TZVP PCM/MeCN conformers (>1%) of (3 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,9 <i>aR</i>)- 2 | 106 |
| Experimental..... | 107 |
| References..... | 110 |
| S3. General information of arugosin J (1), including RT, UV and mass spectra..... | 111 |
| S3.1. ¹ H NMR spectrum of arugosin J (1) (600 MHz, DMSO)..... | 112 |
| S3.1.1. Enlargement of the aromatic region. | 113 |
| S3.2. ¹³ C NMR spectrum of arugosin J (1) (150 MHz, DMSO). | 114 |
| S3.3. HMBC spectrum of arugosin J (1) (600 and 150 MHz, DMSO).. | 115 |
| S3.3.1. Enlargement of the aliphatic region..... | 116 |
| S3.3.2. Enlargement of the aromatic region. | 116 |
| S4. General information of xylarugosin (2), including RT, UV and mass spectra..... | 117 |
| S4.1. ¹ H NMR spectrum of xylarugosin (2) (500 MHz, DMSO). | 118 |
| S4.1.1. Enlargement of the aliphatic region..... | 119 |
| S4.1.2. Enlargement of the aromatic region. | 119 |
| S4.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of xylarugosin (2) (500 MHz, DMSO)..... | 120 |
| S4.2.1. Enlargement of the aliphatic region..... | 121 |
| S4.3. ¹³ C NMR spectrum of xylarugosin (2) (150 MHz, DMSO)..... | 122 |
| S4.4. HMBC spectrum of xylarogusin (2) (600 and 150 MHz, DMSO)..... | 123 |
| S4.4.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 80 ppm)..... | 124 |
| S4.4.2. Enlargement of the aliphatic region (90 – 180 ppm)..... | 124 |
| S4.4.3. Enlargement of the aromatic region (90 – 210 ppm)..... | 125 |
| S4.5. ROESY spectrum of xylarugosin (2) (600 MHz, DMSO). | 126 |
| S4.5.1. Enlargement of the aliphatic region..... | 127 |
| S5. General information of resacetophenon (3), including RT, UV and mass spectra..... | 128 |
| S5.1. ¹ H NMR spectrum of resacetophenone (3) (500 MHz, DMSO)..... | 129 |

Figure S1. Structures and populations of the low-energy B3LYP/6-31G(d) *in vacuo* conformers (>1%) of (6*R*)-1.

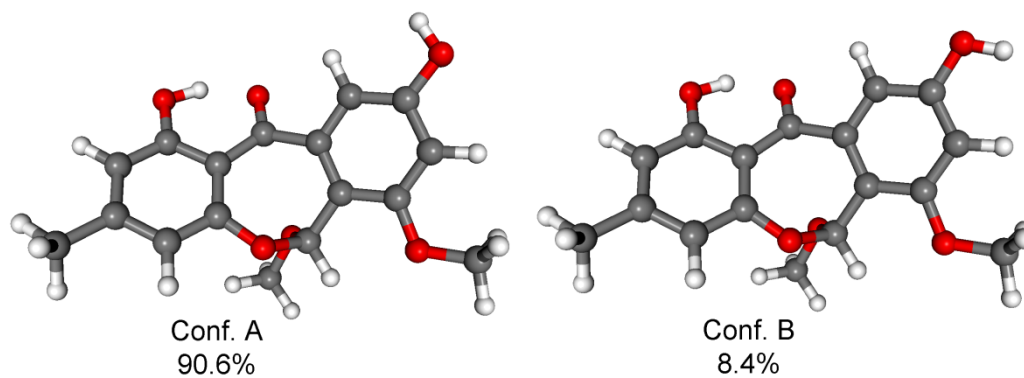
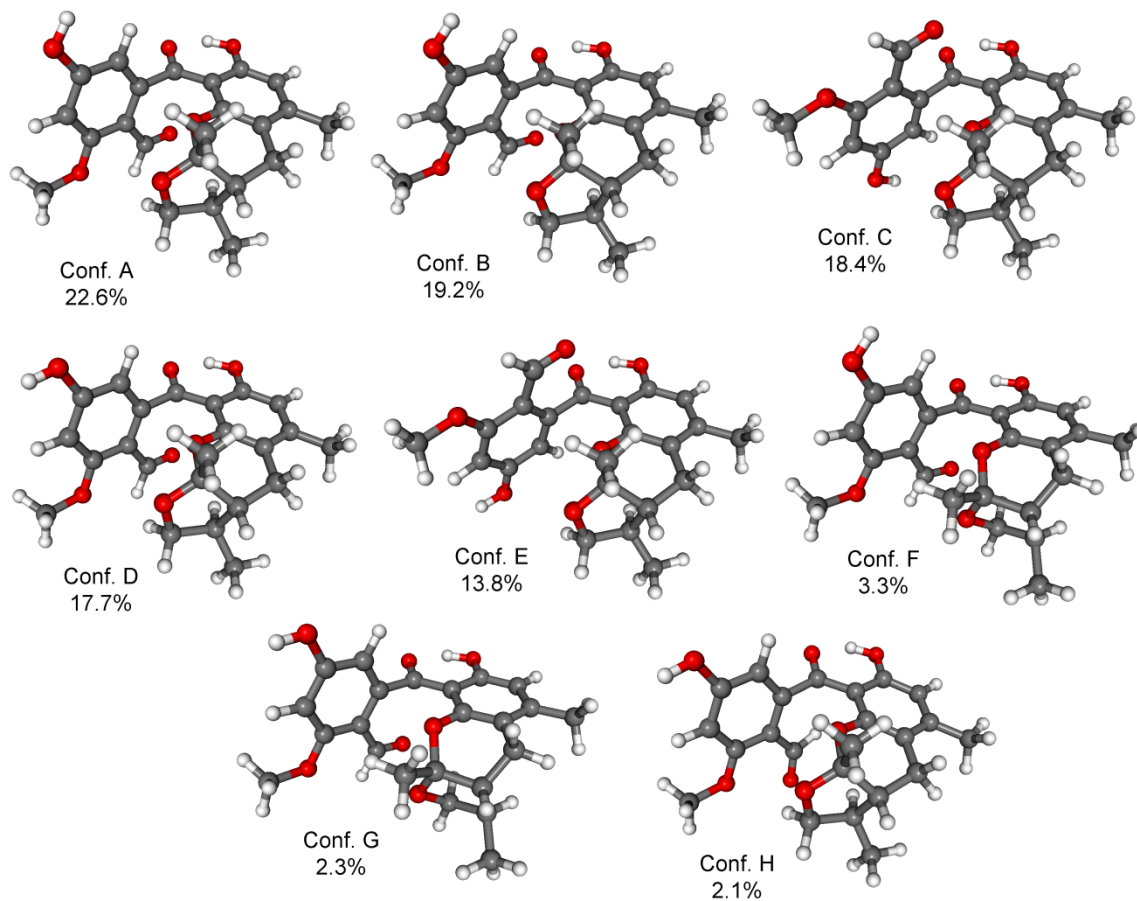


Figure S2. Structures and populations of the low-energy B97D/TZVP PCM/MeCN conformers (>1%) of (3*R*,3*aR*,9*aR*)-2.



Experimental

General experimental procedures

NMR data were recorded on Bruker Avance III-600 NMR spectrometer, mass spectra on a LC-MS HP1100 Agilent Finnigan LCQ Deca XP Thermoquest and HRESIMS spectra on an UHR-QTOF maxis 4G (Bruker Daltonics) mass spectrometers. HPLC analysis was performed with a Dionex Ultimate 3000 LC system combined with a photodiode array detector with detection wavelengths of 235, 254, 280 and 340 nm. The used column (125 x 4 mm, L x ID) was prefilled with Eurospher 10 C₁₈ (Knauer, Germany). A semi preparative HPLC system of LaChrom-Merck Hitachi (pump L7100 and UV detector L7400; column Eurospher 100 C₁₈, 300 x 8 mm, Knauer, Germany) with a flow rate of 5.0 mL/min was used for HPLC separation. Chiral HPLC separation of **1** were performed on a Jasco HPLC system with Chiralpak IA column (5 μ m, 150 x 4.6 mm, hexane/propan-2-ol 80:20 mobile phase, 1 mL/min flow rate) monitored with UV, OR and ECD detectors and HPLC-ECD spectra were recorded in stopped-flow mode on a JASCO J-810 electronic circular dichroism spectropolarimeter equipped with a 10 mm HPLC flow cell. ECD ellipticity (Φ) values were not corrected for the concentration. For an HPLC-ECD spectrum, three consecutive scans were recorded and averaged with 2 nm bandwidth, 1 s response, and standard sensitivity. The HPLC-ECD spectrum of the eluent recorded in the same way was used as background. The concentration of the injected sample was set so that the HT value did not exceed 500 V in the HT channel down to 230 nm.

Fungal material

Xylaria sp. (strain no. Tem1 L2) was isolated from healthy leaves of medicinal plant *Curcuma xanthorrhiza* after disinfection of the leaf surface. The plant sample was collected on the island of Timor, Indonesia. The fungal isolation and purification was performed according to previously described procedures and the fungus was identified by sequencing its ITS region (GenBank accession no: [HQ435662.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HQ435662.1)).^{1,2} A voucher strain is kept in one of the author's laboratories (P.P.).

Cultivation and extraction

The fungus was cultivated on solid rice medium (100 g rice and 110 mL water, autoclaved for 20 min at a temperature of 121 °C) in 15 Erlenmeyer flasks (1 L each) for

Publikation 3: Supporting Information

five weeks under static conditions. The cultures were extracted twice with 400 mL EtOAc. After evaporation and partitioning between *n*-hexane and 90% aqueous methanol, the methanol fraction was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel 60 using an elution system of *n*-hexane and EtOAc. This was followed by size exclusion chromatography on Sephadex LH20 using methanol as eluting solvent, and finally purification by semi-preparative HPLC.

Arugosin J (1): brown red solid; $[\alpha]_D^{20}$ 0 (*c* 0.08, CHCl₃); UV λ_{\max} (PDA) 227 and 299 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; ESIMS (rel. int.) *m/z* 317.0 [M+H]⁺ (100), 654.7 [2M+Na]⁺ (30), 315.2 [M-H]⁻ (100), 360.9 [M+HCOO]⁻ (80), 630.8 [2M-H]⁻ (45); HRESIMS *m/z* 317.10247 [M+H]⁺ (calcd. for C₁₇H₁₇O₆, 317.10196).

(*R*)-**1**: retention time (*t_r*) 3.93 min (Chiralpak IA, *n*-hexane/propan-2-ol 80:20); HPLC-ECD data in *n*-hexane/propan-2-ol 80:20 as λ_{\max} (Φ): 362 (-1.09), 314sh (3.62), 297 (5.75), 269 (-1.15), 254 (2.17), 234 (-0.47), 208 (23.47).

(*S*)-**1**: retention time (*t_r*) 14.71 min (Chiralpak IA, *n*-hexane/propan-2-ol 80:20); HPLC-ECD data in *n*-hexane/propan-2-ol 80:20 as λ_{\max} (Φ): 362 (0.32), 314sh (-0.92), 297 (-1.78), 269 (0.29), 254 (-0.57), 236 (0.33), 208 (-8.12).

Xylarugosin (2): yellow solid; $[\alpha]_D^{20}$ +6.2 (*c* 0.2, CHCl₃); UV λ_{\max} (PDA) 212, 232 and 287 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 2; ESIMS (rel. int.) *m/z* 413.0 [M+H]⁺ (100), 824.6 [2M+H]⁺ (85), 846.7 [2M+Na]⁺ (20), 411.3 [M-H]⁻ (100), 456.7 [M+HCOO]⁻ (35), 822.9 [2M-H]⁻ (10); HRESIMS *m/z* 413.1594 [M+H]⁺ (calcd. for C₂₃H₂₅O₇, 413.1595). ECD (MeCN, λ [nm] ($\Delta\epsilon$), *c* = 3.10×10⁻⁴ M): 384sh (-0.22), 352 (-0.72), 318sh (1.21), 284 (1.69), 261 (-0.49), 245 (0-2.72), 219 (-2.72).

Computational Section

Mixed torsional/low mode conformational searches were carried out by means of the Macromodel 9.9.223³ software using Merck Molecular Force Field (MMFF) with implicit solvent model for chloroform applying a 21 kJ/mol energy window. Geometry reoptimizations (B3LYP/6-31G(d) *in vacuo* and B97D/TZVP⁴ with PCM model for MeCN levels of theory) and TDDFT calculations were performed with Gaussian 09⁵ using various functionals (B3LYP, BH&HLYP, PBE0) and the TZVP basis set *in vacuo* and with the PCM model for MeCN. ECD spectra were generated as the sum of Gaussians⁶ with 3000 and 2100 cm⁻¹ half-height width (corresponding to 27 and 19 nm at 300 nm),

Publikation 3: Supporting Information

using dipole-velocity computed rotational strengths for conformers above 1%. Boltzmann distributions were estimated from the ZPVE corrected B3LYP/6-31G(d) energies in the gas-phase calculations and from the B97D/TZVP energies in the PCM model calculations. The MOLEKEL⁷ software package was used for visualization of the results.

Cell proliferation assay

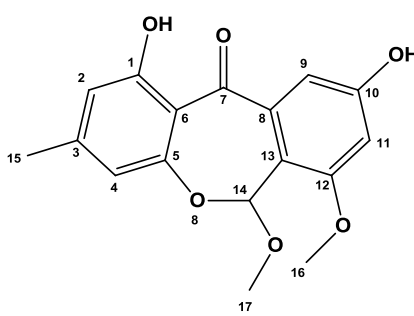
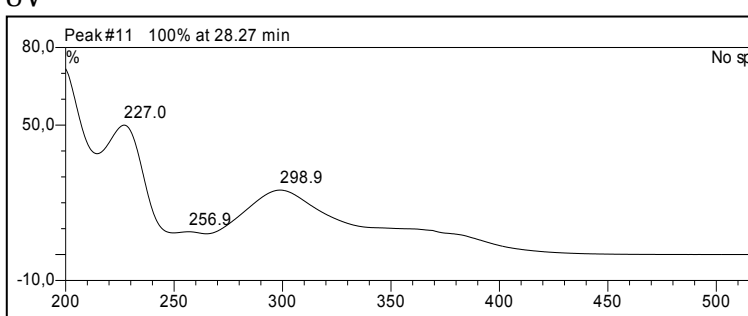
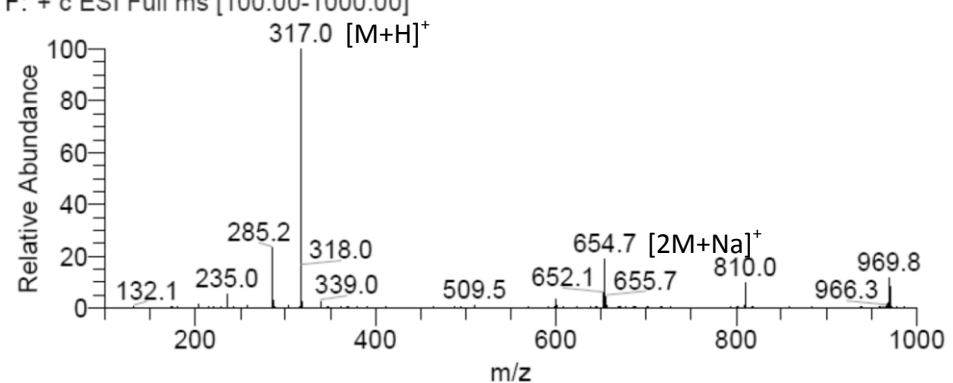
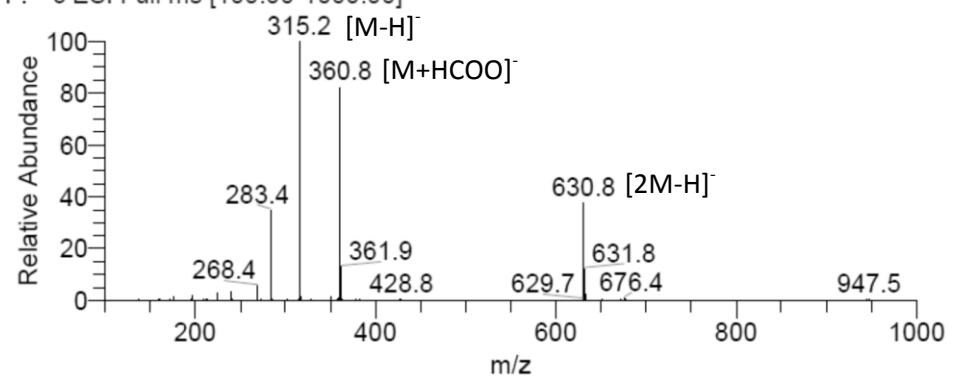
Cytotoxicity was tested against L5178Y mouse lymphoma cells using a microplate 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay with a concentration of 10 µg/mL and compared to that of untreated controls as described previously.⁸ Experiments were repeated three times and carried out in triplicate. As negative controls, media with 0.1% EGMME/DMSO were included in the experiments. The depsipeptide kahalalide F isolated from *Elysia grandifolia*⁹ was used as positive control.

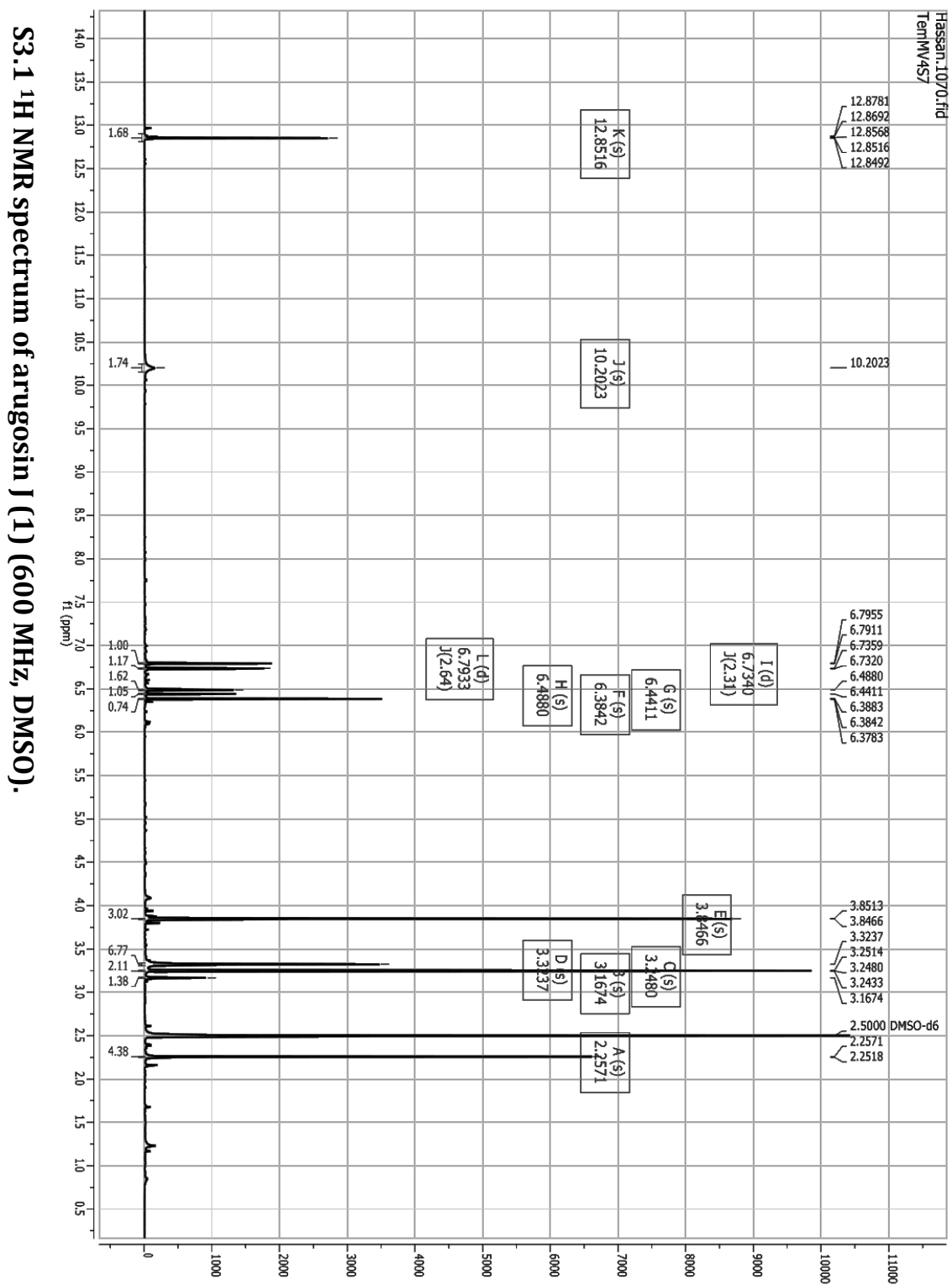
References

1. Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I. D.; Wray, V.; Mueller, W. E. G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schaechtele, C.; Kubbutat, M. H. G.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Ebel, R. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 972-980.
2. Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 479-490.
3. MacroModel. Schrödinger LLC, <http://www.schrodinger.com/MacroModel>. **2012**.
4. Grimme, S. *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787-1799.
5. Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Toyota, K.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, N. M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. *Gaussian, Inc., Wallingford, CT* **2010**.
6. Stephens, P. J.; Harada, N. *Chirality* **2010**, *22*, 229-233.
7. Varetto, U. MOLEKEL 5.4; Swiss National Supercomputing Centre, Manno, Switzerland. **2009**.
8. Kreuter, M. H.; Robitzki, A.; Chang, S.; Steffen, R.; Michaelis, M.; Kljajic, Z.; Bachmann, M.; Schroeder, H. C.; Mueller, W. E. G. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1992**, *101*, 183-187.
9. Ashour, M.; Edrada, R.; Ebel, R.; Wray, V.; Waetjen, W.; Padmakumar, K.; Mueller, W. E. G.; Lin, W. H.; Proksch, P. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1547-1553.

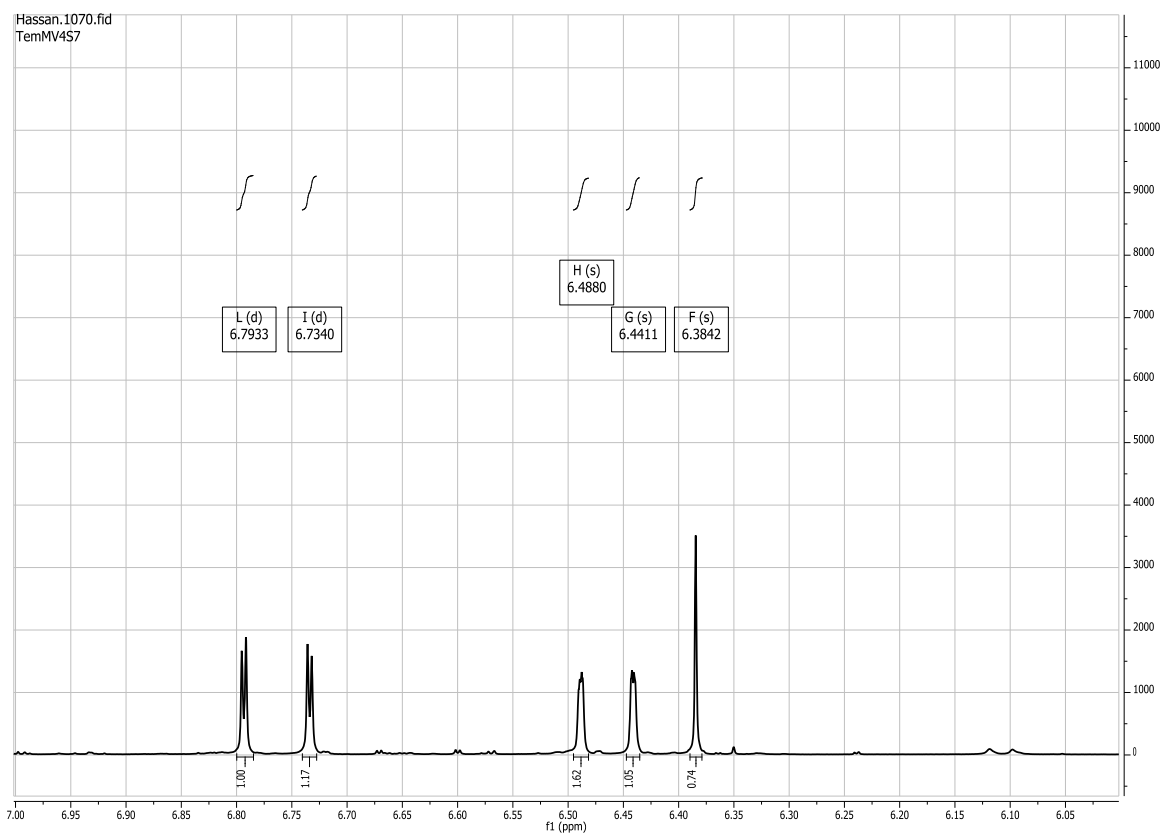
Publikation 3: Supporting Information

S3. General information of arugosin J (1), including RT, UV and mass spectra.

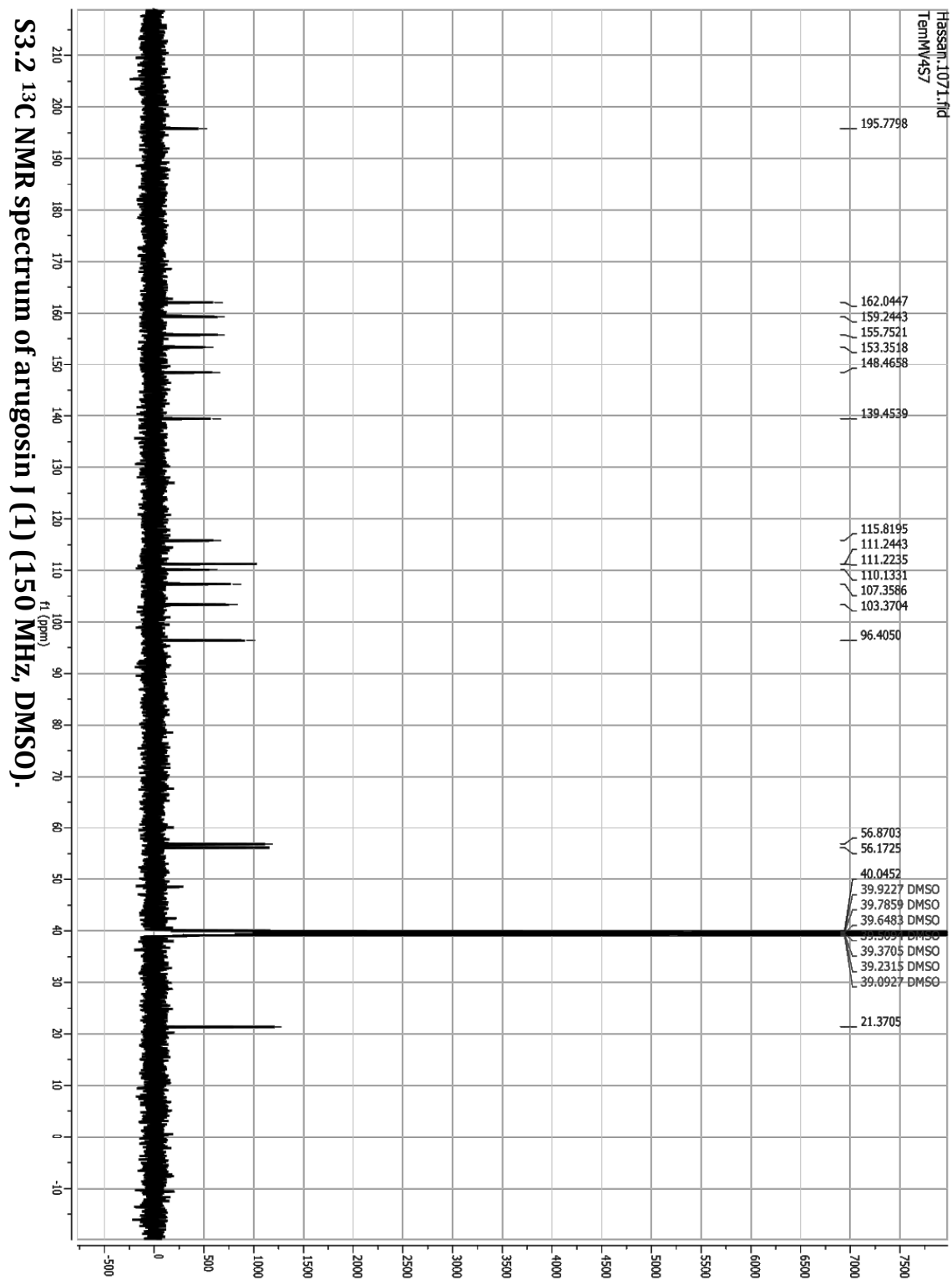
| Arugosin J | |
|---|---|
| Synonym(s) | 1,10-dihydroxy-12,14-dimethoxy-3-methyldibenzo[b,e]oxepin-7(14H)-one |
| Samples code | Tem M V4 S7 |
| Biological source | <i>Xylaria</i> sp. (from <i>Curcuma xanthorrhiza</i>) |
| Sample amount | 5.1 mg |
| Physical description | brownish powder |
| Molecular formula | $C_{17}H_{16}O_6$ |
| Molecular weight | 316 g/mol (317.10247, calcd. for $C_{17}H_{17}O_6$ 317.10196) |
| OR $[\alpha]_D^{20}$ | 0 (c 0.08 $CHCl_3$) |
| Retention time (HPLC) | 29.5 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  |
| MS | <p>lena308 #1102 RT: 29.96 AV: 1 NL: 7.41E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena308 #1104 RT: 30.00 AV: 1 NL: 5.65E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

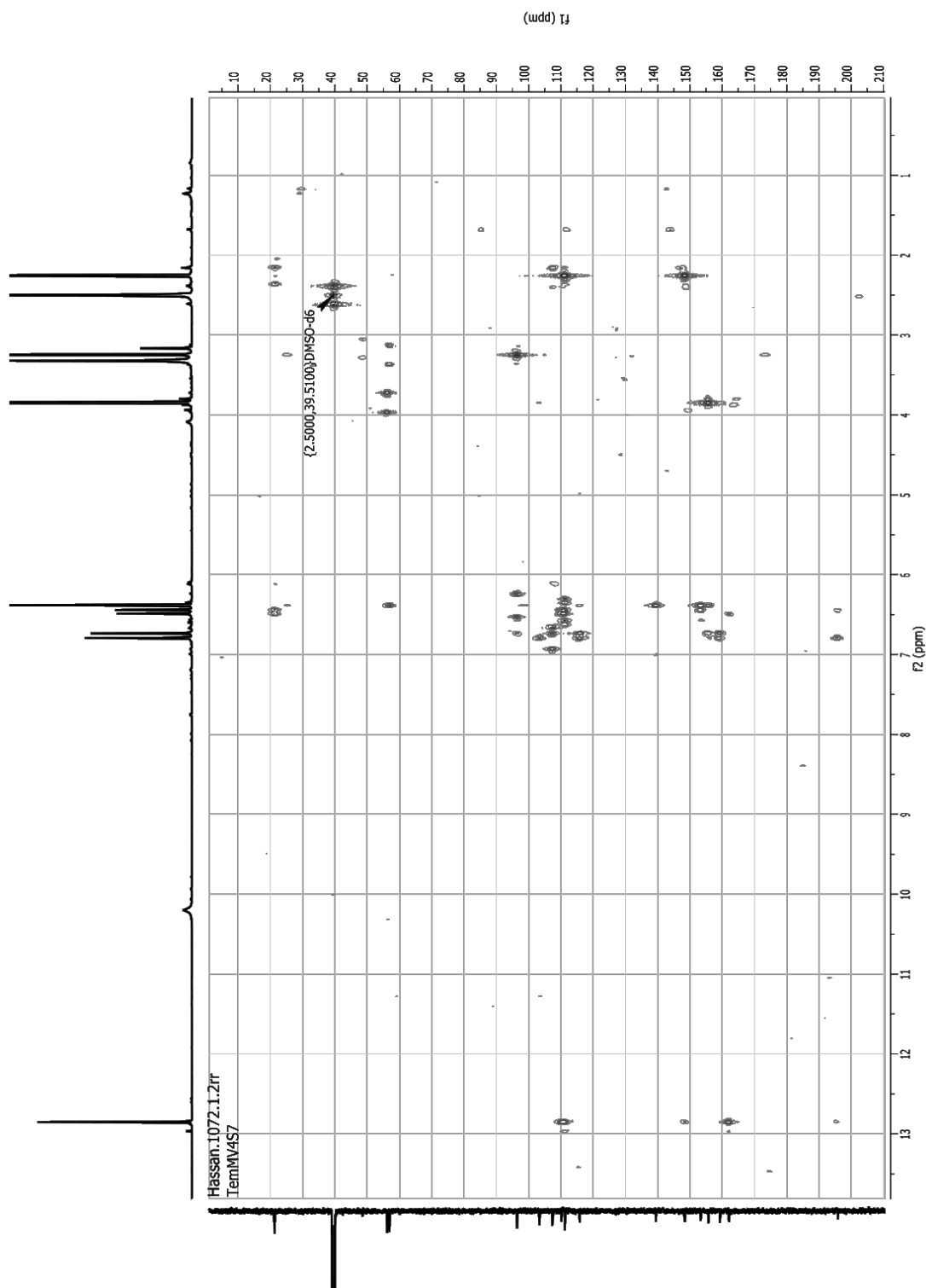


Publikation 3: Supporting Information



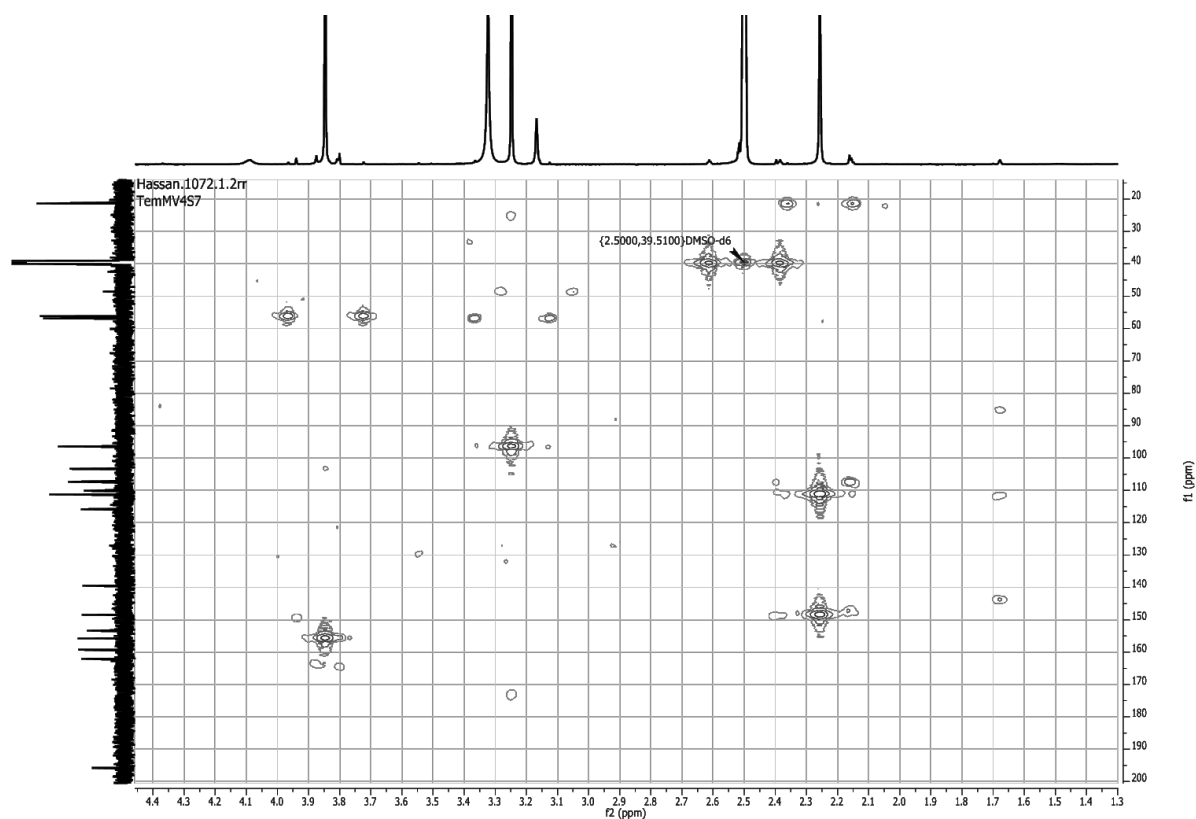
S3.1.1. Enlargement of the aromatic region.



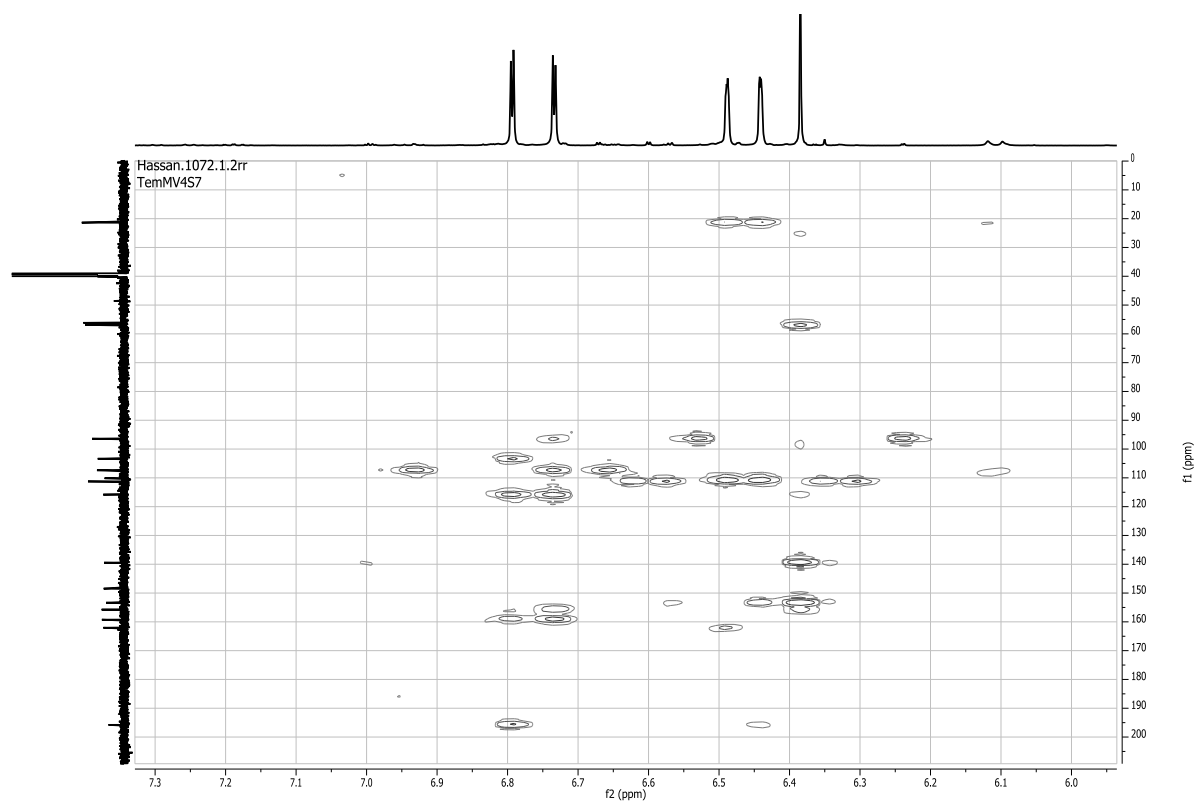


S3.3. HMBC spectrum of arugosin J (1) (600 and 150 MHz, DMSO).

Publikation 3: Supporting Information



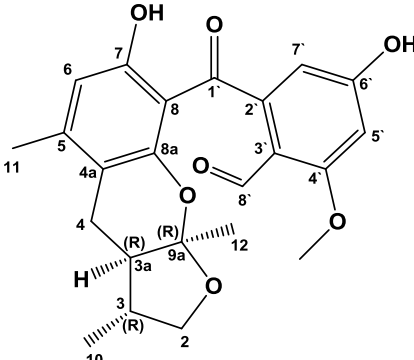
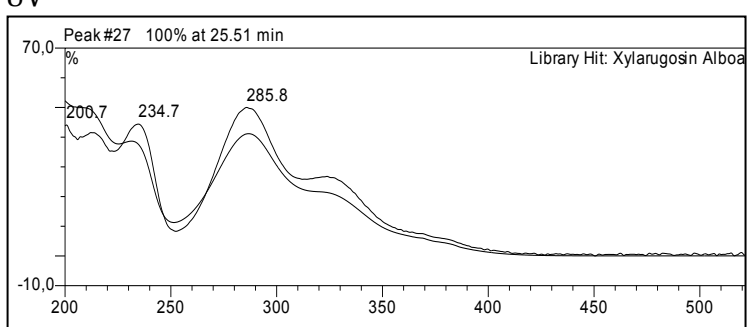
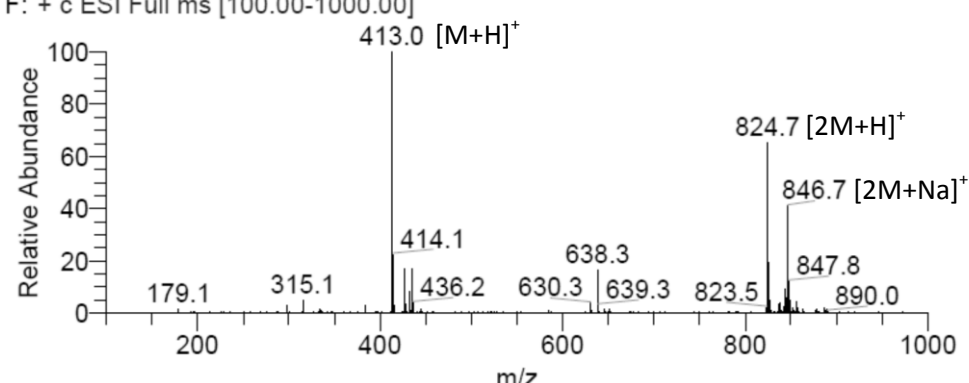
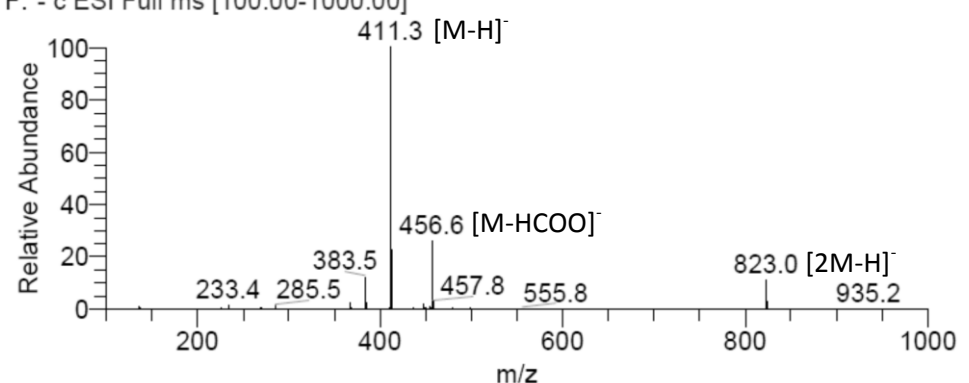
S3.3.1. Enlargement of the aliphatic region.

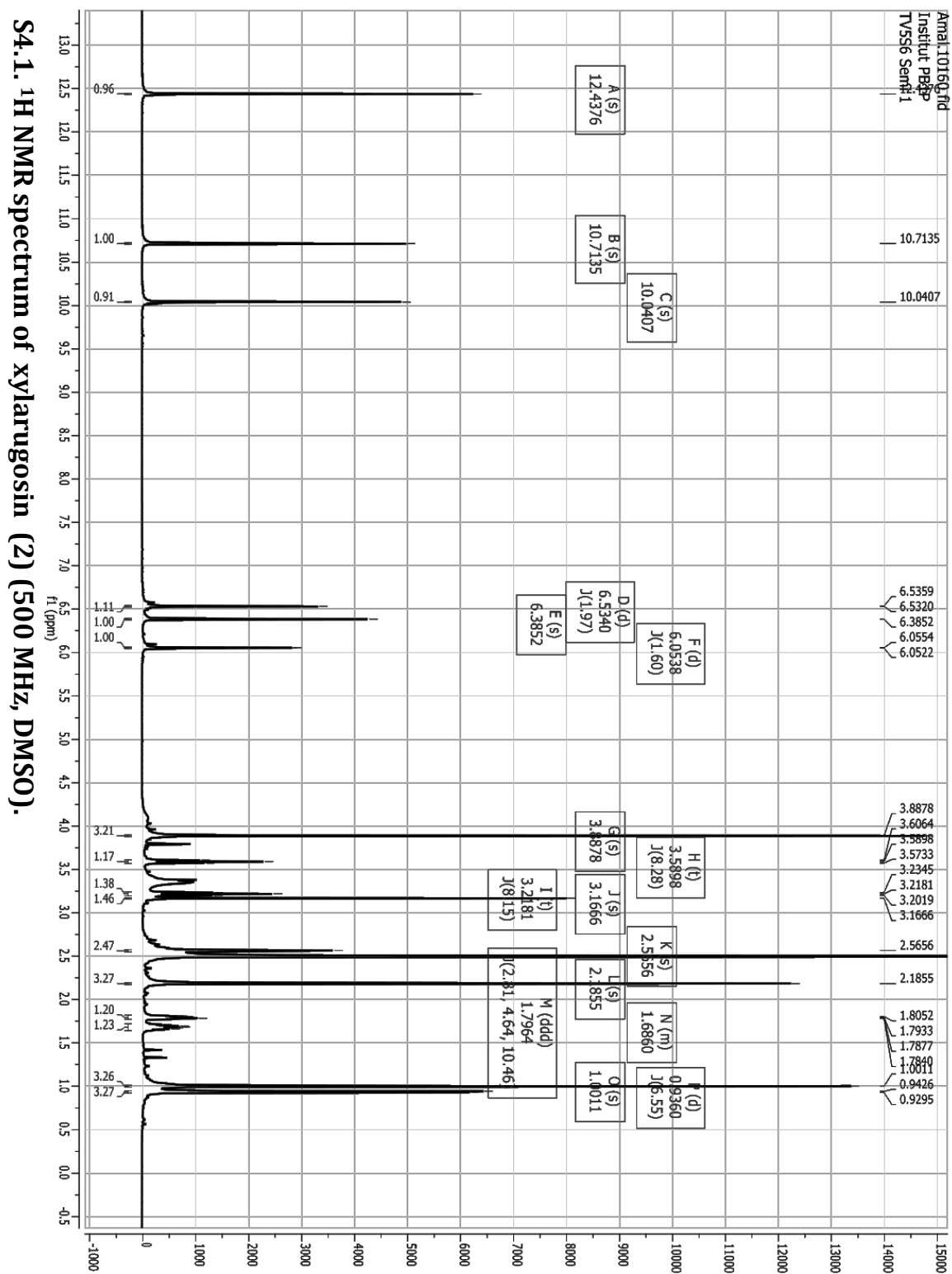


S3.3.2. Enlargement of the aromatic region.

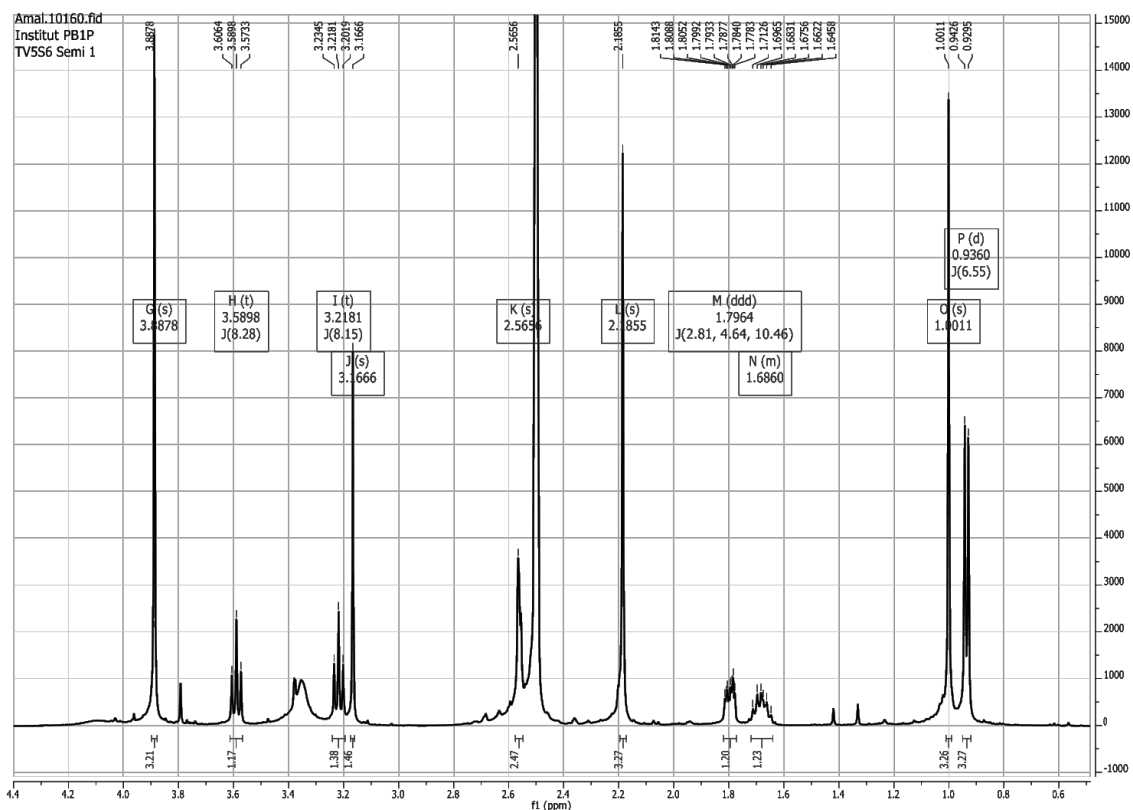
Publikation 3: Supporting Information

S4. General information of xylarugosin (2), including RT, UV and mass spectra.

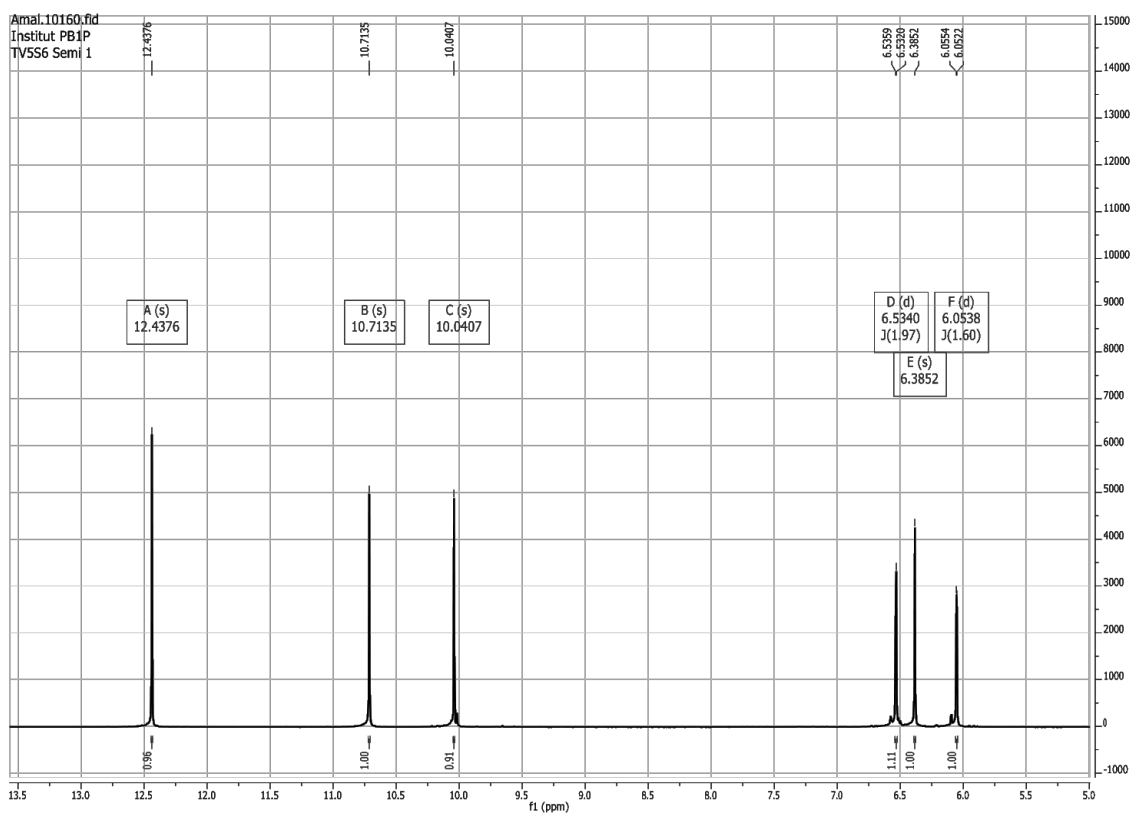
| Xylarugosin | |
|--|---|
| Synonym(s) Samples code Biological source Sample amount Physical description Molecular formula Molecular weight OR $[\alpha]_D^{20}$ Retention time (HPLC) | 4-hydroxy-2-(7-hydroxy-3,5,9a-trimethyl-2,3,3a,9a-tetrahydro-4H-furo[2,3-b]chromene-8-carbonyl)-6-methoxybenzaldehyde Tem M V5 S6-8 Semi1 <i>Xylaria</i> sp. (isolated from <i>Curcuma xanthorrhiza</i>) 7mg Yellow brownish powder $C_{23}H_{24}O_7$ 412 g/mol (413.1594, calcd. for $C_{23}H_{25}O_7$ 413.1595) $+6.2^\circ$ (c 0.2 in $CHCl_3$) 26min |
|  | UV  |
| MS | <p>LENA324 #964 RT: 26.69 AV: 1 NL: 3.77E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>LENA324 #962 RT: 26.64 AV: 1 NL: 6.13E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



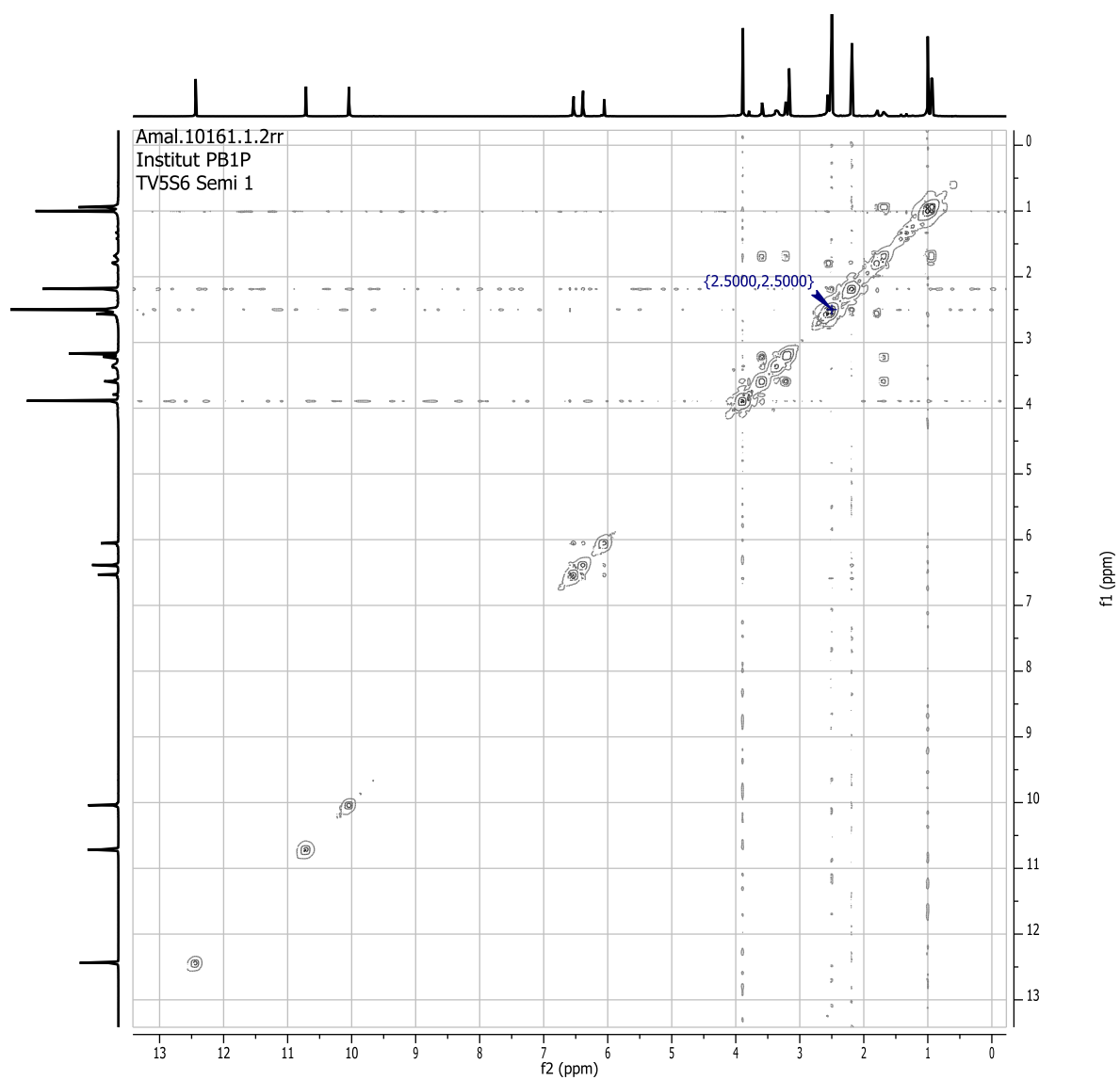
Publikation 3: Supporting Information



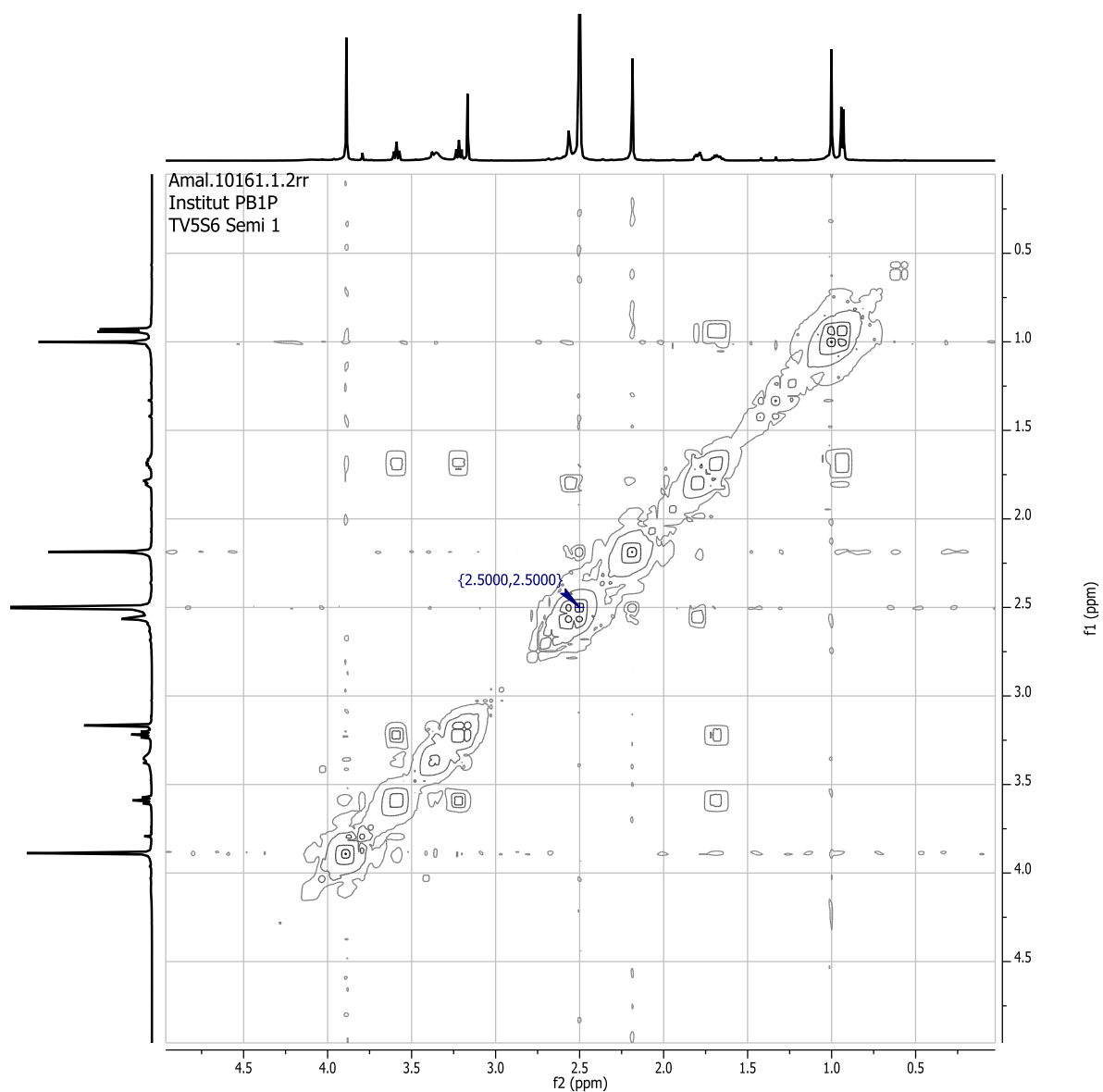
S4.1.1. Enlargement of the aliphatic region.



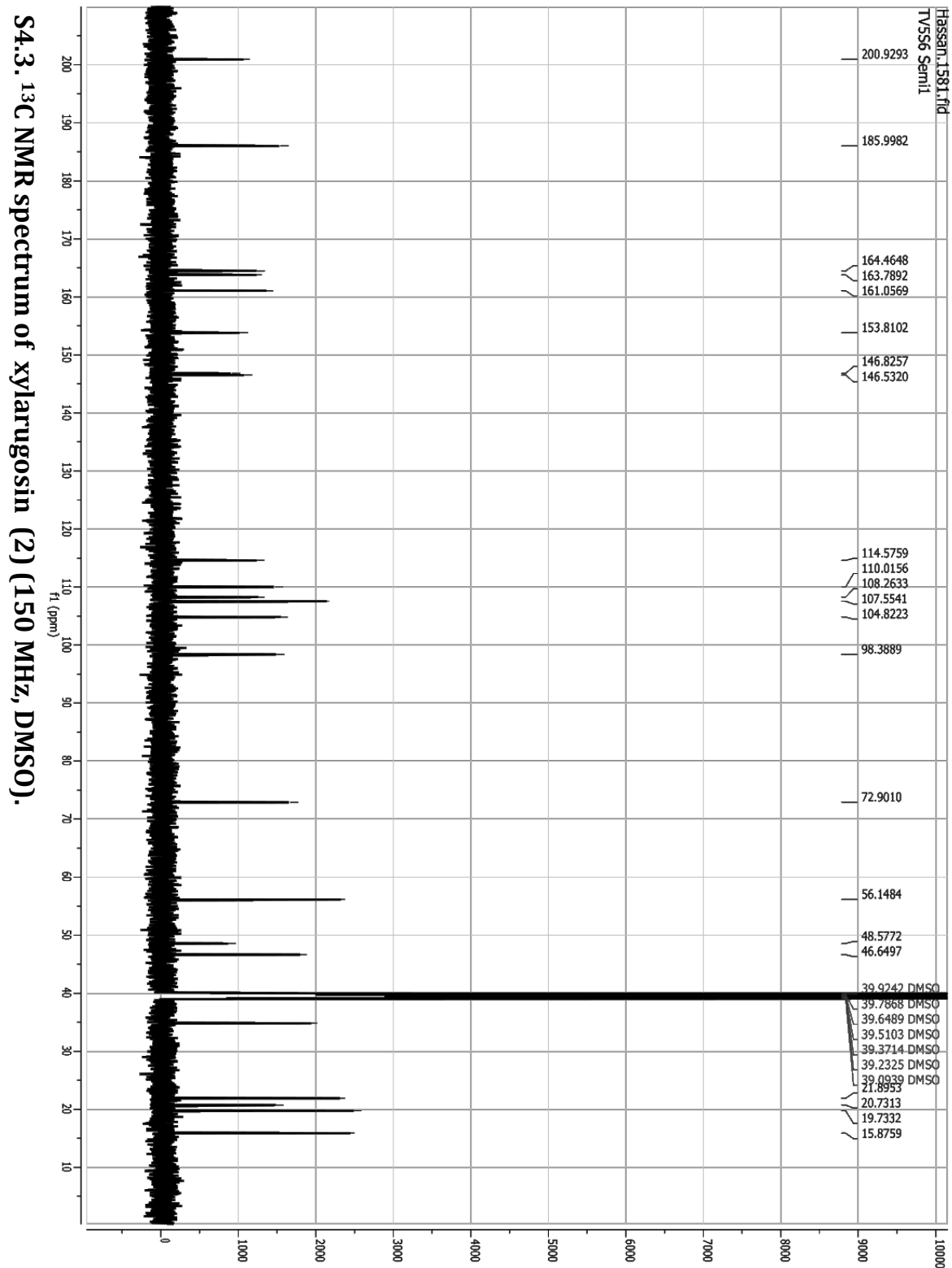
S4.1.2. Enlargement of the aromatic region.

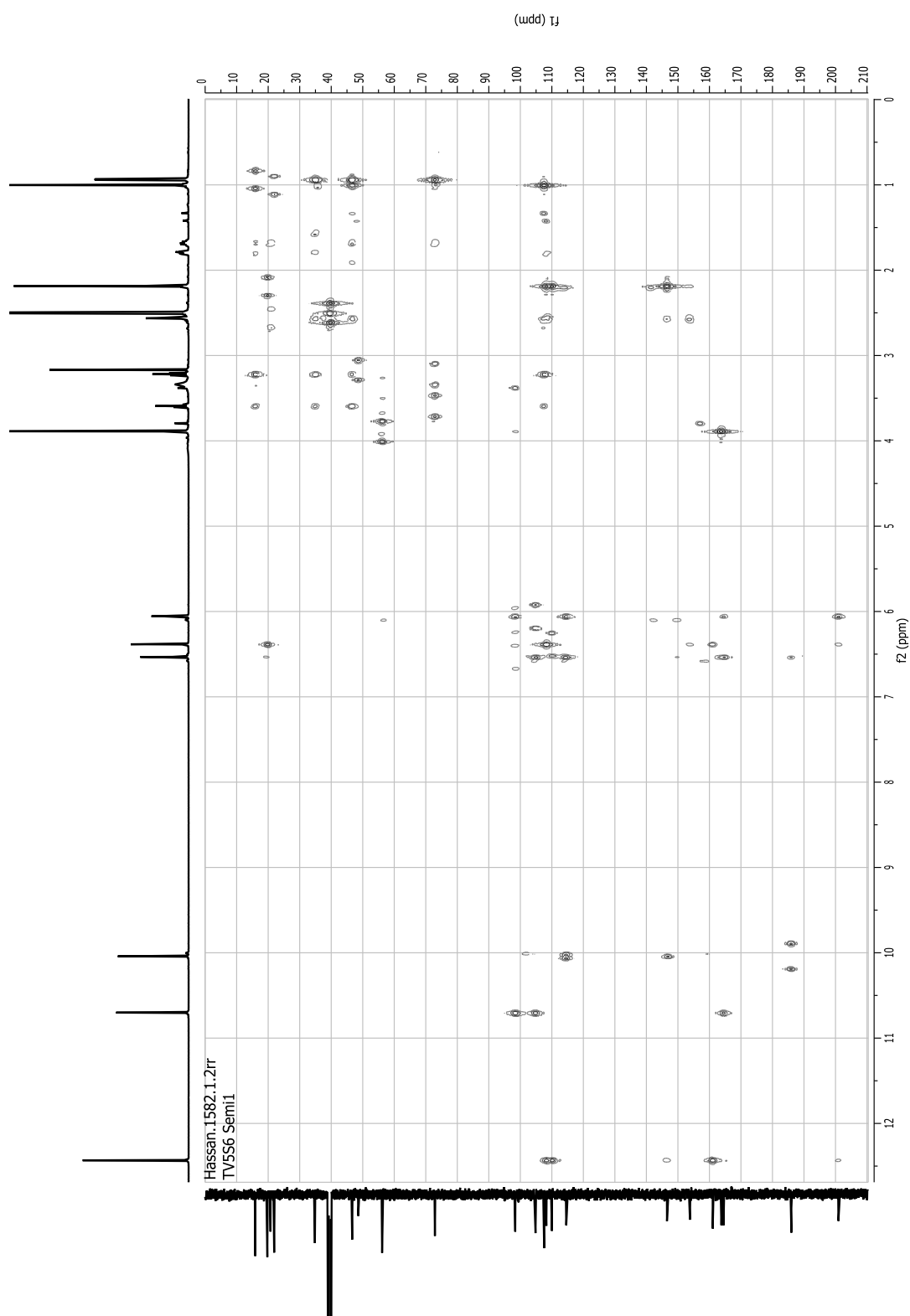


S4.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of xylarugosin (2) (500MHz, DMSO).

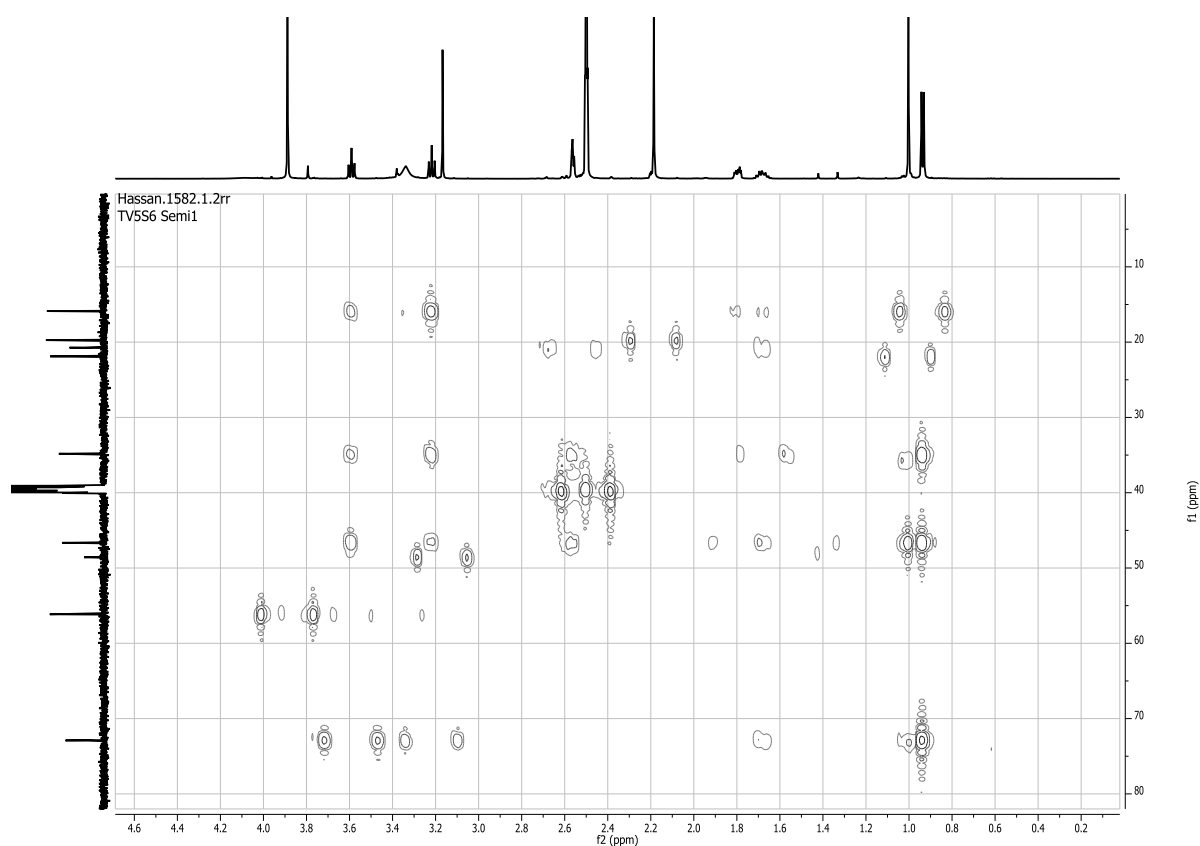


S4.2.1. Enlargement of the aliphatic region.

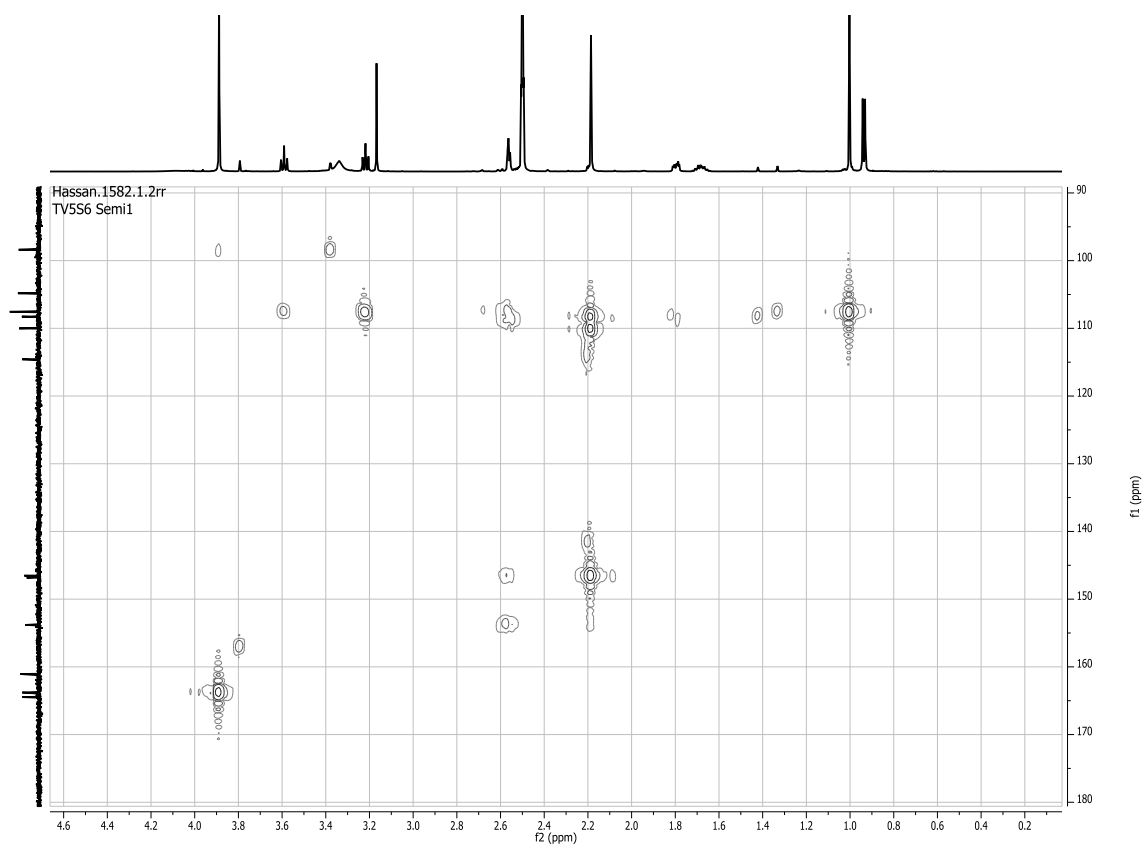




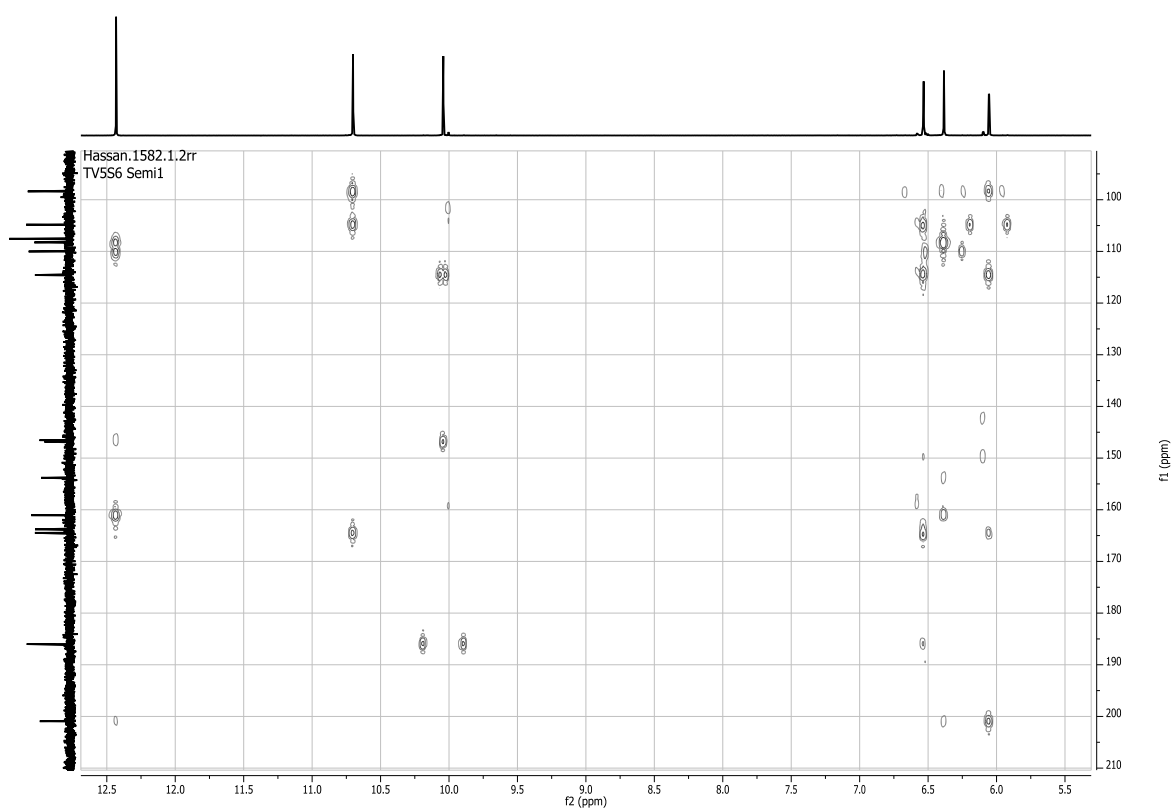
S4.4. HMBC spectrum of xylarugosin (2) (600 and 150 MHz, DMSO).



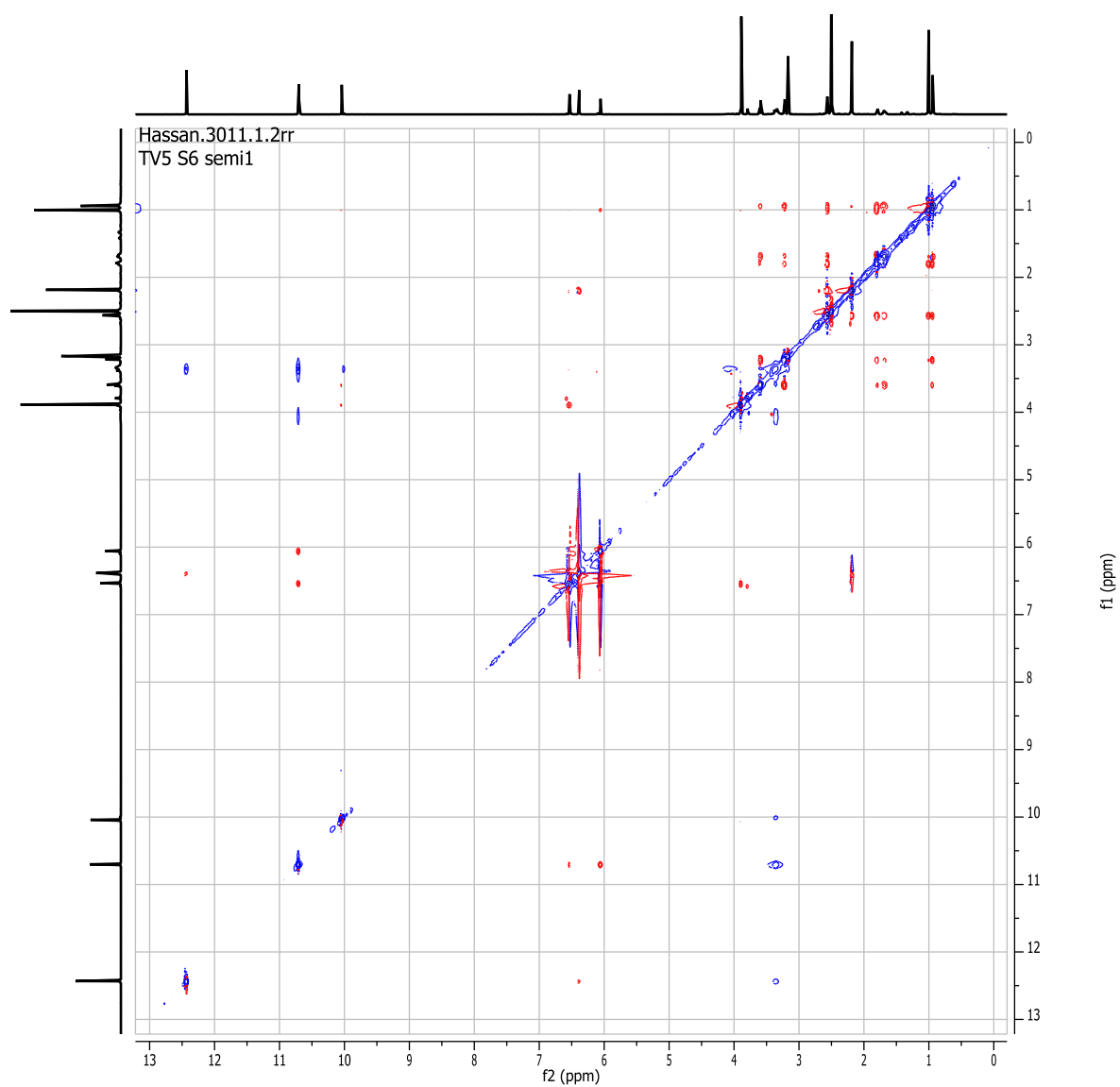
S4.4.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 80 ppm).



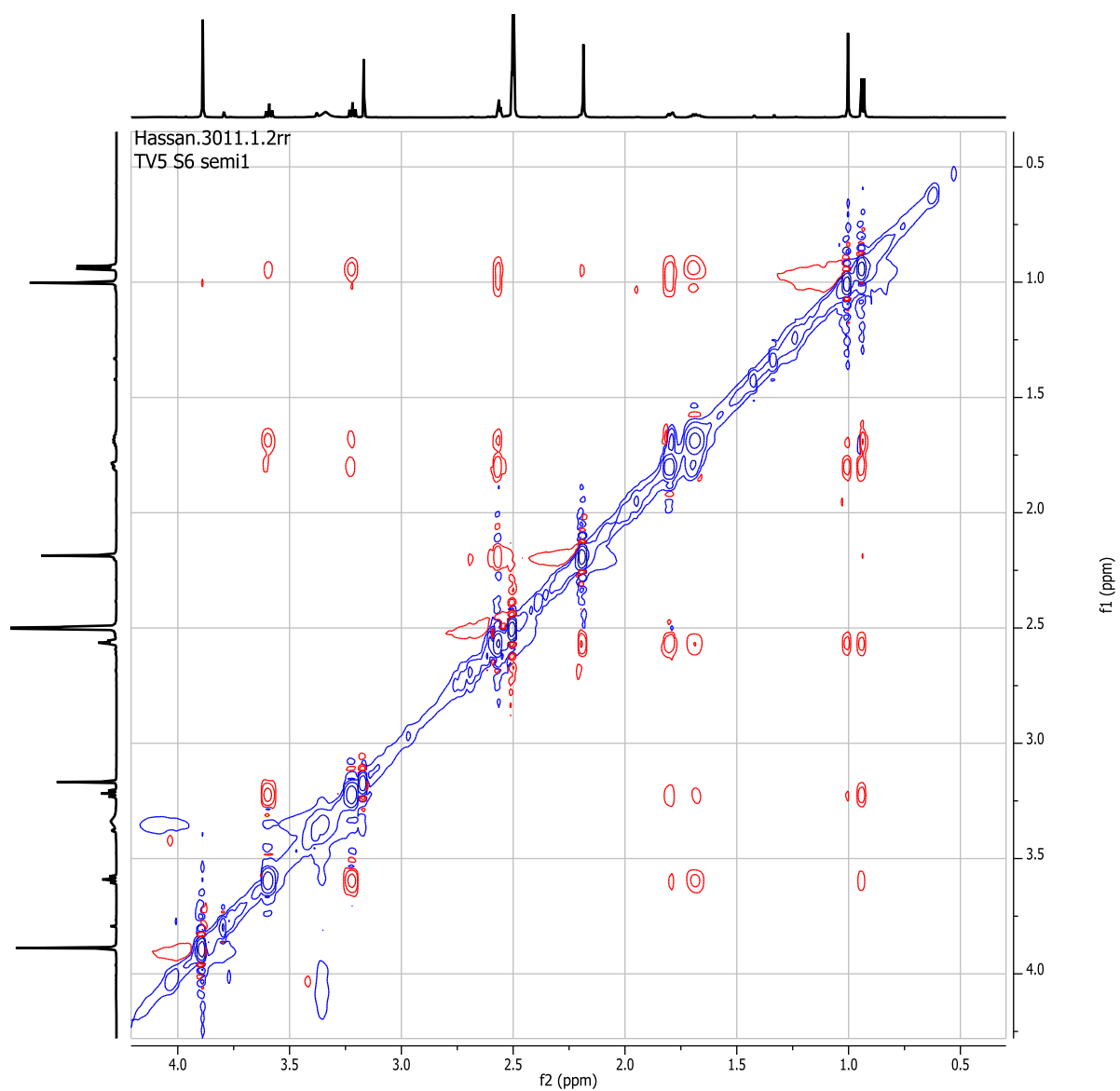
S4.4.2. Enlargement of the aliphatic region (90 – 180 ppm).



S4.4.3. Enlargement of the aromatic region (90 – 210 ppm).



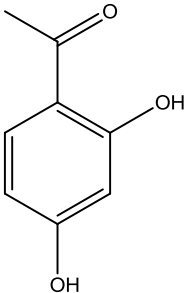
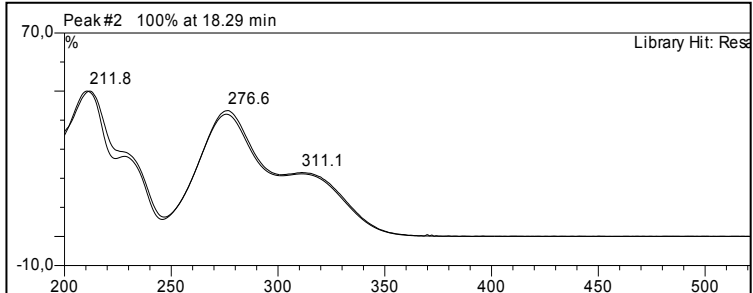
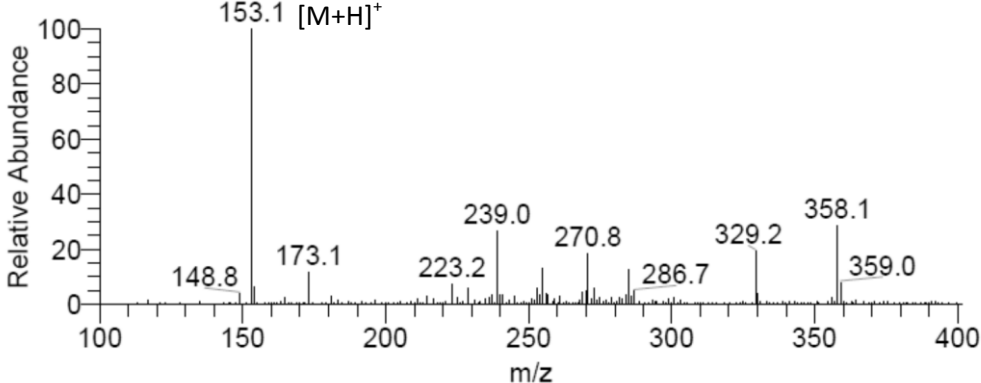
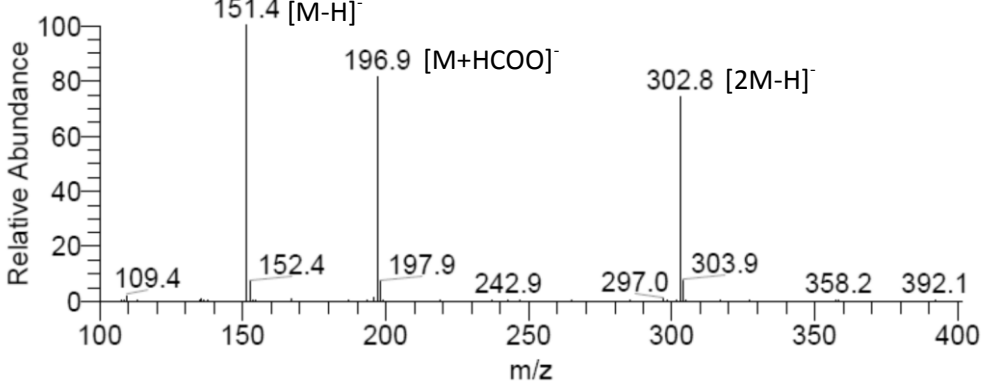
S4.5. ROESY spectrum of xylarugosin (2) (600 MHz, DMSO).

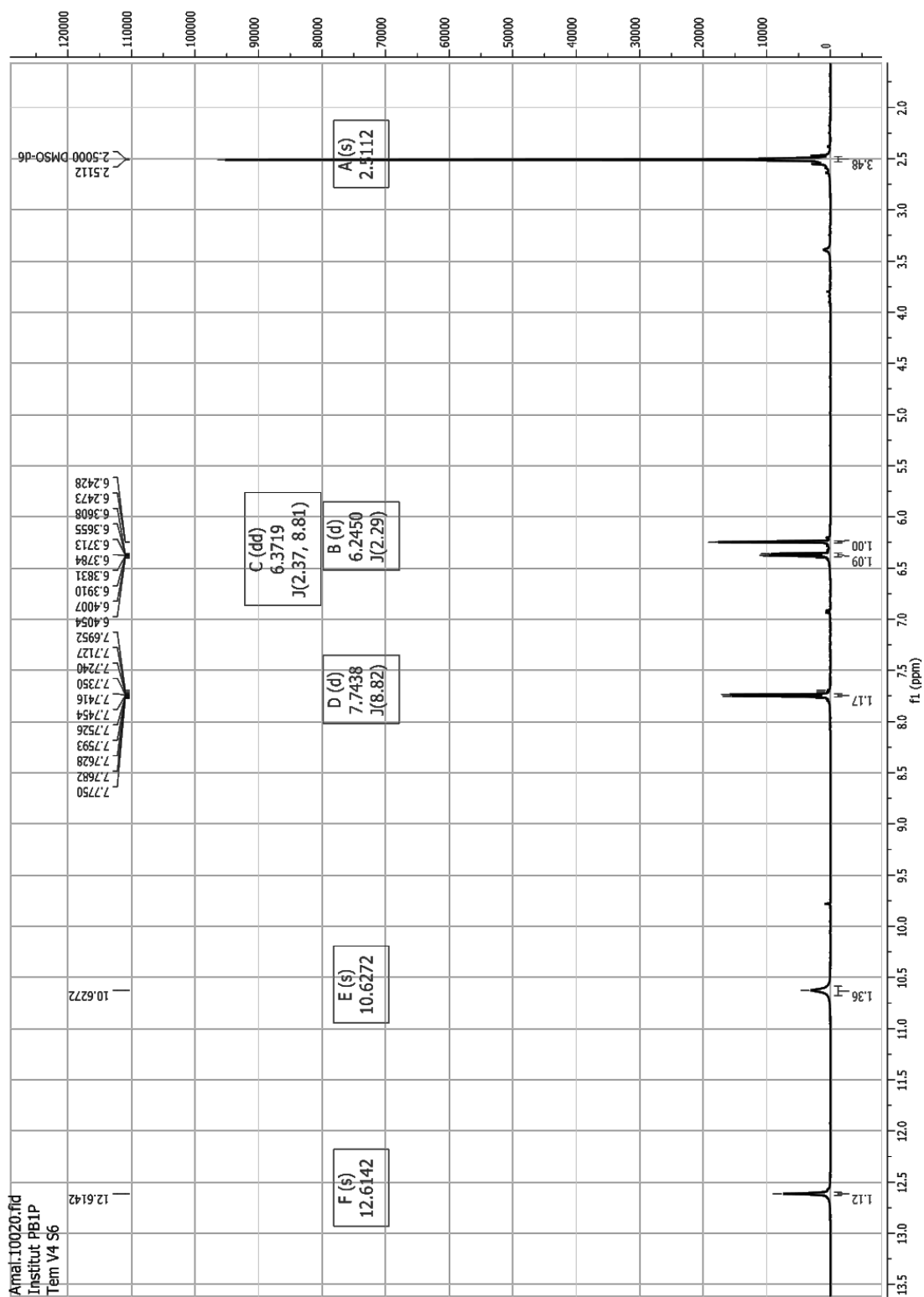


S4.5.1. Enlargement of the aliphatic region

Publikation 3: Supporting Information

S5. General information of resacetophenone (3), including RT, UV and mass spectra.

| Resacetophenone | |
|---|---|
| Synonym(s) | 1-(2,4-dihydroxyphenyl)ethan-1-one |
| Samples code | Tem M V4 S6, Tem 50D-1 |
| Biological source | <i>Xylaria</i> sp. (isolated from <i>Curcuma xanthorrhiza</i>) |
| Sample amount | 31mg |
| Physical description | Brownish powder |
| Molecular formula | C ₈ H ₈ O ₃ |
| Molecular weight | 152 g/mol |
| Retention time (HPLC) | 18 min |
|  | UV  |
| MS | <p>lena307 #623 RT: 16.62 AV: 1 NL: 5.07E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena307 #621 RT: 16.57 AV: 1 NL: 1.76E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



S5.1. ¹H NMR spectrum of resacetophenone (3) (500 MHz, DMSO).

4.4 Publikation 4: *Gymnascella dankaliensis*

Zur Veröffentlichung eingereicht in „Bioorganic & Medicinal Chemistry“

Impact factor: 2.951

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



Cytotoxic acyl amides from the soil fungus *Gymnascella dankaliensis*

Lena Hammerschmidt^a, Amal H. Aly^a, Mohammed Abdelaziz^b, Werner E. G. Müller^c,
Wenhan Lin^d, Georgios Daletos^a, and Peter Proksch^{a, *},

^a Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie, Heinrich-Heine-Universität, Universitätsstraße 1, Geb. 26.23, D-40225 Duesseldorf, Germany

^b Microbial Chemistry Department, Genetic Engineering and Biotechnology Division, National Research Center, El Behous Street 33, Dokki-Giza 12622, Egypt

^c Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Johannes-Gutenberg-Universität, Duesbergweg 6, D-55128 Mainz, Germany

^d National Research Laboratories of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Health Science Center, 100083 Beijing, People's Republic of China

ARTICLE INFO

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

Keywords:

Gymnascella dankaliensis

Soil fungus

Acyl amide

Cultivation experiments

ABSTRACT

The soil fungus *Gymnascella dankaliensis* was collected in the vicinity of the Giza pyramids, Egypt. When grown on solid rice medium the fungus yielded four new compounds including 11'-carboxygymnastatin N (**1**), gymnastatin S (**2**), dankamide (**3**), and aranosin-2-methylether (**4**), the latter having been reported previously only as a semisynthetic compound. In addition, six known metabolites (**5** - **10**) were isolated. Addition of NaCl or KBr to the rice medium resulted in the accumulation of chlorinated or brominated compounds as indicated by LC-MS analysis due to the characteristic isotope patterns observed. From the rice medium spiked with 3.5 % NaCl the known chlorinated compounds gymnastatin A (**11**) and gymnastatin B (**12**) were obtained. All isolated compounds were unambiguously structurally elucidated on the basis of comprehensive spectral analysis (1D and 2D NMR, and mass spectrometry), as well as by comparison with the literature. Compounds **4**, **7** and **11** showed potent cytotoxicity against the murine lymphoma cell line L5178Y (IC₅₀ values 0.44, 0.58 and 0.64 μM, respectively), whereas **12** exhibited moderate activity with an IC₅₀ value of 5.80 μM.

2009 Elsevier Ltd. All rights reserved

1. Introduction

There is an urgent need for new drug candidates as exemplified by the rising resistance of human-pathogenic bacteria and also by the resistance of cancer cells towards treatments with known cytostatic drugs.¹⁻³ Due to the fact that almost two thirds of all currently used antibiotics and anti-cancer agents are either natural products or derived from natural products, nature continues to be an attractive hunting ground for new drug candidates. Fungi are known as exceedingly rich sources of bioactive compounds,⁴ as exemplified by the topoisomerase 2α inhibitor tricitrinol B from *Penicillium citrinum*,⁵ the sphingosine-1-phosphate receptor 1 inhibitors ascotricins A and B from *Ascotricha chartarum*,⁶ the protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor aquastatin A from *Cosmospora* sp.⁷ or myriocin from *Isaria sinclairii*, which led to fingolimod (Gilenya®)

approved in 2010 for the treatment of multiple sclerosis.^{8,9} However, the search for new drug leads from nature including fungi is increasingly facing difficulties due to the frequent re-isolation of known metabolites. One strategy to overcome these obstacles is to focus on new or less investigated habitats such as arctic glaciers or antarctic dry valleys,¹⁰ deserts,¹¹ salt lakes¹² or endophytic and sponge-associated fungi.¹³⁻¹⁵ Schulz *et al.* hypothesized that ecological niches and a high metabolic interaction (e.g. with plants in the case of endophytic fungi) will yield higher proportions of fungi that are capable of producing new metabolites.¹⁶ Other approaches for enhancing the chemical diversity of fungal products include the OSMAC strategy,¹⁷⁻¹⁹ mixed fermentations (also called co-cultivation) of several microorganisms²⁰⁻²³ or the use of epigenetic epigenetic modifiers.^{24,25}

* Corresponding author. Tel.: +49-211-81-14163; fax: +49-211-81-11923; e-mail: proksch@uni-duesseldorf.de (P.Proksch).

In our ongoing search for new bioactive compounds from fungi,^{15,26,27} we investigated the fungus *Gymnascella dankaliensis*, which was isolated from a soil sample in the vicinity the Giza pyramids, Egypt. Bioassay-guided fractionation of the extract following cultivation on solid rice medium yielded four new natural products (**1** - **4**), as well as six known compounds (**5** - **10**). Interestingly, addition of NaCl or KBr to solid rice medium, which was used for fungal fermentation, resulted in the accumulation of chlorinated or brominated metabolites as indicated by LC-MS, which were lacking in the fungal controls. From fungal cultures fermented in the presence of NaCl the known chlorinated compounds gymnastatin A (**11**) and gymnastatin B (**12**) were obtained. All compounds were studied for their cytotoxicity against the murine lymphoma L5178Y cell line. Compounds **4**, **7** and **11** showed strong activity featuring IC₅₀ values of 0.44, 0.58 and 0.64 μM , respectively, whereas **12** exhibited moderate activity with an IC₅₀ value of 5.80 μM .

2. Results and discussion

The ethyl acetate extract of *G. dankaliensis* after cultivation on solid rice medium was subjected to a cytotoxicity bioassay using the murine lymphoma L5178Y cell line. At a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$, the extract inhibited growth of the lymphoma cells completely which prompted us to search for its bioactive metabolites. After partitioning of the extract between *n*-hexane and 90 % aqueous methanol, the aqueous methanol fraction was taken to dryness and subjected to chromatographic separation using silica gel and Sephadex LH-20 as stationary phases, followed by purification with semi-preparative reversed-phase HPLC to yield compounds **1** – **10**.

The molecular formula of compound **1** was determined as C₂₃H₃₁NO₆ on the basis of the positive pseudomolecular signal m/z 418.2221 [M+H]⁺ in the HRESIMS spectrum. Comparison of the NMR spectroscopic data of **1** with those of the known 12'-hydroxygymnastatin (**5**), suggested a close structural relationship between both compounds. Inspection of the ¹H and ¹³C NMR spectra of **1** (Table 1) indicated the presence of a *para*-substituted aromatic ring as indicated by the *ortho*-coupling protons at δ_{H} 6.64 ppm (CH-5/7, $J = 8.3$ Hz, δ_{C} 115.1) and 7.01 ppm (CH-4/8, $J = 8.3$ Hz, δ_{C} 130.0). Additional signals included those of an aliphatic methylene (CH₂-2, δ_{H} 2.95 and 2.75, δ_{C} 36.1 ppm), a methine proton located on a nitrogen-bearing carbon atom, as indicated by its downfield chemical shift at δ_{H} 4.41 ppm (CH-1, δ_{C} 53.9), as well as three exchangeable protons, including a phenolic hydroxy group at δ_{H} 9.19 (6-OH), a carboxyl group at δ_{H} 12.54 (9-COOH) and an amide proton at δ_{H} 8.14 ppm (NH). These signals suggested the presence of a tyrosine moiety as supported by the HMBC correlations from H-5/7 to C-3 (δ_{C} 127.6) and C-6 (δ_{C} 155.6), from H-4/8 to C-2 and C-6, and from H-1 to C-2 and C-9 (δ_{C} 173.8) (Table 1). Further signals included those of two vicinal olefinic protons at δ_{H} 6.96 (CH-3', δ_{C} 144.1) and 5.99 ppm (CH-2', δ_{C} 119.3), an olefinic singlet proton at δ_{H} 5.60 ppm (CH-5', δ_{C} 145.3), two methyl groups at δ_{H} 1.71 and at 0.93 ppm (CH₃-4', δ_{C} 12.6 and CH₃-6', δ_{C} 20.5), an aliphatic methine group at δ_{H} 2.50 ppm

(CH-6', δ_{C} 32.1), five methylene groups (CH₂-7', δ_{H} 1.31 and 1.21, δ_{C} 36.3; CH₂-8', δ_{H} 1.20, δ_{C} 26.4; CH₂-9', δ_{H} 1.23, δ_{C} 28.3; CH₂-10', δ_{H} 1.46, δ_{C} 24.2; and CH₂-11', δ_{H} 2.17, δ_{C} 33.3 ppm), as well as an exchangeable proton of a carboxyl group resonating at δ_{H} 12.04 ppm (12'-COOH), indicating the presence of a polyketide side chain similar to that present in **5**. Detailed analysis of the COSY spectrum disclosed the presence of a spin-system starting from H₃-4' and extending until H₂-11'. In addition, COSY correlations from H-6' to H₃-6' and from H-2' to H-3' were observed. These data indicated the presence of a dimethyloxododecadienoic acid moiety (Figure 1, Table 1) as confirmed by the HMBC correlations from H₃-4' to C-3', C-4' (δ_{C} 131.3) and C-5', from H₃-6' to C-5', C-6' and C-7', and from H₂-10' to C-8', C-9', C-11' and C-12' (δ_{C} 174.3). In addition, the HMBC correlations of the olefinic protons H-2' and H-3' to C-1', as well as the chemical shift of the latter at δ_{C} 165.2 ppm, corroborated the linkage of this moiety to the tyrosine unit through an amide bond (Figure 1).

These data were in agreement with those observed for **5**, apart from the replacement of the terminal hydroxymethyl unit of **5** by a carboxylic group in **1**, which accounted for the molecular weight difference of 14 amu observed between both compounds. This was further supported by the downfield chemical shift of C-12' at δ_{C} 174.3 ppm, indicating the presence of a carboxyl group at this position, as well as by the absence of the H-12' signal at δ_{H} 3.31 ppm as observed in the ¹H-NMR spectrum of **5**.²⁸

The geometry of the double bonds in the side chain was deduced as *E* on the basis of the large coupling constant between H-2' and H-3' (³ $J_{2,3}$, 15.6 Hz), and based on the upfield chemical shift of the vinyl methyl group CH₃-4' resonating at δ_{C} 12.6 ppm. In addition, due to the close biosynthetic relationship with **5** it may be assumed that the absolute configuration of the chiral center at C-6' of **1** is identical to that of **5** and its co-metabolites, as was proved by chemical synthesis and by comparison of the optical activities of each diastereomer with those of the respective natural product.²⁸ The absolute configuration of the tyrosine moiety of **1** was determined using Marfey's analysis, which indicated the presence of both the *L*- and *D*-enantiomers (in a 1:2 ratio) as previously reported also for **5**. Therefore, it was concluded that **1** is a mixture of two diastereomers possessing 6'(R),1(S) and 6'(R),1(R) configurations. This was further supported by the close similarity between the [α]_D values of **1** (-40.3, *c* 0.2, ethanol) and **5** (-32.5, *c* 0.2, ethanol).²⁸ Thus, compound **1** was identified as a new natural product, for which we propose the name 11'-carboxygymnastatin N.

The HRESIMS of **2** exhibited a prominent peak at m/z 362.1598 [M+H]⁺, which is in accordance with the molecular formula C₁₉H₂₃NO₆, indicating an increase of 14 mass units compared to **6**. The spectroscopic data of **2** revealed close similarities to those of **1** and **6**, thus proposing an analogous core structure for **2**.

Accordingly, in the ¹H NMR spectrum of **2** (Table 1), the signals of a *para*-substituted aromatic ring at δ_{H} 7.01 ppm (H-4/8, $J = 8.3$ Hz) and at δ_{H} 6.64 ppm (H-5/7, $J = 8.3$ Hz), a methylene group at δ_{H} 2.95 and 2.75 ppm (CH₂-2), a methine group at δ_{H} 4.42 ppm (CH-1), in

Table 1. NMR spectroscopic data of 11'-carboxygymnastatin **1** and gymnastatin **2** (600 MHz and 300 MHz, DMSO-*d*₆, integration, multiplicity, *J* in Hz).

| Position | 1 | | | | 2 | | | |
|--------------------|------------|--|-------------------------|--------------------------------|--------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| | δ_c | δ_H (<i>J</i> in Hz) | COSY | HMBC | δ_c^a | δ_H (<i>J</i> in Hz) | COSY | HMBC |
| 1 | 53.9 | 4.41, 1H, ddd (9.2, 8.4, 5.1) | 2, NH | 2, 9 | 53.8 | 4.42, 1H, ddd (9.7, 8.4, 4.3) | 2, NH | |
| 2 | 36.1 | 2.95, 1H, dd (14.0, 9.2) 2.75, 1H, dd (14.0, 5.1) | | 1, 3, 4/8 | 35.9 | 2.95 ^c 2.75, 1H, dd (14.0, 9.7) | 1 | 1, 3, 4/8, 9 |
| 3 | 127.6 | | | | 126.8 | | | |
| 4/8 | 130.0 | 7.01, 2H, d (8.3) | 5/7 | 2, 4/8, 5/7, 6 | 129.8 | 7.01, 2H, d (8.4) | 5/7 | 2, 4/8, 5/7, 6 |
| 5/7 | 115.1 | 6.64, 2H, d (8.3) | 4/8 | 3, 5/7, 6 | 114.8 | 6.64, 2H, d (8.4) | 4/8 | 3, 5/7, 6 |
| 6 | 155.6 | 9.19, 1H, s | | 5/7 | 155.7 | 9.20, 1H, s | | 5/7, 6 |
| 9 | 173.8 | 12.54, 1H, br s | | | 173.3 | 12.59, 1H, br s | | |
| NH | | 8.14, 1H, d (8.4) | 1 | | | 8.19, 1H, d (8.4) | 1 | |
| 1' | 165.2 | | | | 164.8 | | | |
| 2' | 119.3 | 5.99, 1H, d (15.6) | 3' | 1', 4', | 120.5 | 6.01, 1H, d (15.6) | 3' | 1', 4' |
| 3' | 144.1 | 6.96, 1H, d (15.6) | | 1', 4', 5', 4'-CH ₃ | 144.1 | 6.93, 1H, d (15.6) | 2' | 1', 4', 5', 4'-CH ₃ |
| 4' | 131.3 | | | | 131.4 | | | |
| 5' | 145.3 | 5.60, 1H, d (9.7) | 4'-CH ₃ , 6' | 3', 4'-CH ₃ | 143.4 | 5.65, 1H, d (9.5) | 4'-CH ₃ , 6' | 3', 4'-CH ₃ |
| 6' | 32.1 | 2.50 ^b | 6'-CH ₃ , 7' | | 29.6 | 2.93 ^c | 6'-CH ₃ , 7' | 5' |
| 7' | 36.3 | 1.31, 1H, m 1.21, 1H, m | 8' | 8' | 41.2 | 2.23, 2H, dd (22.3, 7.1) | 6' | 5', 6', 8', 6'-CH ₃ |
| 8' | 26.4 | 1.20, 2H, m | 9' | 9' | 172.8 | 12.02 1H, br s | | |
| 9' | 28.3 | 1.23, 2H, m | 10' | | | | | |
| 10' | 24.2 | 1.46, 2H, m | 11' | 8', 9', 11', 12' | | | | |
| 11' | 33.3 | 2.17, 2H, t (7.3) | | 9', 10', 12' | | | | |
| 12' | 174.3 | 12.04, 1H, br s | | | | | | |
| 4'-CH ₃ | 12.6 | 1.71, 3H, s | 5' | 3', 4', 5' | 12.3 | 1.73, 3H, s | 5' | 3', 4', 5' |
| 6'-CH ₃ | 20.5 | 0.93, 3H, d (6.6) | 6' | 5', 6', 7' | 19.7 | 0.98, 3H, d (6.6) | 6' | 5', 6', 7' |

^aChemical shift deduced from HMBC

^bOverlapping with solvent

^cOverlapping signals

addition to the exchangeable signals of a phenolic hydroxyl group at δ_H 9.20 ppm (6-OH), a carboxyl group at δ_H 12.59 ppm (9-COOH) and an amide group at δ_H 8.19 ppm (NH) were diagnostic for a tyrosine moiety, as found for **1**. Moreover, the ¹H NMR and COSY spectra of **2** revealed signals corresponding to a *E* substituted double bond at δ_H 6.01 (H-2') and at δ_H 6.93 ppm (H-3') with a coupling constant of 15.6 Hz, an exchangeable proton of a carboxyl group at δ_H 12.02 ppm (8'-COOH), as well as a continuous spin system composed of a methylene group at δ_H 2.23 (H₂-7'), a methine group at δ_H 2.93 (H-6'), an olefinic doublet proton at δ_H 5.65 (H-5'), and two methyl groups at δ_H 0.98 and δ_H 1.73 ppm (H₃-6' and H₃-4', respectively), thus indicating the presence of a dimethylxooctadienoic acid chain as in compound **6** (Figure 1).²⁹ This was corroborated by the HMBC correlations from H₃-4' to C-3', C-4' and C-5', from H₃-6' to C-5', C-6' and C-7', from H-7' to C-5', C-6' and C-8', as well as from H-3' to C-1', C-4' and C-5'. These data suggested that **2** shares the same skeleton with **6**, except for a carboxyl group located at C-1 instead of a hydroxymethyl group as found in **6**, thus accounting for the 14 amu molecular weight difference observed between both compounds. This was further corroborated by the observed HMBC correlation from H-2 to C-9 (δ_c 173.3 ppm). Following hydrolysis of **2** both *L*- and *D*-tyrosine (in a 1:2 ratio) were detected using Marfey's method. Thus, compound **2** is assumed to be a diastereomeric mixture of the 6'(R),1(S) and 6'(R),1(R) stereoisomers, as supported by the similarity between the $[\alpha]_D$ values of **2** (-13.5, *c* 0.25, methanol) and both **1** (-40.3, *c* 0.2, ethanol), and the known gymnastatin N (-32.5, *c* 0.2, ethanol).²⁸

Compound **2** was identified as a new natural product, for which we propose the name gymnastatin S.

The HRESIMS measurement of **3** exhibited a pseudomolecular ion peak at *m/z* 198.1127 [M+H]⁺ indicating the molecular formula of C₁₀H₁₅NO₃. Inspection of the UV and NMR data of **3** (Table 2) revealed spectroscopic features that were partially comparable to those of gymnamide (**10**), thus indicating the presence of an unsaturated acyl amide moiety. Accordingly, the ¹H and COSY spectra (Table 2), showed the signals of three olefinic protons (H-2, H-3, and H-5), one methyl group (H₃-4), located at a double bond, as well as a spin system corresponding to the fragment CH₃(4)CH(5)CH(6)CH₂(7), with CH-6 further correlating with an aliphatic methyl (CH₃-6). These correlations were diagnostic of a dimethylxooctadienoic acid chain, identical to that found in **2** and **6**. This was further confirmed by inspection of the respective HMBC correlations (Table 2).

Furthermore, the presence of only one carboxylic proton resonating at δ_H 12.08 ppm, in addition to two exchangeable protons attributable to a primary amine (δ_H 6.91 and 7.39 ppm, NH₂), corroborated the absence of an additional tyrosine moiety. Due to the close similarity between the $[\alpha]_D$ value of **3** (-33.1, *c* 0.2, methanol) and the known compound gymnamide (**10**) (-47.6, *c* 0.76, CHCl₃),³⁰ it is assumed that the stereocenter at position 6 is *R* configured as in **10**. Therefore, **3** was identified as a new natural product, for which we propose the name dankamide. Interestingly, the acyl chain of **3** is identical to the linear side chains of **2** and **6**, underlining the close biogenetic similarity of the respective compounds.

Table 2. NMR spectroscopic data of dankamide (**3**) (600 and 300 MHz, respectively, DMSO-*d*₆, integration, multiplicity, *J* in Hz).

| Position | δ_c^a | δ_H (<i>J</i> in Hz) | COSY | HMBC |
|-------------------|--------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1 | 166.8 | | | |
| 2 | 120.2 | 5.91, 1H, d (15.5) | 3 | 1, 4 |
| 3 | 143.7 | 6.96, 1H, d (15.5) | 2 | 5, 8, 4-CH ₃ |
| 4 | 130.9 | | | |
| 5 | 143.0 | 5.64, 1H, d (9.6) | 6, 4-CH ₃ | 4, 7 |
| 6 | 29.5 | 2.93, 1H, m | 5, 7, 6-CH ₃ | |
| 7 | 40.3 | 2.24, 2H, m | 6 | 8, 6-CH ₃ |
| 8 | 171.5 | 12.08, 1H, br s | | |
| 6-CH ₃ | 19.8 | 0.97, 3H, d (6.7) | 6 | 5, 6, 7 |
| 4-CH ₃ | 12.2 | 1.71, 3H, s | 5 | 3, 4, 5 |
| NH ₂ | | 7.39, 1H, br s | NH ₂ | 1 |
| | | 6.91, 1H, br s | | |

^aChemical shift deduced from HMBC

The HRESIMS of **4** with the pseudomolecular peak of *m/z* 434.2542 [M+H]⁺ indicated the molecular formula C₂₄H₃₅NO₆. The NMR data of **4** (Table 3) were in perfect agreement with those observed for **7**, except for the presence of an additional methoxy substituent located at C-2 (δ_H 3.34, δ_c 54.1 ppm, 2-OCH₃), which accounted for the increase in the molecular weight of 14 amu compared to **7**. The observed HMBC correlation between the respective methoxy protons (2-OCH₃) and C-2 (δ_c 109.0 ppm) further supported this assumption. The NMR data of **4** showed just one set of signals instead of two, as found for the known compound aranosin and similar compounds. This doubling of signals observed in these derivatives is due to the changes between the two epimeric hemiacetal forms in position C-2. However, in **4** an ether bond was formed resulting in the more stable (*R*)-configuration of the acetal.³¹ Therefore, based on the [α]_D values of **4** (−7.62, *c* 0.17, CHCl₃) and **12** (−122.1, *c* 0.18, CHCl₃), which were both at the negative side, as well as on their close biogenetic relationship, it is assumed that both compounds share the same (*R*)-configuration. Therefore, the structure of **4** was assigned and named aranosin-2-methylether. When **7** was exposed to methanol for five days under non-acidic and acidic conditions at room temperature, no formation of the methylether was detected after LCMS analysis, thus excluding the possibility of **4** being an artifact. To the best of our knowledge, **4** represents a new natural product, which was reported before as semisynthetic derivative of **7** in a structure relationship study.³²

The remaining compounds (**5** – **10**) were elucidated on the basis of their NMR and mass spectrometric data and by comparison with the literature as 12'-hydroxygymnastatin N (**5**),²⁸ farinosone C (**6**),²⁹ aranosin (**7**),^{33,34} aranosinol A (**8**) and B (**9**)³⁴ and gymnamide (**10**).³⁰

The biosynthesis of the tyrosine derived amides obtained from *G. dankaliensis* is suggested to start with an intact tyrosine moiety like in **2**, **5** and in the known gymnastatin N (Scheme 1).³⁵ In analogy to the known halogenating and spirocyclic forming enzymes involved in griseofulvin biosynthesis,³⁶ a spirocyclic cyclohexadiene moiety is assumed to be formed as an intermediate by oxidative coupling, followed by

Table 3. NMR spectroscopic data of aranosin-2-methylether (**4**) (600 MHz, DMSO-*d*₆, integration, multiplicity, *J* in Hz).

| Position | δ_c^a | δ_H (<i>J</i> in Hz) | COSY | HMBC |
|--------------------|--------------|------------------------------|----------------------------|---|
| 2 | 109.0 | 5.01 1H, s | | 3, 4, 5, 2-OCH ₃ |
| 3 | 55.5 | 4.32 1H, td (6.8, 1.2) | NH, 4 | 2, 4, 5, 1' |
| 4 | 36.4 | 2.50 ^b | | 2, 3, 5, 6, 10 |
| | | 2.04 1H, dd (14.4, 1.2) | | |
| 5 | 80.0 | | | |
| 6 | 62.6 | 3.79 1H, t (4.0) | 7 | 5, 10 |
| 7 | 54.8 | 3.49 1H, dd (4.0, 2.6) | | 6, 8, 9 |
| 8 | 200.0 | | | |
| 9 | 54.8 | 3.42 1H, dd (4.0, 2.6) | | 7, 8 |
| 10 | 63.9 | 3.46 1H, t (4.0) | | 5, 6, 9 |
| 2-OCH ₃ | 54.1 | 3.34 3H, s | | 2 |
| NH | | 8.27 1H, d (6.8) | 3 | 2, 3, 4, 1', 2' |
| 1' | 165.4 | | | |
| 2' | 119.0 | 5.99 1H, d (15.3) | 3' | 1', 4', 5' |
| 3' | 144.5 | 7.05 1H, d (15.3) | 2' | 1', 2', 4', 5', 4'-CH ₃ |
| 4' | 130.9 | | | |
| 5' | 146.0 | 5.64 1H, d (9.7) | 6', 4'-CH ₃ | 3', 6', 7', 4'-CH ₃ , 6'-CH ₃ |
| 6' | 32.4 | 2.50 ^b | 5', 7', 6'-CH ₃ | 4', 5', 7', 6'-CH ₃ , 6'-CH ₃ |
| 7' | 36.7 | 1.33 1H, m | 8' | 5', 6', 8' |
| | | 1.22 1H, m | | |
| 8' | 26.9 | 1.18 2H, m | 9' | 7', 9' |
| 9' | 28.7 | 1.22 2H, m | 10' | 8', 10', 11' |
| 10' | 31.2 | 1.21 2H, m | 11' | 9', 11' |
| 11' | 22.1 | 1.24 2H, m | 12' | 10', 12' |
| 12' | 13.1 | 0.84 3H, t (6.8) | | 10', 11' |
| 4'-CH ₃ | 12.5 | 1.72 3H, s | 5' | 3', 4', 5', 7', 6'-CH ₃ |
| 6'-CH ₃ | 20.5 | 0.94 3H, d (6.6) | 6' | 5', 6', 7' |

^aChemical shift deduced from HMBC

^bOverlapping with solvent

stereoselective epoxidation of the double bonds (Scheme 1).³⁷

It is also suggested that halogenation, as in **11** and **12**, takes place in *ortho*-position of the phenolic hydroxy group, before the formation of the spirocycle. In addition, the shorter acyl side chains observed for **2**, **3**, and **6**, could be biosynthesized by polyketide synthases catalyzing fewer steps compared to the other compounds and/or by β -oxidation, which is known for the degradation of fatty acids.

In addition to cultivation on rice, the fungus was cultivated on white beans and in liquid Wickerham medium. These different media caused only slight differences in the patterns of compounds. When cultivated on white beans the fungus showed a decreased production of compound **2**, whereas the liquid medium yielded the lowest amount of extract weight (Figure 2).

When the rice medium was spiked with 3.5 % NaCl several chlorinated natural products were detected by LC-MS based on their characteristic isotope patterns (Figure 3). From the latter extract the known chlorinated compounds gymnastatin A (**11**) and B (**12**) were isolated.

Further experiments using potassium bromide or potassium iodide as addition to the rice medium were likewise performed (Figure 3). When grown in the presence on KBr several unknown brominated compounds were detected by LC-MS based on their

Publikation 4

characteristic isotope patterns (Figure 3). Addition of potassium iodide to the rice medium caused likewise a production of metabolites lacking in fungal controls as judged by the retention time of the new peaks in the

respective HPLC measurements (Figure 3). Experiments to elucidate the nature of these accumulating compounds are underway.

All substances (**1-12**) were tested for their cytotoxic activity against mouse lymphoma cells (L5178Y) using a cellular MTT assay (Table 4). Compounds **4**, **7**, and **11** showed potent activity with IC_{50} values of 0.44, 0.58 and 0.64 μM , respectively, whereas **12** exhibited moderate activity with an IC_{50} value of 5.80 μM compared to kahalalide F (4.3 μM).³⁸ Compounds with an intact tyrosine moiety (**1**, **2**, **5**, **6**) as well as the compounds **3**, **8**, **9** and **10** showed no cytotoxic activity, which lead to a tentative suggestion of their structure activity relationships. A spirocyclic core seems important for mediating cytotoxicity like in **4**, **7**, **11** and **12**. Since compounds **8** and **9**, which bear a spirocyclic moiety but lack the keto function in position 8, showed no cytotoxic effect, the keto substituent in the spirocyclic core seems to be an important structural feature for the enhancement of the activity of these compounds.

3. Conclusion

Cultivation of the fungus *Gymnascella dankaliensis* on solid rice medium yielded four new compounds

(11'-carboxygymnastatin N (**1**), gymnastatin S (**2**), dankamide (**3**), and aranorosin-2-methylether (**4**)), in addition to six known compounds (**5** - **10**). The cultivation on rice media spiked with NaCl led to the isolation of the known chlorinated compounds, gymnastatin A (**11**) and B (**12**). Further experiments with addition of potassium bromide or potassium iodide to the rice medium resulted in the accumulation of metabolites lacking in fungal controls. All these results supported the OSMAC approach as an effective strategy for activating silent metabolic pathways of microorganisms to overcome the problem of frequent re-isolation of known compounds.

Table 4. IC_{50} values (in μM) of compounds **4**, **7**, **11** and **12** against the mouse lymphoma cells L5178Y.

| Substance | IC_{50} [μM] |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Aranorosin-2-methylether (4) | 0.44 |
| Aranorosin (7) | 0.58 |
| Gymnastatin A (11) | 0.64 |
| Gymnastatin B (12) | 5.80 |

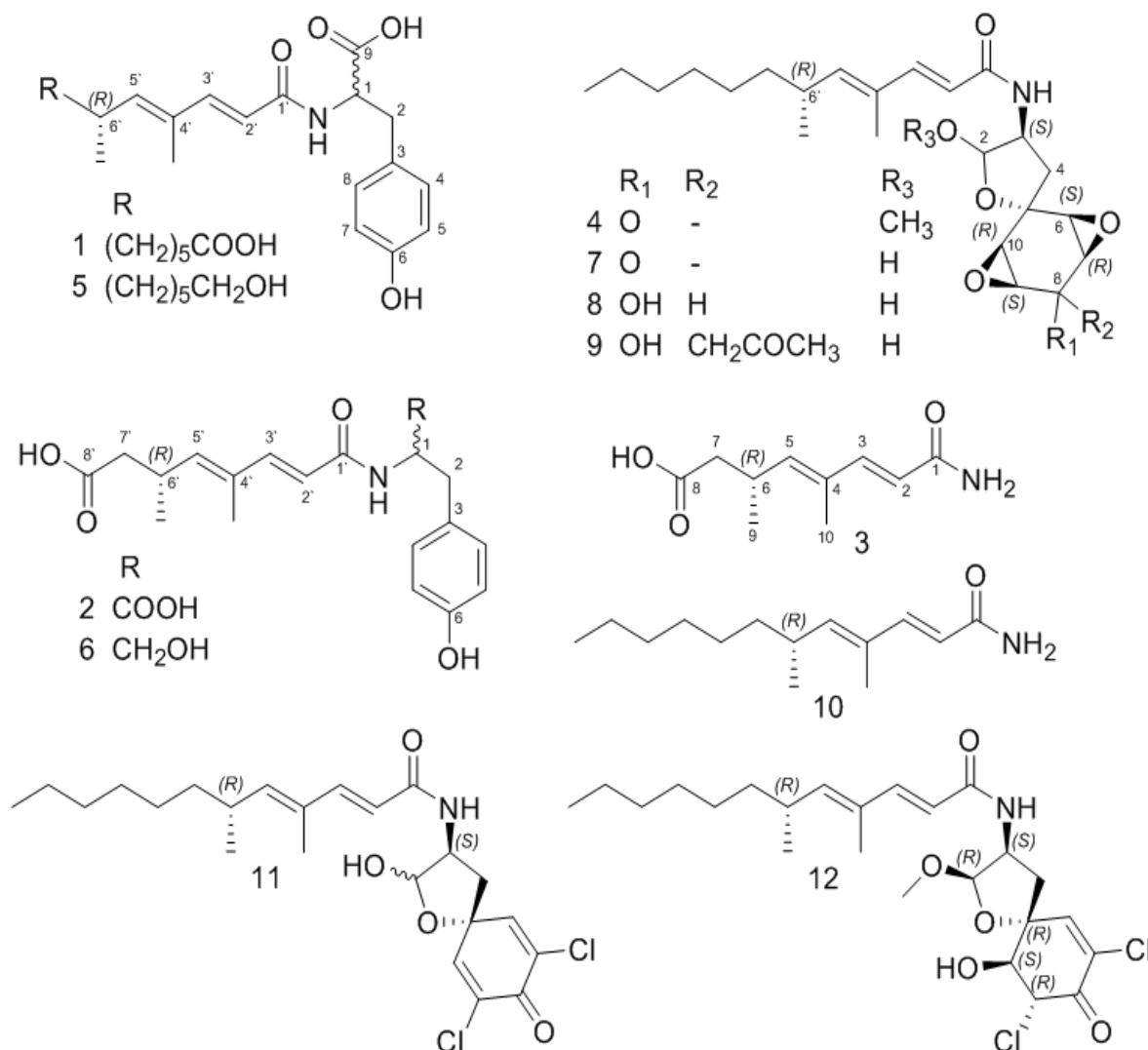


Figure 1. Structures of isolated compounds **1** - **12**.

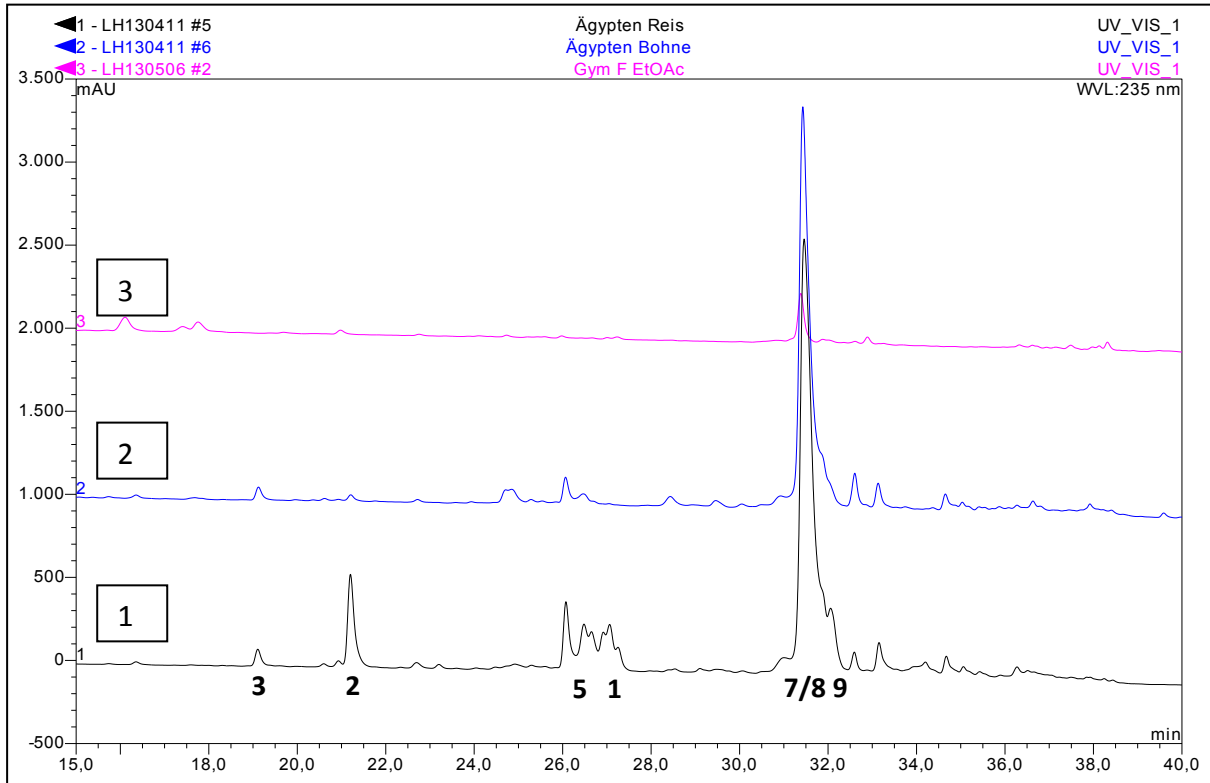


Figure 2. HPLC analysis of fungal extracts grown on rice (1), white beans (2) or in liquid Wickerham (3) medium. Peak heights indicate amounts of compounds formed during the different fermentations.

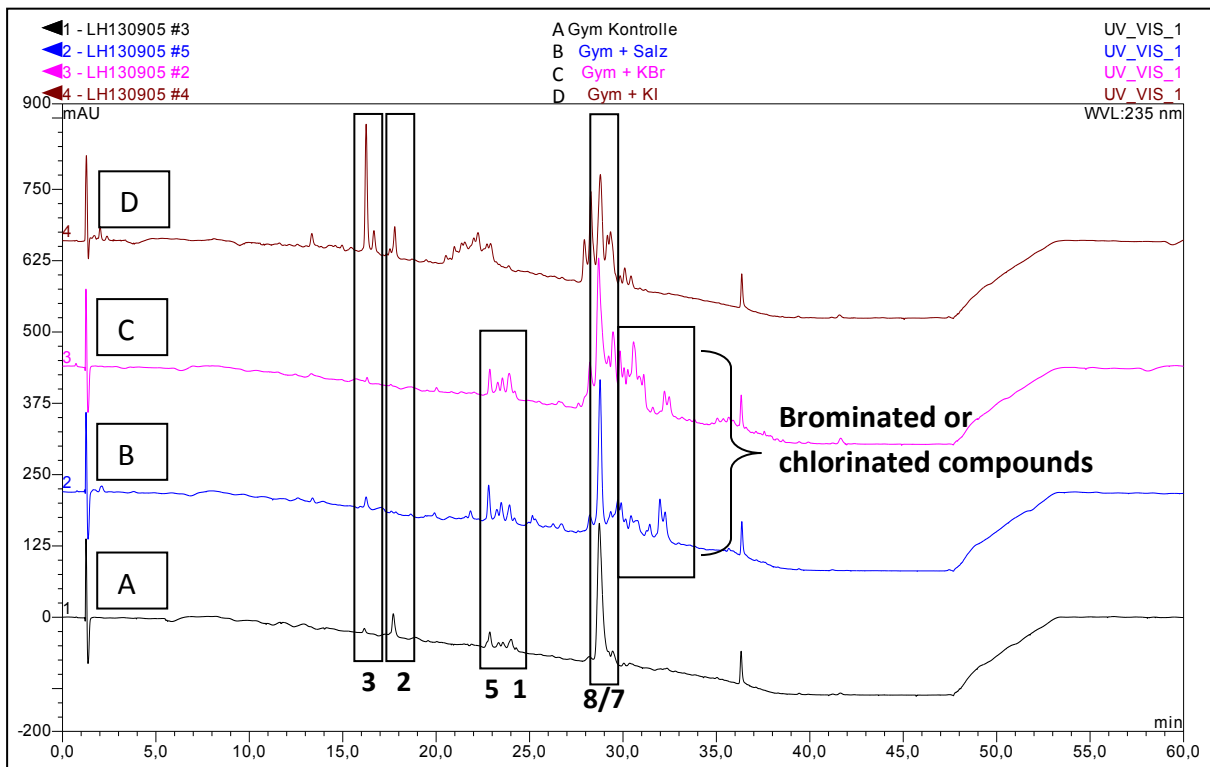
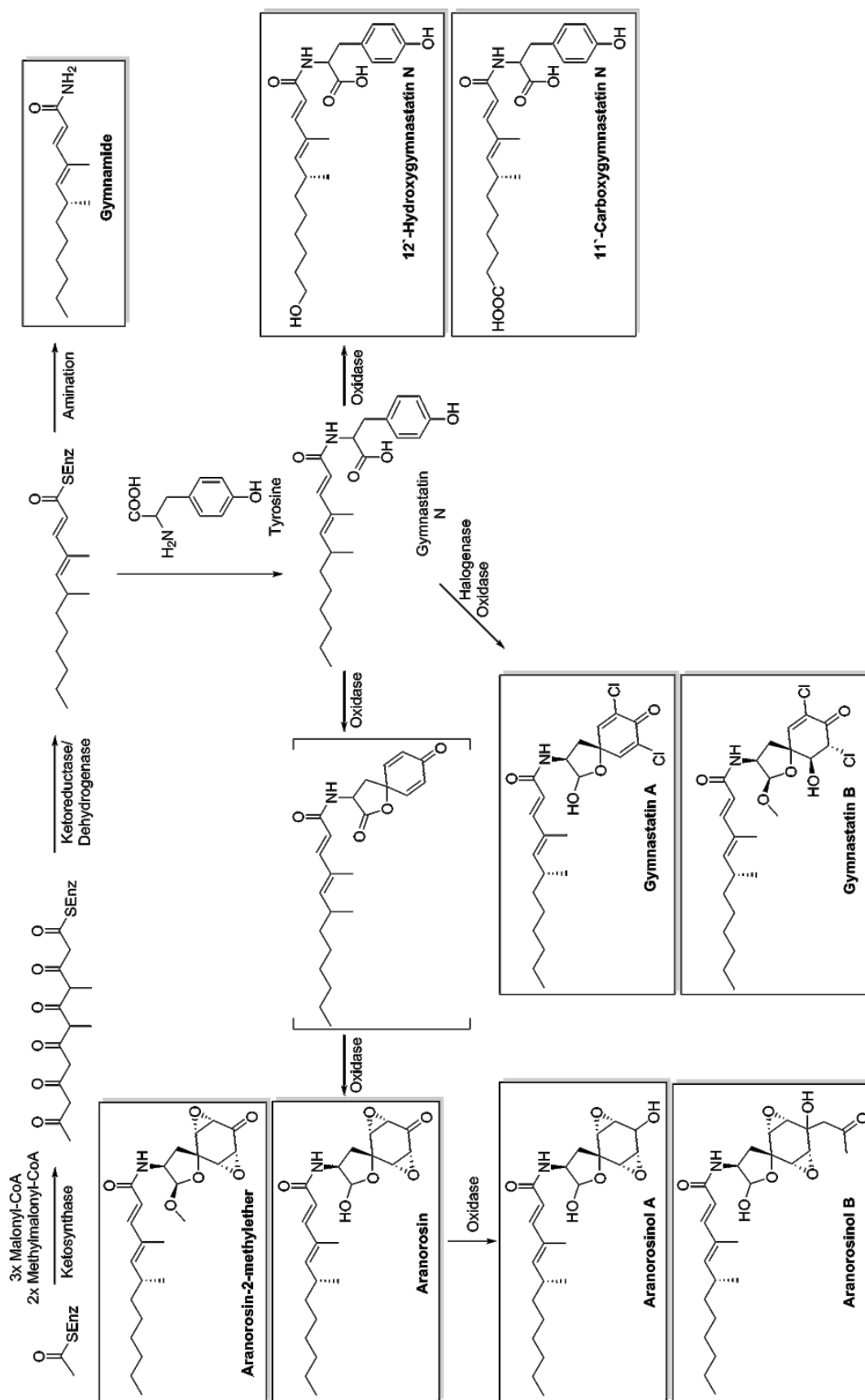


Figure 3. HPLC analysis of fungal extracts grown on solid rice medium (A). Chromatograms B-D represent fungal extracts obtained after addition of 3.5 % NaCl (B), 3.5 % KBr (C) or 3.5 % KI (D) to the rice medium.



Scheme 1. Postulated biosynthesis of tyrosine derived long chain acyl amides from *G. dankaliensis* modified after McKillop *et al.*³⁵ and Cacho *et al.*³⁶

4. Experimental section

4.1. General experimental procedures

For column chromatography Merck MN Silica gel 60M (0.04-0.063 mm) or Sephadex LH20 as stationary phases were used. For combination of fractions pre-coated Silica Gel 60 F254 TLC plates (Merck) were used with UV detection at 254 and 366 nm and reaction with anisaldehyde spray reagent. Optical rotation were measured with a Jasco P-2000 polarimeter. For column chromatography distilled and for spectroscopic measurements spectral grade solvents were used. HPLC analysis was performed on a Dionex 3000 RS system coupled to a Dionex 3000 DAD with detection wavelengths at 235, 254, 280 and 340 nm. The chromatographic column (125 x 4 mm, L x ID) was pre-filled with Eurospher 10 C18 (Knauer, Germany). HPLC separation was performed on a semi preparative HPLC system of LaChrom-Merck Hitachi (Pump L7100 and UV detector L7400; Eurospher 100 C18, 300 x 8 mm, Knauer, Germany) with a flow rate of 5.0 mL/min. Mass spectra were measured with a LC-MS HP1100 Agilent Finnigan LCQ Deca XP Thermoquest and high-resolution mass (HRESIMS) spectra were recorded with a UHR-QTOF maXis 4G (Bruker Daltonics) mass spectrometer. ¹H, ¹³C and 2D NMR spectra were recorded in deuterated solvents on Bruker ARX 500 or AVANCE DMX 600 NMR spectrometers.

4.2. Fungal material

The fungus was isolated from a soil sample collected in the surroundings of Giza pyramids, Egypt. The soil was taken from a depth of 10 cm, sieved and air dried for 3-5 days at 18 °C. After drying, samples were kept at 10 °C until use. The isolation was performed like described before.³⁹ The fungus was identified by DNA amplification, sequencing of fungal ITS region and comparing with GenBank data (GenBank accession no. **HM991265.1**) according to a protocol described previously.⁴⁰ A voucher strain is kept in one of the author's laboratory (P.P.).

4.3. Cultivation

Mass growth of the fungus was carried out in two Erlenmeyer flasks (1 L each) on solid rice medium (100 mL distilled water added to 100 g commercially available rice and autoclaved) or on solid bean medium (80 g commercially available white beans soaked in 110 mL distilled water over night, after decantation the beans were autoclaved) at 21 °C under static conditions for 40 days. As liquid medium a Wickerham medium was prepared as described before.⁴¹ The halogen incorporation experiments were performed on solid rice medium with additional 3.5 % NaCl in two Erlenmeyer flasks, 3.5 % KBr or 3.5 % KI into each Erlenmeyer flask.

4.4. Extraction and isolation

Each fungal culture was extracted two times with 500 mL ethyl acetate. The obtained crude extracts of rice (2.3 g), beans (1.7 g) and Wickerham (0.4 g) medium were analyzed by HPLC and LCMS. Initial purification was performed by partitioning between *n*-hexane and 90 % aqueous MeOH. The MeOH phases of the fungus grown

on rice or on white beans were combined and fractionated using vacuum liquid chromatography (VLC) on silica gel 60 using *n*-hexane/ethyl acetate and DCM/MeOH step gradient elution. Further separation was done using size exclusion chromatography over Sephadex LH 20. Fractions were purified by semi preparative HPLC yielding **1** (4.7 mg), **2** (1.4 mg), **3** (1.3 mg), **4** (9.2 mg), **5** (4.1 mg), **6** (1.1 mg), **7** (39.1 mg), **8** (4.7 mg), **9** (28.8 mg), **10** (3.1 mg). The fungal extract obtained after cultivation on rice medium spiked with 3.5 % NaCl yielded a weight of 2.1 g. The extract was partitioned, fractionated and purified as described above yielding **11** (10.4 mg) and **12** (2.0 mg). The extracts on rice with KBr (0.9 g) and KI (0.3 g) were partitioned as described before and HPLC and mass analysis were performed.

4.4.1. 11'-carboxygymnastatin N (1)

White to Yellow shining solid; $[\alpha]_D^{20}$ - 40.3 (*c* 0.2, ethanol); UV λ_{max} (PDA) 226, 269 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; ESIMS (rel. int.) *m/z* 835.1 [2M+H]⁺ (100), 418.2 [M+H]⁺ (50), 416.4 [M-H]⁻ (100), HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ 418.2221 (calcd. for C₂₃H₃₂NO₆, 418.2224).

4.4.2. Gymnastatin S (2)

Yellow to brown shining solid; $[\alpha]_D^{20}$ - 13.5 (*c* 0.25, methanol); UV λ_{max} (PDA) 227, 268 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 1; ESIMS (rel. int.) *m/z* 723.1 [2M+H]⁺ (100), 362.1 [M+H]⁺ (45), 360.3 [M-H]⁻ (100), 721.1 [2M-H]⁻ (20), HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ 362.1598 (calcd. for C₁₉H₂₄NO₆, 362.1598).

4.4.3. Dankamide (3)

Yellow solid; $[\alpha]_D^{20}$ - 33.1 (*c* 0.2, methanol); UV λ_{max} (PDA) 268 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 2; ESIMS (rel. int.) *m/z* 395.0 [2M+H]⁺ (100), 198.1 [M+H]⁺ (95), 393.2 [2M-H]⁻ (100), 242.3 [M+HCOO]⁻ (80), HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ 198.1127 (calcd. for C₁₀H₁₆NO₃, 198.1125).

4.4.4. Aranorosin-2-methylether (4)

Yellow; $[\alpha]_D^{20}$ - 7.62 (*c* 0.17, CHCl₃); UV λ_{max} (PDA) 268 nm; ¹H and ¹³C NMR, see Table 3; ESIMS (rel. int.) *m/z* 953.2 [2M+2HOCH₃+Na]⁺ (100), 466.3 [M+HOCH₃+H]⁺ (55), 899.1 [2M+HOCH₃+H]⁺ (30), 434.3 [M+H]⁺ (20), 510.2 [M+HOCH₃+HCOO]⁻ (100), 478.6 [M+HCOO]⁻ (40), 432.7 [M-H]⁻ (10), 865.1 [2M-H]⁻; HRESIMS *m/z* [M+H]⁺ 434.2542 (calcd. for C₂₄H₃₆NO₆, 434.2537).

4.5. Marfey's Reaction

Marfey's reaction was carried out to determine the configuration of the tyrosine units of the new compounds **1** and **2** and of known compound **5**. For hydrolysis, 1 mg of each compound was dried, dissolved in 1 mL 6 M HCl under a nitrogen stream and heated for 24 hours at 110 °C. After cooling and evaporating, the residue was dissolved in 50 µL water. 50 µL of this solution was mixed with 100 µL of Marfey's reagent (1-fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-*L*-alanine amide) (0.5 mg in 100 µL acetone) under nitrogen and 20 µL 1 M NaHCO₃ for 1h at 40 °C. After cooling again, 10 µL 2 M HCl was added and mixed. After drying over night, the residue was dissolved in 1 mL methanol and LC-MS measurements

were carried out with authentic *L*- and *DL*-tyrosine (ICN Biomedicals Inc.) at a concentration of 50 mM treated in the same way as described above but lacking the hydrolysis step.

4.6. Bioactivity

Cytotoxicity was tested against the mouse lymphoma cell line L5178Y using a microplate 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay like described before.⁴² A standard concentration of 10 µg/mL of the substances were used. As positive control kahalalide F with IC₅₀ 4.3 µM was used.

Acknowledgement

Supplementary data

Supplementary data (compound characterization, 1D and 2D NMR spectra of new compounds **1 - 4**) associated with this article can be found in the online version, at <http://XXXXXXXXXXXXXXXXXX>

References and notes

1. Tavares-Valente, D.; Baltazar, F.; Moreira, R.; Queiros, O. Cancer cell bioenergetics and pH regulation influence breast cancer cell resistance to paclitaxel and doxorubicin. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2013**, *45* (5), 467-475.
2. Gottesman, M. M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annu. Rev. Med.* **2002**, *53*, 615-627.
3. WHO. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/> **2014**.
4. Schueffler, A.; Anke, T. Fungal natural products in research and development. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (10), 1425-1448.
5. Du, L.; Liu, H. C.; Fu, W.; Li, D. H.; Pan, Q. M.; Zhu, T. J.; Geng, M. Y.; Gu, Q. Q. Unprecedented citrinin trimer tricitinol B functions as a novel topoisomerase IIa inhibitor. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (16), 5796-5810.
6. Yonesu, K.; Ohnuki, T.; Ono, Y.; Takatsu, T.; Nara, F. Ascotricins A and B, novel antagonists of sphingosine-1-phosphate receptor 1 from *Ascotricha chartarum* Berk. SANK 14186. *J. Antibiot.* **2009**, *62* (7), 359-364.
7. Seo, C.; Sohn, J. H.; Oh, H.; Kim, B. Y.; Ahn, J. S. Isolation of the protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory metabolite from the marine-derived fungus *Cosmospora* sp. SF-5060. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (21), 6095-6097.
8. Pelletier, D.; Hafler, D. A. Fingolimod for multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366* (4), 339-347.
9. Fujita, T.; Inoue, K.; Yamamoto, S.; Ikumoto, T.; Sasaki, S.; Toyama, R.; Chiba, K.; Hoshino, Y.; Okumoto, T. Fungal metabolites. 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *J. Antibiot.* **1994**, *47* (2), 208-215.
10. Cantrell, S. A.; Dianese, J. C.; Fell, J.; Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P. Unusual fungal niches. *Mycologia* **2011**, *103* (6), 1161-1174.
11. Baptista-Rosas, R. C.; Hinojosa, A.; Riquelme, M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1111* (1), 35-46.
12. Niknejad, F.; Moshfegh, M.; Najafzadeh, M. J.; Houbraken, J.; Rezaei, S.; Zarrini, G.; Faramarzi, M. A.; Nafissi-Varcheh, N. Halotolerant ability and α-amylase activity of some saltwater fungal isolates. *Iran. J. Pharm. Res.* **2013**, *12* (Suppl. 1), 113-119.
13. Niu, S. W.; Liu, D.; Hu, X. X.; Proksch, P.; Shao, Z. Z.; Lin, W. H. Spiromastixones A-O, antibacterial chlorodepsidones from a deep-sea-derived *Spiromastix* sp. fungus. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (4), 1021-1030.
14. Liu, Y.; Wray, V.; Abdel-Aziz, M. S.; Wang, C. Y.; Lai, D. W.; Proksch, P. Trimeric anthracenes from the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (7), 1734-1738.
15. El Amrani, M.; Lai, D. W.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Siems, K.; Seidel, C.; Schnekenburger, M.; Gaigneaux, A.; Diederich, M.; Feger, D.; Lin, W. H.; Proksch, P. Protein kinase and HDAC inhibitors from the endophytic fungus *Epicoccum nigrum*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (1), 49-56.
16. Schulz, B.; Boyle, C.; Draeger, S.; Rommert, A. K.; Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* **2002**, *106*, 996-1004.
17. Bode, H. B.; Bethe, B.; Hoefs, R.; Zeeck, A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* **2002**, *3* (7), 619-627.
18. Wang, W. J.; Li, D. Y.; Li, Y. C.; Hua, H. M.; Ma, E. L.; Li, Z. L. Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 by the one strain-many compounds strategy. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (6), 1367-1371.
19. Hewage, R. T.; Aree, T.; Mahidol, C.; Ruchirawat, S.; Kittakoop, P. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry* **2014**, In Press.
20. Wang, J.; Ding, W.; Li, C.; Huang, S.; She, Z.; Lin, Y. A new polysubstituted benzaldehyde from the co-culture broth of two marine fungi (strain nos. E33 and K38). *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49* (5), 799-802.
21. Li, C.; Wang, J.; Luo, C.; Ding, W.; Cox, D. G. A new cyclopeptide with antifungal activity from the co-culture broth of two marine mangrove fungi. *Nat. Prod. Res.* **2014**, *28* (9), 616-621.
22. Ola, A. R. B.; Thomy, D.; Lai, D.; Broetz-Oesterheld, 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.
23. Marmann, A.; Aly, A. H.; Lin, W. H.; Wang, B. G.; Proksch, P. Co-cultivation - A powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Mar. Drugs* **2014**, *12* (2), 1043-1065.
24. Wang, X.; Sena Filho, J. G.; Hoover, A. R.; King, J. B.; Ellis, T. K.; Powell, D. R.; Cichewicz, R. H. Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an Atlantic forest soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (5), 942-948.
25. Van der Molen, K. M.; Darveaux, B. A.; Pearce, C. J.; Oberlies, N. H. Chemical epigenetics induce additional secondary metabolites in a filamentous fungus. *Planta Med* **2012**, *78* (11), 165.

26. Bara, R.; Aly, A. H.; Pretsch, A.; Wray, V.; Wang, B. G.; Proksch, P.; Debbab, A. Antibiotically active metabolites from *Talaromyces wortmannii*, an endophyte of *Aloe vera*. *J. Antibiot.* **2013**, *66* (8), 491-493.
27. Hammerschmidt, L.; Debbab, A.; Ngoc, T. D.; Wray, V.; Hemphill, C. P.; Lin, W.; Broetz-Oesterhelt, H.; Kassack, M. U.; Proksch, P.; Aly, A. H. Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*. *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55* (24), 3463-3468.
28. Phoon, C. W.; Somanadhan, B.; Heng, S. C. H.; Ngo, A.; Ng, S. B.; Butler, M. S.; Buss, A. D.; Sim, M. M. Isolation and total synthesis of gymnastatin N, a POLO-like kinase 1 active constituent from the fungus *Arachniotus punctatus*. *Tetrahedron* **2004**, *60* (50), 11619-11628.
29. Cheng, Y. X.; Schneider, B.; Riese, U.; Schubert, B.; Li, Z. Z.; Hamburger, M. Farinosones A-C, neurotrophic alkaloidal metabolites from the entomogenous deuteromycete *Paecilomyces farinosus*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67* (11), 1854-1858.
30. Amagata, T.; Minoura, K.; Numata, A. Gymnastatins F-H, cytostatic metabolites from the sponge-derived fungus *Gymnascella dankaliensis*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (10), 1384-1388.
31. Amagata, T.; Doi, M.; Ohta, T.; Minoura, K.; Numata, A. Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, gymnastatins A-E, from a *Gymnascella* species separated from a *Halichondria* sponge. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1998**, (21), 3585-3599.
32. Vijayakumar, E. K. S.; Roy, K.; Chatterjee, S.; Mukhopadhyay, T.; Bhat, R. G.; Ganguli, B. N. Structure-activity relationships of new aranorosin analogs to antifungal activity. *J. Antibiot.* **1998**, *51* (5), 522-524.
33. Fehlhaber, H. W.; Kogler, H.; Mukhopadhyay, T.; Vijayakumar, E. K. S.; Roy, K.; Rupp, R. H.; Ganguli, B. N. Aranorosin, a novel antibiotic from *Pseudoarachniotus roseus*. II. Structure elucidation. *J. Antibiot.* **1988**, *41* (12), 1785-1794.
34. Roy, K.; Vijayakumar, E. K. S.; Mukhopadhyay, T.; Chatterjee, S.; Bhat, R. G.; Blumbach, J.; Ganguli, B. N. Aranorosinol A and aranorosinol B, 2 new metabolites from *Pseudoarachniotus roseus* - production, isolation, structure elucidation and biological properties. *J. Antibiot.* **1992**, *45* (10), 1592-1598.
35. McKillop, A.; McLaren, L.; Taylor, R. J. K.; Watson, R. J.; Lewis, N. J. The total synthesis of the diepoxycyclohexanone antibiotic aranorosin and novel synthetic analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, (12), 1385-1393.
36. 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.
37. Hoffmann, I.; Jerneřen, F.; Oliw, E. H. Epoxy alcohol synthase of the rice blast fungus represents a novel subfamily of dioxygenase-cytochrome P450 fusion enzymes. *J. Lipid Res.* **2014**, *55* (10), 2113-2123.
38. Ashour, M.; Edrada, R.; Ebel, R.; Wray, V.; Waetjen, W.; Padmakumar, K.; Mueller, W. E. G.; Lin, W. H.; Proksch, P. Kahalalide derivatives from the Indian sacoglossan mollusk *Elysia grandifolia*. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (11), 1547-1553.
39. Kostadinova, N.; Krumova, E.; Tosi, S.; Pasova; Angelova, M. Isolation and identification of filamentous fungi from Island Livingston, Antarctica. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2009**, *23*, 267-270.
40. Kjer, J.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Proksch, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat. Protoc.* **2010**, *5* (3), 479-490.
41. Aly, A. H. Ph.D. Thesis, Novel natural products from endophytic fungi of Egyptian medicinal plants - Chemical and biological characterization. Heinrich-Heine University, Duesseldorf, July **2007**.
42. Kreuter, M. H.; Robitzki, A.; Chang, S.; Steffen, R.; Michaelis, M.; Kljajic, Z.; Bachmann, M.; Schroeder, H. C.; Mueller, W. E. G. Production of the cytostatic agent aerophysinin by the sponge *Verongia aerophoba* in *in vitro* culture. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **1992**, *101* (1), 183-187.

Click here to remove instruction text...

4.4.1. Supporting information of compounds isolated from *Gymnascella dankaliensis*

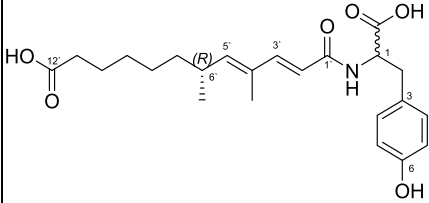
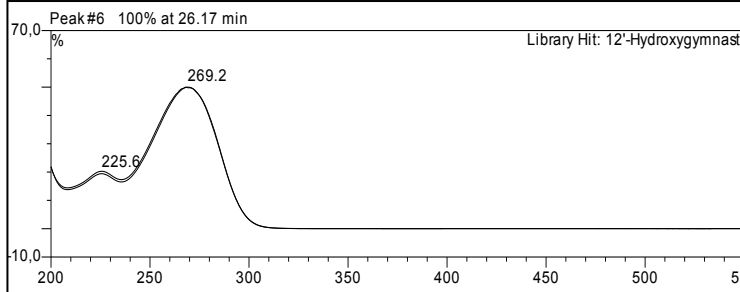
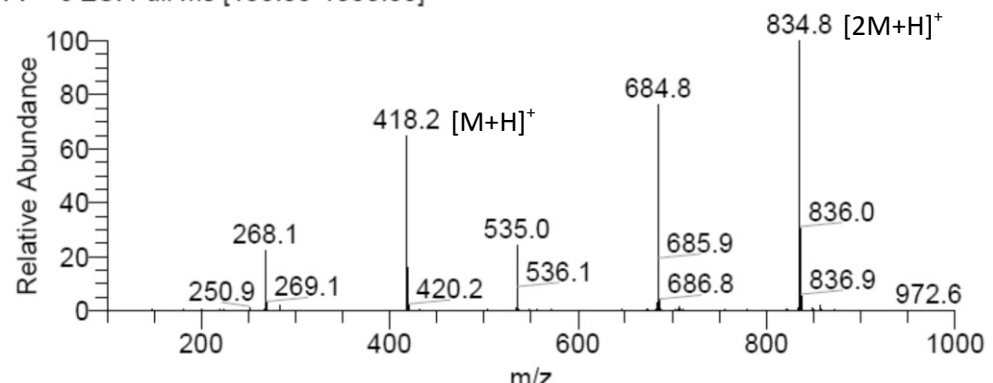
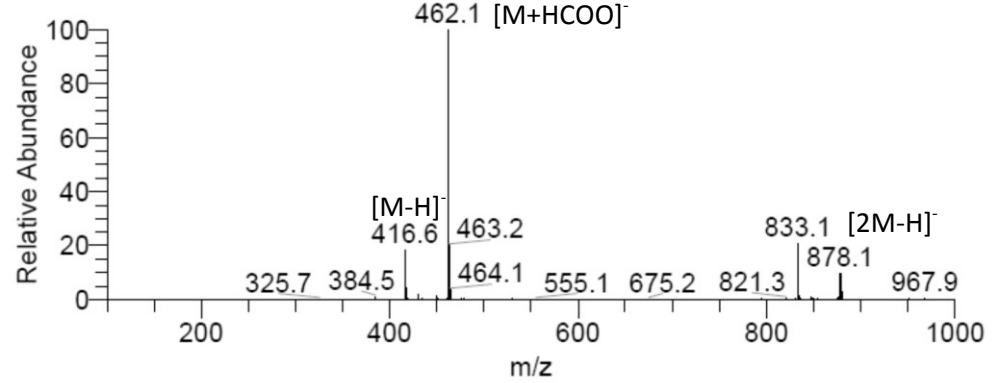
| | |
|--|-----|
| S1. General information of 11'-carboxygymnastatin N (1), including RT, UV and mass spectra. | 143 |
| S1.1. ¹ H NMR spectrum of 11'-carboxygymnastatin N (1) (600 MHz, DMSO). | 144 |
| S1.1.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 5 ppm)..... | 145 |
| S1.1.2. Enlargement of the aromatic region (5 – 10 ppm)..... | 145 |
| S1.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of 11'-carboxygymnastatin N (1) (500 MHz, DMSO)..... | 146 |
| S1.2.1. Enlargements of the aliphatic and aromatic region. | 147 |
| S1.3. HMQC spectrum of 11'-carboxygymnastatin N (1) (600 and 150 MHz, DMSO)..... | 148 |
| S1.4. HMBC spectrum of 11'-carboxygymnastatin N (1) (600 and 150 MHz, DMSO). | 149 |
| S1.4.1. Enlargement of the aliphatic region (5 – 70 ppm)..... | 150 |
| S1.4.2. Enlargement of the aliphatic region (120 – 200 ppm)..... | 150 |
| S1.4.3. Enlargement of the aromatic region (0 – 70 ppm). | 151 |
| S1.4.4. Enlargement of the aromatic region (100 – 180 ppm). | 151 |
| S2. General information of gymnastatin S (2), including RT, UV and mass spectra..... | 152 |
| S2.1. ¹ H NMR spectrum of gymnastatin S (2) (500 MHz, DMSO)..... | 153 |
| S2.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of gymnastatin S (2) (500 MHz, DMSO)..... | 154 |
| S2.2.1 Enlargement of the aliphatic region..... | 155 |
| S2.3. HMBC spectrum of gymnastatin S (2) (600 MHz, DMSO). | 156 |
| S2.3.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 70 ppm)..... | 157 |
| S2.3.2. Enlargement of the aliphatic region (100 – 200 ppm)..... | 157 |
| S2.3.3. Enlargement of the aromatic region (0 – 100 ppm)..... | 158 |
| S2.3.4. Enlargement of the aromatic region (100 – 200 ppm). | 158 |
| S3. General information of dankamide (3), including RT, UV and mass spectra..... | 159 |
| S3.1. ¹ H NMR spectrum of dankamide (3) (500 MHz, DMSO)..... | 160 |
| S3.1.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 5 ppm)..... | 161 |
| S3.1.2. Enlargement of the aromatic region (5 – 13 ppm). | 161 |
| S3.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of dankamide (3) (500 MHz, DMSO)..... | 162 |
| S3.2.1. Enlargement of the aliphatic region..... | 163 |
| S3.3. HMBC spectrum of dankamide (3) (600 and 150 MHz, DMSO)..... | 164 |
| S3.3.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 80 ppm)..... | 165 |
| S3.3.2. Enlargement of the aliphatic region (120 – 200 ppm)..... | 165 |
| S3.3.3. Enlargement of the aromatic region. | 166 |
| S4. General information of aranorosin-2-methylether (4), including RT, UV and mass spectra. | 167 |
| S4.1. ¹ H NMR spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (600 MHz, DMSO)..... | 168 |
| S4.1.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 4.5 ppm)..... | 169 |

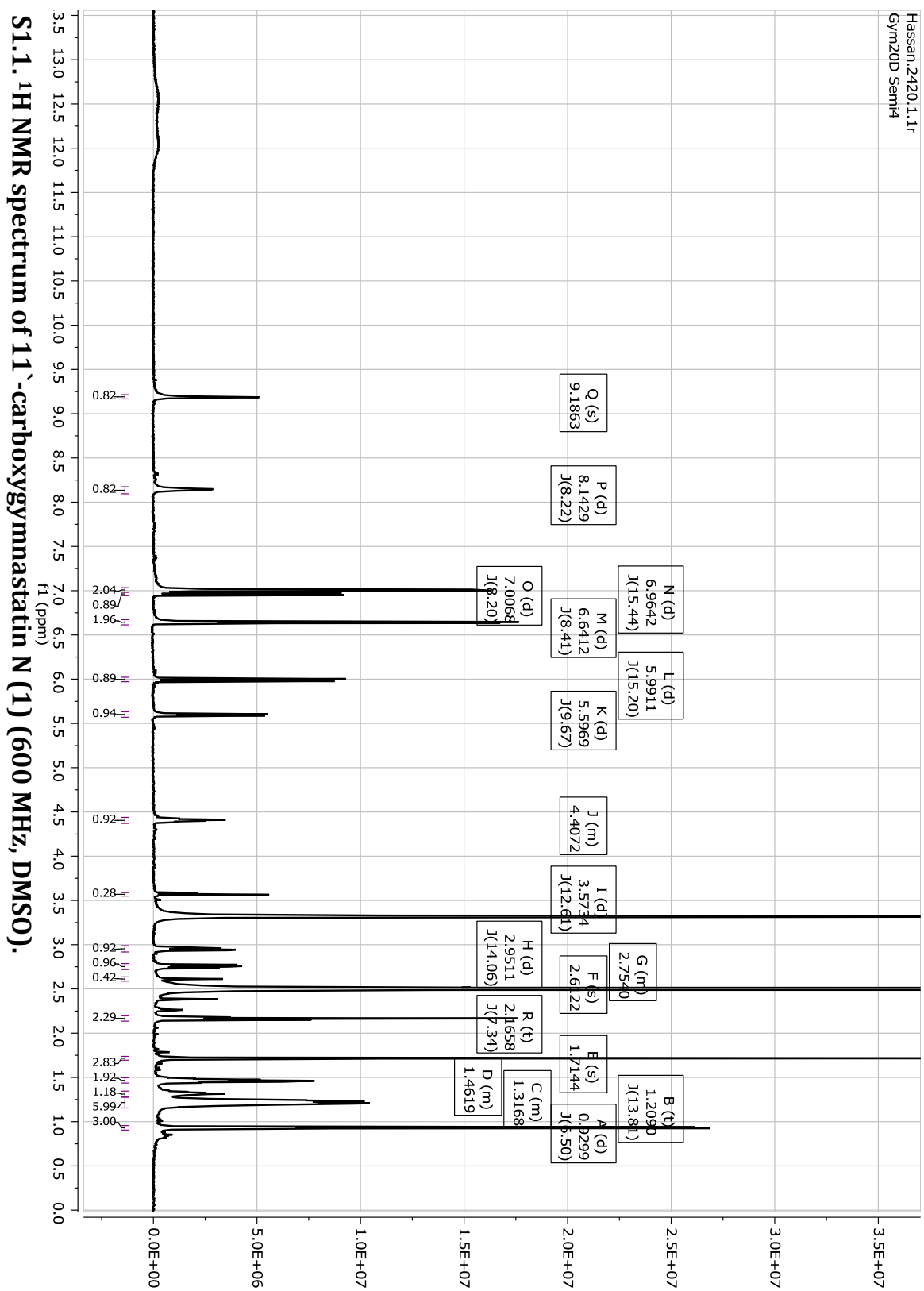
Publikation 4: Supporting Information

| | |
|---|-----|
| S4.1.2. Enlargement of the aromatic region (4.5 – 9 ppm). | 169 |
| S4.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (500 MHz, DMSO). | 170 |
| S4.3. ¹³ C spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (600 MHz, DMSO). | 171 |
| S4.4. HSQC spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (600 MHz, DMSO). | 172 |
| S4.4.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 5 ppm). | 173 |
| S4.5. DEPT spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (600 MHz, DMSO). | 174 |
| S4.6. HMBC spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (600 and 150 MHz, DMSO). | 175 |
| S4.6.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 90 ppm). | 176 |
| S4.6.2. Enlargement of the aliphatic region (100 – 210 ppm). | 176 |
| S4.6.3. Enlargement of the aromatic region (0 – 90 ppm). | 177 |
| S4.6.4. Enlargement of the aromatic region (100 – 210 ppm). | 177 |
| S4.7. ROESY spectrum of aranorosin-2-methylether (4) (600 MHz, DMSO). | 178 |
| S4.7.1. Enlargement (3 – 6 ppm). | 179 |
| S5. General information of 12`-hydroxygymnastatin N (5), including RT, UV and mass spectra. | 180 |
| S5.1. ¹ H NMR spectrum of 12`-hydroxygymnastatin N (5) (500 MHz, DMSO). | 181 |
| S6. General information of farinosone C (6), including RT, UV and mass spectra. | 182 |
| S6.1. ¹ H NMR spectrum of farinosone C (6) (500 MHz, DMSO). | 183 |
| S7. General information of aranorosin (7), including RT, UV and mass spectra. | 184 |
| S7.1. ¹ H NMR spectrum of aranorosin (7) (500 MHz, DMSO). | 185 |
| S8. General information of aranorosinol A (8), including RT, UV and mass spectra. | 186 |
| S8.1. ¹ H NMR spectrum of aranorosinol A (8) (600 MHz, DMSO). | 187 |
| S9. General information of aranorosinol B (9), including RT, UV and mass spectra. | 188 |
| S9.1. ¹ H NMR spectrum of aranorosinol B (9) (600 MHz, DMSO). | 189 |
| S10. General information of gymnamide (10), including RT, UV and mass spectra. | 190 |
| S10.1. ¹ H NMR spectrum of gymnamide (10) (500 MHz, DMSO). | 191 |
| S11. General information of gymnastatin A (11), including RT, UV and mass spectra. | 192 |
| S11.1. ¹ H NMR spectrum of gymnastatin A (11) (600 MHz, DMSO). | 193 |
| S12. General information of gymnastatin B (12), including RT, UV and mass spectra. | 194 |
| S12.1. ¹ H NMR spectrum of gymnastatin B (12) (500 MHz, CHCl ₃). | 195 |
| S12.2. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of gymnastatin B (12) (500 MHz, CHCl ₃). | 196 |

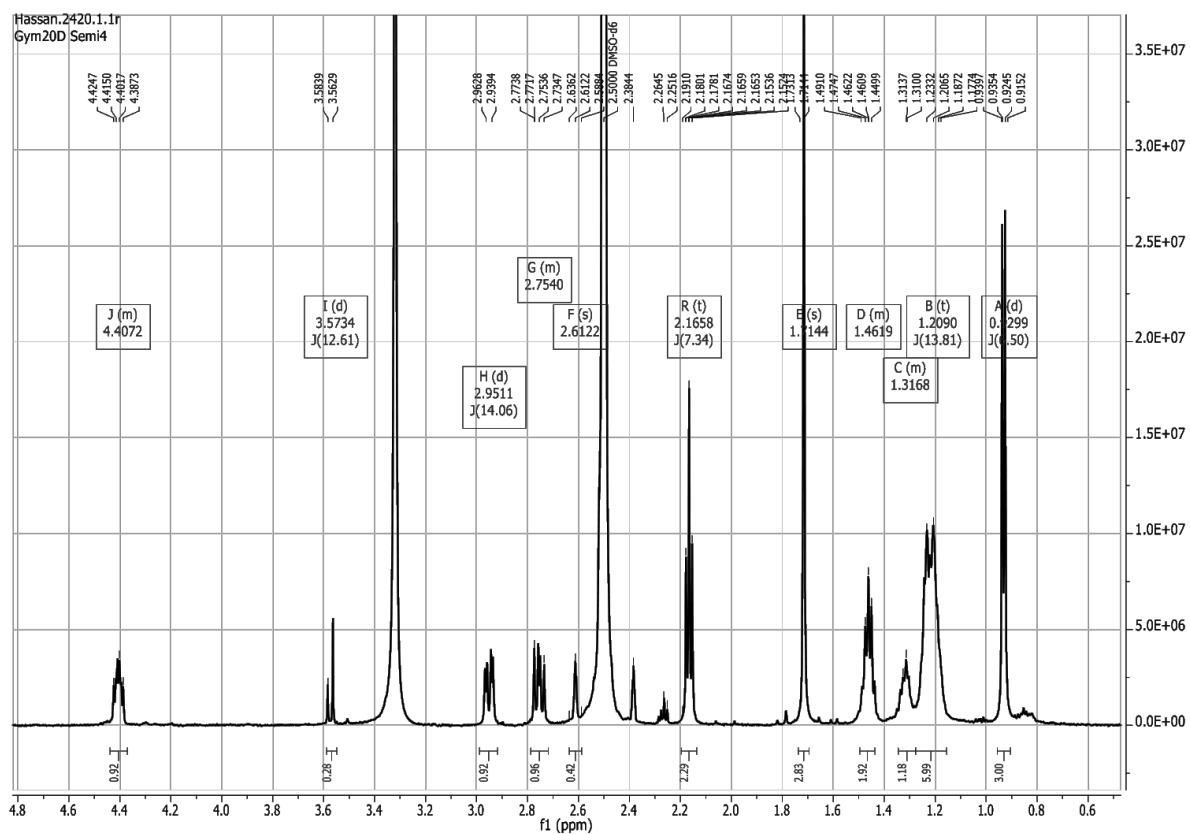
Publikation 4: Supporting Information

S1. General information of 11'-carboxygymnastatin N (1), including RT, UV and mass spectra.

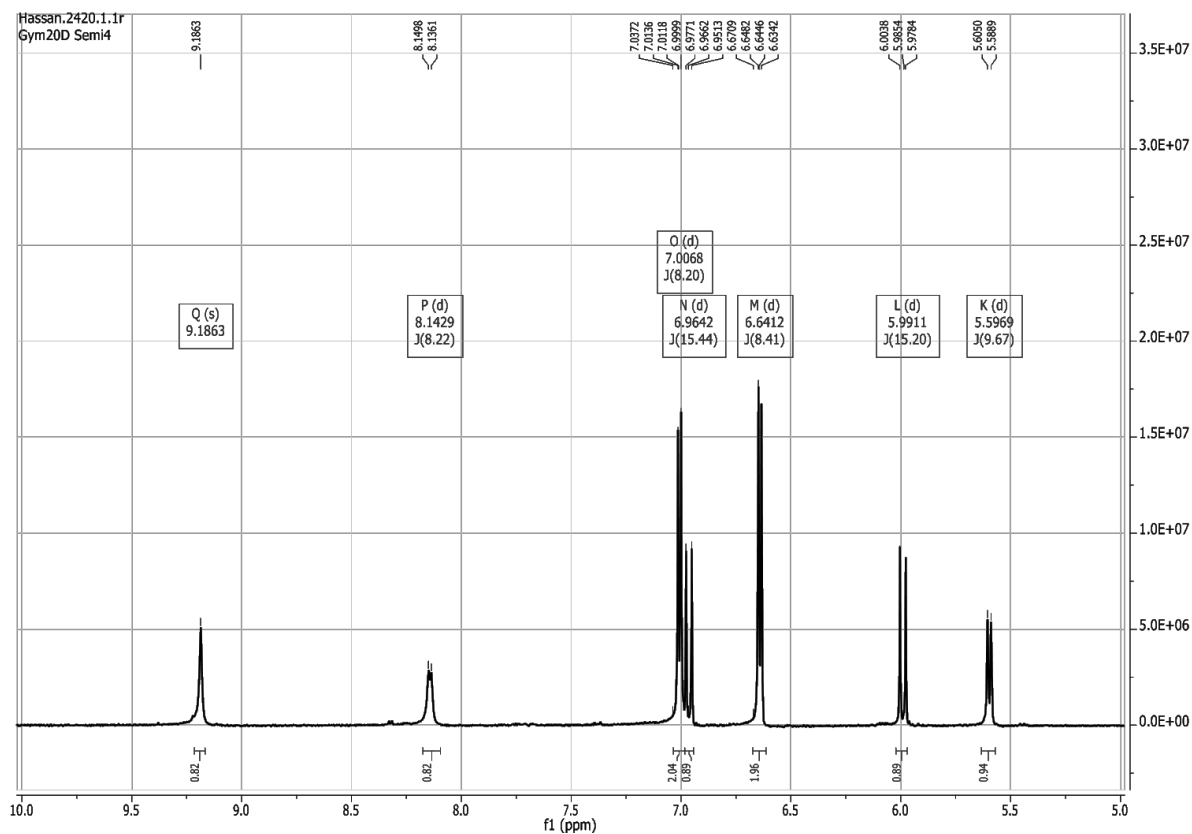
| 11'-carboxygymnastatin N | |
|---|---|
| Synonym(s) | (7 <i>R</i> ,8 <i>E</i> ,10 <i>E</i>)-12-((1-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)amino)-7,9-dimethyl-12-oxododeca-8,10-dienoic acid |
| Samples code | FF7-5-3, GymV20DCM Semi4, Salz V11-5 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 3 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₃ H ₃₁ NO ₆ |
| Molecular weight | 417 g/mol (418.2221, calcd. for C ₂₃ H ₃₂ NO ₆ 418.2224) |
| OR [α] _D ²⁰ | -40.3° (c 0.2, EtOH) |
| Retention time (HPLC) | 26 min |
|  | <p>UV</p>  |
| MS | <p>lena286 #901 RT: 24.97 AV: 1 NL: 2.29E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena286 #899 RT: 24.92 AV: 1 NL: 3.06E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



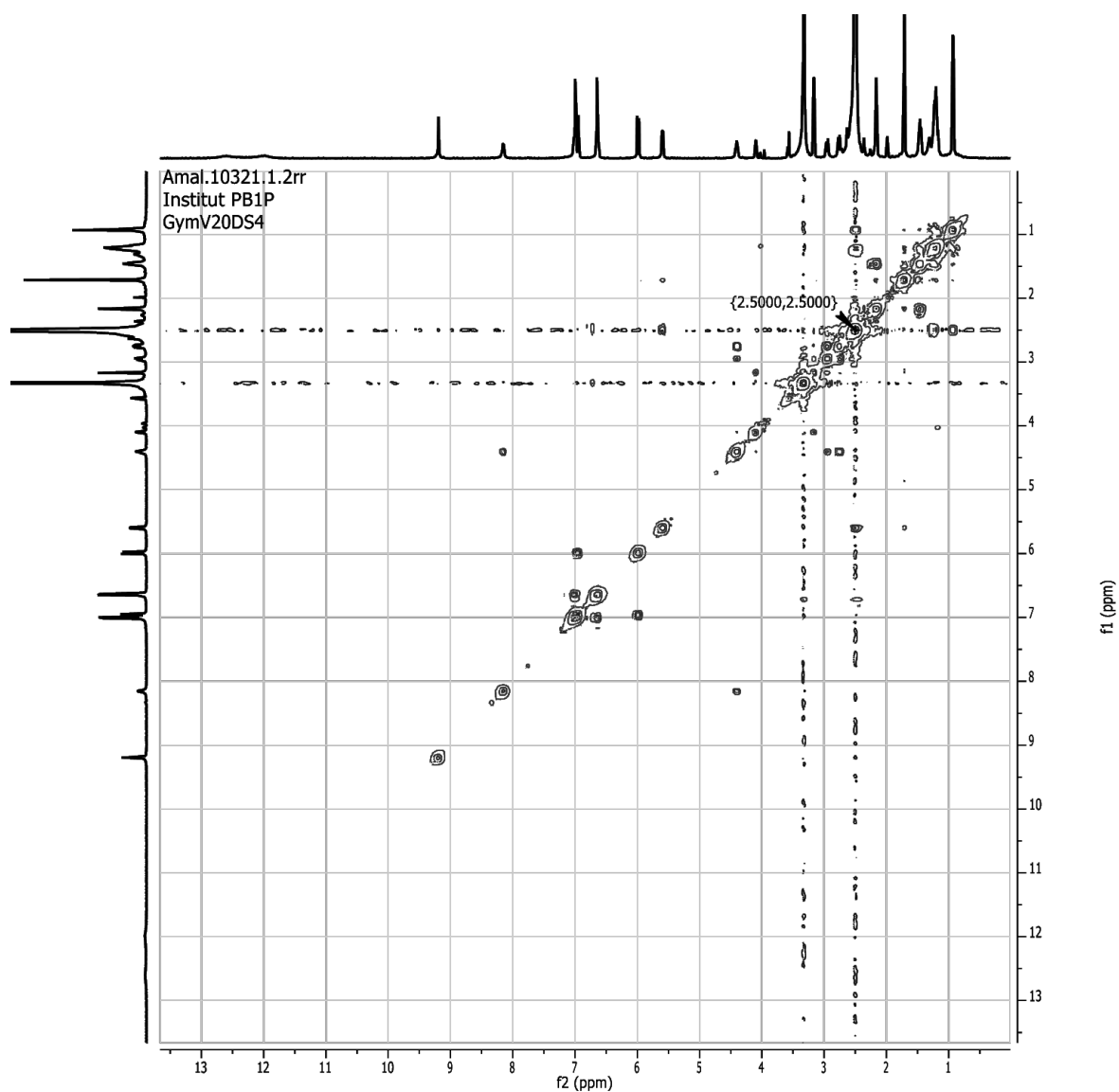
Publikation 4: Supporting Information



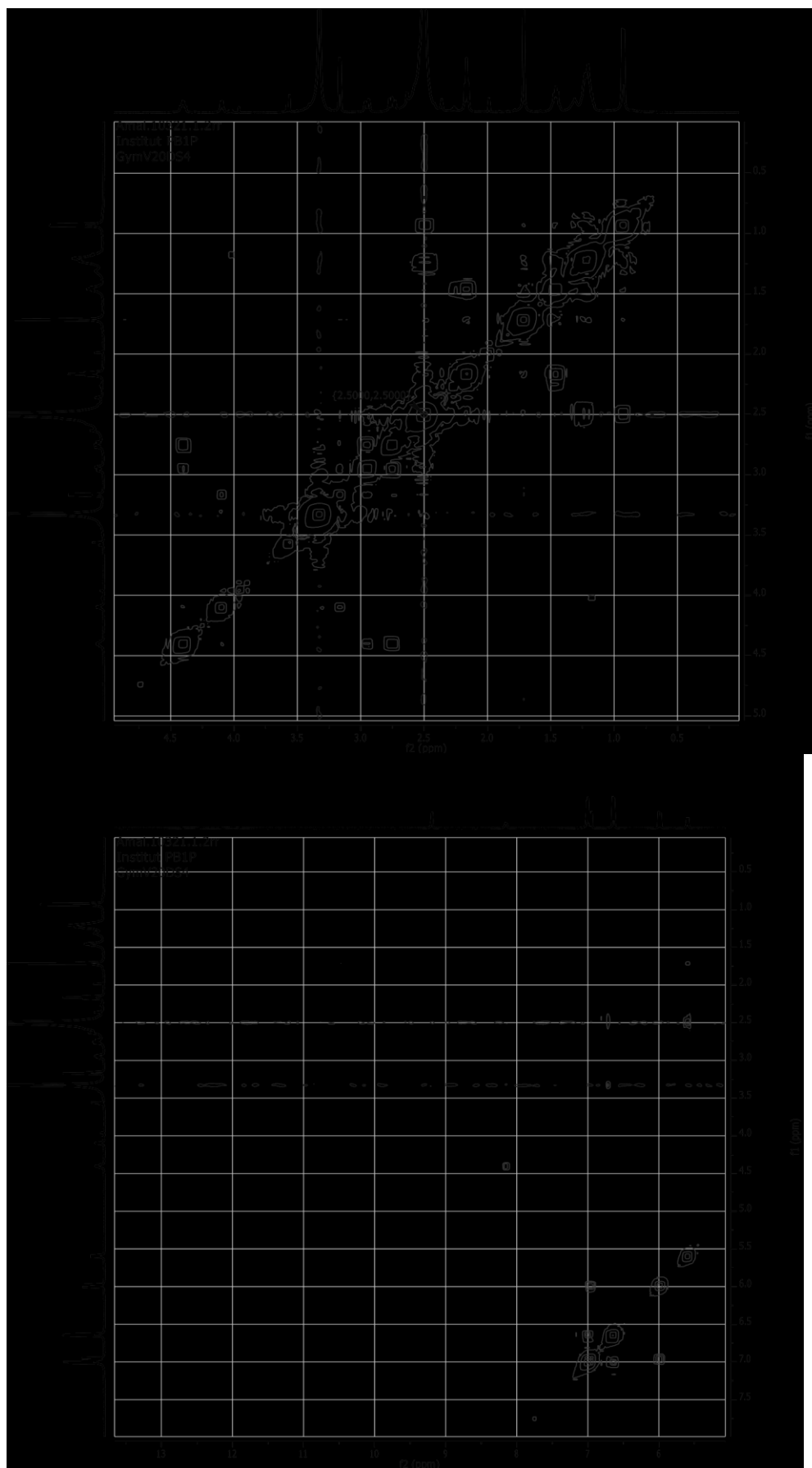
S1.1.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 5 ppm).



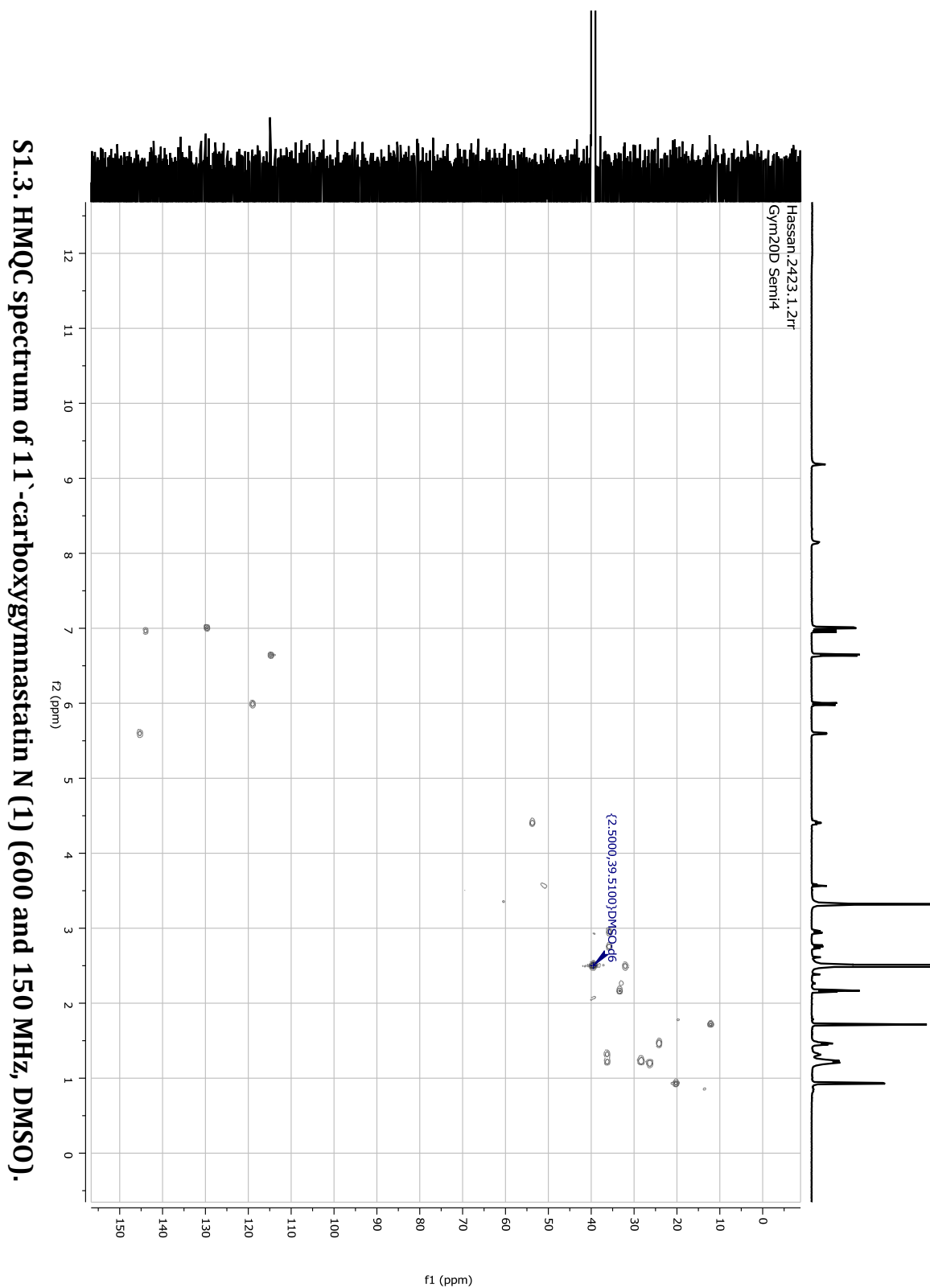
S1.1.2. Enlargement of the aromatic region (5 - 10 ppm).

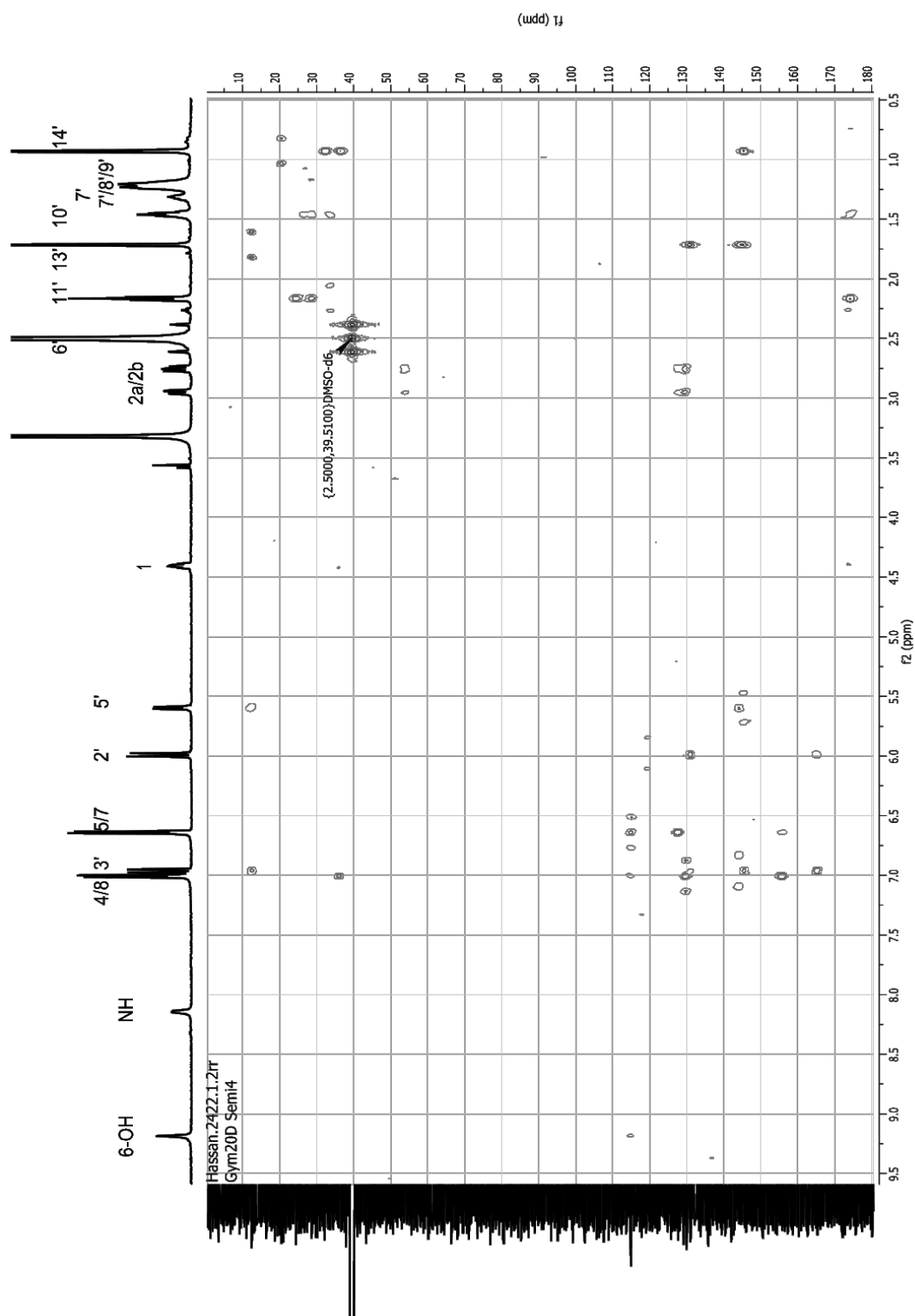


S1.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of 11'-carboxygymnastatin N (1) (500 MHz, DMSO).



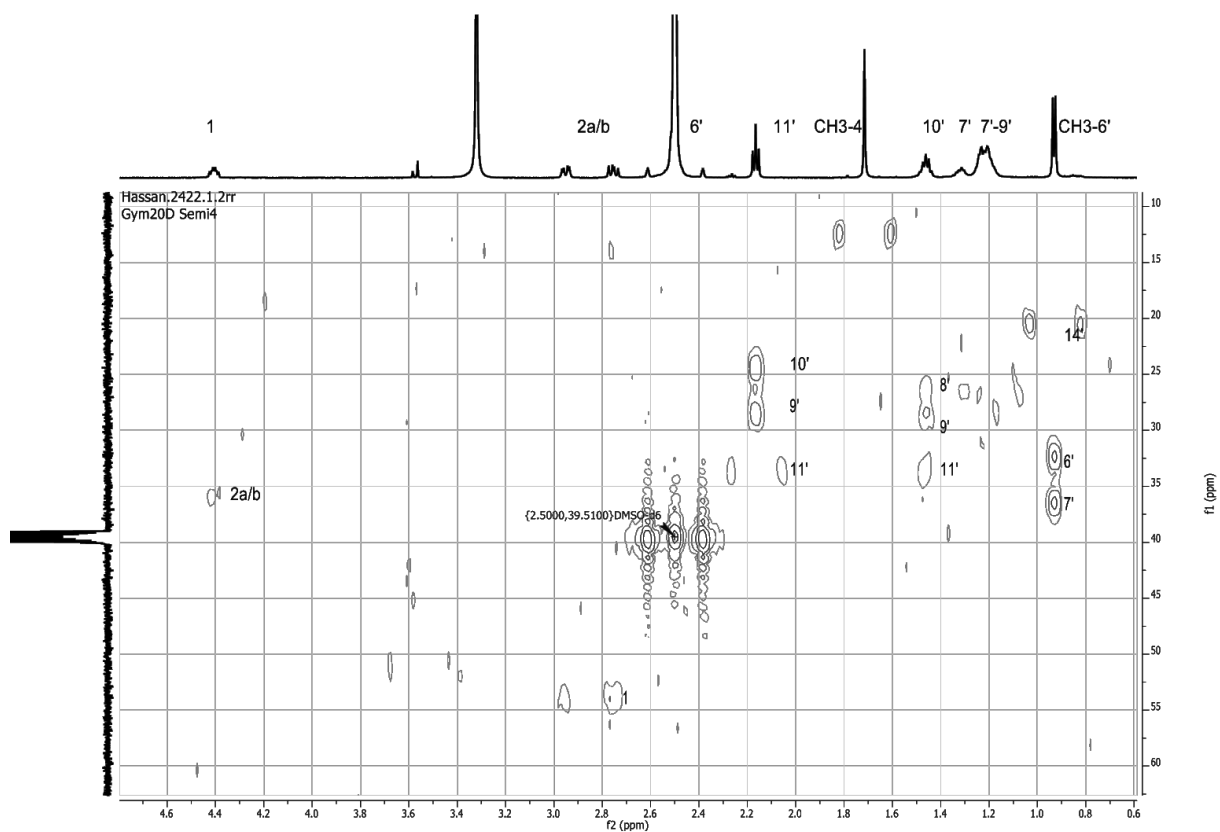
S1.2.1. Enlargements of the aliphatic and aromatic region.



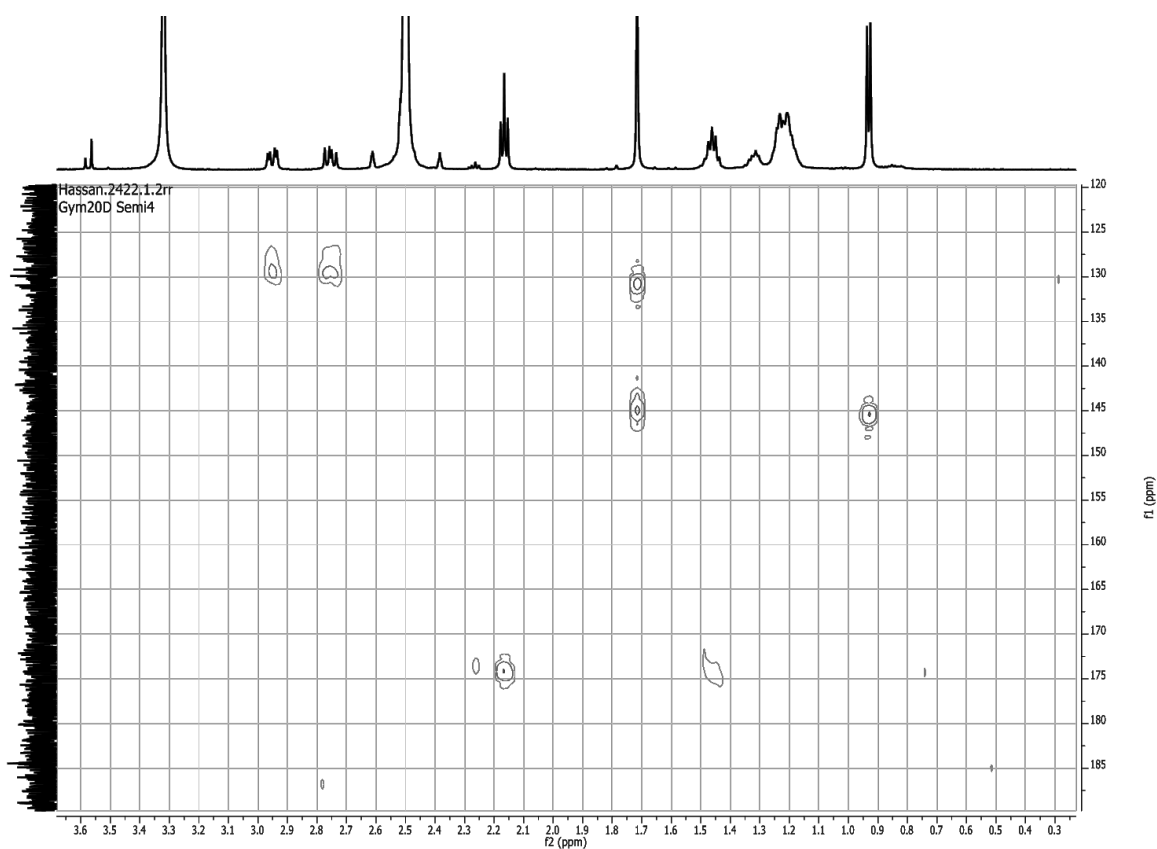


S1.4. HMBC spectrum of 11'-carboxygymnastatin N (1) (600 and 150 MHz, DMSO).

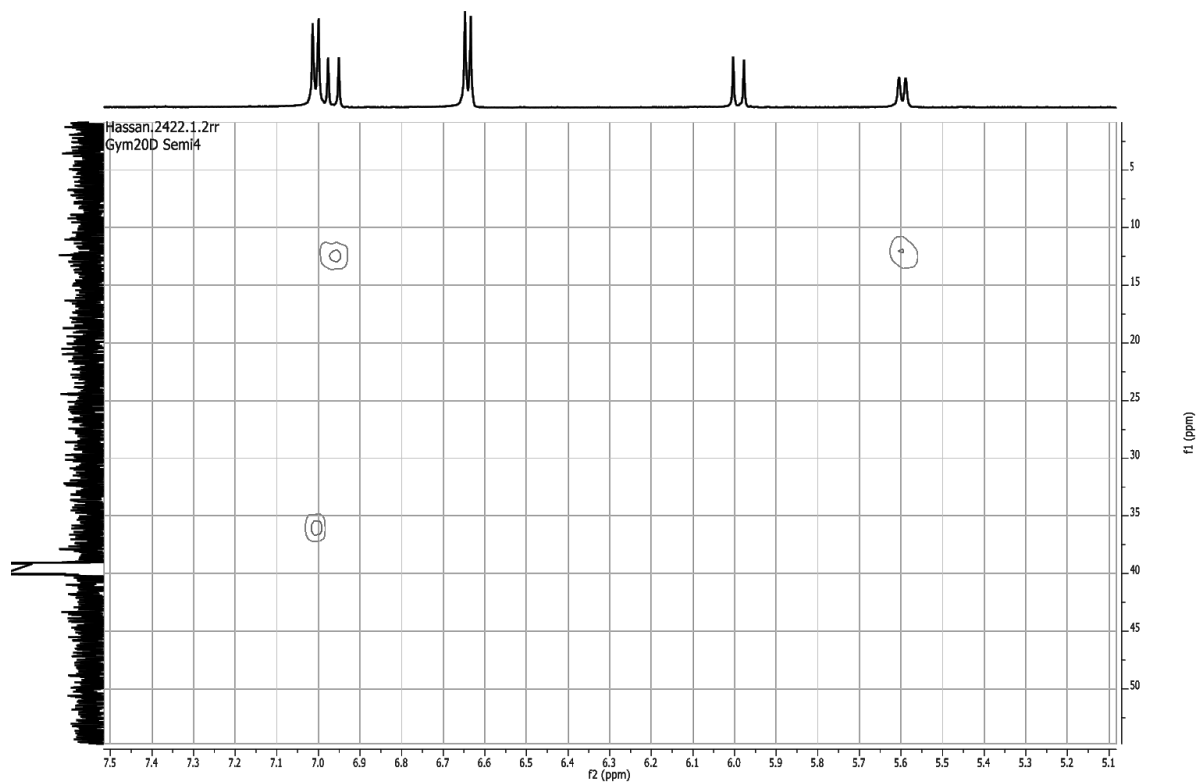
Publikation 4: Supporting Information



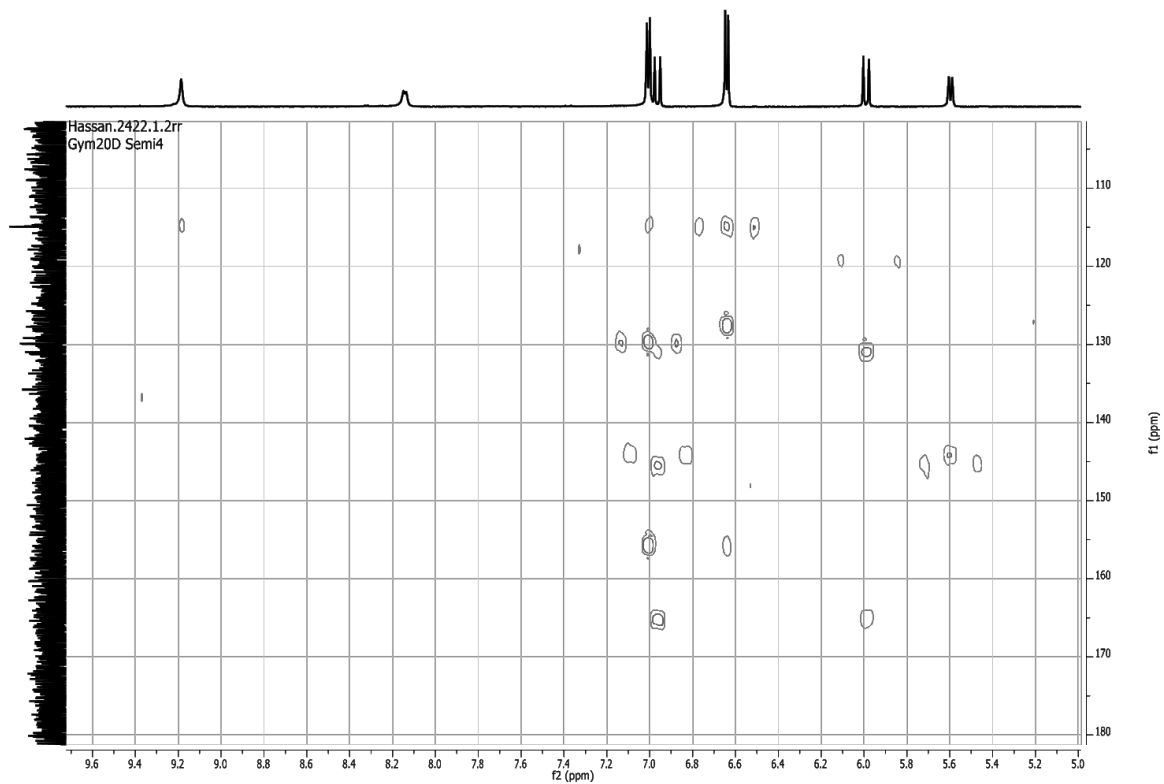
S1.4.1. Enlargement of the aliphatic region (5 - 70 ppm).



S1.4.2. Enlargement of the aliphatic region (120 - 200 ppm).



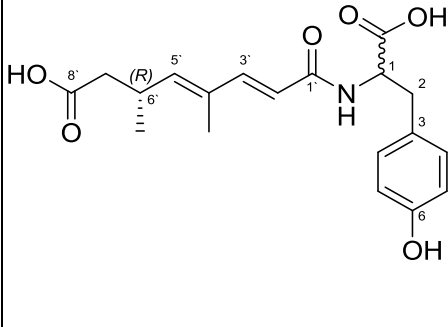
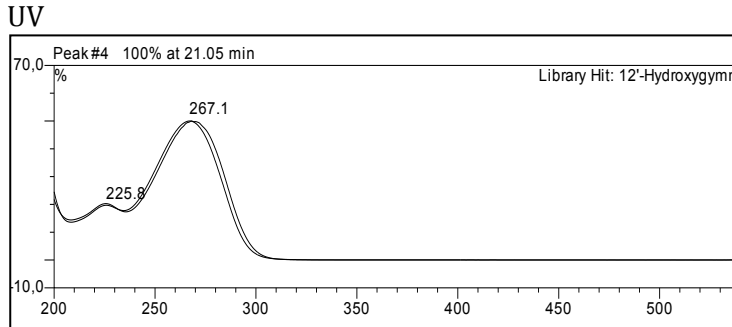
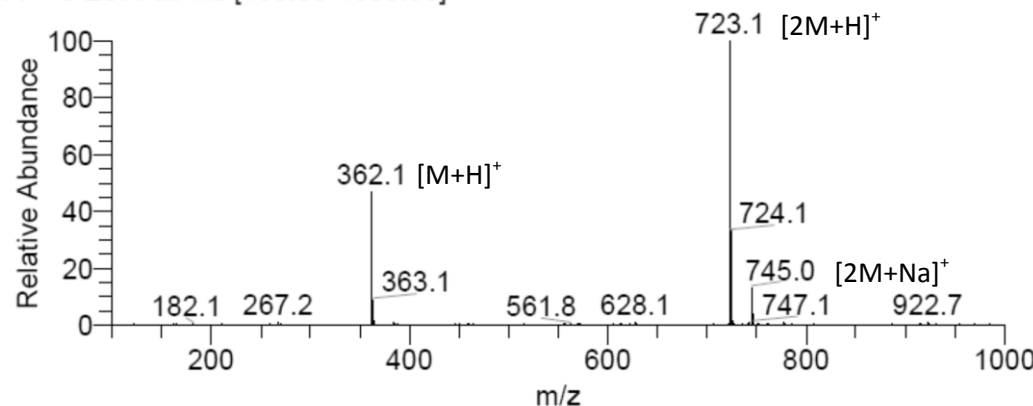
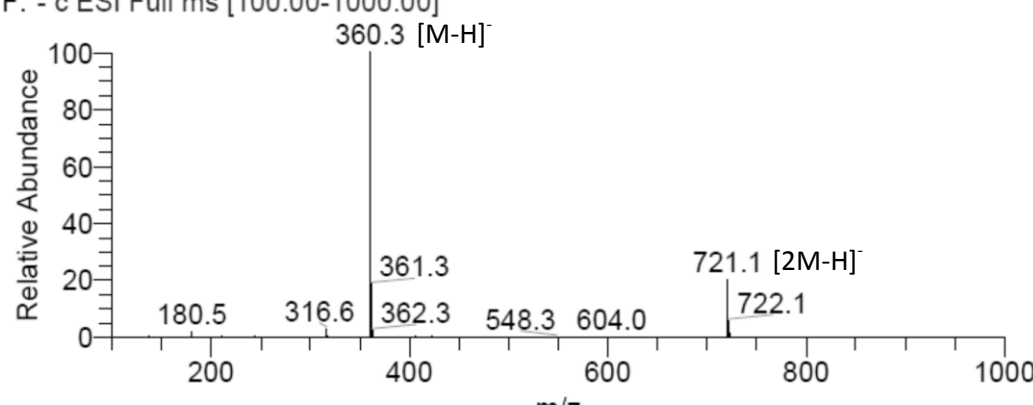
S1.4.3. Enlargement of the aromatic region (0 – 70 ppm).

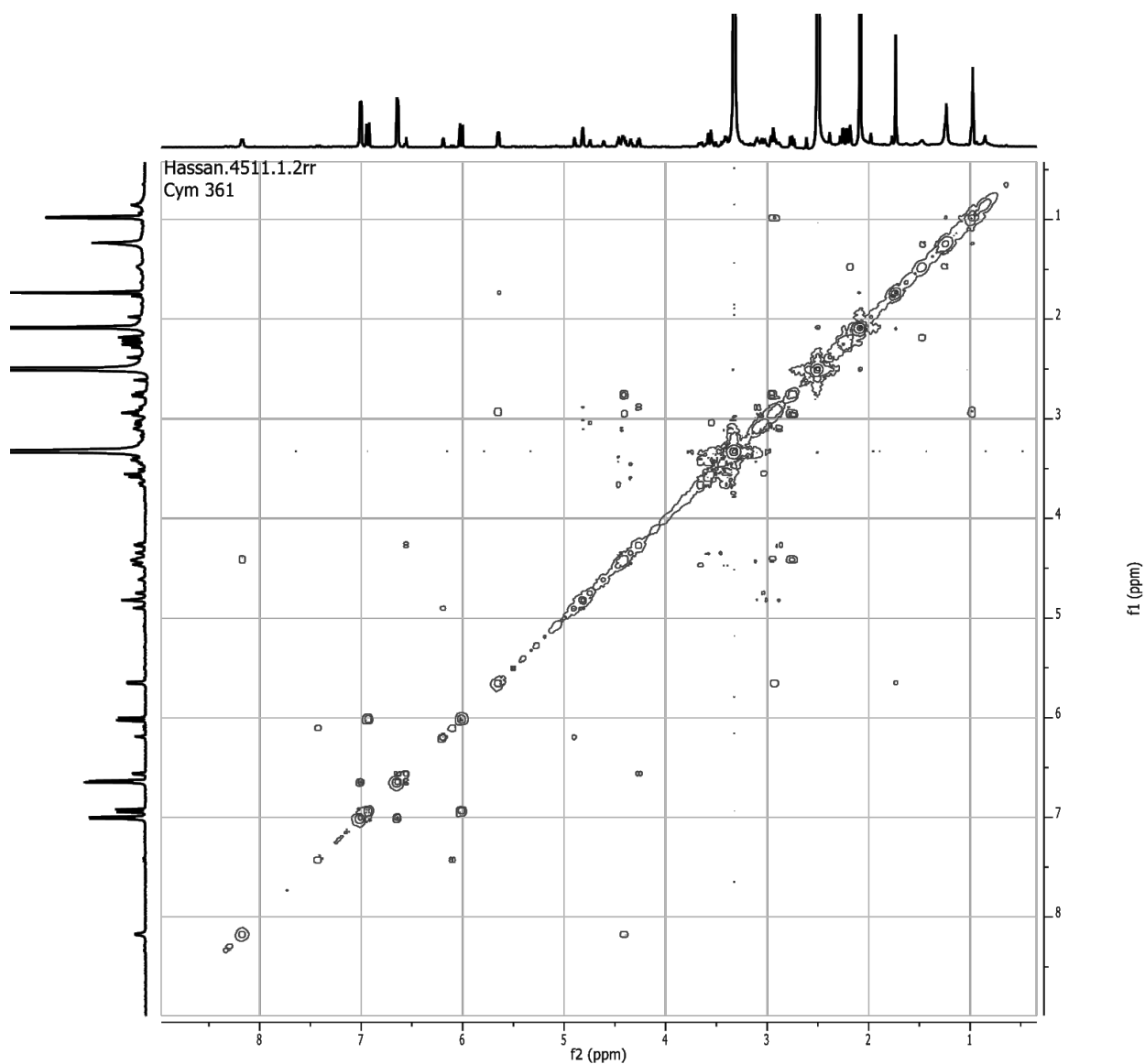


S1.4.4. Enlargement of the aromatic region (100 – 180 ppm).

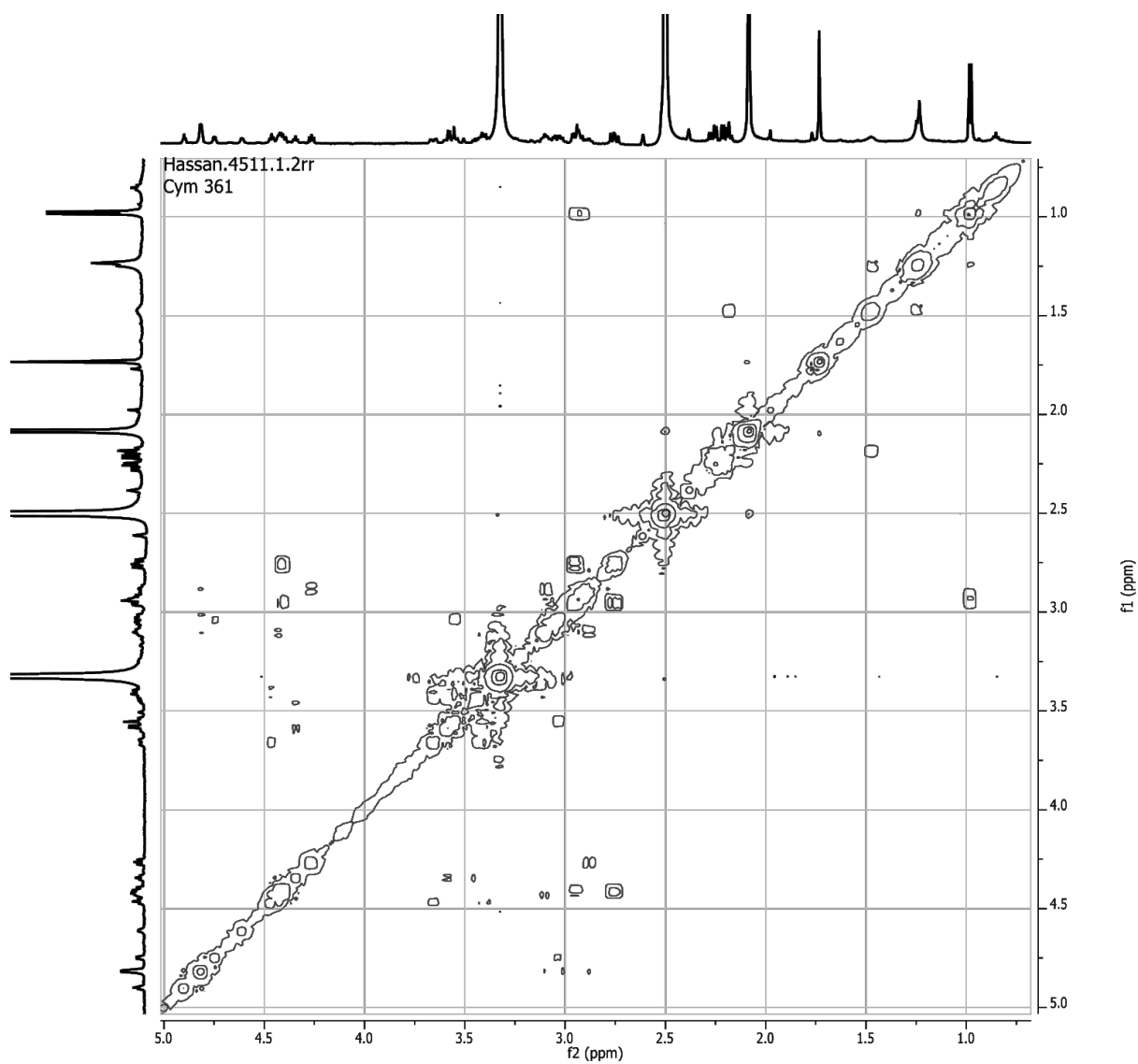
Publikation 4: Supporting Information

S2. General information of gymnastatin S (2), including RT, UV and mass spectra.

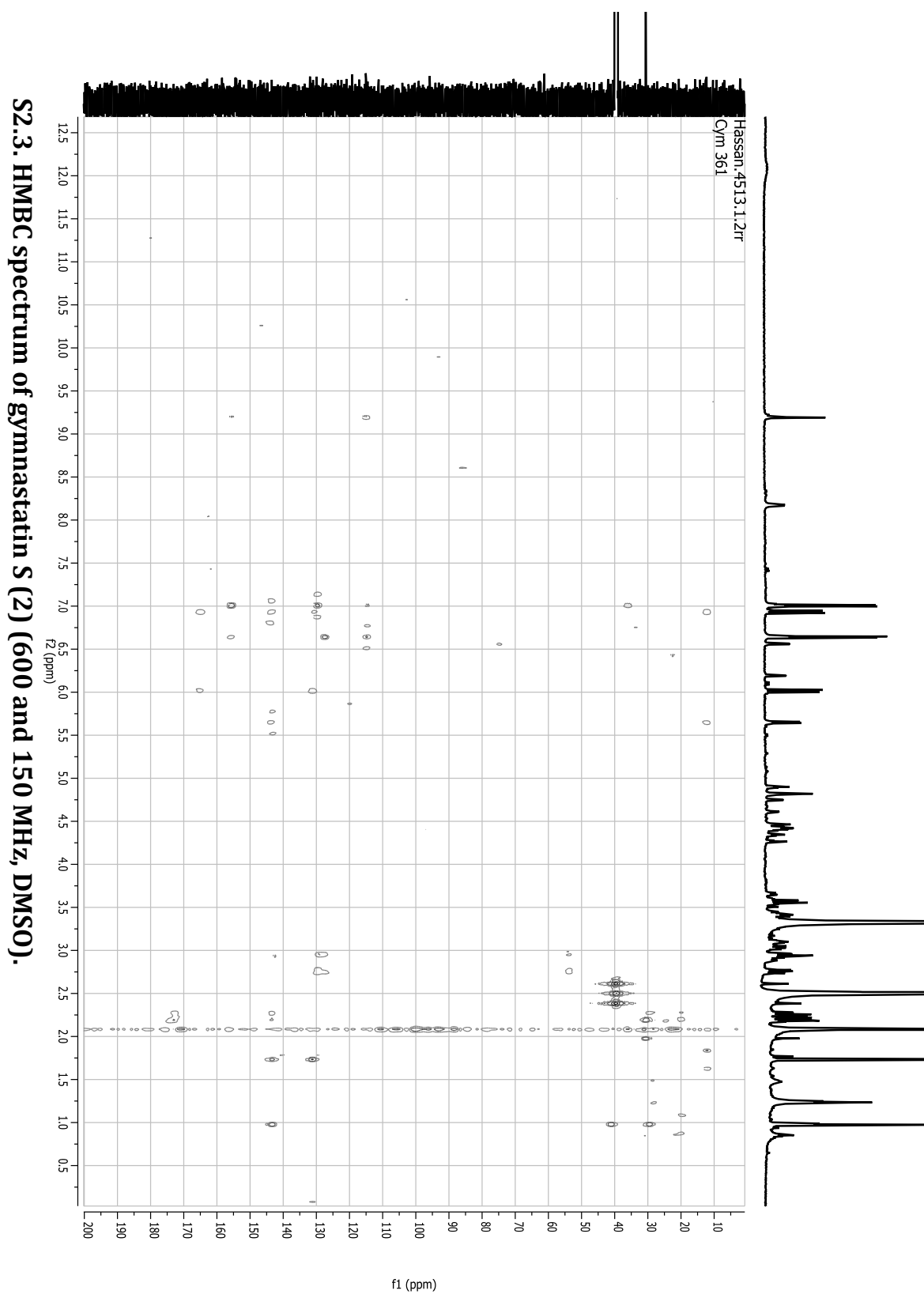
| Gymnastatin S | |
|--|---|
| Synonym(s) Samples code Biological source Sample amount Physical description Molecular formula Molecular weight OR $[\alpha]_D^{20}$ Retention time (HPLC) | (3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-8-((1-carboxy-2-(4-hydroxyphenyl)ethyl)amino)-3,5-dimethyl-8-oxoocta-4,6-dienoic acid Gym V20DCM Semi1, Salz V11-1 <i>Gymnascella dankaliensis</i> 2 mg White to yellow shining solid $C_{19}H_{23}NO_6$ 361 g/mol (362.1598, calcd. for $C_{19}H_{24}NO_6$ 362.1598) -13.5° (c 0.25, MeOH) 21 min |
|  | UV  |
| MS | <p>Lena349 #739 RT: 20.80 AV: 1 NL: 2.50E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena349 #737 RT: 20.76 AV: 1 NL: 3.71E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

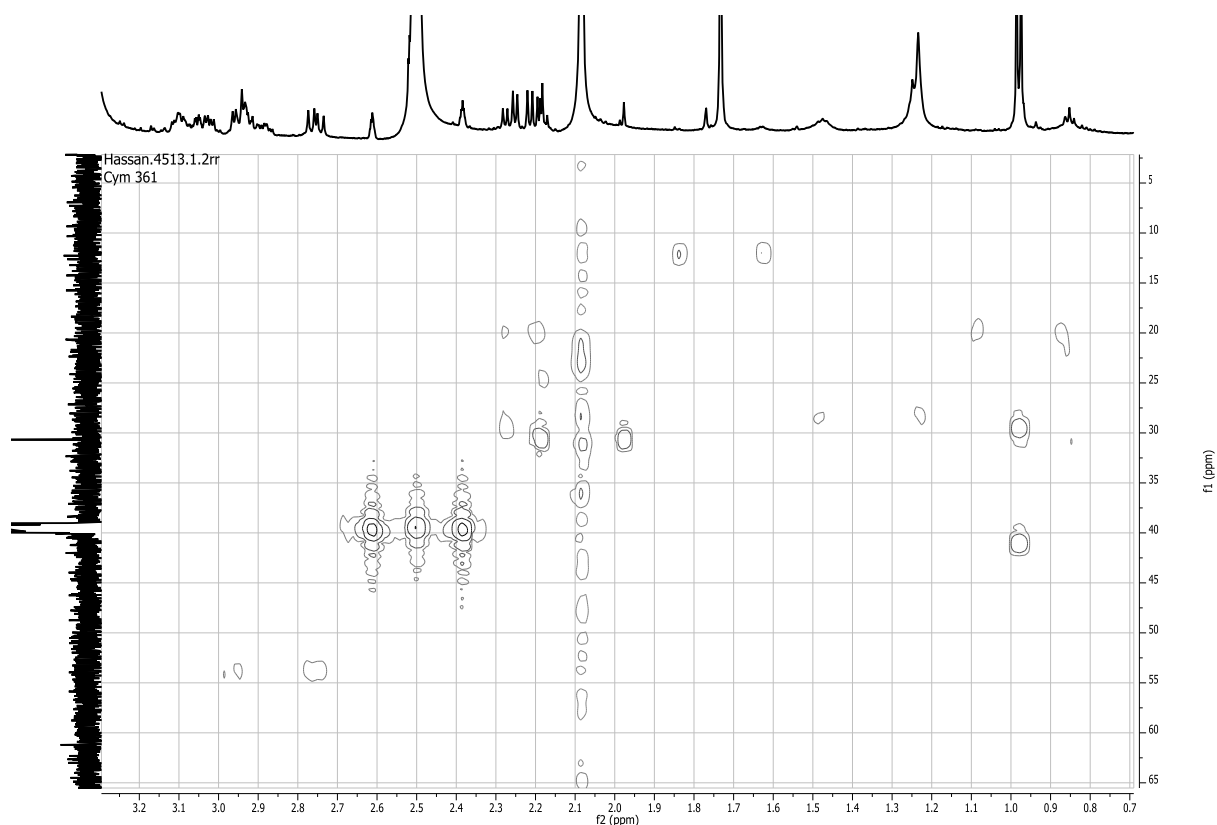


S2.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of gymnastatin S (2) (500 MHz, DMSO).

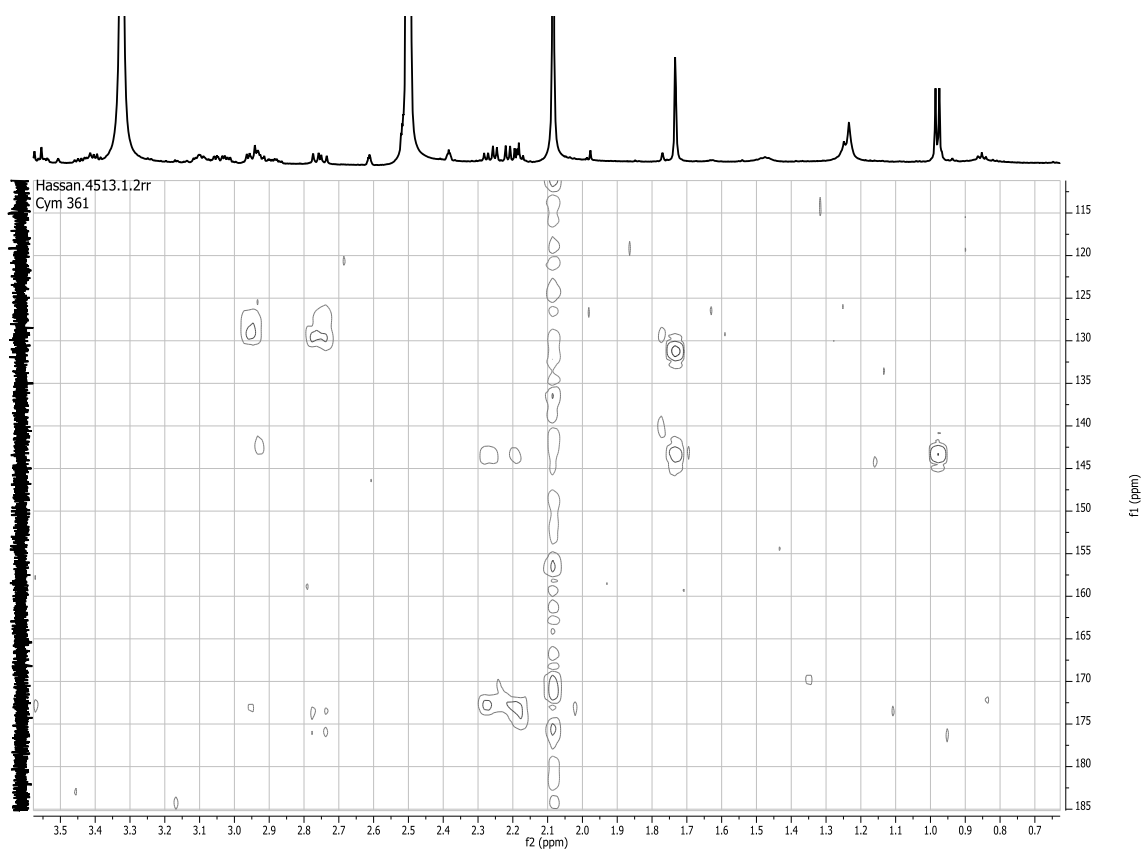


S2.2.1 Enlargement of the aliphatic region.

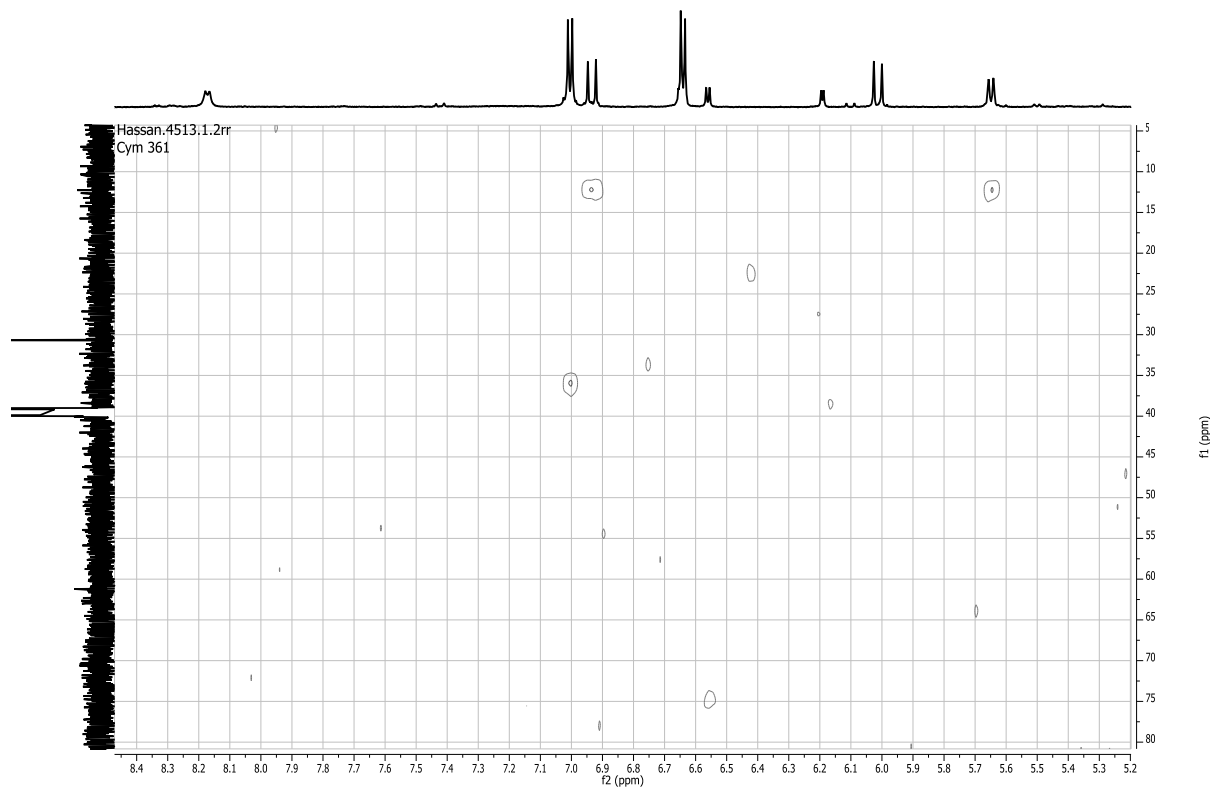




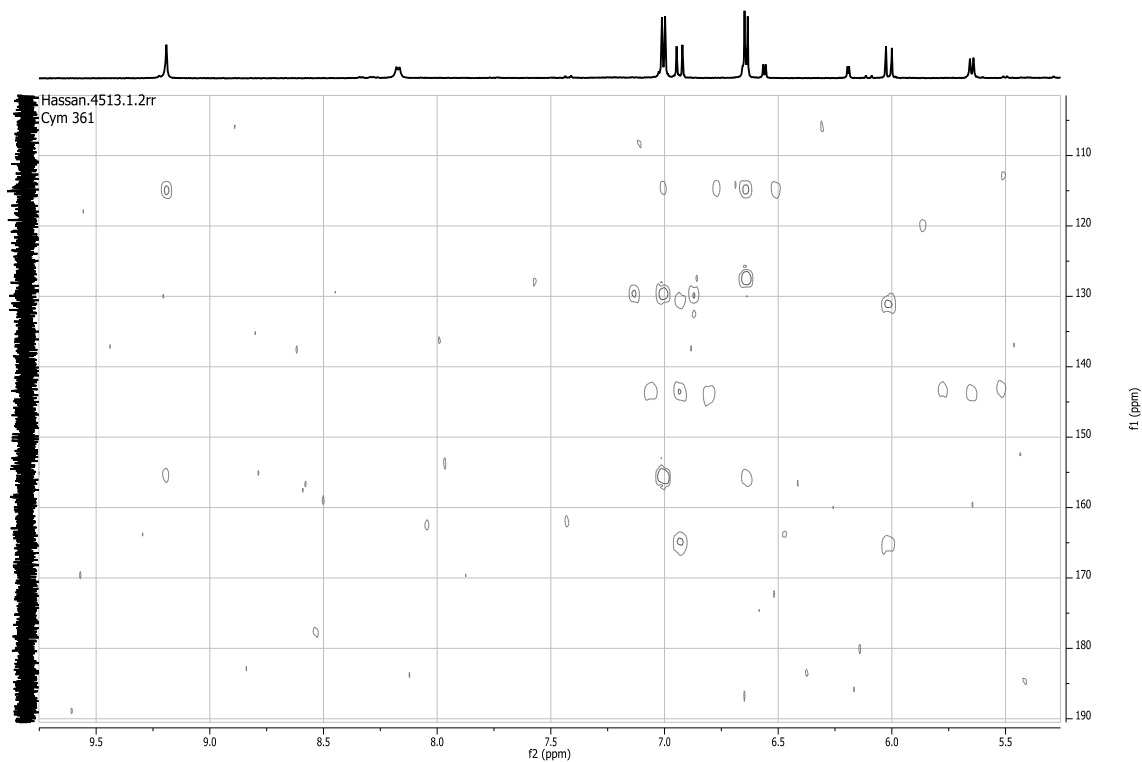
S2.3.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 70 ppm).



S2.3.2. Enlargement of the aliphatic region (100 - 200 ppm).



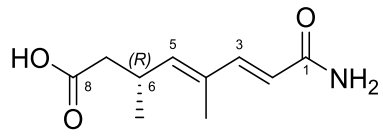
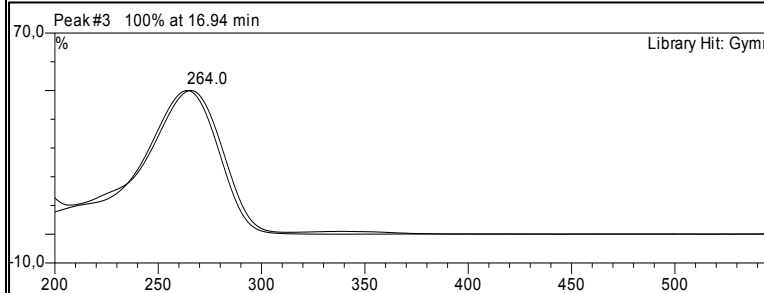
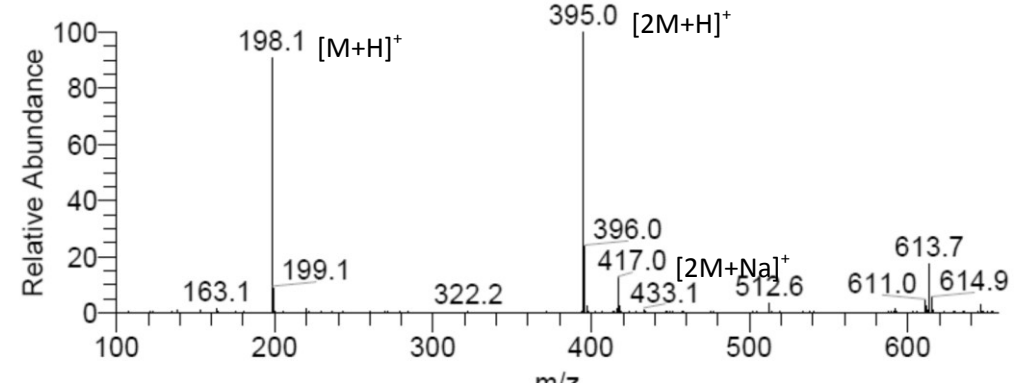
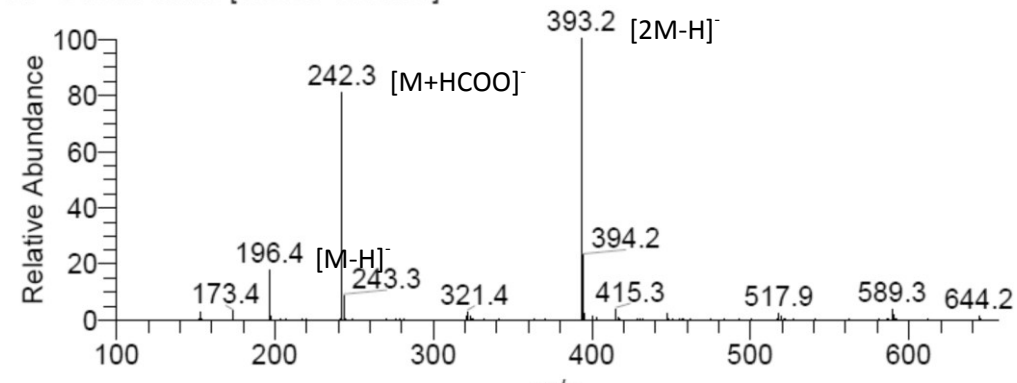
S2.3.3. Enlargement of the aromatic region (0 – 100 ppm).

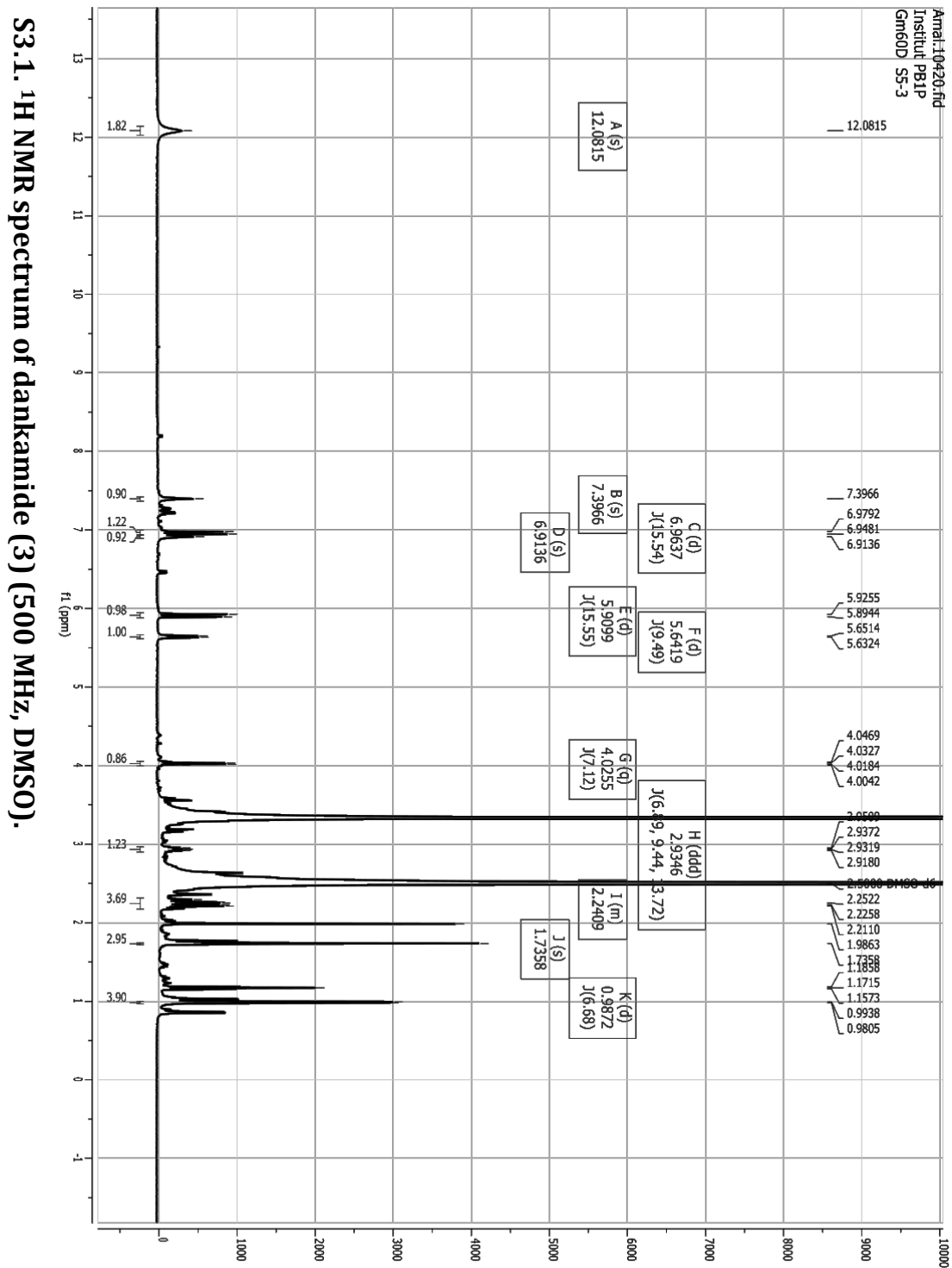


S2.3.4. Enlargement of the aromatic region (100 – 200 ppm).

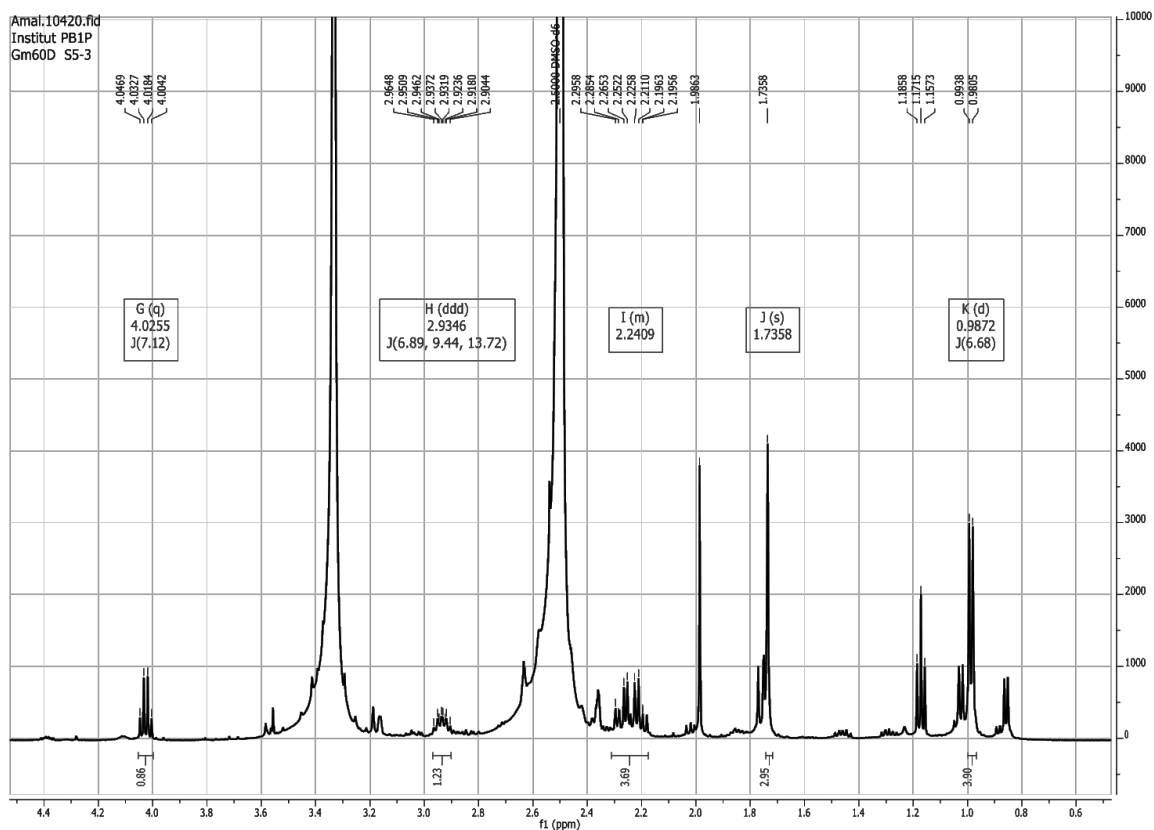
Publikation 4: Supporting Information

S3. General information of dankamide (3), including RT, UV and mass spectra.

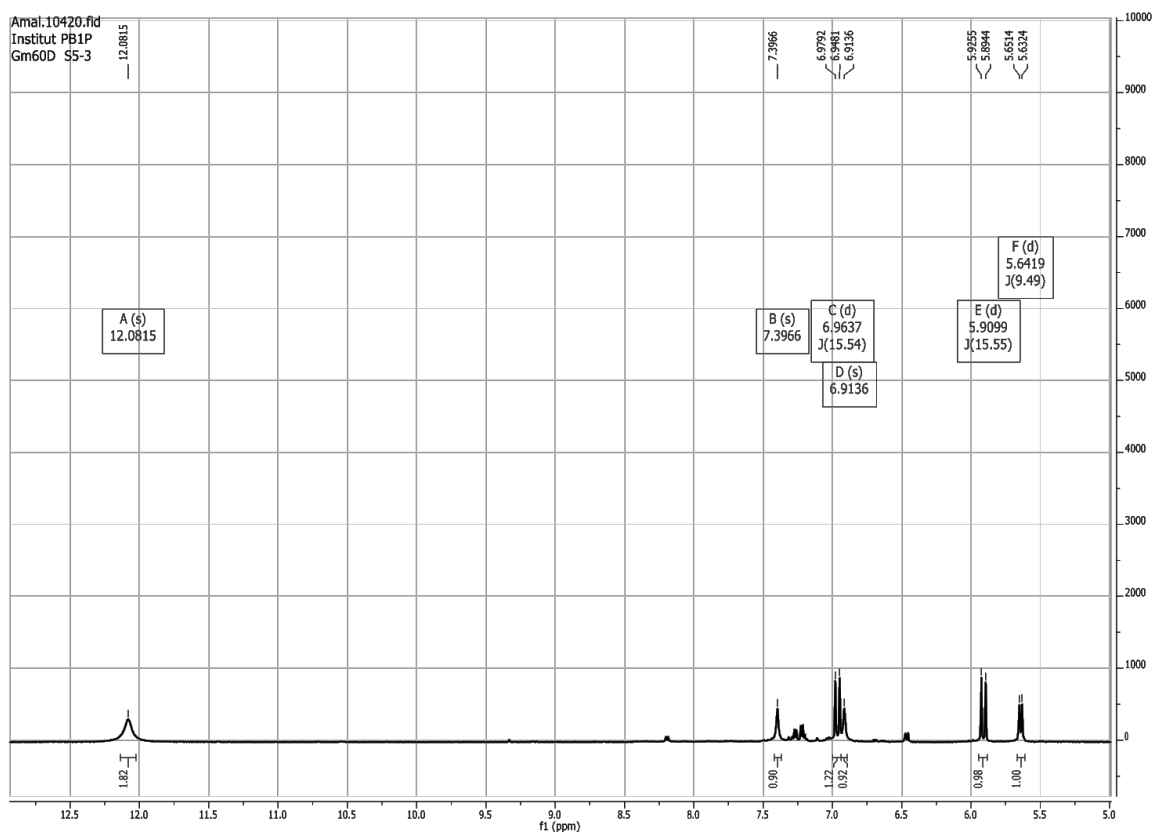
| Dankamide | |
|---|---|
| Synonym(s) | (3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-8-amino-3,5-dimethyl-8-oxoocta-4,6-dienoic acid |
| Samples code | Gym V60DCM S5-3; Salz H2O S5-2 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 1.3 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₁₀ H ₁₅ NO ₃ |
| Molecular weight | 197 g/mol (198.1127 calcd. for C ₁₀ H ₁₆ NO ₃ 198.1125) |
| OR [α] _D ²⁰ | -33.1° (c 0.2, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 17 min |
|  | <div style="text-align: center;">UV</div>  |
| MS | <p>Lena365 #685 RT: 18.17 AV: 1 NL: 2.59E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena365 #683 RT: 18.12 AV: 1 NL: 8.43E6 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



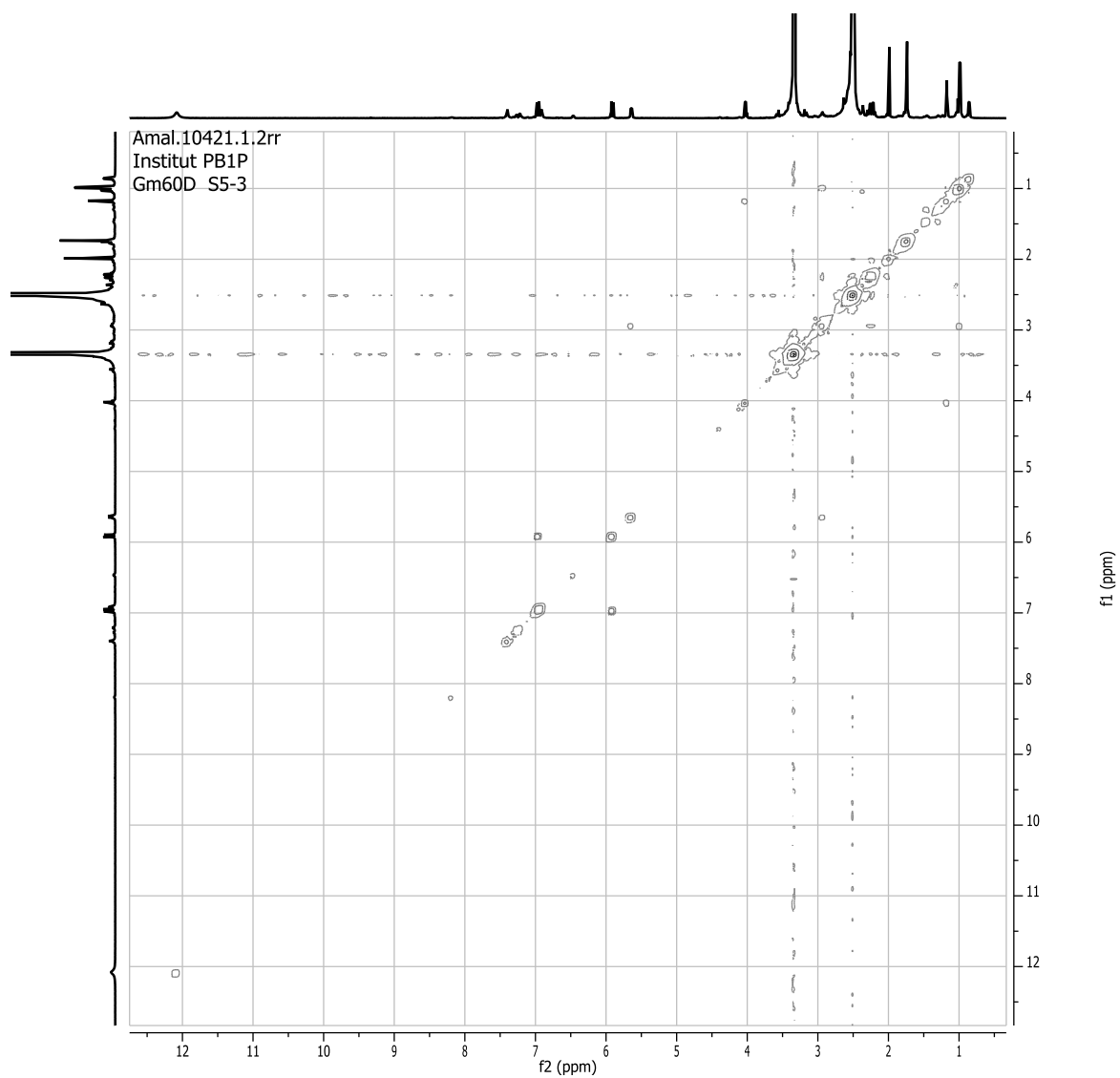
Publikation 4: Supporting Information



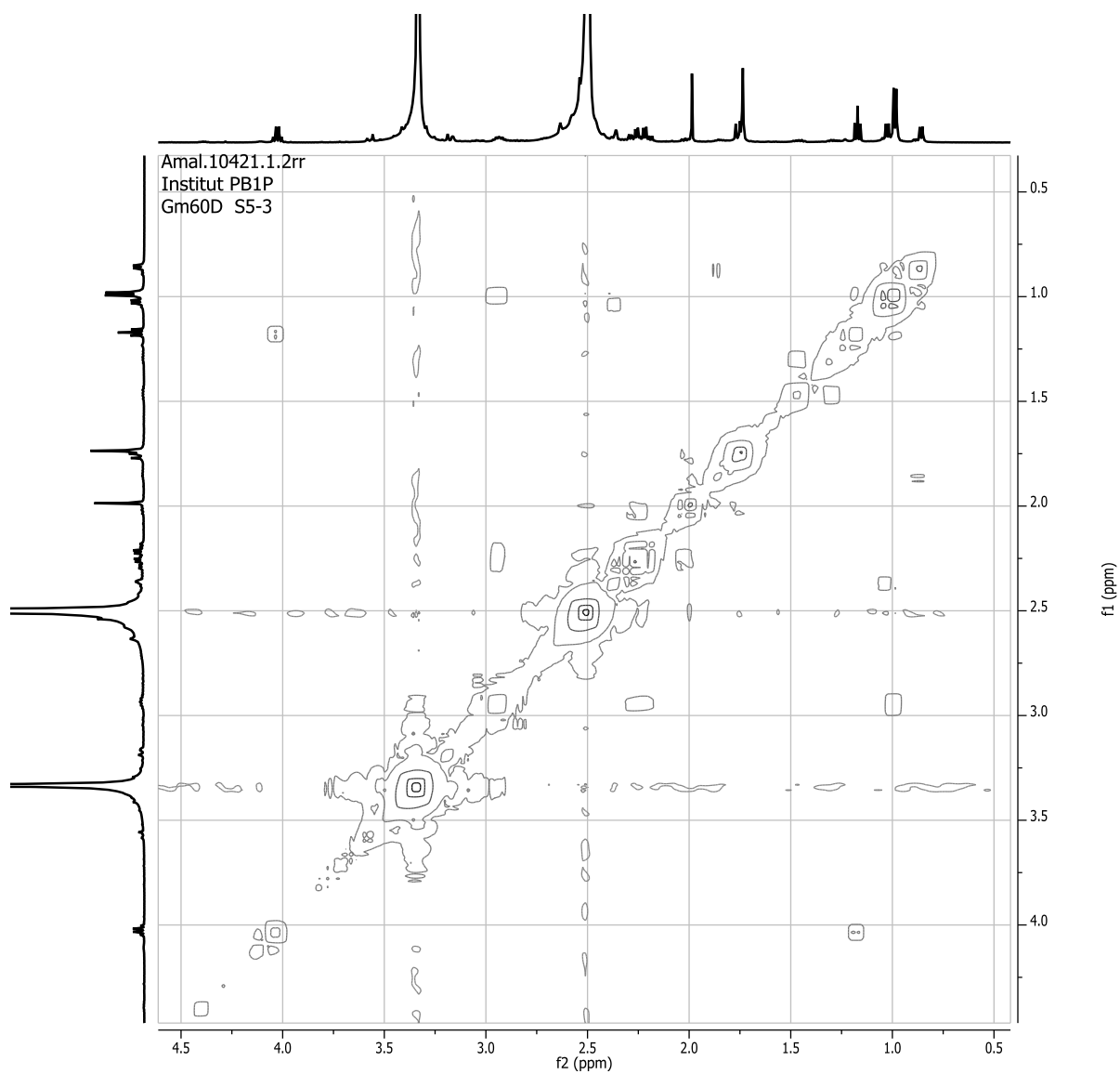
S3.1.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 5 ppm).



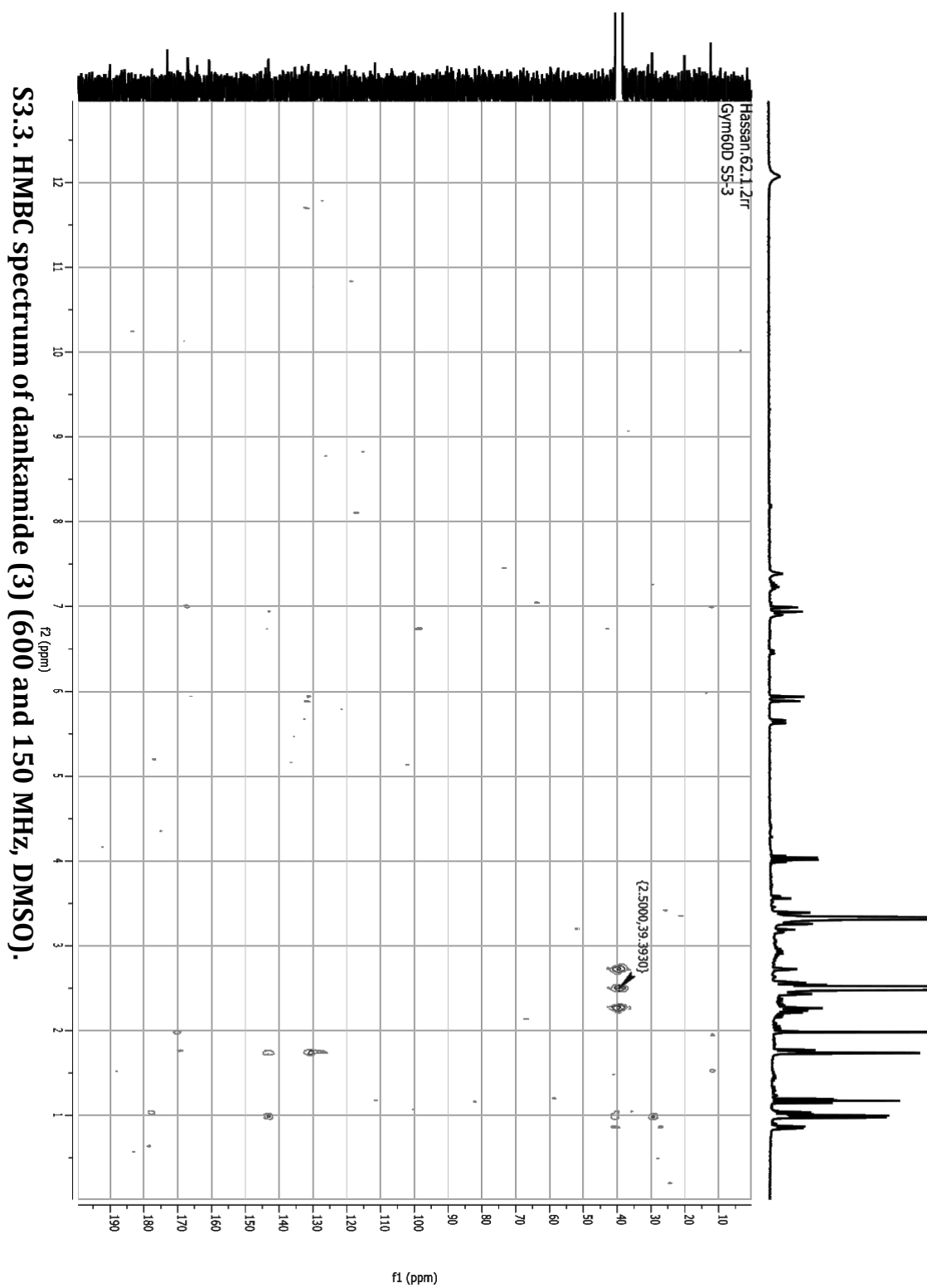
S3.1.2. Enlargement of the aromatic region (5 - 13 ppm).



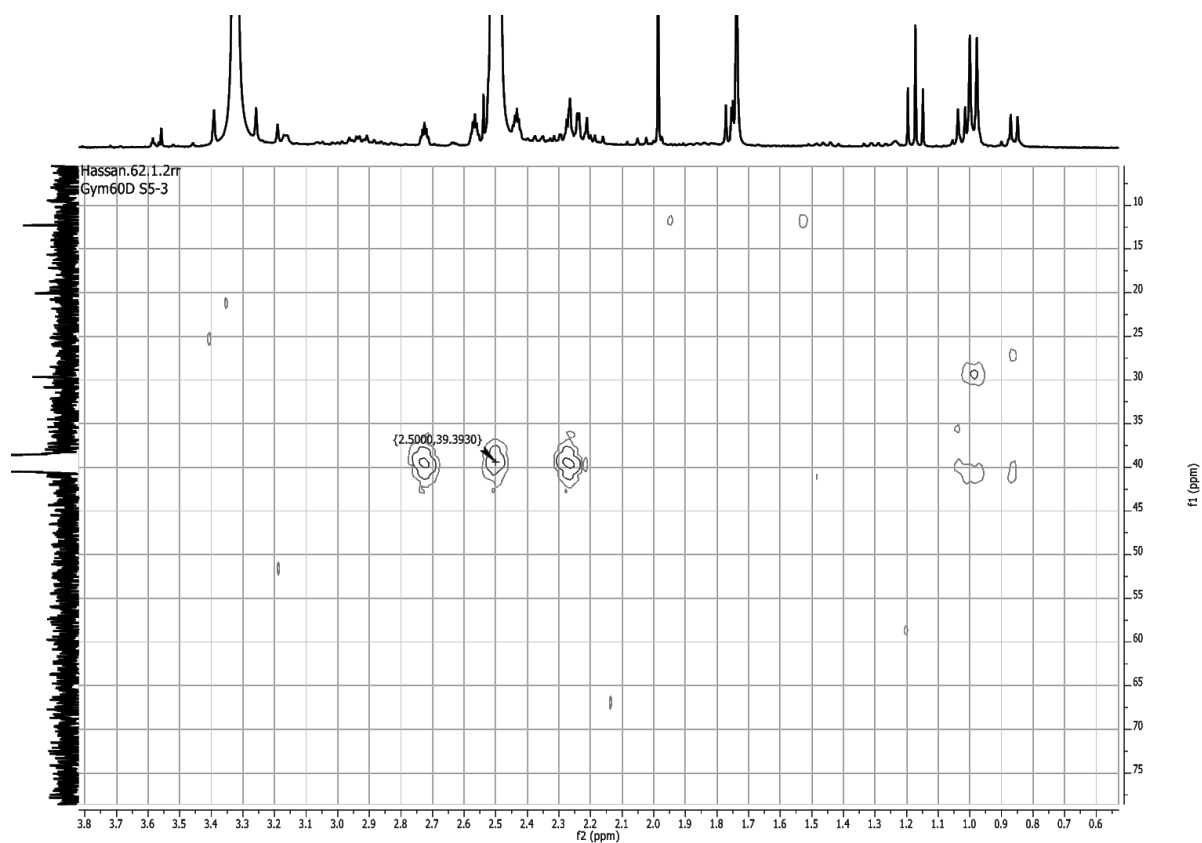
S3.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of dankamide (3) (500 MHz, DMSO).



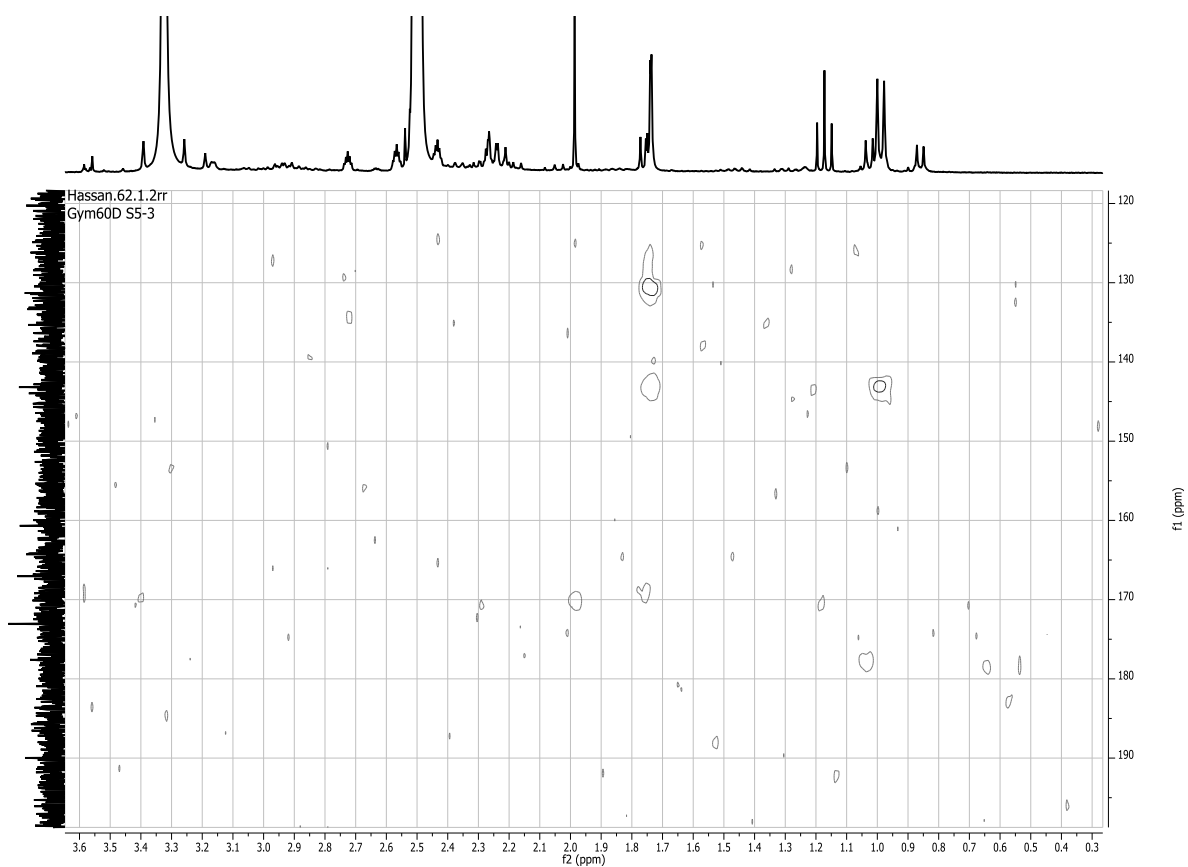
S3.2.1. Enlargement of the aliphatic region.



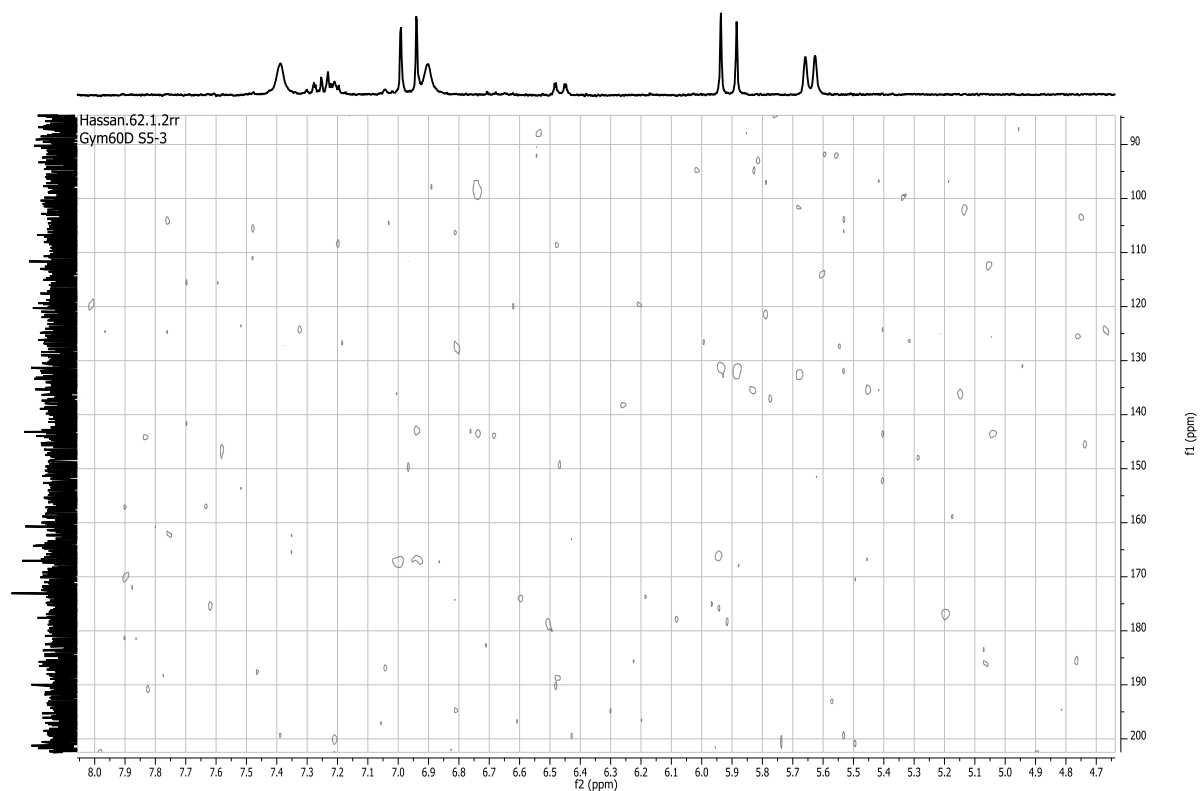
Publikation 4: Supporting Information



S3.3.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 80 ppm).



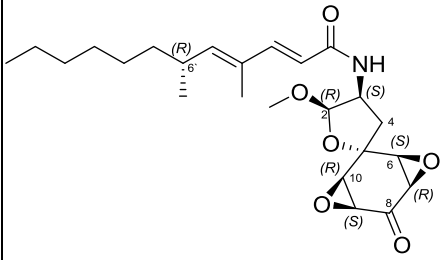
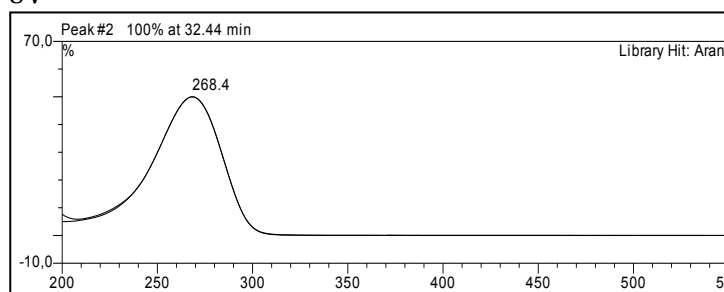
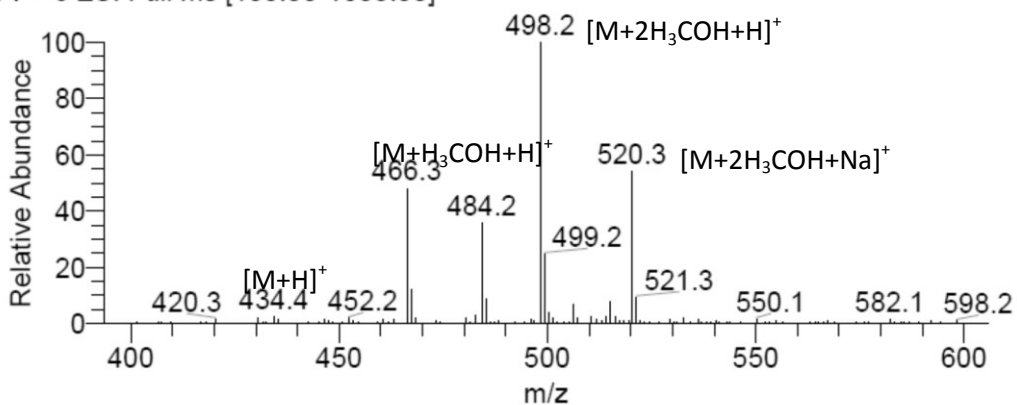
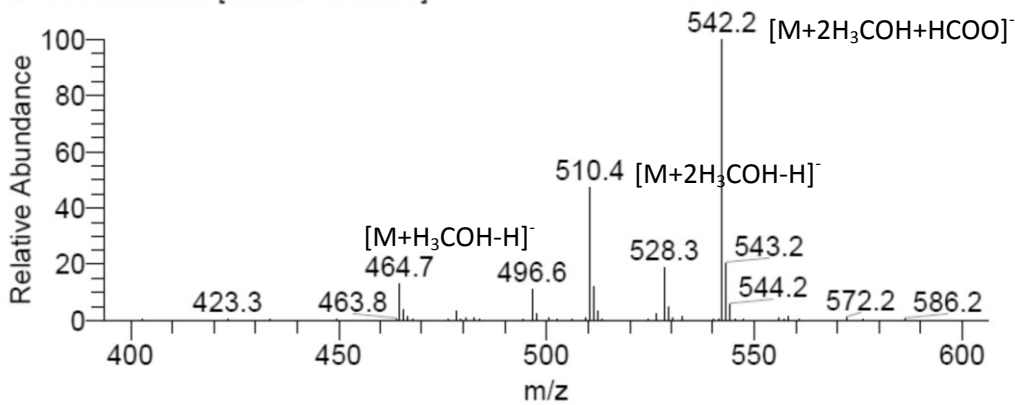
S3.3.2. Enlargement of the aliphatic region (120 - 200 ppm).

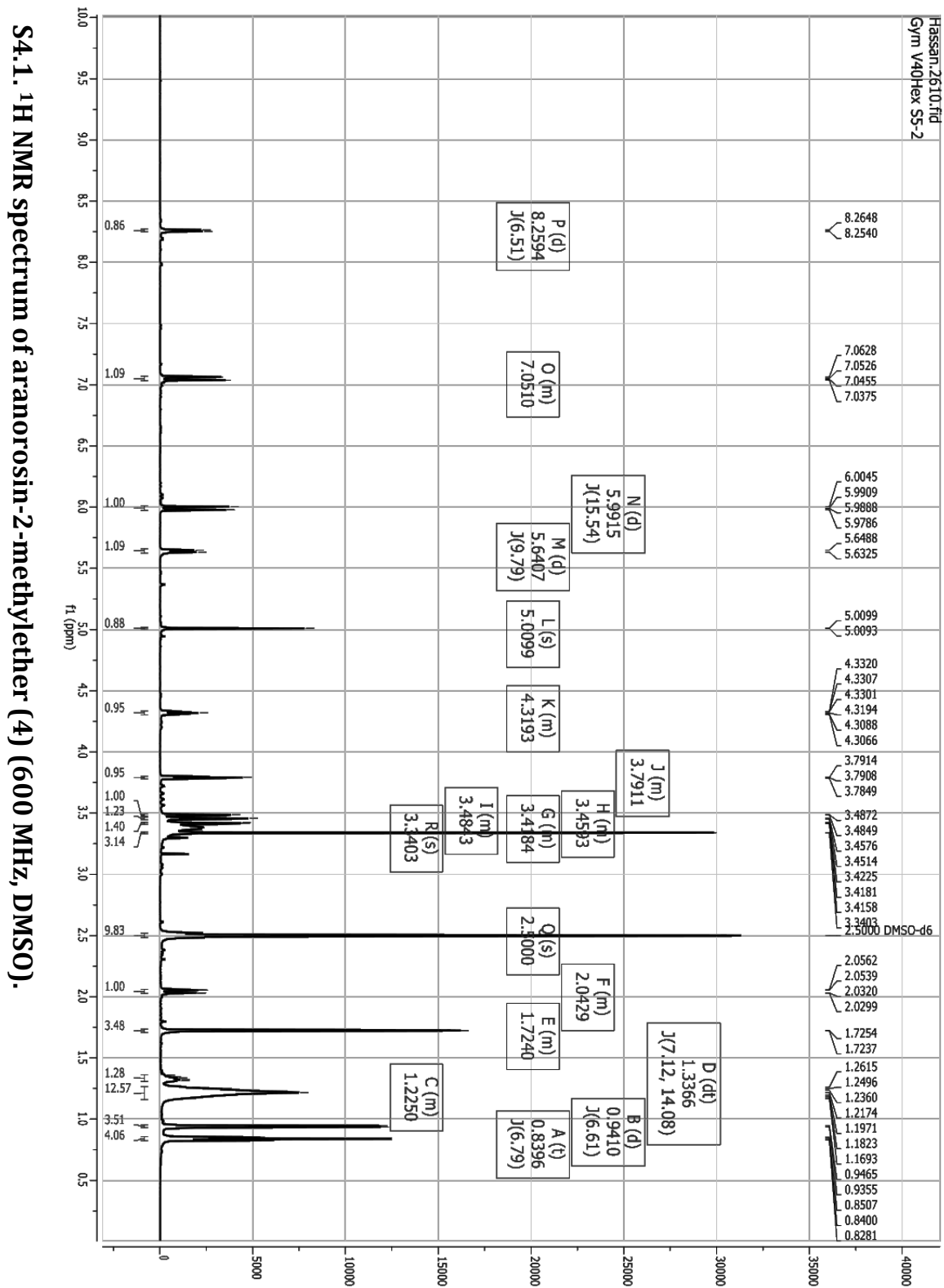


S3.3.3. Enlargement of the aromatic region.

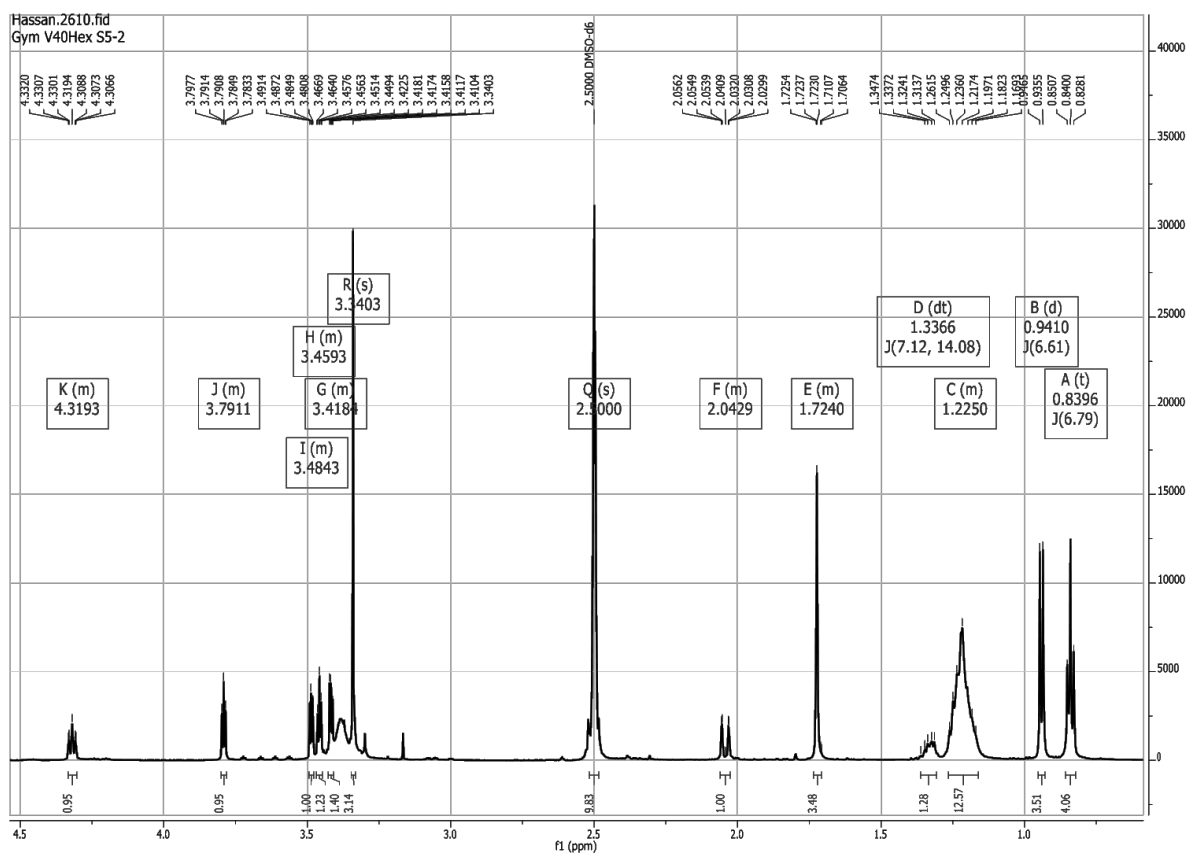
Publikation 4: Supporting Information

S4. General information of aranorosin-2-methylether (4), including RT, UV and mass spectra.

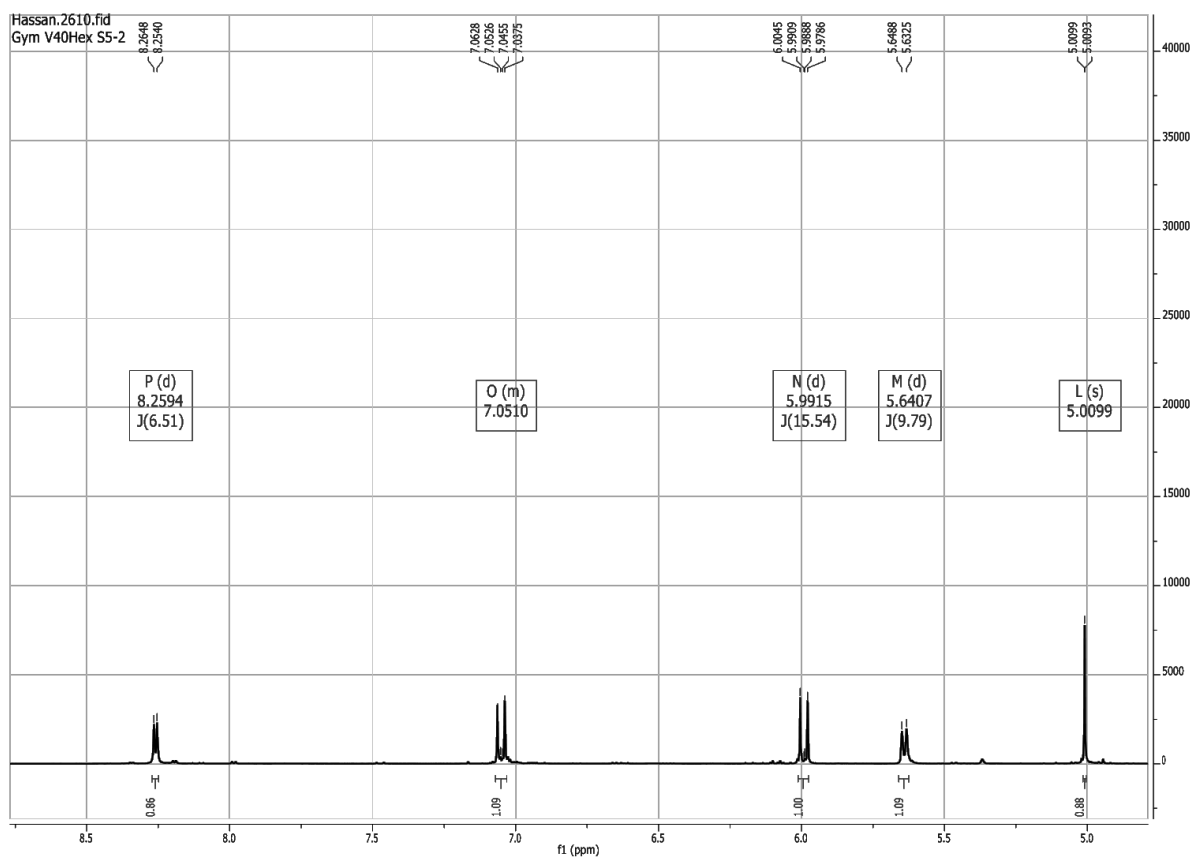
| Aranorosin-2-methylether | |
|--|---|
| Synonym(s) Samples code Biological source Sample amount Physical description Molecular formula Molecular weight OR $[\alpha]_D^{20}$ Retention time (HPLC) | (6 <i>R</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -((1' <i>R</i> ,2 <i>r</i> ,3' <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,5' <i>R</i> ,7' <i>S</i>)-5-methoxy-6'-oxodihydro-3 <i>H</i> -4',8'-dioxaspiro[furan-2,2'-tricyclo[5.1.0.0 ^{3,5}]octan]-4-yl)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide Gym 40Hex S5 Semi1 and 2 <i>Gymnascella dankaliensis</i> 5 mg White to yellow shining solid C ₂₄ H ₃₅ NO ₆ 433 g/mol (434.2542, calcd. for C ₂₄ H ₃₆ NO ₆ 434.2537) -7.62° (c 0.17, CHCl ₃) 32 min |
|  | UV  |
| MS | <p>Lena391 #990 RT: 27.07 AV: 1 NL: 5.44E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena391 #992 RT: 27.11 AV: 1 NL: 1.54E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



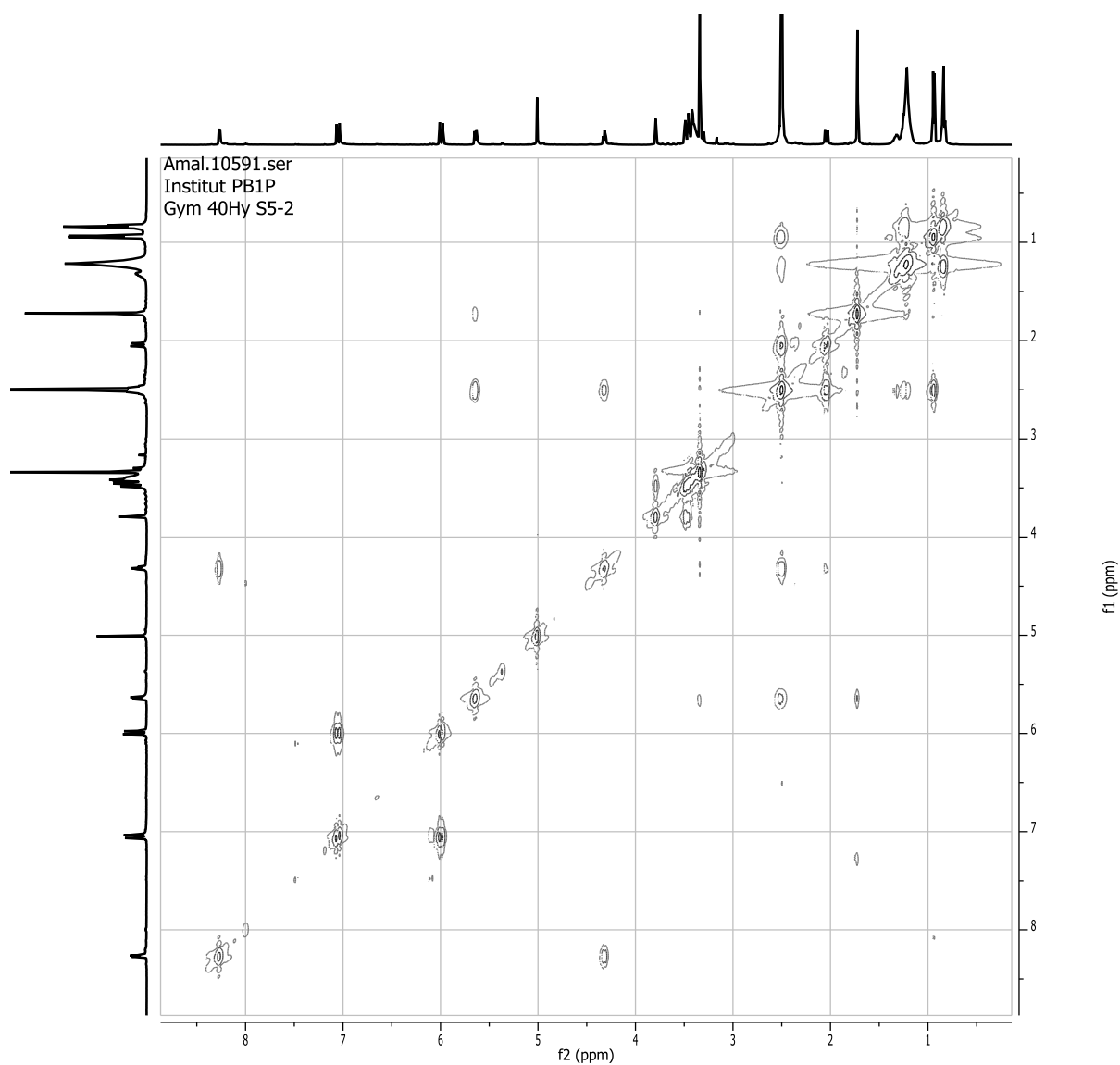
Publikation 4: Supporting Information



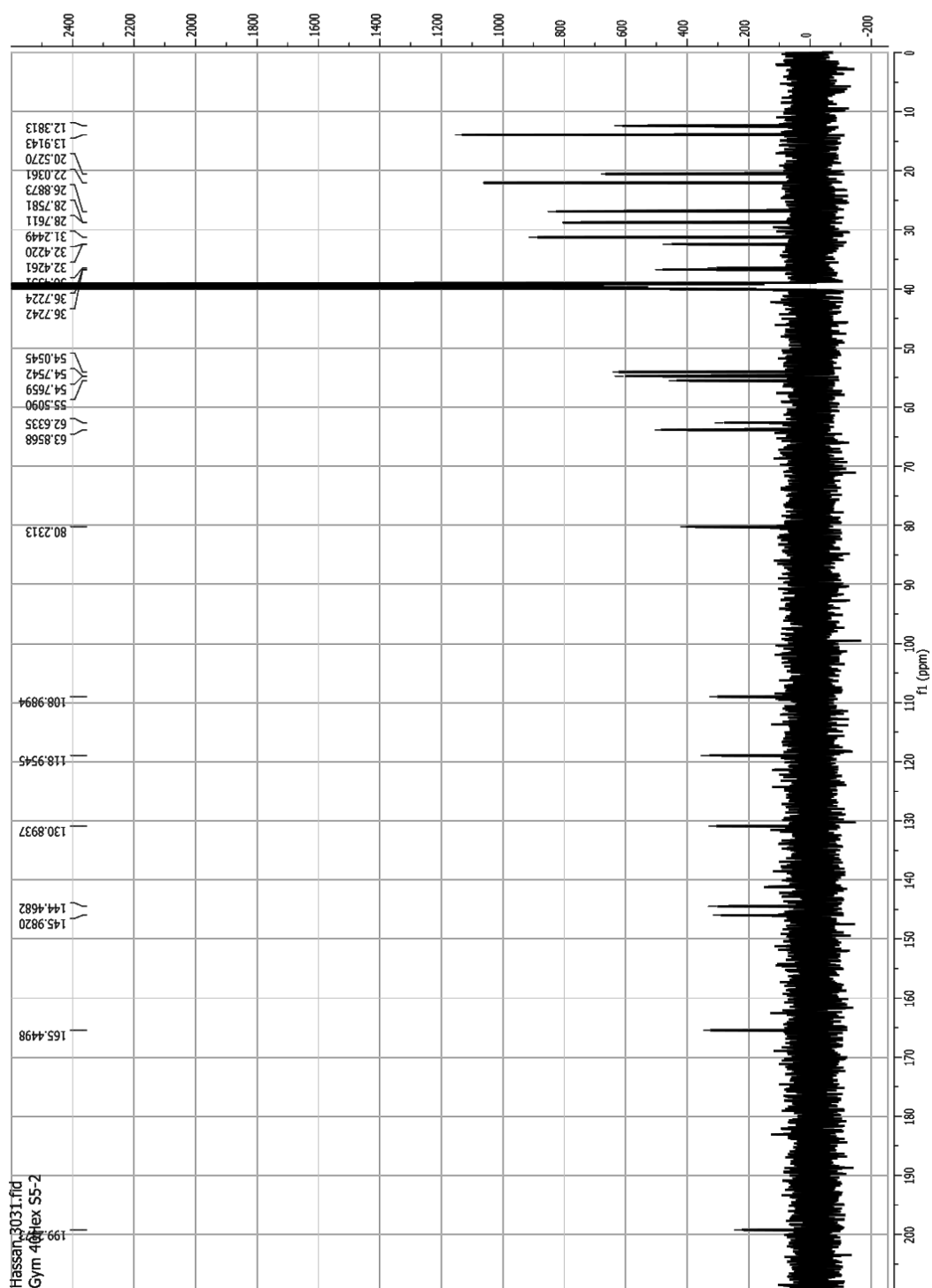
S4.1.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 4.5 ppm).



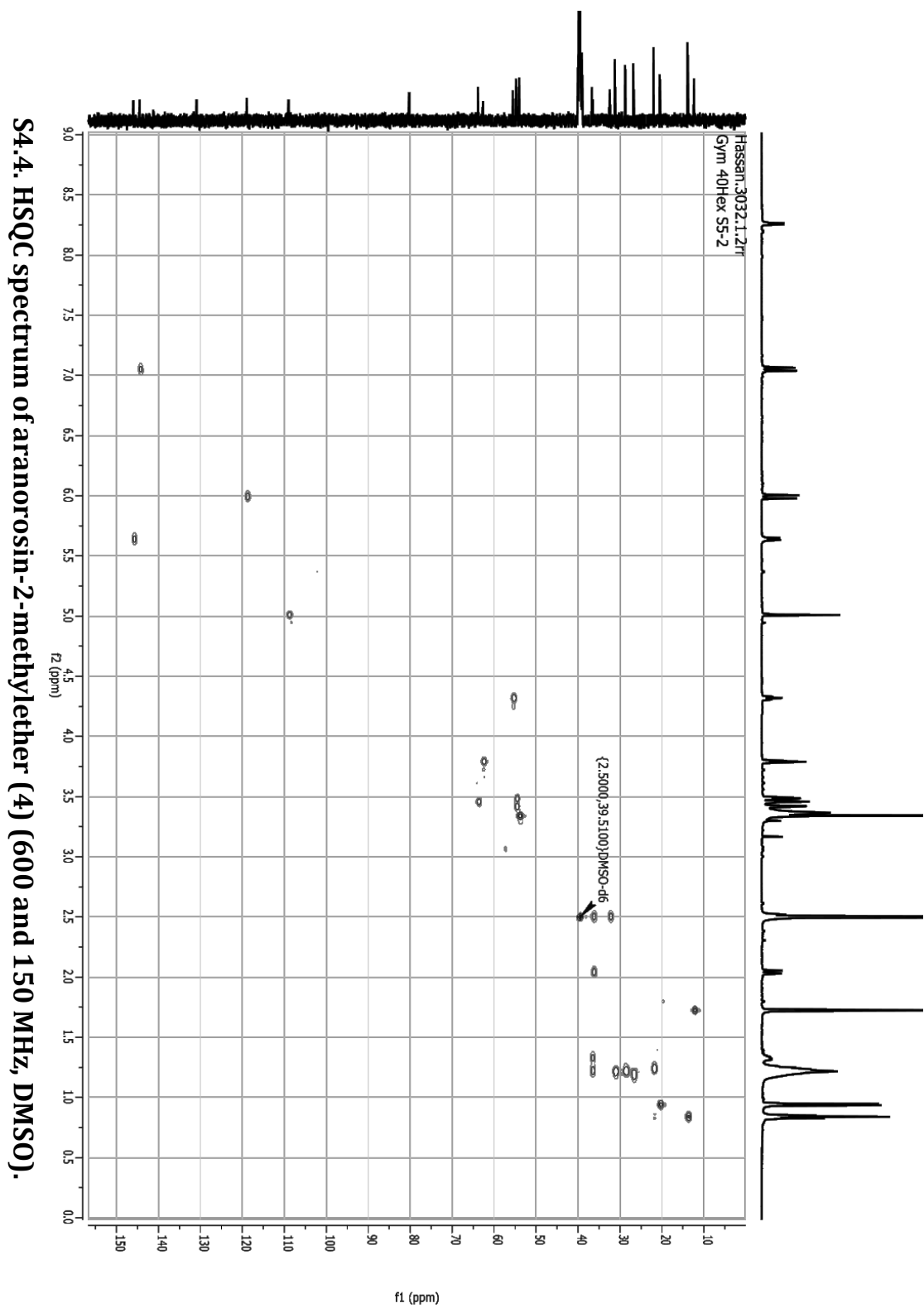
S4.1.2. Enlargement of the aromatic region (4.5 - 9 ppm).

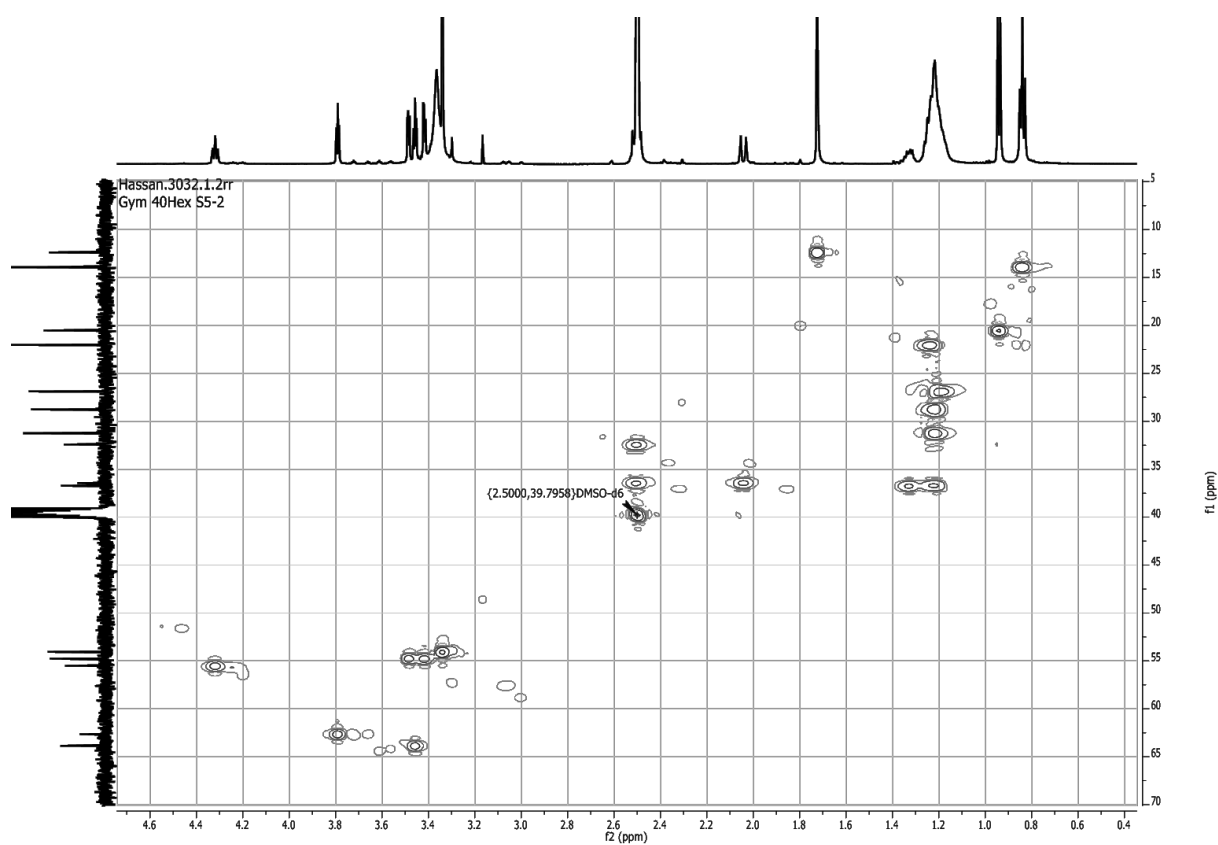


S4.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of aranorosin-2-methylether (500 MHz, DMSO).

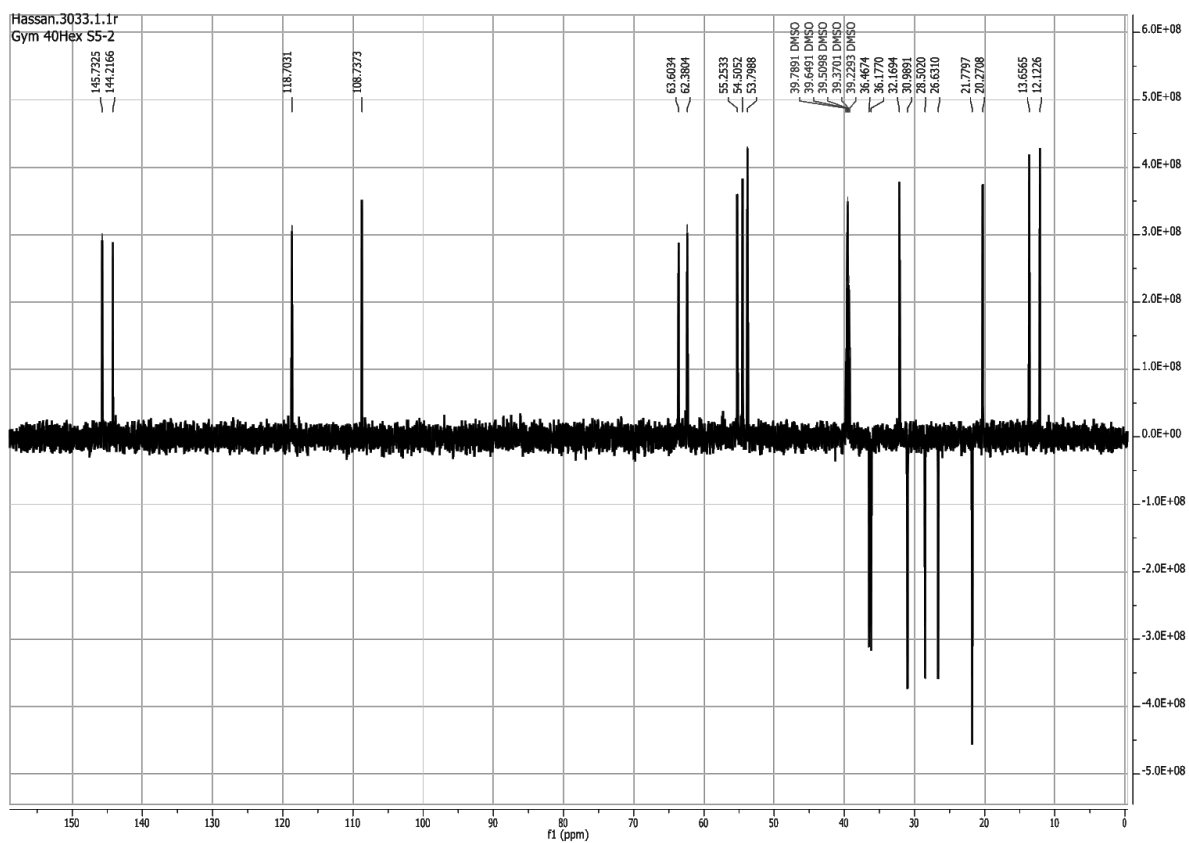


S4.3. ¹³C NMR spectrum of ararorosin-2-methylether (4) (150 MHz, DMSO).

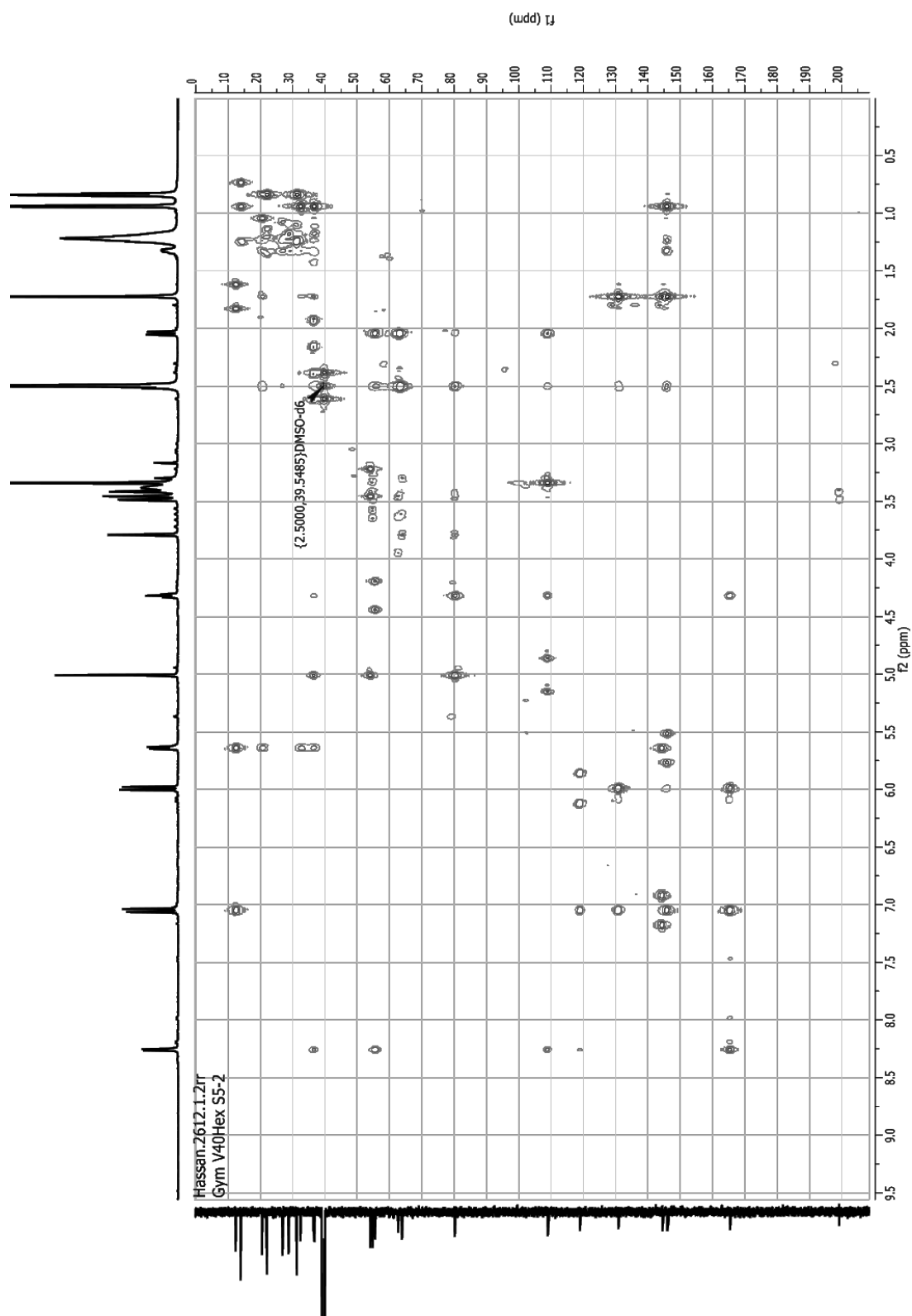




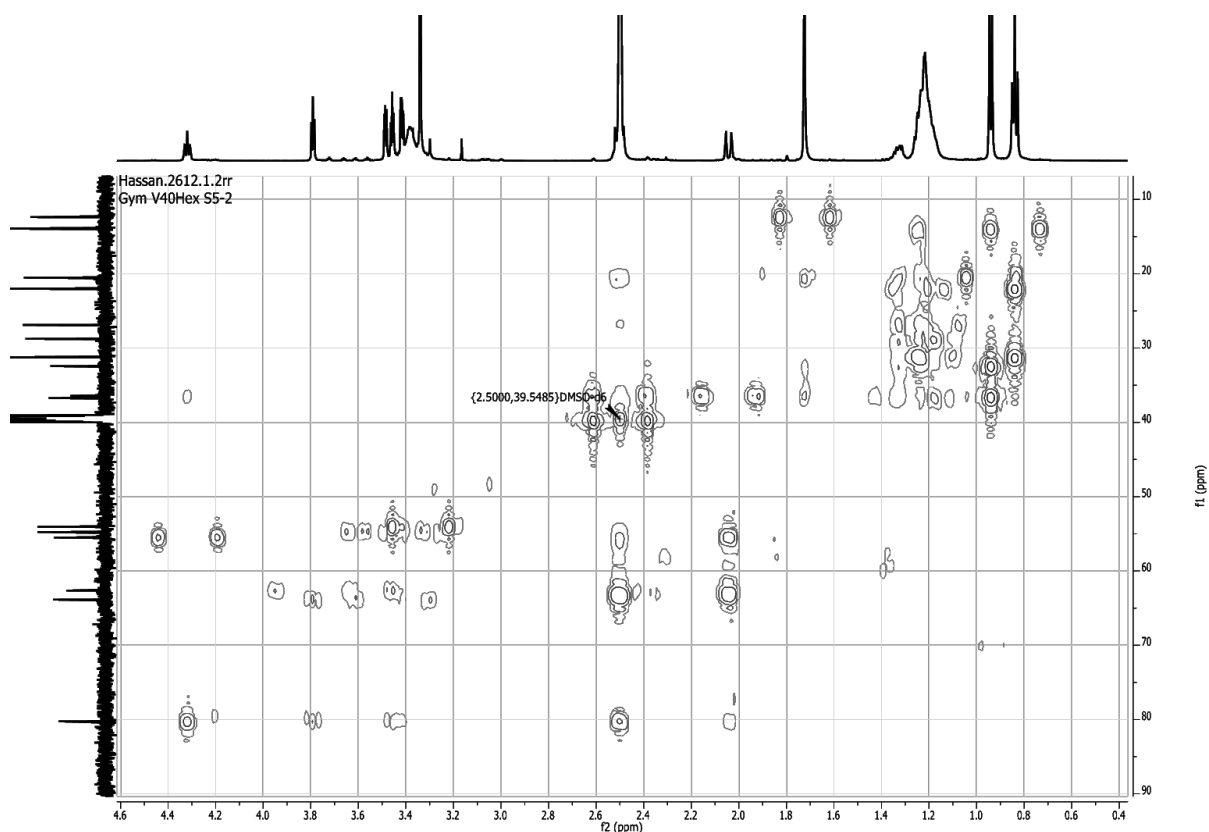
S4.4.1. Enlargement of the aliphatic region (0 - 5 ppm).



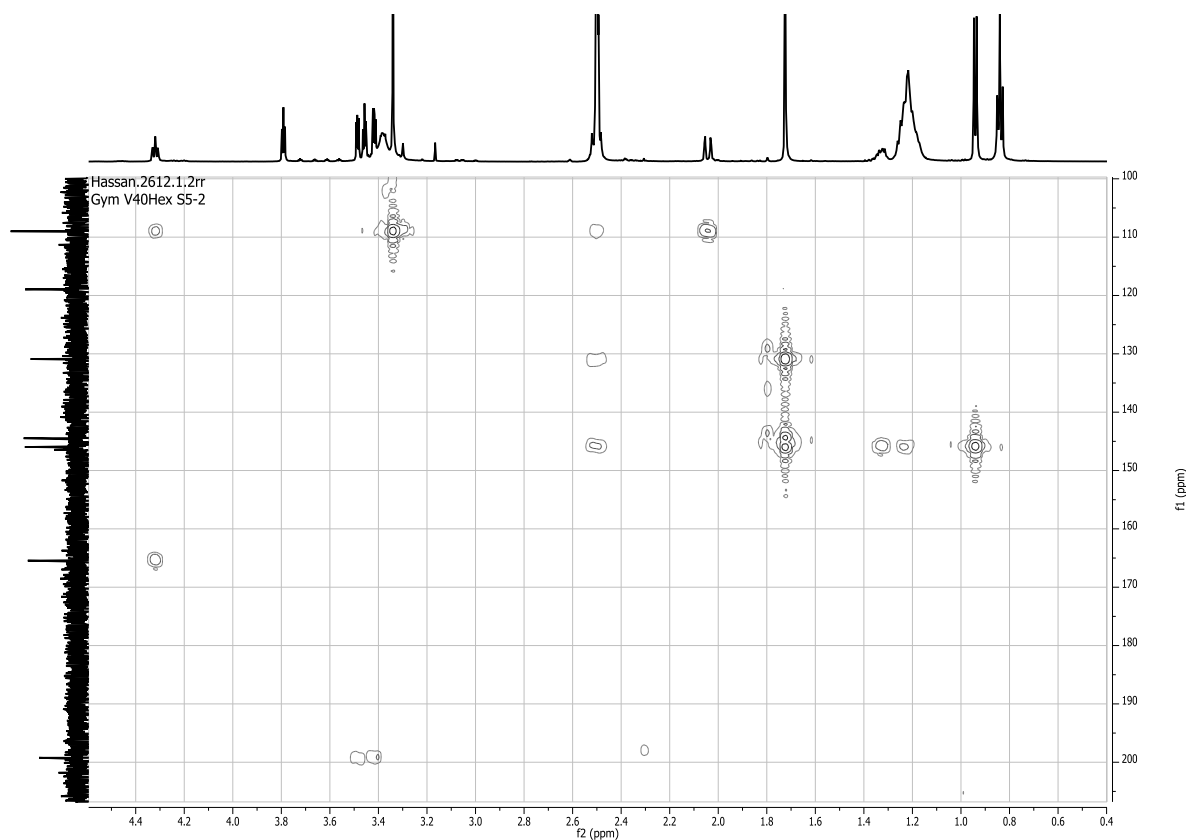
S4.5. DEPT spectrum of aranorosin-2-methylether (600 MHz, DMSO).



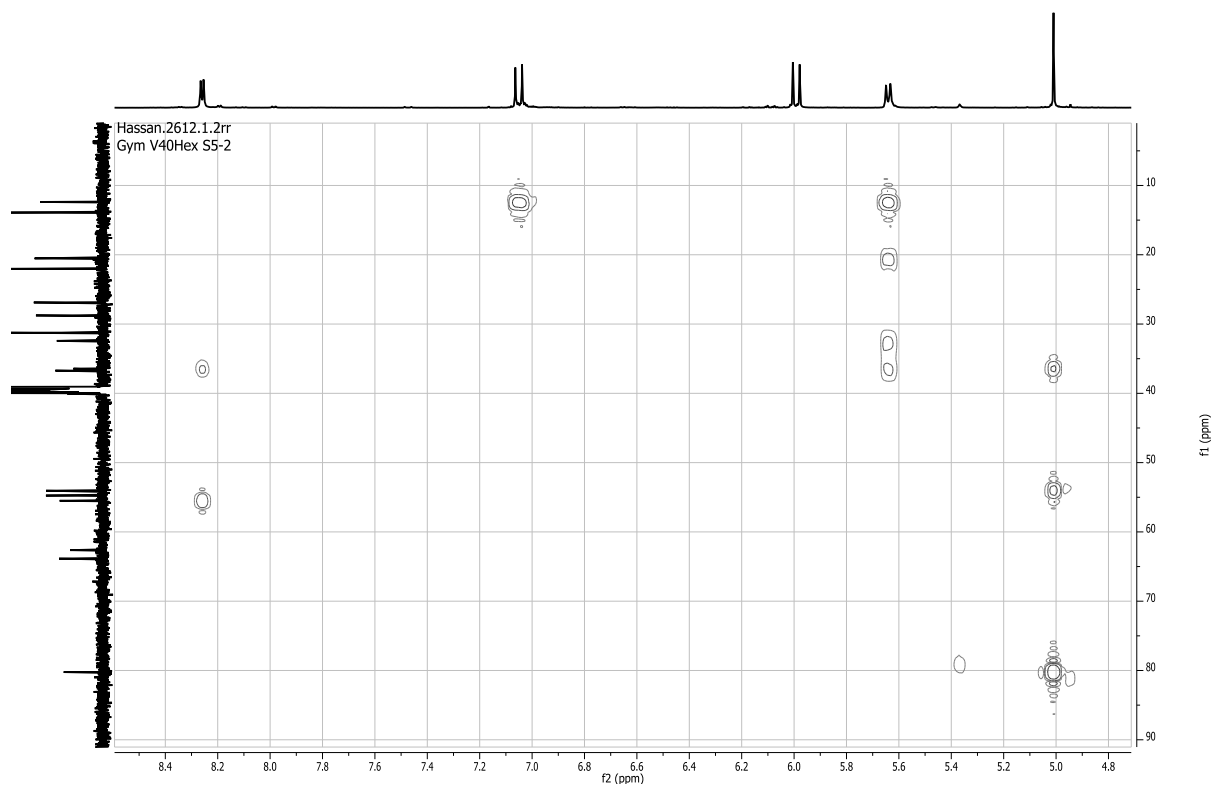
S4.6. HMBC spectrum of aranorosin-2-methylether (600 and 150 MHz, DMSO).



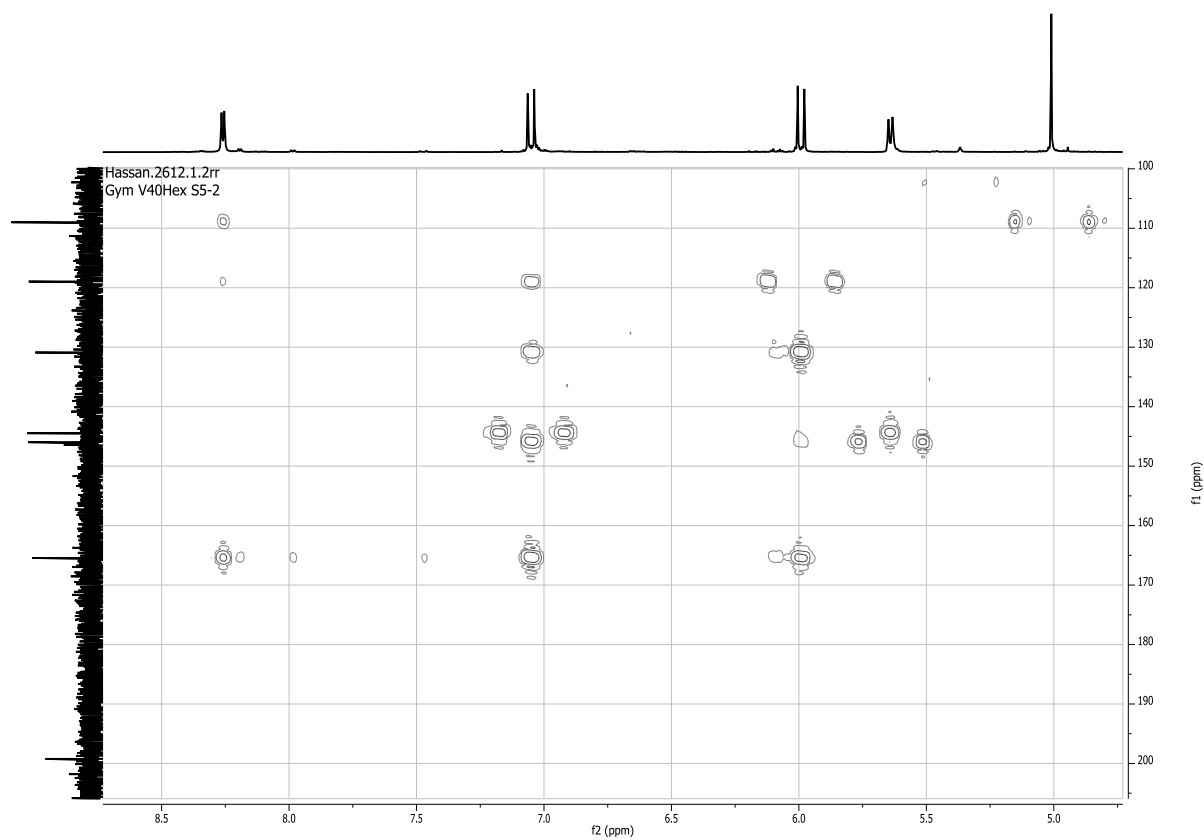
S4.6.1. Enlargement of the aliphatic region (0 – 90 ppm).



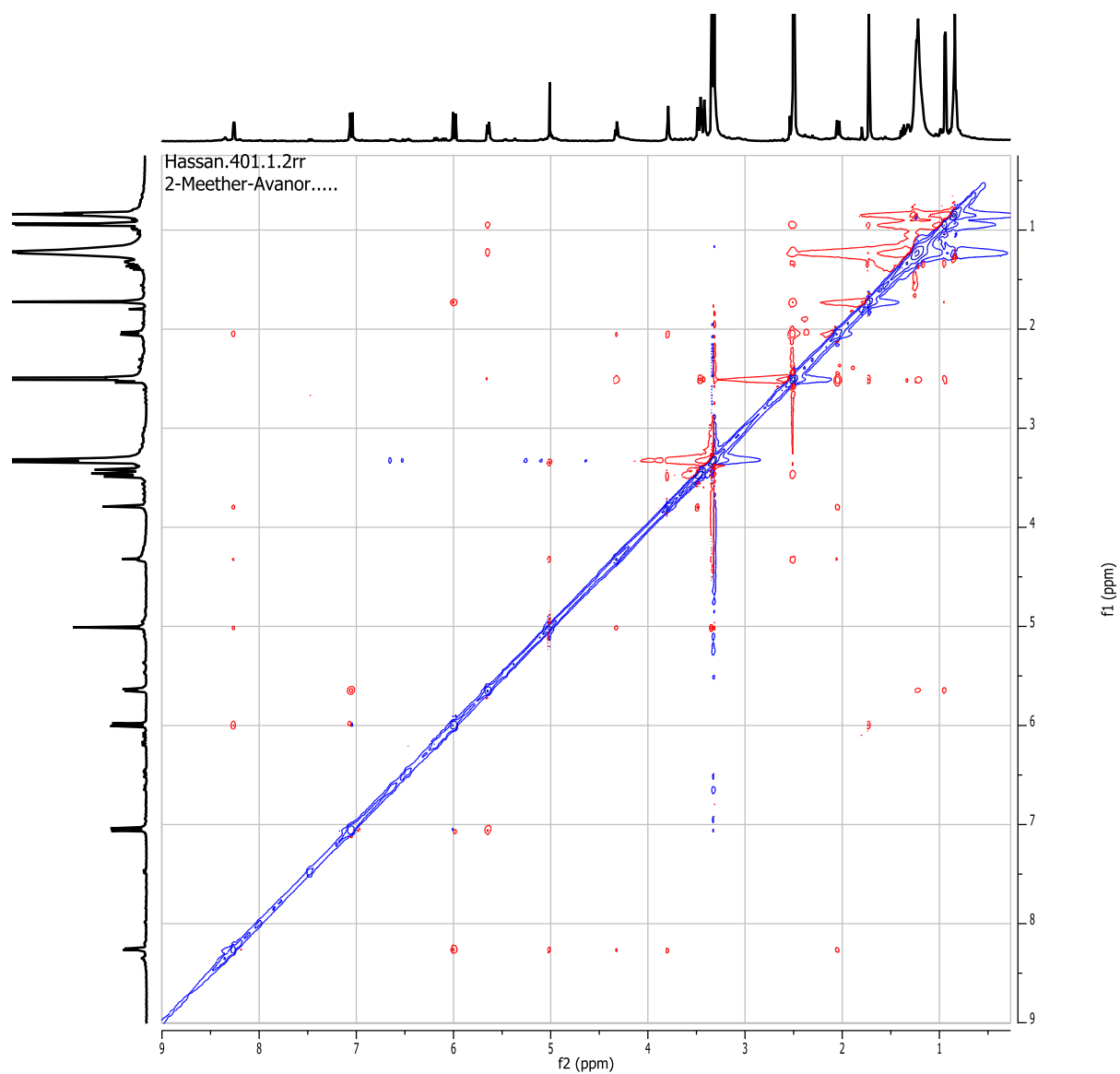
S4.6.2. Enlargement of the aliphatic region (100 – 210 ppm).



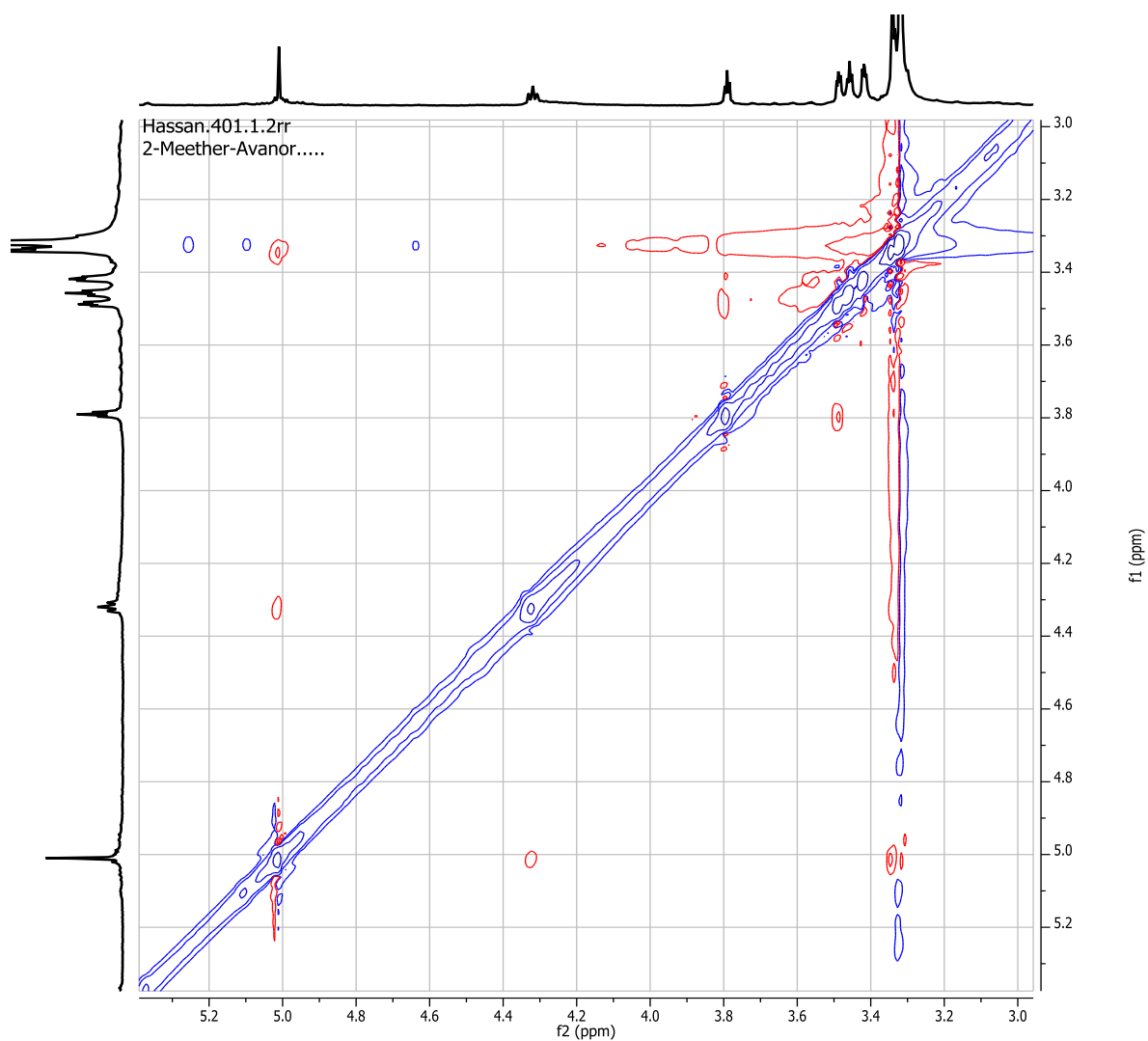
S4.6.3. Enlargement of the aromatic region (0 – 90 ppm).



S4.6.4. Enlargement of the aromatic region (100 – 210 ppm).

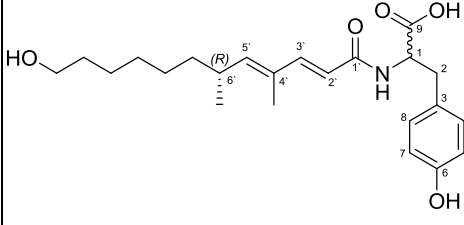
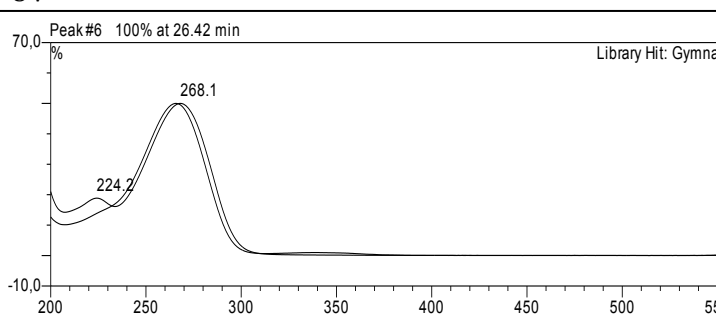
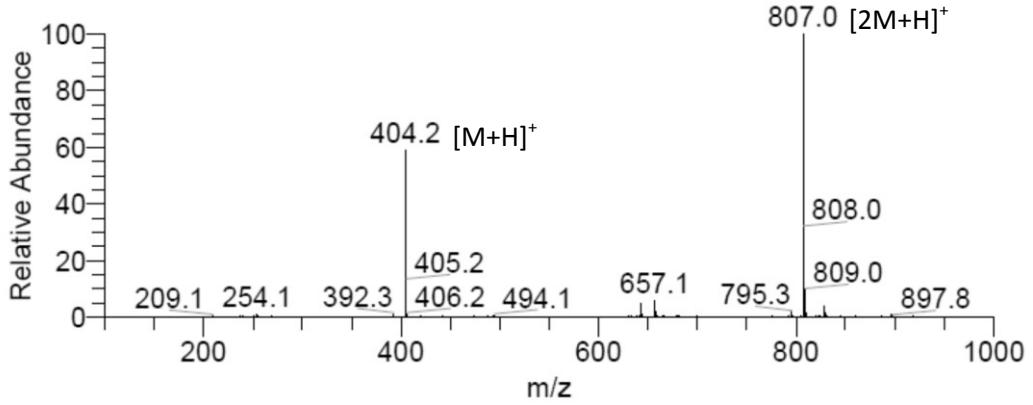
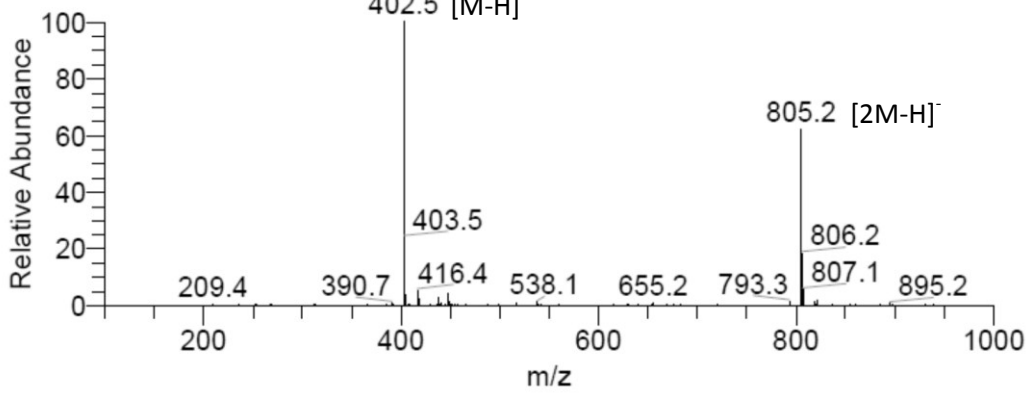


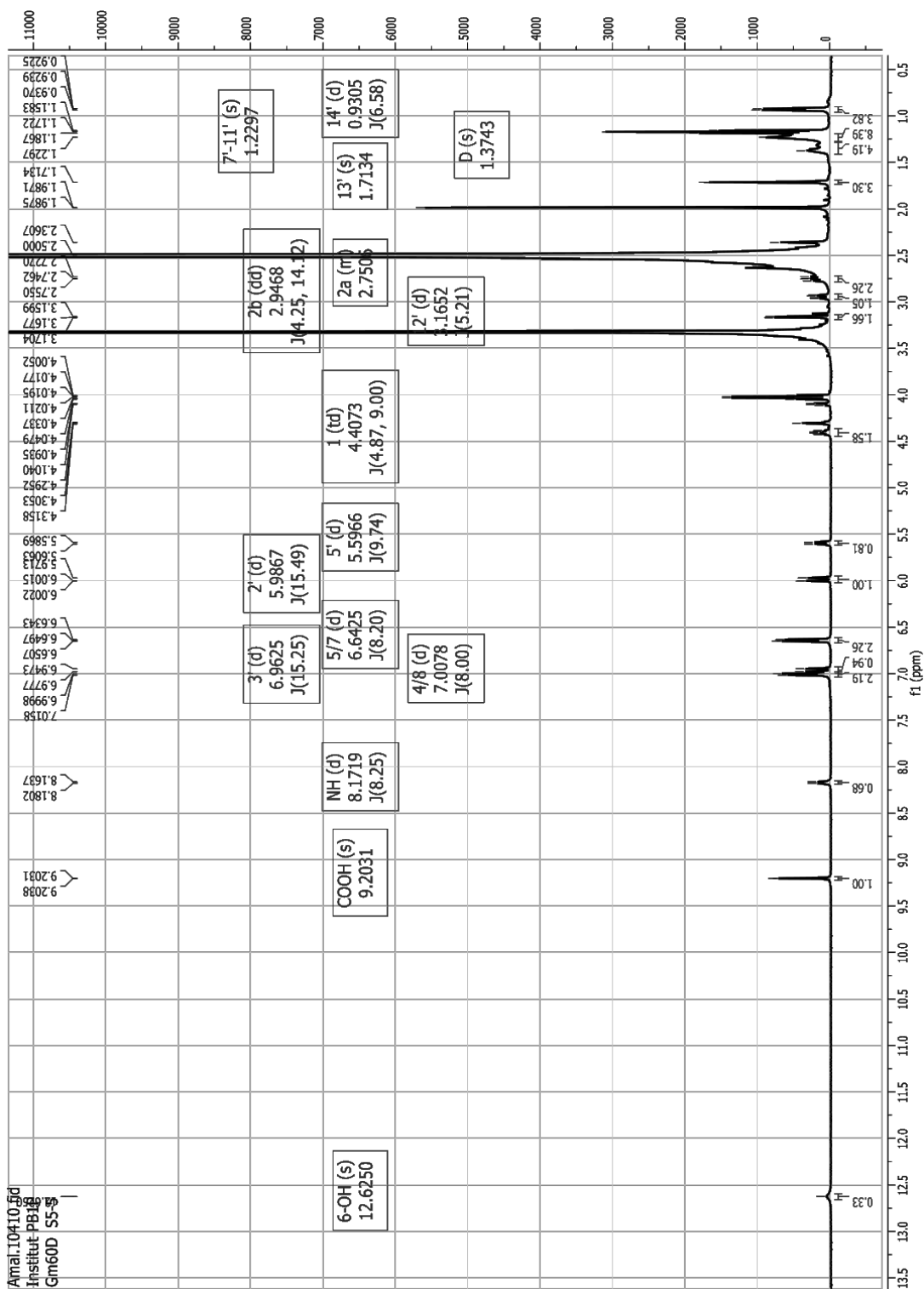
S4.7. ROESY spectrum of aranorosin-2-methylether (600 MHz, DMSO).



S4.7.1. Enlargement (3 - 6 ppm).

S5. General information of 12`-hydroxygymnastatin N (5), including RT, UV and mass spectra.

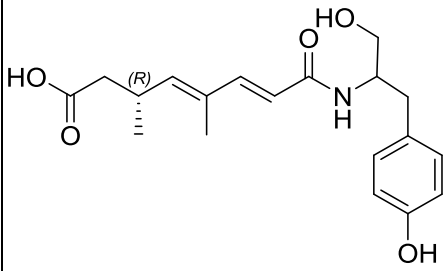
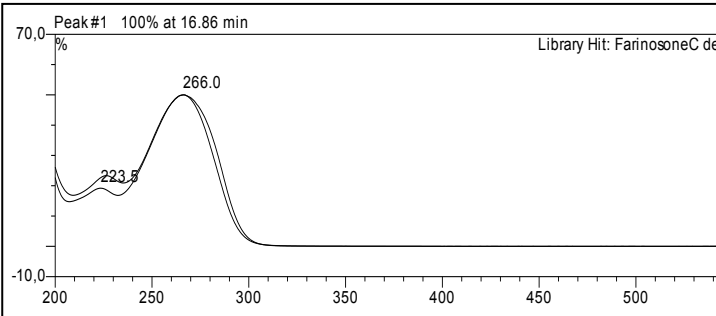
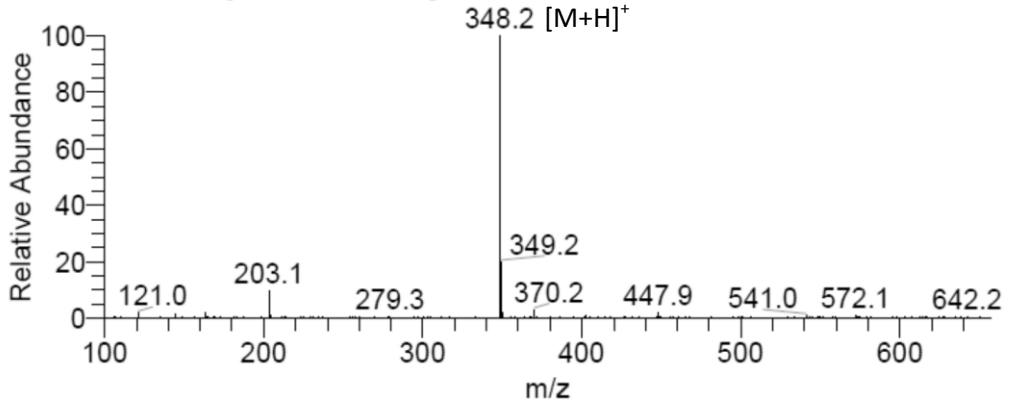
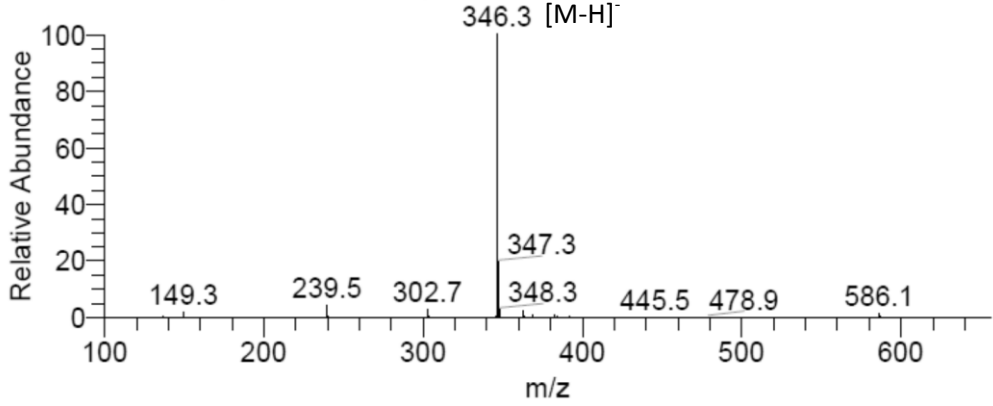
| 12`-hydroxygymnastatin N | |
|---|--|
| Synonym(s) | ((6 <i>R</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-12-hydroxy-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienoyl)tyrosine |
| Samples code | F6-2-1, Gym 60DCM S5 Semi5 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 3 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₃ H ₃₃ NO ₅ |
| Molecular weight | 403 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -26.1° (c 0.2, EtOH) |
| Retention time (HPLC) | 25 min |
|  | <p>UV</p>  |
| | <p>MS</p> <p>lena286 #841 RT: 23.47 AV: 1 NL: 2.14E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |
| | <p>lena286 #843 RT: 23.52 AV: 1 NL: 2.70E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

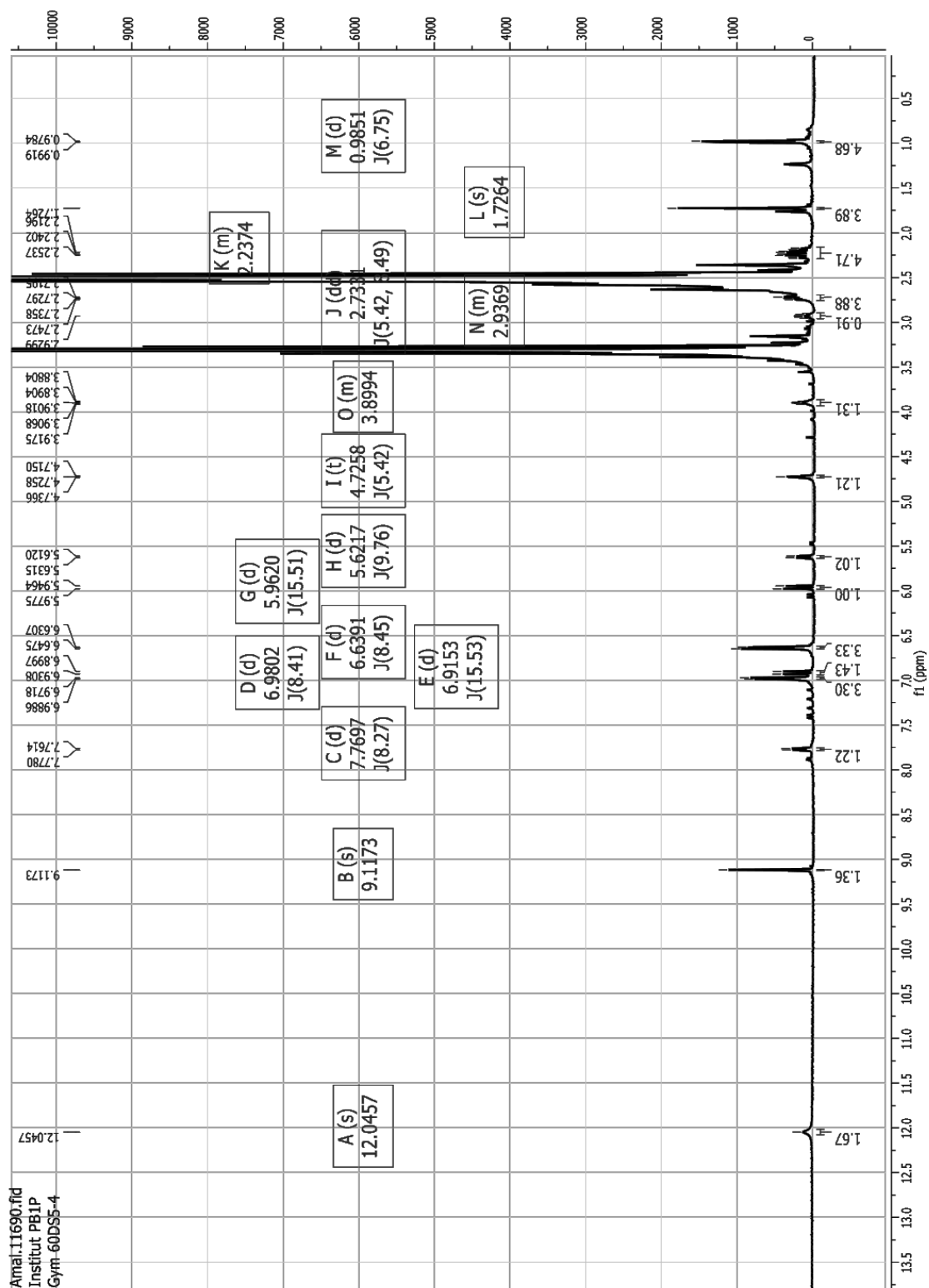


S5.1. ¹H NMR spectrum of 12-hydroxygymnastatin N (5) (500 MHz, DMSO).

Publikation 4: Supporting Information

S6. General information of farinosone C (6), including RT, UV and mass spectra.

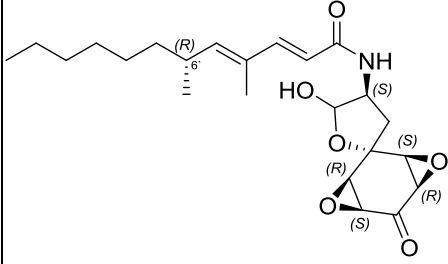
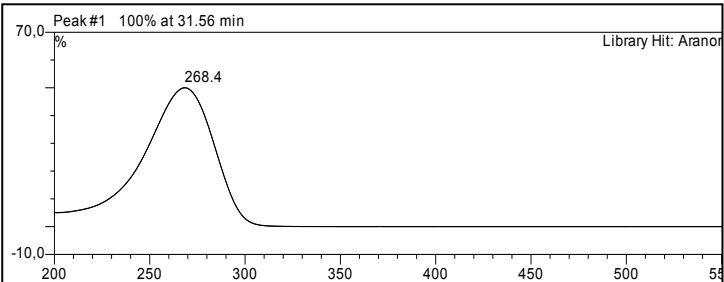
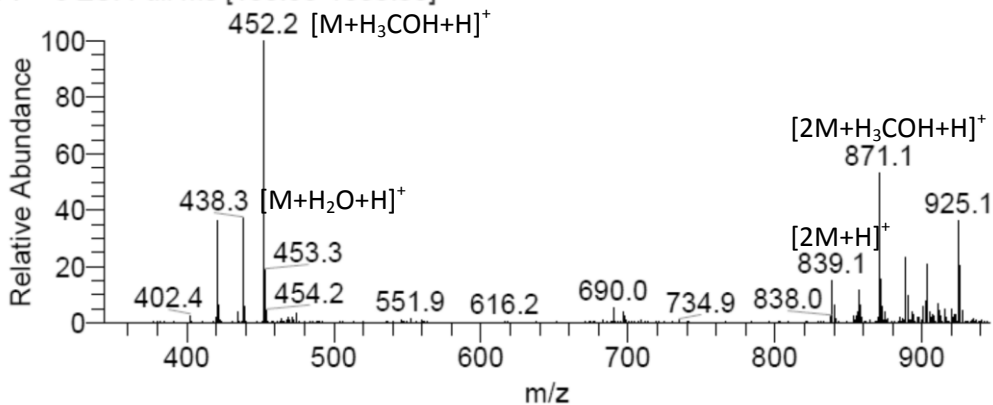
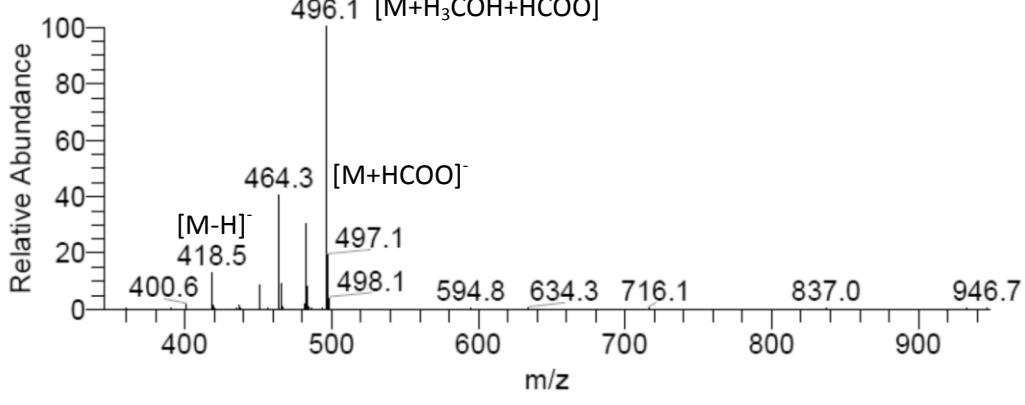
| Farinosone C | |
|---|---|
| Synonym(s) | (3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-8-((1-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)propan-2-yl)amino)-3,5-dimethyl-8-oxoocta-4,6-dienoic acid |
| Samples code | Gym 60DCM S5 Semi4, Salz H2O S4 Semi2 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 1.0 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₁₉ H ₂₅ NO ₅ |
| Molecular weight | 347 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -11.2° (c 0.2, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 17 min |
|  | <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">UV</div>  </div> |
| MS | <p>Lena365 #750 RT: 19.76 AV: 1 NL: 9.63E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena365 #752 RT: 19.82 AV: 1 NL: 1.47E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

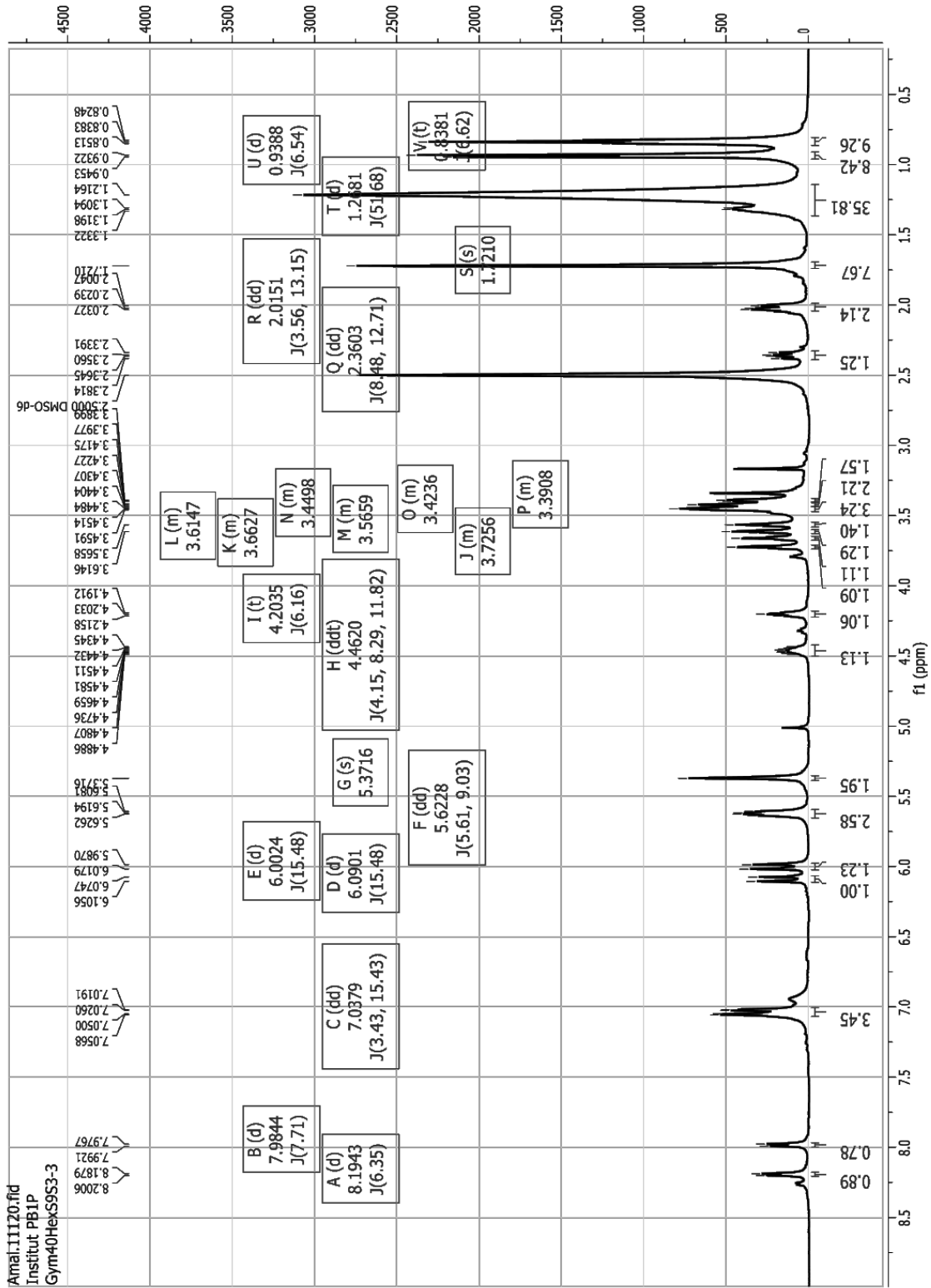


S6.1.1H NMR spectrum of farinosone C (6) (500 MHz, DMSO).

Publikation 4: Supporting Information

S7. General information of aranorosin (7), including RT, UV and mass spectra.

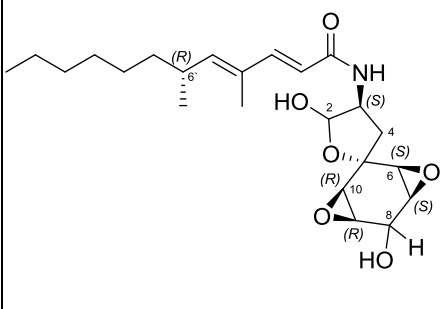
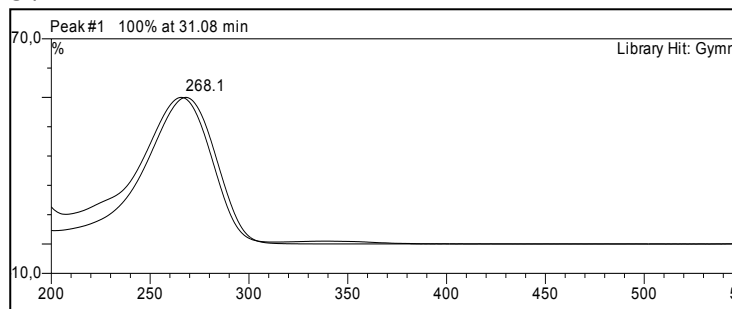
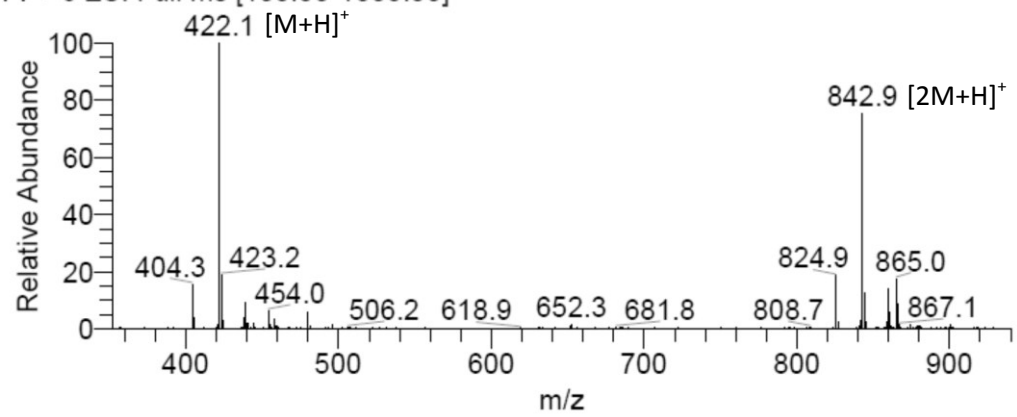
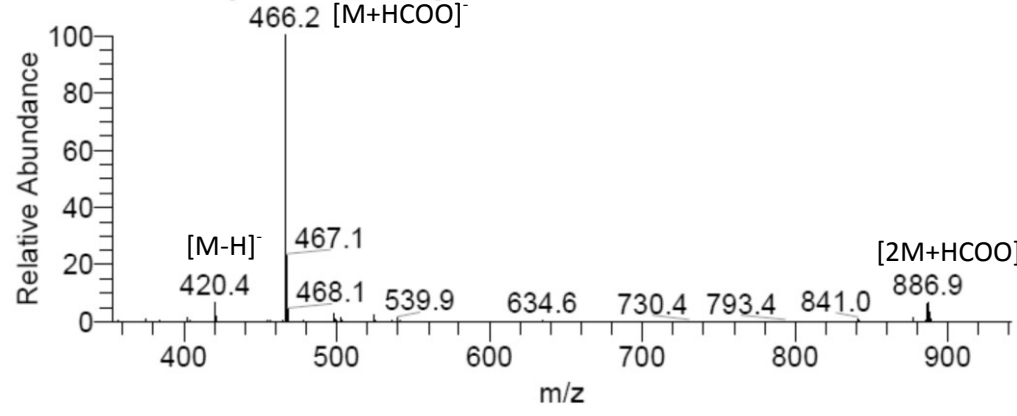
| Aranorosin | |
|---|---|
| Synonym(s) | (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>R</i>)- <i>N</i> -((1' <i>R</i> ,2 <i>r</i> ,3' <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5' <i>S</i> ,7' <i>S</i>)-5-hydroxy-6'-oxodihydro-3 <i>H</i> -4',8'-dioxaspiro[furan-2,2'-tricyclo[5.1.0.0 ^{3,5}]octan]-4-yl)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide |
| Samples code | Gym 40Hex S9S3 Semi3 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 10 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₃ H ₃₃ NO ₆ |
| Molecular weight | 419 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -4.57° (<i>c</i> 0.17, CHCl ₃) |
| Retention time (HPLC) | 32 min |
|  | <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">UV</div>  </div> |
| MS | <p>LENA334 #1029 RT: 28.62 AV: 1 NL: 5.51E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>LENA334 #1031 RT: 28.67 AV: 1 NL: 9.05E6 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

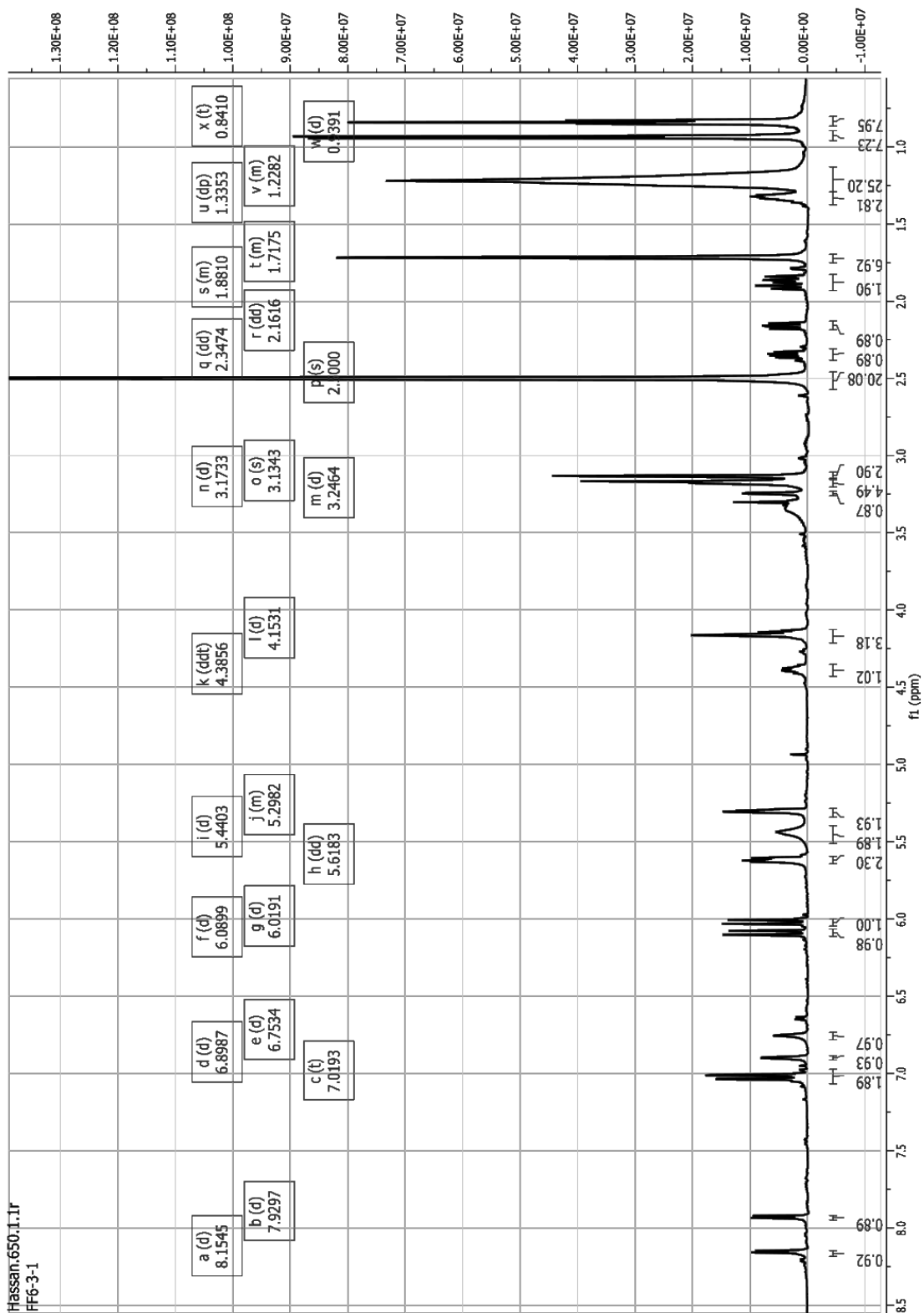


S7.1. ¹H NMR spectrum of aranorosin (7) (500 MHz, DMSO).

Publikation 4: Supporting Information

S8. General information of aranososinol A (8), including RT, UV and mass spectra.

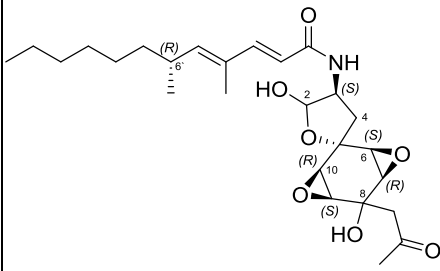
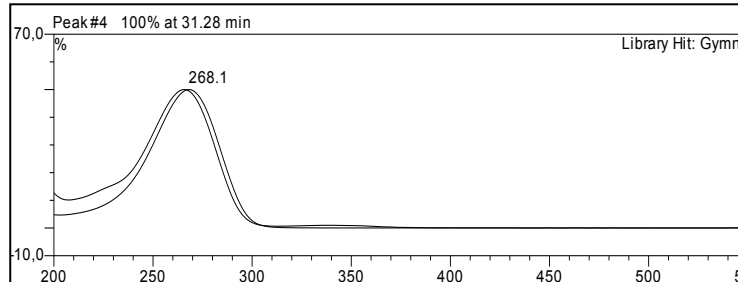
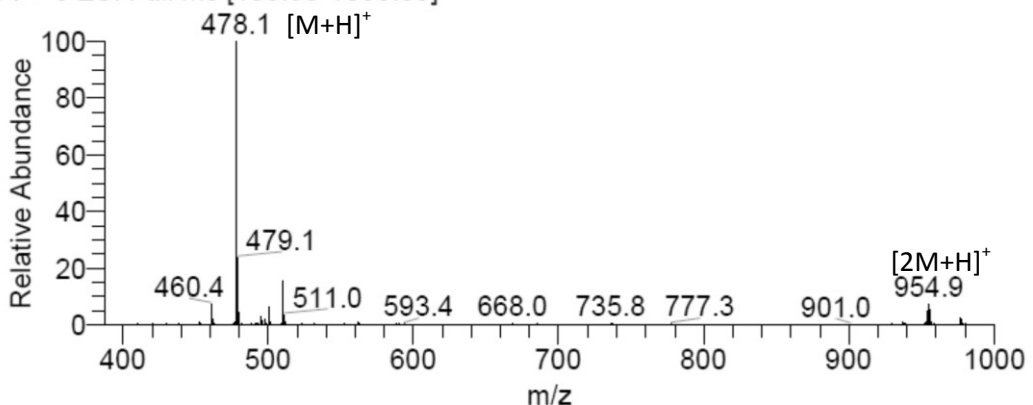
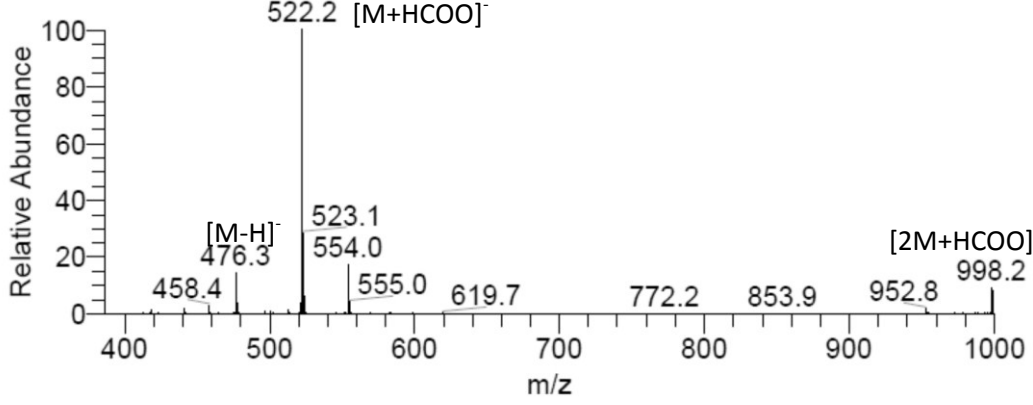
| Aranorosinol A | |
|---|---|
| Synonym(s) | (2`E,4`E,6`R)-N-((1R,2r,3S,4S,5S,7R)-5,6'-dihydroxydihydro-3H-4',8'-dioxaspiro[furan-2,2'-tricyclo[5.1.0.0 ^{3,5}]octan]-4-yl)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide |
| Samples code | FF 6-3-1 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 5 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₃ H ₂₅ NO ₆ |
| Molecular weight | 421 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -1.3 (c 0.5, MeOH) |
| Retention time (HPLC) | 31 min |
|  | <div style="text-align: center;">UV</div>  |
| MS | <p>lena259 #1270 RT: 34.31 AV: 1 NL: 7.41E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena259 #1272 RT: 34.35 AV: 1 NL: 3.70E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

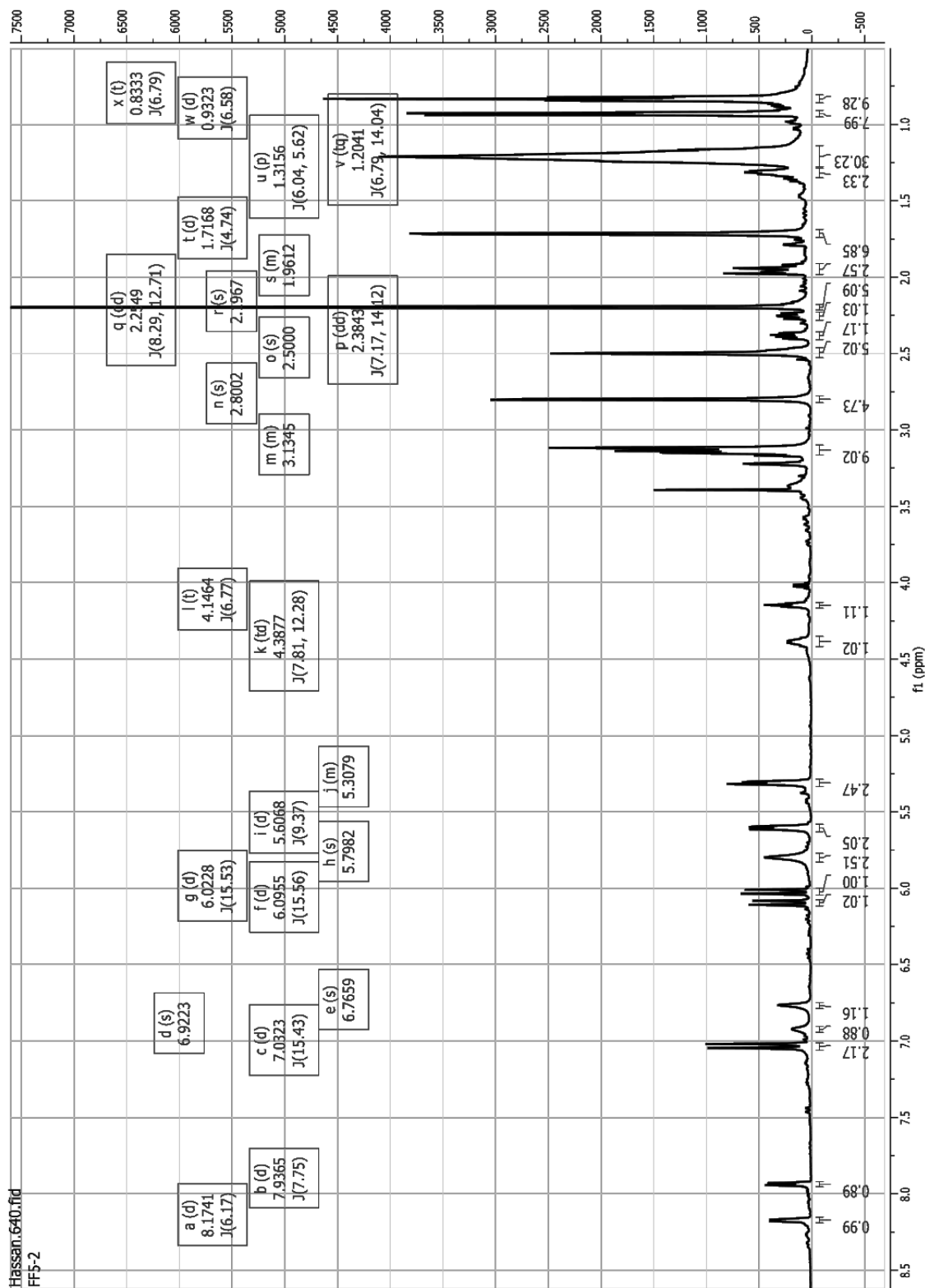


S8.1. ¹H NMR spectrum of aranosinol A (8) (600 MHz, DMSO).

Publikation 4: Supporting Information

S9. General information of aranorosinol B (9), including RT, UV and mass spectra.

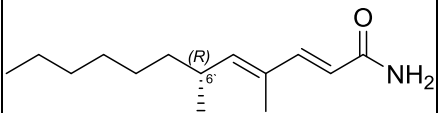
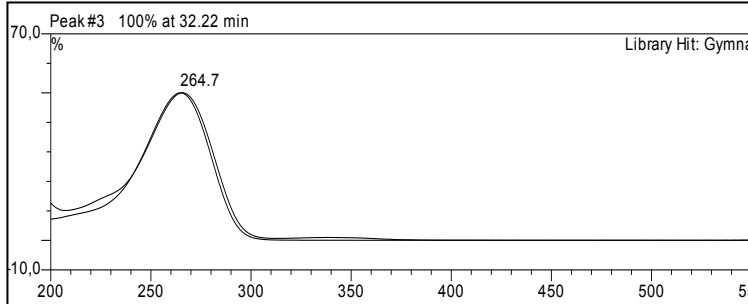
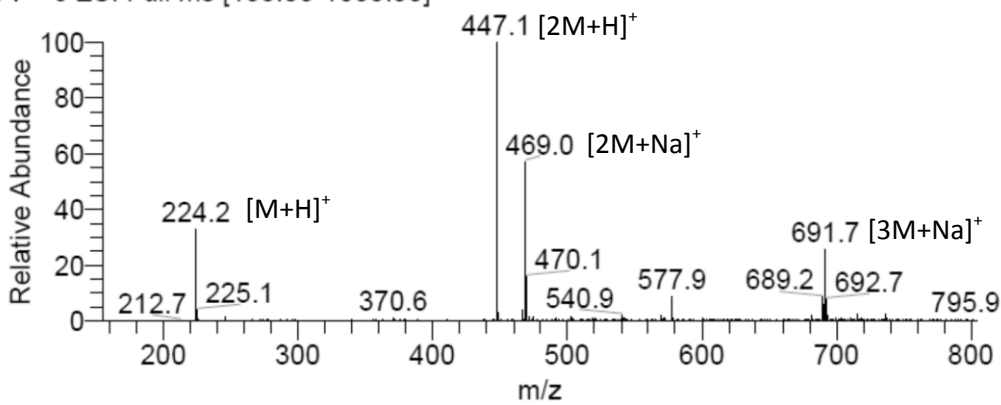
| Aranorosinol B | |
|---|---|
| Synonym(s) | (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>R</i>)- <i>N</i> -((1' <i>R</i> ,2 <i>r</i> ,3' <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5' <i>R</i> ,7' <i>S</i>)-5,6'-dihydroxy-6'-(2-oxopropyl)dihydro-3 <i>H</i> -4',8'-dioxaspiro[furan-2,2'-tricyclo[5.1.0.0 ^{3,5}]octan]-4-yl)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide |
| Samples code | FF5-2 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 80 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₆ H ₃₉ NO ₇ |
| Molecular weight | 477 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -11.1° (c 0.1, CHCl ₃) |
| Retention time (HPLC) | 31 min |
|  | <div style="text-align: center;">UV</div>  |
| MS | <p>lena251 #1229 RT: 34.42 AV: 1 NL: 9.61E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>lena251 #1231 RT: 34.46 AV: 1 NL: 4.61E7 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

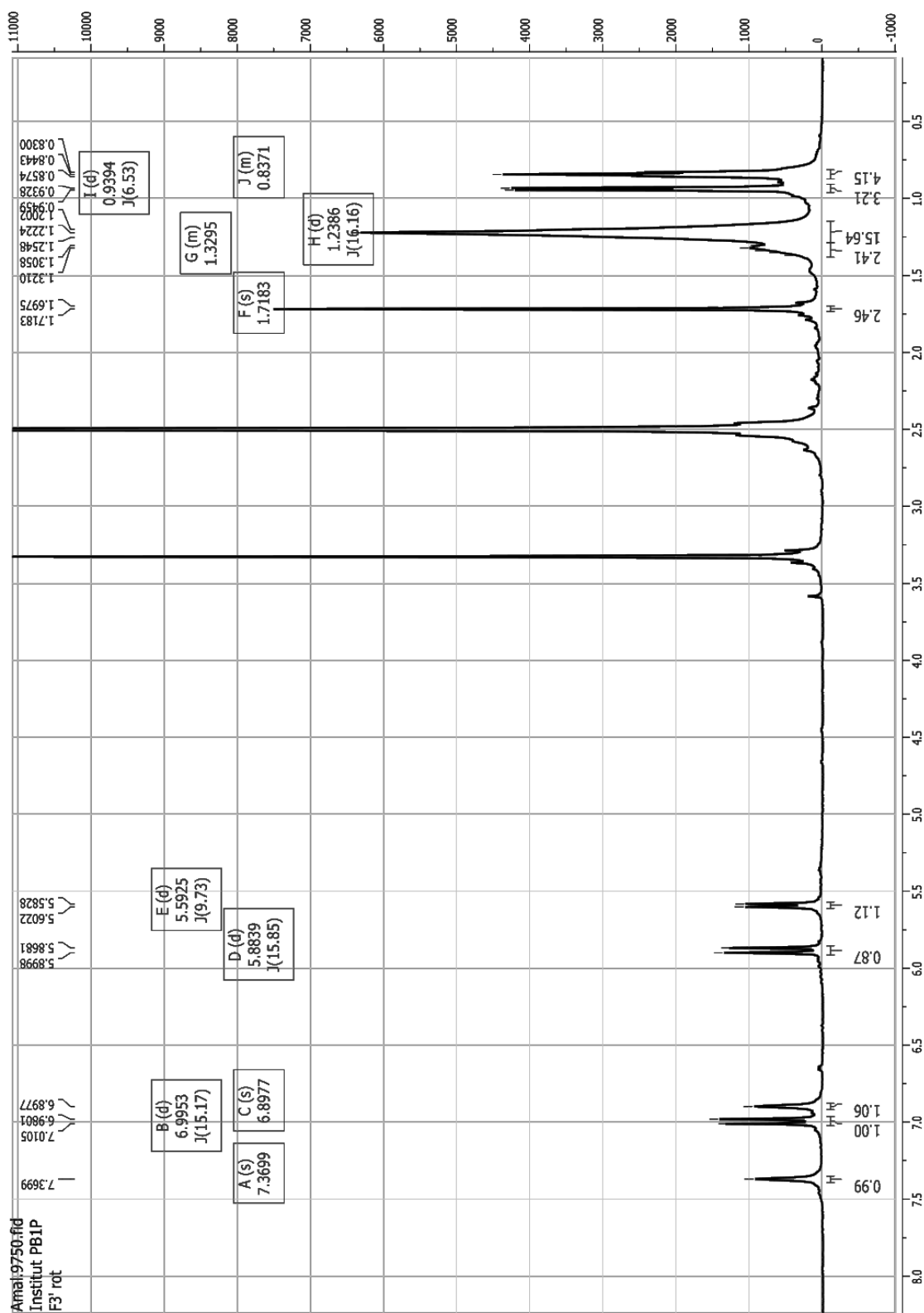


S9.1. ¹H NMR spectrum of aranosinol B (9) (600 MHz, DMSO).

Publikation 4: Supporting Information

S10. General information of gymnamide (10), including RT, UV and mass spectra.

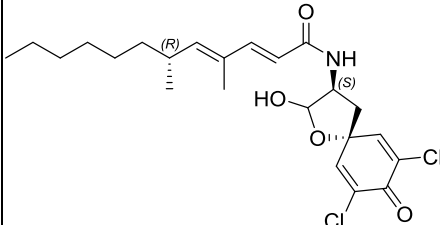
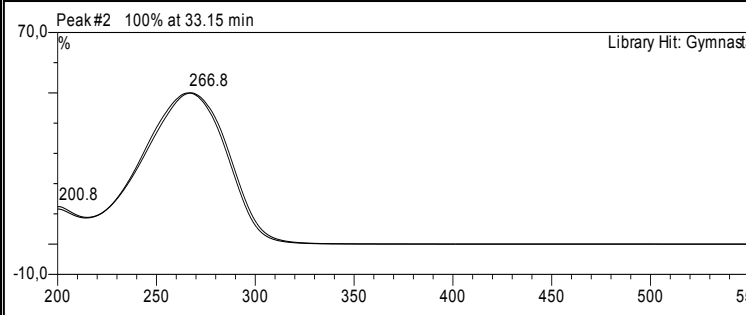
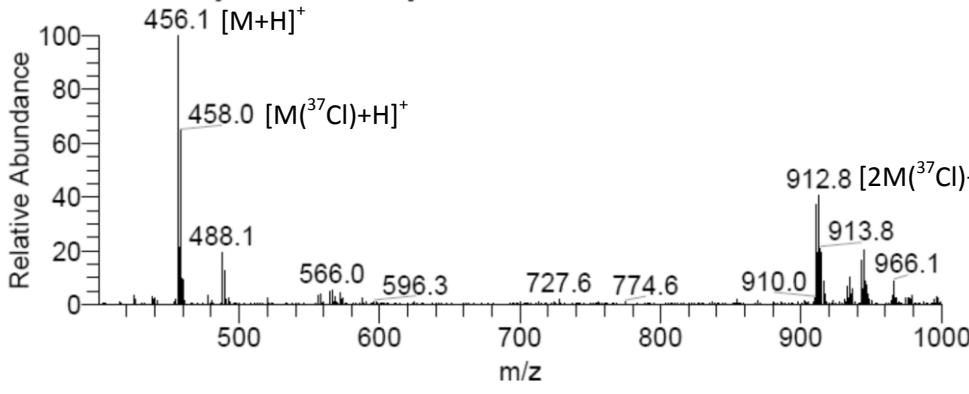
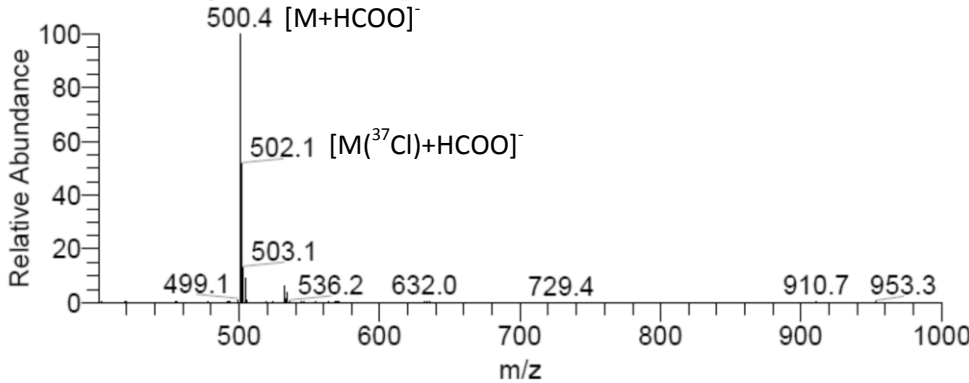
| Gymnamide | |
|---|--|
| Synonym(s) | (6 <i>R</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide |
| Samples code | F'3 rot |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 57 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₁₄ H ₂₅ NO |
| Molecular weight | 223 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -14.0° (c 0.5, CHCl ₃) |
| Retention time (HPLC) | 32 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  |
| MS | <p>lena261 #1287 RT: 36.06 AV: 1 NL: 4.83E8 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

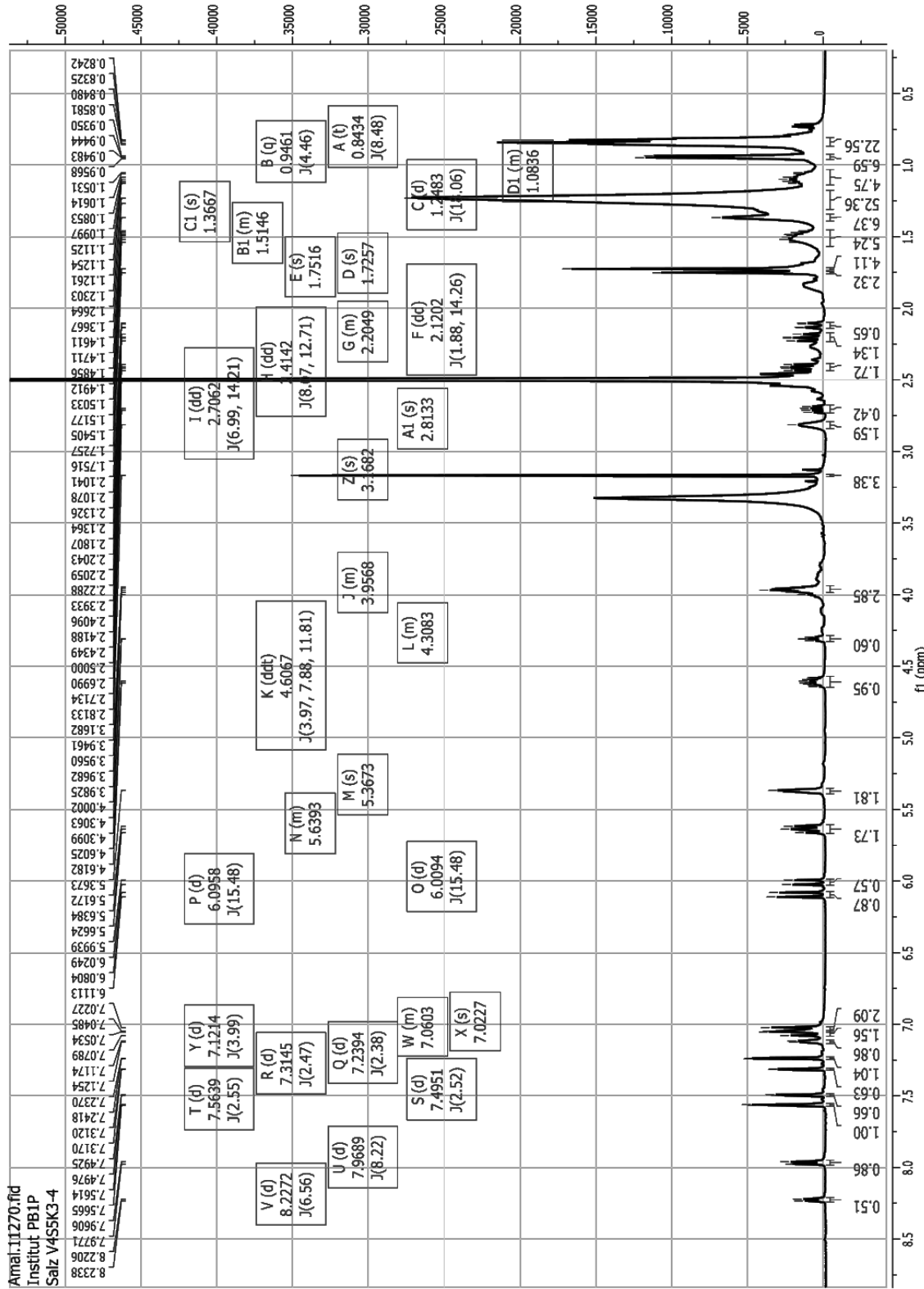


S10.1. ¹H NMR spectrum of gymnamide (10) (500 MHz, DMSO).

Publikation 4: Supporting Information

S11. General information of gymnastatin A (11), including RT, UV and mass spectra.

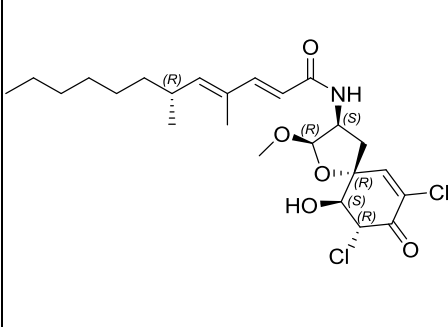
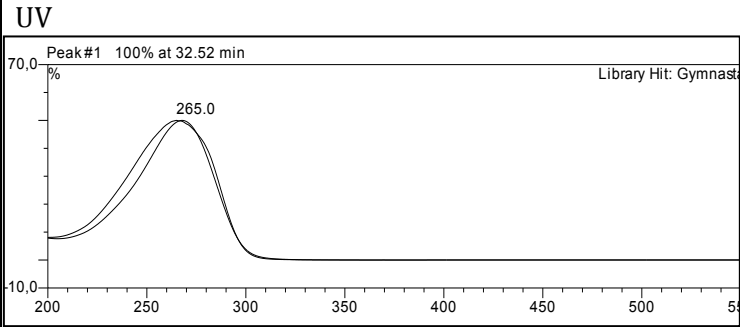
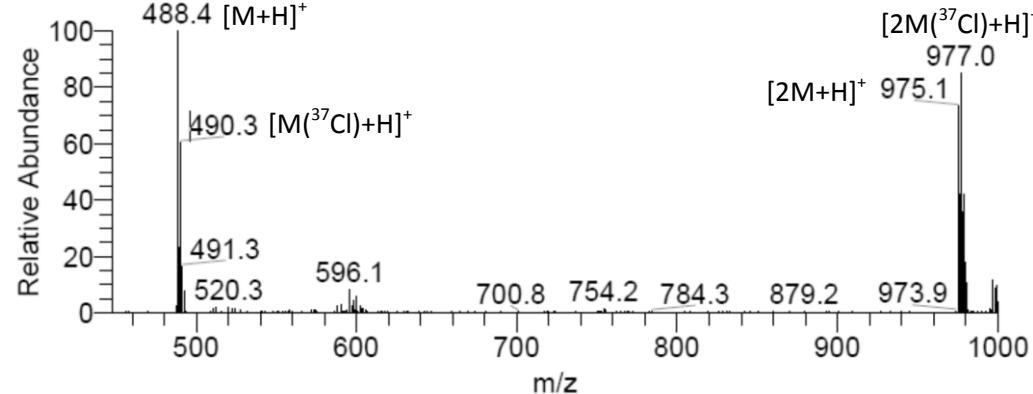
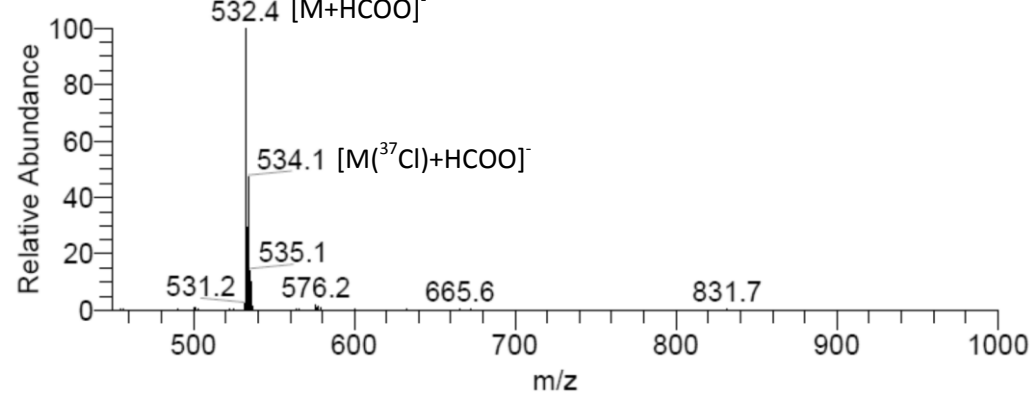
| Gymnastatin A | |
|---|---|
| Synonym(s) | (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>R</i>)- <i>N</i> -((3 <i>S</i>)-7,9-dichloro-2-hydroxy-8-oxo-1-oxaspiro[4.5]deca-6,9-dien-3-yl)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide |
| Samples code | Salz V4 S5 K3-4 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 2 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₃ H ₃₁ Cl ₂ NO ₄ |
| Molecular weight | 455 and 457 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -7.5° (<i>c</i> 0.2, CHCl ₃) |
| Retention time (HPLC) | 32 and 33 min (not separable) |
|  | UV  |
| MS | <p>Lena419 #1246 RT: 35.58 AV: 1 NL: 1.15E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena419 #1248 RT: 35.64 AV: 1 NL: 6.74E6 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |

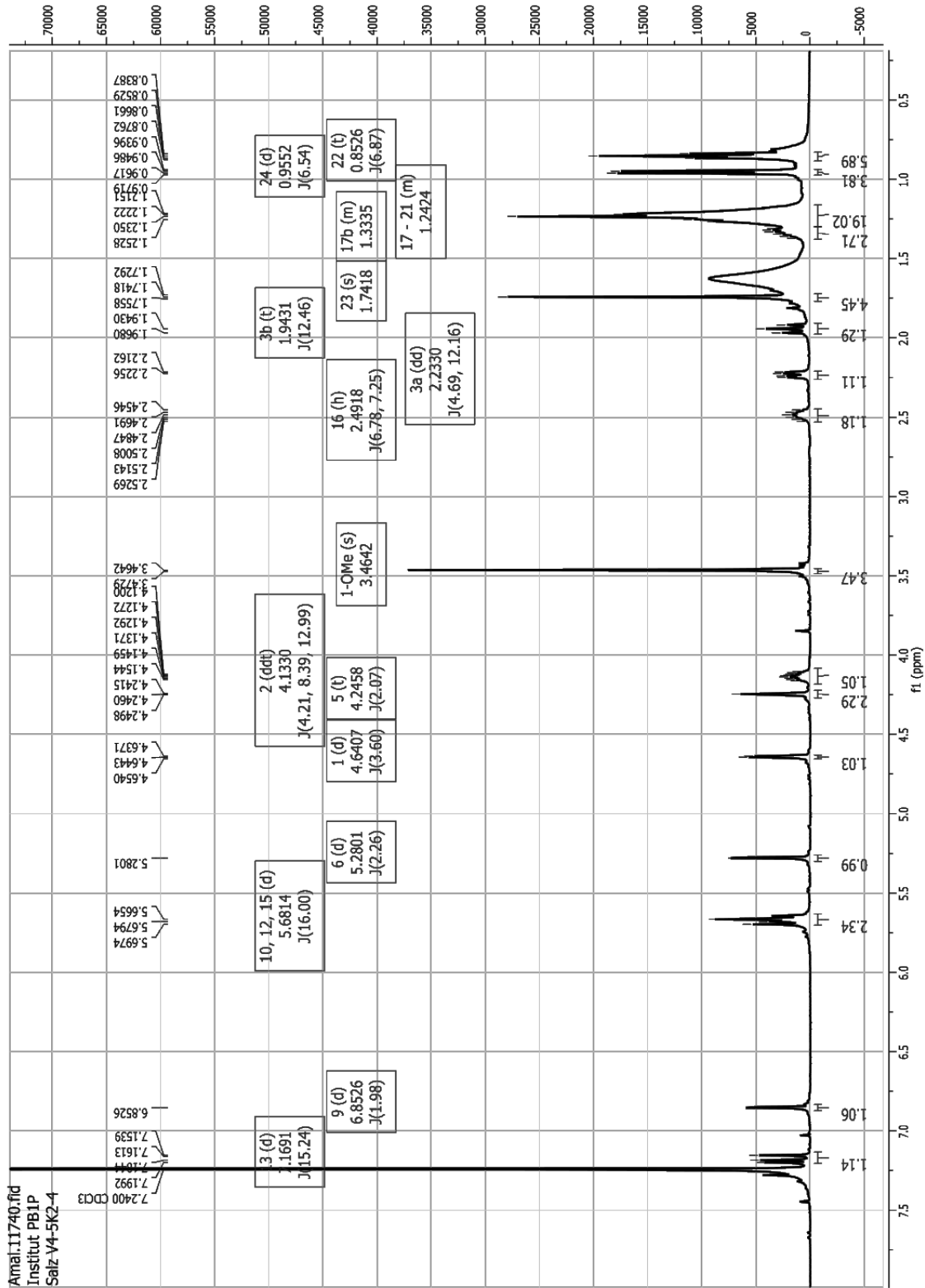


S11.1. ¹H NMR spectrum of gymnastatin A (11) (500 MHz, DMSO).

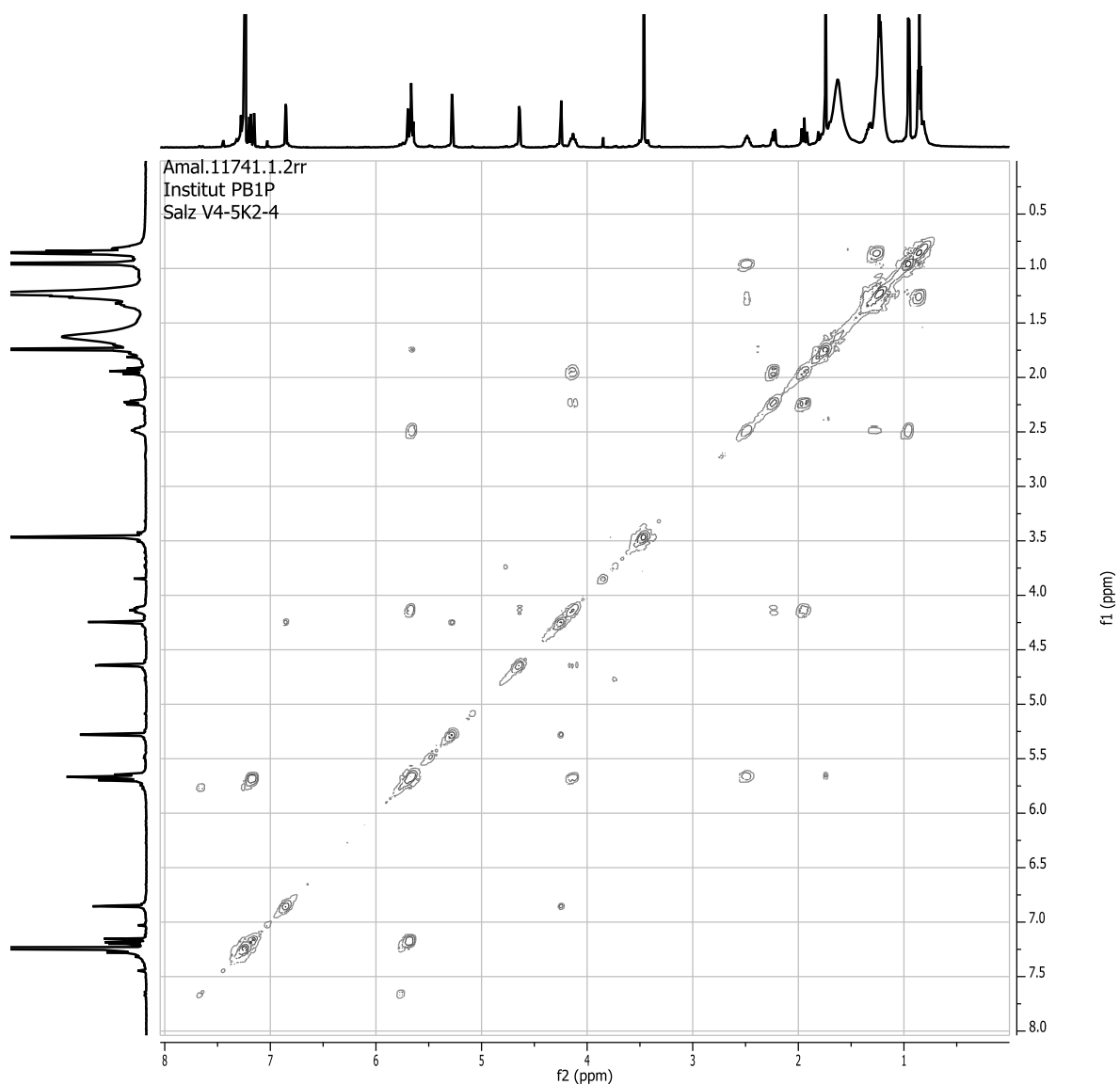
Publikation 4: Supporting Information

S12. General information of gymnastatin B (12), including RT, UV and mass spectra.

| Gymnastatin B | |
|--|---|
| Synonym(s) | (6 <i>R</i> ,2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -((2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>S</i>)-7,9-dichloro-10-hydroxy-2-methoxy-8-oxo-1-oxaspiro[4.5]dec-6-en-3-yl)-4,6-dimethyldodeca-2,4-dienamide |
| Samples code | Salz V4 S5 K2 Semi4+5, Salz V4 S5 K1 Semi1 |
| Biological source | <i>Gymnascella dankaliensis</i> |
| Sample amount | 2 mg |
| Physical description | White to yellow shining solid |
| Molecular formula | C ₂₄ H ₃₅ Cl ₂ NO ₅ |
| Molecular weight | 487 and 489 g/mol |
| OR [α] _D ²⁰ | -93.9° (c 0.18, CHCl ₃) |
| Retention time (HPLC) | 33 min |
|  | <p style="text-align: center;">UV</p>  |
| MS | <p>Lena435 #1058 RT: 30.26 AV: 1 NL: 2.22E7 F: + c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  <p>Lena435 #1060 RT: 30.30 AV: 1 NL: 7.07E6 F: - c ESI Full ms [100.00-1000.00]</p>  |



S12.1. ¹H NMR spectrum of gymnastatin B (12) (500 MHz, CHCl₃).



S12.2. ^1H - ^1H COSY spectrum of gymnastatin B (12) (500 MHz, CHCl_3)

5 Diskussion

5.1 Polyketide und ihre Wirkungen

Die meisten der pilzlichen Sekundärmetabolite werden auf dem Polyketidbiosyntheseweg produziert. Die Substanzklasse der Polyketide umfasst sehr unterschiedliche Strukturen und funktionelle Gruppen: So variieren sie von der aromatischen Orsellinsäure über das pentazyklische Aflatoxin B₁ bis hin zu den nichtaromatischen Makroliden oder dem Dekalin Lovastatin. Daraus resultieren ihre unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften (Barton et al., 1999; Cox and Simpson, 2009; Dewick, 2009a; Weissman, 2009). Aflatoxine sind karzinogene dekahaketidische Mykotoxine aus *Aspergillus flavus* und *A. parasiticus*, die bei Aufnahme zu Lebertumoren führen können (Forth et al., 1998). Makrolide aus Streptomyceten hingegen werden als Antibiotika eingesetzt, weil sie die Proteinbiosynthese von Bakterien durch Inhibition der 50S-Ribosom-Untereinheit hemmen. Lovastatin stammt aus *Aspergillus terreus* und wird als Serum-Cholesterinsenker eingenommen, weil es die Neusynthese von Cholesterin durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase unterdrückt (Forth et al., 1998; Mutschler et al., 2001). Auch in der Agrarwirtschaft finden Polyketide Anwendung. In diesem Zusammenhang ist das aromatische Hexaketid Strobilurin A, aus *Strobilurus tenacellus* als antifungaler Wirkstoff zu nennen (Anke et al., 1977; Bartlett et al., 2002).

5.1.1 Polyketidsynthesen

Die Polyketidsynthase (PKS von **P**oly**k**etidsynthase) kann in drei Typen oder Klassen unterteilt werden. PKS Typ I ist bei Pilzen und Bakterien zu finden, Typ II ausschließlich bei Bakterien und Typ III bei Pflanzen, Pilzen und Bakterien. Sie unterscheiden sich neben dem Vorkommen auch in ihrem Aufbau: PKS Typ I ist wie die Fettsäuresynthase (FAS von **F**atty **a**cid **s**ynthase) ein großes multifunktionales Enzym mit individuellen Domänen, während PKS Typ II ein monofunktionales Enzym ist und oft als „minimale PKS“, bestehend aus einer **K**etosynthase (KS) und einem **A**cy**C**arrier-**P**rotein (ACP), bezeichnet wird. Als Startereinheit verwendet die PKS Typ I Acetyl- oder Propionyl-CoA, wohingegen die Starter bei Typ II variabel sind. Die Ketten verlängernden Einheiten sind bei Typ I Malonyl-CoA oder Methylmalonyl-CoA und bei Typ II ausschließlich Malonyl-CoA. Beide verwenden ACP, um die Acyl-CoA-Einheiten zu aktivieren. PKS Typ III unterscheidet sich sehr von den anderen beiden Synthesen. Sie ist ein Homodimer mit

Diskussion

nur einem aktiven Zentrum und verwendet kein ACP, sondern die Coenzym-A-Ester. Als Startereinheiten werden Cinnamoyl-CoA oder 4-Hydroxycinnamoyl-CoA verwendet, die im Shikimat-Biosyntheseweg aus den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin entstehen. Die Kettenverlängerungseinheit ist Malonyl-CoA (Cox and Simpson, 2009; Dewick, 2009a; Weissman, 2009).

Die wichtigsten Vertreter der aus Typ I gebildeten Substanzen sind die Makrolide, Typ II bildet unterschiedliche Polyphenole aus. Typ III, die auch als Chalcon- oder Stilben-Synthase bezeichnet wird, bildet, wie die Namen schon andeuten, Chalcone, Stilbene und Styrylpyrone aus (Cox and Simpson, 2009; Dewick, 2009a; Weissman, 2009).

Die pilzliche Typ I PKS wird weiter in die modulare und iterative PKS unterteilt. Die modulare Typ I PKS besitzt Module, die aus unterschiedlichen Enzymen zusammengesetzt sind. Das Edukt wird von den Enzymdomänen in einem Modul verändert und anschließend zum nächsten Modul weitergereicht. Auf diese Weise durchläuft das Polyketid nacheinander unterschiedliche Module bis zu seiner Fertigstellung. Bei der iterativen PKS werden die gleichen Enzymdomänen mehrfach angelaufen, wobei nicht genau bekannt ist, wie die iterative Typ I PKS zwischen den einzelnen „Reduktionsgraden“ der Produkte unterscheiden kann (Cox and Simpson, 2009; Staunton and Weissman, 2001). In der vorliegenden Arbeit wird nicht zwischen den einzelnen Typen der PKS bzw. der iterativen und modularen Typ I PKS unterschieden.

Die PKS können enzymatische Untereinheiten wie **Malonyl/Acyltransferase (MAT)**, **Acyl-Carrier-Protein (ACP)**, **Ketosynthase (KS)**, **Ketoreduktase (KR)**, **Dehydrase (DH)**, **Enoylreduktase (ER)** und **Thioesterase (TE)** besitzen. Die MAT überträgt den Coenzym-A-Ester auf das ACP bzw. auf die KS. Die KS verknüpft die Kettenverlängerungseinheit am ACP mit der Startereinheit an der KS durch eine Claisen-Reaktion. Die KR reduziert mit Hilfe von NADPH das entstehende Keton zum Alkohol. Die DH spaltet diesen Alkohol unter Bildung einer Doppelbindung ab. Die ER reduziert wiederum mit Hilfe von NADPH die Doppelbindung zu einer aliphatischen Bindung. Die TE entlässt das Produkt (Dewick, 2009a).

Fettsäuren können zu den Polyketiden gezählt werden. Allerdings wird diese Zuordnung kontrovers diskutiert. Einerseits entstehen sie aus Acetyl-CoA-Einheiten, was die Polyketide ausmacht, andererseits gehören sie zu den primären Metaboliten, nicht zu den sekundären Metaboliten wie die PK. Der Unterschied zwischen den PKS und FAS

besteht in ihrer „Programmierung“: PKS bewirken unterschiedliche Reaktionen des Edukts wie Zyklisierung und Aromatisierung durch unterschiedliche TE oder Aromatasen. FASs kontrollieren lediglich die Kettenlänge des Produkts (Barton et al., 1999; Dewick, 2009a; Weissman, 2009). Es wurden bereits zwei TE mit Claisen-Cyclase- und Decarboxylase-Eigenschaften entdeckt (Fujii et al., 2001; Vagstad et al., 2012).

Der Polyketidstoffwechselweg ist mit anderen Stoffwechselwegen wie dem Shikimat-Weg und den primären Stoffwechselwegen verbunden. So kann durch die Kombination unterschiedlicher Startereinheiten mit unterschiedlichen Kettenverlängerungseinheiten und durch Verknüpfung von Metaboliten aus unterschiedlichen Stoffwechselwegen die Vielfalt der Polyketide noch erhöht werden. Im Vergleich zu Bakterien können Pilze unterschiedliche PKS bilden, in dem Spleißvorgänge und unterschiedliche Leseraster die RNA verändern.

5.1.2 Pyron- und Lactonderivate

Pyron- oder Lactonderivate sind zyklische Ester, die im Falle des Lactons gesättigt und im Falle des Pyrons ungesättigt vorliegen. Sie sind vielfach in Polyketiden zu finden, die bedingt durch die Reaktivität einer Keto- und einer Hydroxygruppe bzw. eines aktivierten Thioesters und einer Hydroxygruppe entstehen (McGlacken and Fairlamb, 2005). In dieser Arbeit wird neben den α -Pyronen auch ein 4-Pyron bzw. Chromon beschrieben.

Für Pyron- und Lactonderivate sind die unterschiedlichsten Wirkungen beschrieben. Einige zytotoxische Beispiele sind das Nigerapyron E aus *Aspergillus niger* (Liu et al., 2011) und Dihydroinfectopyron aus *Petriella* sp. (Proksch et al., 2008). Auch sind die Herz wirksamen Bufadienolide mit einem Pyronring ausgestattet, die in Kröten (*Bufo* sp.), in Christrosen (*Helleborus niger*) oder in Meerzwiebeln (*Urginea maritima*) vorkommen. Außerdem sind Berichte über Wirkungen bei HIV und Alzheimer von McGlacken und Fairlamb zusammengefasst (McGlacken and Fairlamb, 2005). Die im Zuge dieser Arbeit isolierten Pyron- und Lactonderivate aus dem Pilz *Acremonium strictum* sind in *Abbildung 2* zusammengefasst.

Biosynthetisch ist Acropyron aus der Startereinheit Acetyl-CoA entstanden, das jeweils im Wechsel mit einem Malonyl-CoA und zwei Methylmalonyl-CoA oder mit drei Malonyl-CoA mit anschließenden Methylierungsreaktionen verknüpft wird.

Diskussion

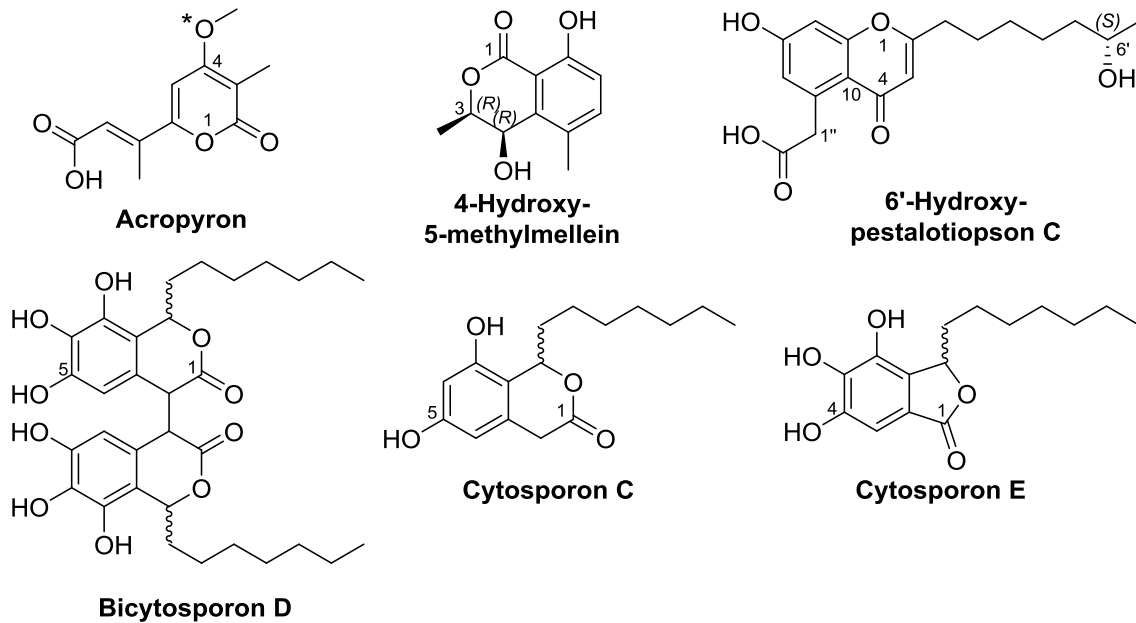


Abbildung 2: Strukturen der in dieser Arbeit isolierten Pyron- und Lactonderivate aus *Acremonium strictum*.

Abraham *et al.* konnten durch Einbauversuche mit Methionin-methyl- d_3 anhand des Fusalanipyrons zeigen, dass die deuterierte Methylgruppe gar nicht, einmal oder auch zweimal (in Position 3 und der Seitenkette) eingebaut werden kann. Hiermit bewiesen sie zum ersten Mal, dass trotz Anwendung der Isopren-Regel diese Substanz auf dem PK-Weg aufgebaut wird (Abraham *et al.*, 1990). Durch Reduktionen werden die Doppelbindungen gebildet. Die endständige Methylgruppe wird zur Carbonsäure oxidiert. Mittels *S*-Adenoyl-Methionin-Methyltransferase (SAM) wird die Hydroxygruppe in Position 4 (mit Sternchen markiert) zur Methoxygruppe methyliert. Durch die Thioesterase kommt es zur Lactonierung (Dewick, 2009a; McGlacken and Fairlamb, 2005).

Das im Rahmen der Arbeit isolierte Acropyron ist mit den Gibepyrone aus *Gibberella* sp. (Barrero *et al.*, 1993) verwandt. Gibepyrone A besitzt ein Proton in Position 4 und im Gegensatz zum Acropyron keine Methoxygruppe. Es zeichnet sich durch eine But-2-en-Seitenkette aus, während Acropyron eine But-2-ensäure besitzt. Gibepyrone weist eine geringe antibakterielle Wirkung (MHK 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gegenüber *B. subtilis* auf (Barrero *et al.*, 1993). Für Acropyron konnte keine Bioaktivität festgestellt werden. Dieses kann an den beschriebenen strukturellen Unterschieden liegen. Es kann allerdings auch an der unterschiedlichen Durchführung der antibiotischen Assays liegen. Die für die Arbeitsgruppe Proksch durchgeführten antibiotischen Tests beginnen bei einer Konzentration von 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Diese Anfangskonzentration wurde aufgrund ihrer

Diskussion

klinischen Relevanz gewählt. Auf dem Markt befindliche Antibiotika wie Ciprofloxacin haben eine MHK von 0,06 bis 2 µg/mL gegenüber Gram-positiven und Gram-negativen Keimen. Barrero *et al.* haben mit einer Konzentration von 200 µg/mL begonnen (Barrero et al., 1993).

4-Hydroxy-5-methylmellein ist ähnlich aufgebaut wie das oben beschriebene Acropyron. Es besteht aus drei Malonyl- und einem Methylmalonyl-CoA. Die Methylgruppe in Position 3 zeigt die Startereinheit Acetyl-CoA an. Durch Reduktase- und Aromataseaktivität kommt es zur Aromatisierung, wobei die Keto- bzw. Hydroxygruppe in Position 6 durch eine Dehydrogenase abgespalten wird. Durch Oxidation wird die Hydroxygruppe in Position 4 angebracht und durch die Abspaltung von dem Enzymkomplex kommt es zur Ausbildung der Lactonstruktur (Dewick, 2009a).

Die angenommene Biosynthese der Cytosporonderivate ist in *Abbildung 3* in Anlehnung an Brady *et al.* gezeigt (Brady et al., 2000). An den Acetyl-Starter werden mit Hilfe der Ketosynthese sieben Malonyl-CoA gebunden. Durch Reduktasen und Dehydrogenasen wird die Seitenkette und durch eine Aromatase der Aromat gebildet. So entsteht Cytosporon C. Durch β -Decarboxylierung des Oktaketides und anschließende C-O-Zyklisierung durch TE entsteht Cytosporon E. Die Hydroxylierung des Aromaten in Position 6 kann vor oder nach der Lactonbildung entstehen (in *Abb. 3* mit Sternchen gekennzeichnet).

Die Dimerisierung zu Bicytosporon D entsteht wahrscheinlich über eine Laccase oder Peroxidase katalysierte Radikalreaktion, wie es für die Johanneskraut-Substanz Emodin-Dianthron oder auch für die Sennoside A und B aus *Cassia angustifolia* beschrieben wurde (Dewick, 2009a). Solche Reaktionen sind post-PKS-Modifikationen und konnten durch Isolierung einzelner Enzyme für Emodin-Dianthron bzw. Sennoside bestätigt werden (ebenda).

Cytosporon E zeigte moderate zytotoxische Aktivität sowohl gegenüber der humanen Cisplatin sensitiven Ovarialkarzinomzelllinie A2780 sens als auch der Cisplatin resistenten Ovarialkarzinomzelllinie A2780 CisR mit IC₅₀-Werten von 8,3 bzw. 19,0 µM. Darüber hinaus hemmte es die humane Kolorektalkrebszelllinie HCT 116 mit einem IC₅₀-Wert von 35,4 µM. Aus der Literatur ist eine Wirksamkeit gegenüber Bakterien bekannt, die in dieser Arbeit bestätigt werden konnte (Brady et al., 2000).

Diskussion

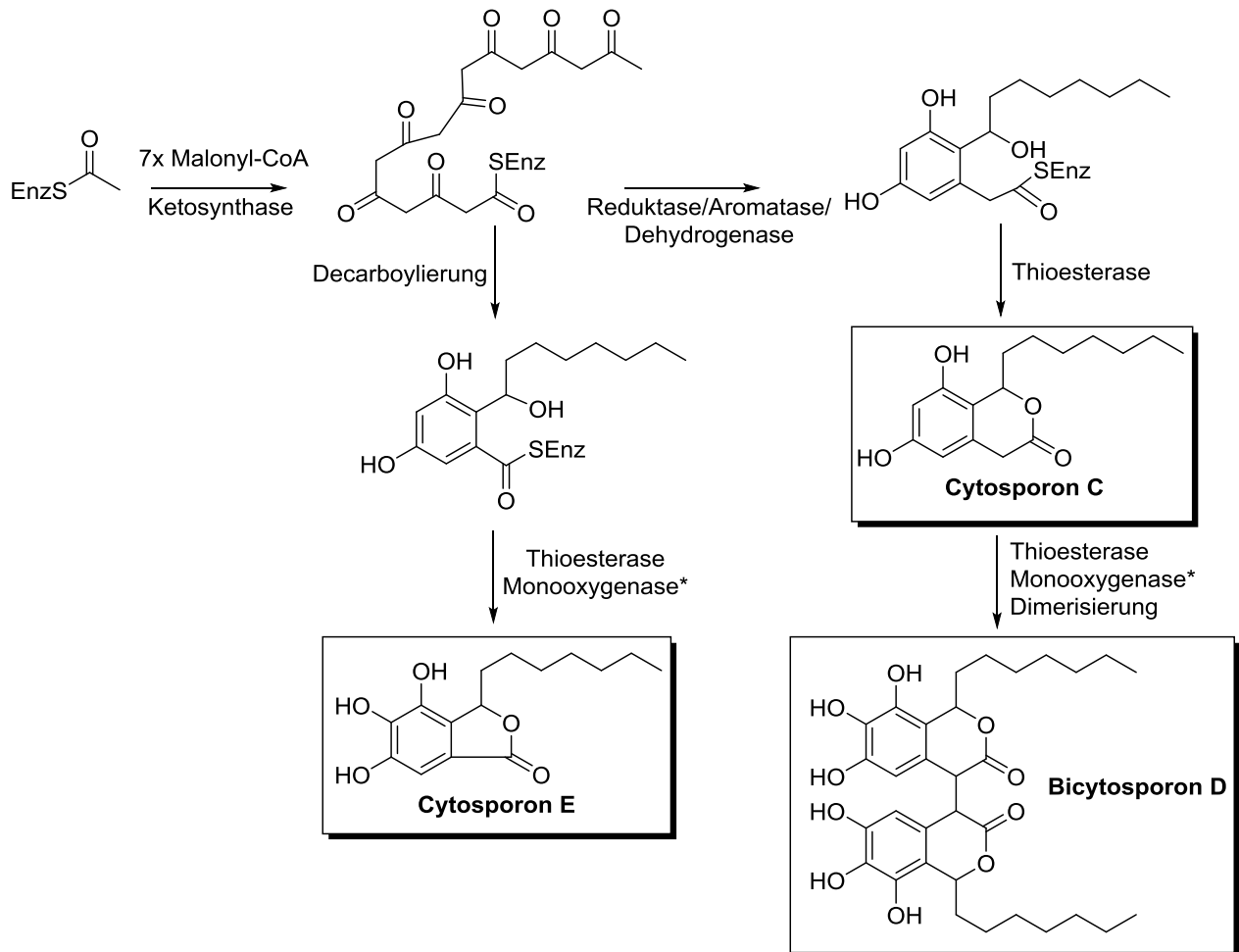


Abbildung 3: Postulierte Biosynthese der Cytosporone (Brady et al., 2000).

Für das 4-Pyronderivat 6`-Hydroxypestalotiopson C wurde bisher kein Biosyntheseweg beschrieben. Visnagin und Khellin werden über das 5,7-Dihydroxy-2-methylchromon aufgebaut, die jedoch in Position 2 nur eine Methylgruppe und keine Heptanseitenkette und in Position 5 eine Hydroxygruppe und keinen Essigsäurerest besitzen (Dewick, 2009a). Ausgehend von der Biosynthese von Visnagin bzw. Khellin kann die Methylgruppe in Position 2 durch die PKS verlängert werden. Im nächsten Schritt müsste die Hydroxygruppe in Position 5 abgespalten und an ihrer Stelle eine Essigsäure eingebaut werden. Da diese Reaktionen viel enzymatischen Aufwand bedeuten würden, wird ein anderer, einfacherer Weg vorgeschlagen, der in *Abbildung 4* gezeigt ist. Der Unterschied liegt in der „Faltung“ der Ketidkette: Das Chromon wird aus einem Nonaketid aufgebaut. Die Bildung des Heterozyklus erfolgt wie bei der Biosynthese von Khellin und Visnagin: Durch Keto-Enol-Tautomerie entsteht eine Doppelbindung zwischen Position 2 und 3. Diese wird durch die aromatische Hydroxygruppe nukleophil angegriffen und der heterozyklische Ring entsteht.

Diskussion

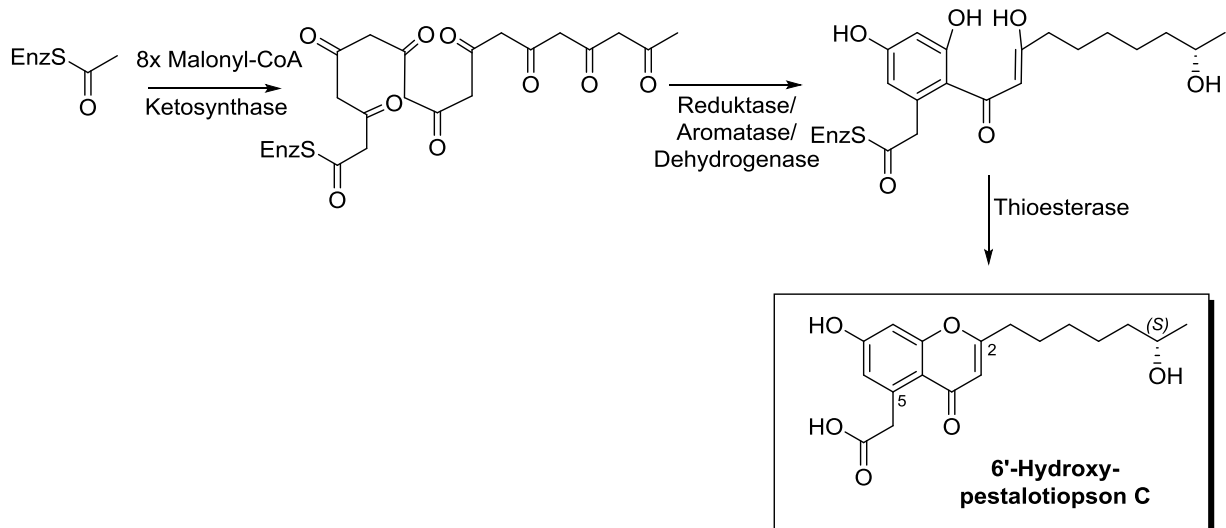


Abbildung 4: Postulierter Biosyntheseweg des 6'-Hydroxypestalotiopson C.

Chromone wurden unter anderem als Inhibitoren der Melaninbiosynthese durch Hemmung der Tyrosinase identifiziert (Buchholz et al., 2010; Oonuma et al., 1993). Ein Hinweis, dass auch 6'-Hydroxypestalotiopson C Einfluss auf den Melaninstoffwechsel hat, könnte das ebenfalls im Zuge dieser Arbeit aus dem Endophyten *Acremonium* isolierte Isoscleron sein. Durch Akkumulation von Tetrahydronaphthalin entsteht Isoscleron während der Melaninsynthese (Buchholz et al., 2010; Oonuma et al., 1993). Melanine tragen zur Virulenz eines Pilzes bei, indem sie die Penetration erleichtern. Durch Glycerinakkumulation in melanisierten Zellwänden wird ein höherer Turgordruck generiert. Weiterhin blockt Melanin Abwehrmechanismen der Pflanze wie Bildung von ROS oder Enzymen (Nosanchuk and Casadevall, 2003; Nosanchuk and Casadevall, 2006). Auf Basis dieser Erkenntnisse kann folgende These aufgestellt werden: Endophytische Pilze können ihre Pathogenität reduzieren, indem sie Substanzen wie z.B. Chromone bilden, die die Melaninsynthese hemmen.

5.1.3 Weitere Polyketide

Die Verbindungen Questinol (Anthrachinon), Sulochrin (Benzophenon) und Asterriksäure (Diphenylether) entstehen auf demselben Biosyntheseweg. Ausgehend von einem Octaketid aus Acetyl-CoA als Starter und sieben Malonyl-CoA-Einheiten wird mittels Aromatisierung, Oxidation und Decarboxylierung das Anthrachinon Emodin gebildet. Aus diesem entsteht dann durch Methylierung und Hydroxylierung das isolierte Questinol. Emodin wird mittels Oxigenase zum Sulochrin aufgespalten

Diskussion

(Hargreaves et al., 2002; Simpson, 2012). Es wird angenommen, dass die Umwandlung von Sulochrin in Asterricsäure analog zur Geodinbiosynthese abläuft. Geodin wird mittels einer Halogenase und einer Multikupfer-Dihydrogeodin- bzw. einer durch CYP450 katalysierten Oxidase durch phenolische, oxidative Kopplung aus Sulochrin über Dehydrogeodin gebildet (Cacho et al., 2013; Huang et al., 1995). Durch eine Oxidase wird ein Grisandien gebildet. Durch Angriff der Ketogruppe des Lactonrings mittels einer Hydroxygruppe kommt es zur Ringöffnung und durch Rearomatisierung entsteht Asterricsäure (Abbildung 5).

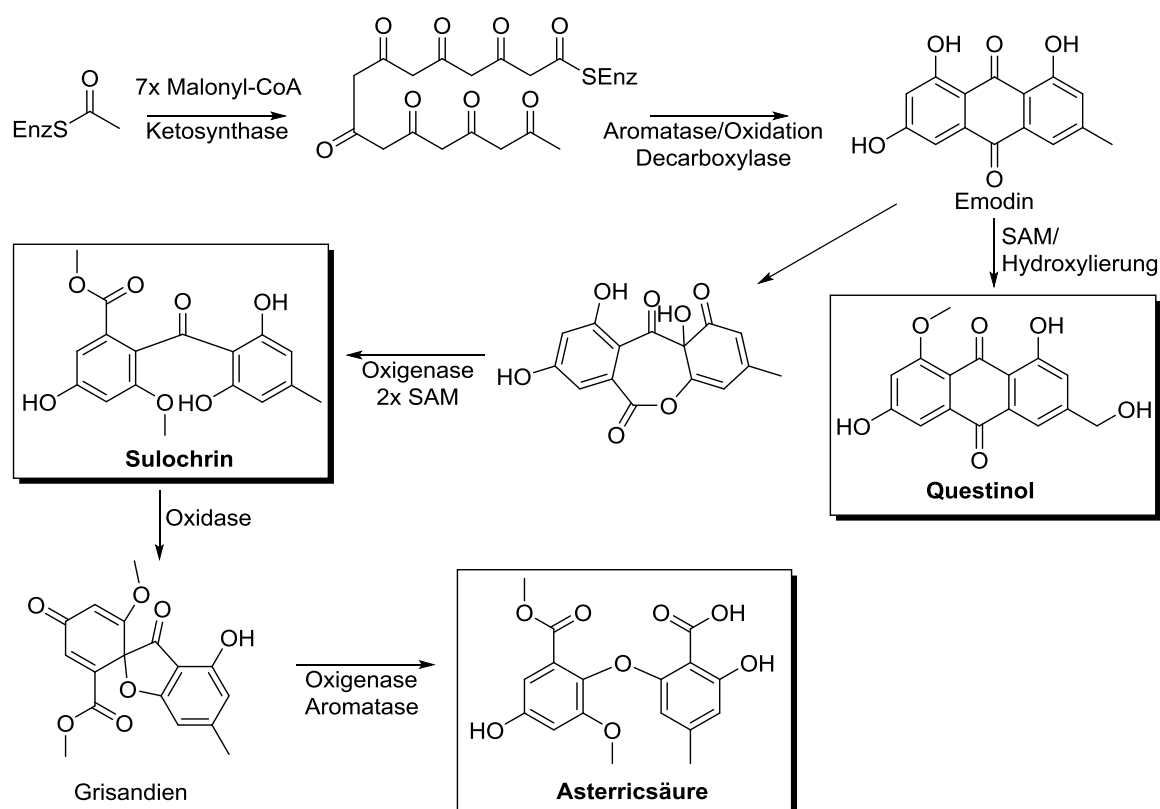


Abbildung 5: Biosyntheseweg für Questinol, Sulochrin und Asterricsäure (Cacho et al., 2013; Hargreaves et al., 2002; Huang et al., 1995; Simpson, 2012).

6-Hydroxyisoscleron entsteht durch Autoxidation als Nebenprodukt bei der Hemmung der Melaninbiosynthese (Bruno and Sparapano, 2006; Vagstad et al., 2012). Durch Oxidation von 1,3,6,8-Tetrahydronaphthalin (THN) entsteht das Naphthochinon Flaviolin und durch Reduktion und Wasserabspaltung entsteht 6-Hydroxyisoscleron (Abbildung 6). Vagstad *et al.* konnten zeigen, dass Isoscleron mittels post-PKS-Veränderungen entstanden ist und eine Thioesterase mit Claisen-Cyclase- und Decarboxylase-Eigenschaften bei diesem Biosyntheseweg involviert ist. Weiterhin wurde das Zwischenprodukt Flaviolin isoliert (Vagstad et al., 2012). Diese Reaktion

Diskussion

kann auch für 6-Hydroxyisoscleron angenommen werden. Isosclerone (und Sclerone) sind phytotoxisch (Venkatasubbaiah and Chilton, 1992).

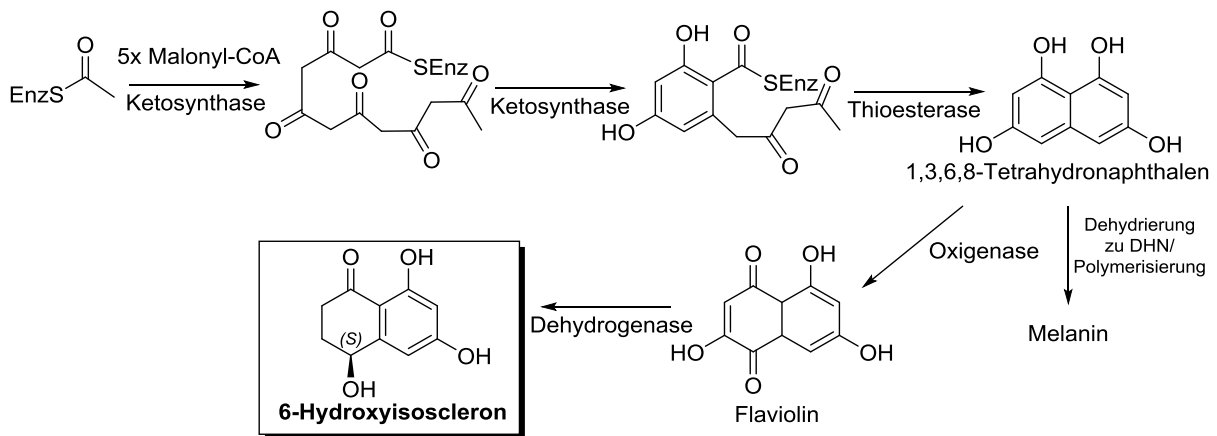


Abbildung 6: Biosynthese von 6-Hydroxyisoscleron (Vagstad et al., 2012).

Für Waolsäure und Waol A konnte in der Literatur kein Biosyntheseweg gefunden werden. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit eine Biosynthese postuliert: Eine Acetyl-CoA-Startereinheit wird mit drei Malonyl-CoA verknüpft, so dass ein Octaketid entsteht. Zwei dieser Octaketide könnten mittels Aldolreaktion unter Kohlendioxidabspaltung miteinander reagieren. Die Bildung zyklischer Ether ist aus marinen Organismen bekannt. Bei diesen wurde eine Epoxidringbildung postuliert, die durch die Isolierung der entsprechenden Enzyme bestätigt werden konnte (Hotta et al., 2012). Entsprechend kann bei der Waol-Biosynthese angenommen werden, dass entlang der in *Abbildung 7* markierten Bindung ein Epoxid entsteht. Dieses wird basen katalysiert durch eine Hydroxygruppe (in *Abb. 7* ist die Vorstufe, das Keton, mit Sternchen gezeichnet) nukleophil angegriffen. Das Epoxid öffnet sich unter Bildung einer Hydroxygruppe und es entsteht die Waolsäure. Durch die bekannten Reduktions-, Dehydrierungs- und Hydroxylierungsschritte, über deren Reihenfolge nur spekuliert werden kann, kann Waolsäure synthetisiert werden. Diese wird, wie bereits in Publikation 2 beschrieben, im Sauren unter Wasserabspaltung zu Waol A umgewandelt (*Abbildung 7*).

Waol A und der Methylester der Waolsäure Waol B zeigten zytotoxische Wirkungen auf unterschiedliche Zelllinien wie humane Leukämiezelllinie HL60 und murine Leukämiezelllinie P388 (Nozawa et al., 2000). Die Wirkung von Waol A konnte in dieser Arbeit durch Wachstumshemmung der Ovarialkarzinomzelllinien A2780 sens und CisR und der humanen Kolorektalzelllinie HCT116 mit IC₅₀-Werten von 27,1, 12,6 bzw. 22,7 µM bestätigt werden. Die Säure wies keine Wirkung auf.

Diskussion

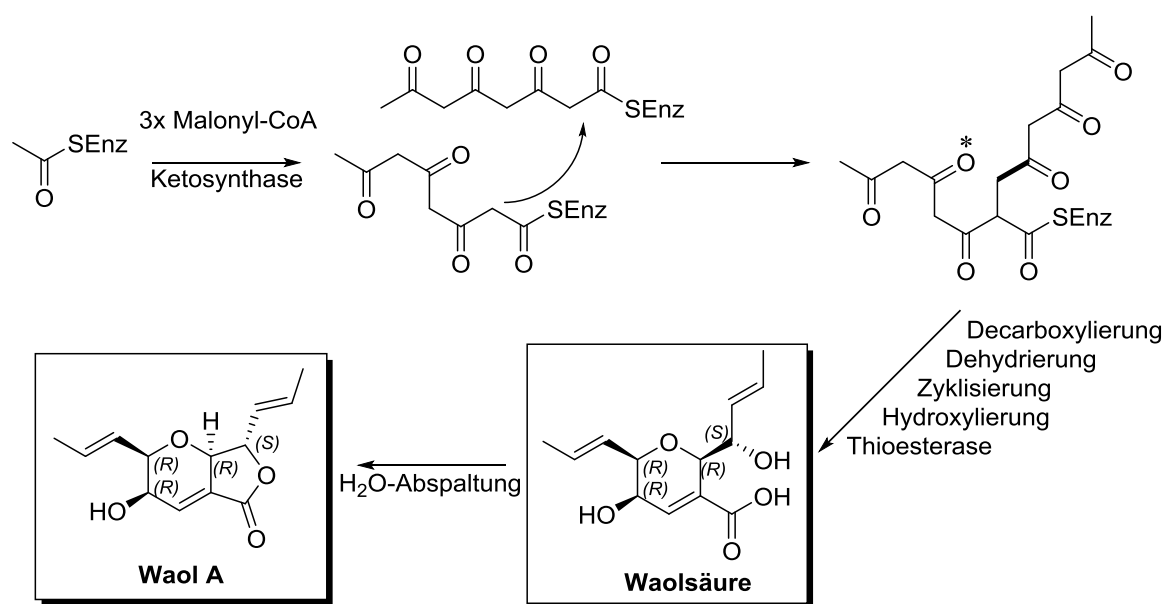


Abbildung 7: Hypothetische Biosynthese von Waol A über Waolsäure.

Für das Australifunginolderivat NBRI 17671 ist ebenfalls kein Biosyntheseweg in der Literatur bekannt. Dieses Dekalinderivat könnte wie das Dekalingerüst des Lovastatins mittels Diels-Alder-Zyklisierung aufgebaut werden. Durch SAM-Methylierung, Oxidation und Enolisierung wäre die Bildung der Substanz denkbar (*Abbildung 8*). Die Methylgruppen könnten aber auch durch Reaktion von Methylmalonyl-CoA in den entsprechenden mit Sternchen gekennzeichneten Positionen eingebracht worden sein. NBRI 17671 zeigte hier keine zytotoxische Wirkung. In der Literatur wurde das Aldehyd von NBRI 17671 als Downregulator der Aktivität des Mitogen-aktivierenden Proteinkinase (MAPK) beschrieben. Darüber hinaus hemmte Australifungin die Sphinganin-*N*-Acyltransferase, die bei der Sphingolipidbiosynthese eine Rolle spielt (Hensens et al., 1995; Mandala et al., 1995). Sphinganin wird zu Ceramid umgewandelt, was Apoptose auslösen kann. Sphingosin-1-phosphat, was wiederum aus Ceramid aufgebaut ist, wurde mit Metastasierung in Verbindung gebracht, da es für die Angiogenese, Proliferation und Zellmigration eine wichtige Rolle spielt (Barz, 2003).

Die drei aus *Xylaria* sp. isolierten Substanzen, Resacetophenon, Arugosin I und Xylarugosin, werden hier zusammen diskutiert, da sie biosynthetisch sehr ähnlich aufgebaut sind. Für Xanthonderivate gibt es einen Biosyntheseweg über Emodin, welches zu einem Xanthonderivat (siehe auch *Abbildung 5*) umgewandelt wird (Simpson, 2012).

Diskussion

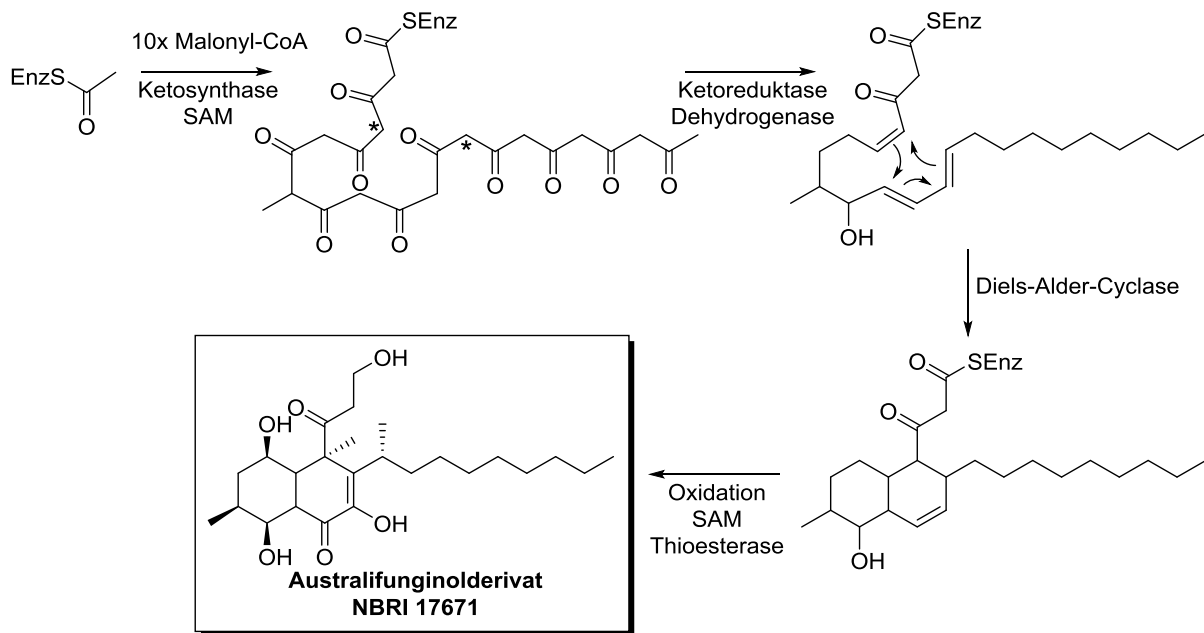


Abbildung 8: Hypothetische Biosynthese des Australifunginolderivats NBRI 17671.

Wenn dieser Syntheseweg für die neuen *Xylaria*-Derivate Arugosin J und Xylarugosin angenommen wird, würde so das Substitutionsmuster des zweiten Aromaten nicht übereinstimmen. Daher wurde ein anderer Biosyntheseweg postuliert. Wie bereits in Publikation 3 erwähnt wurde, besitzen Arugosin J und Xylarugosin das ebenfalls isolierte Resacetophenon als Untereinheit (markiert in *Abbildung 9*). Auch Alboatrin, welches die zweite Teilstruktur des Xylarugosins darstellt, konnte bereits von Ichihara *et al.* isoliert werden, so dass angenommen werden kann, dass die Teilstrukturen einzeln durch PKS gebildet und anschließend enzymatisch verknüpft werden (Ichihara *et al.*, 1988).

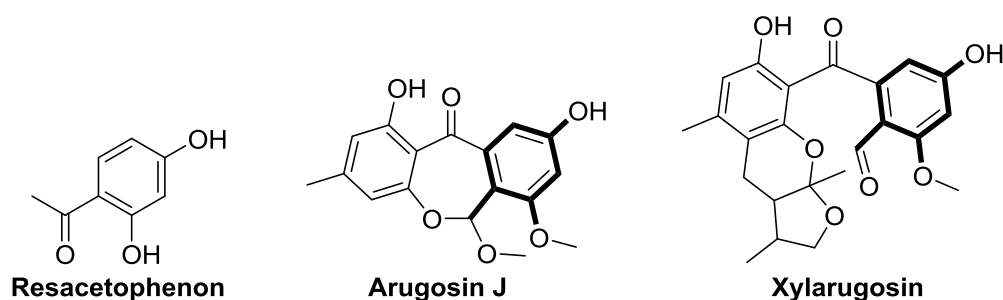


Abbildung 9: Isolierte Substanzen aus *Xylaria* sp.

In *Abbildung 10* ist die hypothetische Biosynthese der *Xylaria*-Derivate dargestellt. Resacetophenon und Orsellinsäure entstehen beide durch unterschiedliche Faltung aus dem gleichen Oktaketid. So entsteht zum einen Orsellinsäure und zum anderen Phloracetophenon (Dewick, 2009a). Letzteres ist ein Trihydroxy-Derivat und unter

Diskussion

Abspaltung einer Hydroxygruppe entsteht das Resacetophenon. Aus zwei Molekülen Orsellinsäure können die beiden weiteren *Xylaria*-Substanzen aufgebaut werden wie es für die Depside und Depsidone gezeigt wurde (Armaleo et al., 2011; Nielsen et al., 2011). Das eine Orsellinsäure-Molekül wird zu Orcinol decarboxyliert und das zweite Molekül zum Aldehyd oxidiert. Orcinol wird dann, in *ortho*-Position zur Hydroxygruppe, elektrophil vom Aldehyd angegriffen und die Carboxylgruppe verestert mit der Hydroxygruppe. Solch eine Esterase konnte für die Depsid- und Depsidon-Biosynthese nachgewiesen werden (Child et al., 1971). Durch Methylierungen entsteht das Arugosin J. Die Biosynthese des Pilzmetabolits Alboatrin kann in Anlehnung an Ichihara *et al.* beschrieben werden. Sie zeigt die Reaktion von Orcinol mit einer Isopreneinheit, die ebenfalls in *ortho*-Position zur Hydroxygruppe elektrophil addiert wird (Ichihara et al., 1988). Unter Protonabspaltung wird die Hydroxygruppe zum Keton und reagiert mit Prenylpyrophosphat. Unter erneuter Protonenabspaltung kommt es zur Rearomatisierung und die Ketogruppe reagiert mit einem Acetyl-CoA. Der so gebildete Ester wird von der Doppelbindung der Isopreneinheit angegriffen und es kommt zum Ringschluss (Dihydropyran) (ebenda). Das entstandene Halbketal wird dann unter erneutem Ringschluss zum Vollketal. Alboatrin reagiert, wie bereits für Arugosin J beschrieben, mit dem zweiten Orsellinsäurederivat zu Xylarugosin.

In der Literatur sind antioxidative Eigenschaften der Xyloketale beschrieben, besonders Xyloketal B wurde als möglicher neuer Arzneistoff bei kardiovaskulären Erkrankungen und Arteriosklerose untersucht. Die zytotoxische oder antibiotische Aktivität wurde bisher nicht untersucht. (Li et al., 2013; Wang et al., 2011) Den strukturverwandten im Rahmen dieser Arbeit isolierten Substanzen konnte keine zytotoxische oder antibiotische Aktivität nachgewiesen werden. Die antioxidativen Eigenschaften wurden nicht getestet.

Diskussion

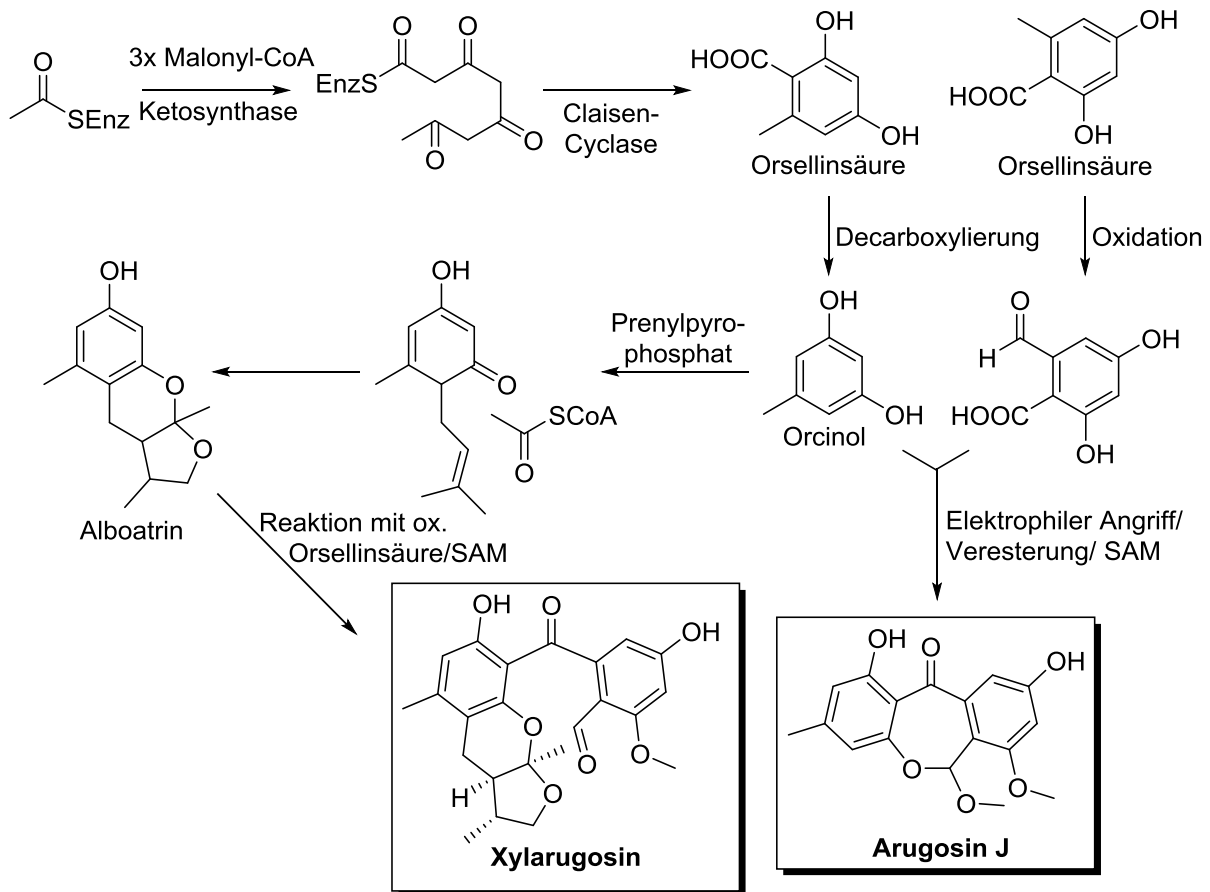


Abbildung 10: Hypothetische Biosynthese von Xylarugosin und Arugosin J und die Entstehung von Alboatrin (Ichihara et al., 1988).

5.1.4 Polyketid-Hybride

In diesem Abschnitt werden die Polyketidsubstanzen diskutiert, die neben der Polyketidstruktur noch ein weiteres Strukturmerkmal aus einem anderen Biosyntheseweg besitzen. Bei den im Zuge dieser Arbeit isolierten Styrylpyronen 3-Methyl-desmethoxyyangonin und 3-Methylbisanoryangonin, Pestalotiopen A und C und den Metaboliten aus *Gymnascella dankaliensis* handelt es sich um solche Hybride.

Die Styrylpyrone 3-Methyl-desmethoxyyangonin und 3-Methylbisanoryangonin setzen sich aus einem α -Pyron und einem Styrol zusammen. Wie schon in Publikation 1 beschrieben, ähneln die beiden Substanzen den aus *Kava kava* (Lauraceae) bekannten Styrylpyronen Desmethoxyyangonin bzw. Bisanoryangonin sehr. Der Unterschied liegt in der Methylgruppe in Position 3 (Dharmaratne et al., 2002; Singh, 1992). Styrylpyrone sind sowohl aus Basidiomyceten (Fiasson, 1982) als auch aus Angiospermen (wie die Lauraceen) und Farnen bekannt (Beckert et al., 1997).

Diskussion

Biosynthetisch entstehen Styrylpyrone durch die Typ III PKS, die sogenannte Styrylpyron-Synthase (Beckert et al., 1997). Wie in *Abbildung 11* gezeigt, werden die Startereinheiten Cinnamoyl-CoA bzw. 4-Hydroxycinnamoyl-CoA, die aus den Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin entstehen, mit einem Malonyl-CoA und einem Methylmalonyl-CoA (oder zwei Malonyl-CoA und SAM-Methylierung in Position 3) mittels Ketosynthase verknüpft. Durch Tautomerie entsteht das Dienol-Derivat. Mittels einer Thioesterase kommt es zur Lacton- bzw. Pyronzyklisierung. Im Falle des 3-Methyl-desmethoxyyangonin wird die Hydroxygruppe in Position 4 durch eine SAM-Methyltransferase methyliert (Dewick, 2009b).

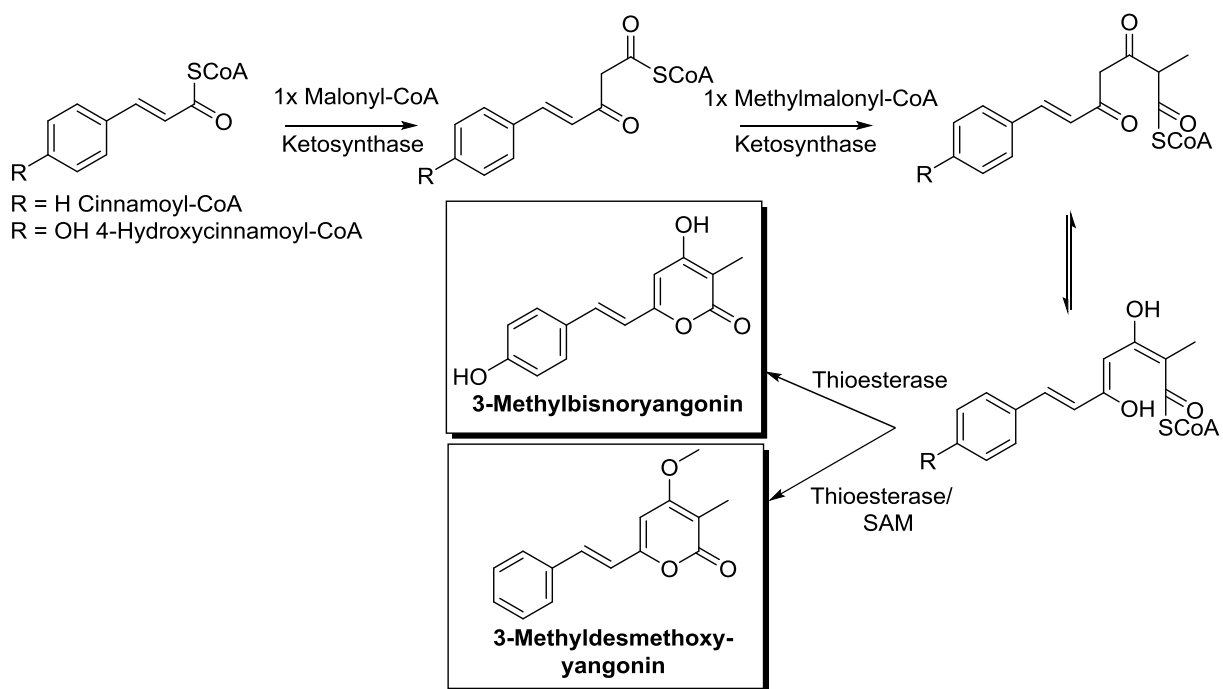


Abbildung 11: Postulierte Biosynthese der Styrylpyrone (Beckert et al., 1997).

Im Zuge dieser Arbeit konnte eine aktivierende Wirkung auf die Histon-Deacetylase (HDAC) Klasse III oder Sirtuine (silent information regulator, SIR) gefunden werden (unveröffentlichte Ergebnisse). Sirtuin-Aktivatoren wie das Stilben Resveratrol aus Rotwein oder das Flavonol Quercetin, welches strukturell den Styrylpyronen ähnelt, haben schützende Wirkung auf Herz- und Hirnzellen, interagieren mit Tumorsuppressoren wie p53, senken die Lipogenese und verbessern die Insulinausschüttung (Camins et al., 2010; Folmer et al., 2010; Stuenkel and Campbell, 2011). Darüber hinaus bewirken die Sirtuine ein negatives Feedback auf die anderen HDAC-Klassen. Bei Krebs-, aber auch bei degenerativen Erkrankungen wie Parkinson,

Diskussion

konnte gezeigt werden, dass oft ein Ungleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung vorliegt. Daher werden HDAC-Inhibitoren als neue Arzneistoffe untersucht (Johnstone, 2002).

Den Kavapyronen werden die anxiolytischen und antikonvulsiven Eigenschaften des Kavaextraktes zugeschrieben, was durch Uebelhacks Untersuchung der Inhibition der Blutplättchen-MAO-B belegt werden konnte (Uebelhack et al., 1998). Der genaue zentrale Wirkungsmechanismus ist nicht bekannt. Die Kavapyrone und die im Zuge dieser Arbeit isolierten Styrylpyrone sind sich strukturell sehr ähnlich. Daher könnte die im Rahmen dieser Arbeit festgestellte Sirtuin-Aktivierung auch als Wirkungsmechanismus für Kavapyrone postuliert werden. Diese Annahme kann durch Untersuchungen zu HDAC-Inhibitoren bei Parkinson untermauert werden. Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass HDAC-Inhibitoren die Expression der COMT und MAO-A herunterregulieren, so dass es zu einer Erhöhung der Catecholamine und Monoamine im synaptischen Spalt kommt (Bence et al., 2012; Harrison and Dexter, 2013). Die Sirtuin-Aktivierung führt zu einer Hemmung der anderen HDAC-Klassen, die zu einer verminderten Expression der Monoamin abbauenden Enzyme führt. Dies erhöht die Monoaminkonzentration und führt somit zur Anxiolyse. So könnte die anxiolytische Wirkung der Kavapyrone erklärt werden.

Die aus *Acremonium strictum* isolierten Substanzen Pestalotiopen A und C setzen sich aus der polyketidischen Cyclopaldinsäure und dem Sesquiterpen Altiloxin B (Phthalid) zusammen. Es sind bereits andere Sesquiterpen-Polyketid-Hybride oder Meroterpenoide wie die Austalide aus *Aspergillus ustus* und die Marilone aus *Stachylidium* sp. beschrieben, die ebenfalls einen Phthalid-Teil besitzen (Almeida et al., 2011; De Jesus et al., 1983; Geris and Simpson, 2009; Zhou, 2012). Interessanterweise sind viele dieser Meroterpenoide aus Tetraketiden und einem Terpenrest zusammengesetzt und kommen häufig bei Pilzen und marinen Organismen vor (Geris and Simpson, 2009). Da die Pestalotiopen-Produzenten *A. strictum* und *Pestalotiopsis* sp. aus marinen Mangroven stammen, treffen beide Punkte zu.

Mit Hilfe von ¹⁴C-Fütterungsversuchen konnten Birch und Kocor herausfinden, dass Cyclopaldinsäure aus drei Malonyleinheiten und drei SAM-Methylierungen entsteht (Birch and Kocor, 1960). Die andere Teilstruktur zeigt eine Drimaneinheit. Es gibt Berichte, dass Drimane typische Schwammmetabolite sind und vielfach auch in Mollusken gefunden wurden. Die Annahme einer diätetischen Herkunft der

Diskussion

Sesquiterpene in Mollusken konnte durch deren *de novo* Synthese eindeutig widerlegt werden (Jansen and de Groot, 2004). Darüber hinaus sind diese Substanzen auch in Pflanzen weit verbreitet (ebenda). Wie die beiden Untereinheiten miteinander verknüpft werden, kann nur hypothetisch diskutiert werden: Die Drimanstruktur könnte, wie oft beschrieben, durch einen elektrophilen Angriff eines Chlor-Kations im Zuge einer zweifachen Zyklisierung gebildet werden. Die so entstehende positive Ladung wird durch die Hydroxygruppe des Methanolrests der modifizierten Cyclopaldinsäure unter Abspaltung eines Protons stabilisiert (Abbildung 12) (Jansen and de Groot, 2004). Wahrscheinlich wird das Diphosphat des Farnesyls vorher abgespalten und das Hydroxid zu einer Säure oxidiert.

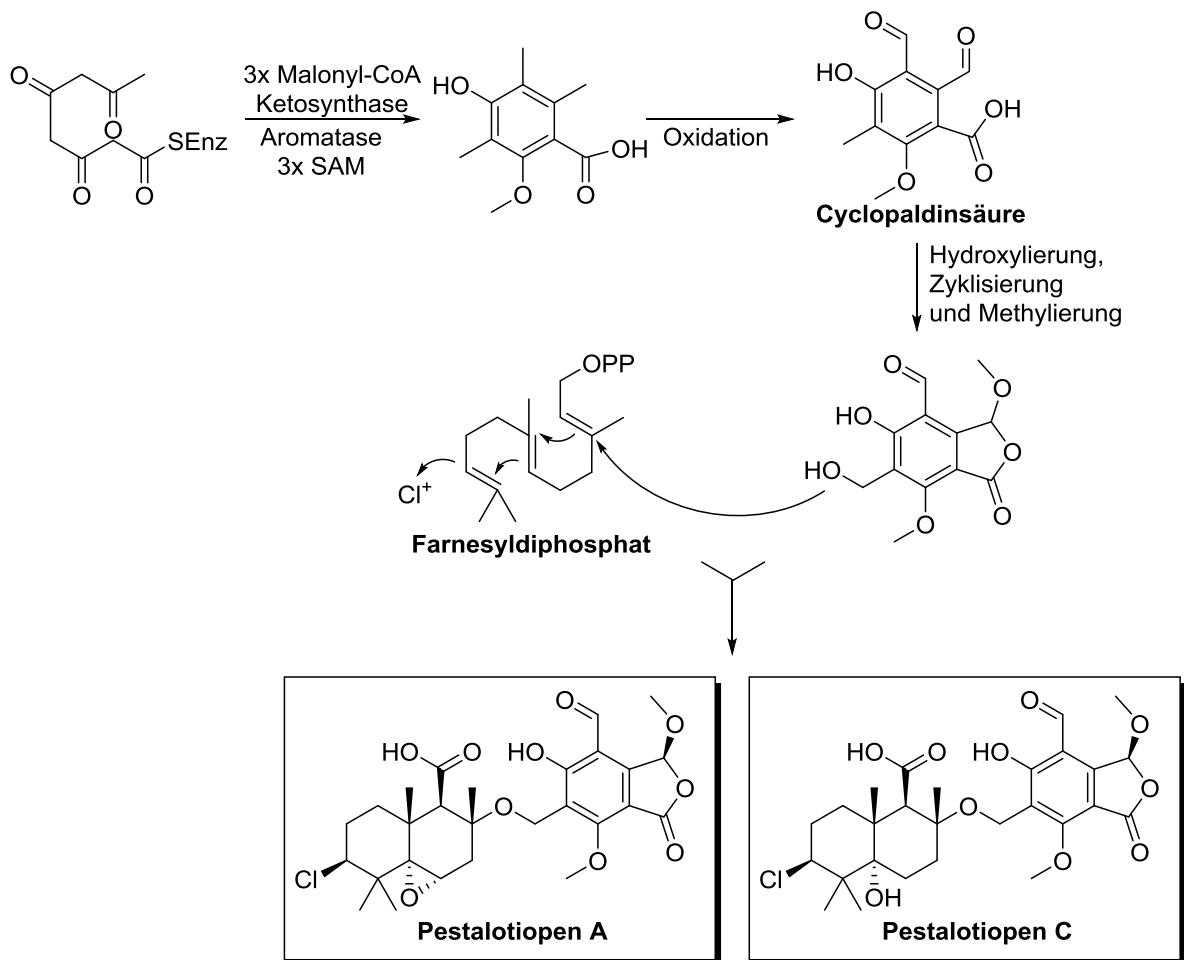


Abbildung 12: Postulierte Biosynthese von Pestalotiopen A (Birch and Kocor, 1960; Jansen and de Groot, 2004).

Diskussion

Im Zuge dieser Arbeit wies Pestalotiopen A sehr geringe zytotoxische Eigenschaften gegenüber der humanen Cisplatin sensitiven Ovarialkarzinomzelllinie A2780 sens und der humanen Cisplatin resistenten Ovarialkarzinomzelllinie A2780 CisR und der humanen Kolorektalzelllinie HCT116 mit IC_{50} -Werten von 76,2, 30,1 bzw. 188,0 μ M auf. Diese Wirkung kann auf das Epoxidstrukturmerkmal zurückgeführt werden. Nukleophile wie die DNA (oder auch Glutathion) reagieren mit dem Epoxid, wodurch es zu Zellzyklusarrest und Mutationen kommen kann (Forth et al., 1998; Mutschler et al., 2001). Hierfür würde auch die Unwirksamkeit des Pestalotiopen C sprechen, das keine Epoxidfunktion besitzt.

Auch die hier beschriebenen Metabolite des Pilzes *Gymnascella dankaliensis* sind Hybride aus der Aminosäure Tyrosin und einem Fettsäure ähnlichen Polyketid (McKillop et al., 1996).

Die Funde einer regio- und stereospezifischen Spirozyklus bildenden Cytochrom P450-Oxidase aus dem Griseofulvin produzierenden *Penicillium aethiopicum* (Cacho et al., 2013) und einer Kupfer abhängigen Dihydrogeodin-Oxidase aus *Aspergillus terreus* (Huang et al., 1995) untermauern die biogenetische Bildung des Aranorosin-Spirozyklus. Auch ist für die Biosynthese des Griseofulvins eine Flavin abhängige Halogenase identifiziert worden (Cacho et al., 2013). Diese Halogenasen bilden mittels eines Flavinperoxidintermediats hypochlorige Säure und besitzen Tryptophan und 4- bzw. 6-Hydroxyisochinolin als Substrate. Sie chlorieren in *ortho*-Position zu einer Hydroxygruppe und können auch Brom substituieren (Blasiak and Drennan, 2009; Cacho et al., 2013).

In Anlehnung an diese Spirozyklus bildenden und halogenierenden Enzyme kann eine Biosynthese, wie sie in *Abbildung 13* gezeigt ist, postuliert werden. Für die Spirozyklusbildung sind zwei Varianten der oxidativen Kopplung möglich: Zum einen kann es über Radikale und zum anderen über ein Epoxid zur Ringbildung kommen (Cacho et al., 2013). Die Aranorosinderivate können durch Epoxidierung der Doppelbindungen entstehen (Hoffmann et al., 2014). Da die Halogenierung an einem intakten Aromaten bzw. Phenolring stattfindet, kann angenommen werden, dass Tyrosin in Form des Gymnastatin N von einer wie oben beschriebenen Halogenase chloriert wird.

Diskussion

Die beiden neuen Substanzen Dankamid und Gymnastatin S besitzen eine verkürzte Seitenkette. Hier gibt es zwei Möglichkeiten, wie diese entstehen kann. Einmal kann die Seitenkette durch Acetyl-CoA als Starter und zwei Methylmalonyl-CoA und einem Malonyl-CoA als Kettenverlängerungseinheit gebildet werden. Die Alternative wäre die Entstehung der verkürzten Seitenkette durch β -Oxidation des Gymnamid-Seitenkette wie sie bei Fettsäuren bekannt ist.

Durch die Marfey-Reaktion konnte die Konfiguration der Aminosäure Tyrosin als *D*- und *L*-Tyrosin bestätigt werden, was ebenfalls von Phoon *et al.* mittels Totalsynthese herausgefunden wurde (Phoon *et al.*, 2004). Das Verhältnis der beiden Aminosäurederivate fiel zugunsten des *D*-Derivats aus. Diese Erkenntnis deutet auf Stereospezifität des Spirozyklus bildenden Enzyms hin. Dies könnte ebenfalls erklären, weshalb alle Aranorosinderivate, die einen Spirozyklus beinhalten, bis dato in Position 2 (*S*)-konfiguriert vorliegen.

Die Bioaktivität der *Gymnascella*-Derivate ist gut untersucht. So wurden als erstes die antibiotischen Aktivitäten von Aranorosin, Aranorosinol A und B beschrieben (Roy *et al.*, 1988; Roy *et al.*, 1992). Später kamen die zytotoxischen Nachweise hinzu: Für Aranorosin wurde der Wirkungsmechanismus untersucht und eine apoptotische Wirkung über Hemmung des Bcl2 nachgewiesen (Nakashima *et al.*, 2008). Gymnastatin N inhibiert die POLO-like Kinase 1 (Plk1) (Phoon *et al.*, 2004). Plk1 greift nicht nur in Mitosestadien ein, sondern ist auch an der DNA-Replikation in der S-Phase und an Regeneration nach DNA-Schäden beteiligt. Darüber hinaus hemmt sie das proapoptotische p53 und wird in einigen Krebszellen überexprimiert, weshalb Plk1-Inhibitoren als Krebstherapeutika untersucht werden (Weerd *et al.*, 2006). Auch die chlorierten Derivate Gymnastatin A-C zeigten zytotoxische Wirkung gegenüber einer murinen Lymphozytenleukämiezelllinie P388 (Amagata *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit konnten die zytotoxischen Wirkungen auf die Mauslymphomzelllinie L5178Y von Aranorosin (IC₅₀-Wert 0,58 μ M), Aranorosin-2-methylether (IC₅₀-Wert 0,44 μ M), Aranorosinol B (IC₅₀-Wert 15,51 μ M)*, Gymnastatin A (IC₅₀-Wert 0,64 μ M) und Gymnastatin B (IC₅₀-Wert 5,80 μ M)* bestätigt werden. Die Unterschiede der Wirkung deuten auf die folgende Struktur-Wirkungsbeziehung hin: Die Substanzen mit intaktem Tyrosin und die Fettsäure ähnlichen Derivate Dankamid und Gymnamid wiesen keine Zytotoxizität auf. Daraus lässt sich schließen, dass der Spirozyklus eine Rolle bei der Wirkung spielt. Da die mit einem Spirozyklus ausgestatteten Aranorosinol A und

Gymnastatin B keine bzw. nur moderate Wirkung* zeigten, ist anzunehmen, dass zwei weitere strukturelle Merkmale des Spirozyklus für die Wirkung wichtig sind. Die Ketofunktion in Position 8 und Doppelbindungen bzw. Epoxidstrukturen stabilisieren den Cyclohexanring bzw. den Cyclohexadienring, was offensichtlich die Zytotoxizität erhöht.

5.2 Horizontaler Gentransfer und Co-Entwicklung

Als Erklärung für die Vielzahl an verwandten Substanzen in Pilzen und Pflanzen wird einerseits ein Horizontaler Gentransfer (HGT), andererseits eine Co-Entwicklung zwischen Wirtspflanze und Endophyt bzw. Pflanzen und Endophyten diskutiert. Letztere wird auf simultane Umweltfaktoren zurückgeführt (Kusari 2009).

Mechanismen für einen HGT in Eukaryonten sind generell unbekannt und können nur vermutet werden (Rosewich and Kistler, 2000). Rosewich und Kistler haben Hinweise zusammengestellt, die auf einen HGT hindeuten. Dazu gehören DNA-Übereinstimmungen phylogenetisch weit entfernter Organismen, hohe Ähnlichkeit eines Gens von Spezies einer ökologischen Nische und Ausnahmen zum Prinzip der „Universalität des Codes“. Als Beispiel kann das Codon GUG herangezogen werden, welches standardmäßig für Valin codiert, jedoch bei einigen Bakterien auch als Startcodon dient (Knippers, 2005). In dieser Arbeit wurden keine genetischen Untersuchungen vorgenommen, so dass HGT bzw. Co-Entwicklung nur aufgrund des Vorteils für den Pilz diskutiert werden kann.

Drimanderivate sind aus Pilzen, Schwämmen und Pflanzen, Emodinderivate vor allem aus Pflanzenfamilien wie Fabaceae und Rhamnaceae und Styrylpyranderivate aus *Piper methysticum* bekannt. Im Folgenden soll auf die beiden letzten Beispiele näher eingegangen werden.

Penicillium glabrum und seine Quelle *Punica granatum* sind gut untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Anthrachinonderivate und Styrylpyrone aus *P. glabrum* isoliert. Diese beiden Polyketidmetabolite kommen nicht im Granatapfel selber vor (Jasuja et al., 2012; Middha et al., 2013).

Emodin ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet und stellt für Pflanzen einen Fraßschutz dar, besitzt aber auch antibakterielle und antimykotische Eigenschaften (Izhaki, 2002). Diese Eigenschaften unterstützen den Endophyten auch bei der Verteidigung seines

Diskussion

Biotops. In der Literatur findet man Anthrachinone oft als sekundäre Metabolite von *Penicillium*-Spezies (Liu et al., 2013).

Die Kavalactone und die im Zuge dieser Arbeit isolierten Styrylpyrone unterscheiden sich nur in einer Methylgruppe in Position 3. Für Styrylpyrone sind neben antientzündlichen, antidiabetischen, auch antioxidative, antivirale, zytotoxische (Lee and Yun, 2011) und Wurzelwachstum hemmende (Fujita et al., 1994b) Eigenschaften beschrieben worden. Darüber hinaus konnte Toxizität gegenüber dem herbivoren Nachtfalter *Spodoptera exigua* nachgewiesen werden (Senthil-Nathan et al., 2008). Letztere Eigenschaften sind ebenfalls eine gute Waffe für den Pilz, seinen Standort zu sichern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Anthrachinone und Styrylpyrone grundsätzlich aus Pflanzen bekannt sind und ihr Vorkommen in Pilzen durch ihre Wirkungen sinnvoll ist. Jedoch kann ein HGT bzw. Co-Entwicklung zwischen *P. glabrum* und dem Granatapfel ausgeschlossen werden, da die Pflanze diese Substanzen nicht produziert. Deshalb ist anzunehmen, dass *P. glabrum*, ein weit verbreiteter Pilz, diese Biosynthesewege in Zusammenhang mit anderen Wirten erworben hat und anschließend erst eine Symbiose mit *Punica granatum* eingegangen ist.

6 Ausblick

Die Resistenzentwicklung gegenüber etablierten Arzneistoffen, wie zum Beispiel Antibiotika oder Zytostatika, zeigt, wie wichtig es ist, immer wieder neue potentielle Wirkstoffe zu finden und bekannte Substanzen auf neue Wirkprinzipien zu testen. In zahlreichen Veröffentlichungen konnte bewiesen werden, dass Endophyten und Bodenpilze eine herausragende Quelle neuer Wirkstoffe sind. Damit sie das auch bleiben, ist die Interaktion zwischen Pilzen und biotischen und abiotischen Faktoren seines Wirts bzw. der ökologischen Nische äußerst bedeutungsvoll. So ist es wichtig, dass die Diversität, wie sie in den Tropen und Mangrovenwäldern gefunden wird, auch weiterhin erhalten bleibt.

Ein weiterer Schritt ist, diese Interaktion gezielt in Laboratorien nachzuahmen. So werden Co-Kultivierungsversuche mit unterschiedlichen Mikroorganismen durchgeführt. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommene Kultivierung des Bodenpilzes *Gymnascella dankaliensis* mit *Bacillus subtilis* zeigte kaum eine Veränderung des Substanzmusters. Weitere Versuche mit anderen Bakterien oder auch Pilzen können durchgeführt werden, um durch Stress die Produktion neuer Substanzen anzuregen.

In der Literatur ist beschrieben, dass epigenetische Eingriffe mit HDAC-Inhibitoren wie SAHA oder Trichostatin A das Substanzspektrum erweitern können. Der im Zuge dieser Arbeit isolierte Endophyt *Penicillium glabrum* produziert Sirtuin aktivierende Substanzen, die wiederum ein negatives Feedback auf die anderen HDAC-Klassen haben. Daher könnte der Pilz für einen Co-Kultivierungsversuch verwendet werden. Man hätte zwei Effekte: Einmal die Pilz-Pilz-Interaktion und die direkte Wirkung auf die HDAC. Darüber hinaus kann durch Zusatz bestimmter Stoffe wie Salze und Aminosäuren das Substanzspektrum erweitert werden. Die vorliegenden Versuche mit Halogensalzen als Zusatz zum Kulturmedium von *Gymnascella dankaliensis* zeigten für Brom und Chlor einen biosynthetischen Einbau. Das Experiment mit Kaliumjodid bewirkte eine Veränderung des Substanzmusters, so dass die weitere Untersuchung dieser kryptischen, d. h. unter Standardbedingungen nicht detektierbaren Substanzen, sinnvoll wäre. Dazu gehört die Prüfung, ob Jod eingebaut wurde oder ob, durch Stress induziert, neue Substanzen gebildet wurden. Darüber hinaus könnte auch der Einfluss „nicht-physiologischer“ Bedingungen wie extremer pH-Wert oder Lichteinfluss wie beim „OSMAC“-Denkansatz untersucht werden.

Ausblick

Die Metabolite aus den Mangrovenpilzen *Acremonium strictum* und *Pestalotiopsis* sp. waren z. T. strukturell sehr ähnlich. Hier könnte eine Co-Kultivierung mit Pflanzenteilen der Mangrove *Rhizophora apiculata* und *R. mucronata* den Pilz anregen, weitere interessante Substanzen zu produzieren. Da der Pilz aus einer marinen Umgebung kommt, könnten auch Versuche mit Salzen zeigen, ob das Substanzmuster durch den Salzeinfluss verändert und ob z. B. Brom anstelle des Chlors in die Pestalotiopenderivate eingebaut werden kann.

Auch die Erforschung der Biosynthesewege bzw. des Genclusters der Endophyten ist wichtig: Es könnte die Frage geklärt werden, ob epigenetisch gezielt mit HDAC-Inhibitoren eingegriffen werden kann. Darüber hinaus könnten spezielle Gencluster in einen einfacher kultivierbaren Pilz oder ein Bakterium eingebracht werden, wodurch eine industrielle Produktion möglich wäre.

Des Weiteren zeigt sich deutlich, dass die Wahl der Bioassays auch eine entscheidende Rolle spielt. Viele der hier isolierten Substanzen zeigten keine Wirkung in den für die Arbeitsgruppe Proksch durchgeführten zytotoxischen und antibakteriellen Bioassays. Da der Pilz seinen Lebensraum schützen will, könnten Tests auf insektizide Substanzen durchgeführt werden. Das Styrylpyron 3-Methyl-desmethoxyangonin ist ein Beispiel dafür, dass mit dem durchgeführten Standardtest nicht alle Substanzen erfasst werden. Obwohl die Substanz keine zytotoxische Wirkung aufwies, konnte eine HDAC-inhibierende Wirkung durch die Sirtuin-Wirkung beobachtet werden. HDAC-Inhibitoren werden als neue zytotoxische Wirkstoffe untersucht. Als ein Beispiel ist bereits Vorinostat als Zolinza® in den USA auf dem Markt. Darüber hinaus zeigt das Styrylpyron in Hinblick auf die verwandten Kavapyrone, wie wichtig es ist, auch bekannte Substanzen neuen Tests zu unterziehen. Daher könnte eine Untersuchung der Kavapyrone weiterhelfen, die anxiolytische Wirkung von *Kava kava* bzw. die Rolle der Histon-Acetylierung und Deacetylierung bei bestimmten Krankheitsbildern wie der Depression weiter aufzuklären. Ein breiteres Spektrum an Bioassays liefert ein umfassenderes Gesamtbild der Wirkungen. Dabei stellen die Mengen der isolierten Substanzen häufig den limitierenden Faktor dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue und bekannte Substanzen aus Endophyten und einem Bodenzpilz isoliert und auf ihre Wirkungen untersucht. Die Vielzahl der möglichen Folgeexperimente zeigt, dass die Pilzerforschung in ihren Kinderschuhen steckt. Das volle Potenzial der aus Pilzen isolierbaren Substanzen ist noch längst nicht ausgeschöpft.

7 Referenzen

- Abraham E.P. and Chain E. **1940** An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146, 837.
- Abraham W.R., Knoch I. and Witte L. **1990** Biosynthesis of the terpenoidic polyketide fusalanipyrene. *Phytochemistry* 29, 2877-2878.
- Alberts A.W., Chen J., Kuron G., Hunt V., Huff J., Hoffman C., Rothrock J., Lopez M., Joshua H., Harris E., Patchett A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albersschonberg G., Hensens O., Hirshfield J., Hoogsteen K., Liesch J. and Springer J. **1980** Mevinolin - a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme-A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America - Biological Sciences* 77, 3957-3961.
- Almeida C., Kehraus S., Prudencio M. and Koenig G.M. **2011** Marilones A-C, phthalides from the sponge-derived fungus *Stachylidium* sp. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* 7, 1636-1642.
- Aly A.H., Debbab A., Kjer J. and Proksch P. **2010** Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. *Fungal Diversity* 41, 1-16.
- Aly A.H., Edrada-Ebel R., Indriani I.D., Wray V., Mueller W.E.G., Totzke F., Zirrgiebel U., Schaechtele C., Kubbutat M.H.G., Lin W.H., Proksch P. and Ebel R. **2008** Cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Alternaria* sp. and their subsequent detection in its host plant *Polygonum senegalense*. *Journal of Natural Products* 71, 972-980.
- Aly A.H., Debbab A. and Proksch P. **2013** Fungal endophytes - secret producers of bioactive plant metabolites. *Pharmazie* 68, 499-505.
- Amagata T., Doi M., Ohta T., Minoura K. and Numata A. **1998** Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, gymnastatins A-E, from a *Gymnascella* species separated from a *Halichondria* sponge. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* 3585-3599.
- Amagata T., Takigawa K., Minoura K. and Numata A. **2010** Gymnastatins I-K, cancer cell growth inhibitors from a sponge-derived *Gymnascella dankaliensis*. *Heterocycles* 81, 897-907.
- Anke T., Oberwinkler F., Steglich W. and Schramm G. **1977** The strobilurins - new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus*. *Journal of Antibiotics* 30, 806-810.
- Armaleo D., Sun X.M. and Culberson C. **2011** Insights from the first putative biosynthetic gene cluster for a lichen depside and depsidone. *Mycologia* 103, 741-754.
- Bachmann S.P., Patterson T.F. and Lopez-Ribot J.L. **2002** *In vitro* activity of caspofungin (MK-0991) against *Candida albicans* clinical isolates displaying different mechanisms of azole resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2228-2230.
- Bacon C.W. and White J. **2000** Microbial Endophytes, 10th Ed. Marcel Dekker Inc., New York.
- Baptista-Rosas R.C., Hinojosa A. and Riquelme M. **2007** Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in Western North American deserts. *Coccidioidomycosis: Sixth International Symposium* 1111, 35-46.
- Bara R., Zerfass I., Aly A.H., Goldbach-Gecke H., Raghavan V., Sass P., Mandi A., Wray V., Polavarapu P.L., Pretsch A., Lin W.H., Kurtan T., Debbab A., Broetz-Oesterhelt H. and Proksch P. **2013** Atropisomeric dihydroanthracenones as inhibitors of multiresistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Chemistry* 56, 3257-3272.

Referenzen

- Bara R.A. **2012** Natural products from endophytic fungus *Talaromyces wortmannii*: their structure elucidation and mechanism of actions, Dissertation, <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=23431>.
- Baraban E.G., Morin J.B., Phillips G.M., Phillips A.J., Strobel S.A. and Handelsman J. **2013** Xyolide, a bioactive nonenolide from an Amazonian endophytic fungus, *Xylaria feejeensis*. *Tetrahedron Letters* 54, 4058-4060.
- Barrero A.F., Oltra J.E., Herrador M.M., Cabrera E., Sanchez J.F., Quílez J.F., Rojas F.J. and Reyes J.F. **1993** Gibberones: α -pyrones from *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron* 49, 141-150.
- Bartlett D.W., Clough J.M., Godwin J.R., Hall A.A., Hamer M. and Parr-Dobrzanski B. **2002** The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58, 649-662.
- Barton D., Nakanishi K. and Meth-Cohn O. **1999** Comprehensive natural products chemistry. Vol. 1. Polyketides and other secondary metabolites including fatty acids and their derivatives. Elsevier Science Ltd, Amsterdam.
- Barz S. **2003** Charakterisierung der humanen Glukosylceramid-Synthase in melanozytären Zellen, Dissertation, http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000001134.
- Beckert C., Horn C., Schnitzler J.P., Lehning A., Heller W. and Veit M. **1997** Styrylpyrone biosynthesis in *Equisetum arvense*. *Phytochemistry* 44, 275-283.
- Becking J.H. **1965** Nitrogen fixation and mycorrhiza in *Podocarpus* root nodules. *Plant Soil* 23, 213-226.
- Bence M., Koller J., Sasvari-Szekely M. and Keszler G. **2012** Transcriptional modulation of monoaminergic neurotransmission genes by the histone deacetylase inhibitor trichostatin A in neuroblastoma cells. *Journal of Neural Transmission* 119, 17-24.
- Benz F., Knuesel F., Nueesch J., Treichler H., Voser W., Nyfeler R. and Keller-Schierlein W. **1974** Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen 143. Mitteilung. Echinocandin B, ein neuartiges Polypeptid-Antibioticum aus *Aspergillus nidulans* var. *echinulatus*: Isolierung und Bausteine. *Helvetica Chimica Acta* 57, 2459-2477.
- Birch A.J. and Kocor M. **1960** Biosynthesis. XXII. Palitantin and cyclopaldic acid. *Journal of the Chemical Society* 866-871.
- Blasiak L.C. and Drennan C.L. **2009** Structural perspective on enzymatic halogenation. *Accounts of Chemical Research* 42, 147-155.
- Bode H.B., Bethe B., Hoefs R. and Zeeck A. **2002** Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem* 3, 619-627.
- Brachmann A. and Parniske M. **2006** The most widespread symbiosis on Earth. *PLoS Biology* 4, 1111-1112.
- Brady S.F., Wagenaar M.M., Singh M.P., Janso J.E. and Clardy J. **2000** The cytosporones, new octaketide antibiotics isolated from an endophytic fungus. *Organic Letters* 2, 4043-4046.
- Bringi V., Kadkade P.G., Prince C.L., Schubmehl B.F., Kane E.J. and Roach B. **1995** Enhanced production of taxol and taxanes by cell cultures of *Taxus* species. Patent US5407816 A.
- Brockhaus Enzyklopädie Online. **2014** <https://duesseldorf-ulb.brockhaus-wissensservice.com/brockhaus/sahara>.
- Bruno G. and Sparapano L. **2006** 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* 69, 209-223.
- Buchholz H., Carola C. and Mujica-Fernaud T. **2010** Use of chromone derivatives. Patent EP20060724793.

Referenzen

- Cacho R.A., Chooi Y.H., Zhou H. and Tang Y. **2013** Complexity generation in fungal polyketide biosynthesis: a spirocycle-forming P450 in the concise pathway to the antifungal drug griseofulvin. *ACS Chemical Biology* 8, 2322-2330.
- Camins A., Sureda F.X., Junyent F., Verdaguer E., Folch J., Pelegri C., Vilaplana J., Beas-Zarate C. and Pallas M. **2010** Sirtuin activators: designing molecules to extend life span. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1799, 740-749.
- Campbell N. and Reece J. **2009** Biologie, 8. Aufl., Pearson Education Deutschland GmbH, München.
- Cantrell S.A., Dianese J.C., Fell J., Gunde-Cimerman N. and Zalar P. **2011** Unusual fungal niches. *Mycologia* 103, 1161-1174.
- Cassady J.M., Chan K.K., Floss H.G. and Leistner E. **2004** Recent developments in the maytansinoid antitumor agents. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52, 1-26.
- Chen H.J., Awakawa T., Sun J.Y., Wakimoto T. and Abe I. **2013** Epigenetic modifier-induced biosynthesis of novel fusaric acid derivatives in endophytic fungi from *Datura stramonium* L. *Natural Products and Bioprospecting* 3, 20-23.
- Chen S.C.A., Slavin M.A. and Sorrell T.C. **2011** Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. *Drugs* 71, 11-41.
- Child J.J., Oka T., Simpson F.J. and Krishnamurty H.G. **1971** Purification and properties of a phenol carboxylic acid acyl esterase from *Aspergillus flavus*. *Canadian Journal of Microbiology* 17, 1455-1463.
- Cox R.J. and Simpson T.J. **2009** Methods in enzymology. Vol 459, Chapter 3. Fungal Type I Polyketide Synthases. Elsevier Inc. New York.
- Cragg G.M. **1998** Paclitaxel (Taxol ®): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews* 18, 315-331.
- Dai J., Krohn K., Draeger S. and Schulz B. **2009** New naphthalene-chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea*. *European Journal of Organic Chemistry* 1564-1569.
- De Jesus A.E., Horak R.M., Steyn P.S. and Vlegaar R. **1983** Biosynthesis of austalide D, a meroterpenoid mycotoxin from *Aspergillus ustus*. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications* 716-718.
- Debbab A., Aly A.H. and Proksch P. **2013** Mangrove derived fungal endophytes - a chemical and biological perception. *Fungal Diversity* 61, 1-27.
- Dewick P.M. **2009a** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd Ed. Chapter 3. The acetate pathway: fatty acids and polyketides. John Wiley & Sons, Ltd. New York.
- Dewick P.M. **2009b** Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3rd Ed. Chapter 4. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. John Wiley & Sons, Ltd. New York.
- Dharmaratne H.R.W., Nanayakkara N.P.D. and Khan I.A. **2002** Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry* 59, 429-433.
- Douglas C.M., D'Ippolito J.A., Shei G.J., Meinz M., Onishi J., Marrinan J.A., Li W., Abruzzo G.K., Flattery A., Bartizal K., Mitchell A. and Kurtz M.B. **1997** Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3- β -D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41, 2471-2479.
- Eadie M.J. **2003** Convulsive ergotism: epidemics of the serotonin syndrome? *Lancet Neurology* 2, 429-434.
- Eaton C.J., Cox M.P. and Scott B. **2011** What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenism? *Plant Science* 180, 190-195.

Referenzen

- Eimanifar A. and Mohebbi F. **2007** Urmia Lake (northwest Iran): a brief review. *Saline Systems* 3, 1-8.
- Endo A., Kuroda M. and Tsujita Y. **1976** MI-236A, MI-236B, and MI-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *Journal of Antibiotics* 29, 1346-1348.
- Eyberger A.L., Dondapati R. and Porter J.R. **2006** Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *Journal of Natural Products* 69, 1121-1124.
- Fiasson J.L. **1982** Chemotaxonomic research on mushrooms. 44. Distribution of styrylpyrones in the basidiocarps of various Hymenochaetaceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 10, 289-296.
- Fleming A. **1980** Classics in infectious diseases: on the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* by Alexander Fleming, Reprinted from the *British Journal of Experimental Pathology* 10, 226-236.
- Folmer F., Orlikova B., Schnekenburger M., Dicato M. and Diederich M. **2010** Naturally occurring regulators of histone acetylation/deacetylation. *Current Nutrition & Food Science* 6, 78-99.
- Forth W., Henschler D., Rummel W. and Starke K. **1998** Pharmakologie und Toxikologie 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin.
- Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie **2013** http://www.ime.fraunhofer.de/de/geschaeftsfelder/industrielle_biotechnologie/metaboli_engineering.html.
- Freeman S. and Rodriguez R.J. **1993** Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. *Science* 260, 75-78.
- Fujii I., Watanabe A., Sankawa U. and Ebizuka Y. **2001** Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry & Biology* 8, 189-197.
- Fujita T., Inoue K., Yamamoto S., Ikumoto T., Sasaki S., Toyama R., Chiba K., Hoshino Y. and Okumoto T. **1994a** Fungal metabolites. 11. A potent immunosuppressive activity found in *Isaria sinclairii* metabolite. *Journal of Antibiotics* 47, 208-215.
- Fujita T., Nishimura H., Kaburagi K. and Mizutani J. **1994b** Plant growth inhibiting α -pyrones from *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry* 36, 23-27.
- Gangadevi V. and Muthumary J. **2009** A novel endophytic taxol-producing fungus *Chaetomella raphigera* isolated from a medicinal plant, *Terminalia arjuna*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 158, 675-684.
- Geris R. and Simpson T.J. **2009** Meroterpenoids produced by fungi. *Natural Product Reports* 26, 1063-1094.
- Goodsell D.S. **2003** The molecular perspective: histone deacetylase. *Oncologist* 8, 389-391.
- Gottesman M.M. **2002** Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine* 53, 615-627.
- Grove J.F., Macmillan J., Mulholland T.P.C. and Zealley J. **1952** Griseofulvin. Part III. The structures of the oxidation products $C_9H_9O_5Cl$ and $C_{14}H_{15}O_7Cl$. *Journal of the Chemical Society* 3967-3977.
- Gurib-Fakim A. **2006** Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27, 1-93.
- Hamayun M., Khan S.A., Khan M.A., Khan A.L., Kang S.M., Kim S.K., Joo G.J. and Lee I.J. **2009** Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 25, 1785-1792.

Referenzen

- Hamilton-Miller J.M. **2000** Sir Edward Abraham's contribution to the development of the cephalosporins: a reassessment. *International Journal Antimicrobial Agents* 15, 179-184.
- Hargreaves J., Park J.O., Ghisalberti E.L., Sivasithamparam K., Skelton B.W. and White A.H. **2002** New chlorinated diphenyl ethers from an *Aspergillus* sp. *Journal of Natural Products* 65, 7-10.
- Harrison I.F. and Dexter D.T. **2013** Epigenetic targeting of histone deacetylase: therapeutic potential in Parkinson's disease? *Pharmacology & Therapeutics* 140, 34-52.
- Hedden P., Phillips A.L., Rojas M.C., Carrera E. and Tudzynski B. **2001** Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: a case of convergent evolution? *Journal of Plant Growth Regulation* 20, 319-331.
- Hensens O.D., Helms G.L., Jones E.T.T. and Harris G.H. **1995** Structure elucidation of australifungin, a potent inhibitor of sphinganine *N*-acyltransferase in sphingolipid biosynthesis from *Sporormiella australis*. *Journal of Organic Chemistry* 60, 1772-1776.
- Hentschel C., Eglau M.C. and Hahn E.G. **1996** *Curcuma xanthorrhiza* (Java tumeric) in clinical use. *Fortschritte der Medizin* 114, 349-350.
- Hewage R.T., Aree T., Mahidol C., Ruchirawat S. and Kittakoop P. **2014** One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry* In Press.
- Hofmann A. **1964** Die Mutterkornalkaloide - Vom Mutterkorn zum LSD, 2. Aufl., Nachtschatten Verlag, Solothurn.
- Hoffmann I., Jerneerén F. and Oliw E.H. **2014** Epoxy alcohol synthase of the rice blast fungus represents a novel subfamily of dioxygenase-cytochrome P450 fusion enzymes. *Journal of Lipid Research* 55, 2113-2123.
- Holton R.A. **1990** Method for preparation of taxol; Patent EP400971A2.
- Hotta K., Chen X., Paton R.S., Minami A., Li H., Swaminathan K., Mathews I.I., Watanabe K., Oikawa H., Houk K.N. and Kim C.Y. **2012** Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring closure in polyether biosynthesis. *Nature* 483, 355-358.
- Huang K.X., Fujii I., Ebizuka Y., Gomi K. and Sankawa U. **1995** Molecular-cloning and heterologous expression of the gene encoding dihydrogeodin oxidase, a multicopper blue enzyme from *Aspergillus terreus*. *Journal of Biological Chemistry* 270, 21495-21502.
- Ichihara A., Nonaka M., Sakamura S., Sato R. and Tajimi A. **1988** Structure and synthesis of alboatrin, a novel phytotoxic metabolite from *Verticillium albo-atrum*. *Chemistry Letters* 27-30.
- Izhaki I. **2002** Emodin - a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist* 155, 205-217.
- Jansen B.J.M. and de Groot A. **2004** Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. *Natural Product Reports* 21, 449-477.
- Jasuja N.D., Saxena R., Chandra S. and Sharma R. **2012** Pharmacological characterization and beneficial uses of *Punica granatum*. *Asian Journal of Plant Sciences* 11, 251-267.
- Johanningsmeier S.D. and Harris G.K. **2011** Pomegranate as a functional food and nutraceutical source. *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol 2 2, 181-201.
- Johnstone R.W. **2002** Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* 1, 287-299.
- Journal of Metabolic Engineering **2013** International Metabolic Engineering Society, <http://www.journals.elsevier.com/metabolic-engineering/>.

Referenzen

- Khan S.A., Hamayun M., Yoon H., Kim H.Y., Suh S.J., Hwang S.K., Kim J.M., Lee I.J., Choo Y.S., Yoon U.H., Kong W.S., Lee B.M. and Kim J.G. **2008** Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology* 8, 231-240.
- Knippers R. **2005** Molekulare Genetik, 9. Ed. Kapitel 4. Transkription, Translation und der genetische Code. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Knypl J.S. **1965** Dependence of indolyl-3-acetic acid and coumarin-induced growth on ribonucleic acid and protein synthesis. *Nature* 206, 844-846.
- Kucht S., Groß J., Hussein Y., Grothe T., Keller U., Basar S., Koenig W.A., Steiner U. and Leistner E. **2004** Elimination of ergoline alkaloids following treatment of *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) with fungicides. *Planta* 219, 619-625.
- Kück U., Reiß J., Nowrousian M., Hoff B. and Engh I. **2009** Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung, 3. Aufl., Springer-Verlag, Heidelberg.
- Kusari S., Lamshoft M., Zuhlke S. and Spiteller M. **2008** An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products* 71, 159-162.
- Kusari S., Zuhlke S., Kosuth J., Cellarova E. and Spiteller M. **2009** Light-independent metabolomics of endophytic *Thielavia subthermophila* provides insight into microbial hypericin biosynthesis. *Journal of Natural Products* 72, 1825-1835.
- Kusari S., Kosuth J., Cellarova E. and Spiteller M. **2011** Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis. *Fungal Ecology* 4, 219-223.
- Kusari S., Hertweck C. and Spittelert M. **2012** Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & Biology* 19, 792-798.
- Lee H.J., Kim W.C., Jeon S.Y., Kim J.W., Joo G.J., Rhee I.K. and Song K.S. **2003** Growth inhibitors of soybean seedling from *Bacillus* sp. IJ-31. *Agricultural Chemistry and Biotechnology* (English Edition) 46, 100-104.
- Lee I.K. and Yun B.S. **2011** Styrylpyrone-class compounds from medicinal fungi *Phellinus* and *Inonotus* spp., and their medicinal importance. *Journal of Antibiotics* 64, 349-359.
- Leistner E. and Steiner U. **2009** The mycotia - physiology and genetics. Vol. 15. Chapter 9. Fungal origin of ergoline alkaloids present in dicotyledonous plants (Convolvulaceae). Springer-Verlag, Berlin.
- Li J.Y., Strobel G., Sidhu R., Hess W.M. and Ford E.J. **1996** Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology-UK* 142, 2223-2226.
- Li Y.C., Tao W.Y. and Cheng L. **2009** Paclitaxel production using co-culture of *Taxus* suspension cells and paclitaxel-producing endophytic fungi in a co-bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, 233-239.
- Li Z.X., Chen J.W., Yuan F., Huang Y.Y., Zhao L.Y., Li J., Su H.X., Liu J., Pang J.Y., Lin Y.C., Lu X.L., Pei Z., Wang G.L. and Guan Y.Y. **2013** Xyloketal B exhibits its antioxidant activity through induction of HO-1 in vascular endothelial cells and zebrafish. *Marine Drugs* 11, 504-522.
- Lindequist U., Rausch R., Fuessel A. and Hanssen H.P. **2010** Higher fungi in traditional and modern medicine. *Medizinische Monatsschrift fuer Pharmazeuten* 33, 40-48.
- Liu D., Li X.M., Meng L., Li C.S., Gao S.S., Shang Z., Proksch P., Huang C.G. and Wang B.G. **2011** Nigerapyrones A-H, α -pyrone derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus niger* MA-132. *Journal of Natural Products* 74, 1787-1791.
- Liu Y.h., Yang X., Li J.l., Guo Z.y., Deng Z.s., Tu X., Chen J.f. and Zou K. **2013** Polyketide metabolites from the endophytic fungus *Penicillium* sp. (no. 4) of *Paris polyphylla* sm. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 25, 431-434, 493.

Referenzen

Mandala S.M., Thornton R.A., Frommer B.R., Curotto J.E., Rozdilsky W., Kurtz M.B., Giacobbe R.A., Bills G.F., Cabello M.A., Martin I., Pelaez F. and Harris G.H. **1995** The discovery of australifungin, a novel inhibitor of sphinganine *N*-acyltransferase from *Sporormiella australis* - producing organism, fermentation, isolation, and biological activity. *Journal of Antibiotics* 48, 349-356.

Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik **2013**
<http://www.mpg.de/153825/immunbiologie>.

McGlacken G.P. and Fairlamb I.J.S. **2005** 2-Pyrone natural products and mimetics: isolation, characterisation and biological activity. *Natural Product Reports* 22, 369-385.

McKillop A., McLaren L., Taylor R.J.K., Watson R.J. and Lewis N.J. **1996** The total synthesis of the diepoxycyclohexanone antibiotic aranorosin and novel synthetic analogues. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* 1385-1393.

Meinke P.T., Colletti S.L., Fisher M.H., Wyvratt M.J., Shih T.L., Ayer M.B., Li C., Lim J., Ok D., Salva S., Warmke L.M., Zakson M., Michael B.F., de M., Ostlind D.A., Fink D., Drag M., Schmatz D.M. and Shoop W.L. **2009** Discovery of the development candidate *N*-tert-butyl nodulisporamide: a safe and efficacious once monthly oral agent for the control of fleas and ticks on companion animals. *Journal of Medicinal Chemistry* 52, 3505-3515.

Meinke P.T., Shih T. and Fisher M.H. **1996** Nodulisporic acid derivatives; Patent WO9629073A1.

Meyer V. **2008** Genetic engineering of filamentous fungi - progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances* 26, 177-185.

Middha S.K., Usha T. and Pande V. **2013** HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in Pharmacological Sciences* 2013, 296236 - 296241.

Morrison T.M. and English D.A. **1967** Significance of mycorrhizal nodules of *Agathis australis*. *New Phytologist* 66, 245-250.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K. and Schäfer-Korting M. **2001** Mutschler Arzneimittelwirkungen, 8. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Nakashima T., Tanaka R., Yamashita Y., Kanda Y. and Hara M. **2008** Aranorosin and a novel derivative inhibit the anti-apoptotic functions regulated by Bcl-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377, 1085-1090.

Nicolaou K.C., Yang Z., Liu J.J., Ueno H., Nantermet P.G., Guy R.K., Claiborne C.F., Renaud J., Couladouros E.A., Paulvannan K. and Sorensen E.J. **1994** Total synthesis of taxol. *Nature* 367, 630-634.

Nielsen M.L., Nielsen J.B., Rank C., Klejnstrup M.L., Holm D.K., Brogaard K.H., Hansen B.G., Frisvad J.C., Larsen T.O. and Mortensen U.H. **2011** A genome-wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiology Letters* 321, 157-166.

Niknejad F., Moshfegh M., Najafzadeh M.J., Houbraken J., Rezaei S., Zarrini G., Faramarzi M.A. and Nafissi-Varcheh N. **2013** Halotolerant ability and α -amylase activity of some saltwater fungal isolates. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 12, 113-119.

Niu S.W., Liu D., Hu X.X., Proksch P., Shao Z.Z. and Lin W.H. **2014** Spiromastixones A-O, antibacterial chlorodepsidones from a deep-sea-derived *Spiromastix* sp. fungus. *Journal of Natural Products* 77, 1021-1030.

Nosanchuk J.D. and Casadevall A. **2003** The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cellular Microbiology* 5, 203-223.

Referenzen

- Nosanchuk J.D. and Casadevall A. **2006** Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 3519-3528.
- Nozawa O., Okazaki T., Morimoto S., Chen Z.X., He B.M. and Mizoue K. **2000** Waol B, a new trihydrofuran derivative with cytotoxic activity, isolated from *Myceliophthora lutea*. *Journal of Antibiotics* 53, 1296-1300.
- Ola A.R.B., Thomy D., Lai D., Broetz-Oesterhelt H. and Proksch P. **2013** Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of Natural Products* 76, 2094-2099.
- Ondeyka J.G., Helms G.L., Hensens O.D., Goetz M.A., Zink D.L., Tsipouras A., Shoop W.L., Slayton L., Dombrowski A.W., Polishook J.D., Ostlind D.A., Tsou N.N., Ball R.G. and Singh S.B. **1997** Nodulisporic acid A, a novel and potent insecticide from a *Nodulisporium* sp. Isolation, structure determination, and chemical transformations. *Journal of the American Chemical Society* 119, 8809-8816.
- Oonuma H., Nishizawa Y., Jokura H., Azuma S., Kimura M., Kobayashi T., Imokawa G., Kitayama T., Hori T. and Et A. **1993** Transdermal preparations containing chromone derivatives or their salts as melanin-formation inhibitors, Patent JP05301813A.
- Ozaki Y. **1990** Antiinflammatory effect of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb., and its active principles. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 38, 1045-1048.
- Pelletier D. and Hafler D.A. **2012** Fingolimod for multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine* 366, 339-347.
- Phoon C.W., Somanadhan B., Heng S.C.H., Ngo A., Ng S.B., Butler M.S., Buss A.D. and Sim M.M. **2004** Isolation and total synthesis of gymnastatin N, a POLO-like kinase 1 active constituent from the fungus *Arachniotus punctatus*. *Tetrahedron* 60, 11619-11628.
- Portal epigenetischer Forschung in Deutschland Ö.u.S.g.d.d.S.D. **2013** <http://epigenetics.uni-saarland.de/de/home/>.
- Pritchard D.I. **2005** Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens. *Drug discovery today* 10, 688-691.
- Proksch P., Ebel R., Edrada R., Riebe F., Liu H., Diesel A., Bayer M., Li X., Han L.W., Grebenyuk V., Mueller Werner E.G., Draeger S., Zuccaro A. and Schulz B. **2008** Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the *Suberites* case. *Botanica Marina* 51, 209.
- Puri S.C., Nazir A., Chawla R., Arora R., Riyaz-ul-Hasan S., Amna T., Ahmed B., Verma V., Singh S., Sagar R., Sharma A., Kumar R., Sharma R.K. and Qazi G.N. **2006** The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. *Journal of Biotechnology* 122, 494-510.
- Puri S.C., Verma V., Amna T., Qazi G.N. and Spitteller M. **2005** An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Products* 68, 1717-1719.
- Rasyid A., Rahman A.R.A., Jaalam K. and Lelo A. **2002** Effect of different curcumin dosages on human gall bladder. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 11, 314-318.
- Redman R.S., Kim Y.O., Woodward C.J.D.A., Greer C., Espino L., Doty S.L. and Rodriguez R.J. **2011** Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. *Plos One* 6, e14823.
- Redman R.S., Litvintseva A., Sheehan K.B., Henson J.M. and Rodriguez R.J. **1999** Fungi from geothermal soils in Yellowstone National Park. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5193-5197.
- Remy W., Taylor T.N., Hass H. and Kerp H. **1994** 4 hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11841-11843.

Referenzen

- Rillig M.C. **2004** Arbuscular mycorrhizae, glomalin, and soil aggregation. *Canadian Journal of Soil Science* 84, 355-363.
- Roensberg D. **2013** Neue Naturstoffe endophytischer Pilze aus Mangrovenpflanzen - Strukturaufklärung und Bioaktivität, Dissertation, <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=26300>.
- Rosewich U.L. and Kistler H.C. **2000** Role of horizontal gene transfer in the evolution of fungi. *Annual Review of Phytopathology* 38, 325-363.
- Roy K., Mukhopadhyay T., Reddy G.C.S., Desikan K.R., Rupp R.H. and Ganguli B.N. **1988** Aranorosin, a novel antibiotic from *Pseudoarachniotus roseus*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, chemical and biological properties. *Journal of Antibiotics* 41, 1780-1784.
- Roy K., Vijayakumar E.K.S., Mukhopadhyay T., Chatterjee S., Bhat R.G., Blumbach J. and Ganguli B.N. **1992** Aranorosinol A and aranorosinol B, two new metabolites from *Pseudoarachniotus roseus* - production, isolation, structure elucidation and biological properties. *Journal of Antibiotics* 45, 1592-1598.
- Schardl C.L., Leuchtman A. and Spiering M.J. **2004** Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* 55, 315-340.
- Schramm G., Steglich W., Anke T. and Oberwinkler F. **1978** Antibiotics from Basidiomycetes. III. Strobilurin A and strobilurin B, antifungal metabolites from *Strobilurus tenacellus*. *Chemische Berichte - Recueil* 111, 2779-2784.
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Rommert A.K. and Krohn K. **2002** Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106, 996-1004.
- Schwendemann A.B., Decombeix A.L., Taylor T.N., Taylor E.L. and Krings M. **2011** Morphological and functional stasis in mycorrhizal root nodules as exhibited by a Triassic conifer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 13630-13634.
- Senthil-Nathan S., Choi M.Y., Paik C.H. and Kalaivani K. **2008** The toxicity and physiological effect of goniotalamin, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Huebner. *Chemosphere* 72, 1393-1400.
- Simpson T.J. **2012** Genetic and biosynthetic studies of the fungal prenylated xanthone shamixanthone and related metabolites in *Aspergillus* spp. revisited. *ChemBioChem* 13, 1680-1688.
- Singh P., Rathinasamy K., Mohan R. and Panda D. **2008** Microtubule assembly dynamics: An attractive target for anticancer drugs. *IUBMB Life* 60, 368-375.
- Singh Y.N. **1992** Kava - an overview. *Journal of Ethnopharmacology* 37, 13-45.
- Spalding M., Kainuma M. and Collins L. **2010** World Atlas of Mangroves, 1st Ed. Earthscan, London UK.
- Staunton J. and Weissman K.J. **2001** Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports* 18, 380-416.
- Stierle A., Strobel G. and Stierle D. **1993** Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science* 260, 214-216.
- Strobel G. and Daisy B. **2003** Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, 491-501.
- Stuenkel W. and Campbell R.M. **2011** Sirtuin 1 (SIRT1): the misunderstood HDAC. *Journal of Biomolecular Screening* 16, 1153-1169.
- Tan R.X. and Zou W.X. **2001** Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18, 448-459.

Referenzen

Uebelhack R., Franke L. and Schewe H.J. **1998** Inhibition of platelet MAO-B by kava pyrone-enriched extract from *Piper methysticum* Forster (kava-kava). *Pharmacopsychiatry* 31, 187-192.

Vagstad A.L., Hill E.A., Labonte J.W. and Townsend C.A. **2012** Characterization of a fungal thioesterase having Claisen cyclase and deacetylase activities in melanin biosynthesis. *Chemistry & Biology* 19, 1525-1534.

Venkatasubbaiah P. and Chilton W.S. **1992** Phytotoxins produced by *Tubakia dryina*. *Mycopathologia* 120, 33-37.

Waller F., Achatz B., Baltruschat H., Fodor J., Becker K., Fischer M., Heier T., Hueckelhoven R., Neumann C., von Wettstein D., Franken P. and Kogel K.H. **2005** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13386-13391.

Wallwey C. and Li S.M. **2011** Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Natural Product Reports* 28, 496-510.

Wang G., Pang J., Lin Y., Liu J., Xie Y. and Liu C. **2011** Application of xyloketal B in preparing antiatherosclerotics; Patent CN102018699A.

Wang J., Debbab A., Hemphill C.F.P. and Proksch P. **2013** Optimization of enniatin production by solid-phase fermentation of *Fusarium tricinctum*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* 68, 223-230.

Wang W.J., Li D.Y., Li Y.C., Hua H.M., Ma E.L. and Li Z.L. **2014** Caryophyllene sesquiterpenes from the marine-derived fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5 by the one strain-many compounds strategy. *Journal of Natural Products* 77, 1367-1371.

Wasson R.G., Hofmann A. and Ruck C.A.P. **2008** The road to Eleusis: unveiling the secret of the mysteries. 30th Ed. North Atlantic Books.

Weerdt B.C.M. and Medema R.H. **2006** Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 5, 853-864.

Weissman K.J. **2009** Methods in enzymology. Vol. 459. Chapter 1. Introduction to Polyketide Biosynthesis.

Wijesekara I., Li Y.X., Vo T.S., Ta Q.V., Ngo D.H. and Kim S.K. **2013** Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by neoechinulin A from marine-derived fungus *Microsporium* sp. *Process Biochemistry* 48, 68-72.

Zhou Y. **2012** Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from the sponge-associated fungus *Aspergillus* sp., Dissertation, <http://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=21815>.

Abkürzungen

8 Abkürzungen

Liste der verwendeten Abkürzungen

| | |
|------------------------|--|
| $[\alpha]_D^{20}$ | Spezifische Drehwert bei 20°C und der Natrium-D-Linie |
| Abb. | Abbildung |
| ACP | Acyl-Carrier-Protein |
| br | breites NMR-Signal |
| ^{13}C | Isotop des Kohlenstoffs |
| CD | Circulardichroismus |
| CDCl_3 | Deuteriertes Chloroform |
| COSY | Correlation Spectroscopy |
| δ | Chemische Verschiebung im NMR |
| d | Dublett im NMR |
| DAD | Diodenarray-Detektor |
| dd | Dublett von Dublett im NMR |
| DEPT | Distorsionsless Enhancement by Polarisation Transfer |
| DH | Dehydratase |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| $\text{DMSO-}d_6$ | Deuteriertes Dimethylsulfoxid |
| ER | Enoylreduktase |
| ESI | Electrospray Ionisation |
| EtOAc | Ethylacetat |
| FAS | Fettsäuresynthase (von fatty acid) |
| FTHRMS | Hochauflösende (high resolution) Fouriertransformation-Massenspektrometrie |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond correlation |
| HMQC | Heteronuclear multiple quantum coherence |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| Hz | Hertz |
| IC_{50} | Inhibitorische Konzentration bei halbmaximaler Wirkung |
| J | Kopplungskonstante |
| KR | Ketoreduktase |
| KS | Ketosynthase |
| λ_{max} | Wellenlängenmaximum |
| m | Multipllett im NMR |
| M | Molar (mol/L) |
| MAT | Malonyl/Acyltransferase |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| m/z | Masse pro Ladung |

Abkürzungen

| | |
|-------|--|
| MW | Molekulargewicht |
| NMR | Nuclear magnetic resonance |
| NOE | Nuclear Overhauser effect |
| NOESY | Nuclear Overhauser and exchange spectroscopy |
| OSMAC | One strain – many compounds |
| PDA | Photodiodearray |
| PK | Polyketid |
| PKS | Polyketidsynthase |
| ROESY | Rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy |
| RP | Reversed phase |
| s | Singulett im NMR |
| t | Triplett im NMR |
| TE | Thioesterase |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| TLC | Dünnschichtchromatografie |
| u | unit, Einheit der Atommasse |
| VLC | Vacuum liquid chromatography |

9 Wissenschaftliche Leistungen

Publikationen

Hammerschmidt, L.; Wray, V.; Lin, W. H.; Kamilova, E.; Proksch, P.; Aly, A. H. **2012**. New styrylpyrones from the fungal endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*. *Phytochemistry Letters*, 5, 600-603.

Hammerschmidt, L.; Debbab, A.; Duong Ngoc, T. ; Wray, V.; Pérez Hemphill, C.; Lin, W. H.; Broetz-Oesterhelt, H.; Kassack, M. U.; Proksch, P.; Aly, A. H. **2014**. Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*. *Tetrahedron Letters*, 55, 3463-3468.

Hammerschmidt, L.; Ola, A. ; Müller, W.E.G.; Lin, W. H.; Mándi, A.; Kurtán, T.; Proksch, P.; Aly, A. H. **2014**. Two new metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. isolated from the medicinal plant *Curcuma xanthorrhiza*. *Tetrahedron Letters*, submitted.

Hammerschmidt, L., Aly, A. H., Abdelaziz, M., Müller, W. E. G., Lin, W. H., Daletos, G., Proksch, P. **2014**. Cytotoxic acyl amides from the soil fungus *Gymnascella dankaliensis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, submitted.

Vorträge

03-04.05.2012 1^{er} Congrès de Pharmacologie, Société Marocaine de Pharmacologie, Rabat, Marokko: New Styrylpyrones from the Fungal Endophyte *Penicillium glabrum* isolated from *Punica granatum*

18.-21.09.2011 5th Asian-Link Workshop on Natural Product Chemistry & Annual Meeting of NSFC Major International Joint Project, Qingdao, China: Endophytic fungi: source of new drugs and the work with them.

10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben, ganz herzlich bedanken, denn ohne Mithilfe anderer wäre sie nicht entstanden!

Dennoch gibt es viele, die ich namentlich erwähnen möchte!

- Herrn Prof. Dr. Proksch möchte ich für die Chance, diese Arbeit bei ihm im Institut durchzuführen, herzlich bedanken. Darüber hinaus für die vielen Anregungen und die Auslandsaufenthalte, die meinen Horizont erweitert haben!
- Herrn Prof. Dr. Kassack möchte ich für die Übernahme des Koreferats herzlich danken und ebenfalls seinen Mitarbeitern für die Durchführung der MTT-Assays.
- Prof. Dr. Bingui Wang danke ich für die Ermöglichung des Aufenthaltes bei ihm im Institut (Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qindao, China), seine nette Betreuung und die seiner Mitarbeiter, vorallem Meng Ling Hong und Liu Yang.
- Prof. Dr. Wenhan Lin und Dr. Wray für die NMR-Lösungshilfen. Prof. Lin möchte ich auch für die gastfreundliche Aufnahme in Beijing herzlich danken.
- Frau Prof. Dr. Brötz-Oesterhelt und AG danke ich für Durchführungen der biologischen Aktivität und PB1-Betreuung. Dr. Pretsch von SeaLife Pharma danke ich ebenfalls für biologische Aktivitätsmessungen und finanzielle Unterstützung.
- Prof. Müller und Frau Steffen möchte ich für die Durchführung der zytotoxischen Tests danken!
- Herrn Dr. Tommes, Herrn Bürgel, Frau Karkoschke und Frau Beuer möchte ich für NMR- und MS-Messungen danken. Gerade für die kleinen Ausnahmen und Extrawünsche!
- Dr. Elena Kamilova, Dr. Tu Duong Ngoc, Dr. Antonius Ola und Prof. Dr. Mohammed Abdelaziz danke ich für die Überlassung der Pilzquellen bzw. der Pilze.
- Frau Claudia Eckelskemper danke ich für den reibungslosen Ablauf der administrativen Angelegenheiten und die Gespräche zwischendurch beim Warten!
- Unseren TAs Katja Friedrich, Simone Miljanovic und Waltraud Schlag möchte ich nicht nur für die Labor- und logistischen Angelegenheiten ganz herzlich danken, sondern besonders für die Gespräche und Aufmunterungen! Ohne euch würde nichts laufen!
- Dr. Amal Hassan Aly danke ich für die Gespräche und die Stunden, die bei der Manuskriptbearbeitung verstrichen sind.
- Allen meinen ehemaligen Kollegen und Gästen: Dr. Daniela Ackermann, Mousa AlTarabeen, Dr. Robert Bara, Meriem Bendouma, Dr. Anne Berscheid, Huiqin Chen, Mi-Young Chung (Eiszeiten, Mensa und vieles mehr), George Daletos (Korrektur des letzten Papers), Dr. Abdessamad Debbab (Rabat-Aufenthalt), Mona ElNekity, Imke Form (viel Schokolade und nette Gesrpäche), Dr. Sherif Ebbada, Dr. Weaam Ebrahim, Mustapha ElAmrani, Wera Hauschild (Gespräche

Danksagung

über die Uni hinaus), Dr. Fatima Zahra Kabbaj (die nette Laborzeit und die supernette Bewirtung in Rabat von deiner ganzen Familie), Dr. Bartosz Lipowicz (für Aufmunterungen, Pflaster und Korrekturlesen), Yang Liu, Amin Mokhlesi, Mariam Mousa, Rini Muharini, Hendrik Niemann (Mensa und Sport), Dr. Festus Okoje, Dr. Antonius Ola (besonderen Dank für die Monate im Kabuff), Catalina Pérez Hemphill (für Sport im Labor, 43 mit Milch und vieles mehr), Dr. Cong-Dat Pham, Dr. David Rönsberg, Dr. Peter Saß, Dr. Jianping Wang, Dr. Yaming Zhou und alle, die ich jetzt leider vergessen habe.

Danke für die tolle Aufnahme, die Zeit zum Beantworten meiner Fragen, die schönen Gespräche und gemeinsamen Erlebnisse wie Essen gehen und Wilhuhn-Pokal-Spiele! Danke, danke, danke!!

- Andreas Marmann danke ich für die tolle Laborzeit mit Geschichten, Videos und 1Live, besonders für all die Antworten auf meine Fragen, Eiszeiten, die ewige Wanderung in und durch Beijing und die Freundschaft übers Labor hinaus!
- Dann möchte ich noch Kirsten Famulla, Heike Goldbach-Gecke, Nadine Kromberg, Catherine Schumacher und Dhana Thomy danken, (Oh mein Gott), eigentlich für alles!! Besonders für die vielen lustigen Stunden um, im, am und weit weg vom Labor. Das Großwerden, Sport, Plan B-Z, Cocktails und Grill-, Serien- und Kochabende. Ich danke euch, Mädels, ohne euch wäre es nicht das Gleiche gewesen!!
- Dann möchte ich noch „meinen“ Pharmazeuten Anne und Barbara danken, ohne die das Studium wirklich langweilig gewesen wäre, dem „Physikerfreundeskreis“ (Anna, Robert, Lena, André, Nina, Nils, Konrad und Jonas), für die tolle Studienzeit mit euch und dass es mit den Treffen auch über Münster hinaus klappt und Steffi und Christian Wilms, für alles und dass sie nach Neuss gezogen sind.
- Zum Schluss danke ich meinen Eltern Franz und Christa Hammerschmidt, die mich in jeglicher Sicht unterstützt und es mir ermöglicht haben, dahin zu kommen, wo ich jetzt bin! Meiner Schwester Inga für die langen Telefonate und meiner Schwester Thea und ihrem Mann Thorsten für sonntägliches Essen, Filmabende, aus Löchern ziehen und den ewigen Glauben an mich!

11 Erklärung

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

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

HR-ESI-Massenspektrometrie: Die Messungen wurden durch Frau Andrea Berger am Institut für Biophysikalische Analytik am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig auf einem Micromass QTOF II bzw. durch Herrn Dr. Peter Tommes auf einem Bruker Daltonics maXis G4 am Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt.

NMR-Spektroskopie: Die Messungen wurden am Institut für Anorganische Chemie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Bruker DRX500) durch Herr Behm und Herrn Dr. Amadeo bzw. am Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie der HHU (Bruker Avance III-600) von Frau Beuer durchgeführt. Weitere Messungen wurden von Frau C. Karkoschke und Herrn Dr. Viktor Wray am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig auf einem Bruker AM-300, ARX-400 und DMX-600 vorgenommen.

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

Antibakterielle Aktivität: Die Untersuchungen auf antibakterielle Aktivität wurde einmal von Mitarbeitern von Herrn Dr. Alexander Pretsch in den Laboren der SeaLife Pharma GmbH in Tulln, Österreich und zum anderen von Heike Goldbach-Gecke am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie an der HHU vorgenommen.

Erklärung

Zytotoxizität: Die Untersuchungen auf zytotoxische Aktivität wurden durch die Mitarbeiter der AG Kassack am Institut für Pharmazeutische Chemie der HHU an der Cisplatin sensitiven und resistenten Ovarialkarzinom- (A2780) und an der humanen Kolorektalzelllinie HCT116 durchgeführt. Weitere Untersuchungen an der murinen Lymphomzelllinie L5178Y von Frau Renate Steffen am Institut für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vorgenommen.

HDAC: Die Untersuchungen zur HDAC-Wirkung wurden durch die Mitarbeiter von Herrn Dr. Diederich im Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer (LBMCC) in Luxemburg durchgeführt.

Catalina Pérez Hemphill hat während ihrer Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Proksch ebenfalls die Substanz Waolsäure (Publikation 2) isoliert, weshalb sie als Autorin mit in die Publikation aufgenommen wurde.

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

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel **„Neue Naturstoffe aus endophytischen Pilzen und einem Bodenzpilz – Chemische und biologische Charakterisierung“** selbst angefertigt habe. Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Diese Dissertation wurde weder in der vorgelegten noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem erkläre ich, dass ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 10.11.2014

Lena Hammerschmidt