

**ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG
NEUER NATURSTOFFE AUS SCHWAMM-
ASSOZIIERTEN MIKROORGANISMEN**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
NATURWISSENSCHAFTLICHEN DOKTORGRADES
DER BAYERISCHEN JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG**

**vorgelegt von
Gerhard Lang
aus
Hamilton/Kanada**

Würzburg 2004

Eingereicht am: _____

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

der Dissertation

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis Januar 2004
am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg angefertigt

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann danke ich für
die Unterstützung dieser Arbeit, fachliche Diskussionen
und die exzellenten Arbeitsbedingungen

Teile der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse waren bereits Gegenstand von
Publikationen^[34,54,66,109,161] und Patenten^[74,110,160] sowie von Postern und Vorträgen

INHALTSVERZEICHNIS

ALLGEMEINER TEIL.....	1
1 Einleitung	1
2 Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Pilzen	5
2.1 Kenntnisstand.....	5
2.2 Isolierung und Anzucht der Pilze.....	8
2.3 Extraktion und Testung auf biologische Aktivität	9
2.4 Dereplikation bekannter Naturstoffe durch HPLC-UV, -MS und -NMR.....	11
2.5 Naturstoffe aus <i>Penicillium cf. brevicompactum</i> E00-1/14b	15
2.5.1 Ergebnisse der HPLC-UV, -MS und -NMR-Untersuchungen.....	15
2.5.2 Isolierung der Verbindungen durch Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC)	17
2.5.3 Strukturaufklärung der Petrosifungine A (23) und B (24)	19
2.5.4 Identifizierung von Brevianamid A (22).....	21
2.6 Naturstoffe aus <i>Emericella varicolor</i> E00-6/3	22
2.6.1 Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen	22
2.6.2 Die Anthrachinone Evarichinon (27) und 7-Hydroxyemodin (28).....	23
2.6.3 Die Prenylxanthone Isoemicellin (30), Tajixanthonhydrat (33) und Shamixanthon (34).....	25
2.6.4 Strukturaufklärung von Stromemycin (35).....	28
2.7 Metaboliten eines <i>Penicillium chrysogenum</i> -Stammes	31
2.7.1 Sorbicillin-abgeleitete Naturstoffe	31
2.7.1.1 Sorbicillacton A (47).....	33
2.7.1.2 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (53)	39

2.7.1.3	Sorbifuranon A (54a), B (58) und C (59)	39
2.7.1.4	Eine Sorbicillinol-abgeleitete Substanz (62a).....	47
2.7.1.5	Bisvertinolon (64)	49
2.7.2	Identifizierung der Alkaloide Meleagrין (38) und Roquefortin C (18)	49
2.7.3	Zeitverlauf und Salzabhängigkeit der Metabolitenkonzentration in E01-10/3-Kulturen.....	50
2.8	Naturstoffe aus <i>Penicillium</i> -Stamm E00-2/7	52
2.8.1	Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen	52
2.8.2	Hamigeron und neue Hamigeron-Derivate	52
2.8.3	Identifizierung von Citreohybridonol (69).....	54
2.8.4	Identifizierung eines Atrovenetinon-Aceton-Addukts (71)	54
2.8.5	Identifizierung von Cladosporin (72).....	55
2.9	Weitere bekannte Metaboliten der marinen Pilzisolat	56
2.9.1	Nafuredin (73) aus E00-5/5.....	56
2.9.2	Cochliodinol aus E00-2/1.....	57
2.10	Synthese von racemischem und enantiomerenreinem Xestodecalacton A (75)	58
2.10.1	Hintergrund	58
2.10.2	Synthese von (<i>R</i>)- und (<i>S</i>)- sowie <i>rac</i> -Xestodecalacton A (75).....	59
3	Naturstoffe aus Bakterien.....	62
3.1	Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Bakterien.....	62
3.1.1	Kenntnisstand.....	62
3.1.2	Isolierung von 2-Methylthionaphthochinon (95) aus Bakterienstamm SB2.....	64
3.2	Naturstoffe aus terrestrischen Streptomyceten.....	65
3.2.1	Hintergrund	65
3.2.2	Strukturaufklärung des Angucyclinons AK1030B (102).....	66
3.2.3	Identifizierung von 4-Hydroxyscytalon (104)	70

4 Zusammenfassung	72
5 Summary	79
EXPERIMENTELLER TEIL	85
1 Allgemeine Methoden.....	85
1.1 Verwendete Meßgeräte	85
1.2 Chromatographische Methoden	87
2 Isolierung von Naturstoffen aus Schwamm-assoziierten Pilzen	89
2.1 Extraktion der Pilzkulturen und Aufarbeitung der Extrakte	89
2.2 Untersuchung der Pilzextrakte im <i>Artemia salina</i> -assay	89
2.3 HPLC-UV, -MS, -NMR und -CD-Untersuchungen des Pilzstammes E00-24/37	90
2.4 Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Penicillium brevicompactum</i> E00-1/14b.....	91
2.4.1 Pilzmaterial, Extraktion und HPLC-Untersuchungen.....	91
2.4.2 Isolierung der Substanzen durch FCPC	93
2.4.3 Petrosifungin A (23).....	93
2.4.4 Petrosifungin B (24).....	95
2.4.5 Marfey- und GITC-Analyse der Petrosifungine A (23) und B (24).....	96
2.4.6 Brevianamid A (22).....	97
2.5 Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Emericella varicolor</i> E00-6/3.....	98
2.5.1 Pilzmaterial, Extraktion und Isolierung der Inhaltstoffe.....	98
2.5.2 Evarichinon (27).....	99
2.5.3 7-Hydroxyemodin (28).....	100
2.5.4 O-Methylierung von 27 und 28	101

2.5.5	Isoemicellin (30)	101
2.5.6	Shamixanthon (34)	102
2.5.7	Tajixanthonhydrat (33)	103
2.5.8	Stromemycin (35)	104
2.5.9	Methanolyse von 35	105
2.5.10	2-Furansäure (105)	106
2.6	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Penicillium chrysogenum</i> E01-10/3	107
2.6.1	Pilzmaterial, Extraktion und Isolierung der Inhaltsstoffe	107
2.6.2	Sorbicillacton A (47)	108
2.6.3	<i>O</i> -Methylierung von Sorbicillacton A (47)	109
2.6.4	2',3'-Dihydrosorbicillacton A (53)	110
2.6.5	Sorbifuranon A (54a)	111
2.6.6	Methylierung von Sorbifuranon A (54a)	112
2.6.7	Sorbifuranon B (58)	113
2.6.8	Sorbifuranon C (59)	114
2.6.9	Ethylvinylether-Sorbicillinol-Addukt (62a)	116
2.6.10	Reaktion von Sorbicillinol-Acetat mit Ethylvinylether	117
2.6.11	Bisvertinolon (64)	118
2.6.12	Meleagrין (38)	119
2.7	Isolierung von Inhaltsstoffen aus <i>Penicillium</i> sp. E00-2/7	119
2.7.1	Pilzmaterial, Extraktion und Isolierung der Reinsubstanzen	119
2.7.2	Hamigeronhydrat (66)	120
2.7.3	Hamigerin (67)	121
2.7.4	Hamigeron (65)	122
2.7.5	Citreohybridonol (69)	123
2.7.6	Atrovetinon-Aceton-Addukt (71)	124

2.7.7	Cladosporin (72).....	125
2.8	Isolierung von Nafuredin (73) aus Pilzstamm E00-5/5.....	125
2.9	Isolierung von Cochliodinol (74) aus Pilzstamm E00-2/1	126
2.10	Synthese von Xestodecalacton A (75)	127
2.10.1	Darstellung von <i>rac</i> - 84	127
2.10.2	Darstellung von (<i>S</i>)- 84 [bzw. (<i>R</i>)- 84]	128
2.10.3	Darstellung von (3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäure (88)	130
2.10.3.1	Benzylierung von (3,5-Dihydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (87).....	130
2.10.3.2	Verseifung von (3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäuremethylester (107)	130
2.10.4	Darstellung von 5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäuremethylester (89)	131
2.10.5	Darstellung von 5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäure (90)	132
2.10.6	Darstellung von <i>O,O</i> -Dibenzylxestodecalacton A (91)	133
2.10.7	Hydrogenolyse von 91 zu Xestodecalacton A (75).....	134
3	Isolierung von Naturstoffen aus Bakterien	135
3.1	Isolierung von 2-Methylthionaphthochinon (95).....	135
3.2	Naturstoffe aus Actinomyceten (von Prof. Fiedler, Tübingen).....	136
3.2.1	AK1030B (102).....	136
3.2.2	4-Hydroxycytalon (104)	138
A	Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse von AK1030B (102)...	139
	LITERATUR UND ANMERKUNGEN.....	142

ALLGEMEINER TEIL

1 Einleitung

Die Evolution hat eine unvorstellbare Zahl an Lebewesen geschaffen, die mit ihrem Reichtum an Formen und Überlebensstrategien jeden nur erdenklichen Lebensraum auf der Erde ausfüllen. Parallel zu dieser Entwicklung entstand auch eine enorme Vielfalt an Naturstoffen, d.h. organischen Verbindungen mit relativ geringer Molekülmasse, die nicht Teil des Primärstoffwechsels sind. Diese Sekundärmetaboliten werden von den Organismen zu den unterschiedlichsten Zwecken produziert, doch oft geht es dabei um Interaktion. Diese kann beispielsweise ein Informationsaustausch zwischen Zellen und Geweben innerhalb mehrzelliger Organismen sein, vermittelt durch Hormone wie Thyroxin beim Menschen oder Jasmonsäure bei Pflanzen. Oft dienen Naturstoffe aber auch der Kommunikation zwischen verschiedenen Individuen derselben Art, zum Beispiel durch 'Quorum-sensing'-Moleküle wie das Bradyoxetin^[1] bei Bakterien der Art *Bradyrhizobium japonicum* oder die Pheromone vieler Insektenarten. Doch die pharmakologisch interessantesten Sekundärmetaboliten dienen keinesfalls der friedlichen Kommunikation, sondern bilden die Abwehr- und Angriffswaffen im Kampf der Organismen um Nahrung und Lebensraum. Insbesondere die Mikroorganismen, Pilze und Bakterien, sind bekannt für ihren 'chemischen Erfindungsreichtum', und eine Vielzahl ihrer Produkte werden auch medizinisch als Antibiotika eingesetzt, so z.B. das berühmte Penicillin^[2] oder das von Bakterien produzierte Streptomycin.^[3] Unter den mehrzelligen Organismen sind es vor allem Pflanzen und marine Invertebraten, die sich aufgrund ihrer sessilen Lebensweise und wegen oft mangelnden physikalischen Schutzes auf eine chemische Verteidigung verlassen müssen, um sich gegen Fraßfeinde zu verteidigen. Das Pflanzenreich bildet schon seit langem einen reichen Fundus für die medizinischen Bedürfnisse der Menschen, zuerst im Rahmen einer mündlich überlieferten Volksmedizin, heutzutage aber durch eine systematische Suche nach biologisch aktiven pflanzlichen Substanzen; und diese Suche war bisher überaus erfolgreich, sie führte zur Entdeckung wichtiger Wirksubstanzen, wie z.B. den wichtigen Antitumormitteln Taxol^[4] und Vincristin.^[5] Bei der Entwicklung neuer Medikamente spielen Naturstoffe auch heute noch eine bedeutsame Rolle. Über die Hälfte der im Zeitraum 1981-2002 zugelassenen Wirkstoffe waren Naturstoffe oder Naturstoffderivate.^[6]

Die Beobachtung, dass viele marine Invertebraten trotz ihrer scheinbaren Wehrlosigkeit kaum von Fraßfeinden angegriffen werden, veranlasste Chemiker und Biologen, auch diese Organismengruppe auf ihren Gehalt an biologisch aktiven Verbindungen hin zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass viele dieser Meeresbewohner über eine sehr effektive chemische Verteidigung verfügen. Tatsächlich produzieren marine Invertebraten deutlich

häufiger cytotoxische Substanzen als jede andere Gruppe von Pflanzen oder Tieren. Einer der ersten Erfolge der marinen Naturstoffforschung war die Entdeckung ungewöhnlicher Nucleoside im Schwamm *Cryptotethya crypta*,^[7] die später als Vorbild für das medizinisch eingesetzte antivirale Arabinosyladenosin (araA, **1**) und andere Nucleosidanaloga dienten. Weitere hochaktive Naturstoffe aus Schwämmen sind das aus *Halichondria okadai* isolierte Halichondrin B (**2**),^[8] das sich bereits in der ersten klinische Testphase als Antikrebsmedikament befindet,^[9] die aus demselben Schwamm isolierte Okadainsäure (**3**), welche ein Inhibitor der Proteinphosphatasen 1 und 2A ist, sowie das cytostatisch aktive Discodermolid (**4**) aus *Discodermia dissoluta*.^[10]

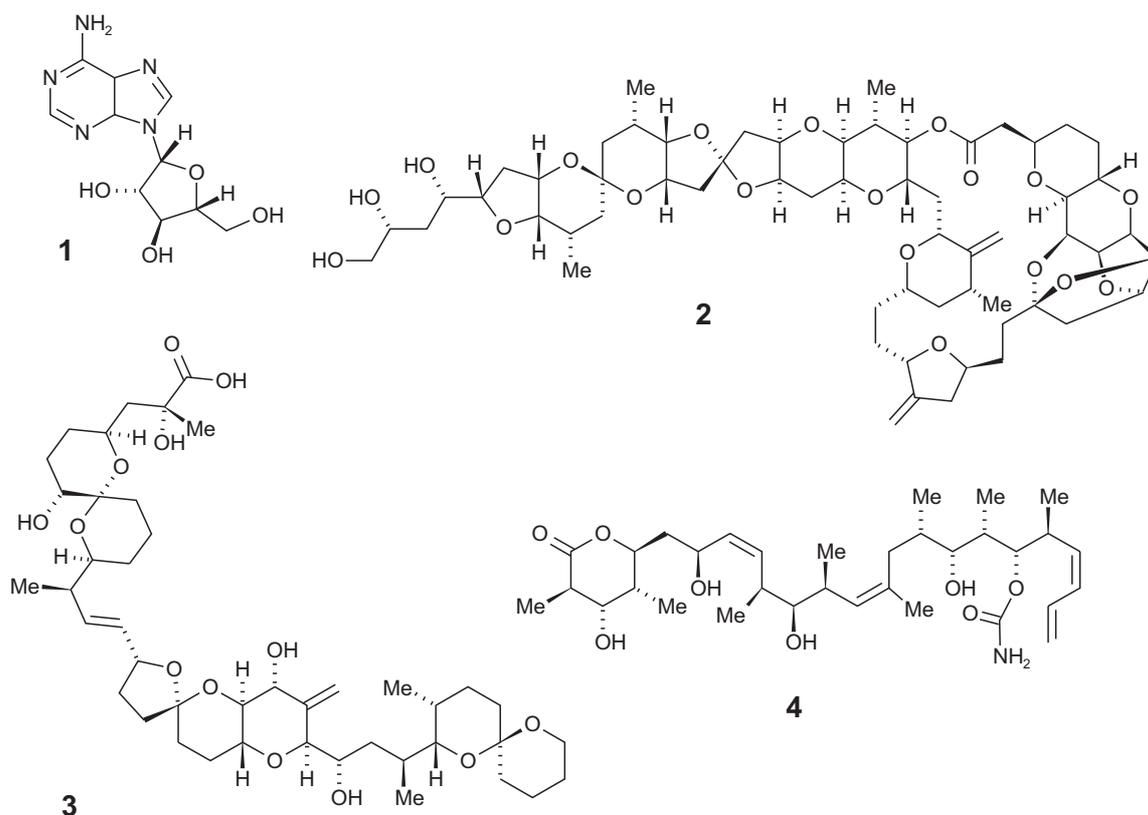


Abb. 1. Der antivirale Wirkstoff Arabinosyladenosin (araA; **1**) sowie die aus Schwämmen isolierten biologisch aktiven Verbindungen Halichondrin B (**2**), Okadainsäure (**3**) und Discodermolid (**4**).

Nicht nur Schwämme sind eine ergiebige Quelle für hochaktive Substanzen, auch aus anderen marinen Invertebraten wurden Wirkstoffe isoliert, die sich teilweise schon in den klinischen Testphasen des Zulassungsverfahrens befinden. Als erster mariner Naturstoff steht ω -Conotoxin MVIIA (Ziconitide) kurz vor der Zulassung als Analgetikum, es handelt sich hier um ein aus 25 Aminosäure bestehendes Peptid, welches ursprünglich aus der räuberischen Kegelschnecke *Conus magus* isoliert wurde.^[11] Auch das aus dem Moostierchen

Bugula neritina gewonnene Cytostatikum Bryostatin 1 (**5**)^[12] hat schon erfolgreich die zweite klinische Testphase durchlaufen.^[13]

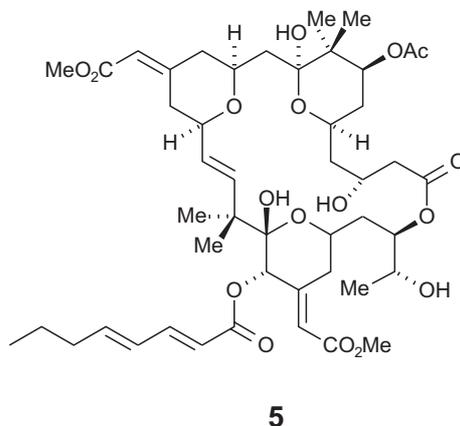


Abb. 2. Bryostatin 1 (**5**),^[12] ein potenzieller Antitumorwirkstoff aus dem Moostierchen *Bugula neritina*.

Trotz all dieser Erfolge zeichnet sich in den letzten Jahren ein Trend weg von marinen Makro- hin zu Mikroorganismen ab. Die Gründe dafür sind vielfältig. Zum einen ist durch die unermüdliche Forschungsarbeit der letzten fünf Jahrzehnte ein großer Teil der Schwämme, Bryozoen und Tunicaten schon gut untersucht, so dass es immer schwieriger wird, neue Verbindungen zu finden. Außerdem mehren sich die Hinweise darauf, dass ein Teil der aus Invertebraten isolierten Naturstoffe eigentlich von symbiotischen Bakterien produziert wird.^[14] Doch der Hauptgrund ist sicherlich die begrenzte Verfügbarkeit der meisten aus marinen Invertebraten isolierten Naturstoffe. Das Sammeln der Tiere aus ihrem natürlichen Lebensraum verbietet sich aus ökologischen Gründen und wäre überdies meist unrentabel. Die Kultivierung gestaltet sich sehr schwierig, obwohl es z.B. für den Bryostatin-Produzenten *Bugula neritina* schon viel versprechende Ansätze gibt.^[15] Und die Produktion der Wirkstoffe durch chemische Totalsynthese ist wegen der oft äußerst komplexen Strukturen ebenfalls ineffizient. Naturstoffe aus Mikroorganismen dagegen sind meist einfach in großem Maßstab zugänglich. Darüber hinaus ist bei Naturstoffen aus marinen Bakterien und Pilzen ein höherer Anteil neuer Strukturtypen zu erwarten als bei Mikroorganismen aus gut untersuchten terrestrischen Habitaten.^[16]

Die vorliegende Arbeit ist Teil zweier interdisziplinärer Projekte, deren Ziel die Erschließung neuer Wirkstoffe aus marinen Schwämmen und daraus isolierten Mikroorganismen ist. Die Aufgabe unserer Arbeitsgruppe innerhalb dieser Projekte ist die chemische Analyse von Schwamm-, Bakterien- und Pilzextrakten, die Isolierung neuer Naturstoffe sowie deren Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie. Darüber hinaus werden in unserer Gruppe Naturstoffe auch totalsynthetisch dargestellt, zum einen um die Verbindungen und ihre Derivate in größeren

Mengen für biologische Tests zur Verfügung zu stellen, aber auch um Fragen der absoluten Konfiguration zu klären und die durch NMR-Spektroskopie ermittelten Strukturen zu bestätigen.

Da es sich bei der Isolierung von Naturstoffen und der Auslotung ihrer biologischen Aktivitäten um ein Arbeitsgebiet an der Schnittstelle zwischen Chemie und Biologie handelt, beruht die vorliegende Arbeit zu großen Teilen auf Vorarbeiten von und Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen. Im Folgenden sind die für diese Arbeit wichtigsten Kooperationspartner und ihr Anteil an dieser Arbeit aufgeführt:

- Arbeitsgruppe Dr. K. Schaumann (Alfred-Wegener-Institut Bremerhaven):
Isolierung, taxonomische Einordnung und Anzucht von marinen Pilzen
- Arbeitsgruppe Prof. J. Imhoff (Institut für Meereskunde, Kiel):
Isolierung, Identifizierung und Anzucht Schwamm-assoziiierter Bakterien
- Arbeitsgruppe Dr. U. Hentschel (Universität Würzburg):
Isolierung Schwamm-assoziiierter Bakterien, Tests auf antimikrobielle und anti-Biofilm-Aktivität
- Arbeitsgruppe Prof. W. E. G. Müller (Universität Mainz):
Isolierung Schwamm-assoziiierter Bakterien, Tests von Reinsubstanzen auf cytostatische und antivirale Aktivität
- Arbeitsgruppe Prof. R. Brun (Schweizerisches Tropeninstitut, Basel):
Test der Substanzen auf antiprotozoale Aktivität
- Zentaris AG (Frankfurt am Main):
Test der Substanzen auf cytostatische Aktivität

Im Einzelnen ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgabenstellungen:

- Etablierung eines effektiven Dereplikationssystems zur Identifizierung bekannter Naturstoffe durch die gekoppelten Analyseverfahren HPLC-UV, -MS/MS, -NMR und -CD.
- Extraktion und chemisches Screening mariner Pilze sowie die Isolierung und Strukturaufklärung neuer Naturstoffe aus diesen Organismen.
- Identifizierung bioaktiver Substanzen in Extrakten Schwamm-assoziiierter Bakterien.
- Strukturaufklärung von Naturstoffen aus extremophilen Actinomyceten.
- Aufklärung der absoluten Konfiguration des Pilzmetaboliten Xestodecalacton A durch Totalsynthese.

2 Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Pilzen

2.1 Kenntnisstand

Pilze bevölkern die unterschiedlichsten Lebensräume. Am bekanntesten sind wohl die Ständerpilze (Basidiomyceten) mit ihren auffälligen Fruchtkörpern, doch der weitaus größere Teil der Pilzarten ist eher unscheinbar. Man findet sie als Schimmel auf Lebensmitteln und anderen organischen Substraten, in symbiotischer Gemeinschaft mit Algen bilden sie Flechten, pflanzenpathogene Pilze verursachen Ernteaufschläge, und einige Arten spielen auch als Krankheitserreger beim Menschen eine Rolle. Insgesamt sind über 70.000 verschiedene Pilzarten bekannt.^[17] Es verwundert also nicht, dass auch das Meer Lebensraum vieler Pilzspezies ist. Die marinen Pilze bilden jedoch keine taxonomisch einheitliche Gruppe, sondern gehören sehr unterschiedlichen Genera an, die häufig auch terrestrische Vertreter haben. Nach Kohlmeier^[18] werden marine Pilze als solche definiert, die in einer Umgebung mit hohem Salzgehalt wachsen und Sporen bilden. Dabei unterscheidet man obligat marine Pilze, die nur bei hohen Salzkonzentrationen gedeihen, von fakultativ marinen, die sowohl in salzhaltiger als auch in salzärmer Umgebung wachsen.^[18] Marine Pilze wurden aus verschiedenen Substraten isoliert, so z.B. aus Sedimentproben, Algen, Krebschalen, Mangroven und Schwämmen. Die Anzahl der marinen höheren Pilzspezies wurde auf mindestens 6000 geschätzt.^[19] In der vorliegenden Arbeit ist von 'Schwamm-assoziierten Pilzen' die Rede, doch dieser Ausdruck ist irreführend. Bisher wurde in Schwämmen kein Pilzwachstum nachgewiesen. Eine Ausnahme stellt ein parasitärer Pilz dar, welcher in den 30er Jahren des letzten Jahrhunderts auf Schwammfarmen auf den Bahamas *Hippospongia*-Arten befiel.^[20]

Naturstoffe aus Pilzen spielen eine wichtige Rolle als gesundheitsschädliche Kontaminanten in Lebensmitteln und werden in diesem Zusammenhang als Mycotoxine bezeichnet. Das bekannteste dieser Gifte, und gleichzeitig eines der stärksten Leberkanzerogene, ist Aflatoxin B₁ (6), welches von *Aspergillus flavus* produziert wird. Das nephrotoxische Ochratoxin A (7) aus *Aspergillus ochraceus* findet sich vor allem in Futtergetreide und reichert sich in Muskulatur und Fettgewebe von Schlachttieren an. Patulin (8) ist als Kontamination von Apfelsaft weit verbreitet. Durch strenge Lebensmittelkontrollen geht von diesen Toxinen jedoch kaum noch eine Gefahr aus, in Entwicklungsländern dagegen ist verschimmelter Getreide die Hauptursache für die sehr hohe Inzidenz von Leberkrebs.^[21]

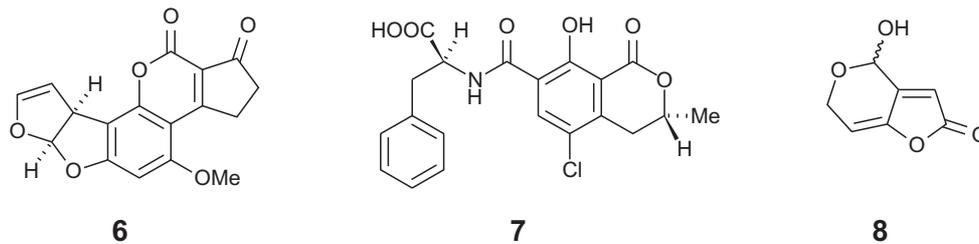


Abb. 3. Gesundheitlich relevante Mycotoxine: Aflatoxin B₁ (**6**), Ochratoxin A (**7**) und Patulin (**8**).

Doch Pilze werden vom Menschen auch nutzbringend eingesetzt. Die Fruchtkörper einiger Pilze werden direkt verzehrt, diverse Schimmelpilze werden eingesetzt, um Lebensmittel durch Fermentation haltbarer oder wohlschmeckender zu machen, und für die Herstellung von alkoholischen Getränken werden Hefen verwendet. In manchen Kulturkreisen werden Psilocin-haltige Pilze auch wegen ihrer halluzinogenen Wirkung in religiösen Ritualen eingesetzt.

Das pharmakologische Potenzial von Naturstoffen aus Pilzen wurde erst relativ spät erkannt. Zwar wurde schon Ende des 19. Jahrhunderts die Mycophenolsäure (**9**) als erster antibiotisch wirksamer Naturstoff isoliert,^[47] doch erst mit der Entdeckung des Penicillins G (**10**) durch A. Fleming im Jahr 1929 begann die Erfolgsgeschichte der Pilze in der Medizin.^[2] Heute werden Pilznaturstoffe nicht nur als Antibiotika eingesetzt, sondern auch bei einer Vielzahl anderer medizinischer Indikationen. Das Cyclopeptid Cyclosporin A (**12**)^[22] aus dem Pilz *Tolypocladium inflatum* ist ein wichtiges Immunsuppressivum und wird zur

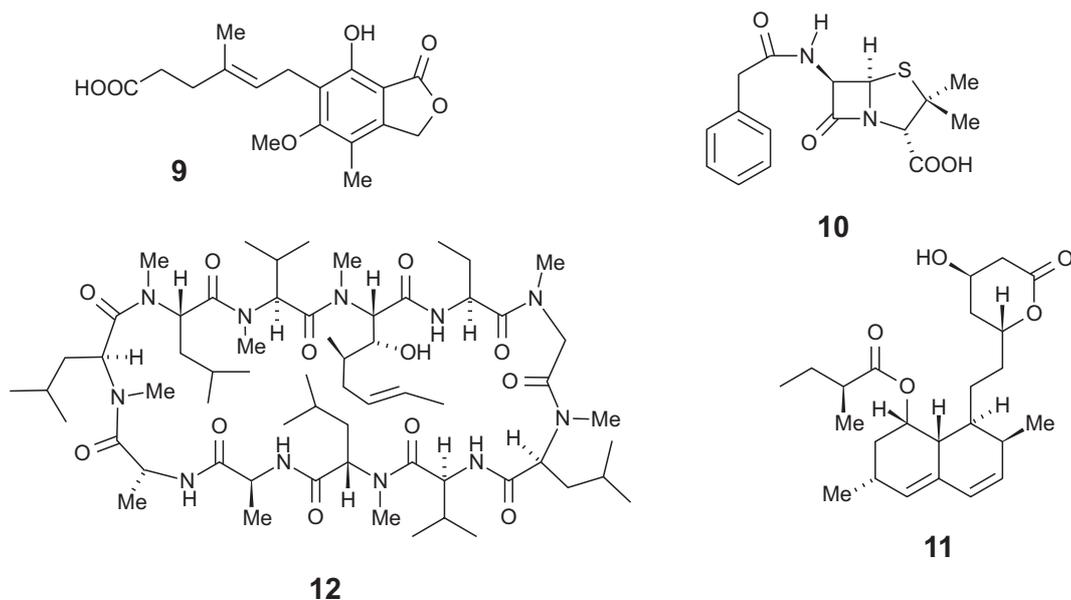


Abb. 4. Medizinisch eingesetzte Pilznaturstoffe: Mycophenolsäure (**9**), das Antibiotikum Penicillin G (**10**), das Immunsuppressivum Cyclosporin A (**12**) und der Cholesterin-Biosynthese-Hemmer Lovastatin (**11**).

Unterdrückung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen verwendet. Von der Struktur des Lovastatins (**11**) aus *Aspergillus terreus*^[23] leitet sich eine ganze Gruppe von Cholesterinsenkern ab, die zu den meistverkauften Medikamenten zählen.

Doch die Suche nach Wirkstoffen aus Pilzen gestaltet sich immer schwieriger. Ein Großteil der terrestrischen Spezies wurde schon bearbeitet, und der Anteil der schon bekannten Strukturen unter den isolierten bioaktiven Substanzen wächst ständig. Daher zählt es sich aus, Wert auf eine möglichst hohe taxonomische Vielfalt unter den untersuchten Pilzen zu legen. Erreicht wird dies dadurch, dass man Pilze aus bisher wenig untersuchten Lebensräumen sammelt. Eine bedeutende Quelle für solche 'chemisch ungewöhnlichen' Mikroorganismen sind dabei die Weltmeere, die immerhin zwei Drittel der Erdoberfläche ausmachen, und deren Mikroorganismen bei bisherigen Naturstoffscreening-Programmen deutlich unterrepräsentiert waren. Dabei zeigte eine Studie an nahezu 3000 marinen und terrestrischen Pilzisolaten, dass die Extrakte mariner Pilze nicht nur häufiger eine antibiotische Wirkung besitzen als die terrestrischer Stämme, sondern dass die aus den marinen Pilzen isolierten bioaktiven Verbindungen auch seltener schon bekannte Naturstoffe sind.^[16]

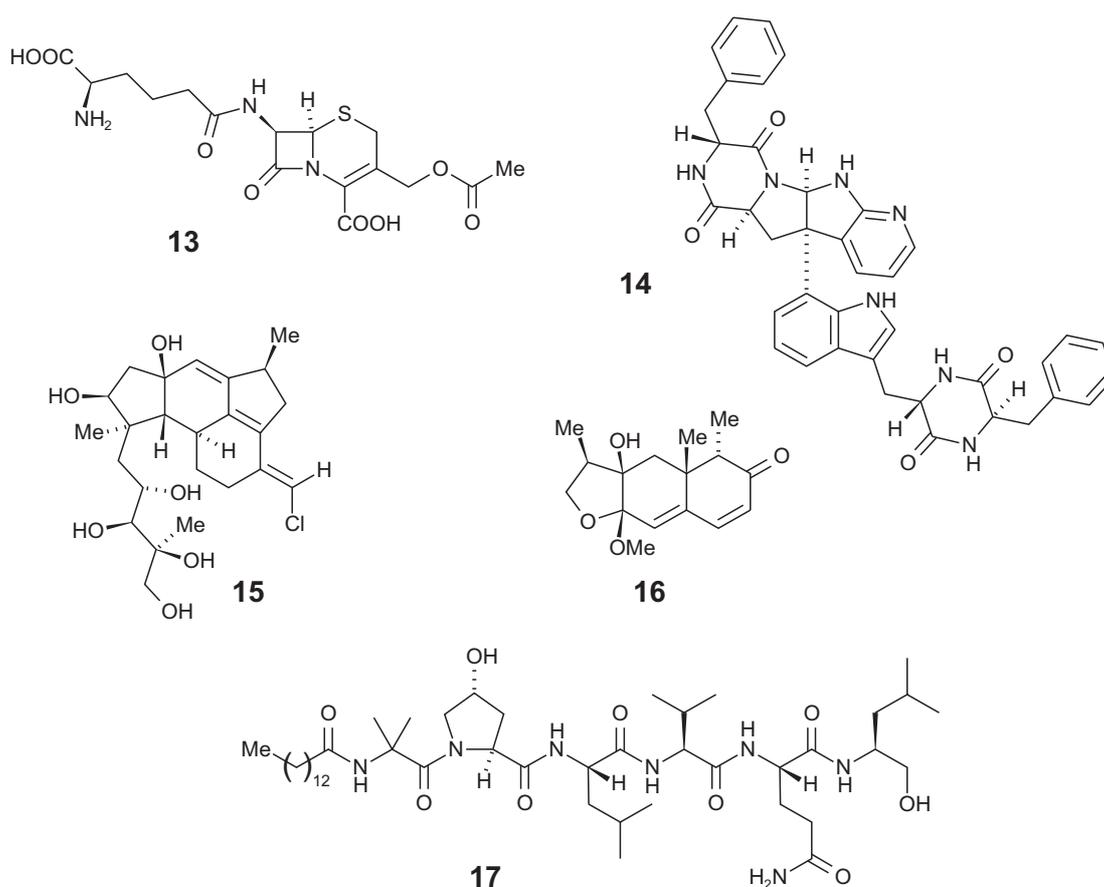


Abb. 5. Cephalosporin C (**13**), Asperazin (**14**), Neomangicol A (**15**), Microsphaeropsisin (**16**) und Halovir A (**17**), biologisch aktive Naturstoffe aus marinen Pilzen.

Es verwundert also nicht, dass auch aus marinen Pilzen schon einige Naturstoffe isoliert werden konnten, deren biologischen Eigenschaften sie als Kandidaten für eine Entwicklung zum Medikament prädestinieren. Die einzige schon als Medikament zugelassene Verbindung, deren Produzent ein aus dem marinen Lebensraum isolierter Pilz ist, ist das aus einem Stamm von *Acremonium chrysogenum* gewonnene β -Lactam-Antibiotikum Cephalosporin C (**13**). Dieser Pilz wurde in der Nähe eines Abwasserrohres vor der sardinischen Küste isoliert.^[24] Unter den aus marinen Pilzen isolierten Metaboliten finden sich Verbindungen mit den unterschiedlichsten Strukturen und biologischen Aktivitäten. Es sind einige cytotoxische Substanzen bekannt, wie das Asperazin (**14**), isoliert aus einem *Aspergillus niger* aus einem Schwamm der Gattung *Hyrtios*,^[25] oder das Neomangicol A (**15**), welches von einem aus Treibholz isoliertem *Fusarium heterosporum* gebildet wird.^[26] Andere Verbindungen sind antibakteriell, so z.B. das Microsphaeropsisin (**16**) aus einem *Microsphaeropsis*-Stamm, oder wirken wie die das peptidische Halovir A (**17**) antiviral.

2.2 Isolierung und Anzucht der Pilze

Die hier untersuchten Pilze wurden von der Gruppe 'Marine Mycologie' des Alfred-Wegener-Institutes (Bremerhaven) aus verschiedenen Schwämmen des westlichen Mittelmeers isoliert, taxonomisch eingeordnet und für die chemisch-analytischen Untersuchung kultiviert.^[27] Die Pilze wurden unmittelbar nach dem Sammeln der Schwämme, im Rahmen mehrerer Exkursionen auf die italienische Insel Elba, aus dem inneren Schwammgewebe durch klassische mycologische Methoden isoliert. Wichtig ist hierbei, dass Isolierung und Anzucht der Pilze ausschließlich auf Medien mit hohen Salzkonzentrationen erfolgten; somit ist gewährleistet, dass es sich bei den Isolatn nicht um rein terrestrische, sondern um zumindest fakultativ marine Pilze handelt. Es wurden Pilze aus Schwämmen der folgenden Spezies isoliert:

- *Chondrosia reniformis* NARDO (Chondrosiidae)
- *Petrosia ficiformis* POIRET (Petrosiidae)
- *Ircinia fasciculata* SCHMIDT (Irciniidae)
- *Haliclona valliculata* GRIESSINGER (Haliclonidae)
- *Oscarella lobularis* SCHMIDT (Oscarellidae)
- *Spongia officinalis* LINNAEUS (Spongiidae)

Von ca. 600 aus diesen Schwammspezies gewonnenen Pilzisolaten wurden 52 so ausgewählt, dass eine möglichst hohe taxonomische Diversität gewährleistet war, und für die

chemische Untersuchung in 300-mL-Standkulturen in Wickerham-Seewasser-Medium^[28] angezogen.

Es bleibt zu bemerken, dass es trotz großen methodischen Aufwandes, z.B. durch Elektronenmikroskopie sowie lichtmikroskopisch mit pilzspezifischen Färbemethoden, den beteiligten Biologen bislang nicht gelang, ein Wachstum von Pilzen im Schwammgewebe nachzuweisen.^[27] Eine Herkunft der isolierten Pilze aus Sporen und Hyphenfragmenten, die der Schwamm aus dem Meerwasser gefiltert hatte, erscheint deshalb nahe liegend. Ungeachtet der ungewissen biologischen Rolle der Pilze im Schwamm haben sich aus Schwämmen isolierte Pilze jedoch bestens als Quelle neuer Naturstoffe bewährt,^[29,30] wie auch in der vorliegenden Arbeit wieder verdeutlicht wird.

2.3 Extraktion und Testung auf biologische Aktivität

Für die Suche nach neuen Naturstoffen gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Ansätze. Zum einen ist es möglich, aus Extrakten mit einer gewissen biologischen Aktivität, durch aufeinander folgende chromatographische Trennverfahren und Testung der dabei gewonnenen Fraktionen, die bioaktive Verbindung so lange aufzukonzentrieren, bis sie schließlich als Reinstoff vorliegt, und die chemische Struktur durch spektroskopische Methoden aufgeklärt werden kann. Eine andere Möglichkeit liegt in der Isolierung möglichst vieler reiner Verbindungen aus dem betreffenden Extrakt und in der anschließenden Strukturaufklärung und Testung der Bioaktivitäten dieser Substanzen. Beide Verfahren, die Bioaktivitäts-geleitete Isolierung und das so genannte chemische Screening, besitzen gewisse Vor- und Nachteile. Bei Ersterem ist gewährleistet, dass nur aktive Substanzen auch isoliert werden, während das chemische Screening zwar oft einen höheren Arbeitsaufwand mit sich bringt, dafür aber auch zu einer größeren Auswahl an unterschiedlichen Reinsubstanzen führt, die dann auf verschiedenste Aktivitäten getestet werden können. Darüber hinaus können auf diese Weise auch Verbindungen entdeckt werden, die keine biologische Aktivität aufweisen, dafür aber Aufschluss über Biosynthesewege geben oder wegen ungewöhnlicher Strukturelemente von besonderem Interesse sind. Für die vorliegende Arbeit wurde eine chemische Screening-Methode angewandt, allerdings wurden die Rohextrakte der Pilze auch auf verschiedene Bioaktivitäten getestet, um so eine bevorzugte Bearbeitung aktiver Extrakte zu ermöglichen.

Die am Alfred-Wegener-Institut angezogenen 300-mL-Kulturen wurden filtriert, dann wurden Mycel und Kulturmedium getrennt mit Dichlormethan/Methanol bzw. Ethylacetat extrahiert. Durch Partitionieren zwischen Methanol (+5 % Wasser) und Petrolether erhielt man eine polare und eine unpolare Extraktfraktion. Diese Fraktionen wurden verschiedenen Tests auf biologische Aktivitäten unterzogen:

- Hemmhofassays (in der Gruppe von Dr. U. Hentschel) zum Nachweis von antimikrobieller Aktivität gegen gram-negative (*E. coli*) und gram-positive (*S. aureus*) Bakterien, gegen ein nicht identifiziertes Schwamm-assoziiertes Bakterium (SB1) sowie einen Hefepilz (*C. albicans*);
- Cytotoxizitätstest (durch die Zentaris AG) gegen fünf verschiedene Tumorzelllinien (KB/HeLa, SKOV3, SF268, NCI-H460 und RKOp27);
- Die allgemeine Toxizität gegen *Artemia salina* wurde im so genannten brine-shrimp-assay bestimmt, der eine gute Korrelation zu Cytotoxizitätstests zeigt, und zugleich sehr preiswert und einfach durchzuführen ist.^[31]

Tabelle 1. Eine Auswahl der untersuchten Pilzisolat und ihre Aktivitäten gegen verschiedene Mikroorganismen sowie *A. salina*.

Stamm-Nr.	aus Schwamm	aktiv gegen				
		<i>A. salina</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	SB1
E00-1/1	<i>C. reniformis</i>	-	-	-	-	-
E00-1/2	"	-	-	-	-	-
E00-1/4	"	-	-	-	-	-
E00-1/8	"	-	-	-	-	-
E00-1/9b	"	-	-	-	-	-
E00-1/14b	"	-	-	-	++	-
E00-1/15	"	(+)	-	-	-	-
E00-2/1	<i>P. ficiformis</i>	+	-	+	-	-
E00-2/2	"	-	-	+	-	-
E00-2/6a	"	-	-	+	++	-
E00-2/6b	"	-	-	-	-	-
E00-2/6c	"	+	-	+	-	-
E00-2/7	"	+	+	-	-	+
E00-2/16	"	-	-	-	-	-
E00-5/5	<i>O. lobularis</i>	(+)	-	-	(+)	-
E00-5/6b	"	-	-	-	-	-
E00-5/7	"	(+)	-	-	-	-
E00-6/3	<i>H. valliculata</i>	-	-	-	-	(+)

Im brine-shrimp-assay sowie gegen verschiedene Mikroorganismen wurden für einige der Pilzextrakte interessante Aktivitäten beobachtet (siehe Tabelle 1). Bei den Cytotoxizitätstests dagegen besaß keine der Proben verfolgenswerte Aktivität, wobei diese von der Zentaris AG als >50 % Wachstumshemmung bei einer Konzentration von 3.16 µg/mL definiert war. Diese Konzentration war offenbar zu niedrig angesetzt, was daran ersichtlich ist, dass selbst diejenigen Extrakte nur eine Wachstumshemmung von ca. 20 % zeigten, in denen eine bekanntermaßen cytotoxische Substanz eine Hauptkomponente war, z.B. Mycophenolsäure (9) in den Stämmen E00-1/14b und E00-2/6a (siehe Kapitel 2.5.1). Cytotoxizität und Aktivität gegen *A. salina* wurden nur bei ungefähr der Hälfte der Extrakte bestimmt.

Im Sinne eines chemischen Screenings wurden alle Pilzextrakte auch einer eingehenden Untersuchung durch HPLC-UV und HPLC-MS sowie durch Dünnschichtchromatographie unterzogen. Diese Methoden zeigten nicht nur, dass 30-40 % der untersuchten Pilze nennenswerte Mengen an Sekundärmetaboliten produzieren, sondern sie lieferten auch erste spektroskopische Informationen über diese Inhaltstoffe. Darüber hinaus konnten so Pilzstämmen mit identischem Metabolitenmuster identifiziert werden (E00-2/6a und E00-1/14b sowie E00-2/6c und E00-2/7).

2.4 Dereplikation bekannter Naturstoffe durch HPLC-UV, -MS und -NMR

Bei der Suche nach neuen Naturstoffen ist es von großer Bedeutung, schon bekannte Verbindungen möglichst frühzeitig als solche zu identifizieren, um unerwünschte Mehrfachisolierungen zu vermeiden. Dieser Prozess wird als Dereplikation bezeichnet. Insbesondere bei den Pilzen, die nun seit über 100 Jahren chemisch untersucht werden, liegt der Anteil der schon bekannten Metaboliten teilweise bei 90 % oder mehr, wobei dieser Wert auch vom Substrat abhängt, aus dem der Pilzstamm isoliert wurde. Besonders hoch ist dieser Anteil bei Pilzen aus Bodenproben gemäßiger Klimazonen, wogegen Pilze aus anderen Habitaten, z.B. marine^[32] oder endophytische^[33] Pilze, bisher seltener untersucht wurden und deshalb ergiebiger Quellen für Naturstoffe mit neuartigen Strukturen und biologischen Eigenschaften sind.^[16]

Eine effektive Dereplikation bekannter Naturstoffe in den hier untersuchten Schwamm-assoziierten Pilzen wurde durch die Anwendung der in unserer Arbeitsgruppe erstmals komplettierten Triade aus den gekoppelten HPLC-Verfahren HPLC-UV, HPLC-MS und HPLC-NMR erreicht.^[34] Die so erhaltenen spektroskopischen Daten ermöglichten in Kombination mit der Suche in Datenbanken (AntiBase^[35] und SciFinder^[36]) in vielen Fällen die Identifizierung von bekannten Verbindungen ohne vorherige Isolierung. Darüber hinaus lieferten diese Methoden hilfreiche Informationen für die Strukturaufklärung unbekannter Naturstoffe.

Alle Pilzextrakte wurden zunächst durch HPLC-UV (mit Photodiodenarray-Detektor) und durch Dünnschichtchromatographie mit zwei verschiedenen Laufmitteln untersucht. Dabei kamen die von Frisvad und Thrane beschriebenen chromatographischen Bedingungen zur Anwendung, die einen Vergleich der von uns ermittelten Daten mit tabellarisch aufgelisteten Retentionsindices und UV-Spektraldaten von 182 der häufigsten Pilzinhaltsstoffe gestatteten.^[37] Diese Retentionsindices berechneten sich aus dem Verhältnis der Retentionszeiten beziehungsweise der R_F -Werte der detektierten Metaboliten und der jeweils verwendeten Referenzsubstanz: dies waren Alkylphenone bei den HPLC-Untersuchungen und der Pilzmetabolit Griseofulvin (**19**; siehe Abb. 6) bei der DC-Analytik.

Weitere wichtige Informationen, nämlich die Molekülmassen der im Extrakt enthaltenen Substanzen, lieferte das HPLC-MS-Screening. Hierbei wurden als Laufmittelgemische sowohl $H_2O/MeCN$ als auch $D_2O/MeCN$ verwendet. Die Differenz der in den HPLC-Läufen mit H_2O bzw. D_2O gemessenen Massenzahlen der Moleküle erlaubte es, jedem Substanzpeak neben der Molekülmasse auch die Anzahl der austauschenden, und somit gegen Deuterium austauschenden, Protonen zuzuordnen.^[38] Diese Zahl ist ein wertvolles Kriterium beim Ausschluss falscher Strukturen aus einer Liste von Naturstoffen mit der korrekten Molekülmasse, wie sie sich zum Beispiel mit der AntiBase-Datenbank^[35] leicht generieren lässt. Zudem bieten Molekülmasse und Anzahl der austauschenden Protonen einen unverzichtbaren Anhaltspunkt zur Aufklärung unbekannter Strukturen.^[38]

Da in den meisten Fällen Molekülmasse und Anzahl der austauschenden Protonen nicht genügen, um eine Verbindung eindeutig als bekannt oder neu einzuordnen, wurden einige der Pilzextrakte auch durch HPLC-NMR untersucht. Durch diese moderne Kopplungstechnik ist es möglich, ohne präparative Trennung NMR-Spektren von den Bestandteilen komplexer Gemische zu erhalten.^[39] Dazu wird der Eluentenstrom nach der HPLC-Trennung durch einen NMR-Durchflussprobenkopf geleitet. Bei der sogenannten 'stop-flow'-Technik wird der Laufmittelfluss angehalten, sobald sich eine Substanz im Probenkopf befindet. Dadurch wird es möglich, nicht nur Protonenspektren aufzunehmen, sondern auch zeitaufwendige zweidimensionale NMR-Experimente wie z.B. ROESY und TOCSY durchzuführen. Bei sehr geringen Substanzmengen kann dabei durch eine längere Messdauer das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich verbessert werden. Von grundlegender Bedeutung für alle HPLC-NMR-Experimente ist eine effektive Unterdrückung der Lösungsmittelsignale. Bei dem hier verwendeten Eluentensystem, D_2O und undeuteriertes Acetonitril, ist es vor allem das Signal der Acetonitril-Protonen, aber auch das Signal der Restprotonen im D_2O , welche die sehr schwachen Signale des Analyten überdecken. Zur Unterdrückung dieser intensiven Signale wurde die sog. 'WET-Sequenz'^[40] eingesetzt, welche z -Gradienten benutzt und der älteren Technik der Vorsättigung überlegen ist. Durch die verbesserte Lösungsmittelunterdrückung wird das Restsignal des Lösungsmittels schmaler und verdeckt somit nur noch einen kleineren Bereich des Analytspektrums. Die WET-Methode wurde auch bei den zweidimensionalen

Techniken COSY, ROESY und TOCSY eingesetzt, was zu einer erheblichen Verbesserung der Qualität der erhaltenen Spektren führte.^[41]

Die vielfältigen spektroskopischen Daten, die somit für jeden Substanzpeak gewonnen werden konnten, bildeten den Schlüssel zu einer einfachen und – im Gegensatz zu Verfahren, die nur auf Molekülmasse und UV-Spektrum beruhen – eindeutigen Dereplikationsmethode. Als Beispiel hierfür sei die Identifizierung von drei literaturbekannten Verbindungen im Extrakt des Pilzes E00-24/37, einer *Penicillium*-Spezies isoliert aus dem Schwamm *Spongia officinalis*, angeführt. Die Methanolfraction des Extraktes zeigte im HPLC-UV-Chromatogramm deutlich drei Hauptkomponenten, die Peaks A, B und C (siehe Abb. 6). Diesen Peaks konnten durch Auswertung der HPLC-MS-Daten die Molekülmassen 389 (3), 352 (0) und 336 (2) zugeordnet werden, wobei die Zahlen in Klammern jeweils die Anzahl der im HPLC-MS-Lauf mit D₂O ausgetauschten Protonen angibt. Die Suche nach diesen Massen in der Naturstoffdatenbank AntiBase^[35] ergab, nach Eliminierung der Substanzen mit der falschen Anzahl an austauschbaren Protonen, noch zehn mögliche Strukturen für Peak A, acht für Peak B und 24 für Peak C. Ausschließlich durch HPLC-MS war also keine eindeutige Identifizierung der Verbindungen möglich, es waren weitere spektroskopische Daten notwendig. Aus diesem Grund wurden mittels HPLC-NMR on-line-¹H-NMR-Spektren der drei Substanzpeaks aufgenommen. Diese Spektren wurden mit den möglichen Strukturen aus der Datenbank verglichen, wobei insbesondere die Kopplungsmuster der aromatischen Protonen sowie die Anzahl der Methylgruppen im Molekül ausschlaggebend waren. Dadurch konnten die Substanzen als drei literaturbekannte Pilzmetaboliten identifiziert werden. Es handelte sich um Roquefortin C (**18**; Abb. 6), ein von unterschiedlichen *Penicillium*-Stämmen produziertes tremorgenes Alkaloid,^[42] sowie um Griseofulvin (**19**),^[43] eine auch medizinisch eingesetzte fungizide Verbindung,^[44] und Cyclopiazonsäure (**20**),^[45] ein bekanntes Mycotoxin mit Ca²⁺-ATPase-inhibierender Wirkung.^[46] Auch die UV-Spektren und die aus HPLC und DC berechneten Retentionsindices stimmten gut mit publizierten Daten überein.^[37]

Durch on-line-Messung von Circular dichroismus-Spektren (CD-Spektren), also durch HPLC-CD-Kopplung, konnte für zwei der Verbindungen sogar die absolute Konfiguration bestimmt werden. Dies geschah bei **19** durch Vergleich mit dem Spektrum von käuflichem Griseofulvin und bei Cyclopiazonsäure durch Vergleich mit veröffentlichten CD-Daten.^[45] In beiden Fällen stimmte die Konfiguration mit der des schon bekannten Naturstoffes überein. Im Falle von Roquefortin C (**18**) waren keine Vergleichsdaten vorhanden, allerdings kann es als relativ unwahrscheinlich angesehen werden, dass diese weit verbreitete Verbindung im untersuchten Pilz nicht in der bereits bekannten Konfiguration vorlag.

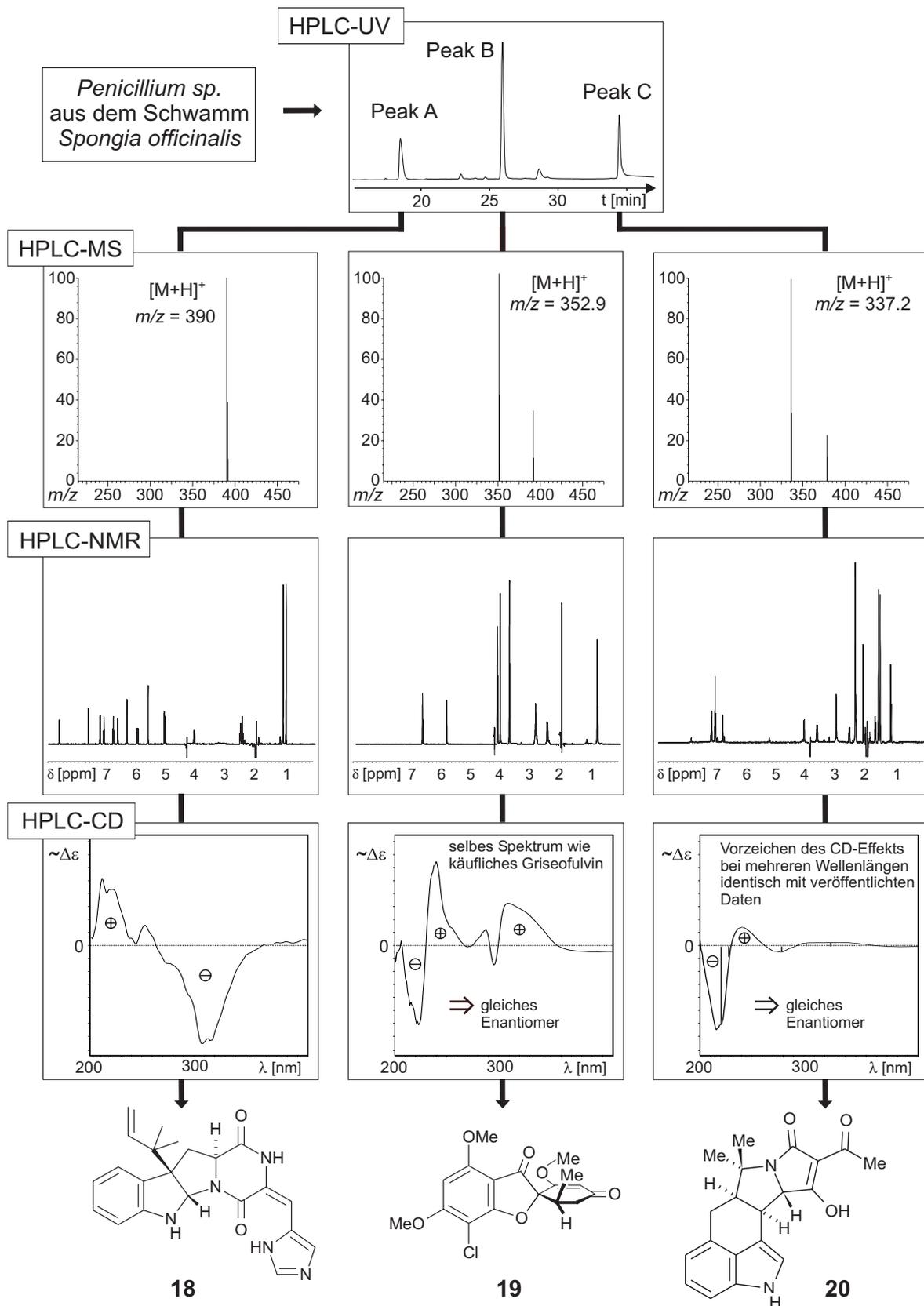


Abb. 6. Identifizierung der bekannten Naturstoffe Roquefortin C (**18**), Griseofulvin (**19**) und Cyclopiazonsäure (**20**) im Extrakt der *Penicillium* sp. E00-24/37 durch HPLC-UV, -MS, -NMR und -CD.

2.5 Naturstoffe aus *Penicillium cf. brevicompactum* E00-1/14b

Unter den hier bearbeiteten Pilzstämmen zeigten E00-1/14b und E00-2/6a, isoliert aus *Chondrosia reniformis* bzw. *Petrosia ficiformis*, die auffälligsten Aktivitäten in den Bioaktivitätstests. Die Extrakte dieser Stämme wirkten stark antifungisch gegen die Hefe *Candida albicans* (siehe Tabelle 1). Beide Pilzstämmen konnten durch morphologische Untersuchungen (durch S. Steffens, Alfred-Wegener-Institut Bremerhaven) als *Penicillium brevicompactum* identifiziert werden.^[27] Dieser Befund wird auch chemotaxonomisch durch die im folgenden beschriebenen Naturstoffe gestützt.

2.5.1 Ergebnisse der HPLC-UV, -MS und -NMR-Untersuchungen

Schon in den HPLC-UV-Chromatogrammen der Extrakte fiel auf, dass die beiden Stämme E00-1/14b und E00-2/6a ein nahezu identisches Metabolitenprofil aufweisen und somit mit großer Wahrscheinlichkeit der gleichen Spezies zuzurechnen sind. Dabei waren im UV-Profil deutlich zwei Hauptkomponenten neben mehreren Peaks mit geringerer Intensität zu sehen.

Der größte Peak im HPLC-Lauf konnte schon durch Vergleich des Retentionsindex aus der HPLC, der relativen R_f -Werte in zwei verschiedenen DC-Systemen (CAP und TEF) sowie der Maxima im UV-Spektrum mit tabellierten Daten^[37] als Mycophenolsäure (**9**; Abb. 7) identifiziert werden.

Tabelle 2. Chromatographische Kenngrößen und UV-Daten von Mycophenolsäure (**9**) im Extrakt von E00-1/14b im Vergleich zu Literaturdaten.

	Literaturwert ^[37]	gemessen
Retentionsindex (HPLC)	984	939
rel. R_f -Werte (CAP; TEF)	85; 135	70; 133
UV-Maxima [nm]	217, 249, 302	216, 248, 302

Bestätigt wurde dieser Befund sowohl durch das in HPLC-Kopplung aufgenommene ¹H-NMR-Spektrum als auch durch die Molekülmasse der Substanz in der HPLC-MS von m/z 321 $[M+H]^+$, bzw. m/z 324 $[M+D]^+$ nach Austausch acider Protonen in D₂O. Mycophenolsäure (**9**) ist eine der ältesten aus Schimmelpilzen in reiner Form isolierten Substanzen. Schon 1893 wurde diese Verbindung aus *Penicillium glaucum*, später auch aus vielen anderen *Penicillium*-Species, gewonnen. Klinische Bedeutung hat Mycophenolsäure wegen ihrer immunsuppressiven Wirkung, beruhend auf einer Hemmung der Inosin-5'-monophosphat-Dehydrogenase, erlangt. Dabei wird der *N*-Morpholinoethylester (Mycophenolat-Mofetil,

CellCept[®]) eingesetzt.^[47] Wahrscheinlich ist die Mycophenolsäure auch für die im Hemmhofstest beobachtete antifungische Wirksamkeit des Pilzextraktes gegen *C. albicans* verantwortlich.

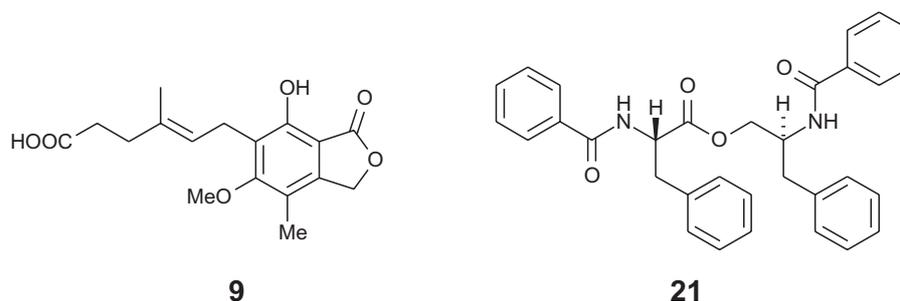


Abb. 7. Mycophenolsäure (**9**) und Asperphenamat (**21**), zwei literaturbekannte Naturstoffe aus *Penicillium brevicompactum* (E00-1/14b).

Eine Minderkomponente mit der Molekülmasse 406, die im unpolaren Bereich des HPLC-Laufs eluierte, wurde durch Auswertung der HPLC-NMR-Daten und Abgleich mit der Datenbank Antibase^[35] als Asperphenamat (**21**; Abb. 7) identifiziert. Diese Verbindung ist auch bekannt als Auranamid, Anabellamid und Asjanin und wurde nicht nur aus Pilzen,^[48] sondern auch aus Pflanzen^[49] isoliert. Biologische Aktivitäten von Asperphenamat sind nicht bekannt.

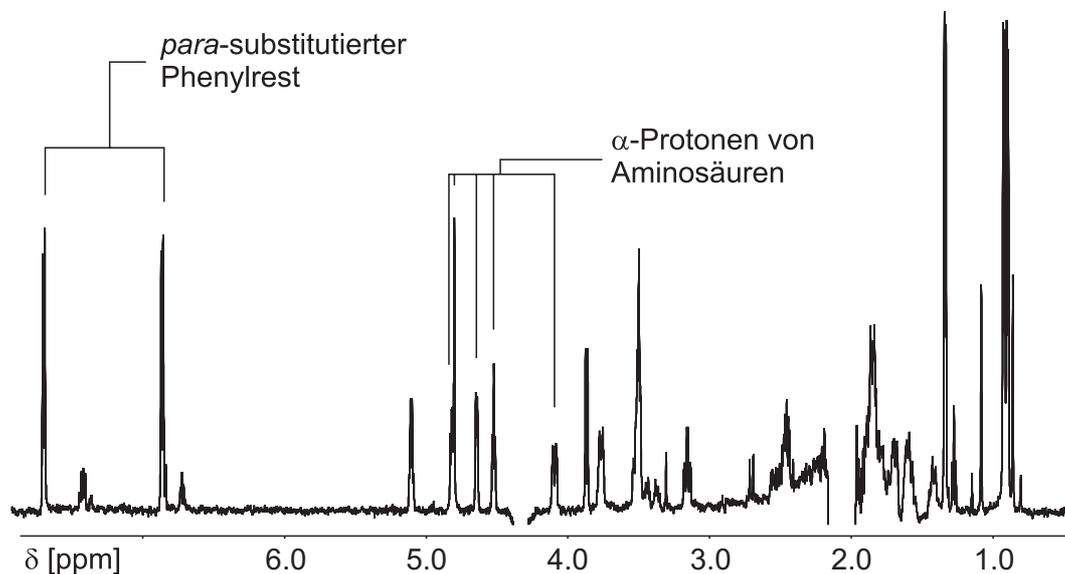


Abb. 8. On-line-¹H-NMR-Spektrum der peptidischen Verbindung **24** aus *Penicillium brevicompactum* E00-1/14b.

Drei weitere Substanzpeaks **23**, **24** und **22** mit den Molekülmassen 623, 639 und 406 konnten durch die Datenbanksuche nicht ohne weiteres bekannten Verbindungen zugeordnet werden. Besonders interessant war hierbei die Verbindung **24**; aus ihrem on-line-¹H-NMR-Spektrum (Abb. 8) konnte bereits auf einige strukturelle Elemente geschlossen werden. Zwei Dublettsignale ($^3J_{\text{HH}} = 8.6$ Hz) bei 6.9 und 7.8 ppm deuteten auf einen *para*-substituierten

Phenylrest hin, während einige Dubletts sowie Doppeldubletts mit chemischen Verschiebungen von 3.5 bis 5 ppm als α -Protonen von Aminosäuren gedeutet wurden, was eine peptidische Natur der Verbindung nahe legte. Da in den Datenbanken keine Peptide gefunden wurden, die mit den hier beschriebenen spektroskopischen Daten übereinstimmten, es sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um bisher unbekannte Naturstoffe handelte, wurde der Pilz in größerem Maßstab (10 L) angezogen, um die Isolierung dieser Minderkomponenten zu ermöglichen.

2.5.2 Isolierung der Verbindungen durch Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC)

Unter den chromatographischen Methoden, die zur Isolierung von Naturstoffen aus komplexen Extrakten eingesetzt werden, spielt die präparative HPLC aufgrund ihrer hohen Trennleistung eine herausragende Rolle. Ein großer Nachteil dieser Technik besteht jedoch der begrenzten Probenmenge pro Trennlauf, wodurch sich die Aufreinigung größerer Substanzmengen sehr langwierig gestaltet. Daher wurde zur Isolierung der unbekanntesten Verbindungen aus dem 10-L-Ansatz des Pilzes E00-1/14b eine flüssig-flüssig-chromatographische Methode gewählt, die so genannte Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC).^[50] Wie bei anderen flüssig-flüssig-chromatographischen Methoden, wie z.B. der High Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC),^[51] wird auch bei der FCPC ein zweiphasiges Lösungsmittelgemisch eingesetzt, wobei wahlweise die obere oder die untere Phase als stationäre Phase dient. Die FCPC unterscheidet sich im Aufbau deutlich von der HSCCC: Während bei letzterer eine Kapillarspule verwendet wird, in welcher die stationäre Phase durch eine planetare Bewegung zurückgehalten wird, befinden sich im Rotor der FCPC mehrere hundert diskrete Trennkammern. In diesen hintereinander geschalteten Kammern findet die Verteilung der Substanzen zwischen mobiler und stationärer Phase statt. Das ganze System wird dafür in schnelle Rotation (bis zu 1400 rpm) versetzt, wodurch, bedingt durch den speziellen Aufbau des Rotors, die stationäre Phase zurückgehalten wird. Darüber hinaus sorgt die Zentrifugalkraft für eine schnelle Entmischung der Phasen in den Trennkammern und ermöglicht somit eine höhere Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase.

Der Verteilungskoeffizient K einer Substanz ($K = c_{\text{stationäre Phase}}/c_{\text{mobile Phase}}$) sollte ungefähr zwischen 0.8 und 4.5 liegen, damit diese in einem FCPC-Trennlauf eine sinnvolle Retentionszeit besitzt. Bei kleinerem K wird die Substanz schon im 'Einspritzpeak' eluiert, bei größerem K liegt die Retentionszeit über drei Stunden. Um nun ein Lösungsmittelsystem zu finden, das für die Trennung der Substanzen im hier untersuchten Pilzextrakt geeignet war, wurde in verschiedenen zweiphasigen *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol/Wasser-Systemen jeweils etwas Pilzextrakt gelöst. Anschließend wurden die Konzentrationen der einzelnen

Verbindungen in oberer und unterer Phase durch HPLC untersucht. Abbildung 9 zeigt die HPLC-Läufe von drei der getesteten Lösungsmittelsysteme. Dabei sieht man, dass sich die Verbindungen im insgesamt polaren System A vorwiegend in der oberen, unpolaren Phase befinden, während im sehr unpolaren System C die Konzentrationen in der unteren, polaren Phase höher sind. Für die geplante Trennung geeignet war das System B mit der Zusammensetzung 2:8:2:8 (*n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol/Wasser). Bei Verwendung der unpolaren Phase als stationäre Phase lagen hier die Verteilungskoeffizienten für die drei noch nicht identifizierten Verbindungen **23**, **24** und **22** bei 4.1, 1.3 und 4.2. Die bereits bekannten Naturstoffe Mycophenolsäure (**9**) und Asperphenamat (**21**) erwiesen sich mit Konstanten von 28.7 bzw. >100 als deutlich unpolarer.

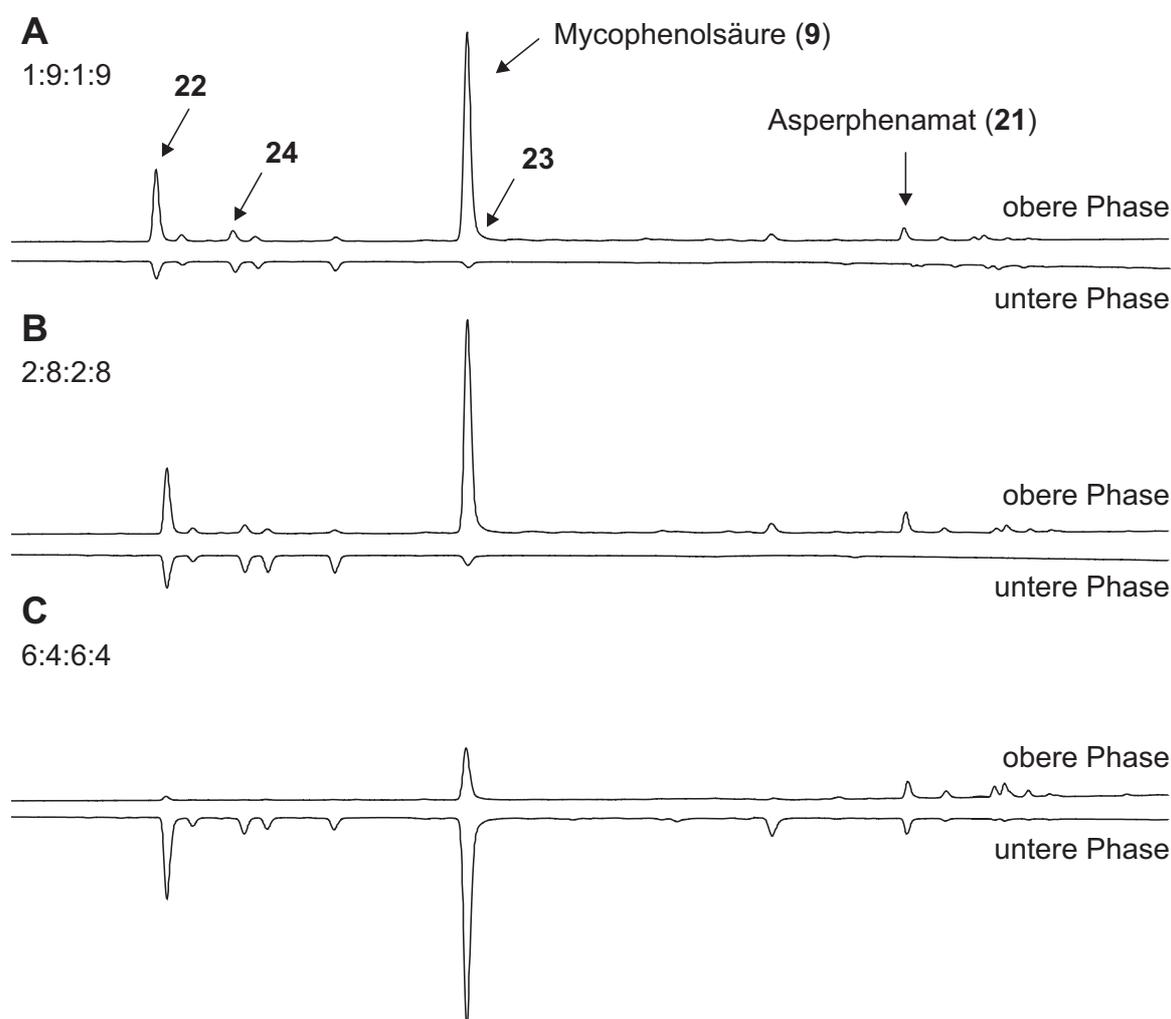


Abb. 9. Bestimmung der Verteilungskonstanten der von E00-1/14b produzierten Verbindungen in verschiedenen *n*-Heptan/Ethylacetat/Methanol/Wasser-Lösungsmittelsystemen durch HPLC.

Die durch die Verteilungskonstanten vorausgesagte Elutionsreihenfolge – "kleine Konstante vor großer Konstante" – bewahrheitete sich in den daraufhin durchgeführten FCPC-Trennläufen. Dabei wurden für den gesamten Extrakt (ca. 2 g) nur zwei Läufe mit

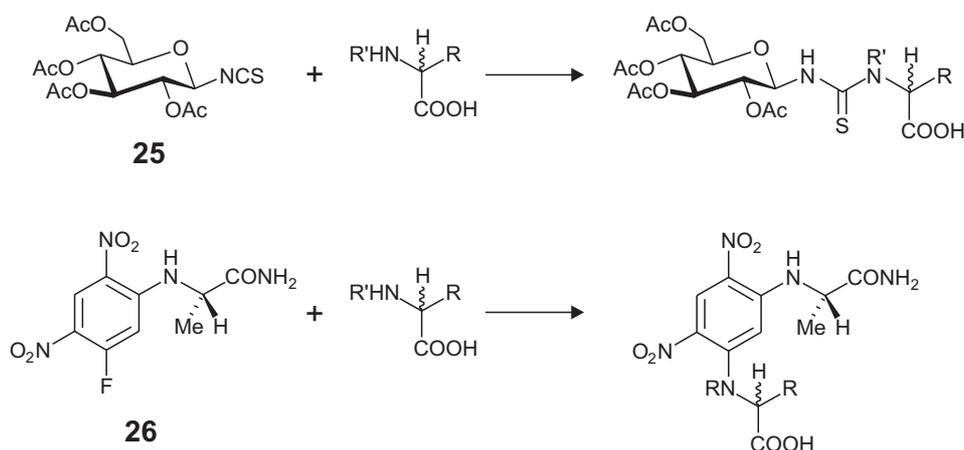
einer Dauer von jeweils zwei Stunden benötigt. Nach einer weiteren Aufreinigung durch Gelchromatographie auf Sephadex LH-20 wurden die drei unbekanntes Verbindungen in reiner Form in Mengen von 34 bis 40 mg erhalten. Der gesamte Trennungsgang war somit im Vergleich zur präparativen HPLC sehr Zeit sparend und, da keinerlei feste Adsorbentien eingesetzt wurden, besonders schonend für die isolierten Substanzen.

2.5.3 Strukturaufklärung der Petrosifungine A (23) und B (24)

Die durch FCPC isolierten Reinstoffe wurden mittels Massenspektrometrie sowie ein- und zweidimensionaler NMR-Experimente genauer untersucht. Für **23**, die unpolarste der Verbindungen, ergab die hochauflösende Massenspektrometrie eine Masse von 623.3317, was der Summenformel $C_{33}H_{45}N_5O_7$ (berechnet zu 623.3319) entspricht. Die Auswertung der NMR-Spektren zeigte, dass es sich auch hier um eine peptidische Verbindung handelte. Durch Analyse der Kopplungsmuster der COSY-, HMQC- und HMBC-Spektren konnten ausgehend vom jeweiligen α -Proton die Aminosäuren Valin, Threonin, Prolin sowie zweimal die nicht proteinogene Aminosäure Pipecolinsäure nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde ein Benzoylgruppe (*Bz*) identifiziert. Die Abfolge dieser Bausteine im Peptid ergab sich aus den HMBC-Korrelationen $Pip1-\alpha \rightarrow Pip2-CO$, $Val-\alpha \rightarrow Thr-CO$, $Val-NH \rightarrow Thr-CO$ und $Thr-\alpha \rightarrow Bz-CO$ sowie aus den ROESY-Korrelationen $Pip2-\alpha \leftrightarrow Pip1-\alpha$, $Pro-\alpha \leftrightarrow Pip2-\epsilon$, $Pro-\beta \leftrightarrow Pip2-\epsilon$, $Val-\alpha \leftrightarrow Pro-\alpha$ und $Thr-\alpha \leftrightarrow Val-NH$ (Abb. 10). Die HMBC-Korrelation $Thr-\beta \rightarrow Pip1-CO$ zeigte eine Esterbindung zwischen der C-terminalen Pipecolinsäure *Pip1* und der β -Sauerstofffunktion des Threonins, somit handelte es sich bei der Verbindung um ein Cyclodepsipeptid, d.h. ein cyclisches Peptid mit einer Esterbindung im Ring. Da in den NMR-Spektren beide NH-Protonen sichtbar waren und über ihre Korrelationen eindeutig zugeordnet wurden, konnte auch eine Amidbindung zwischen *Pip1* und dem Threonin ausgeschlossen werden. Die absoluten Konfigurationen der einzelnen Aminosäuren, und damit die relative und absolute Konfiguration des gesamten Moleküls, wurden durch saure Hydrolyse, anschließende Derivatisierung der Aminosäuren mit chiralen Reagenzien und nachfolgende HPLC-Analyse aufgeklärt. Das dabei erhaltene Chromatogramm wurde mit Chromatogrammen von Derivaten kommerziell erhältlicher Aminosäuren verglichen.

Mit 2,3,4,6-Tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosylisothiocyanat (**25**; GITC)^[52], das mit Aminoverbindungen Thioharnstoffderivate bildet (Schema 1), als Derivatisierungsreagenz konnte gezeigt werden, dass der Valin- und der Prolinrest sowie beide Pipecolinsäuren L-Konfiguration besitzen. Da zwei der GITC-Derivate der vier Threonin-Diastereomere durch die HPLC nicht getrennt werden konnten, wurde auch mit einem anderen Reagenz, 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid (**26**; FDAA; Marfey's Reagenz), derivatisiert. Es handelt sich hierbei um eine fluoraromatische Verbindung, mit der Aminosäuren in einer

nucleophilen aromatischen Substitution reagieren (Schema 1).^[53] Dadurch konnte auch für den Threoninrest die L-Konfiguration, sowie die 'normale' R-Konfiguration am zweiten Stereozentrum, nachgewiesen werden. Die L-Konfigurationen der anderen Aminosäuren wurde noch einmal bestätigt, so dass sich für **23** die in Abb. 10 dargestellte Gesamtstruktur ergab. Da diese bisher unbekannte Verbindung von einem aus dem Schwamm *Petrosia ficiformis* isolierten Pilz gebildet wurde, erhielt sie den Namen Petrosifungin A (**23**).^[54]



Schema 1. Reaktionen der chiralen Derivatisierungsreagenzien GITC (**25**) und 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid (**26**; FDAA) mit Aminosäuren.

Die zweite, polarere Verbindung **24** zeigte in der hochauflösenden Massenspektrometrie einen Molekülpeak bei m/z 639.3264, was für die Summenformel $C_{33}H_{45}N_5O_8$ (berechnet zu 639.3269) sprach. Die NMR-Daten stimmten weitgehend mit denen von Petrosifungin A (**23**) überein und bestätigten somit die schon aus dem online- 1H -NMR-Spektrum abgelesene peptidische Struktur. Als einziger Unterschied konnte ein *para*-Hydroxybenzoyl-Rest (*pOH-Bz*) an Stelle des Benzoylsubstituenten identifiziert werden. Auch bei dieser Verbindung wurde durch saure Hydrolyse und Derivatisierung für alle Aminosäuren die L-Konfiguration

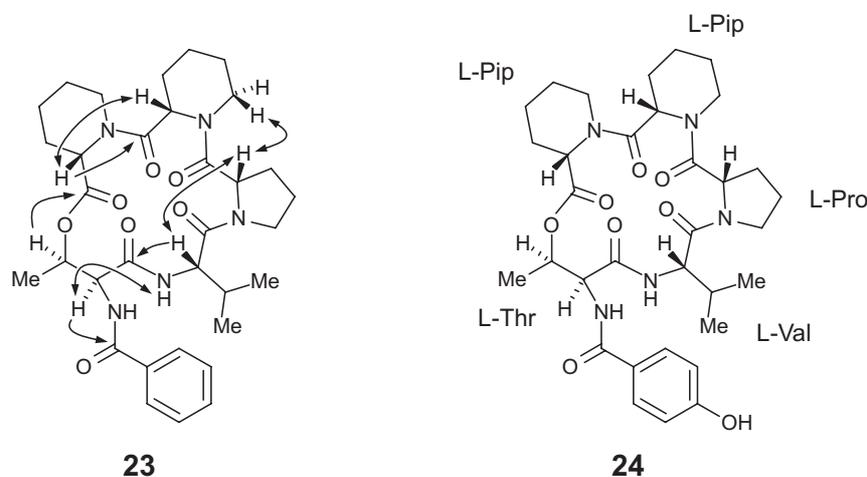


Abb. 10. Strukturen von Petrosifungin A (**23**) und B (**24**) mit ausgewählten HMBC- und ROESY-Wechselwirkungen.

gefunden. Wegen der engen strukturellen Verwandtschaft zu Petrosifungin A wurde dieses Peptid, bei dem es sich ebenfalls um einen bisher unbekannte Naturstoff handelte, Petrosifungin B (**24**; Abb. 10) genannt.^[54]

Aus Pilzen sind schon eine Reihe verschiedenartiger Cyclodepsipeptide bekannt, wobei die sogenannten Destruxine, Hexadepsipeptide mit insektizider und phytotoxischer Wirkung, mit über 30 Vertretern die größte und bekannteste Gruppe stellen.^[55] Weitere aus Pilzen isolierte bioaktive Cyclodepsipeptide sind z.B. das ionophore Beauvericin^[56] und die Neurokinin-antagonistische Verbindung Sch 217048.^[57] Aus einem anderen Stamm der Art *P. brevicompactum* ist das Cyclodepsipeptid Brevigellin^[58] bekannt, das jedoch kaum strukturelle Ähnlichkeit mit den Petrosifunginen aufweist.

Einzigartig an den hier beschriebenen neuen Verbindungen Petrosifungin A (**23**) und B (**24**) ist die Abfolge von drei cyclischen Aminosäuren, Prolin und zweimal Pipecolinsäure, die in dieser Sequenz von keinem anderen natürlichen Cyclopeptid bekannt ist.

2.5.4 Identifizierung von Brevianamid A (**22**)

Eine weitere mittels FCPC isolierte Verbindung, die stark gelbgrün fluoreszierte, wurde nach Auswertung der spektroskopischen Daten als das literaturbekannte^[59] und insektizid wirkende^[60] Alkaloid Brevianamid A (**22**; Abb. 11) identifiziert.

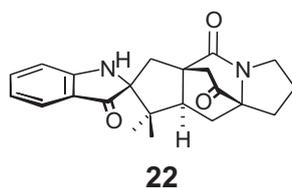


Abb. 11. Das literaturbekannte^[59] Pilzalkaloid Brevianamid A (**22**).

Die isolierten sowie auch die durch gekoppelte HPLC-Methoden identifizierten Metaboliten unterstützen klar die taxonomische Einordnung des Pilzes als *P. brevicompactum*. Zwar wird Mycophenolsäure (**9**) auch von anderen *Penicillium*-Spezies gebildet, Asperphenamat (**21**) und insbesondere Brevianamid A (**22**) sind jedoch ein deutlicher chemotaxonomischer Hinweis auf *P. brevicompactum*.^[61]

2.6 Naturstoffe aus *Emericella varicolor* E00-6/3

Ein weiterer von uns eingehend untersuchter Pilz ist das Isolat E00-6/3 aus einem Schwamm der Spezies *Haliclona valliculata*, welches von Steffens^[27] als *Emericella varicolor* identifiziert wurde. *E. varicolor* ist die teleomorphe Form von *Aspergillus varicolor* (synonym *A. stellatus*), der schon Objekt mehrerer naturstoffchemischer Untersuchungen war, die zur Entdeckung einer Vielzahl neuer Sekundärmetaboliten führten. So wurden unter anderem Sesterterpene mit ungewöhnlichen polycyclischen Kohlenstoffgerüsten, z.B. Astellatol^[62] und Variecolin,^[63] sowie eine Reihe von prenylierten Xanthonderivaten^[64,65] isoliert. Anstoß für unsere Untersuchungen gab hier die Fragestellung, inwiefern sich das Metabolitenmuster des vorliegenden marinen Isolates von *E. varicolor* von den beschriebenen Naturstoffprofilen analoger terrestrischer Stämme unterscheidet. Biologische Aktivitäten des Pilzextraktes wurden nicht gefunden.

2.6.1 Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen

Die HPLC-UV-Untersuchung des Extraktes ergab eine Reihe von Substanzpeaks, die sich auf Grund ihrer UV-Spektren in strukturähnliche Gruppen einordnen ließen. So waren im 'polaren' Bereich des Chromatogramms zwei Substanzen, **27** und **28**, mit sehr ähnlichen UV-Spektren zu erkennen, welchen durch HPLC-MS die Molekülmassen 300 bzw. 286 zugeordnet wurden. Die strukturelle Ähnlichkeit der zwei Verbindungen wurde durch HPLC-NMR weiter bestätigt, die on-line-¹H-NMR-Spektren beider Stoffe zeigten die Signale dreier aromatischer Protonen im Bereich von 7.1 bis 7.6 ppm und einer Methylgruppe bei 2.45 ppm. Nur das Spektrum der polareren Verbindung **27** enthielt ein zusätzliches *O*-Methylsignal mit einer chemischen Verschiebung von 3.95 ppm. Zusammen mit den Molekülmassen legte dies nahe, dass es sich bei **27** um ein *O*-methyliertes Derivat von **28** handelte.

Eine weitere Gruppe von Peaks mit zueinander ähnlichen UV-Spektren war im 'unpolaren' Bereich des Chromatogramms angesiedelt. Hier fiel eine Übereinstimmung mit den UV-Daten bereits bekannter Prenylxanthone^[64,65] auf. Der Hauptmetabolit (nach der Intensität der UV-Absorption geurteilt) besaß eine Molekülmasse von 696 (mit acht austauschenden Protonen) und konnte keiner der aus *A. varicolor* bekannten Naturstoffklassen zugeordnet werden. Zur Isolierung und Strukturaufklärung dieser Substanzen wurde der Pilz im 10-L-Maßstab angezogen und die Verbindungen durch klassische chromatographische Methoden aufgereinigt.

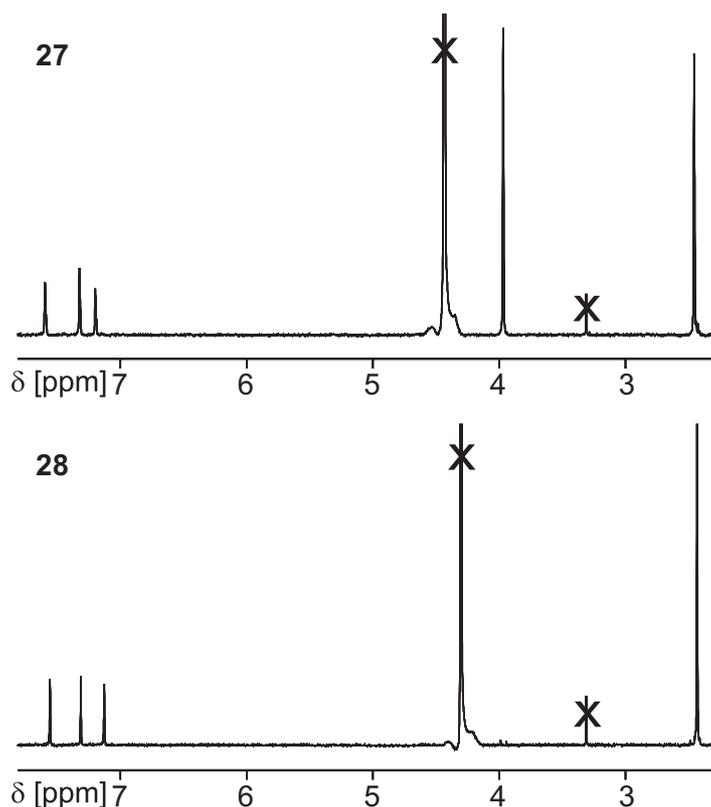


Abb. 12. On-line-¹H-NMR-Spektren der Verbindungen **27** und **28** im Extrakt von *E. varicolor* E00-6/3.

2.6.2 Die Anthrachinone Evarichinon (**27**) und 7-Hydroxyemodin (**28**)

Die hochauflösende Massenspektrometrie (HREIMS) von Verbindung **27** wies mit m/z 300.0634 $[M]^+$ auf die Summenformel $C_{16}H_{12}O_6$ hin (berechnet zu 300.0634). Die ¹³C-NMR-Daten waren mit zwei Carbonylsignalen bei 189 und 183 ppm und zwölf Signalen im aromatischen Bereich charakteristisch für ein Anthrachinon, darüber hinaus zeigte das Spektrum die Signale einer Methyl- und einer *O*-Methylgruppe. Im ¹H-NMR-Spektrum waren neben den erwarteten Signalen einer an einen Aromaten gebundenen Methylgruppe und einer *O*-Methylgruppe drei aromatische Protonen zu erkennen. Durch HMQC-, HMBC- und COSY-Experimente konnte die Gesamtstruktur ermittelt werden. Die Teilstruktur einer Methylgruppe (2.45 ppm) an C-6, die von zwei aromatischen Protonen 5-H und 7-H (7.60 und 7.25 ppm) flankiert ist, wurde aus den HMBC-Korrelationen dieser Methylgruppe zu C-5 und C-7 sowie aus der schwachen ⁴ J_{HH} -Kopplung zwischen den Protonen der Methylgruppe und den beiden aromatischen Protonen 5-H und 7-H abgeleitet. Da sowohl die *O*-Methylgruppe als auch 7-H eine HMBC-Wechselwirkung zu C-8 zeigte, war offensichtlich, dass diese *O*-Methylgruppe sich am selben Ring befand wie die aromatische Methylgruppe. Das dritte aromatische Proton 4-H (7.15 ppm) koppelte im COSY-Spektrum mit keinem der anderen Protonensignale, und im HMBC mit keinem der Kohlenstoffsignale aus dem ersten

Ring und musste sich somit auf der anderen Seite des Anthrachinons befinden. Für die verbleibenden drei Substituenten auf dieser Seite verlangte die aus der hochauflösenden Masse berechnete Summenformel, dass es sich um drei Hydroxygruppen handelte, was auch in guter Übereinstimmung mit den deutlich Tieffeld-verschobenen Kohlenstoffsignalen für C-1, C-2 und C-3 (152.0, 140.5 bzw. 152.7 ppm) war. Die Protonen 4-H und 5-H zeigten im HMBC starke Wechselwirkungen zu demselben Carbonyl-Kohlenstoff C-10, so dass davon ausgegangen wurde, dass beide sich in *peri*-Position zu dieser Carbonylfunktion befanden. Damit war schließlich nachgewiesen, dass es sich bei der Verbindung um 1,2,3-Trihydroxy-6-methyl-8-methoxy-9,10-anthrachinon (**27**; Abb. 13) handelte. Dieser Naturstoff war bisher unbekannt und wurde nach dem ihn produzierenden Organismus *E. varicolor* Evarichinon genannt.^[66]

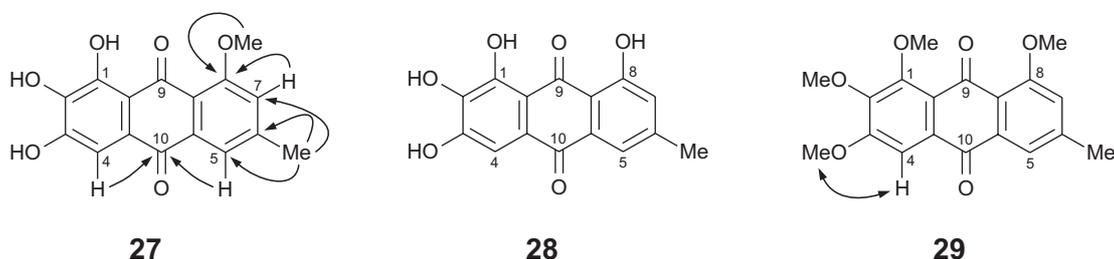


Abb. 13. Evarichinon (**27**), 7-Hydroxyemodin (**28**) und deren gemeinsames permethyliertes Derivat **29**; die Pfeile bezeichnen wichtige HMBC-Korrelationen in **27** bzw. die einzige ROESY-Wechselwirkung von 4-H in **29**.

Basierend auf den NMR-Daten von Evarichinon (**27**) wurde Verbindung **28** einfach als 1,2,3,8-Tetrahydroxy-6-methyl-9,10-anthrachinon (**28**; Abb. 13) identifiziert. Alle NMR-Daten von **28** stimmten gut mit denen des Evarichinons überein, bis auf das Fehlen der *O*-Methylgruppe, das schon im HPLC-NMR-Spektrum aufgefallen war. Dazu passend wurde als hochauflösende Masse m/z 286.0475 (berechnet für $C_{15}H_{10}O_6$: 286.0477) gemessen. Als weiteren Beleg für die postulierten Strukturen wurden **27** und **28** mit Diazomethan vollständig *O*-methyliert. In beiden Fällen führte die Reaktion zum gleichen Produkt, 1,2,3,8-Tetramethoxy-6-methyl-9,10-anthrachinon (**29**; Abb. 13). Diese *O*-permethylierte Verbindung ermöglichte weiterhin die Bestätigung der Position von 4-H *peri* zu einer Carbonylfunktion. Im ROESY-Spektrum von **29** zeigt 4-H eine Korrelation zu einer einzigen *O*-Methylgruppe (siehe Abb. 13). Befände sich das aromatische Proton in Position 2 oder 3 würde es mit zwei *O*-Methylgruppen wechselwirken.

Im Gegensatz zu Evarichinon (**27**) ist **28** ein literaturbekannter Naturstoff mit dem Trivialnamen 7-Hydroxyemodin (die Position 7 in der klassischen Nummerierung des Emodins entspricht der Position 2 in der hier benutzten IUPAC-Nomenklatur). Dieser Metabolit wurde bisher aus dem Pilz *Aspergillus rugulosus*^[67] sowie aus einer Reihe von Insekten aus der Familie der Coccidae^[68,69] isoliert. In den Cytotoxizitätstests der Zentaris AG

inhibierte Evarichinon (**27**) bei einer Konzentration von 3.16 $\mu\text{g/mL}$ die Proliferation von KB-Zellen um 60 % und von NCI-H460-Zellen um 69 %, während die verwandte Verbindung **28** inaktiv war.

2.6.3 Die Prenylxanthone Isoemicellin (**30**), Tajixanthonhydrat (**33**) und Shamixanthon (**34**)

Ebenfalls aus *E. varicolor* wurden die drei Substanzen **30**, **33** und **34** isoliert, deren UV-Spektren eine Verwandtschaft mit den aus *A. varicolor* bekannten Prenylxanthonen nahe legte.

Die HREIMS ergab für **30** eine Summenformel von $\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_5$. Die Auswertung der NMR-Spektren ergab ein Xanthonssystem sowie zwei Prenylreste, einer davon direkt an das aromatische Ringsystem gebunden der andere über ein Sauerstoffatom. Neben den Substituenten, die allen pilzlichen Prenylxanthonen eigen sind, nämlich einer OH-Gruppe (12.9 ppm), die eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff des Xanthons ausbildet, und einer C-Methylgruppe (2.47 ppm), wurde eine Hydroxymethylgruppe identifiziert. Das vollständige Substitutionsmuster von **30** wurde mit Hilfe einer Reihe von HMBC- und HMQC-Wechselwirkungen ermittelt, woraus sich die in Abb. 14 dargestellte Gesamtstruktur ergab. Ein Problem blieb hierbei noch die Orientierung des *O*-prenylierten Ringes, d.h. die Frage, ob die CH_2OH -Gruppe auf derselben Seite des Moleküls ist wie die phenolische Hydroxygruppe (also an C-9) oder auf der anderen Seite (an C-12). Die hohe Verschiebung der Hydroxymethylenprotonen zu tiefem Feld (5.13 ppm) deutete auf einen Abschirmungseffekt durch eine benachbarte Carbonylfunktion hin und damit auf Position C-9. Ein weiterer Hinweis war die Ähnlichkeit des ^1H -NMR-Spektrums mit dem des Variecoxanthon B (**31**; Abb. 14),^[65] auch bekannt als Emericellin.^[70] Damit unterscheidet sich die neue Verbindung **30** nur durch die Position der C-Prenyleinheit von Variecoxanthon B. Durch die HMBC-Korrelation 21-H \leftrightarrow C-4 (Abb. 14) konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass die C-Prenyleinheit sich *ortho* zur phenolischen Hydroxygruppe, also an C-3, befindet. Im EI-MS wurden Hauptfragmente bei m/z 339 und 340 detektiert, das Resultat einer Abspaltung des *O*-Prenylrestes (C_5H_9 bzw. C_5H_8). Weitere Fragmente bei m/z 283 und 284 untermauerten die Position des C-Prenylrestes an C-3. Sie sind auf eine darauf folgende Abspaltung der C-Prenyleinheit zurückzuführen, eine Reaktion, die über einen 6-gliedrigen Übergangszustand erfolgt und eine Hydroxygruppe in *ortho*-Position zum Prenylrest benötigt.^[71] Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Emericellin (**31**) wurde die neue Verbindung Isoemicellin (**30**) genannt. Tests auf biologische Aktivitäten konnten nicht durchgeführt werden, da Isoemicellin in polaren Lösungsmitteln schwerlöslich ist und daher in den gängigen Testsystemen nicht eingesetzt werden kann.

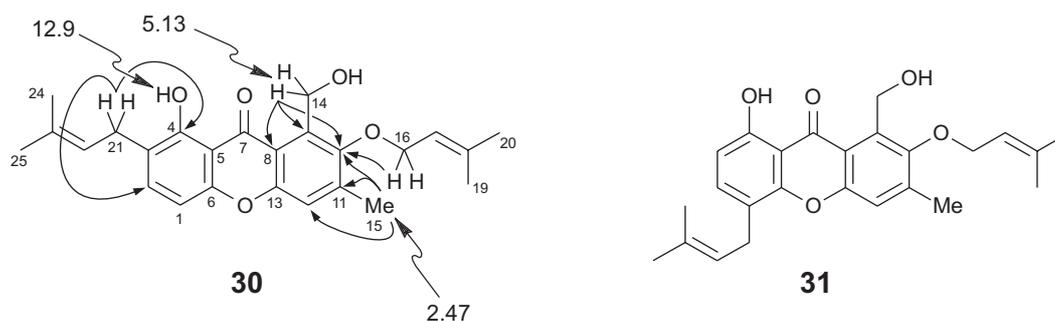
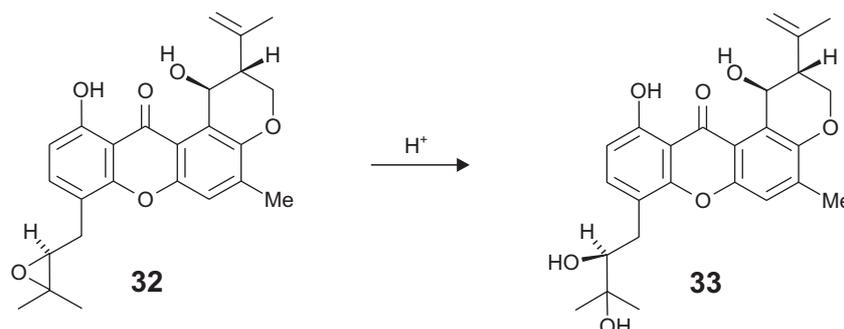


Abb. 14. Ausgewählte chemische Verschiebungen und HMBC-Wechselwirkungen von Isoemicellin (**30**) sowie, zum Vergleich, die bekannte Verbindung Emericellin (**31**).

Das zweite Prenylxanthon wurde durch Auswertung der NMR- und MS-Daten als die bekannte Verbindung Tajixanthonhydrat (**33**; Schema 2) identifiziert. Diese ist schon aus *A. variegata*^[72] sowie aus einem marinen Isolat von *E. variegata*^[73] bekannt. Das hier isolierte Tajixanthonhydrat ist kein originärer Naturstoff, sondern ein Artefakt, welches bei saurer Aufarbeitung durch Hydrolyse der Epoxidgruppe von Tajixanthon (**32**) gebildet wurde.



Schema 2. Bildung von Tajixanthonhydrat (**33**) durch Hydrolyse des Naturstoffs Tajixanthon (**32**).

In der Arbeitsgruppe von U. Hentschel konnte eine bisher unbekannte biologische Wirkung des Tajixanthonhydrates nachgewiesen werden. Es inhibiert in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/mL}$ die Bildung eines *Staphylococcus-epidermidis*-Biofilms, ohne die Bakterien abzutöten.^[74] Bakterielle Biofilme, besonders solche aus *S. aureus* oder *S. epidermidis*, stellen ein ernstes Problem in der klinischen Praxis dar. Sie können sich auf Implantaten und Kathetern bilden und führen oft, besonders bei immunsupprimierten Patienten, zu schweren rekurrierenden Infektionen.^[75] Die Bekämpfung dieser Biofilme gestaltet sich schwierig, da die Bakterien im Biofilm in eine Polysaccharid-Matrix eingebettet sind, welche sie besonders widerstandsfähig gegen normale Antibiotika macht.^[76] Zudem besteht beim Einsatz von Antibiotika immer die Gefahr einer Resistenzbildung; während im Jahr 1941 noch fast alle *S. aureus*-Stämme auf Penicillin G ansprachen, waren 1992 schon 92 % der Stämme resistent,^[77] und sogar das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin, welches als letzte Behandlungsmöglichkeit für Methicillin-resistente *S. aureus*-Stämme gilt, ist nicht mehr in

allen Fällen wirksam.^[78] Aus diesen Gründen wird zur Zeit intensiv nach Wirkstoffen gesucht, welche die Biofilmbildung von Staphylokokken verhindern und gleichzeitig nicht toxisch auf die Bakterien wirken, so dass sie keinen 'evolutionären Druck' auf die Erreger ausüben, der zu einer Resistenzbildung führen könnte. Tajixanthonhydrat (**33**) ist neben Farnesol^[79] bisher die einzige Substanz, die diese Eigenschaften besitzt.

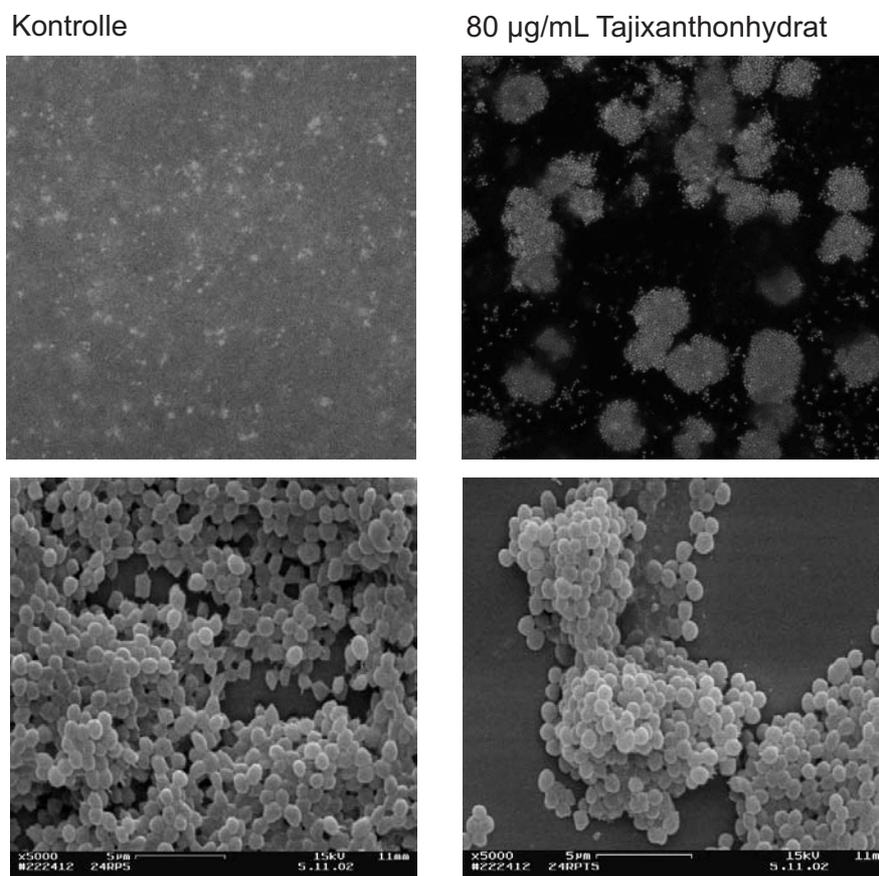


Abb. 15. *Staphylococcus-epidermidis*-Biofilm nach 24 h Inkubation ohne bzw. mit 80 µg/mL Tajixanthonhydrat (**33**); oben: Confocal Laser Scanning Microscopy, unten: Scanning Electron Microscopy.

Das dritte isolierte Prenylxanthon wurde als das ebenfalls aus *A. varicolor* bekannte^[64] Shamixanthon (**34**) identifiziert. Diese Verbindung ähnelt strukturell sehr dem Tajixanthon (**32**), einziger Unterschied ist die Doppelbindung an Stelle des Oxiranrings. Shamixanthon ist höchstwahrscheinlich eine biosynthetische Vorstufe von Tajixanthon.^[80] Interessanterweise besitzt Shamixanthon im Gegensatz zu Tajixanthonhydrat keine Biofilm-inhibierende Wirkung.

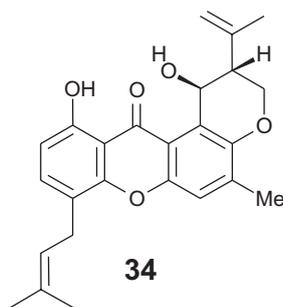


Abb. 16. Shamixanthon (**34**), isoliert aus *E. varicolor*.

2.6.4 Strukturaufklärung von Stromemycin (**35**)

Die im HPLC-UV-Chromatogramm auffälligste Komponente des Extraktes wurde ebenfalls durch MPLC und anschließende Säulenchromatographie an Kieselgel isoliert. Schon die in der HPLC-MS erkennbare hohe Massenzahl von 696 deutete auf eine komplexe Verbindung hin. Die Auswertung der NMR-Spektren gestaltete sich schwierig, da im Protonenspektrum mehrere Signale im Aliphaten-Bereich überlagert waren. Doch durch Einbeziehung der HMQC-, HMBC- und ^{13}C -Spektren war es möglich, diese überlappenden Signale zwei an aromatische Systeme gebundenen Nonadienylresten zuzuordnen. Der aromatische Bereich des Protonenspektrums enthielt drei Signale, von denen zwei eine *meta*-Kopplung (2.3 Hz) zueinander aufwiesen. Da das dritte Signal mit keinem der anderen aromatischen Protonen koppelte, war gesichert, dass die Verbindung mindestens zwei aromatische Ringe enthielt. Eine weitere aus den NMR-Daten ersichtliche Teilstruktur war eine Zuckereinheit, welche durch COSY- und ROESY-Wechselwirkungen als ein Glucopyranosylrest identifiziert wurde (Abb. 17), wobei die hohe Kopplungskonstante (9.9 Hz) zwischen 1''-H und 2''-H des Zuckers ein β -Anomer anzeigte. Im Gegensatz zu ähnlichen Naturstoffen^[81] war in der vorliegenden Verbindung die Glucose jedoch nicht *O*-glycosidisch, sondern *C*-glycosidisch gebunden, was aus den HMBC-Korrelationen zwischen dem anomeren Proton 1''-H und drei aromatischen Kohlenstoffatomen C-1, C-2 und C-3 ersichtlich war. Auch die ^{13}C -NMR-Daten der Zuckereinheit stimmten gut mit denen bekannter *C*-Glucoside überein.^[82] Das Substitutionsmuster der beiden aromatischen Ringe wurde aus HMQC- und HMBC-Wechselwirkungen abgeleitet. So konnte gezeigt werden, dass die Verbindung aus zwei 2,4-Dihydroxybenzoesäureeinheiten aufgebaut ist, die jeweils in 5-Position noch mit einem 3,5-Nonadienylrest substituiert sind und von denen eine die *C*-glycosidisch gebundene Glucoseeinheit trägt. Diese Teilstrukturen sowie die aus HPLC-MS und FAB-MS (Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry) erhaltene Molekülmasse sprachen für eine Ether- oder eine Esterbindung zwischen den beiden Molekülhälften. Für die Estervariante sprach, dass sowohl im Electrospray- als auch im FAB-Massenspektrum neben einem relativ kleinen Pseudomolekülion bei m/z 697.6 ein intensives Signal bei m/z 421 mit sechs austauschenden

Protonen zu sehen war. Dieses Signal wurde als die glycosylierte Hälfte des Moleküls nach Spaltung der Esterbindung gedeutet, was auch zeigte, dass der Glucoserest auf der Carbonylseite des Esters war. Solche massenspektrometrisch beobachtbare Esterspaltungen sind auch von anderen Verbindungen bekannt, die wie der hier beschriebene Metabolit zur Gruppe der Depside gehören, das sind Naturstoffe mit einer Esterbindung zwischen zwei hydroxylierten aromatischen Carbonsäuren.^[83] Welche der aromatischen Sauerstofffunktionen im nichtglycosylierten Ring an der Esterbindung mit der glycosylierten Molekülhälfte beteiligt ist, konnte aus dem ROESY-Spektrum abgeleitet werden. Die ROESY-Interaktionen 8-H \leftrightarrow 2'-H und 8-H \leftrightarrow 4'-H (Abb. 17) zeigten eindeutig, dass der Sauerstoff an C-3' an der Esterbindung beteiligt ist.

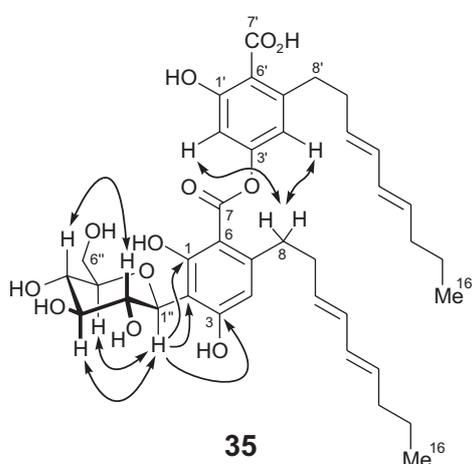
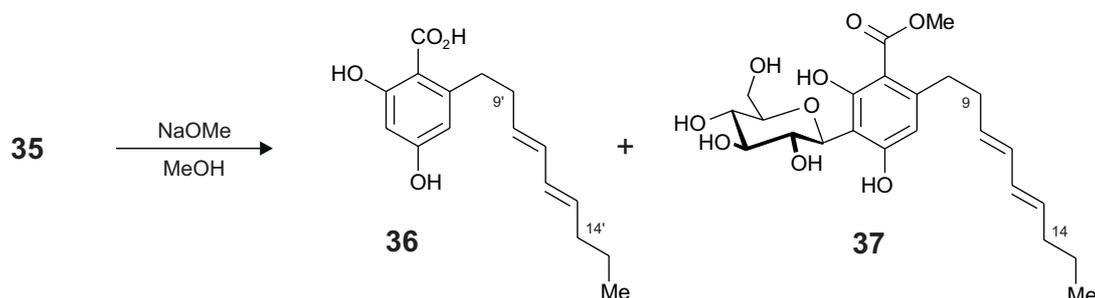


Abb. 17. Ausgewählte ROESY- und HMBC-Wechselwirkungen von Stromemycin (**35**); es ist das wahrscheinlichere D-Enantiomer des Glucosylrests dargestellt.

Durch eine Datenbanksuche wurde festgestellt, dass es sich bei der isolierten Verbindung um einen bekannten erst kürzlich entdeckten Wirkstoff, das Stromemycin (**35**) handelte. Diese Verbindung war bereits wegen ihrer Stromelysin-inhibierenden Wirkung patentiert worden.^[84] Stromelysin ist eine so genannte Matrixmetalloproteinase, deren physiologische Funktion die Spaltung von Matrixproteinen (z.B. Kollagen) ist. Da die Matrixmetalloproteinasen auch bei der Angiogenese involviert sind, stellen sie ein wichtiges Target bei der Suche nach Wirkstoffen gegen Tumorerkrankungen dar. In den Testsystemen unserer Kooperationspartner auf cytotoxische, anti-Biofilm und antiprotozoale Wirkung konnte jedoch keine weitere Aktivität von Stromemycin festgestellt werden.

Im erwähnten Patent^[84] waren weder die Konfiguration des Zuckers noch die der Doppelbindungen in den Nonadienylketten genannt. Der Zucker wurde, wie weiter oben schon beschrieben, durch Auswertung der ROESY-Wechselwirkungen als Glucose (β -Form) identifiziert. Zur Bestimmung der Doppelbindungskonfigurationen wurden die $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten herangezogen, welche jedoch nicht einfach aus dem Protonenspektrum abgelesen werden konnten, da die Signale der beiden Nonadienylreste im Spektrum stark

überlappten und somit komplizierte Multipletts bildeten. Durch methanolytische Spaltung der Esterbindung von Stromemycin (**35**; Schema 3) wurden die unglycosylierte Hälfte **36** des Moleküls und der Methylester **37** der glycosylierten Hälfte erhalten, welche nun getrennt mittels NMR vermessen wurden. Dabei zeigte sich, dass die Signale der Doppelbindungsprotonen immer noch Multipletts höherer Ordnung waren und somit keinen direkten Zugang zu den Kopplungskonstanten erlaubten. Entkopplung durch Einstrahlung auf die Frequenzen der allylischen Protonen 9-H und 14-H resultierte in einer weiteren Vereinfachung der Multipletts, doch die Ermittlung der Kopplungskonstanten gelang erst durch eine rechnerische Simulation des Spinsystems. Diese Berechnung erfolgte mittels der WIN-DAISY-Software, die nach Vorgabe von Startwerten für chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten diese durch ein iteratives Verfahren so lange optimiert, bis das daraus berechnete Spektrum die größtmögliche Übereinstimmung mit dem gemessenen zeigt. Daraus ergaben sich für alle Doppelbindungen $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten zwischen 15.2 und 15.3 Hz, was der *E*-Konfiguration entspricht. Eine Bestimmung der absoluten Konfiguration von Stromemycin (**35**), d.h. der absoluten Konfiguration der Glucoseeinheit, war bisher nicht möglich. Allerdings kommt L-Glucose in der Natur nur äußerst selten vor, so dass von einer D-Konfiguration des Zuckers ausgegangen werden kann.



Schema 3. Methanolytische Spaltung von Stromemycin (**35**).

Aus dem Extrakt des angesäuerten Kulturmediums wurde als weitere Verbindung noch 2-Furancarbonsäure isoliert. Diese Substanz entstand wahrscheinlich durch Oxidation des im Malzextrakt-Medium enthaltenen Furfural. Dies ist auch von anderen Pilzstämmen bekannt.^[85]

2.7 Metaboliten eines *Penicillium chrysogenum*-Stammes

Eine ganze Reihe verschiedenartiger Metabolite, darunter auch neue bioaktive Naturstoffe mit ungewöhnlichen Strukturen, konnten aus einem Pilzstamm der Spezies *Penicillium chrysogenum* THOM (Trichocomaceae)^[86] gewonnen werden. Isoliert, identifiziert und für die chemischen Untersuchungen angezogen worden war dieser Pilz von Steffens.^[27] Interessant war hierbei besonders, dass *P.-chrysogenum*-Stämme mit identischem Metabolitenmuster nicht nur einmal und aus einer einzigen Schwammspezies, sondern mehrfach und aus Schwammindividuen unterschiedlicher Arten isoliert wurden, nämlich aus *Chondrosia reniformis* und *Ircinia fasciculata*. Bei der Kultivierung der Pilze fiel die gelbe Färbung auf, die das Kulturmedium um die Pilzkolonien annahm.

P. chrysogenum ist die vielleicht am weitesten verbreitete *Penicillium*-Spezies.^[87] Sie ist meist terrestrisch und wurde auch schon an ungewöhnlichen Lokalitäten^[88] gefunden. Bekannt wurde diese Art vor allem durch ihre Verwendung als Penicillin-Produzent, *P. chrysogenum* ersetzte dabei *P. notatum*, aus welchem Fleming^[2] das erste reine Penicillin isoliert hatte. Doch diese Pilzspezies produziert noch weitere, strukturell sehr diverse Metaboliten; so sind aus Pilzen dieser Art z.B. die Alkaloide Meleagrin (**38**)^[89] und Chrysoengin (**39**)^[90] sowie Sorbicillin (**40**)^[91] bekannt.

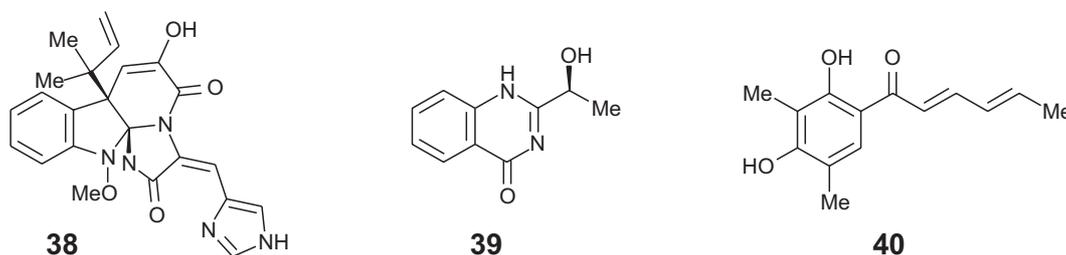


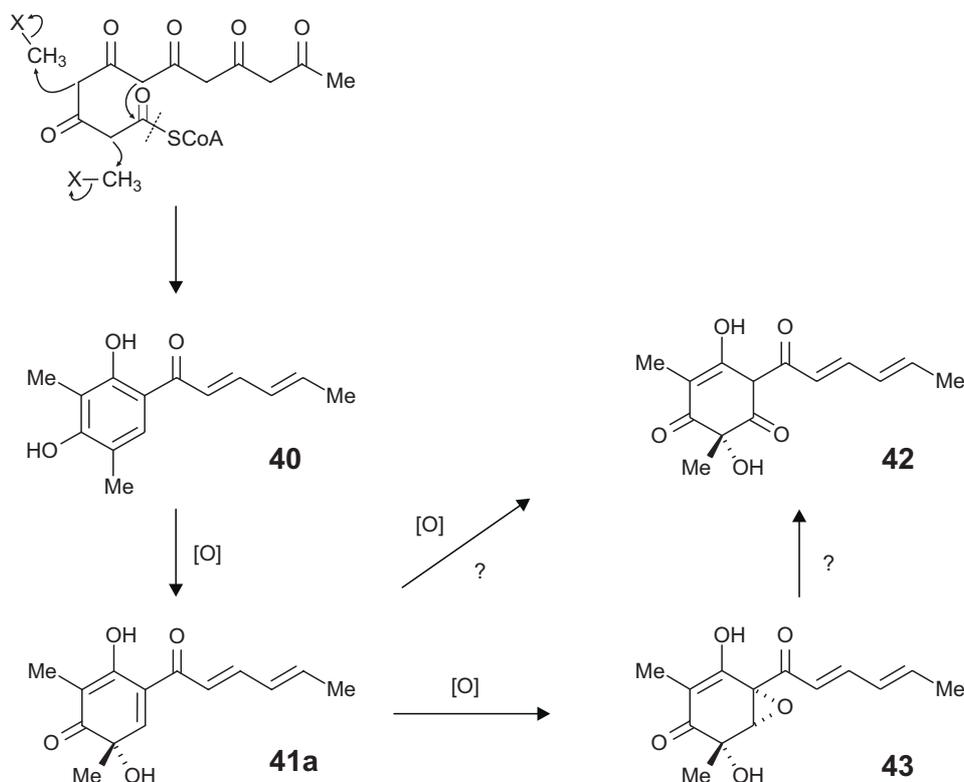
Abb. 18. Einige von *P. chrysogenum* produzierte Metaboliten: Meleagrin (**38**), Chrysoengin (**39**) und Sorbicillin (**40**).

2.7.1 Sorbicillin-abgeleitete Naturstoffe

Im HPLC-UV-Chromatogramm des Pilzextraktes fiel eine Gruppe von drei Substanzen mit sehr ähnlichen UV-Spektren auf. Der Vergleich mit Spektraldaten aus *P. chrysogenum* bekannter Metaboliten legte nahe, dass es sich hierbei um Derivate des Sorbicillins (**40**) handelte. Auch die gelbe Farbe des Kulturmediums und des daraus gewonnenen Extraktes ließ sich durch diese Sorbicillin-Derivate erklären.

Sorbicillin (**40**), ein zweifach *C*-methyliertes Hexaketid, das als Verunreinigung bei der frühen Penicillin-Produktion entdeckt wurde,^[91] bildet den Grundkörper einer strukturell vielfältigen Klasse von Pilzmetaboliten. Durch oxidative Dearomatisierung von Sorbicillin

wird biosynthetisch das hochreaktive Sorbicillinol (**41a**)^[92] gebildet. Weitere Oxidation führt zu Epoxysorbicillinol (**43**)^[93] oder zum Oxosorbicillinol (**42**)^[94], wobei unklar ist, ob **42** direkt aus **41a** oder durch Umlagerung von **43** gebildet wird.



Schema 4. Biosynthese von Sorbicillinol (**41a**) aus Sorbicillin (**40**) und seine Weiteroxidation zu Epoxysorbicillinol (**43**) und Oxosorbicillinol (**42**); (X-CH₃ = *S*-Adenosylmethionin).

Sorbicillinol (**41a**) ist die Ausgangsverbindung für die Biogenese der so genannten Bisvertinoide. Diese Metaboliten entstehen durch Dimerisierung von Sorbicillinol, einerseits durch Diels-Alder-Reaktionen, wobei z.B. das Bisorbicillinol (**44**)^[95] entsteht, andererseits aber auch durch Michael-Additionen und Halbacetalbildung, die zu Bisvertinol (**45**)^[96] und Trichodimerol (**46**)^[97] führen. Da die Primärprodukte der Dimerisierungsreaktionen teilweise noch durch weitere Oxidationen und Umlagerungen modifiziert werden, existiert eine große Vielfalt an Bisvertinoiden, von denen manche interessante Bioaktivitäten besitzen. So ist z.B. Bisvertinolon (**64**, Abb. 29)^[96] der erste β -(1,6)-Glucan-Biosynthese-Inhibitor^[98] und Trichodimerol (**46**) unterdrückt die Wirkung des Tumornekrosefaktors α .^[99] Einige dieser Verbindungen wurden auch synthetisch dargestellt, wobei das Sorbicillin (**40**) zum Sorbicillinol (**41a**) oxidiert wurde, welches dann biomimetisch, gesteuert durch die Reaktionsbedingungen, selektiv zu den gewünschten Bisvertinoiden weiterreagierte.^[99,100]

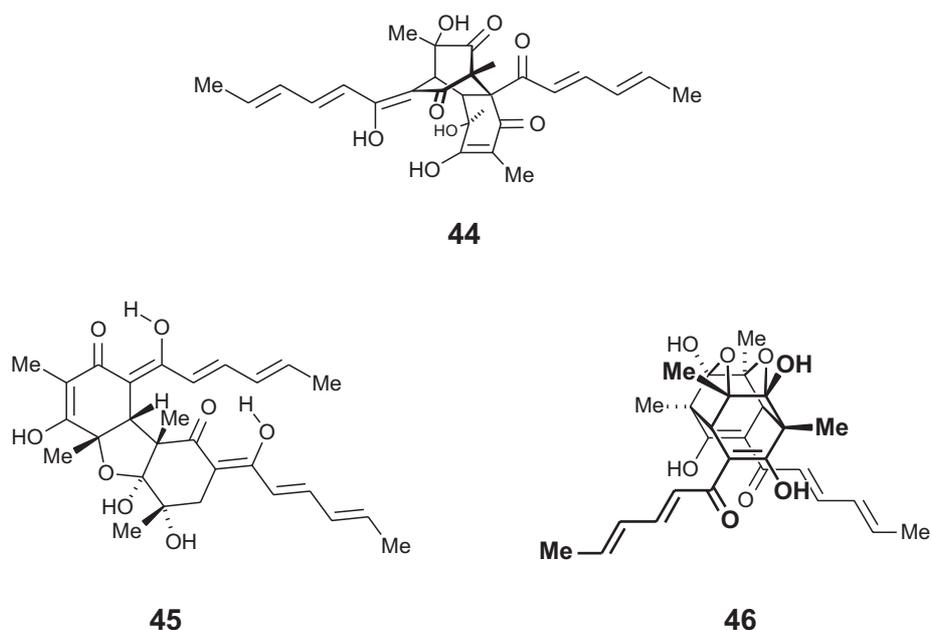


Abb. 19. Einige bekannte Bisvertinoide: Bisorbicillinol (**44**)^[95], Bisvertinol (**45**)^[96] und Trichodimerol (**46**)^[97]

Von den 'Sorbicillin-ähnlichen' Verbindungen im hier untersuchten Pilzextrakt zeigten drei (**47**, **54a** und **62a**) im HPLC-MS-Chromatogramm Pseudomolekularionen $[M+H]^+$ bei den Massen 418, 445 bzw. 321. Diese Massenzahlen lagen zwischen denen einfacher Sorbicillin-abgeleiteter Moleküle, wie z.B. Epoxysorbicillinol (**43**; $M = 264$), und denen der Bisvertinoide, z.B. Trichodimerol (**46**; $M = 496$), und konnten somit keinem der bekannten Sorbicillin-Derivate zugeordnet werden. Besonders ungewöhnlich war die ungerade Molekülmasse von **47**, die auf mindestens ein Stickstoffatom in der Struktur hindeutete, obwohl alle bislang bekannten Sorbicillin-Derivate stickstofffrei waren. Die Molekülmasse des vierten Substanzpeaks (**64**) lag mit $[M+H]^+$ 513 im Massenbereich der Bisvertinoide.

Zur Strukturaufklärung und Bioaktivitätstestung wurden diese Verbindungen durch präparative HPLC isoliert.

2.7.1.1 Sorbicillacton A (**47**)

Dass es sich bei Verbindung **47** tatsächlich um ein Sorbicillinderivat handelte, war schon im HPLC-¹H-NMR-Spektrum an den typischen Signalen des Sorbylrests zu erkennen, einem Methyldublett bei 1.8 ppm und drei miteinander koppelnden Doppelbindungsprotonen zwischen 6.0 und 7.2 ppm. Aus den NMR-Daten der isolierten Substanz, vor allem aus den HMBC- und COSY-Korrelationen, ließen sich drei Teilstrukturen des Moleküls ableiten: ein Fumaratrest (**47c**), bei welchem die *E*-Konfiguration der Doppelbindung aus der hohen Kopplungskonstante (15.4 Hz) ersichtlich war, ein Sorbylrest (**47a**), dessen typische ¹H-NMR-Signale schon im HPLC-NMR-Spektrum identifiziert worden waren, und ein

Cyclohexanonring (**47b**), dessen Substitutionsmuster aus den HMBC-Wechselwirkungen der drei Methylgruppen C-7, C-8 und C-11 sowie von 6-H abgeleitet wurde.

Die Durchführung der NMR-Messungen in THF- d_8 ermöglichte es, auch austauschbare Protonen und deren Wechselwirkungen zu beobachten. Hierbei erkannte man zwei zusätzliche scharfe Signale im ^1H -Spektrum. Dabei handelte es sich um eine enolische Hydroxygruppe, die durch die Wasserstoffbrückenbindung zu einer β -ständigen Ketogruppe stark zu tiefem Feld verschoben war (16.6 ppm), und ein amidisches Proton bei 7.6 ppm. Durch die HMBC-Korrelationen dieser Protonen konnten alle drei Teilstrukturen zu einer Gesamtstruktur **47d** vereinigt werden. Dabei bildeten der Sorbylrest **47a** und der Cyclohexanonring **47b** eine für diese Naturstoffklasse typische Sorbicillinolstruktur. Ungewöhnlich, da bisher von keinem Sorbicillinderivat bekannt, war dagegen die an C-6 gebundene C_3 -Einheit. Amidisch mit dieser verknüpft war wiederum der Fumarsäurerest, was über die HMBC-Korrelationen des NH-Protons eindeutig belegt werden konnte.

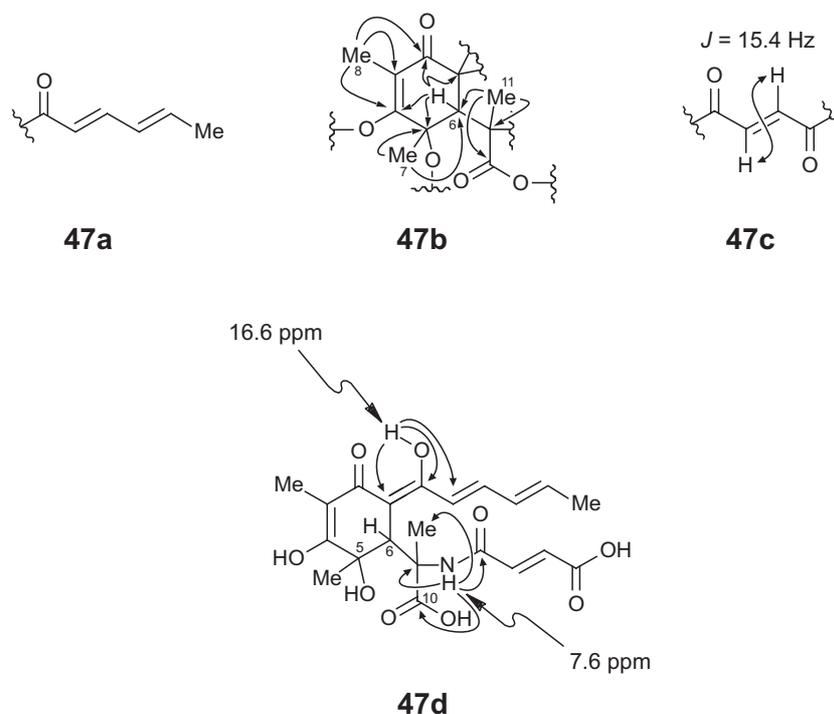


Abb. 20. Teilstrukturen (**47a**, **b** und **c**) von **47** sowie eine erste hypothetische Gesamtstruktur (**47d**); wichtige HMBC- und COSY-Korrelationen sind durch Pfeile dargestellt.

Die im HPLC-MS-Chromatogramm beobachtete Molekülmasse von 417 erforderte eine formale 'Abspaltung' von Wasser aus der hypothetischen Struktur **47d**. Im Einklang mit den NMR-Daten konnte hierfür nur eine Lactonverknüpfung zwischen einer der zwei Säuregruppen und entweder dem tertiären Alkohol an C-5 oder der enolischen Hydroxylgruppe an C-4 verantwortlich sein. Aus sterischen Gründen konnte die Beteiligung des Enols jedoch ausgeschlossen werden. Um die Position dieses Lactonrings sicher zu ermitteln, wurde durch Behandlung mit Methanol/Schwefelsäure der Methylester von **47**

hergestellt. Die NMR-Untersuchungen des Reaktionsproduktes ergaben, dass es sich um ein monomethyliertes Derivat von **47** handelte. Durch ein HMBC-Experiment wurde gezeigt, dass die freie Säuregruppe des Fumarsäurerests (C-4'') methyliert war und nicht die Säuregruppe C-10. Somit lag eine Verknüpfung der Säuregruppe C-10 mit dem tertiären Alkohol, also die Präsenz eines 5-Ring-Lactons, nahe. Unterstützt wurde diese Hypothese durch die chemische Verschiebung von C-5. Mit 81.0 ppm lag diese deutlich höher als bei anderen von Sorbicillinol abgeleiteten Verbindungen mit einer freien Hydroxylgruppe an dieser Position, z.B. 71.9 ppm bei Sorbifuranon A (**54a**; siehe 2.7.1.3) und 74.9 ppm bei einem aus Sorbicillinol gebildeten Artefakt (**62a**; siehe 2.7.1.4).

Folglich besaß der unmethylierten Naturstoff die Struktur **47** (Abb. 21). Die ROESY-Wechselwirkungen zwischen 6-H und den Methylgruppen 7-H und 11-H wiesen auf eine *cis*-Konfiguration von 6-H zu beiden Methylgruppen hin, wodurch die relative Konfiguration aller drei Stereozentren (C-5, C-6 und C-9) festgelegt war. Da es sich bei **47** um einen neuen Naturstoff mit Sorbicillin-abgeleiteter Struktur und einem Lactonring handelte, wurde diese Verbindung Sorbicillacton A genannt.

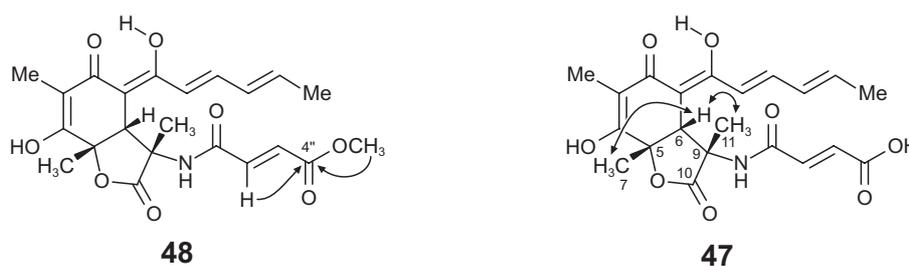


Abb. 21. Strukturen von Sorbicillacton A (**47**) und dessen Methylierungsprodukt **48**; wichtige HMBC- und ROESY-Wechselwirkungen sind durch Pfeile dargestellt.

Der schwierigste Schritt bei der Strukturaufklärung von chiralen Naturstoffen ist oft die Bestimmung der absoluten Konfiguration. Es existieren zwar einige Standardmethoden zur Lösung dieses Problems, z.B. die Derivatisierung mit chiralen Reagenzien und anschließende NMR-Spektroskopie,^[101] kinetische Methoden,^[102] oder, sofern die Verbindung kristallin vorliegt und Schweratome enthält, die Röntgenkristallographie.^[103] Auf **47** war jedoch keine dieser Methoden anwendbar. Ein weiteres wichtiges Verfahren ist die Interpretation der CD-Spektren mit Hilfe empirischer Regeln^[104] oder der Vergleich mit verwandten Verbindungen. Dies war jedoch im vorliegenden Fall ebenfalls nicht möglich, da noch kein strukturell ähnliches Molekül bekannt war, das als Vergleich hätte dienen können. Deshalb wurde die absolute Konfiguration von Sorbicillacton A durch die quantenchemische Berechnung der CD-Spektren für die beiden möglichen Enantiomere (*5S,6R,9S*)-**47** und (*5R,6S,9R*)-**47** und anschließenden Vergleich mit dem gemessenen Spektrum des Naturstoffs bestimmt. Diese in

unserer Arbeitsgruppe etablierte und weiterentwickelte Methode wurde schon mehrfach erfolgreich auf andere Naturstoffe angewandt.^[105,106]

Im Fall von Sorbicillacton A (**47**) wurde die Berechnung der CD-Spektren von Mühlbacher^[107] unter Anwendung einer 'Molecular-Dynamics'-Methode durchgeführt, bei der die Bewegungen des Moleküls simuliert und die berechneten Spektren aller in einem bestimmten Zeitraum auftretenden Konformere zu einem Durchschnittsspektrum addiert werden.^[108] Die gute Übereinstimmung des für die (5*S*,6*R*,9*S*)-Konfiguration berechneten Spektrums mit dem gemessenen, vor allem im Bereich des Minimums bei 250 nm, deutete auf eben diese Konfiguration des Naturstoffes hin.

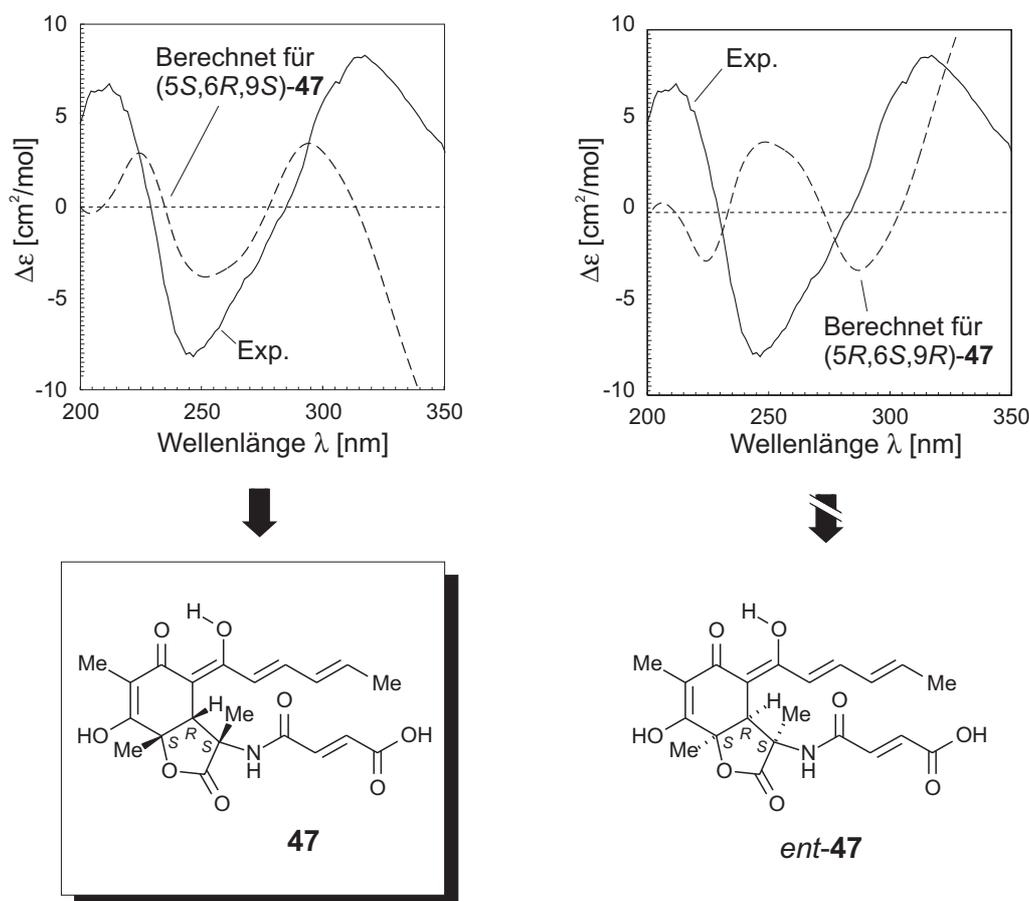
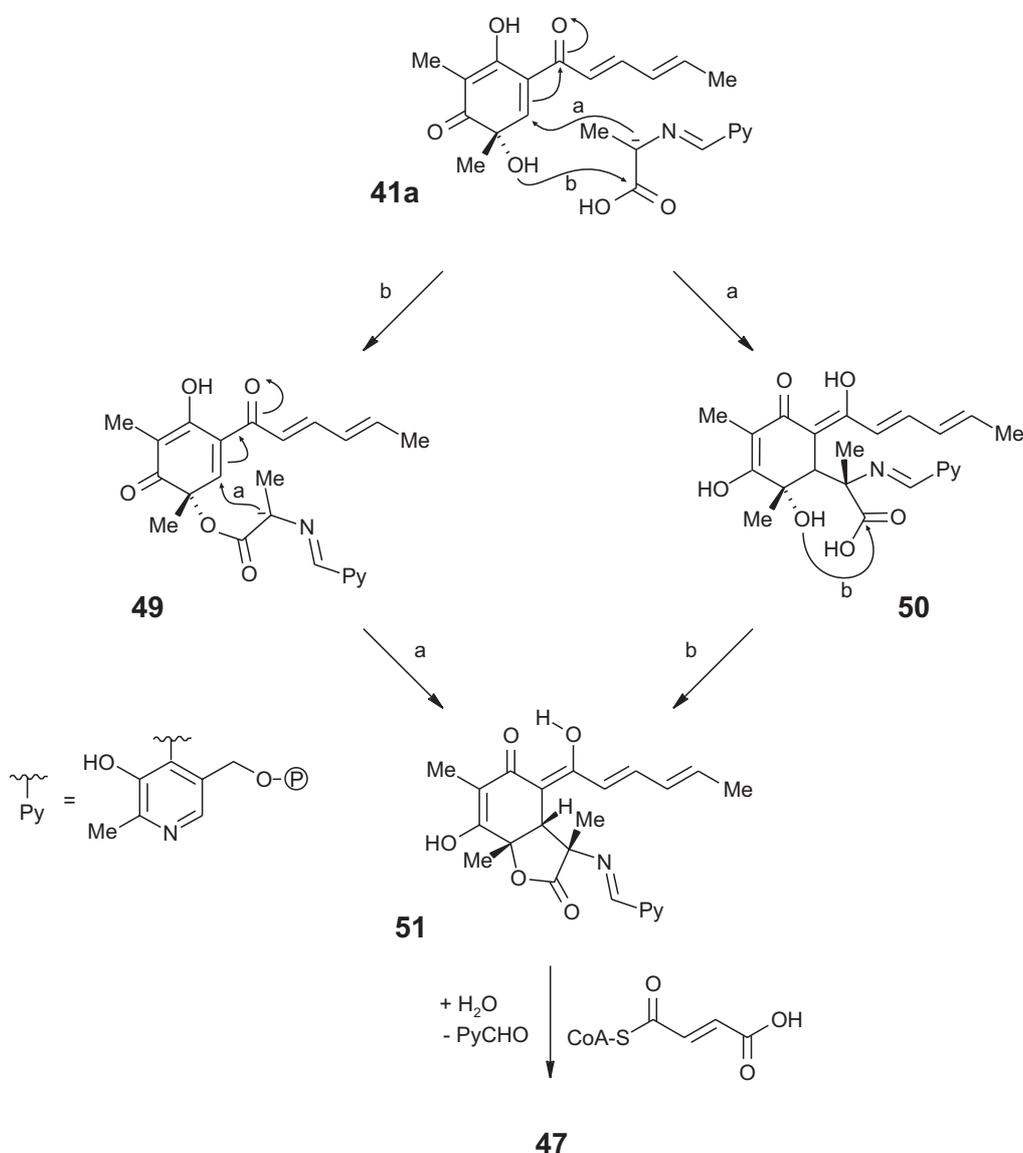


Abb. 22. Bestimmung der absoluten Konfiguration von Sorbicillacton A (**47**) durch quantenchemische Berechnung der CD-Spektren beider möglicher Enantiomere.

Die Struktur von Sorbicillacton A (**47**) ist in mehrfacher Hinsicht interessant. Es ist nicht nur das erste stickstoffhaltige Sorbicillinderivat, sondern begründet darüber hinaus auch eine neue Klasse Sorbicillin-abgeleiteter Naturstoffe. Die bisher bekannten Sekundärmetaboliten mit Sorbicillin-Grundstruktur lassen sich in zwei Klassen einteilen, einerseits einfache oxidative Derivate von Sorbicillin, wie Sorbicillinol (**41a**), Epoxysorbicillinol (**43**) und Oxosorbicillinol (**42**, siehe Schema 4), und andererseits die strukturell sehr vielfältige Gruppe

der dimeren Bisvertinoide (Abb. 19). Sorbicillacton A hingegen enthält neben dem von Sorbicillin abgeleiteten Cyclohexanon mit Sorbyl-Seitenkette noch strukturelle Elemente, die offensichtlich einen anderen biosynthetischen Ursprung haben. Die C₃-Einheit, welche am 5-Ring-Lacton beteiligt ist, könnte ihren Ursprung in der Aminosäure Alanin haben, welche mit Sorbicillinol (**41a**) zu **49** verestert wird und nach Aktivierung, z.B. durch Pyridoxalphosphat, nucleophil an das Enon-System des Sorbicillinol angreift und somit den Lactonring schließt (**51**). Alternativ ist es auch vorstellbar, dass zuerst die C-C-Bindung geknüpft und erst danach das Lacton geschlossen wird, so dass die Zwischenstufe **50** existiert (Schema 5). Beide Wege sind prinzipiell vorstellbar, doch der Weg über Zwischenstufe **49** würde den Ursprung der *cis*-Konfiguration von 6-H und der Methylgruppe an 5-H des Sorbicillactons besonders gut erklären. Die anschließende amidische Anbindung von Fumarsäure würde somit die



Schema 5. Hypothetischer Biosyntheseweg von Sorbicillacton A (**47**) aus Sorbicillinol, aktiviertem L-Alanin und Fumarsäure.

hypothetische Biosynthese von Sorbicillacton A abschließen.

Eine alternativer Weg wäre die Bildung des bicyclischen Systems aus einer einzigen heptaketidischen, d.h. aus sieben Acetateinheiten aufgebauten, Kette, so dass die Kohlenstoffatome im 5-Ring nicht von Alanin, sondern von der als letztes in die Kette eingebauten Acetateinheit herrühren. Allerdings erforderte dieser Weg nicht nur eine zusätzliche Methylierung an C-9, sondern auch die ungewöhnliche Einführung eines Stickstoffsubstituenten an derselben Position, was diese Hypothese eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Es bleibt zu erwähnen, dass das bicyclische Grundgerüst von Sorbicillacton A (**47**), welches bisher in Naturstoffen unbekannt war, bei der Synthese von Bisvertinoiden als Nebenprodukt **52** auftauchte, allerdings als Struktur mit unsubstituiertem Lactonring.^[100]

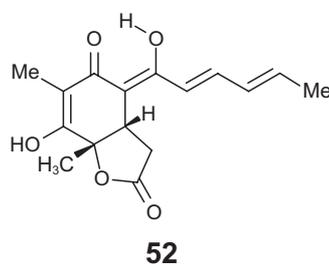


Abb. 23. Das mit Sorbicillacton A (**47**) strukturverwandte literaturbekannte Syntheseprodukt **52**.

Da viele der bekannten Sorbicillin-Naturstoffe interessante Bioaktivitäten aufweisen, wurde auch Sorbicillacton A (**47**) von unseren Kooperationspartnern in verschiedenen Bioassays getestet. Cytotoxizitätstests in der Arbeitsgruppe von Prof. Müller (Universität Mainz) offenbarten eine starke Wirkung dieser Substanz gegen eine murine leukämische Lymphoblasten-Zelllinie (L5178y) mit einer ED_{50} von $2.2 \pm 0.3 \mu\text{g/mL}$. Die Aktivität war selektiv gegen diese Zelllinie, bei HeLa-S3-, PC-12- und Maus-Sarkom-180-Zellen lag die ED_{50} über $10 \mu\text{g/mL}$. Weitere Experimente zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Sorbicillacton A zeigten, dass die Verbindung die DNA-Biosynthese hemmt, die RNA- und Proteinbiosynthese jedoch nicht. Auch konnte eine Apoptose-Induktion durch Sorbicillacton A ausgeschlossen werden. Es wurde nicht nur eine cytotostatische, sondern auch eine antivirale Wirkung gefunden; Sorbicillacton A schützte H9-Zellen vor den Wirkungen einer Infektion mit HIV-1. Dieser antivirale Effekt wurde bei Wirkstoffkonzentrationen von $0.3 - 1.0 \mu\text{g/mL}$ beobachtet, also unterhalb der cytotostatisch wirksamen Konzentration.^[109]

Ein Patent auf die Struktur, die Bioaktivitäten und die Isolierung von Sorbicillacton A wurde eingereicht und steht kurz vor der Erteilung.^[110]

2.7.1.2 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (53)

Im HPLC-MS-Chromatogramm des Pilzextraktes fiel auf, dass die ESI-Massenspektren des Sorbicillacton-A-Peaks nicht nur Pseudomolekularionen der für Sorbicillacton A (47) erwarteten Masse m/z 418 $[M+H]^+$, sondern in geringerer Intensität auch Ionen der Masse m/z 420 $[M+H]^+$ zeigten. Durch präparative HPLC unter isokratischen Bedingungen gelang es, diese beiden Substanzen mit fast identischem Retentionsverhalten zu trennen. Die etwas später eluierende Substanz **53** mit der Molekülmasse 419 unterschied sich auch im UV-Spektrum deutlich von Sorbicillacton A; das hypsochrom verschobene Absorptionsmaximum von **53** (von 379 zu 331 nm) ließ auf eine Unterbrechung des für die gelbe Farbe von Sorbicillacton A verantwortlichen konjugierten π -Systems schließen. Die NMR-Spektren ähnelten denen des Sorbicillactons A, doch bei den Signalen des Sorbylrests waren Unterschiede zu erkennen: im Vergleich zu dem des Sorbicillactons A enthielt das Protonenspektrum von **53** zwei Signale von Doppelbindungsprotonen weniger, dafür aber Resonanzen zweier zusätzlicher CH_2 -Gruppen; die Auswertung der COSY- und HMBC-Spektren zeigte, dass in **53** die mittlere Doppelbindung der Sorbylkette durch eine Einfachbindung ersetzt ist (siehe Abb. 24).

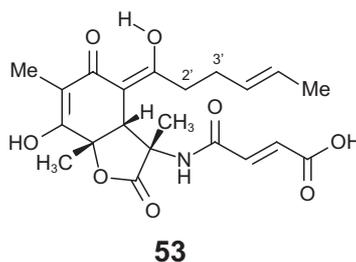


Abb. 24. Struktur von 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**).

Solche 2',3'-Dihydroderivate von Sorbicillin-abgeleiteten Verbindungen sind nicht unbekannt. So wurden neben dem 2',3'-Dihydrosorbicillin selbst^[111] auch schon die Strukturen der entsprechenden Derivate von Bisvertinoiden veröffentlicht, z.B. das 2',3'-Dihydrobisorbicillinol.^[96]

2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**) ist deutlich schwächer cytotoxisch als Sorbicillacton A, die ED50 gegen L5178y-Zellen liegt bei über 10 $\mu\text{g/mL}$.

2.7.1.3 Sorbifuranon A (54a), B (58) und C (59)

Verbindung **54a**, deren UV-Spektrum dem des Sorbicillacton A (47) ähnelte, wurde nach der Isolierung ebenfalls eingehend durch MS- und NMR-Experimente untersucht. Erwartungsgemäß wurde das gleiche Sorbicillinol-Grundgerüst wie bei Sorbicillacton A gefunden. Darüber hinaus zeigte das ^{13}C -NMR-Spektrum Signale für weitere zehn

Kohlenstoffatome. Durch Interpretation von HMBC- und COSY-Daten konnten diese Signale einem *n*-Propylrest und einer α,β -ungesättigten Carbonsäure zugeordnet werden, deren Doppelbindungskonfiguration anhand der $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 11.9 Hz als *Z* bestimmt wurde. Bei den restlichen Signalen handelte es sich um zwei Carbonylkohlenstoffe C-10 und C-12 (203.8 bzw. 193.6 ppm), einen quartären Kohlenstoff C-11 bei 115.6 ppm und einen Methinkohlenstoff C-9 bei 84.7 ppm mit zugehörigem Proton 9-H bei 5.27 ppm. Die HMBC-Wechselwirkungen von 9-H zu C-1, C-5 und C-6 legten nahe, dass der unbekannte Teil der Struktur über C-9 mit C-6 des Sorbicillinolteils verknüpft war, in die andere Richtung war eine HMBC-Korrelation von 2-H zu C-10 zu sehen. Durch weitere HMBC-Wechselwirkungen ausgehend von Protonen des *n*-Propylrests wurde die Abfolge der Kohlenstoffatome C-11, C-12 und C-13 erkannt (Abb. 25). Die α,β -ungesättigte Carbonsäureeinheit war an C-11 gebunden, was aus der Wechselwirkung 17-H \rightarrow C-11 ersichtlich war. Die Korrelationen 16-H \rightarrow C-10 und 16-H \rightarrow C-12 ließen den Schluss zu, dass direkt an C-11 neben C-12 und C-16 auch C-10 gebunden war. Ein weiterer für die Strukturaufklärung wichtiger Faktor war die chemische Verschiebung von C-9 (84.7 ppm), die auf einen Sauerstoffsubstituenten hindeutete.

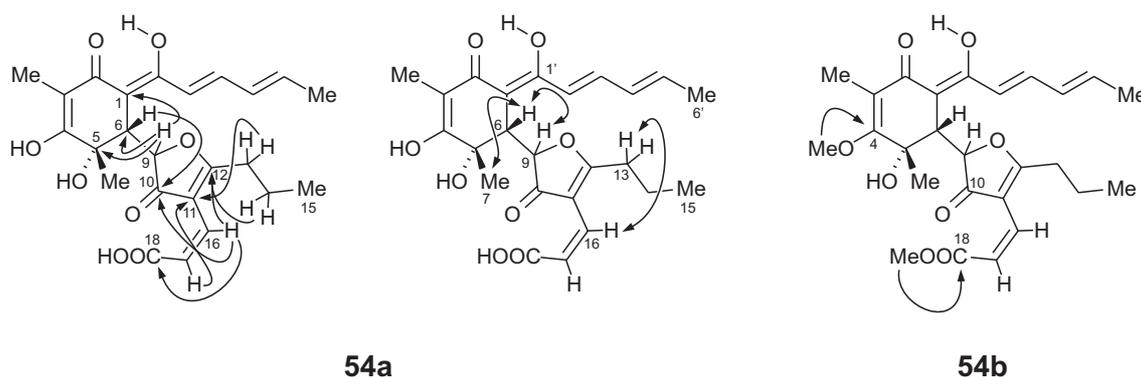


Abb. 25. Struktur von Sorbifuranon A (**54a**) und seinem zweifach *O*-methyliertem Derivat **54b**; die Pfeile zeigen für die Strukturaufklärung wichtige HMBC- und ROESY-Korrelationen.

Der einzige Strukturvorschlag, der im Einklang sowohl mit den eben genannten HMBC-Wechselwirkungen als auch mit der aus der exakten Masse (m/z 445.1859 $[\text{M}+\text{H}]^+$) berechneten Summenformel $\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_8$ stand, war die in Abb. 25 dargestellte Furanonstruktur **54a**. Die chemische Verschiebung von C-12 von 193.6 ppm im 3-Oxo-2,3-dihydrofuran-Strukturelement erschien ungewöhnlich hoch für einen Enolether. Doch durch eine Datenbankrecherche wurde ein bekannter Naturstoff mit ebendiesem Strukturelement gefunden, die aus den Blüten von *Erigeron annuus* isolierte (5-Butyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)-essigsäure (**55**; Abb. 26).¹¹² Somit konnte gezeigt werden, dass die chemischen Verschiebungen im Furanonsystem akzeptabel sind und solche Strukturen, wenn auch selten, in der Natur vorkommen. In Übereinstimmung mit dem Strukturvorschlag **54a** wurde die

Verbindung bei Behandlung mit Diazomethan zweifach zu **54b** methyliert, an der freien Säuregruppe C-18 und an der enolischen Hydroxylgruppe an C-4, nicht jedoch unter Enoletherbildung an C-10! Dabei wurde die Position der eingeführten Methylgruppen durch ein HMBC-Experiment ermittelt. Ein zusätzlicher Hinweis auf die Richtigkeit der Struktur war die ROESY-Wechselwirkung 16-H \leftrightarrow 13-H. Nach den beiden hier diskutierten Strukturelementen, der Sorbicillinol- und der Furanonhälfte, wurde die Verbindung Sorbifuranon A (**54a**) genannt.

Wie schon bei Sorbicillacton A (**47**) konnte auch bei Sorbifuranon A (**54a**) die *cis*-Anordnung von 6-H und der Methylgruppe C-7 am Cyclohexanonring durch die NOESY-Wechselwirkung 6-H \leftrightarrow 7-H belegt werden. Über die Konfiguration des dritten Stereozentrums C-9 konnte aus den NMR-Spektren keine Information gewonnen werden. Möglicherweise ist die Konfiguration an C-9 nicht stabil, da der Furanonring mit geringen Mengen seines 3-Hydroxyfuran-Tautomers im Gleichgewicht stehen könnte. Die Gründe für diese Annahme werden weiter unten bei der Strukturaufklärung von Sorbifuranon B (**58**) erläutert. Dagegen spricht allerdings, dass im ^{13}C -NMR-Spektrum kein doppelter Signalsatz und somit kein Hinweis auf das gleichzeitige Vorliegen zweier Diastereomere zu sehen war. Die absolute Konfiguration von **54a** wurde nicht aufgeklärt. Die in Abb. 25 dargestellte rein spekulative *S*-Konfiguration an C-5 entspricht der Konfiguration aller bisher bekannten Sorbicillinolderivate, unter anderem auch der durch CD-Berechnungen bestimmten Konfiguration von Sorbicillacton A (**47**).

Die Biogenese von Sorbifuranon A (**54a**) ist unklar. Offensichtlich handelt es sich um ein Sorbicillinderivat und in Anbetracht der Struktur liegt es nahe, dass **54a** so wie viele andere Vertreter dieser Naturstoffklasse durch Michael-Addition eines Nucleophils an C-6 des Sorbicillinols (**41a**; siehe Schema 4) gebildet wird. Im Falle von **54a** wäre dieses Nucleophil jedoch ein ungewöhnliches Furanonderivat, das weder als Naturstoff bekannt ist noch aus dem hier untersuchten Pilz isoliert werden konnte. Furanonsysteme wie in **54a** sind in Naturstoffen äußerst selten; neben der bereits erwähnten (5-Butyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)-essigsäure (**55**)^[112] sind nur noch wenige Beispiele bekannt, z.B. Spinonin (**56**)^[113] und 2-Deoxysiphonarienfuranon (**57**).^[114]

Das Metabolitenspektrum des hier untersuchten *P.-chrysogenum*-Stammes war sehr instabil, d.h. es variierte auch unter scheinbar identischen Anzuchtbedingungen beträchtlich. Insbesondere die Konzentration von Sorbifuranon A (**54a**) im Pilzextrakt war wenig reproduzierbar. Dafür konnten in einer 10-L-Kultur des Pilzes jedoch zusätzliche interessante Sorbicillin-Derivate identifiziert werden. Im HPLC-MS-Chromatogramm des Extraktes dieser Kultur traten zwei neue Substanzpeaks **58** und **59** auf, welche eine um zwei höhere bzw. die gleiche Masse wie **54a** besaßen. Nach Isolierung der Verbindungen durch präparative HPLC

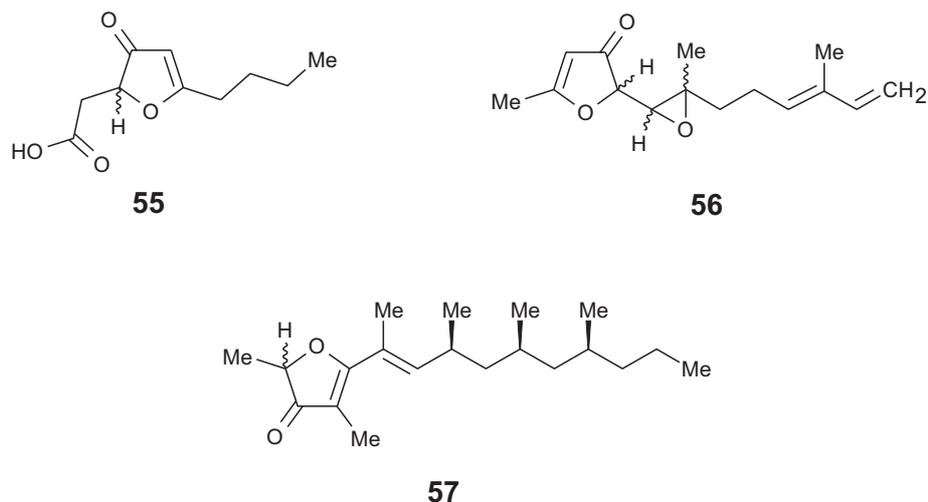


Abb. 26. Bekannte Naturstoffe mit 3-Oxo-2,3-dihydrofuran-Struktur: (5-Butyl-3-oxo-2,3-dihydrofuran-2-yl)-essigsäure (**55**), Spinonin (**56**) und 2-Deoxysiphonarienfuranon (**57**).

konnte bestätigt werden, dass es sich bei **58** und **59** ebenfalls um von Sorbicillin abgeleitete Verbindungen handelte. Die Analyse der NMR-Spektren von **58** offenbarte die gleiche Dihydrofuranon-Struktur wie bei Sorbifuranon A (**54a**). Allerdings fehlten bei den in MeOH- d_4 gemessenen Spektren die Signale von 9-H und scheinbar auch von C-9. Durch eine längere Messzeit und die daraus resultierende Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses gelang es dann schließlich doch, das C-9-Signal im Protonen-entkoppelten ^{13}C -Spektrum aufzuspüren, allerdings als sehr schwaches Triplett mit einer Kopplungskonstante von ca. 20 Hz. Diese Aufspaltung mit einer für $^1J_{\text{DC}}$ -Kopplungen typischen Konstante sprach für einen H-D-Austausch an C-9. Durch eine erneute Messung der Substanz in MeOH/MeOH- d_4 9:1 wurde diese Vermutung bestätigt; das Signal von C-9 erschien wie erwartet als scharfes Singulett bei 84.9 ppm (bei **54a**: 84.7 ppm). Die chemische Verschiebung des Protons 9-H lag mit 4.68 ppm ebenfalls im erwarteten Bereich (bei **54a**: 5.27 ppm). Dieser H-D-Austausch sprach auch dafür, dass die Konfiguration am Stereozentrum C-9 unter normalen Bedingungen nicht stabil ist. Bei **54a** wurde ein solch schneller Austausch von 9-H zwar nicht beobachtet, doch die Ähnlichkeit der Strukturen ließ die Vermutung zu, dass auch hier ein Austausch stattfinden kann, Sorbifuranon A (**54a**) also nur zwei konfiguratativ stabile Stereozentren besitzt.

Neben dem Dihydrofuranon-Strukturelement wurde bei **58** eine 2',3'-Dihydrosorbyl-Seitenkette identifiziert, wobei jedoch die chemische Verschiebung des Carbonylkohlenstoffs C-1' mit 209.5 ppm deutlich höher lag als z.B. bei Sorbifuranon A (169.1 ppm), die Carbonylfunktion bei dieser Verbindung also nicht enolisiert vorlag. An Stelle des bei Sorbicillin-Derivaten üblichen Cyclohexanonrings wurde bei **58** ein Butenolid-System identifiziert (Abb. 27). Solche Butenolid-Strukturen sind auch von verschiedenen

Bisvertinoiden bekannt, so z.B. dem Bisorbibutenolid (auch bekannt als Bislongiquinolid),^[115] das durch eine Umlagerungsreaktion aus Bisorbicillinol (**44**; Abb. 19) gebildet wird.^[116]

Über die HMBC-Wechselwirkungen des Protons 6-H konnten wegen dessen zentraler Lage im Molekül die Teilstrukturen zu der Gesamtstruktur **58** (Abb. 27) zusammengesetzt werden. Wegen der freien Rotierbarkeit der Bindung C-5 – C-6 war es bei dieser Verbindung nicht möglich, wie bei Sorbicillacton A (**47**) und Sorbifuranon A (**54a**) mit Hilfe von NOESY- oder ROESY-Wechselwirkungen eine Aussage über die relative Konfiguration dieser beiden Stereozentren zu machen. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu Sorbifuranon A wurde **58** Sorbifuranon B genannt.

Die NMR-Spektren der aus dem gleichen Kulturansatz isolierten Verbindung **59** zeigten eine große Ähnlichkeit zu **58**. Wieder wurde ein Butenolidrest gefunden mit chemischen Verschiebungen, die beinahe identisch zu dem von **58** waren. Auch ein Dihydrofuranonsystem wurde identifiziert, allerdings mit einem quartär substituierten Kohlenstoff C-9. Der Kohlenstoff C-3' im Sorbylteil des Moleküls war dreifach substituiert, während er bei Sorbifuranon B (**58**) noch eine CH₂-Gruppe war. Ein weiterer Unterschied zu **58** war die stärkere 'Aufspaltung' der diastereotopen Protonen an C-1 (2.29 und 3.07 ppm) und C-2' (2.50 und 2.77 ppm). Große Differenzen zwischen den chemischen Verschiebungen diastereotoper Protonen, die an dasselbe Kohlenstoffatom gebunden sind, sprechen oft dafür, dass diese CH₂-Gruppe Teil eines Ringsystems ist. Tatsächlich offenbarten die HMBC-Spektren eine zusätzliche Bindung, zwischen C-9 und C-3', belegt durch die Wechselwirkungen 2'-H → C-9, 3'-H → C-9 und 3'-H → C-10, so dass es sich bei **59** um ein Cyclohexanonderivat mit einem *spiro*-verknüpftem Dihydrofuranonring handelte (Abb. 27). In Fortsetzung der bisher verfolgten Nomenklatur wurde **59** Sorbifuranon C genannt.

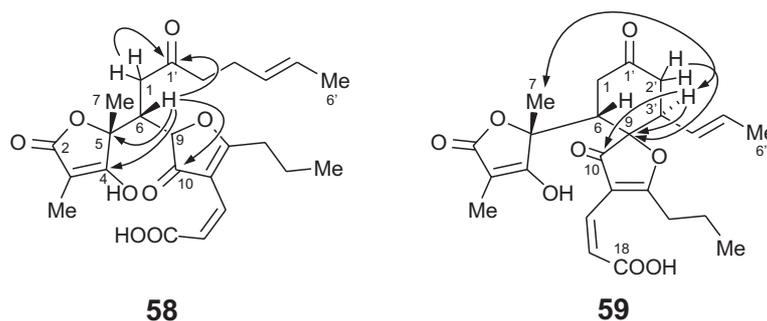
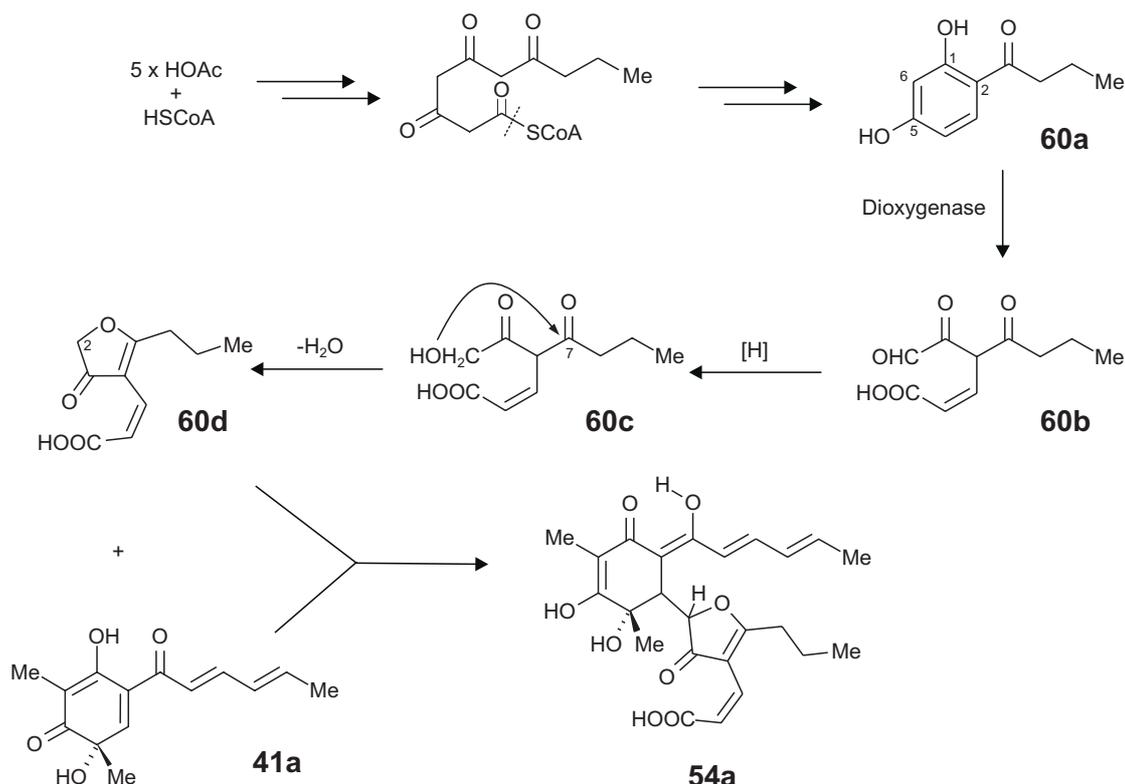


Abb. 27. Die Strukturen der neuen Sorbicillin-Derivate Sorbifuranon B (**58**) und C (**59**); die Pfeile bezeichnen für die Strukturaufklärung wichtige HMBC- und ROESY-Wechselwirkungen.

Sorbifuranon C (**59**) besitzt drei Stereozentren C-6, C-9 und C-3'. Da diese Teil desselben Sechsrings sind, bestand hier die Möglichkeit, durch ein NOESY-Experiment Informationen über die relative Konfiguration zu erhalten. Aussagekräftig war hier vor allem die

Wechselwirkung der Methylgruppe 7-H zu 3'-H, welche zeigte, dass 3'-H und 6-H in *trans*-Konfiguration zueinander stehen. Unterstützt wurde dies auch durch das Fehlen einer Wechselwirkung 3'-H \leftrightarrow 6-H, die bei einer *cis*-Konfiguration zu erwarten wäre, da wegen der zwei relativ großen Substituenten an C-6 und C-3' (der Butenolid- und ein *n*-Propenylrest) von einer axialen Anordnung dieser beiden Protonen ausgegangen werden kann. Allerdings war es wegen der großen räumlichen Entfernung aller Protonen im Dihydrofuranonteil zu den Protonen im Rest des Moleküls leider nicht möglich, an Hand der NOESY-Daten auch die Konfiguration an C-9 in Relation zu den beiden anderen Stereozentren zu setzen.

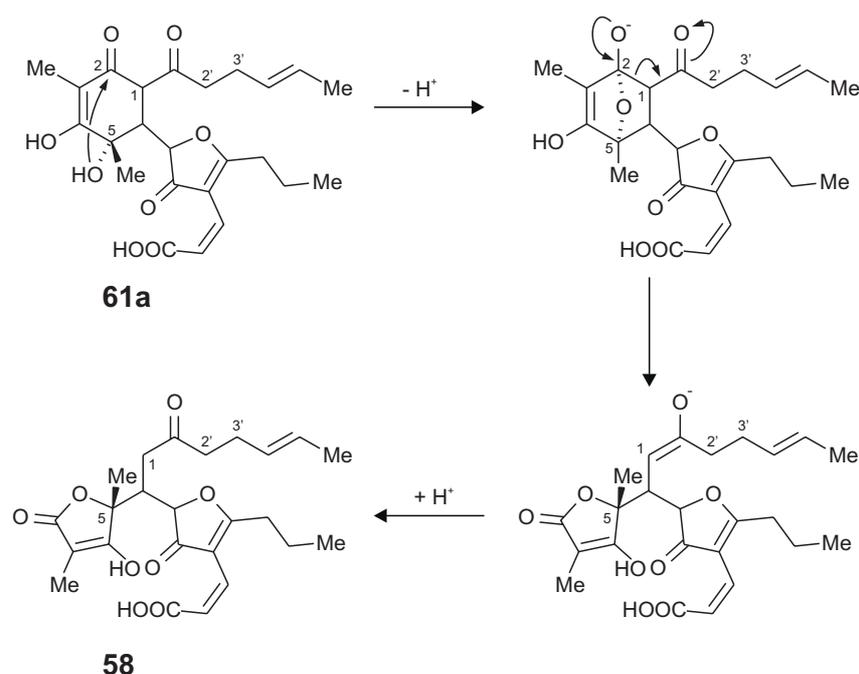
Die Dihydrofuranon-Einheit der Sorbifuranone hat ihren biosynthetischen Ursprung möglicherweise in dem (als Naturstoff unbekanntem) Pentaketid 2-Butanoyl-1,5-dihydroxybenzol (**60a**). Der aromatische Ring dieser Verbindung könnte durch eine Dioxygenase oxidativ zwischen C-5 und C-6 geöffnet werden, so dass der Aldehyd **60b** entsteht. Nach Reduktion zum Alkohol **60c** ergäbe ein nucleophiler Angriff der Hydroxylfunktion an die Ketogruppe C-7 das 2,3-Dihydrofuranon **60d**. Das Enolat von **60d** könnte schließlich aufgrund seiner nucleophilen Eigenschaften an C-2 in einer Michael-Addition mit Sorbicillinol (**41a**) zu Sorbifuranon A (**54a**) reagieren.



Schema 6. Ein möglicher Biosyntheseweg von Sorbifuranon A (**54a**).

Die Biosynthesen von Sorbifuranon B (**58**) und C (**59**) lassen sich durch zwei Arten von intramolekularen Reaktionen erklären. Wie bereits am Beispiel der Reaktion von Bisorbicillinol (**44**) zu Bisorbibutenolid erwähnt, ist die Umlagerung des Cyclohexanonringes

bei Naturstoffen mit Sorbicillinolstruktur zu einem Butenolid bereits literaturbekannt.^[116] Im vorliegenden Fall wäre die direkte biosynthetische Vorstufe von Sorbifuranon B (**58**) ein hypothetisches 2',3'-Dihydrosorbifuranon A (**61a**). Diese Umlagerung erfolgt durch den nucleophilen Angriff der 5-OH-Gruppe an die Ketofunktion in 2-Position. Anschließend wird die Bindung C-1 – C-2 gespalten und das entstehende Enolat an C-1 wieder protoniert, so dass **58** gebildet wird.

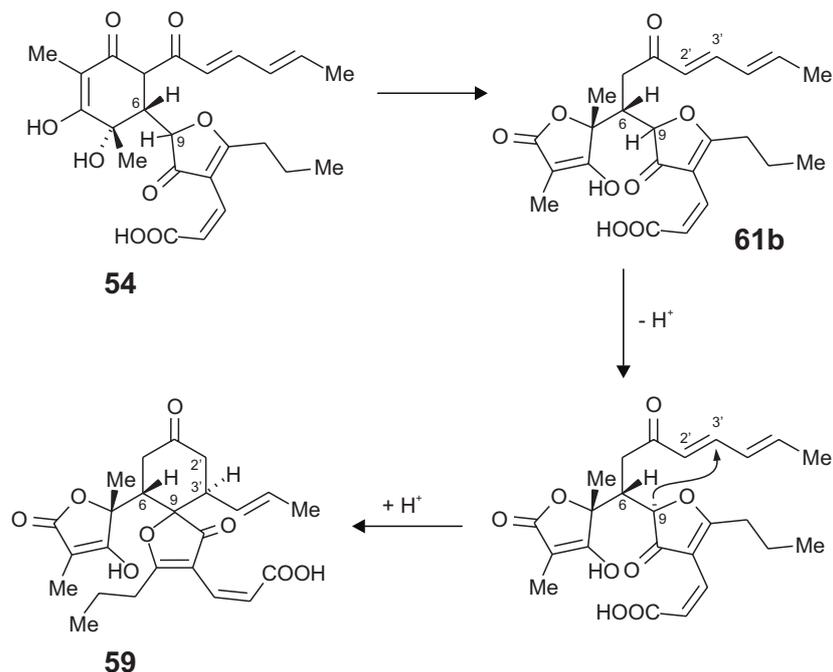


Schema 7. Umlagerung der hypothetischen Vorstufe 2',3'-Dihydrosorbifuranon A (**61a**) zu Sorbifuranon B (**58**).

Da aus dem Pilz bereits ein anderes 2',3'-Dihydrosorbicillinderivat, das 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**), isoliert wurde und solche Dihydroderivate von einigen anderen Sorbicillin-Naturstoffen bekannt sind, ist es möglich, dass auch der hypothetische Sorbifuranon-B-Vorläufer **61a** von dem untersuchten *P.-chrysogenum*-Stamm produziert wird. Der Versuch, 2',3'-Dihydrosorbifuranon A (**61a**) im Pilzextrakt neben Sorbifuranon A (**54a**) durch HPLC-MS nachzuweisen, misslang jedoch aufgrund der schlechten Ionisierbarkeit von **54a** unter Electrospray-Bedingungen.

Die Biosynthese von Sorbifuranon C (**59**) verläuft wahrscheinlich ebenfalls über Umlagerungsreaktionen. Während die biosynthetische Vorstufe von Sorbifuranon B (**58**) nicht im Pilzextrakt nachgewiesen werden konnte, ist der Startpunkt einer möglichen Biogenese von **59** das bereits isolierte und charakterisierte Sorbifuranon A (**54a**). Analog zu der in Schema 7 gezeigten Reaktion kann aus **54a** das 2',3'-Dehydrosorbifuranon B (**61b**) entstehen. Durch die zusätzliche Doppelbindung in der Seitenkette ist diese Verbindung jedoch instabiler als Sorbifuranon B (**58**) selbst, so dass nach Deprotonierung C-9 im Sinne

einer intramolekularen Michael-Addition an C-3' angreift und damit das Cyclohexanonsystem des Sorbifuranon C (**59**) bildet.



Schema 8. Umlagerung von Sorbifuranon A (**54a**) zu Sorbifuranon C (**59**) über eine postulierte Zwischenstufe 2',3'-Dehydrosorbifuranon B (**61b**).

Ob es sich bei Sorbifuranon B (**58**) und C (**59**) um Produkte von enzymatischen Reaktionen, nicht-enzymatischen Reaktionen im Pilz oder gar um Artefakte der Isolierung handelt, ist unklar.

Der Mechanismus der ersten Umlagerung, welche zur Bildung des Butenolidsystems führt, spricht dafür, dass die Konfiguration an C-5 erhalten bleibt. Bei der intramolekularen Michael-Addition jedoch lässt sich nicht ohne Weiteres vorhersagen, welche Konfiguration das bei dieser Reaktion gebildete *spiro*-Zentrum besitzt, da der Dihydrofuranonring vor der Reaktion frei um die Achse C-6 – C-9 drehbar ist. Alle hier in den Abbildungen und Reaktionsschemata für die Sorbifuranone gezeigten absoluten Konfigurationen wurden nicht experimentell bestimmt. Da die bekannten Sorbicillinolderivate, einschließlich des weiter oben beschriebenen Sorbicillactons A (**47**), *S*-Konfiguration an C-5 besitzen, wurden die Sorbifuranone auch mit dieser Konfiguration abgebildet.

Sorbifuranon B (**58**) wirkt schwach cytostatisch gegen L1578y-Zellen (13 % Hemmung bei 10 $\mu\text{g/mL}$), bei Sorbifuranon C (**59**) wurde keine Aktivität beobachtet.

2.7.1.4 Eine Sorbicillinol-abgeleitete Substanz (62a)

Unter den aus dem Pilzextrakt isolierten Substanzen besaß Verbindung **62a** mit $[M+H]^+$ 321 die kleinste Molekülmasse. Die NMR-Spektren zeigten wie schon bei Sorbicillacton A (**47**) und Sorbifuranon A (**54a**) einen Sorbylrest in seiner Enolform. Auch das bekannte Sorbicillinol-Grundgerüst wurde bei dieser Verbindung identifiziert. Auffällig war das stark tieffeldverschobene Signal von C-4 (210.4 ppm), welches deutlich machte, dass diese Carbonylfunktion hier nicht als Enol wie bei Sorbicillacton A (**47**) vorlag. Zusätzlich zu den 14 Kohlenstoffatomen des Sorbicillinolgerüsts enthielt das ^{13}C -NMR-Spektrum noch die Signale von vier weiteren Kohlenstoffen: einer Methylgruppe C-12 (15.4 ppm), zwei Methylenkohlenstoffen C-9 und C-11 (31.8 und 66.3 ppm) und einem Methinkohlenstoff C-10 (79.9 ppm). Mehrere HMBC-Wechselwirkungen (Abb. 28) belegten eine von C-9 und C-10 gebildete C_2 -Brücke von C-6 zu C-3 des Sorbicillinolringes, so dass ein [2.2.2]-Bicyclus vorlag. Die Ausrichtung dieser C_2 -Brücke, also die Frage welcher Brückenkohlenstoff an C-6 und welcher an C-3 gebunden ist, war durch die HMBC-Wechselwirkungen $10\text{-H} \rightarrow \text{C-2}$ und $10\text{-H} \rightarrow \text{C-4}$ sowie durch $9\text{-H} \rightarrow \text{C-1}$ und $9\text{-H} \rightarrow \text{C-5}$ eindeutig festgelegt. Die restlichen zwei Kohlenstoffatome C-11 und C-12 gehörten offensichtlich zu einer *O*-Ethylgruppe. Die HMBC-Korrelationen $10\text{-H} \rightarrow \text{C-11}$ und $11\text{-H} \rightarrow \text{C-10}$ zeigten, dass diese an C-10, also eines der Brückenkohlenstoffatome, gebunden war. Damit ergab sich für **62a** die in Abb. 28 dargestellte Konstitution. Aus Mangel an aussagekräftigen ROESY-Wechselwirkungen konnte die relative Konfiguration von **62a** nicht bestimmt werden, doch es fiel auf, dass im ^{13}C -NMR-Spektrum von **62a** kein doppelter Signalsatz zu sehen war, so dass wahrscheinlich kein Diastereomeregemisch vorlag.

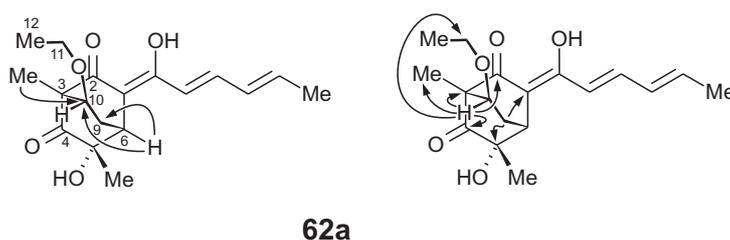
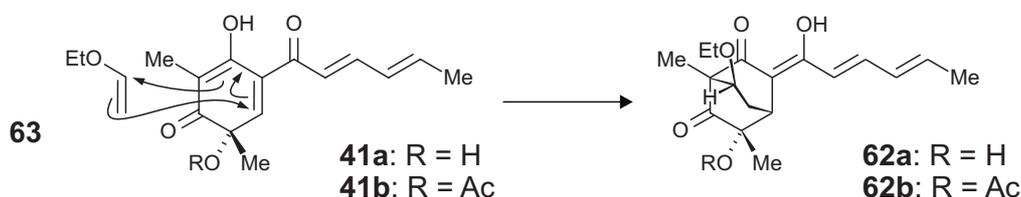


Abb. 28. Konstitution des Sorbicillinolderivates **62a** mit für die Strukturaufklärung wichtigen HMBC-Wechselwirkungen (relative und absolute Konfiguration sind willkürlich gewählt).

Obwohl Ethanol häufig in der Natur vorkommt und bekanntermaßen auch von vielen Mikroorganismen produziert wird, stellen Ethylester und vor allem -ether unter den Naturstoffen eine Rarität dar, eines der wenigen Beispiele für Pilzmetaboliten mit Ethylether-Funktion ist ein Juglon-Derivat aus dem Pilz *Guignardia laricina*.^[117] Verständlicherweise weckt ein solches Strukturelement in einem Naturstoff immer den Verdacht, es könnte sich

um ein Artefakt handeln, welches erst während der Extraktion oder Isolierung der Substanz entstanden ist. Deshalb wurde 1,2- ^{13}C -markiertes Acetat an den Pilz verfüttert,^[27] wovon ein Einblick in die Biogenese von **62a**, insbesondere der C_2 -Brücke und der ungewöhnlichen Ethylethergruppe, erhofft wurde. Leider war im Kulturansatz mit markiertem Acetat die Bildung der von Sorbicillin abgeleiteten Naturstoffe fast vollständig unterdrückt. Allerdings konnte noch genug **62a** für eine ^{13}C -NMR-Messung isoliert werden. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß ein Einbau von Acetat in das Sorbicillin-Gerüst (bis auf die Methylgruppen am Ring, die aus dem C_1 -Pool stammen), doch sowohl die C_2 -Brücke als auch der Ethylrest waren nicht markiert. Dieses Ergebnis sprach für eine 'unnatürliche' Entstehung von **62a**. Eine Hypothese ist die Bildung von **62a** aus Sorbicillinol (**41a**) und Ethylvinylether (**63**) durch eine Diels-Alder-Reaktion. Sorbicillinol, welches vermutlich durch Oxidation aus Sorbicillin (**40**) gebildet wird^[92] (siehe Schema 4), ist mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Zwischenstufe bei der Biosynthese von Sorbicillacton A (**47**) und Sorbifuranon A (**54a**) und muss deshalb in kleinen Konzentrationen auch im Pilz vorliegen. Ethylvinylether wird als Monomer bei der Herstellung verschiedener Kunststoffe eingesetzt, und könnte entweder als Verunreinigung des zum Abtöten der Pilzkultur verwendeten Ethylacetats in den Kulturansatz gelangt sein, oder es wurde durch das Lösungsmittel aus Kunststoffgefäßen herausgelöst. [4+2]-Cycloadditionen mit Ethylvinylether als Dienophil sind bekannt,^[118] und auch Sorbicillinol geht bereitwillig Diels-Alder-Reaktionen ein, sowohl als Dien- als auch als Dienophilkomponente, z.B. bei der Biosynthese von Bisorbicillinol (**44**).^[95]

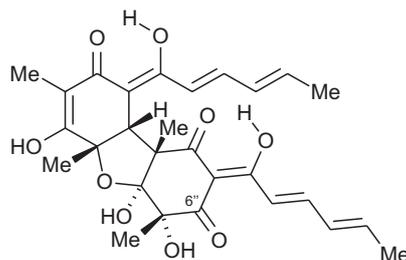


Schema 9. Mögliche Bildung eines Sorbicillinol-Ethylvinylether-Adduktes (**62a**) und dessen *O*-Acetyl-Derivat **62b** durch Diels-Alder-Reaktion von Ethylvinylether (**63**) mit Sorbicillinol (**41a**) bzw. *O*-Acetylsorbicillinol (**41b**).

Die Hypothese der Artefaktbildung ließ sich in der Tat experimentell untermauern. Synthetisches Sorbicillinol-Acetat (**41b**) reagierte nach Zugabe von Ethylvinylether spontan zu **62b** (*O*-acetyliertem **62a**) als einzigem Produkt. Da im ^{13}C -NMR-Spektrum ein einfacher Signalsatz vorhanden war, kann davon ausgegangen werden, dass auch hier nur ein Diastereomer (und dessen Enantiomer) vorlag. Die Ähnlichkeit der chemischen Verschiebungen mit denen von **62a** spricht dafür, dass das acetylierte Produkt **62b** die gleiche relative Konfiguration besitzt. Auch wurden keine relevante zusätzliche NOESY-Wechselwirkungen beobachtet.

2.7.1.5 Bisvertinolon (64)

Im HPLC-MS-Chromatogramm wurde neben den bisher erwähnten Sorbicillin-Naturstoffen noch eine Substanz **64** mit einem Pseudomolekularion $[M+H]^+$ 513 detektiert. Diese Molekülmasse liegt im Bereich der dimeren Sorbicillin-Derivate. Durch Datenbanksuche wurde ein bekanntes Bisvertinoid mit dieser Masse gefunden, das Bisvertinolon.^[96] Die spektroskopischen Daten der isolierten Verbindung zeigten, dass es sich bei **64** tatsächlich um diesen bekannten Naturstoff handelte.



64

Abb. 29. Struktur des bekannten Bisvertinoids Bisvertinolon (**64**).

Bisvertinolon (**64**) entsteht durch Oxidation in 6''-Position aus einem Zwischenprodukt, das durch Michael-Addition und Halbacetalbildung aus zwei Sorbicillinolmolekülen (**41a**; Schema 4) gebildet wird. Möglicherweise findet die Oxidation auch vor der Dimerisierung statt, so dass Oxosorbicillinol (**42**; Schema 4) als Nucleophil mit Sorbicillinol (**41a**) zu Bisvertinolon reagiert. Das verwandte Bisvertinol (**45**; Abb. 19) besitzt in 6''-Position eine CH_2 -Gruppe.

Eine interessante biologische Aktivität von Bisvertinolon ist seine Fähigkeit, die β -(1,6)-Glucan-Biosynthese in Pilzen zu inhibieren, wodurch es eine interessante Leitstruktur für Fungizide darstellt.^[98]

2.7.2 Identifizierung der Alkaloide Meleagrinen (38) und Roquefortin C (18)

Die Hauptkomponente im Extrakt des untersuchten *Penicillium chrysogenum* war kein von Sorbicillin abgeleiteter Naturstoff, sondern ein Alkaloid. Die spektroskopischen Daten der Verbindung mit der Masse 433 belegten, dass es sich hier um den bereits erwähnten aus *P. chrysogenum* bekannten Naturstoff Meleagrinen (**38**) handelte. Durch HPLC-MS und HPLC-NMR konnte als Minderkomponente auch das verwandte Roquefortin C (**18**) identifiziert werden, das im Rahmen dieser Arbeit bereits im Pilzstamm E00-24/29 (isoliert aus *Spongia officinalis*) gefunden worden war (siehe 2.4).

Sowohl Meleagrín (**38**) als auch Roquefortin C (**18**) sind in *P.-chrysogenum*-Stämmen weit verbreitet und zeigen, dass es sich bei dem untersuchten Stamm um den Chemotyp *P. chrysogenum* var. *chrysogenum* handelt.^[119] Diese Alkaloide sind biosynthetisch von den Aminosäuren Tryptophan und Histidin und einer Prenyleinheit abgeleitet. Sie gehören zur Klasse der tremorgenen Alkaloide, so genannt wegen ihrer neurotoxischen Eigenschaften, die bei oraler Aufnahme zu Zittern und Muskelkrämpfen führen. Solche Vergiftungen (meist durch Roquefortin C) kommen vor allem bei Haustieren vor.^[120]

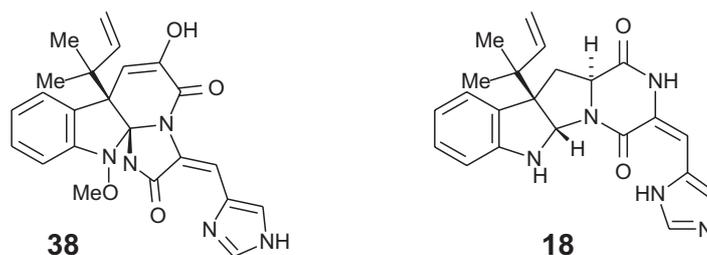


Abb. 30. Die tremorgenen Alkaloide Meleagrín (**38**) und Roquefortin C (**18**) aus *P. chrysogenum* E01-10/3.

2.7.3 Zeitverlauf und Salzabhängigkeit der Metabolitenkonzentration in E01-10/3-Kulturen

In Kooperation mit S. Steffens^[27] vom Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven wurden Experimente zum Einfluss der Salinität des Kulturmediums auf den Sekundärstoffwechsel von *P. chrysogenum* E01-10/3 durchgeführt. Die für die Isolierung der oben beschriebenen Naturstoffe verwendeten Pilzkulturen wuchsen in Wickerham-Seewasser-Medium^[28] mit einer Salinität von 30 PSU [entspricht 30 g Gesamtsalzgehalt pro kg Lösung (Mittelmeerwasser: 33-36 PSU)]. Unter den gleichen Bedingungen, d.h. als Standkultur in 300 mL Flüssigmedium, wurde der Pilz auch in Medien mit niedrigeren Salinitäten (0, 10 und 20 PSU) angezogen. Anschließend wurden die Kulturen mit Ethylacetat extrahiert, mit einem internen Standard versetzt und mittels HPLC-UV untersucht. Dabei zeigte sich, dass Bisvertinolon (**64**) und das Sorbicillinol-Ethylvinylether-Addukt (**62a**) bevorzugt im salzfreien Medium produziert wurden, während bei Sorbicillacton A (**47**) und Sorbifuranon A (**54a**) eine leichte Tendenz zu höheren Konzentrationen bei höherer Salinität zu beobachten war. Die Konzentration an Meleagrín (**38**) wurde von der Salinität kaum beeinflusst.

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss allerdings beachtet werden, dass es sich hier um nur vier Einzelmessungen handelt; der beobachtete Effekt könnte auch auf 'normale' Schwankungen der Metabolitenproduktion zurückzuführen sein. Dass die Salinität einen Einfluss auf die von marinen Pilzen gebildeten Naturstoffe hat, ist bekannt. So wird z.B.

Trichoharzin von einem marinen *Trichoderma*-Stamm nur in salzhaltigem Medium gebildet.^[121]

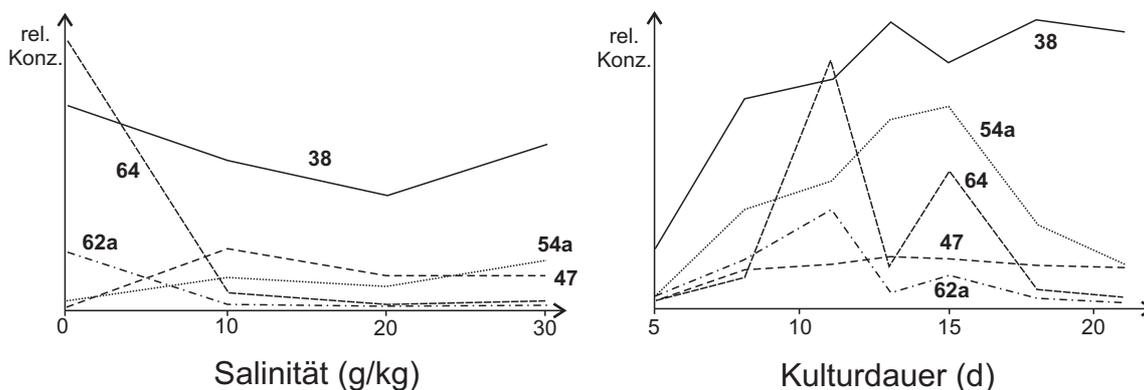


Abb. 31. Abhängigkeit der Produktion an Sorbicillacton A (**47**), Sorbifuranon A (**54a**), an Sorbicillinol-Ethylvinylether-Addukt **62a**, Bisvertinolon (**64**) und Meleagrinen (**38**) vom Salzgehalt des Mediums und von der Kulturdauer; die relativen Konzentrationen wurden aus den Peakflächen in der HPLC berechnet und sind zwischen den verschiedenen Substanzen nicht vergleichbar.

Auf die gleiche Weise wurde auch der zeitliche Verlauf der Metabolitenkonzentrationen untersucht. Sieben Pilzkulturen (in WS-Medium mit einer Salinität von 30 PSU) wurden nach unterschiedlichen Anzuchtzeiten von 5 bis 20 Tagen geerntet, extrahiert und analysiert. Das Ergebnis war ein Konzentrationsmaximum von Sorbifuranon A (**54a**), Sorbicillinol-Ethylvinylether-Addukt (**62a**) und Bisvertinolon (**64**) nach ca. 14 Tagen, danach nahm die Konzentration dieser Verbindungen wieder ab, während Sorbicillacton A (**47**) auf gleichem Niveau blieb und die Meleagrinkonzentration (**38**) weiterhin zunahm. Dies bedeutet, dass die Verbindungen **54a**, **62a** und **64** vom Pilz nur in einer frühen Wachstumsphase gebildet und danach entweder wieder aktiv abgebaut werden oder sich aufgrund ihrer Instabilität zersetzen.

2.8 Naturstoffe aus *Penicillium*-Stamm E00-2/7

2.8.1 Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen

Die Extrakte der aus dem Schwamm *Petrosia ficiformis* isolierten Pilzstämme E00-2/7 und E00-2/6c, die beide als *Penicillium*-Arten identifiziert wurden, zeigten im *Artemia-salina*-Testsystem eine moderate Toxizität und wirkten schwach antibiotisch gegen verschiedene Mikroorganismen. Im HPLC-Screening waren die Chromatogramme der beiden Pilze weitgehend identisch, es konnte also davon ausgegangen werden, dass es sich um dieselbe Art handelte.

Die biologische Aktivität der Extrakte sowie die an den Chromatogrammen erkennbare große Diversität an Sekundärmetaboliten rechtfertigte eine ausführlichere Untersuchung dieser Pilze. Zur Strukturaufklärung wurden die Inhaltstoffe aus einer 10-L-Flüssigkultur von E00-2/7 mittels präparativer HPLC isoliert.

2.8.2 Hamigeron und neue Hamigeron-Derivate

Die NMR-Spektren von drei der isolierten Substanzen waren untereinander sehr ähnlich. Nach Auswertung aller spektroskopischen Daten stellte sich heraus, dass es sich bei einer der Verbindungen um den bekannten Pilzmetaboliten Hamigeron (**65**)^[122] und zwei Derivate davon handelte.

Das erste dieser Hamigeron-Derivate wurde als die Diol-Verbindung Hamigeronhydrat (**66**) identifiziert, die durch hydrolytische Öffnung des Oxiranringes aus **65** hervorgeht. Im Gegensatz zu Tajixanthonhydrat (**33**, Schema 2), das während der Isolierung von Tajixanthon als Artefakt gebildet wurde, handelte es sich bei Hamigeronhydrat mit großer Wahrscheinlichkeit um ein originäres Produkt des Pilzes, da diese Verbindung direkt nach der Extraktion durch HPLC nachgewiesen werden konnte. Die NMR-Spektren von Hamigeron (**65**) und Hamigeronhydrat (**66**) unterschieden sich nur marginal. Ein eindeutiger Hinweis auf die Epoxidfunktion in **65** war die mit 175 Hz relativ hohe ¹J_{CH}-Kopplungskonstante zwischen C-20 und 20-H,^[122] bei **66** lag der Wert dieser Konstante hingegen bei 143 Hz. Das zweite isolierte Hamigeronderivat, das ebenfalls neue Hamigerin (**67**), trägt im Gegensatz zu **65** und **66** keine Sauerstofffunktion an C-20 und C-21, sondern besitzt an dieser Stelle eine Doppelbindung. Stattdessen befindet sich eine Hydroxylgruppe an C-23. Im ¹H-NMR-Spektrum von **67** sind deutlich die zwei diastereotopen Protonen an C-24 zu erkennen.

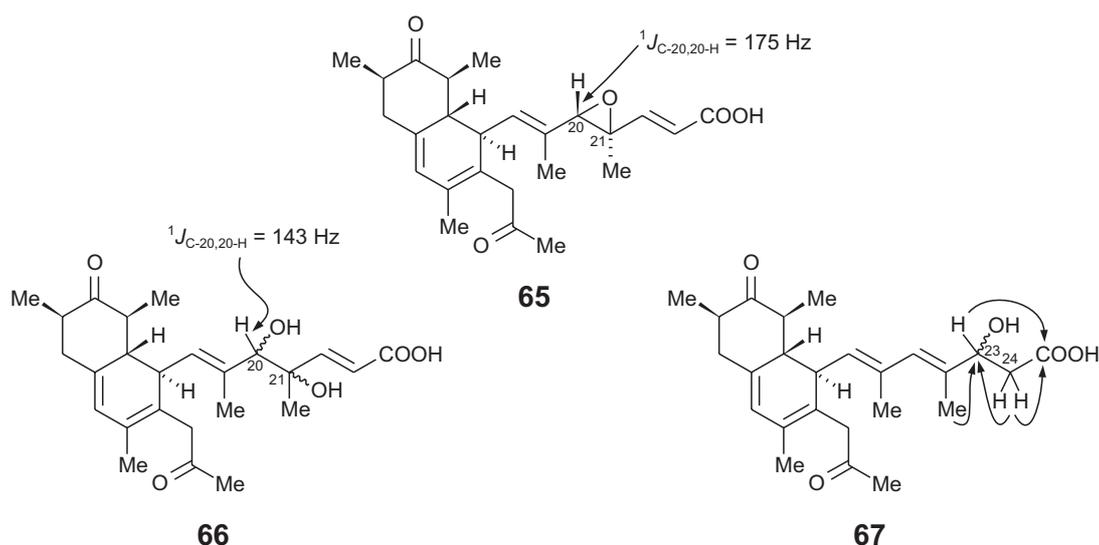


Abb. 32. Hamigeron (**65**) sowie die neuen Hamigeron-Derivate Hamigeronhydrat (**66**) und Hamigerin (**67**) mit für die Strukturaufklärung wichtigen Kopplungskonstanten und HMBC-Wechselwirkungen.

Der acetogenine Naturstoff Hamigeron (**65**) wurde ursprünglich aus *Hamigera avellanea* isoliert. Er zeichnet sich durch eine ausgeprägte fungizide Aktivität aus.^[122] Der Biosynthesevorläufer von **65** ist vermutlich das aus einer *Curvularia*-Art bekannte TAN-2342 (**68**). Aus dieser Trien-Verbindung, die wegen ihrer Tubulinpolymerisations-hemmenden Eigenschaft patentiert wurde,^[123] könnte **65** durch Epoxidierung der mittleren Doppelbindung in der Seitenkette hervorgehen. Die biosynthetische Beziehung zwischen Hamigerin (**67**) und TAN-2342 (**68**) ist unklar: entweder entsteht **67** durch Addition von Wasser an die Doppelbindung C-23 – C-24 von **68**, oder aber es handelt sich bei **67** um eine Biosynthesevorstufe von **68**, bei welcher die Eliminierung von Wasser an dieser Position nicht stattgefunden hat.

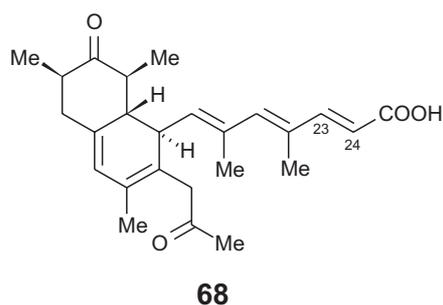


Abb. 33. Der Tubulinpolymerisation-Hemmer TAN-2342 (**68**).

Die Konfigurationen der Stereozentren von Hamigeron (**65**) und TAN-2342 (**68**) sind nicht vollständig bekannt. In der Literatur wurden mit Hilfe von J_{HH} -Kopplungskonstanten und NOESY-Experimenten nur die relativen Konfigurationen der Stereozentren am bicyclischen System und am Oxiranring von Hamigeron bestimmt, nicht die relative Konfiguration des Gesamtmoleküls (diese und die absolute Konfiguration sind in Abb. 32 und Abb. 33

willkürlich gewählt).^[122] Über die Konfigurationen der in den neuen Verbindungen **66** und **67** neu auftretenden Stereozentren konnte mit NMR-Methoden keine Aussage getroffen werden.

2.8.3 Identifizierung von Citreohybridonol (**69**)

Die Hauptkomponente des Extraktes zeigte in der HPLC-MS ein Pseudomolekularion bei m/z 501 $[M+H]^+$, darüber hinaus konnte ein austauschendes Proton nachgewiesen werden. Nach Isolierung der Verbindung wurden Teilstrukturen durch NMR-Experimente aufgeklärt, wobei die HMBC-Wechselwirkungen der insgesamt acht Methylgruppen besonders hilfreich waren. Erschwert wurde die Strukturaufklärung durch die wegen des Tautomerengleichgewichts im ^{13}C -Spektrum nicht sichtbaren Signale von C-15 und C-17. Wegen des ungünstigen Diederwinkels war auch keine H,H-Kopplung zwischen 5-H und 6-H zu erkennen.

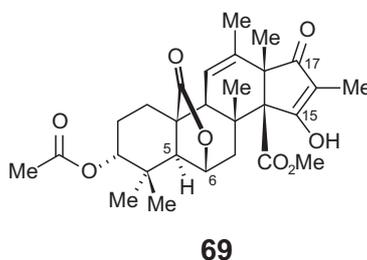


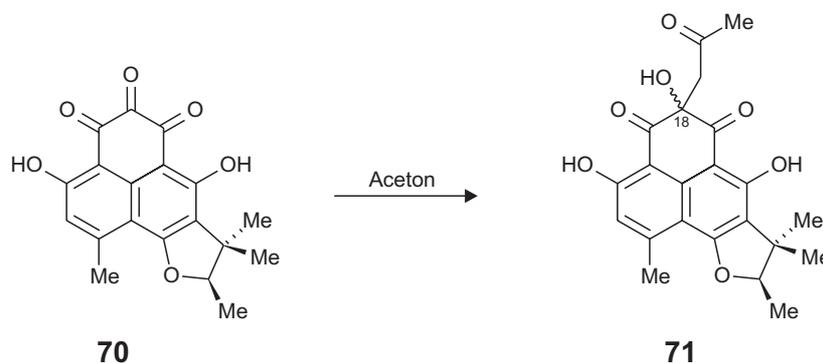
Abb. 34. Struktur von Citreohybridonol (**69**).

Eine Datenbanksuche mit den identifizierten Teilstrukturen ergab, dass es sich um Citreohybridonol (**69**) handelte. Diese Verbindung war bereits aus einem Hybridstamm bekannt, der durch Zellfusion aus zwei *P. citreo-viride*-Stämmen erhalten worden war. Fütterungsexperimente mit 1,2- ^{13}C -markiertem Acetat in Verbindung mit INADEQUATE-Messungen hatten gezeigt, dass Citreohybridonol in einer gemischten Biosynthese aus einer Sesquiterpen-Einheit und einem Polyketidteil gebildet wird.^[124] Neben Citreohybridonol sind aus demselben Hybridstamm auch die verwandten Citreohybridone bekannt, die an C-15 eine Methoxygruppe oder eine Acetatgruppe tragen und bei denen es sich möglicherweise um Artefakte handelt. Die Citreohybridone wirken cytotoxisch gegen HeLa-Zellen sowie insektizid und fraßhemmend gegen die Kohlmotte (*Plutella xylostella*). Die relative Konfiguration dieser Verbindungen war durch eine Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt worden.^[125]

2.8.4 Identifizierung eines Atrovetinon-Aceton-Addukts (**71**)

Eine weitere aus dem Pilzextrakt isolierte Verbindung, mit einer Molekülmasse von 398, wurde nach Auswertung der NMR-Daten und einer Suche nach den gefundenen Teilstrukturen in Datenbanken als das schon bekannte Artefakt **71** identifiziert. Dieses

Phenalenonderivat entsteht durch die Reaktion von Aceton mit dem hochreaktiven Triketon Atrovenetinon (**70**).^[126]



Schema 10. Die Reaktion des Naturstoffes Atrovenetinon (**70**) mit Aceton zum Artefakt **71**

Bei der Isolierung der Substanz wurde kein Aceton verwendet. Somit ist unklar, ob **71** durch Verunreinigungen der benutzten Lösungsmittel oder doch im lebenden Pilz durch 'biogenes' Aceton entstanden ist, welches im Stoffwechsel beispielsweise durch Decarboxylierung von Acetoacetat gebildet werden kann. Die Tatsache, dass die ¹³C-Signale der Kohlenstoffatome in der Nähe von C-18, der Anknüpfungsstelle des Acetons, aufgespalten sind, also mindestens zwei Stereoisomere vorliegen, spricht zumindest für einen nicht-enzymatischen Ursprung der Verbindung. Eine Möglichkeit, den Ursprung dieser Verbindung aufzuklären, wäre die Verfütterung von 1,2-¹³C₂-Acetat an den Pilz. Falls sich eine Markierung im "Aceton-Teil" des Moleküls fände, könnte über das Markierungsmuster sogar geklärt werden, ob freies Aceton eingebaut wurde oder zuerst Acetoacetat, welches daraufhin decarboxyliert wurde.

Da in der Literatur kein Drehwert und keine CD-Daten der Verbindung angegeben sind, war es nicht möglich, ihre absolute Konfiguration zu bestimmen. Interessanterweise ist neben Atrovenetinon (**70**)^[126] auch dessen Enantiomer als Naturstoff bekannt.^[127]

2.8.5 Identifizierung von Cladosporin (**72**)

Aus demselben Pilzextrakt wurde auch der bekannte Naturstoff Cladosporin (**72**) isoliert. In Übereinstimmung mit der hier abgebildeten Struktur besaß die Verbindung eine durch HPLC-MS ermittelte Molekülmasse von 292. Die NMR-Daten stimmten ebenfalls gut mit publizierten Daten überein.^[128]

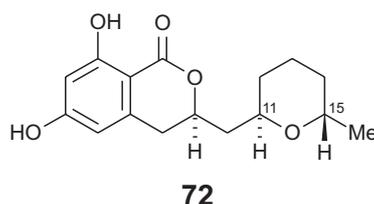


Abb. 35. Struktur von Cladosporin (**72**).

Cladosporin ist ein antibiotisch und phytotoxisch wirksamer Pilzmetabolit acetogeninen Ursprungs. Isoliert wurde er bisher aus *Cladosporium cladosporioides*^[128] und mehreren *Aspergillus*-Arten.^[129] Seine relative Konfiguration war durch eine Röntgenstrukturanalyse bestimmt worden,^[129] die absolute Konfiguration durch Vergleich des CD-Spektrums mit dem einer strukturell ähnlichen Verbindung.^[130]

2.9 Weitere bekannte Metaboliten der marinen Pilzisolat

2.9.1 Nafuredin (73) aus E00-5/5

Ein aus dem Schwamm *Oscarella lobularis* isolierter Pilz produzierte einen einzigen Hauptmetaboliten, welcher nach HPLC-MS eine Molekülmasse von 360 und ein austauschbares Proton besaß. Die mittels präparativer HPLC isolierte Substanz wurde eingehend durch NMR-Experimente untersucht.

Von den 22 ¹³C-NMR-Signalen ließen sich 16 Resonanzen eindeutig einer dreifach C-methylierten C₁₃-Kette mit zwei Dien-Strukturen zuordnen. Die Zuordnung der restlichen sechs Kohlenstoffatome gestaltete sich schwieriger. Zu erkennen war jedoch eine Methylgruppe, ein Ester- oder Säureamidkohlenstoff und drei Protonen, die untereinander nur sehr schwache H-H-Kopplungen zeigten. Zusammen mit den NMR-Daten (Anzahl der Kohlenstoffatome und Integrationen im ¹H-Spektrum) und dem aufgeklärten Strukturfragment ließ die Masse von 360 nur eine sinnvolle Summenformel zu, nämlich C₂₂H₃₂O₄, wobei ein Proton gegen Deuterium austauschbar war.

Eine Strukturvariante, die dieser Summenformel gerecht wird, ist ein Hexanolacton, bei dem in 5-Position die C₁₃-Kette und an C-4 die Methylgruppe angebracht sind und die restlichen Positionen mit einer Hydroxy- und einer Epoxidfunktion substituiert sind. Eine Suche nach den beiden möglichen Strukturen (2-OH und 4-OH) in der CAS-Datenbank ('SciFinder Scholar')^[36] ergab eine Substanz mit der Bezeichnung Nafuredin (73), deren publizierte spektroskopischen Daten gut mit denen der hier untersuchten Verbindung übereinstimmen.^[187]

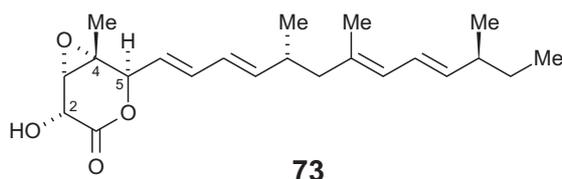


Abb. 36. Nafuredin (73), ein anthelminthischer Wirkstoff aus einem Schwamm-assozierten Pilz.

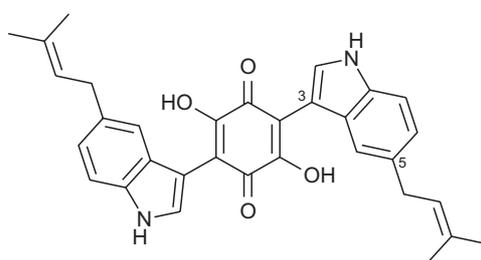
Diese Verbindung ist schon aus einem *Aspergillus-niger*-Stamm bekannt, der auch aus einem Schwamm isoliert worden war. Die absolute Konfiguration des Naturstoffs war durch

ozonolytischen Abbau der Substanz und Vergleich der Fragmente mit stereoselektiv synthetisierten Referenzsubstanzen ermittelt worden.^[131] Inzwischen wurde die Struktur auch durch eine Totalsynthese bestätigt.^[132]

Besonders interessant sind die biologischen Aktivitäten von Nafuredin.^[133] Neben einer gewissen antifungischen Wirkung gegen *Candida albicans* und *Mucor racemosus* zeichnet sich die Verbindung vor allem durch ihre starke anthelminthische Aktivität aus, d.h. sie wirkt gegen parasitäre Würmer. Die Wirksamkeit gegen verschiedene Eingeweidewürmer bei gleichzeitig sehr geringer Toxizität gegen den Wirtsorganismus wurde durch *in-vivo*-Studien an Schafen und Mäusen bestätigt. Ursache für diese biologische Aktivität ist eine spezifische Inhibition der helminthischen mitochondrialen NADH-Fumaratreduktase.^[133]

2.9.2 Cochliodinol aus E00-2/1

Der Extrakt des Pilzstammes E00-2/1, der im Hemmhofstest eine Aktivität gegen *S. aureus* gezeigt hatte, enthielt als Hauptmetabolit eine Verbindung mit einer Molekülmasse von 506. Nach Aufreinigung der Verbindung durch präparative HPLC erhielt man eine rotbraune Substanz. Die im Verhältnis zur Molekülmasse signalarmen ¹H- und ¹³C-NMR-Spektren legten eine symmetrische Struktur nahe. Es konnte ein Indolsystem identifiziert werden, das in 5-Position durch einen Prenylrest substituiert war. Ein weiterer Rest an C-3 des Indolsystems konnte durch die NMR-Spektren nicht identifiziert werden. Eine Datenbankrecherche mit der gefundenen Teilstruktur und Molekülmasse führte zum Cochliodinol (**74**), dessen spektroskopischen Daten auch gut mit denen der hier isolierten Substanz übereinstimmten. Dieses Bis(indolyl)chinon war 1975 aus einer *Chaetomium* sp. isoliert worden. Es besitzt antibiotische Aktivität, unter anderem gegen humanpathogene *Pseudomonas*-Stämme.^[134]



74

Abb. 37. Das prenylierte Bis(indolyl)chinon Cochliodinol (**74**).

2.10 Synthese von racemischem und enantiomerenreinem Xestodecalacton A (75)

2.10.1 Hintergrund

Die Xestodecalactone A-C (75-77) sind Metaboliten eines *Penicillium cf. montanense*, der aus dem Schwamm *Xestospongia exigua* isoliert wurde. Diese Verbindungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Proksch (Uni Düsseldorf) isoliert und zeichnen sich durch ein Decalactonsystem mit einem annellierten 1,3-Dihydroxybenzolring aus. Durch die gekoppelten HPLC-Methoden HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD wurden neben dem einfachsten Vertreter dieser Strukturklasse, dem Xestodecalacton A (75), noch zwei an C-9 hydroxylierte Derivate gefunden. Bei diesen Derivaten, den Xestodecalactonen B (76) und C (77), handelt es sich um Diastereomere, die sich wahrscheinlich in der Konfiguration an C-9 unterscheiden.

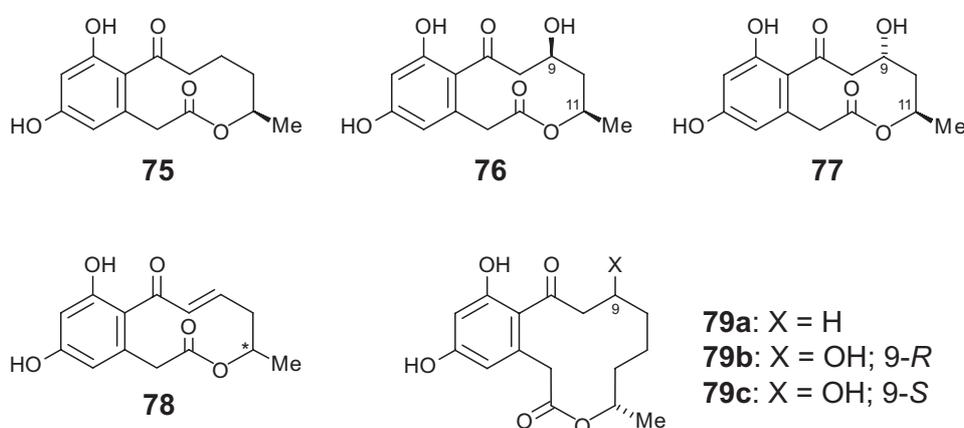


Abb. 38. Benzannellierte makrocyclische Lactone: die Xestodecalactone A-C (75-77), Sporostatin (78) und die Curvularine (79a-c).

Ein in HPLC-Kopplung aufgenommenes ROESY-Spektrum mit WET-Lösungsmittelunterdrückung zeigte, dass bei Xestodecalacton B (76) die OH-Gruppe an C-9 und die Methylgruppe an C-11 *cis*-ständig sind, während Xestodecalacton C (77) *trans*-Konfiguration besitzt. Der Versuch, durch computerchemische Berechnung von CD-Spektren auch die absoluten Konfigurationen dieser Naturstoffe zu ermitteln, misslang, da das Decalacton-System sich als sehr flexibel erwies und energetisch sehr ähnliche Konformationen einnehmen kann, die jedoch fast spiegelbildliche CD-Spektren besitzen. Als einzige der drei Verbindungen wirkt Xestodecalacton B (76) antifungisch gegen *C. albicans*.^[135]

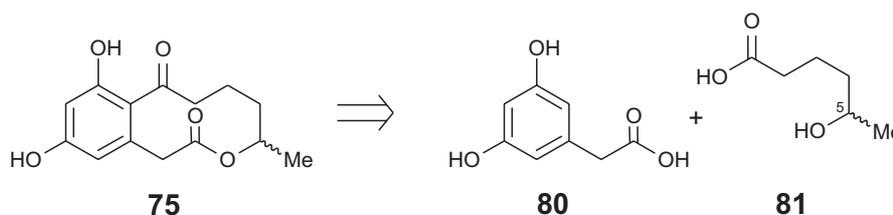
Die Xestodecalactone sind strukturell verwandt mit einer Reihe bekannter Pilzmetabolite. Sporostatin (78) unterscheidet sich von Xestodecalacton A durch eine zusätzliche Doppelbindung im 10-Ring. Diese Verbindung wurde aus dem Pilz *Sporormiella* sp. M5032 isoliert, ist ein cAMP-Inhibitor^[136] und inhibiert auch die EGF-Rezeptor-Kinase.^[137] Die Curvularine (79a-c) sind 12-Ring-Homologe der Xestodecalactone. Wie bei den

Xestodecalactonen sind bei den Curvularinen auch beide Diastereomere (**79b** und **c**) der an C-9 hydroxylierten Verbindung bekannt.^[138]

Zur Aufklärung der absoluten Konfiguration von Xestodecalacton A (**75**) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine enantiomerenreine Synthese dieser Verbindung entwickelt.

2.10.2 Synthese von (*R*)- und (*S*)- sowie *rac*-Xestodecalacton A (**75**)

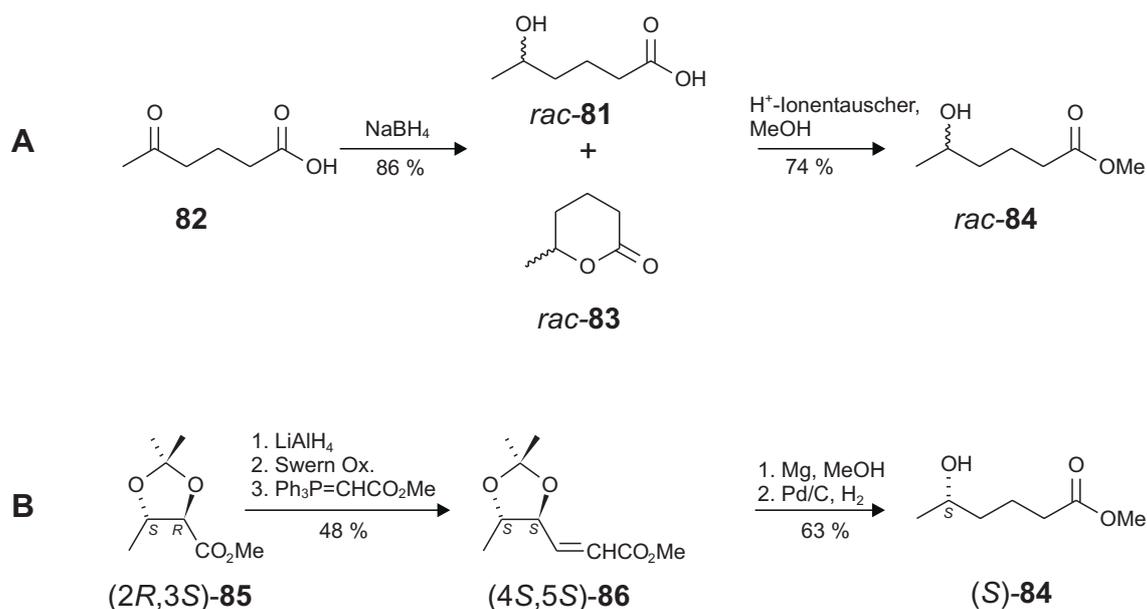
Die Synthese von Xestodecalacton A (**75**) war in weiten Teilen an die literaturbekannte Darstellung der 12-Ring-homologen Verbindung Curvularin (**79**) angelehnt.^[139] Die hier verfolgte Strategie war der Aufbau des cyclischen Esters aus den Bausteinen 3,5-Dihydroxyphenyllessigsäure (**80**) und 5-Hydroxyhexansäure (**81**). Verknüpft wurden diese Bausteine durch Veresterung der freien Säuregruppe von **80** mit der Hydroxylgruppe von **81**, der Ringschluss erfolgte durch intramolekulare Acylierung.



Schema 11. Retrosynthetischer Aufbau von Xestodecalacton A (**75**).

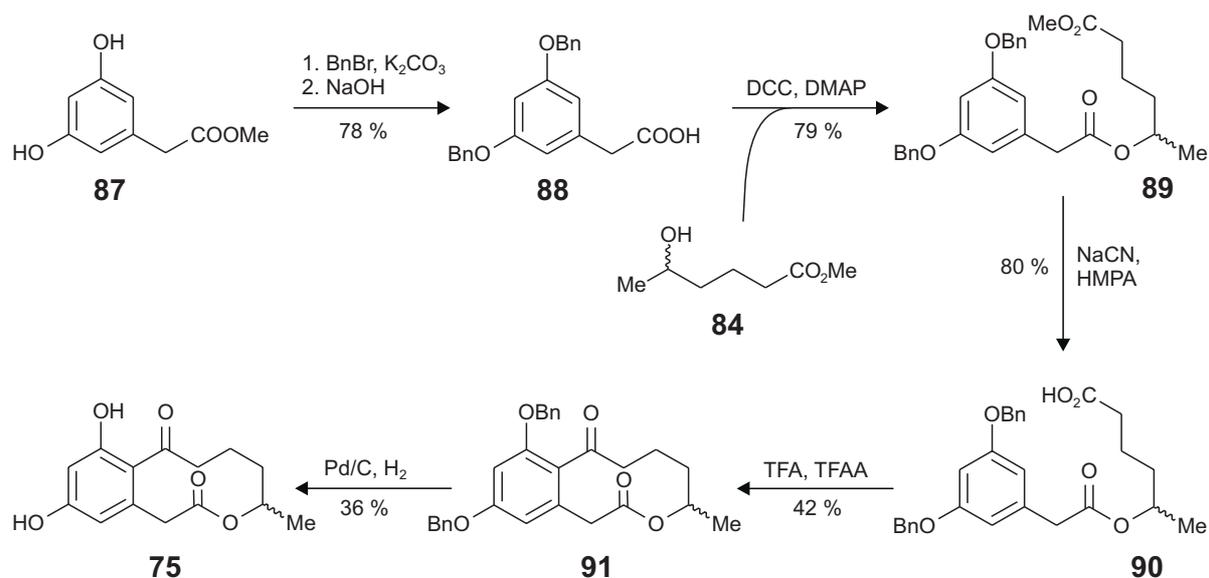
Der primäre Grund für die Synthese von Xestodecalacton A (**75**) war die Bestimmung der absoluten Konfiguration des Naturstoffes. Zur möglichst eindeutigen Zuordnung dieser Konfiguration durch chromatographische und spektroskopische Methoden, wurden deshalb beide Enantiomere, (*R*)-**75** und (*S*)-**75**, sowie das Racemat dargestellt. Da das einzige Stereozentrum sich in der Hexansäurekomponente befand, reduzierte sich das Problem der stereoselektiven Synthese auf die Darstellung von enantiomerenreinem 5-Hydroxyhexansäuremethylester (**84**). *Rac*-**84** war relativ einfach durch Reduktion von 5-Oxohexansäure mittels Natriumborhydrid und anschließende Behandlung des Produktes mit stark saurem Ionenaustauscher in Methanol zugänglich.^[140] Der Ionenaustauscher diente hierbei nicht nur der Methylierung der Säuregruppe, sondern war auch zur Öffnung des nach der Reduktion teilweise gebildeten Hexanolactons **83** notwendig. Die Darstellung der enantiomerenreinen Bausteine (*R*)-**75** und (*S*)-**75** gestaltete sich dagegen aufwändiger. Nach einer Vorschrift aus der Literatur^[141] wurden sie ausgehend von (2*R*,3*S*)-Dihydroxybutansäureacetonid [(2*R*,3*S*)-**85**] {bzw. (2*S*,3*R*)-Dihydroxybutansäureacetonid [(2*S*,3*R*)-**85**]} hergestellt. Durch Reduktion mit LiAlH₄ und anschließende Swern-Oxidation wurde **85** in den entsprechenden Aldehyd umgewandelt und daraufhin durch eine Wittig-

Reaktion um zwei Kohlenstoffatome verlängert, wodurch Verbindung **86** erhalten wurde. Der darauf folgende Schritt, die reduktive Entfernung der Acetonidgruppe durch metallisches Magnesium, erwies sich als kritisch. Der Verlauf der Reaktion hing stark von der Art des eingesetzten Magnesiums und vor allem von der Reaktionstemperatur ab. Als Produkt dieser Reaktion erhielt man nicht Verbindung **84**, wie in der Literatur beschrieben,^[142] sondern ein Gemisch aus isomeren 5-Hydroxyhexensäuremethylestern, welche erst durch Hydrierung in den gewünschten enantiomerenreinen 5-Hydroxyhexensäuremethylester (**84**) überführt werden konnten.



Schema 12. Darstellung von 5-Hydroxyhexensäuremethylester (**84**) in racemischer Form (**A**) bzw. enantiomerenrein (**B**, exemplarisch für (*S*)-**84**).

Der hohe Grad der Funktionalisierung beider Bausteine erforderte die gezielte Anwendung orthogonaler, d.h. unabhängig voneinander abspaltbarer, Schutzgruppen. Vor der Veresterung der beiden Bausteine wurden die phenolischen Hydroxylgruppen von **87** durch Benzylierung geschützt, während die Hexansäurekomponente als Methylester vorlag. Die anschließende Veresterung erfolgte mittels DCC. Zur selektiven Abspaltung der Methylestergruppe von **89**, ohne die zentrale Esterbindung zwischen Phenylelessigsäure- und Hexansäurekomponente zu gefährden, wurde NaCN in HMPA eingesetzt.^[143] Nach dem Ringschluss, der, wie schon für die Synthese des Curvularins beschrieben, nur mit schlechter Ausbeute möglich war, wurde durch Hydrogenolyse der Benzylschutzgruppen der Naturstoff erhalten.



Schema 13. Synthese des Xestodecalacton A (**75**), die Ausbeuten beziehen sich auf die Darstellung des Racemats.

(*R*)-**75**, (*S*)-**75** und *rac*-**75** sowie der isolierte Naturstoff wurden einer HPLC auf einer chiralen Phase unterzogen. Durch Vergleich der Retentionszeiten wurde eindeutig festgestellt, dass es sich beim Naturstoff um die Verbindung mit *R*-Konfiguration handelte. Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch den Vergleich der CD-Spektren der synthetischen Verbindungen mit dem des Naturstoffes bestätigt. Bemerkenswert an diesem Resultat ist, dass der strukturell sehr ähnliche Pilzmetabolit Curvularin (**79a**) *S*-Konfiguration besitzt.^[144]

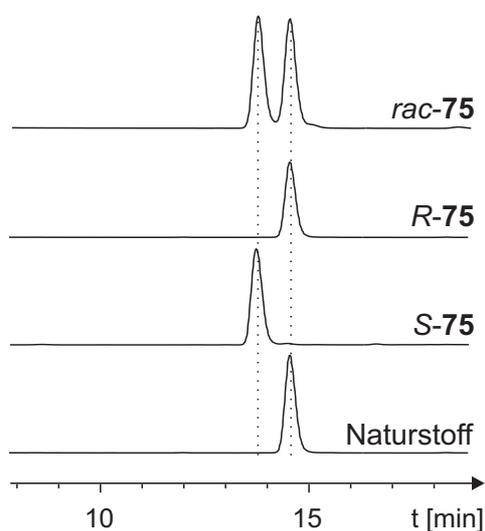


Abb. 39. HPLC-Chromatogramme von racemischem, (*R*)-, (*S*)- sowie von natürlichem Xestodecalacton A (**75**).

3 Naturstoffe aus Bakterien

3.1 Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Bakterien

3.1.1 Kenntnisstand

Bakterien finden sich in den unterschiedlichsten Lebensräumen. Viele Arten sind an extreme Bedingungen angepasst, z.B. an heiße Quellen aber auch an sehr niedrige Temperaturen, und sogar in mehreren Kilometern Tiefe wurden schon speziell angepasste Bakterienstämme in Erdöllagern nachgewiesen. Selbstverständlich existiert auch in den Weltmeeren eine Vielzahl verschiedenster Arten, die entweder frei im Meerwasser leben, im Sediment organische Substanzen abbauen oder aber eine Symbiose mit anderen Meeresorganismen eingegangen sind. Faszinierende Beispiele hierfür sind *Vibrio-fischeri*-Stämme aus den Leuchtorganen einer Tintenfischart, an denen erstmals das Phänomen des 'Quorum-sensing' beobachtet wurde,^[145] sowie spezielle Bakterien, die durch ihre chemoautotrophe Energiegewinnung aus anorganischen Substraten die Lebensgrundlage für Biotope an heißen Tiefseequellen bilden.^[146]

Im Gegenteil zu den Pilzen sind lebende und sich vermehrende Bakterien in Schwämmen eindeutig erkennbar. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schwammgewebe zeigen eine große Zahl von Bakterien, sowohl in der Mesohylmatrix als auch im Inneren von Schwammzellen. In vielen Schwämmen ist der Bakterienanteil sehr groß und macht oft bis zu 40 % der Masse des Schwammes aus. Dass in Schwammexemplaren von sehr weit entfernten Orten oft eine übereinstimmende Mikroflora gefunden wird, die sich dazu noch von der des Umgebungswassers unterscheidet, kann als Hinweis auf eine enge, und vielleicht auch symbiotische, Beziehung zwischen Schwamm und Bakterien gewertet werden. Ein Problem bei der Arbeit mit Schwamm-assoziierten Bakterien ist die schlechte Kultivierbarkeit der meisten dieser Stämme; es wird vermutet, dass sich mit den bisher verfügbaren Methoden nur ein sehr geringer Prozentsatz der im Schwamm lebenden Arten im Labor vermehren lässt.^[147]

Auch als Naturstoffproduzenten spielen Bakterien eine wichtige Rolle. Neben der Klasse der Actinomyceten, aus welcher der größte Teil der medizinisch wichtigen bakteriellen Naturstoffe isoliert wurde (siehe 3.2), sind vor allem die Myxobakterien als Produzenten biologisch aktiver Naturstoffe bekannt. Ein Beispiel hierfür ist der Antitumor-Wirkstoff Epothilon.^[148] Aber auch aus Schwämmen isolierte marine Bakterien haben sich schon als Quelle bioaktiver Verbindungen bewährt. Das cytotoxische Alkaloid Alteramid A (**92**) wird von einer *Alteromonas* sp. gebildet, welche aus dem Schwamm *Halichondria okadai* isoliert wurde.^[149] Ein Beispiel für eine antibiotische Verbindung aus einem Schwamm-assoziierten Bakterium ist das aus einem *Streptomyces*-Stamm isolierte Urauchimycin A (**93**).^[150]

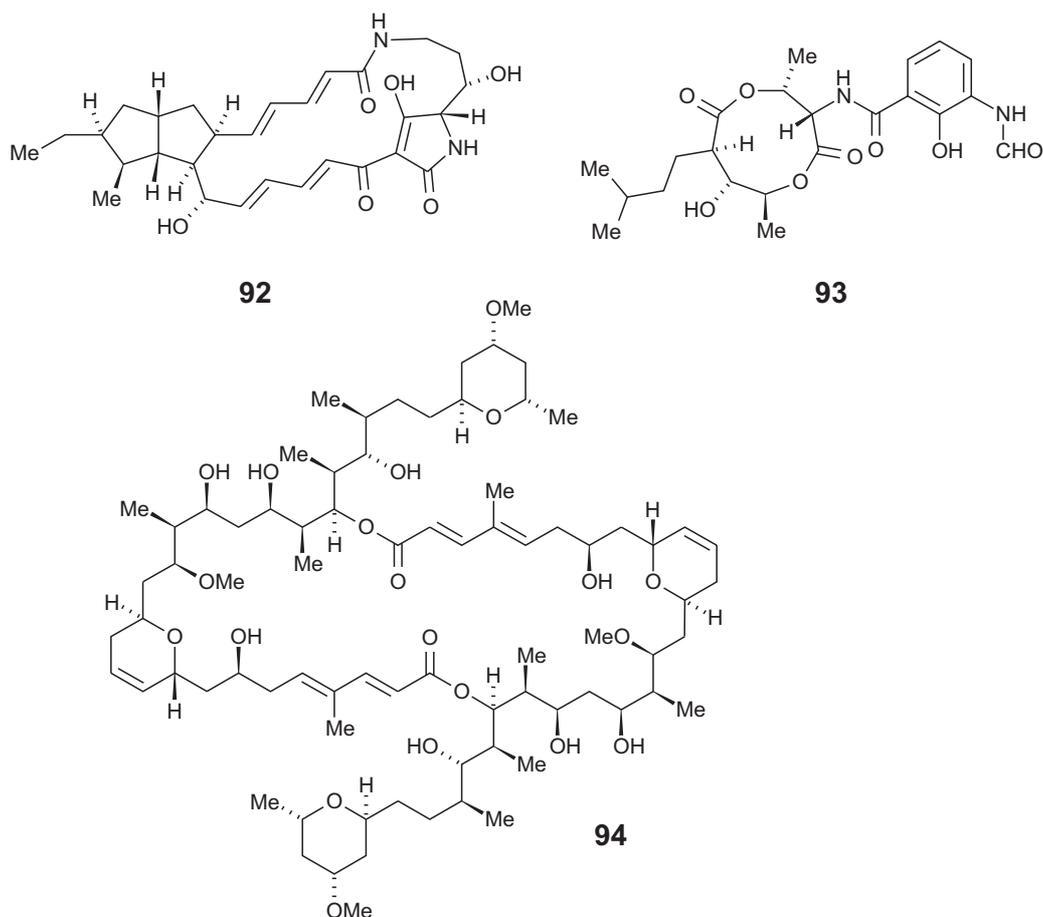


Abb. 40. Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Bakterien: Alteramid A (**92**), Urauchimycin A (**93**) und Swinholid A (**94**).

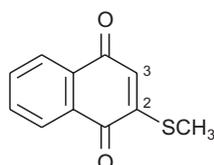
Ein besonders interessanter Aspekt der Naturstoffchemie Schwamm-assoziiierter Bakterien ist die Frage, ob die bakteriellen Sekundärmetaboliten auch für den Schwamm einen ökologischen Nutzen darstellen, und ob einige der aus Schwämmen isolierten Substanzen nicht eigentlich bakteriellen Ursprungs sind. Manche cytotoxische und fraßhemmende Schwammnaturstoffe weisen Strukturelemente auf, die auch von bakteriellen Sekundärmetaboliten bekannt sind. Ein Beispiel hierfür sind die Naturstoffe **2-4** (Abb. 1) mit ihren cyclischen Polyetherstrukturen. Eine dieser Verbindungen, die Okadainsäure (**3**), kommt nicht nur in Schwämmen vor, sondern wird auch von Dinoflagellaten^[151] und möglicherweise von Bakterien^[152] produziert. Einer der wenigen Fälle, in denen wirklich symbiotische Bakterien als Produzenten eines aus einem Schwamm isolierten Naturstoffes identifiziert werden konnten, ist das Swinholid A (**94**) aus dem Schwamm *Theonella swinhoei*. Durch ein aufwändiges Zellseparationsverfahren wurde festgestellt, dass dieser Metabolit nicht in Schwammzellen lokalisiert ist, sondern in den Zellen assoziierter Bakterien.^[153]

3.1.2 Isolierung von 2-Methylthionaphthochinon (**95**) aus Bakterienstamm SB2

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Müller (Universität Mainz) wurden mehrere Bakterienstämme untersucht, deren Extrakte cytostatische oder antiangiogenetische Wirkungen aufwiesen. Als Angiogenese wird der morphogenetische Prozess bezeichnet, bei dem neue Kapillaren gebildet werden, die bei höheren multizellulären Tieren zur Versorgung der Gewebe mit Blut dienen. Dieser Prozess, der sowohl bei physiologischen Vorgängen wie der Gewebekonstruktion als auch bei pathophysiologischen Veränderungen wie dem Wachstum von Tumoren abläuft, wird über eine Reihe von Signaltransduktionswegen gesteuert.^[154] Obwohl der zugrunde liegende Mechanismus bereits seit 1971 bekannt ist,^[155] wurden darauf aufbauende therapeutische Strategien erst in den letzten Jahren intensiv entwickelt.^[156] Heute stellt die Beeinflussung von angiogenetischen Prozessen ein bevorzugtes Forschungsfeld für biotechnologisch ausgerichtete Untersuchungen dar, die das Ziel verfolgen, neue Tumortherautika zu finden.

Die untersuchten Bakterien waren aus den Schwämmen *Suberites domuncula* und *Dysidea avara* isoliert sowie aus so genannten Primmorphen^[157] von *S. domuncula*, d.h. Aggregaten von Schwammzellen, die sich nach Auflösung des Schwammgewebes durch calcium- und magnesiumfreies Seewasser wieder zu funktionsfähigen und teilweise differenzierten Geweben zusammengelagert hatten.

Aus dem antiangiogenetisch wirksamen Extrakt eines aus *D. avara* isolierten Bakteriums wurde durch Gelchromatographie und präparative HPLC eine Substanz isoliert, die als 2-Methylthionaphthochinon (**95**) identifiziert wurde. Diese Verbindung ist synthetischen Chemikern zwar schon seit längerem bekannt,^[158] konnte hier jedoch erstmalig als Naturstoff isoliert werden. Ähnliche, aber zusätzlich in 3-Position prenylierte Verbindungen sind aus einem thermophilen Bakterienstamm beschrieben worden.^[159]



95

Abb. 41. Struktur von 2-Methylthionaphthochinon (**95**).

Ebenfalls bisher unbekannt war die starke antiangiogenetische Wirkung von **95**, die auch für die Aktivität des Rohextrakts verantwortlich war. Im CAM-Assay, bei dem der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Bildung von Blutgefäßen in der Chorioallantois-Membran von Hühnerembryonen beobachtet wird, unterdrückten schon 1 ng der Substanz vollständig die Gefäßbildung auf der behandelten Stelle, womit 2-Methylnaphthochinon zu den stärksten

antiangiogenetischen Substanzen gezählt werden kann, weshalb diese Verbindung zum Patent angemeldet wurde.^[160]

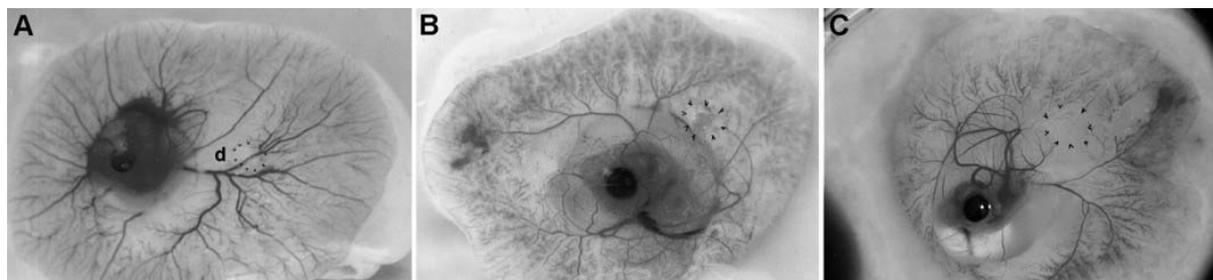


Abb. 42. Einfluss verschiedener Mengen 2-Methylthionaphthochinon (**95**) auf die Vaskularisation der Chorioallantois-Membran von Hühnerembryonen: (A) Kontrolle, (B) 0.25 ng Substanz, (C) 1.00 ng Substanz; die Markierung kennzeichnet die Stelle, an der die Agarscheibe mit der Substanz appliziert wurde.

2-Methylthionaphthochinon (**95**) unterdrückte auch die Bildung von Wasserkanälen in Schwammprimmorphphen, was dafür spricht, dass beide Prozesse, Gefäßbildung und Kanalbildung in Schwämmen, auf den gleichen physiologischen Grundlagen beruhen.^[161]

Neben der antiangiogenetischen Aktivität wurde auch eine cytostatische Wirkung festgestellt. 2-Methylthionaphthochinon (**95**) hemmt das Wachstum von L5178y-Mäuselymphomzellen mit einem ED₅₀-Wert von 80 ng/mL. Die cytostatische Wirkung von 2-Alkylthionaphthochinonen ist bekannt und ist vermutlich auf die irreversible Bindung an Cystein-Reste von Proteinen zurückzuführen.^[162]

3.2 Naturstoffe aus terrestrischen Streptomyceten

3.2.1 Hintergrund

Streptomyceten sind filamentöse gram-positive Bakterien, die ein pilzähnliches Mycelgeflecht bilden und zur Klasse der Actinomyceten gehören. Der größte Teil aller medizinisch eingesetzten bakteriellen Naturstoffe wird von dieser Bakterienfamilie produziert. Die biologischen Aktivitäten von *Streptomyces*-Metaboliten sind sehr vielfältig. Klinisch eingesetzte Substanzen sind z.B. das Antibiotikum Tetracyclin (**96**),^[163] das immunsuppressive Macrolid Tacrolimus (**97**)^[164] und das gegen Pilzinfektionen eingesetzte Amphotericin B (**98**).^[165] Die meisten Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces*-Arten sind entweder polyketidischen Ursprungs oder Cyclopeptide, wie z.B. das Antibiotikum Vancomycin.^[166]

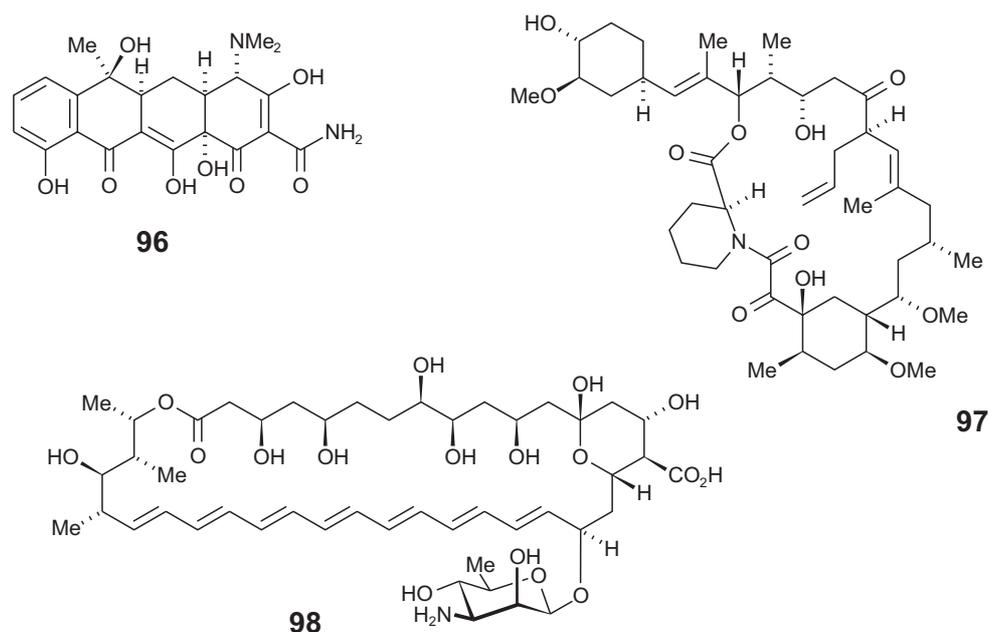


Abb. 43. Tetracyclin (**96**), Tacrolimus (**97**) und Amphotericin B (**98**), medizinisch eingesetzte Sekundärmetaboliten aus *Streptomyces*-Arten.

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Fiedler (Universität Tübingen) werden in unserer Arbeitsgruppe seit einiger Zeit Naturstoffe aus Streptomyceten untersucht. Dabei werden in der Tübinger Arbeitsgruppe extremophile Streptomyceten, insbesondere psychrophile und alkalophile Arten, isoliert, kultiviert und mit Hilfe einer HPLC-DAD-Untersuchung auf ihre Naturstoffproduktion hin untersucht. Durch eine Datenbanksuche nicht identifizierbare Naturstoffe werden isoliert und zur Strukturaufklärung an unsere Arbeitsgruppe übergeben. Dabei konnten schon einige neue Naturstoffe identifiziert werden.^[167-169]

3.2.2 Strukturaufklärung des Angucyclinons AK1030B (**102**)

Im Extrakt des Streptomyceten-Stammes KC1030, isoliert aus dem antarktischen Dauerfrostboden bei Edmundson Point (Terra Nova Bay), wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler (Tübingen) mehrere bekannte Verbindungen durch Vergleich mit einer HPLC-DAD-Datenbank erkannt. Es handelte sich hierbei um Fridamycin E und die glycosylierten Angucycline Urdamycin A (**99**) und B (**101**). Eine isolierte Verbindung wurde von A. Hamm als Dehydrorabelomycin (**100**) identifiziert.^[169]

Eine weitere Substanz aus diesem Bakterienstamm, Verbindung AK1030B (**102**), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Schon die Zahl von 19 Kohlenstoffsignalen im ¹³C-NMR-Spektrum deutete darauf hin, dass es sich hier ebenfalls um ein Angucyclin handelte. Durch die Auswertung der restlichen NMR-Daten, aufgenommen in CDCl₃, wurde diese Vermutung bestätigt und alle Kohlenstoff- und Protonensignale konnten ihrer Position im Angucyclingerüst zugeordnet werden.

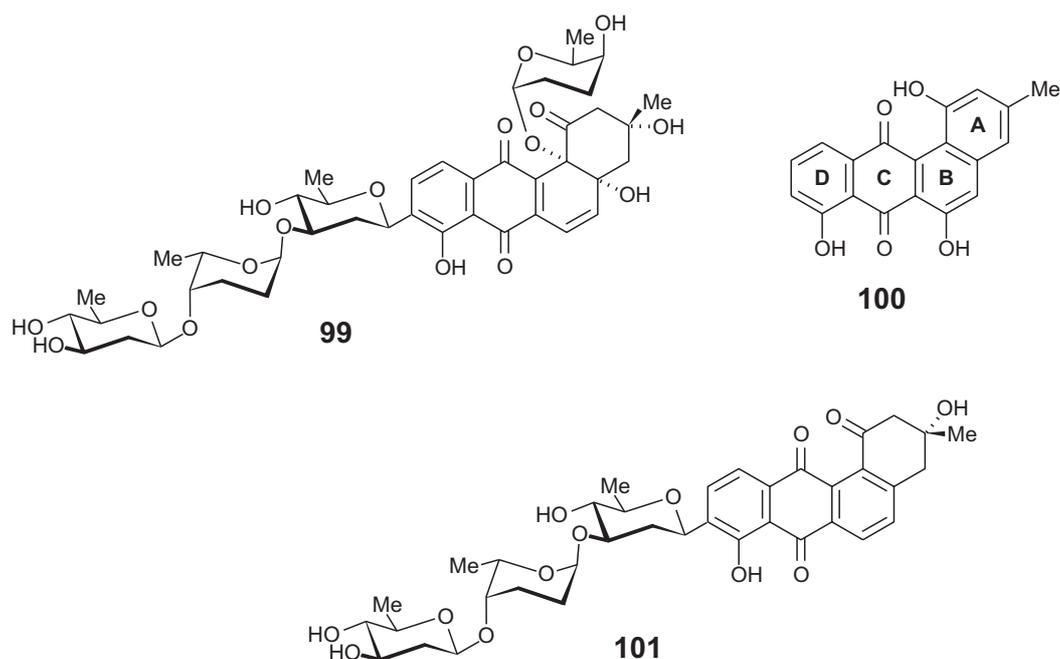
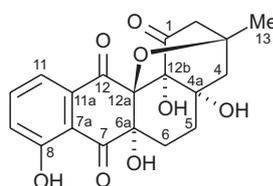


Abb. 44. Die bekannten Angucycline Urdamycin A (**99**) und B (**101**) sowie Dehydrorabelomycin (**100**) aus dem Streptomyceten-Stamm KC1030.

Die aromatischen Protonen 9-H, 10-H und 11-H wurden dem D-Ring (für die Bezeichnung der Ringe siehe Struktur **100**, Abb. 44) des Angucyclingerüsts zugeordnet. Über die HMBC-Korrelationen dieser Signale wurden die übrigen Kohlenstoffatome des D-Rings (C-7a, C-8 und C-11a) identifiziert; auch Kopplungen zu den Carbonylkohlenstoffen des C-Rings (C-7 und C-12) waren zu erkennen. Ausgehend von den Protonensignalen der Methylgruppe 13-H und den zwei Methylengruppen (2-H und 4-H) ließen sich durch HMBC-Wechselwirkungen die ^{13}C -Signale des A-Ringes mit seiner Ketogruppe C-1 und den zwei quartären Kohlenstoffatomen C-4a und C-12b, die die Verbindung zum B-Ring bilden, vollständig zuordnen. Die hohe $^2J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2-H $_{\alpha}$ und 2-H $_{\beta}$ (19.0 Hz) belegte noch zusätzlich die Lage dieser Methylengruppe neben einer Carbonylfunktion. Von den zwei übrigen Methylengruppen C-5 und C-6, die folglich Teil des B-Ringes waren, sah man HMBC-Wechselwirkungen zu den quartären Kohlenstoffatomen C-6a und C-12a, die somit den Übergang vom B- zum C-Ring bilden mussten.

Die ^{13}C -Verschiebungen der fünf quartären C-Atome C-3 (75.9 ppm), C-4a (71.7 ppm), C-6a (77.4 ppm), C-12a (79.9 ppm), C-12b (78.5 ppm) zeigten nicht nur, dass keines dieser Atome an einer Doppelbindung beteiligt war, sondern deuteten auch auf tertiäre Alkohole, Ether oder Epoxide hin. Zusammen mit der aus der exakten Masse bestimmten Summenformel von $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$ ergab sich folgendes Bild: an drei dieser fünf quartären Kohlenstoffe befinden sich Hydroxylgruppen, während die restlichen zwei über eine Etherbrücke verbunden sind.

Zur Bestimmung der Position der Hydroxylgruppen und der Etherbrücke, wurden HMBC- und ROESY-Spektren der Verbindung in Dioxan- d_8 aufgenommen, einem Lösungsmittel, in dem aliphatische Alkohole oft scharfe Signale ergeben. Wie erwartet enthielt das Protonenspektrum drei zusätzliche Singulett-Signale von OH-Gruppen, aus deren HMBC-Wechselwirkungen ersichtlich war, dass sie sich an C-4a, C-6a und C-12b befanden. Daraus folgte eine intramolekulare Etherbrücke zwischen C-3 und C-12b. Dieser Befund wurde auch durch die im HMBC sichtbare $^4J_{\text{HC}}$ -Kopplung zwischen 13-H und C-12a gestützt. Ein weiterer Hinweis auf eine derartige Verbrückung war die sehr hohe $^4J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2.5 Hz (in CDCl_3) zwischen 2- H_β und 4- H_β ; die völlig starre Konformation des A-Ringes führt zu einer 'W'-Anordnung der Bindungen zwischen diesen beiden äquatorialen Protonen und ermöglicht dadurch eine deutliche Kopplung über vier Bindungen. Entsprechend zeigte das axiale Proton 4- H_α eine ROESY-Wechselwirkung zu einem der Protonen an C-2 (Abb. 46).



102

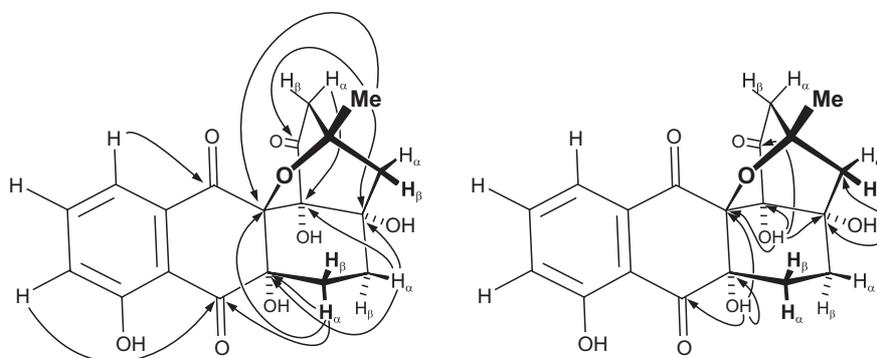


Abb. 45. Struktur des ersten (C-3 - C-12a)-verbrückten Angucyclinons AK1030B (**102**) und für die Strukturaufklärung wichtige HMBC-Kopplungen.

Die $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten zwischen 5- H_α , 5- H_β , 6- H_α und 6- H_β ließen Schlüsse über die Konformation des B-Ringes zu. Die Kopplungskonstante von ~ 14 Hz zwischen 5- H_β und 6- H_β zeigte, dass diese Protonen zueinander in *anti*-Stellung stehen.

Die relative Konfiguration der vier Stereozentren C-3, C-4a, C-12a und C-12b ergab sich automatisch wegen sterischer Zwänge der sehr starren verbrückten Struktur. Unklar war nur die relative Konfiguration an C-6a, hier waren theoretisch beide Konfigurationen möglich. Geklärt wurde diese Frage durch die in Dioxan- d_8 gemessenen ROESY-Spektren. Da alle drei Hydroxylprotonen am B-Ring mit 5- H_β wechselwirkten, war gesichert, dass diese drei OH-

Gruppen alle auf derselben Seite des B-Ringes liegen. Die Konfiguration des Moleküls war also entweder (3*S*,4*aS*,6*aS*,12*aR*,12*bR*) oder (3*R*,4*aR*,6*aR*,12*aS*,12*bS*). Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration sind noch quantenchemische Berechnungen von CD-Spektren der beiden Enantiomere im Gange. Erste Berechnungen durch K. Maksimenka^[170] sagen für eine tetra-*O*-methyliertes Derivat von (3*S*,4*aS*,6*aS*,12*aR*,12*bR*)-**102** ein Spektrum vorher, welches mit dem des Naturstoffes weitgehend übereinstimmt. Berechnungen mit der eigentlichen Struktur des Naturstoffs gestalten sich dagegen kompliziert, da die Lage der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den OH-Gruppen nur schwer vorherzusagen ist. Durch Vergleich mit Angucyclinen bekannter absoluter Konfiguration kommt man jedoch zu einem anderen Ergebnis. Alle diese Verbindungen besitzen, sofern sie an C-3 hydroxyliert sind, die 3*R*-Konfiguration, dies gilt auch für die im hier untersuchten Actinomyceten-Stamm gefundenen Urdamycine A (**99**) und B (**101**).

Die Konstitution und relative Konfiguration von **102** konnten durch eine Röntgenbeugungsanalyse verifiziert werden. Auch die über Kopplungskonstanten und ROESY-Wechselwirkungen vorhergesagte Konformation stimmte exakt mit der Kristallstruktur überein. Eine Bestimmung der absoluten Konfiguration war aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse nicht möglich, da die Struktur kein 'Schweratom' enthält und deshalb die Standardabweichung des Flack-Parameters zu groß war.

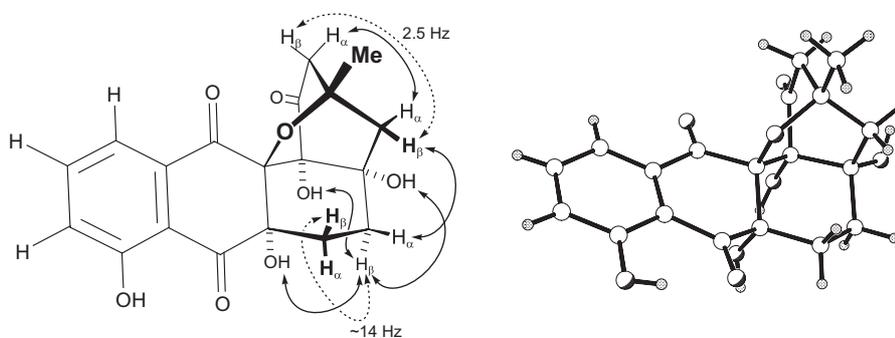
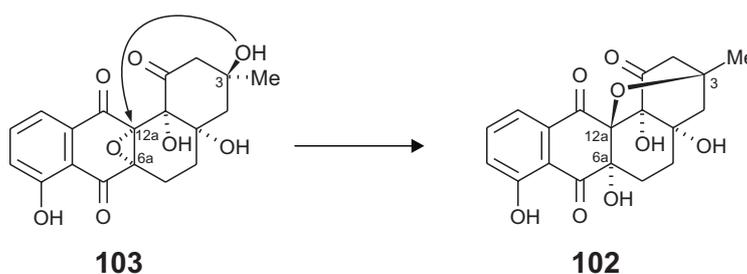


Abb. 46. Vergleich der über ROESY- (durchgezogene Pfeile) und COSY-Wechselwirkungen (gepunktete Pfeile) ermittelten Konformation mit der durch Röntgenbeugungsanalyse erhaltenen Kristallstruktur von AK1030B (**102**).

Die Angucycline sind eine Gruppe von bakteriellen Sekundärmetaboliten mit einem typischen abgewinkelten tetracyclischen Kohlenstoffgerüst, das sich von Benz[*a*]anthrachinon ableiten lässt. Biosynthetisch sind die Angucycline mit den Tetracyclinen verwandt, welche eine lineare Anordnung der vier Ringe aufweisen. Die Naturstoffklasse der Angucycline, die inzwischen über 100 Vertreter zählt, kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden, die eigentlichen Angucycline, die immer säure-labile Glycoside sind, und Angucyclinone, welche

keine mit Säure abspaltbaren Zuckerreste besitzen. Viele dieser Verbindungen besitzen ausgeprägte biologische Aktivitäten, vor allem cytostatische und antibiotische Wirkungen sind bekannt. Es wurde aber auch von Hydroxylase- und Monooxygenase-Inhibitoren, von Blutplättchenaggregations-Hemmern und von antiviralen Angucyclinen berichtet.^[171]

Da es keine Zuckerreste besitzt, gehört AK1030B (**102**) zu den Angucyclinonen. Von den anderen im selben Bakterienstamm identifizierten Angucyclinen (siehe Abb. 44) unterscheidet es sich durch den höheren Hydroxylierungsgrad und vor allem durch die in dieser Naturstoffklasse bisher nicht beobachtete Etherbrücke von C-3 nach C-12b, die zu einer käfigartig starren Struktur führt. Es gibt verschiedene Angucycline mit Hydroxylgruppen an C-3, C-4a, C-6a, C12a oder C12b, aber eine Verbindung, die wie **102** Sauerstofffunktionen an allen diesen Positionen trägt, ist bisher nicht bekannt. Eine plausible biosynthetische Vorstufe von **102** wäre die Verbindung **103** mit einer Epoxidfunktion an C-6a/C-12a und ohne die Etherbrücke. Die Hydroxylgruppe an C-3 könnte nucleophil an C-12a angreifen und somit die Etherbrücke bilden und gleichzeitig das Epoxid öffnen.



Schema 14. Bildung von AK1030B (**102**) aus der hypothetischen Vorstufe **103**

AK1030B (**102**) besitzt eine schwache Wirksamkeit gegen gram-positive Bakterien. Cytostatische, antiprotozoische oder antifungische Aktivitäten wurden nicht gefunden.

3.2.3 Identifizierung von 4-Hydroxyscytalon (**104**)

Eine weitere in der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler aus einem *Streptomyces*-Stamm isolierte Substanz zeigte sowohl im ¹H-NMR- als auch im ¹³C-NMR-Spektrum einen doppelten Signalsatz. Es lag also ein Gemisch zweier unterschiedlicher, wenn auch strukturell nahe verwandter, Verbindungen vor. Durch Integration der Signale im Protonenspektrum wurde das molare Verhältnis der beiden Substanzen zu 1:2.8 bestimmt. In beiden Signalsätzen waren im Prinzip die gleichen Strukturelemente zu erkennen, je zwei aromatische Protonen in *meta*-Anordnung (⁴J_{HH} = 2.4 Hz), eine diastereotope CH₂-Gruppe und zwei einzelne Protonen, deren chemische Verschiebungen zwischen 4 und 5 ppm auf eine Position an einem sekundären Alkohol oder Ester hindeutete. Im ¹³C-Spektrum waren für beide Verbindungen Signale für je sechs aromatische Kohlenstoffe, eine Ketogruppe (bei 201.6 bzw. 202.0 ppm)

die Methylengruppe (43.6 und 44.5 ppm) und zwei Sauerstoff-substituierte aliphatische Kohlenstoffatome (zwischen 70 und 72 ppm) zu sehen. Die Auswertung der COSY- und HMBC-Wechselwirkungen ergab das bicyclische System **104** (Abb. 47) mit einem aromatischem und einem aliphatischem Sechsering, an beiden Ringen befanden sich zwei Hydroxylgruppen, am aliphatischen zusätzlich noch eine Ketofunktion. Diese Konstitution war für beide Komponenten des Gemisches dieselbe, mit Hilfe der Kopplungskonstanten konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich um Diastereomere mit *cis*- bzw. *trans*-Konfiguration des vicinalen Diols an C-3 und C-4 handelte. Die $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante zwischen 3-H und 4-H betrug 2.5 Hz für das *cis*- und 7.5 Hz für das *trans*-Isomer. Ob es sich um ein Gemisch von nur zwei diastereomeren Verbindungen handelte, oder ob noch mehr Stereoisomere in der Mischung vorhanden waren, also auch Enantiomerenpaare, konnte durch die NMR-Untersuchungen natürlich nicht geklärt werden.

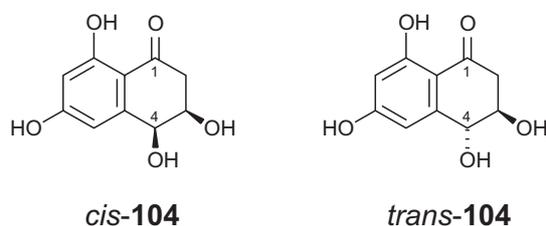


Abb. 47. *Cis*- und *trans*-4-Hydroxyscytalon (**104**), der isolierte Naturstoff ist ein Gemisch dieser Stereoisomere; die absoluten Konfigurationen sind willkürlich gewählt.

Die Verbindung **104** ist unter dem Namen 4-Hydroxyscytalon schon als Naturstoff aus Pilzen bekannt,^[172,173] allerdings ist dies die erste Isolierung aus einem Bakterium. Interessant ist insbesondere, dass die Stereostruktur des Naturstoffes je nach produzierendem Mikroorganismus variiert; aus dem Pilz *Pyricularia oryzae* wurde die *trans*-Verbindung isoliert,^[172] der Pilz *Verticillium dahliae* liefert ausschließlich das *cis*-Diol,^[173] während das hier untersuchte bakterielle 4-Hydroxyscytalon (**104**) ein Gemisch der beiden Diastereomere ist. Die absolute Konfiguration des Naturstoffes wurde bei keiner der bisherigen Isolierungen bestimmt, und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt.

Es sind keine biologischen Aktivitäten von **104** beschrieben, doch es fällt auf, dass diese Verbindung bisher nur aus pflanzenpathogenen Pilzen isoliert wurde.

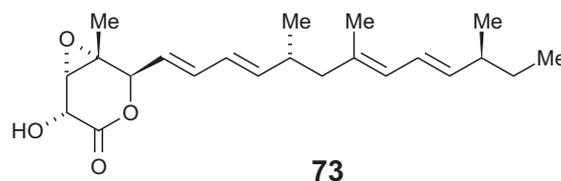
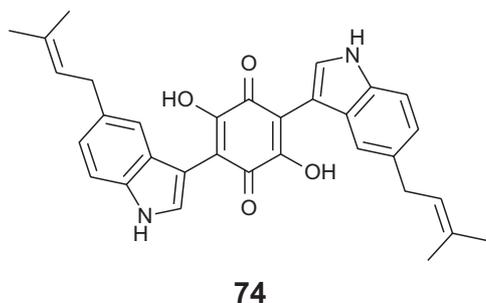
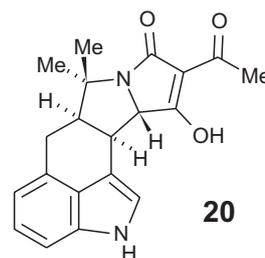
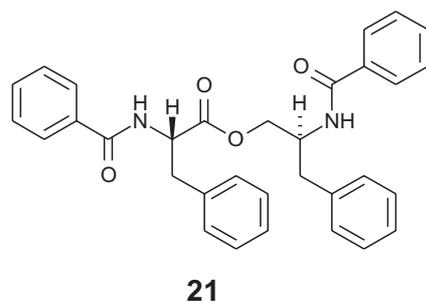
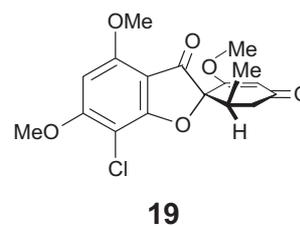
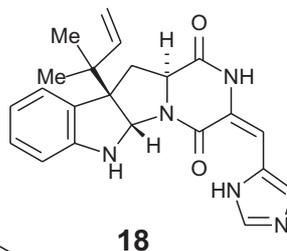
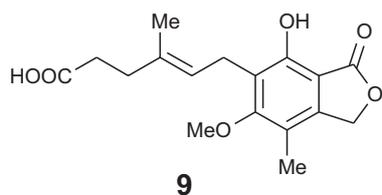
4 Zusammenfassung

Im Laufe der vergangenen fünf Jahrzehnte haben sich marine Invertebraten zu einer wichtigen und gut untersuchten Quelle für neue Naturstoffe entwickelt. Verbindungen mit überaus viel versprechenden pharmakologischen Aktivitäten wurden aus Schwämmen, Moostierchen und anderen Organismen isoliert, und auch heute noch werden ständig neue interessante Strukturen veröffentlicht. In den vergangenen Jahren ließ sich ein Trend hin zur chemischen Untersuchung von marinen Mikro- anstelle der Makroorganismen beobachten. Zwei der wichtigsten Argumente für diesen neuen Ansatz sind die bessere Kultivierbarkeit von Mikroorganismen, und somit die Möglichkeit einer einfachen Hochskalierung der Substanzisolierung, sowie der begründete Verdacht, dass einige der aus marinen Invertebraten isolierten Verbindungen eigentlich mikrobiellen Ursprungs sind.

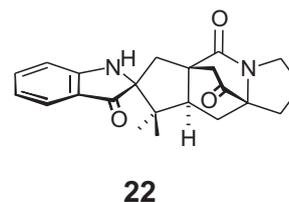
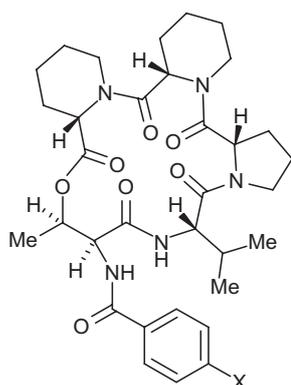
Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Suche nach neuen biologisch aktiven Naturstoffen in Mikroorganismen, welche aus verschiedenen Schwämmen des Mittelmeeres isoliert wurden. Im Gegensatz zu den mediterranen Schwämmen selbst, die schon seit über 30 Jahren chemisch untersucht werden, so dass von den häufigeren Arten kaum noch neue Naturstoffe zu erwarten sind, ist die mit den Schwämmen assoziierte Mikroflora chemisch weitgehend unerforscht. Die Mikroorganismen für die vorliegende Arbeit wurden in den Arbeitsgruppen unserer Kooperationspartner, Dr. K. Schaumann (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven), Prof. J. Imhoff (Institut für Meereskunde, Kiel) und Prof. W. E. G. Müller (Universität Mainz), isoliert, identifiziert und kultiviert. Es wurden insgesamt 13 neue und 21 bekannte Verbindungen gefunden.

Im Einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Es konnte ein Dereplikations-Verfahren, also eine Methode zur frühzeitigen Erkennung bekannter Verbindungen etabliert werden. Eine schnelle Dereplikation ist überaus wichtig, da durch sie die Suche nach neuen Naturstoffen effizienter gestaltet werden kann. Zu diesem Zweck wurden die Extrakte der marinen Pilze durch die gekoppelten HPLC-Methoden HPLC-UV, -MS und -NMR untersucht. Die so gewonnenen spektroskopischen Informationen wurden mit den Daten bekannter Naturstoffe in Datenbanken abgeglichen, so dass ein sehr effektives Dereplikations-Werkzeug zur Verfügung stand. Mit dieser Methode wurden die bekannten Pilzmetaboliten Mycophenolsäure (**9**), Roquefortin C (**18**), Griseofulvin (**19**), Asperphenamat (**21**) und Cyclopiazonsäure (**20**) in den Extrakten identifiziert. Die ebenfalls bekannten Verbindungen Cochliodinol (**74**) und Nafuredin (**73**) wurden nach ihrer Isolierung durch präparative HPLC mittels herkömmlicher ‚off-line‘-Methoden identifiziert.

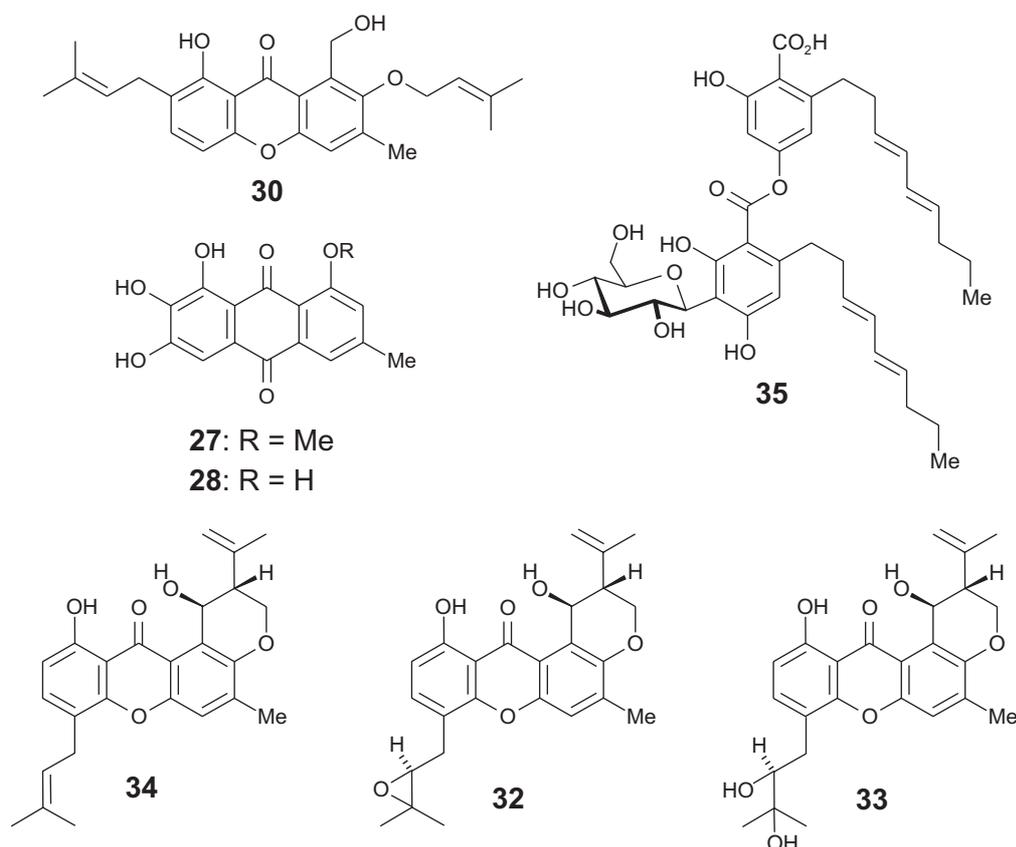


- Ein aus dem Schwamm *Petrosia ficiformis* isolierter Pilz, der mittels morphologischer und chemotaxonomischer Kriterien als *Penicillium brevicompactum* identifiziert wurde, produzierte zwei unbekannte Naturstoffe, deren peptidische Struktur schon aus den HPLC-¹H-NMR-Spektren ersichtlich war. Die Isolierung dieser Verbindungen mittels Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC), einer neuen flüssig-flüssig-chromatographischen Methode, und Gelchromatographie ergab diese Peptide in reiner Form, so dass ihre Strukturen durch NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie aufgeklärt werden konnten. Bei diesen Substanzen handelte es



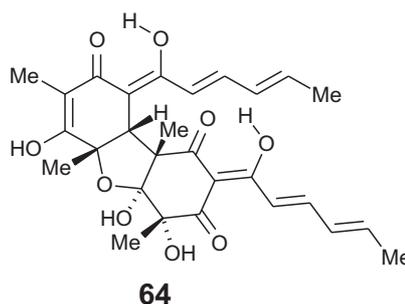
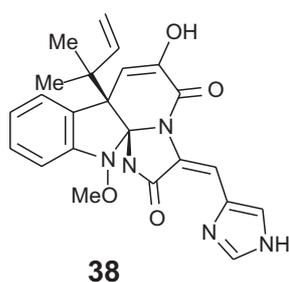
sich um zwei neue Cyclodepsipeptide, Petrosifungin A (**23**) und B (**24**), welche beide je zwei Einheiten der nicht proteinogenen Aminosäure Pipecolinsäure enthielten. Die Konfigurationen der Aminosäurereste wurden durch Säurehydrolyse, Derivatisierung mit chiralen Reagenzien und anschließende HPLC-Analyse bestimmt. Dabei wurden zwei unterschiedliche Derivatisierungsmethoden, mit Marfey's Reagenz und mit GITC, verglichen. Neben den Petrosifunginen wurden noch weitere für *P. brevicompactum* typische Sekundärmetaboliten nachgewiesen, nämlich Brevianamid A (**22**), Asperphenamat (**21**; siehe oben) und Mycophenolsäure (**9**; siehe oben).

- Aus einem *Emericella-variecolor*-Stamm, isoliert aus dem Schwamm *Haliclona valliculata*, wurden mehrere Verbindungen mit unterschiedlichsten Strukturen isoliert. Es wurden zwei hochoxygenierte Anthrachinone gefunden, zum einen das bekannte 7-Hydroxyemodin (**28**), aber auch ein bisher unbekanntes *O*-methyliertes Derivat dieser Verbindung, das Evarichinon (**27**), das eine deutliche cytotoxische Aktivität besitzt. Des Weiteren produzierte der Pilz eine Reihe von Prenylxanthonen, die bekannten Naturstoffe Shamixanthon (**34**) und Tajixanthon (**32**) sowie den neuen Naturstoff Isoemicellin (**30**). Tajixanthonhydrat (**33**), ein Artefakt, welches durch Hydrolyse der Epoxid-Verbindung Tajixanthon (**32**) gebildet worden war, inhibierte die Biofilmbildung von *Staphylococcus*-Stämmen, ohne dabei cytotoxisch auf die Bakterien zu wirken. Die Hauptkomponente des Pilzextraktes war das schon bekannte

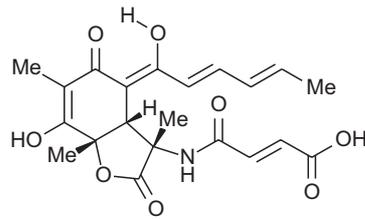
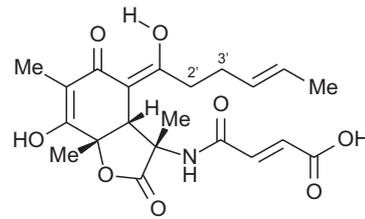
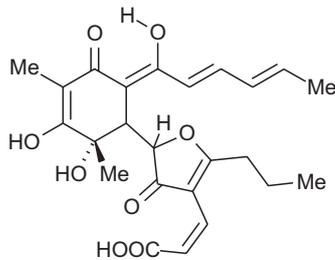
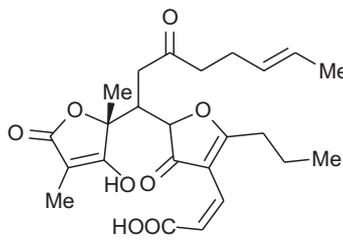
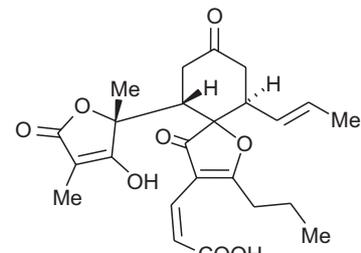


C-glycosidische Depsid Stromemycin (**35**). Durch verschiedene NMR-Verfahren, darunter Protonenkopplungs-Experimente und rechnerische Simulation von komplexen Spinsystemen, konnten die bisher unbekannte Konfigurationen der Doppelbindungen und die relative Konfiguration der Zuckereinheit bestimmt werden.

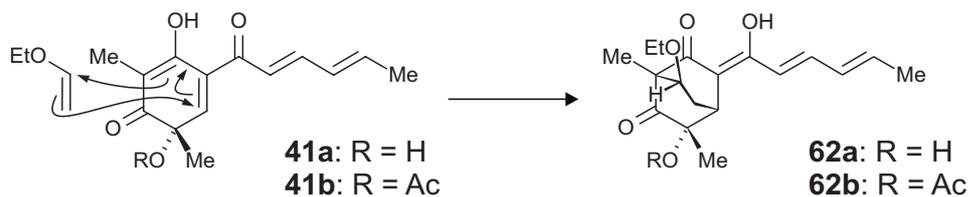
- Mehrere aus den Schwämmen *Ircinia fasciculata* und *Chondrosia reniformis* isolierte *Penicillium-chrysogenum*-Stämme wurden untersucht. Die HPLC-Analyse ergab, dass diese Stämme das gleiche Metabolitenspektrum aufwiesen und somit demselben Chemotyp dieser Art angehörten. Diese Pilze produzierten die bekannten tremorgenen Alkaloide Meleagrin (**38**) und Roquefortin C (**18**; siehe oben), daneben aber auch eine Reihe von Sorbicillin-abgeleiteten Naturstoffen mit größtenteils unbekanntem Strukturen. Die darunter einzige bekannte Verbindung war das Bisvertinolon (**64**). Alle anderen zählten weder zu den Bisvertinoiden (das sind Sorbicillin-abgeleitete dimere Verbindungen) noch zu den einfachen oxidierten Sorbicillin-Derivaten, sondern wiesen ungewöhnliche Strukturelemente auf, die in dieser Naturstoffklasse bisher nicht beobachtet worden waren.



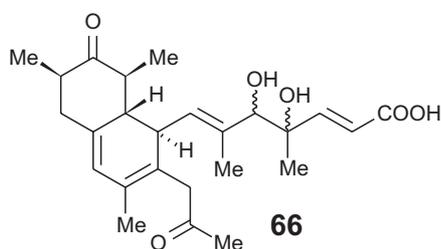
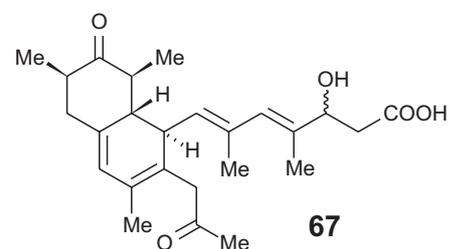
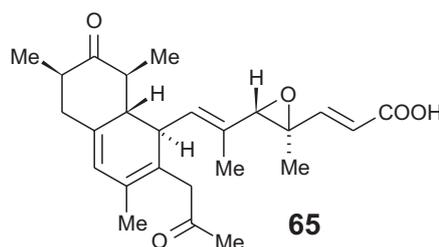
Zwei dieser neuartigen Verbindungen, Sorbicillacton A (**47**) und 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**), sind die ersten stickstoffhaltigen Sorbicillin-abgeleiteten Naturstoffe. Ersterer wirkte bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/mL}$ hochselektiv cytotoxisch gegen eine murine Leukämie-Zelllinie, darüber hinaus war diese Verbindung bei einer sogar noch geringeren Konzentration ($<1 \mu\text{g/mL}$) anti-HIV-aktiv. Sorbifuranon A (**54a**), ein weiteres neues Sorbicillinderivat, besitzt eine ungewöhnliche 2,3-Dihydro-3-furanon-Einheit, die vermutlich durch oxidative Ringöffnung aus einem pentaketidischem aromatischem Vorläufer gebildet wird. Sorbifuranon A ist der mutmaßliche biogenetische Vorläufer der ebenfalls isolierten neuen *spiro*-Verbindung Sorbifuranon C (**59**), welche aus **54a** durch zwei Umlagerungsreaktionen gebildet werden kann. Das dritte Mitglied der neuen Verbindungsklasse der Sorbifuranone, das Sorbifuranon B (**58**), lässt sich entsprechend von einem postulierten 2',3'-Dihydrosorbifuranon A ableiten.

**47****53****54a****58****59**

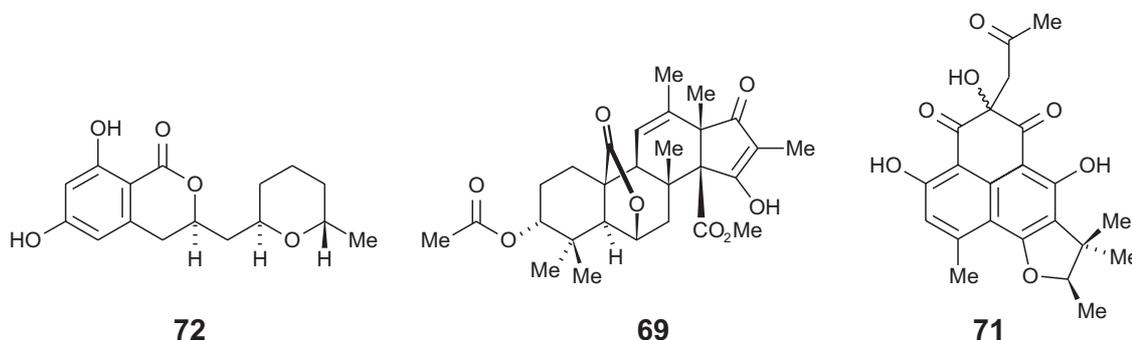
Ein Verfütterungsexperiment mit ^{13}C -markiertem Actetat legte nahe, dass es sich bei Verbindung **62a** um ein Artefakt handelte, das durch eine Diels-Alder-Reaktion aus dem hochreaktiven Biosynthese-Intermediat Sorbicillinol (**41a**) und Ethylvinylether entstanden war. Untermuert werden konnte diese Vermutung durch die Reaktion von *O*-Acetylsorbicillinol (**41b**) und Ethylvinylether zu **62b**.



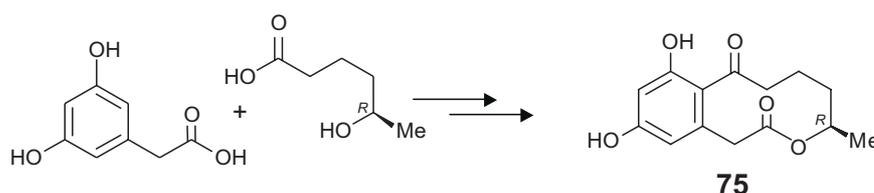
- Ebenfalls eine große Vielfalt an Sekundärmetaboliten produzierte eine *Penicillium*-Art aus dem Schwamm *Petrosia ficiformis*. Mit **66** und **67** wurden zwei neue Derivate des fungiziden Naturstoffs Hamigeron (**65**), der ebenfalls im Extrakt vorhanden war,

**66****67****65**

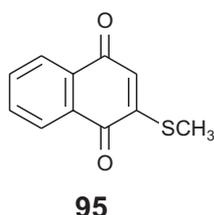
gefunden. Daneben wurden die bekannten Naturstoffe Cladosporin (**72**) und Citreohybridonol (**69**) isoliert sowie Verbindung **71**, die wahrscheinlich durch Reaktion von Atrovenetinon mit Aceton entstanden war.



- Zur Ermittlung der absolute Konfiguration von Xestodecalacton A (**75**), einem in der Arbeitsgruppe von Prof. Proksch (Universität Düsseldorf) isoliertem Pilzmetaboliten, wurden beide Enantiomere synthetisiert. Der Vergleich beider Verbindungen mit natürlichem Xestodecalacton A durch HPLC-Analyse auf chiraler Phase zeigte, dass der Naturstoff *R*-Konfiguration besitzt.

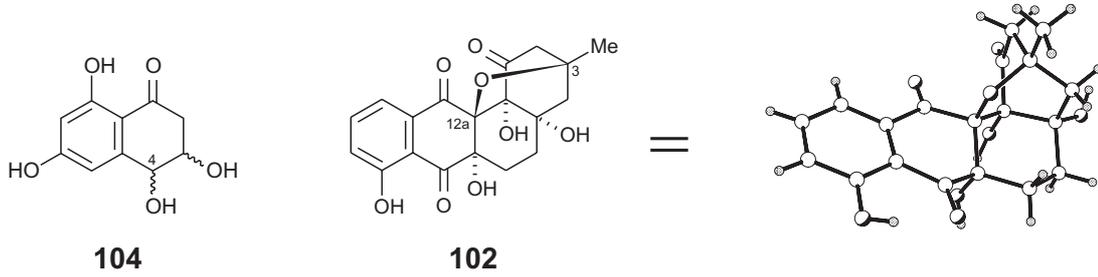


- Aus einem antiangiogenetisch wirksamen Extrakt eines aus dem Schwamm *Dysidea avara* isolierten Bakteriums wurde das bislang nicht als Naturstoff beschriebene 2-Methylthionaphthochinon (**95**) als aktives Prinzip isoliert.



- Es wurden die Strukturen von Naturstoffen aufgeklärt, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Fiedler (Universität Tübingen) aus extremophilen Actinomyceten isoliert worden waren. Neben der bisher nur aus Pilzen bekannten Verbindung 4-Hydroxyscytalon (**104**) wurde so mit **102** ein neues ungewöhnliches Angucyclinon gefunden. Durch NMR-Experimente konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um den ersten Vertreter dieser Naturstoffklasse mit einer intramolekularen Etherbrücke zwischen C-

3 und C-12a handelte. Die ungewöhnliche verbrückte Struktur wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse bestätigt.



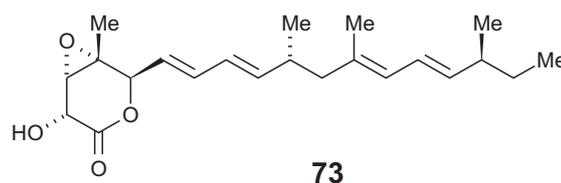
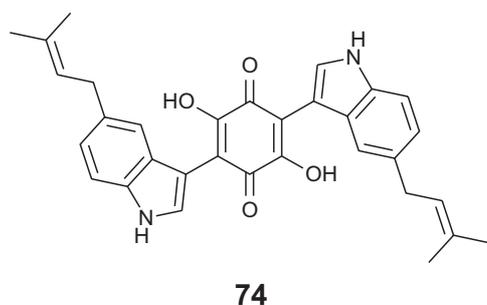
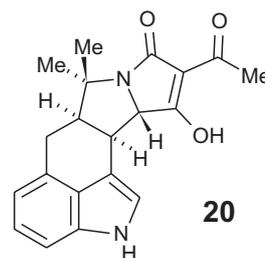
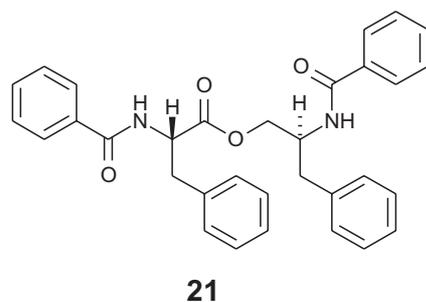
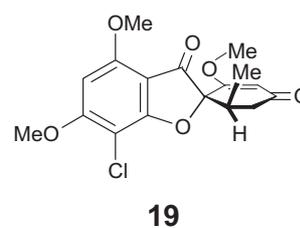
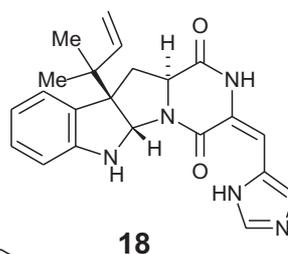
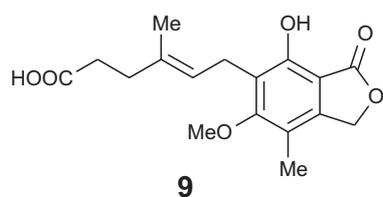
5 Summary

Over the past five decades, marine invertebrates have become an important and well-explored source for novel natural products. Compounds with very promising pharmacological activities have been isolated from sponges, bryozoans, and tunicates, and still, interesting structures are still being published continually. In recent years, however, there has been a trend towards the chemical investigation of marine micro- rather than macro-organisms. Two of the main arguments in favor of this approach are the better cultivability, with the possibility of upscaling the substance isolation, and the growing assumption that some of the compounds isolated from marine invertebrates are actually produced by symbiotic microorganisms.

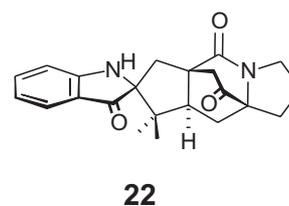
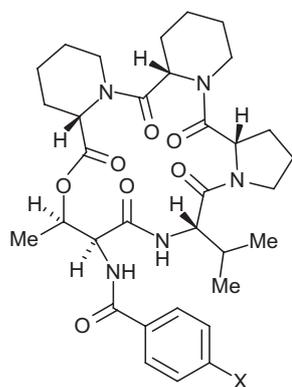
This thesis deals with the screening of microorganisms isolated from various Mediterranean sponges for novel biologically active natural products. In contrast to the Mediterranean sponges themselves, which have been thoroughly examined for more than 30 years, leaving almost none of the more common species uninvestigated, their associated microflora, i.e. bacteria and fungi, have been largely neglected by natural product chemists. The microorganisms used for the present work were isolated, identified, and cultivated in the groups of Dr. K. Schaumann (Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Bremerhaven), Prof. J. Imhoff (Institut für Meereskunde, Kiel), and Prof. W. E. G. Müller (Universität Mainz). Thus a total of 13 new and 21 known compounds were identified.

In detail, the following results have been obtained:

- A dereplication procedure has been established, *i.e.* a method for recognizing known compounds at an early stage of the screening. Fast dereplication is essential for the efficient isolation of new natural products. For that reason, extracts of the marine fungi were investigated using the coupled HPLC techniques HPLC-UV, -MS, and -NMR as a powerful dereplication tool. The spectroscopical data thus gained were then compared to those from natural products databases. With the help of this method it was possible to detect several common fungal metabolites, namely mycophenolic acid (**9**), roquefortine C (**18**), griseofulvine (**19**), asperphenamate (**21**), and cyclopiazonic acid (**20**). The likewise known compounds cochliodinol (**74**) and nafuredin (**73**) were identified after isolation by preparative HPLC using regular 'off-line' methods.

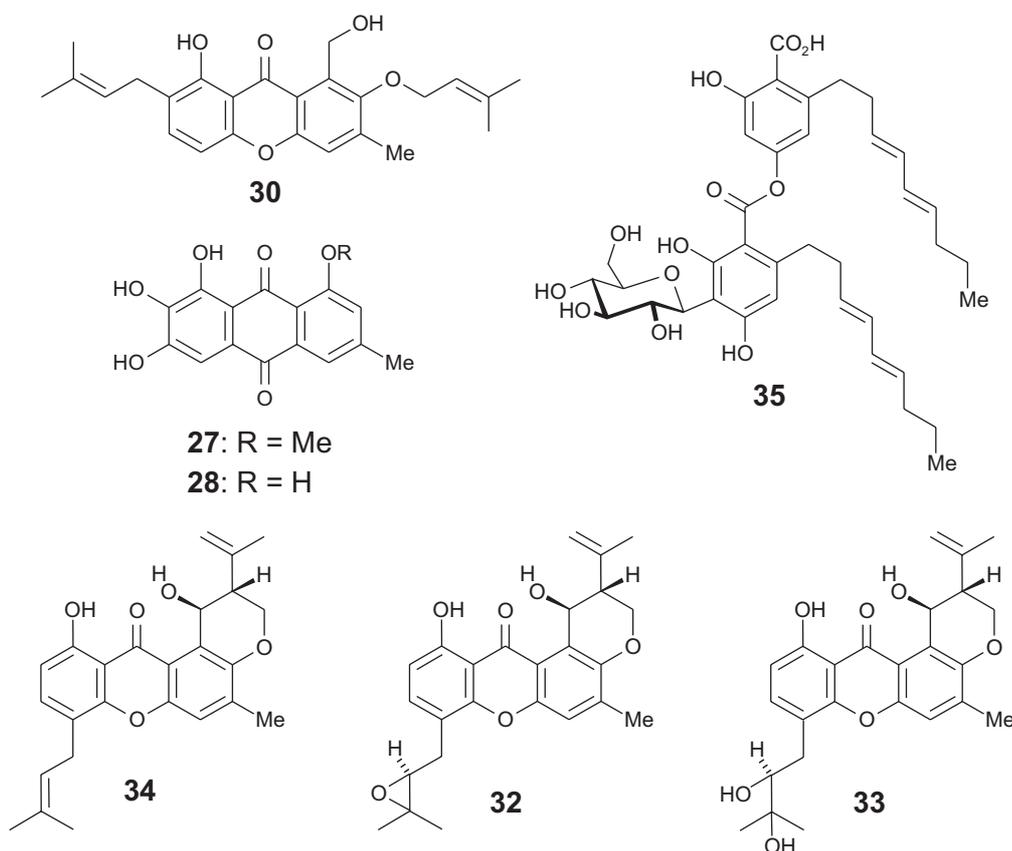


- One fungus isolated from the sponge *Petrosia ficiformis* and morphologically and chemotaxonomically identified as *Penicillium brevicompactum* was found to produce two compounds whose peptidic structures were obvious from their HPLC-¹H-NMR spectra. Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC), a new liquid-liquid chromatographic method, and subsequent gel chromatography gave the two peptides in a pure form and allowed for structural elucidation by conventional NMR and MS methods. Thus, the new compounds, named petrosifungin A (**23**) and B (**24**), were

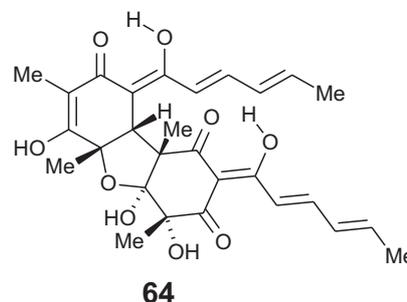
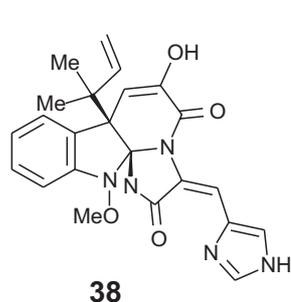


shown to be cyclodepsipeptides, both containing two units of the nonproteinogenic amino acid pipercolinic acid. The absolute configurations of the single amino acids were determined to be all L by hydrolysis, derivatization with chiral reagents, and subsequent HPLC analysis. For the derivatization, two different reagents were compared, Marfey's reagent and GITC. Besides the petrosifungins, several metabolites characteristic of *P. brevicompactum* were identified, brevianamide A (**22**), mycophenolic acid (**9**; see above), and asperphenamate (**21**; see above).

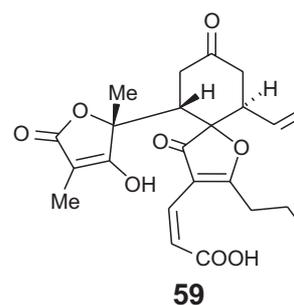
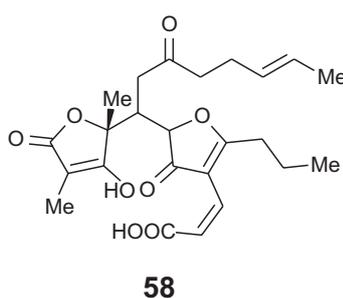
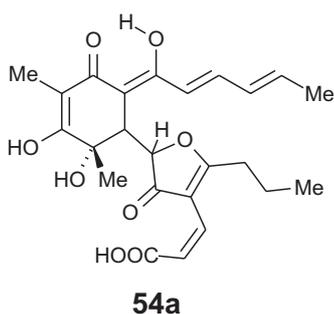
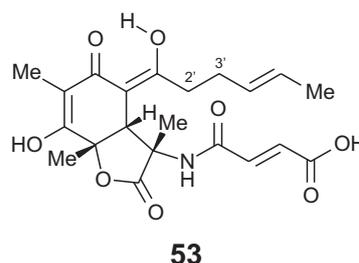
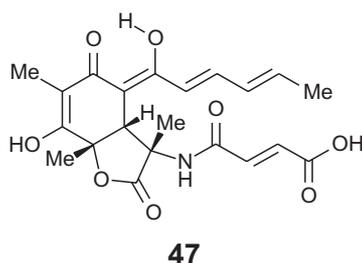
- A strain of *Emericella varicolor*, which was isolated from the sponge *Haliclona valliculata*, yielded a number of compounds with quite diverse structures. Two polyhydroxylated anthraquinones were identified, the known 7-hydroxyemodine (**28**) and its previously unknown *O*-methylated derivative evariquinone (**27**), which exhibited moderate cytotoxic activity. The fungus also produced several prenylxanthenes, namely the known shamixanthone (**34**) and the new natural product isoemericellin (**30**). Tajixanthone hydrate (**33**), which is an artifact formed by hydrolysis of the epoxidic compound tajixanthone (**32**), was found to inhibit the biofilm-formation properties of clinically relevant strains of *Staphylococcus*. The structure of the known *C*-glycosidic depside stromemycin (**35**) was investigated using various NMR experiments including proton decoupling and spin system simulation. Thereby, the previously unknown relative configuration of the monosaccharide moiety and the configurations of the double bonds were elucidated.



- Several strains of *Penicillium chrysogenum*, which were derived from different sponge samples belonging to the species *Ircinia fasciculata* and *Chondrosia reniformis*, were chemically investigated. By HPLC they were all shown to possess identical metabolite patterns and therefore belonged to the same chemovar of this fungal species. These fungi produced the known tremorgenic alkaloids meleagrine (**38**) and roquefortine C (**18**; see above) as well as a range of sorbicillin-derived compounds with mainly unprecedented structures. Among these, bisvertinolone (**64**) was the only known natural product. The others belonged neither to the class of bisvertinoids, dimeric sorbicillin-derived compounds, nor to the simple oxygenated sorbicillin derivatives, but had unique, novel-type structural features never observed before in this class of natural products.

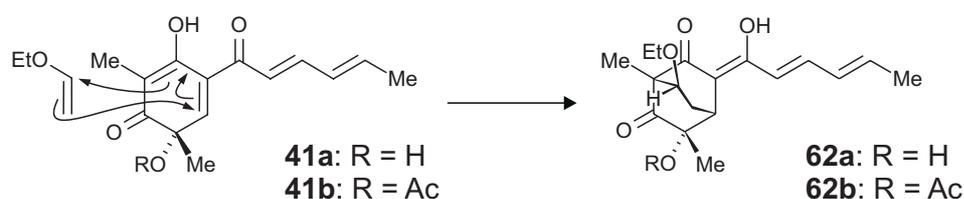


Two of these novel compounds were sorbicillactone A (**47**) and 2',3'-dihydrosorbicillactone A (**53**), the first nitrogen-containing compounds derived from sorbicillin. The former exhibited highly selective activity against L5178y cells with an ED₅₀ of 2 μg/mL and is anti-HIV active *in vitro* at an even lower concentration (<1 μg/mL). Sorbifuranone A (**54a**), a further sorbicillin derivative, has an unusual 2,3-

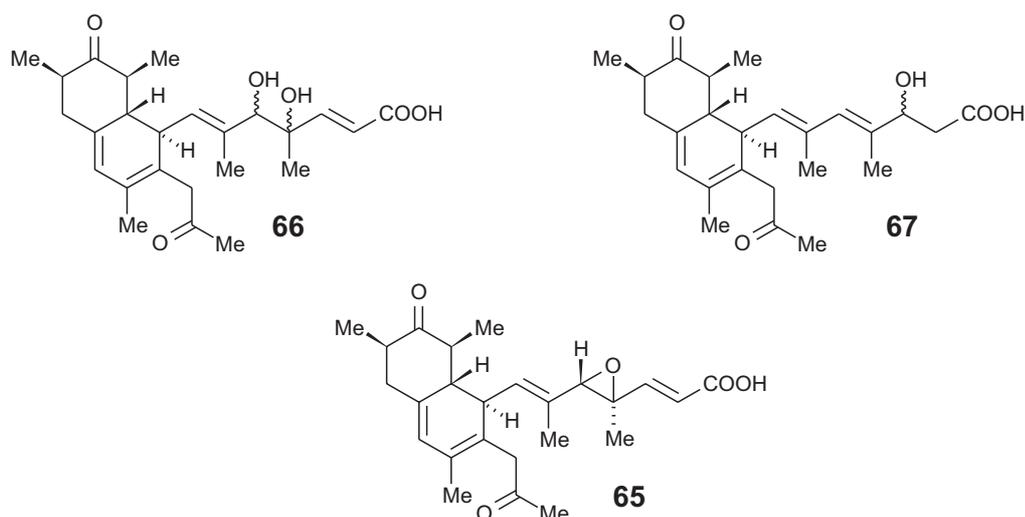


dihydro-3-furanone moiety, which is probably formed by oxidative cleavage of a aromatic pentaketide. Sorbifuranone A is probably the biogenetic precursor of the likewise isolated new *spiro*-compound sorbifuranone C (**59**) via two rearrangement reactions. The third member of this new class of sorbifuranones, sorbifuranone B (**58**), presumably is derived from a hypothetical 2',3'-dihydrosorbifuranone A.

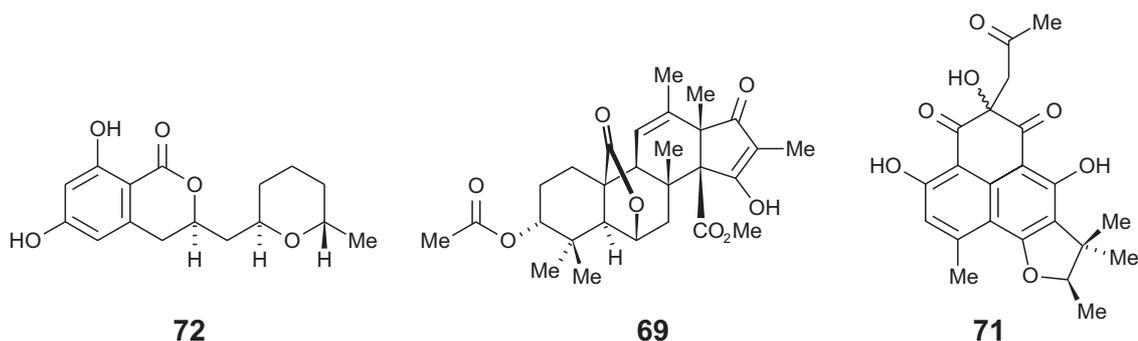
Feeding experiments with ^{13}C -labelled acetate suggested that **61**, a further isolated compound, was an artefact formed by Diels-Alder reaction of the highly unstable sorbicillinol (**41a**) with ethylvinyl ether. This hypothesis was substantiated by the reaction of *O*-acetylsorbicillinol (**41b**) and ethylvinylether, which gave **62b**.



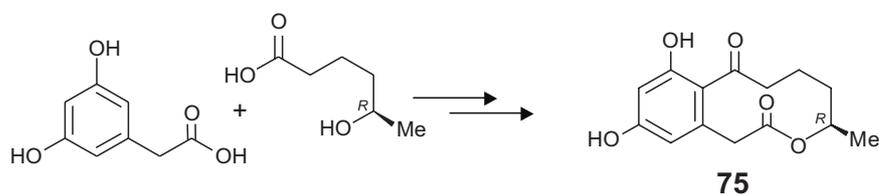
- A *Penicillium* sp. derived from the sponge *Petrosia ficiformis* also yielded a great variety of secondary metabolites. The fungus was found to produce **66** and **67**, two previously unknown derivatives of the antifungal compound hamigerone (**65**).



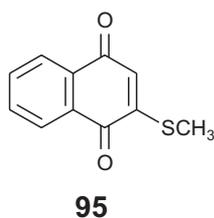
Furthermore, the known natural products cladosporin (**72**) and citreohybridonol (**69**) were identified as well as compound **71**, which was most probably derived from atrovetinone by reaction with acetone.



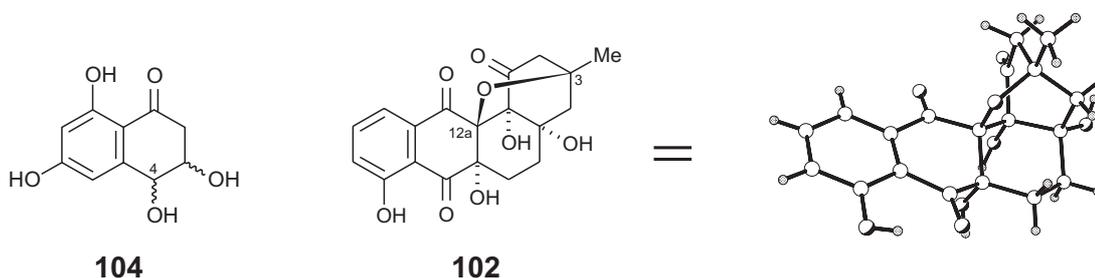
- To elucidate the absolute configuration of xestodecalactone A (**75**), a fungal metabolite isolated in the group of Prof. Proksch (University of Düsseldorf), both of its enantiomers as well as the racemate were synthesized. Comparing the natural product with both synthetic enantiomers by HPLC on a chiral phase, it was shown that natural xestodecalactone A (**75**) possesses the *R*-configuration.



- From an antiangiogenetically active extract of a bacterial strain derived from the sponge *Dysidea avara*, the highly active 2-methylthionaphthoquinone (**95**) was isolated. Although this compound had previously been prepared synthetically, it had not been known as a natural product.



- Structures of metabolites were elucidated which had been isolated in the group of Prof. Fiedler (Universität Tübingen) from extremophilic actinomycetes. Besides 4-hydroxycytalone (**104**), which had previously been known only as fungal metabolite, the unusual angucyclinone **102** was isolated. By NMR experiments, this compound was shown to be the first angucyclinone with an ether bridge between C-3 and C-12a. This unprecedented structure was verified by X-ray crystallography.



EXPERIMENTELLER TEIL

1 Allgemeine Methoden

1.1 Verwendete Meßgeräte

Schmelzpunkte (Schmp.): Die Schmelzpunkte wurden an einem ThermoVar-Kofler-Heiztisch-Mikroskop der Fa. Reichert-Jung bestimmt. Die angegebenen Werte sind nicht korrigiert.

Infrarotspektren (IR): Die Aufnahme der IR-Spektren erfolgte mit einem Perkin-Elmer-1420-Spektrometer. $\tilde{\nu}$ bezeichnet die Wellenzahl. Die Intensitäten der Absorptionsbanden sind gekennzeichnet durch: s = stark, m = mittel, w = schwach und br. = breit.

Kernresonanzspektren ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$): Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden an den Spektrometern Avance 400 und DMX 600 (400 und 600 MHz bzw. 100 und 150 MHz) der Firma Bruker bei Raumtemperatur aufgenommen. Zur Akquisition der HPLC-NMR-Spektren wurde ein 60- μL -Durchflussprobenkopf verwendet, der mit einer z-Gradientenspule ausgestattet war. Die chemischen Verschiebungen sind in Einheiten der δ -Skala angegeben und beziehen sich auf $\delta_{\text{TMS}} = 0$. Zur Eichung der ^1H -NMR-Spektren dienen die Resonanzsignale der Restprotonen der deuterierten Lösungsmittel als interner Standard [z.B. $\delta(\text{CDCl}_3) = 7.26$; $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.31$, $\delta\text{-Aceton-d}_6 = 2.05$] und bei den ^{13}C -NMR-Spektren die ^{13}C -Resonanzsignale der verwendeten Lösungsmittel [$\delta(\text{CDCl}_3) = 77.0$; $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.15$, $\delta\text{-Aceton-d}_6 = 29.8$]. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit der XWIN-NMR-Software (Bruker), iterative Spinsystemberechnungen wurden mit dem WIN-DAISY-Programm (Bruker) durchgeführt. Signalmultiplizitäten sind wie folgt abgekürzt: Singulett = s, Dublett = d, doppeltes Dublett = dd, Triplett = t, doppeltes Triplett = dt, Quartett = q, doppeltes Quartett = dq, Quintett = qui, doppeltes Quintett = dquin, Septett = sep, Multipllett = m, zentriertes Multipllett = m_c . Die Angabe der Kopplungskonstanten J erfolgte in Hertz (Hz). In der Schreibweise nJ gibt n die Anzahl der dazwischen liegenden Bindungen wieder.

Massenspektren (MS): Elektronenstoß-Massenspektren (EI) und hochauflösende Elektronenstoß-Massenspektren (HREIMS) wurden mit dem Spektrometer MAT-8200 der Firma Finnigan bei einem Ionisationspotential von 70 eV aufgenommen. Die in Klammern gesetzten Zahlen geben die Intensität bezogen auf den Basispeak ($I = 100\%$) an. Die Messung der CI-, DCI- und FAB-Spektren erfolgte mit Hilfe des Geräts Finnigan MAT-90, unter Verwendung von *i*Butan, Methan oder Ammoniak als Ionisationsgas. Electrospray-Massenspektren (ESIMS) wurden, sowohl in Kopplung mit der HPLC (HPLC-MS) als auch im stand-alone-Betrieb, mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer TSQ 7000 der

Firma *Finnigan* aufgenommen (Kapillarentemperatur: 210 °C; ESI-Spannung: 3.5 kV; N₂ als Hilfsgas). Einige der ESI-Massenspektren wurden auf einem *Agilent-1100*-System gemessen.

Elementaranalysen: Die Bestimmung der gewichtsprozentualen Anteile an Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff und Schwefel wurden im Institut für Anorganische Chemie der Universität Würzburg mit Hilfe des Gerätes *Leco CHNS-932* durchgeführt. Bei den isolierten Naturstoffen war in der Regel zu wenig Substanzmenge für eine Elementaranalyse vorhanden.

Drehwerte: Zur Ermittlung der optischen Aktivitäten diente ein Polarimeter der Fa. *Perkin-Elmer*. Bei einer Spaltbreite von 1 mm wurden die spezifischen Drehwerte $[\alpha]_D$ bei den Wellenlängen $\lambda = 546$ nm und $\lambda = 579$ nm der Quecksilberdampfampe bestimmt. Dann wurde mit Hilfe der Drude-Gleichung^[174] auf die Natrium-D-Line ($\lambda = 589$ nm) extrapoliert:

$$\alpha_{589} = \frac{\alpha_{579} \times 3.199}{4.199 - \frac{\alpha_{579}}{\alpha_{546}}} \quad [\alpha] = \frac{\alpha \times 100}{c \times d}$$

α : gemessener Drehwert; c: Konzentration [g/100 mL]; d: Schichtdicke [dm].

Die Angabe der ermittelten Drehwerte erfolgt in °.

Ein Teil der Drehwerte wurde auf einem P-1020-Polarimeter der Fa. *Jasco* direkt bei der Natrium-D-Line ($\lambda = 589$ nm) gemessen.

Circulardichroismus (CD): CD-Spektren wurden an einem *Jasco-J-715*-Spectropolarimeter (Fa. *Jasco*) aufgenommen und mit der dazugehörigen Software verarbeitet. Die differentiellen Absorptionskoeffizienten $\Delta\epsilon$ [cm²/mol] bei einer bestimmten Wellenlänge λ [nm] wurden im angegebenen Lösungsmittel und bei der angegebenen Konzentration [g/100 mL] bestimmt.

Röntgenbeugungsanalysen: Bei der Aufnahme der Röntgenstrukturanalysen von AK1030B (**102**) kam ein *Bruker-Smart-APEX*-Detector mit D8-Goniometerkopf zum Einsatz, wobei der verwendete Kristall auf die angegebene Temperatur abgekühlt wurde.^[175] Zur Integration der Reflexintensitäten wurde SAINT^[176] (*Bruker*) verwendet. Die Adsorptionskorrekturen erfolgten empirisch unter Verwendung von SADDABS II.^[177] In allen Fällen wurden die Strukturen durch direkte Methoden gelöst (SHELXS-97)^[178] und das Strukturmodell durch "full matrix least square calculations" gegen F^2 verfeinert. Das verwendete Programmpaket war hierbei SHELLXTL-97.^[179] Die Nichtwasserstoffatome wurden anisotrop verfeinert. Die Wasserstoffatome wurden nach Bestimmung der Hybridisierung der Nichtwasserstoffatome idealisiert berechnet und isotrop verfeinert. Die Erstellung der Graphiken erfolgte mit XP in SHELLXTL-97.^[179]

1.2 Chromatographische Methoden

Dünnschichtchromatographie (DC): Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma *Merck* verwendet. Als Fließmittel wurde meist das saure "TEF-System" (Toluol/Ethylacetat/Ameisensäure 5:4:1) und das "CAP-System" (Chloroform/Aceton/Isopropanol 85:15:20) verwendet.^[37] Zur Detektion der Substanzen wurde die Fluoreszenzlöschung bei 254 nm, die Anregung der Eigenfluoreszenz bei 366 nm sowie das Färbeverhalten gegenüber Iod oder 5proz. Schwefelsäure in Methanol genutzt.

Säulenchromatographie (SC): Als Säulenfüllmaterial wurde Kieselgel 0.063-0.2 mm der Firma *Merck* benutzt. Die Säulen wurden nass befüllt, und die Angabe des Fließmittelzusammensetzung erfolgt in allen Fällen in Volumenprozent. Zur Gelchromatographie wurde Sephadex LH-20 eingesetzt.

Präparative Schichtchromatographie (PSC): Es wurden 20x20-cm-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄ der Fa. *Merck* mit Konzentrierungszone und einer Schichtdicke von 1 oder 2 mm benutzt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC): Analytische HPLC mit UV-Detektion wurde auf einer computergesteuerten Anlage der Firma *Jasco* durchgeführt (Entgasungseinheit DG1580, Mischer LG-1580, Pumpe PU-1580, Säulenofen CO-1560, Probenwechsler AS-1555, Diodenarraydetektor MD-1510). Falls nicht anders angegeben wurden für die HPLC-UV- und HPLC-MS-Läufe eine Symmetry-C₁₈-Säule (*Waters*; 2.1 x 150 mm) und der folgende Lösungsmittelgradient verwendet: Wasser (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss: 0.4 mL/min; 0 min 10 % B, 25 min 25 % B, 35 min 97 % B, 45 min 97 % B. Zur Ermittlung der Anzahl austauschender Protonen wurde dieser Gradient in der HPLC-MS auch mit D₂O an Stelle von H₂O eingesetzt. Für die HPLC-NMR-Experimente wurde eine größere Symmetry-C₁₈-Säule (*Waters*; 4.6 x 250 mm) und folgendes Lösungsmittelsystem verwendet: D₂O + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B). Für die präparative HPLC wurde eine Anlage bestehend aus einer *Waters*-510-Pumpe, einem *Rheodyne*-7125-Injektor und einem *Waters*-484-Diodenarraydetektor eingesetzt. Als Säule für die präparativen HPLC-Trennungen wurde eine SymmetryPrep-C₁₈-Säule (*Waters*; 19 x 300 mm) benutzt. Die produkthaltigen Fraktionen aus der präparativen HPLC wurden vereinigt und der Acetonitrilanteil im Vakuum abgedampft. Zur Abtrennung der Trifluoressigsäure aus dem HPLC-Eluens wurde die Lösung anschließend durch eine mit Methanol und Wasser vorkonditionierte RP-18-Kartusche (*Merck*, mit 500 mg RP-18-Material) gesaugt. Nach Waschen mit etwas Wasser wurden die am Adsorbens gebundenen Substanzen mit Methanol eluiert.

HPLC-CD-Kopplung: Das chromatographische System bestand aus einer HPLC-Pumpe der Fa. *Jasco* (PU-1580), einem Entgaser der Fa. *Gastorr* und einem Gradientenmischer LG-980-02S (Fa. *Jasco*). Als CD-Detektor wurde ein J-715-Spectropolarimeter (*Jasco*) verwendet, das mit einer über ein Motorventil (Fa. *Besta*) angesprochenen Standard-Flusszelle der Fa. *Jasco* betrieben wurde.

HPLC-NMR-Kopplung: Das HPLC-System bestand aus einer Niederdruckgradientenpumpe LC22 (Fa. *Bruker*), einem *Rheodyne*-Injektor 7725i mit 250- μ L-Probenschleife und einem Lambda-1000-UV-Detektor (Fa. *Bischoff*). Die UV-Messzelle (0.01 cm Strahlengang) war über eine ca. 3 m lange Kapillarleitung (0.25 mm I.D.) direkt über das Interface BPSU (*Bruker* Peak Sampling Unit) mit dem NMR-Durchflussprobenkopf verbunden. Die Programme ChromStar und BPSU-12 (Fa. *Bruker*) steuerten das HPLC-System und das BPSU-Interface. Alle HPLC-NMR-Experimente wurden an einem DMX-600-Spektrometer ($B_0 = 14.09$ T) durchgeführt. Als Probenkopf diente bei allen Gradientenexperimenten ein invers konstruierter (^1H , ^{13}C)-Kopf mit einer 60- μ L-Durchflusszelle (Innendurchmesser 3 mm) und z -Gradientenspule. Datenaufnahme und Prozessierung erfolgten mit der Software XWinNMR von *Bruker*. Es wurden überwiegend die Standard-Pulsprogramme und Automatisationsroutinen der Fa. *Bruker* verwendet, die mit einer WET-Lösungsmittelunterdrückung^[40] arbeiten. Bei zweidimensionalen Experimenten wurden teilweise eigens modifizierte Pulsprogramme eingesetzt.^[180]

Fast Centrifugal Partitioning Chromatography (FCPC): Für die Flüssig-flüssig-Chromatographie wurde ein FCPC-System der Fa. *Kromaton*^[50] eingesetzt, welches mit einem 200-mL-Rotor ausgestattet war. Als Pumpe wurde eine P402 (*Latek*) benutzt.

Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC): Hier wurden die Pumpe P400 der Fa. *Latek* und ein *Rheodyne*-PTFE-Probenaufgabeventil verwendet. Zur Trennung benutzte man eine Lobar-Fertigsäule (25 x 310 mm; LiChroprep RP-18, 40-63 μ m, Größe B) der Fa. *Merck*. Die Detektion erfolgte mit einem *Latek*-UV-Detektor.

2 Isolierung von Naturstoffen aus Schwamm-assoziierten Pilzen

2.1 Extraktion der Pilzkulturen und Aufarbeitung der Extrakte

Zur Abtrennung des Mycels wurden die von S. Steffens^[27] angezogenen 300-mL-Kulturen über einen Papierfilter filtriert und das Mycel mit etwas Wasser gewaschen. Man extrahierte das Filtrat dreimal mit je 70 mL EtOAc und das Mycel zweimal mit je 150 mL MeOH/CH₂Cl₂ (1:1). Man vereinigte beide Extrakte und dampfte sie im Vakuum bis zur Trockne ein. Der Rückstand wurde in 60 mL MeOH + 3 % H₂O aufgenommen und zweimal mit je 30 mL PE extrahiert. Man filtrierte PE- und MeOH-Phasen und dampfte sie zur Trockne ein. Vor der weiteren Auftrennung durch präp. HPLC entsalzte man die Methanolfractionen der entsprechenden Extrakte durch Lösen in EtOAc und Waschen mit etwas Wasser.

Man untersuchte alle so gewonnenen Pilzextraktfraktionen durch DC (TEF- und CAP-System) und unterog alle Methanolfractionen einer analytischen HPLC-UV, wobei 20 µL einer Lösung von 2.5 mg Extrakt in einem mL MeOH injiziert wurden. Bei den Extrakten, die im HPLC-UV-Chromatogramm signifikante Substanzpeaks zeigten wurden HPLC-MS-Läufe mit H₂O und D₂O durchgeführt. Einige besonders interessante Extrakte untersuchte man noch durch HPLC-NMR.

Die *Zentaris AG* testete Proben der Pilzextrakte auf ihre Cytotoxizität. Die Hemmhofassays gegen *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* und ein nicht identifiziertes Schwamm-assoziiertes Bakterium wurden in der Arbeitsgruppe von U. Hentschel durchgeführt.

2.2 Untersuchung der Pilzextrakte im *Artemia salina*-assay

Von allen Extrakten (MeOH- und PE-Fractionen) wurden je 400 µg in 50 µL DMSO aufgenommen. Zu diesen DMSO-Lösungen gab man jeweils 1950 µL Meerwasser und zehn frisch geschlüpfte *Artemia-salina*-Nauplien. Nach 24 h wurden die toten, die geschädigten und die lebenden Shrimps ausgezählt. Für aktive Extrakte wurde der Test dreifach wiederholt.

Tabelle 3. Im *Artemia-salina*-Test aktive Pilzextrakte.

Pilzextrakt	Tote/geschädigte/lebende Nauplien
E00-2/6c-MeOH	9/12/9
E00-2/6c-PE	8/1/21
E00-2/7-MeOH	6/2/22
E00-2/7-PE	2/1/17
Kontrolle	0/0/30

2.3 HPLC-UV, -MS, -NMR und -CD-Untersuchungen des Pilzstammes E00-24/37

Die HPLC-UV- und HPLC-MS-Chromatogramme des Extraktes des Pilzstammes E00-24/37 zeigten für die Hauptinhaltsstoffe Roquefortin C (**18**), Griseofulvin (**19**) und Cyclopiazonsäure (**20**) drei intensive Substanzpeaks mit folgenden Daten:

Tabelle 4. HPLC-UV- und HPLC-MS-Daten der Hauptmetaboliten von E00-24/37.

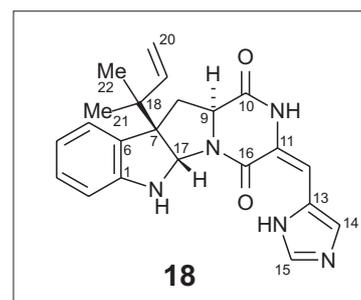
Substanz	UV-Maxima [nm]	m/z [M+H] ⁺	m/z [M _{H→D} +D] ⁺
Roquefortin C	203, 235, 303	390.1	394.3
Griseofulvin	215, 235, 291, 323	352.9	354.0
Cyclopiazonsäure	219, 279	337.2	340.3

Für die HPLC-NMR-Experimente löste man die Methanolfraction (289 mg) des Extraktes in 3 mL MeCN/MeOH-d₄ (1:1) und filtrierte diese Lösung. 100 µL des Filtrats wurden in die HPLC injiziert und mit folgendem Lösungsmittelgradienten aufgetrennt: 0 min 15 % B, 30 min 100 % B, 35 min 100 % B (Fluss 1 mL/min). Roquefortin C (**18**), Griseofulvin (**19**) und Cyclopiazonsäure (**20**) eluierten nach 12.3, 17.9 bzw. 23.7 min. Von diesen Verbindungen wurde je ein online-¹H-Spektrum gemessen. Durch Vergleich dieser NMR-Daten mit den Suchergebnissen der Datenbankrecherche wurden die Substanzen identifiziert. Die NMR-Daten stimmten gut mit den jeweiligen Strukturen überein.

Roquefortin C (**18**)

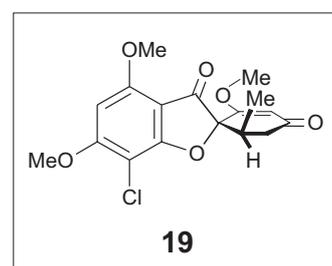
Online-¹H-NMR (600 MHz, MeCN/D₂O): δ = 0.98 (s, 3 H, CH₃), 1.09 (s, 3 H, CH₃), 2.46 (t, J = 12.1 Hz, 1 H, CH), 4), 4.09 (m, 1 H, CH), 5.09 (m, 2 H, CH₂), 5.64 (s, 1 H, CH), 6.01 (dd, J = 17.3, 10.9 Hz, 1 H, CH), 6.36 (s, 1 H, CH), 6.66 (d, J = 7.4 Hz, 1 H, Aryl-CH), 6.82 (t, J = 7.8 Hz, 1 H, Aryl-CH), 7.14 (t, J = 7.3 Hz, 1 H, Aryl-CH), 7.27 (m, 1 H, Aryl-CH), 7.66 (s, ~0.7 H, NH), 8.63 (s, ~0.5 H, NH).

Online-CD (Elliptizität θ in mdeg): θ_{216} +29.8, θ_{240} +3.0, θ_{251} +5.5, θ_{307} -53.1.



Griseofulvin (**19**)

Online-¹H-NMR (600 MHz, MeCN/D₂O): δ = 0.89 (s, 3 H, CH₃), 2.42 (d, J = 10.3 Hz, 1 H, CH), 2.81 (m, 2 H, CH₂),

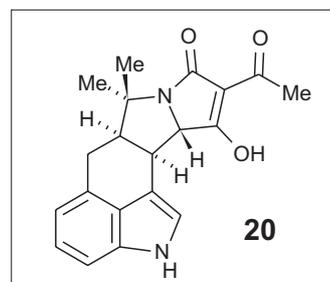


3.65 (s, 3 H, OCH₃), 3.87 (s, 3 H, OCH₃), 4.03 (s, 3 H, OCH₃),
5.64 (s, 1 H, Vinyl-CH), 6.38 (s, 1 H, Aryl-CH).

Online-CD (Elliptizität θ in mdeg): θ_{205} -5.8, θ_{219} -78.0,
 θ_{237} +92.2, θ_{267} +5.0, θ_{286} +24.0, θ_{291} +20.0, θ_{300} +36.9.

Cyclopiazonsäure (**20**)

Online-¹H-NMR (600 MHz, MeCN/D₂O): δ = 1.57 (s, 3 H, CH₃), 1.62 (s, 3 H, CH₃), 1.71 (d, J = 12.4 Hz, 1 H, CH), 2.13 (s, 1 H, CH), 2.38 (m, 2 H, CH₂), 2.39 (s, 3 H, Acyl-CH₃), 2.59 (q, J = 6.2 Hz, 1 H, CH), 3.03 (d, J = 8.5 Hz, 2 H, CH₂), 3.64 (m, 1 H, CH), 4.12 (d, J = 11.0 Hz, 1 H, CH), 6.85 (d, J = 13.8 Hz, 1 H, Aryl-CH), 7.10 (m, 1 H, Aryl-CH), 7.11 (s, 1 H, Aryl-CH), 7.22 (d, J = 12.0 Hz, 1 H, Aryl-CH).



Online-CD (Elliptizität θ in mdeg): θ_{215} -98.9, θ_{238} +23.9,
 θ_{274} -5.9.

2.4 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Penicillium brevicompactum* E00-1/14b

2.4.1 Pilzmaterial, Extraktion und HPLC-Untersuchungen

Der aus dem Inneren eines Schwammes der Art *Petrosia ficiformis* POIRET (Petrosiidae), gesammelt in einer Tiefe von 11-14 m vor dem Capo S. Andrea auf Elba, Italien, isolierte Pilz wurde über morphologische Kriterien als *Penicillium brevicompactum* identifiziert. Für die chemischen Untersuchungen wurde er als Standkultur in 30 l-Erlenmeyerkolben mit je 300 mL WS-Flüssigmedium^[28] angezogen und nach einer Wachstumsperiode von 14 Tagen mit 10 % EtOAc versetzt. Isolierung, Identifizierung und Anzucht erfolgten durch S. Steffens.^[27]

Das Pilzmycel wurde durch Filtration vom Kulturmedium getrennt und erschöpfend mit MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) extrahiert. Das Filtrat extrahierte man dreimal mit je 1 L EtOAc. Beide Extrakte trocknete man und partitionierte sie anschließend zwischen MeOH/Wasser (9:1) und PE. Die Methanolphasen wurden wiederum getrocknet und zwischen EtOAc und Wasser partitioniert. Die Ethylacetat-Fractionen ergaben nach dem Trocknen 1.18 g und 0.80 g Extrakt aus Mycel bzw. Kulturmedium.

Für die HPLC-NMR wurden 50 mg des Mycelextraktes in 1 mL MeOH-d₄ - MeCN (1:1) gelöst. 100 μ L dieser Lösung wurden in die HPLC injiziert. Dabei wurde folgender Lösungsmittelgradient eingesetzt: 0 min 20 % B, 30 min 100 % B. Brevianamid A (**22**), Petrosifungin B (**24**), Mycophenolsäure (**9**) und Asperphenamat (**21**) eluierten nach 11.5, 12.2, 17.0 bzw. 23.5 min. Von diesen Verbindungen wurde je ein online-¹H-Spektrum

gemessen. Von Petrosifungin A (**23**) konnte kein Spektrum aufgenommen werden, da die Verbindung gleichzeitig mit Mycophenolsäure eluierte. Die Spektren von Petrosifungin B (**24**) und Brevianamid A (**22**) stimmten weitgehend mit den von den isolierten Substanzen gemessenen Spektren überein.

Folgende Verbindungen wurden anhand ihrer HPLC-UV, -MS und -NMR-Daten identifiziert:

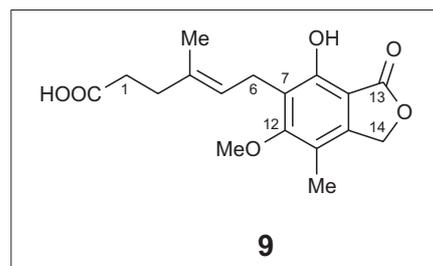
Mycophenolsäure (**9**):

MS (ESI, positiv): m/z 321 $[M+H]^+$;

m/z 324 $[M_{H \rightarrow D}+D]^+$.

UV: λ_{\max} (nm) 215, 251, 303.

Online- $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.76 (s, 3 H, 4- CH_3), 2.10 (s, 3 H, 11- CH_3), 2.22 (t, J = 7.5 Hz, 2 H, 4-H), 2.36 (t, J = 7.4 Hz, 2 H, 3-H), 3.35 (d, J = 6.8 Hz, 2 H, 6-H), 3.73 (s, 3 H, 12- OCH_3), 5.17 (t, J = 6 Hz, 1 H, 5-H), 5.23 (s, 2 H, 14-H).

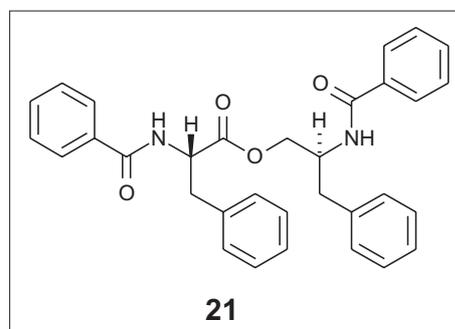


Asperphenamat (**21**):

MS (ESI, positiv): m/z 506 $[M+H]^+$;

m/z 508 $[M_{H \rightarrow D}+D]^+$.

UV: λ_{\max} (nm) 200 (Messbereichsgrenze).



HPLC- $^1\text{H-NMR}$: δ = 2.84 (dd, J = 13.8, 9.0 Hz, 1 H, Ar- CH_2), 2.91 (dd, J = 13.8, 6.1 Hz, 1 H, Ar- CH_2), 3.11 (dd, J = 13.9, 9.3 Hz, 1 H, Ar- CH_2), 3.25 (dd, J = 13.9, 6.0 Hz, 1 H, Ar- CH_2), 4.08 (dd, J = 11.1, 6.0 Hz, 1 H, CHCH_2O), 4.38 (dd, J = 11.1, 4.1 Hz, 1 H, CHCH_2O), 4.54 (m, 1 H, HNCH), 4.81 (dd, J = 10.1, 5.9 Hz, HNCH), 7.2-7.3 (m, 10 H, Ar-H), 7.37 (t, J = 4.4 Hz, 2 H, Ar-H), 7.42 (t, J = 4.4 Hz, 2 H, Ar-H), 7.49 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, Ar-H), 7.52 (t, J = 7.6 Hz, 1 H, Ar-H), 7.63 (d, J = 7.9 Hz, 2 H, Ar-H), 7.67 (d, J = 7.9 Hz, 2 H, Ar-H).

Die spektroskopischen Daten stimmten mit früher veröffentlichten Werten überein.^[48]

2.4.2 Isolierung der Substanzen durch FCPC

Zur Ermittlung eines geeigneten Lösungsmittelsystems für die FCPC-Trennung partitionierte man je 1 mg Mycelextrakt in 10 mL verschiedener 2-Phasensysteme aus *n*-Heptan/EtOAc/MeOH/Wasser, von 1:9:1:9 bis 9:1:9:1. Je 1 mL der oberen und der unteren Phasen wurden getrocknet, in 500 μ L MeOH wieder gelöst und die relativen Konzentrationen der Pilzmetaboliten in den Proben durch analytische HPLC bestimmt. Die Verteilungskonstanten erhielt man durch Division der Peakfläche im Chromatogramm der oberen Phase durch die Peakfläche im Chromatogramm der unteren Phase.

Für die FCPC-Trennung verwendete man das 2:8:2:8-System. Als stationäre Phase wurde die obere Phase gewählt (Fluss 7 mL/min, Rotationsgeschwindigkeit 1300 min⁻¹). Nach 124 min wurde die stationäre Phase rückwärts mit MeOH herausgespült. Die Verbindungen Petrosifungin A (**23**), Petrosifungin B (**24**) und Brevianamid A (**22**) eluierten nach 140-154, 44-64 bzw. 80-110 min. Alle Verbindungen wurden durch Gelchromatographie mit MeOH als Fließmittel weiter gereinigt. Man erhielt nach dem Trocknen 39.8 mg Petrosifungin A (**23**), 35.0 mg Petrosifungin B (**24**) und 34.0 mg Brevianamid A (**22**).

Tabelle 5. Verteilungskonstanten der Metaboliten des Pilzes E00-1/14b in verschiedenen *n*-Heptan/EtOAc/MeOH/Wasser-Lösungsmittelsystemen.

Lösungsmittel-System	Substanz:				
	22	24	23	9	21
1:9:1:9	9.86	2.43	6.13	53.05	-
2:8:2:8	4.16	1.27	4.14	28.65	101.21
3:7:3:7	1.69	0.62	2.11	9.70	49.17
5:5:5:5	0.10	0.10	0.14	0.75	4.40
6:4:6:4	0.03	0.09	0.03	0.15	0.57
7:3:7:3	0.01	0.05	0.03	0.06	0.16

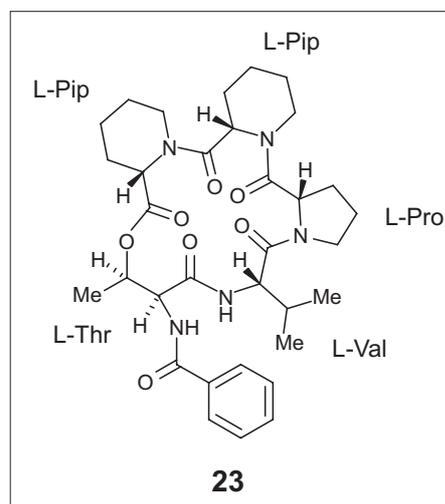
2.4.3 Petrosifungin A (**23**)

Weißer amorpher Feststoff (39.8 mg)

Schmp. 162-164 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -56.2$ ($c = 0.5$ in MeOH).

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{199} +20.3$, $\Delta\epsilon_{225} -6.6$, $\Delta\epsilon_{252} +2.2$.



IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3436$ (br.), 2939 (m), 2871 (w), 1749 (m), 1649 (s), 1523 (m), 1447 (m), 1265 (w), 1235 (w), 1169 (m), 1030 (w), 715 (w), 647 (w) cm^{-1} .

Tabelle 6. NMR-Daten von Petrosifungin A (**23**) in Dioxan- d_8 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	COSY	HMBC	ROESY
<i>Pip1</i>					
CO	169.74	-			
α	54.25	4.36	β	$\beta, \gamma, \epsilon, \text{CO}, \text{Pip2-CO}$	<i>Pip2-α, Thr-NH</i>
β	27.50	1.74/1.86	α		
γ	19.28	~1.5-1.7	δ		
δ	24.65	1.30/1.80	ϵ, γ		
ϵ	39.19	3.14/4.13	δ	γ, δ	
<i>Pip2</i>					
CO	174.26	-			
α	51.18	4.71	β	$\beta, \gamma, \epsilon, \text{CO}, \text{Pro-CO}$	<i>Pip1-α, Val-α</i>
β	26.29	1.76/1.88	α, γ		
γ	19.47	~1.5-1.7	β		
δ	24.93	1.65/1.80	ϵ		
ϵ	42.90	3.65/3.73	δ		<i>Pro-α, Pro-β</i>
<i>Pro</i>					
CO	171.36	-			
α	59.10	4.58	β	$\beta, \gamma, \delta, \text{CO}$	<i>Pip2-ϵ, Val-α, Val-γ'</i>
β	30.37	1.92/2.31	α, γ	$\alpha, \gamma, \delta, \text{CO}$	<i>Pip2-ϵ</i>
γ	23.45	1.72/1.82	ϵ, β	α, β, δ	
δ	47.31	3.47/3.56	γ	β	
<i>Val</i>					
CO	171.32	-			
α	57.38	3.79	NH, β	$\beta, \gamma, \gamma', \text{CO}, \text{Thr-CO}$	$\gamma, \gamma', \text{Pip2-}\alpha, \text{Pro-}\alpha$
β	33.82	1.85	α, γ, γ'	α, γ, γ'	NH
γ	19.12	0.84	β	α, β, γ'	α
γ'	18.87	0.86	β	α, β, γ	$\alpha, \text{NH}, \text{Pro-}\alpha$
NH	-	7.29	α	$\alpha, \text{CO}, \text{Thr-CO}$	$\beta, \gamma', \text{Thr-}\alpha, \text{Thr-}\beta$
<i>Thr</i>					
CO	168.86	-			
α	56.05	4.77	NH, β	$\gamma, \text{CO}, \text{Bz-CO}$	$\gamma, \text{Val-NH}$
β	73.46	5.07	α, γ	$\gamma, \text{CO}, \text{Pip1-CO}$	NH, <i>Val-NH</i>
γ	17.29	1.29	β	α	$\alpha, \text{NH}, \text{Bz-(2, 6)}$
NH	-	7.19	α	$\text{CO}, \text{Bz-CO}$	$\beta, \gamma, \text{Bz-(2, 6)}, \text{Pip1-}\alpha$
<i>Bz</i>					
CO	167.49	-			
1	135.63	-			
2, 6	127.90	7.78	(3, 5)	(2, 6), 4, CO	<i>Thr-NH, Thr-γ</i>
3, 5	128.80	7.45	(2, 6), 4	1, (2, 6), CO	
4	131.63	7.5	(3, 5)	(2, 6)	

MS (ESI, positiv): m/z 624 $[\text{M}+\text{H}]^+$; m/z 626 $[\text{M}_{\text{H} \rightarrow \text{D}}+\text{D}]^+$.

MS (EI): m/z (%): 623 $[\text{M}]^+$ (37), 540 (7), 345 (44), 287 (54), 84 (100).

$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_7$:

Ber. 623.3319;

Gef. 623.3317

(EIMS).

2.4.4 Petrosifungin B (24)

Weißer amorpher Feststoff (35.0 mg)

Schmp. 210-212 °C (MeOH).

Tabelle 7. NMR-Daten von Petrosifungin B (24) in Dioxan-d₈.

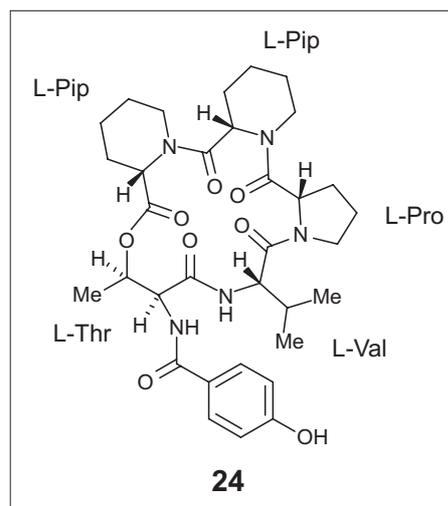
Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	COSY	HMBC	ROESY
<i>Pip1</i>					
CO	170.16	-			
α	54.58	4.40	β	β, γ, ε, CO, <i>Pip2</i> -CO	<i>Pip2-a</i>
β	27.84	1.73/1.87	α	α, CO	
γ	19.64	1.56/1.64	δ		
δ	25.05	1.30/1.77	γ, ε		
ε	39.58	3.14/4.13	δ	α, γ, δ	
<i>Pip2</i>					
CO	174.71	-			
α	51.55	4.72	β	β, γ, CO	<i>Pip1-α, Val-α</i>
β	26.65	1.73/1.87	α		
γ	19.81	1.50/1.64			
δ	25.23	1.63/1.76	ε		
ε	43.35	3.63/3.72	δ	α, γ, δ	<i>Pro-β, Pro-α</i>
<i>Pro</i>					
CO	171.73	-			
α	59.50	4.60	β	β, γ, δ	<i>Pip2-ε, Val-α, Val-γ'</i>
β	30.72	1.93/2.31	α, γ	α, γ, δ, CO	<i>Pip2-ε</i>
γ	23.80	1.70/1.80	β, δ	α, β, δ	
δ	47.70	3.47/3.56	γ	α, β, γ	
<i>Val</i>					
CO	171.67	-			
α	57.85	3.79	NH, β	β, γ, γ', CO, <i>Thr</i> -CO	γ, γ', <i>Pro-α, pOH-Bz-OH, Pip2-α</i>
β	34.17	1.86	α, γ, γ'	α, γ, γ'	NH
γ	19.45	0.84	β	α, β, γ'	α, NH
γ'	19.20	0.86	β	α, β, γ	α, <i>Pro-α</i>
NH	-	7.45	α	CO, <i>Thr</i> -CO	β, γ, <i>Thr-α, Thr-β</i>
<i>Thr</i>					
CO	169.85	-			γ
α	56.34	4.78	NH	γ, CO, <i>pOH-Bz</i> -CO	<i>Val</i> -NH
β	73.89	5.07	γ	γ, <i>Pip1</i> -CO	<i>Val</i> -NH
γ	17.62	1.27	β	α, β	α, NH, <i>pOH-Bz</i> -(2,6)
NH	-	7.03	α	a, <i>pOH-Bz</i> -CO	γ, <i>pOH-Bz</i> -(3, 5)
<i>POH-Bz</i>					
CO	167.32	-			
1	126.98	-			
2, 6	130.16	7.66	(3, 5)	(3, 5), 4, CO	OH, <i>Thr-γ</i>
3, 5	115.75	6.78	(2, 6)	1, 4	<i>Thr</i> -NH
4	160.93	-			
OH	-	8.49		(3, 5), 4	(2, 6), <i>Val-α</i>

$[\alpha]_D^{20} = -37.9$ ($c = 0.5$ in MeOH).

CD (MeOH): $\Delta\epsilon_{202} +13.2$, $\Delta\epsilon_{222} -7.4$, $\Delta\epsilon_{253} +0.7$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3431$ (br.), 2944 (m), 2872 (w), 1747 (m), 1638 (s), 1535 (w), 1501 (m), 1448 (m), 1266 (m), 1237 (m), 1169 (m), 1028 (w), 768 (w) cm^{-1} .

MS (ESI, positiv): m/z 640 $[\text{M}+\text{H}]^+$;
 m/z 642 $[\text{M}_{\text{H} \rightarrow \text{D}}+\text{D}]^+$.



MS (EI): m/z (%): 639 $[\text{M}]^+$ (2), 303 (7), 203 (16), 137 (19), 121 (100).

$\text{C}_{33}\text{H}_{45}\text{N}_5\text{O}_8$: Ber. 639.3268; Gef. 639.3264 (EIMS).

2.4.5 Marfey- und GITC-Analyse der Petrosifungine A (23) und B (24)

Säurehydrolyse der Petrosifungine:

Je 3 mg des Cyclodepsipeptids (**23** oder **24**) wurden in 2 mL 6 M HCl 24 h auf 110 °C erhitzt. Nach Abkühlen dampfte man die Lösung im Vakuum bis zur Trockne ein und nahm den Rückstand in 250 μL Wasser auf.

Derivatisierung mit 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranosylisothiocyanat (GITC; 25) und Analyse der Derivate:

Zu 50 μL der Hydrolysatlösung wurden 25 μL einer Et_3N -Lsg. (50 mg/mL MeCN) und 40 μL einer GITC-Lsg. (10 mg/mL MeCN) gegeben. Nach 40 min bei Raumtemperatur wurden 30 μL des Reaktionsgemisches in die HPLC injiziert. Zur Derivatisierung der als Standard verwendeten Aminosäuren fügte man zu je 20 μL einer Aminosäurelösung (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Wasser) 20 μL der Et_3N -Lsg. und 40 μL der GITC-Lsg. hinzu. Von dieser Lösung wurden 10 μL in die HPLC injiziert. Für die HPLC wurde eine Symmetry- C_{18} -Säule (Waters; 4.6 x 250 mm; 5 μm) und folgender Lösungsmittelgradient verwendet: Wasser + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss: 1.0 mL/min; 0 min 28 % B, 50 min 45 % B. Die Retentionszeiten (min) der einzelnen Aminosäurederivate waren: L-Thr 23.5, D-Thr 24.5, DL-*allo*-Thr 22.9 und 23.5, L-Pro 24.5, D-Pro 25.8, L-Val 30.3, D-Val 31.4, L-Pip 29.5, D-Pip 30.5.

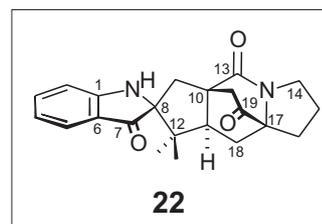
Derivatisierung mit 1-Fluor-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid (FDAA; Marfey's Reagenz; 26) und Analyse der Derivate:

Zu 50 μL einer 0.05 M Lösung der betreffenden Aminosäure (oder zu 50 μL der Hydrolysatlösung) wurden 100 μL einer FDAA-Lsg. (1 % in Aceton) gegeben. Nach Zugabe von 20 μL einer 1 M NaHCO_3 -Lsg. wurde das Reaktionsgemisch 1 h lang bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde durch Zugabe von 10 μL 2 M HCl die Reaktion angehalten, die Lösungsmittel wurden im Vakuum zur Trockne abgedampft, und der Rückstand in 1 mL MeOH/Wasser (1:1) aufgenommen. 5 μL dieser Lösung wurden einer HPLC-Analyse (Säule, Eluenten und Fluss: siehe vorhergehender Absatz) mit folgendem Lösungsmittelgradienten unterzogen: 0 min 23 % B, 45 min 48 % B. Die Retentionszeiten (min) der einzelnen Aminosäurederivate waren: L-Thr 12.7, D-Thr 16.2, DL-*allo*-Thr 12.7 und 14.1, L-Pro 18.9, D-Pro 20.5, L-Val 27.6, D-Val 34.3, L-Pip 28.6, D-Pip 26.2. Einer bessere Trennung der L-Thr- und DL-*allo*-Thr-Derivate wurde bei einem isokratischen Lauf mit 20 % B erzielt: L-Thr 25.8, DL-*allo*-Thr 27.2 und 33.6.

2.4.6 Brevianamid A (22)

Gelber amorpher Feststoff (34.0 mg).

Schmp. 230 °C (MeOH, subl.); Lit.: 220-242 °C (subl.).^[59]



$[\alpha]_D^{20} = +381$ ($c = 0.1$ in MeOH);

Lit.: +413 (ohne Konzentrationsangabe in EtOH).^[59]

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 0.82$ (s, 3 H, 12- CH_3), 1.08 (s, 3 H, 12- CH_3), 1.80 (dd, $J = 14.2, 7.3$ Hz, 18- H_α), 1.92 (m, 1 H, 16- H_α), ~2.0 (m, 1 H, 18- H_β), ~2.0 (m, 2 H, 15-H), 2.44 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H, 9- H_α), 2.57 (dd, $J = 10.0, 7.3$ Hz, 1H, 11-H), 2.64 (m, 1 H, 16- H_β), 2.70 (s, $J = 15.5$ Hz, 1 H, 9- H_β), 3.43 (t, $J = 6.4$ Hz, 2 H, 14-H), 6.71 (td, $J = 7.2, 0.9$ Hz, 1 H, 2-H), 6.84 (dt, $J = 8.3, 0.8$ Hz, 1 H, 4-H), 7.44 (m, 1 H, 3-H), 7.44 (m, 1 H, 5-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 18.9$ (12- CH_3), 26.0 (C-15), 26.6 (12- CH_3), 29.1 (C-18), 30.0 (C-16), 37.2 (C-9), 45.0 (C-14), 50.0 (C-12), 56.1 (C-11), 68.9 (C-10), 71.0 (C-17), 80.8 (C-8), 112.7 (C-4), 119.0 (C-2), 121.3 (C-6), 125.1 (C-5), 139.2 (C-17), 162.7 (C-1), 172.3 (C-13), 175.3 (C-19), 203.4 (C-7).

MS (ESI, positiv): m/z 407 $[\text{M}+\text{MeCN}+\text{H}]^+$; m/z 410 $[\text{M}_{\text{H}\rightarrow\text{D}}+\text{MeCN}+\text{D}]^+$.

MS (EI): m/z (%): 365 $[M]^+$ (95), 296 (100), 268 (28), 220 (17), 165 (23), 133 (25).

Die spektroskopischen Daten stimmten mit früher Veröffentlichten überein.^[59]

2.5 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Emericella varicolor* E00-6/3

2.5.1 Pilzmaterial, Extraktion und Isolierung der Inhaltsstoffe

Der Pilz wurde von Steffens^[27] aus dem Inneren eines Schwammes der Art *Haliclona valliculata* GRIESSINGER (Haliclonidae) isoliert, welcher in 20-30 m Tiefe im Secca di Capo di Fonza (Elba, Italien) gesammelt worden war. Dieser Pilz wurde als *Emericella varicolor* BERK. & BROOME (Trichocomaceae) identifiziert, für die chemische Untersuchung als 10-L-Standkultur in WS-Flüssigmedium^[28] angezogen und nach einer Wachstumsperiode von 14 d mit 10 % EtOAc versetzt.

Kulturmedium und Pilzmycel wurde wie oben beschrieben (siehe 2.4.1) extrahiert. Mycel- und Mediumextrakt wurden vereint und zwischen MeOH + 25 % Wasser und Petrolether partitioniert. Das bereits extrahierte Medium säuerte man mit 100 mL conc. wässr. HCl an und extrahierte es wieder mit EtOAc.

Für die HPLC-NMR-Experimente löste man 10 mg der Methanolfraction des Mediumextraktes in 1 mL MeCN/Wasser (9:1). Von dieser Lösung wurden 75 μ L einer HPLC unter folgenden Bedingungen unterzogen: Säule: Symmetry C₁₈ 3.9 x 150 mm (Waters); D₂O + 0.5 % TFA (A), MeCN (B); Fluss 1 mL/min; 0 min 15 % B, 20 min 100 % B. Von Evarichinon (**27**) und 7-Hydroxyemodin (**28**) wurden nach 10.5 bzw. 15.0 min online-¹H-NMR-Spektren aufgenommen. Die Spektraldaten entsprachen weitgehend denen der isolierten Reinsubstanzen (siehe auch Abb. 12, S. 16).

Zur Isolierung der Anthrachinone wurde die Methanolfraction des Mediumextraktes in EtOAc gelöst und durch Ausschütteln mit etwas Wasser entsalzt. Die getrocknete EtOAc-Phase trennte man durch präparative HPLC auf: Wasser (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 25 % B, 20 min 60 % B. Evarichinon (**27**) wurde nach 16 min eluiert und ergab nach Umkristallisation aus Methanol 15 mg orangefarbener Nadeln. 7-Hydroxyemodin (**28**) wurde nach 22 min eluiert, man erhielt 16.8 mg eines roten Pulvers.

Die Prenylxanthone wurden durch präparative HPLC aus der Petrolether-Fraktion des Kulturmediumextraktes gewonnen, dabei wurde folgender Gradient benutzt: Wasser (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 70 % B, 20 min 94 % B, 60 min 94 % B. Isoemicellin (**30**) wurde von 34 bis 36 min eluiert. Aufreinigung durch Kieselgel-Säulenchromatographie mit CH₂Cl₂ + 0.5 % MeOH als Eluent und anschließende Kristallisation aus CH₂Cl₂/MeCN ergaben 8 mg dünner gelber Nadeln. Shamixanthon (**34**)

wurde von 30 bis 32 min eluiert und ergab nach dem Trocknen 16.9 mg eines gelben Pulvers. Die nach 18 min eluierte Substanz wurde beim Trocknen durch den TFA-Gehalt des Eluenten hydrolysiert, das Hydrolyseprodukt reinigte durch eine weitere präparative HPLC (Säule: XTerra 19 x 300 mm (*Waters*); Wasser (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 10 % B, 30 min 100% B). Das Hydrolyseprodukt, Tajixanthonhydrat (**33**), eluierte nach 24.5 min. Nach dem Trocknen erhielt man 6.7 mg reines **33** als gelbes Pulver.

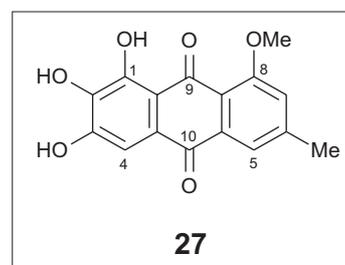
Stromemycin (**35**) wurde durch MPLC aus der Methanolfraction des Mycelextraktes gewonnen: Wasser (A), MeCN + 0.05 % (B); Fluss 5 mL/min; Stufengradient: 0 min 70 % B, 27 min 80 % B, 40 min 90 % B, 54 min 100 % B. Verbindung **35** wurde von 44 bis 51 min eluiert und durch Säulenchromatographie auf Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH/HCOOH (100:5:5) als Eluent weiter aufgereinigt. Diejenigen Fraktionen, die **35** enthielten, wusch man mit etwas Wasser, um die Ameisensäure zu entfernen, und trocknete sie anschließend. Man erhielt 56.6 mg Stromemycin (**35**) als rötliches Pulver.

Der EtOAc-Extrakt des angesäuerten Mediums wurde bis auf 200 mL eingengt und zweimal mit je 100 mL 0.1 M NaOH extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden mit HCl bis auf pH 1 angesäuert, zweimal mit je 100 mL EtOAc extrahiert und die organische Phase getrocknet. Säulenchromatographie des Rückstandes auf Kieselgel mit CH₂Cl₂/MeOH (95:5) als Eluent und anschließende MPLC mit MeCN/Wasser/TFA (15:85:0.1) als mobiler Phase führten zur Isolierung von 14.4 mg einer farblosen kristallinen Substanz, welche als 2-Furansäure (**105**) identifiziert wurde.

2.5.2 Evarichinon (**27**)

Orangerote Kristalle (15.0 mg).

Schmp. 238-242 °C (MeOH, subl.).



IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3466 (s), 1656 (w), 1620 (s), 1593 (s), 1460 (m), 1230 (s), 1170 (s) cm⁻¹.

MS (ESI, positiv): m/z 301 [M+H]⁺; m/z 305 [M_{H→D}+D]⁺.

MS (EI): m/z (%): 300 [M]⁺ (100), 282 (95), 254 (16), 198 (22), 170 (11).

C₁₆H₁₂O₆:

Ber. 300.0634;

Gef. 300.0634

(EIMS).

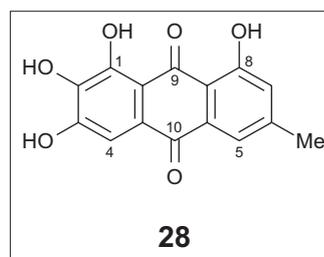
Tabelle 8. NMR-Daten von Evarichinon (**27**) in MeOH-d₄.

Position	¹ H [ppm]	¹³ C [ppm]	HMBC
1		152.0	
2		140.5	
3		152.7	
4	7.15 <i>s</i>	108.9	1/3, 2, 4a, 9a, 10
4a		125.9	
5	7.60 <i>d</i>	121.5	7, 10, 8a, 11
6		148.7	
7	7.25 <i>d</i>	119.8	5, 8, 8a, 11
8		162.3	
8a		119.3	
9		189.2	
9a		112.7	
10		183.2	
10a		136.8	
6-Me	2.45 <i>s</i>	22.2	5, 6, 7
8-OMe	3.95 <i>s</i>	56.9	8

2.5.3 7-Hydroxyemodin (**28**)

Rotes Pulver (16.8 mg).

Schmp. 293 °C (zers.); Lit.: 296-298 °C (zers.).^[68]



IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3328 (br.), 1668 (w), 1621 (s), 1564 (w), 1480 (w), 1418 (w), 1357 (m), 1274 (s), 1230 (m) cm⁻¹.

¹H-NMR (400 MHz, Aceton-d₆): δ = 2.46 (bs, 3 H, 6-CH₃), 7.10 (q, *J* = 0.76 Hz, 1 H, 7-H), 7.36 (s, 1 H, 4-H), 7.55 (d, *J* = 1.6 Hz, 1 H, 5-H).

¹³C-NMR (100 MHz, Aceton-d₆): δ = 22.1 (6-Me), 110.1 (C-4), 111.4 (C-9a), 114.8 (C-8a), 121.5 (C-5), 124.4 (C-7), 127.1 (C-4a), 134.7 (C-10a), 139.3 (C-2), 149.8 (C-6), 152.2 (C-1), 152.7 (C-3), 163.1 (C-8), 181.5 (C-10), 192.7 (C-9).

MS (ESI, positiv): *m/z* 287 [M+H]⁺; *m/z* 292 [M_{H→D}+D]⁺.

MS (EI): *m/z* (%): 286 [M]⁺ (100), 258 (15), 212 (5), 184 (5), 143 (5), 115 (8).

C₁₅H₁₀O₆: Ber. 286.0477; Gef. 286.0475 (EIMS).

¹H-NMR- und IR-Spektrum stimmen gut mit Daten aus der Literatur überein.^[68,69]

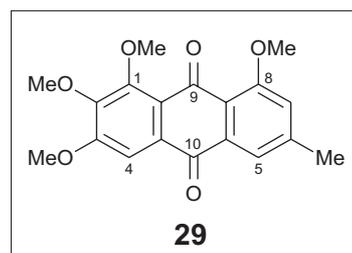
2.5.4 O-Methylierung von 27 und 28

Zu einer Lösung von 1 mg Anthrachinon (**27** oder **28**) in 1 mL MeOH/Wasser (9:1) wurde eine Lösung von Diazomethan^[181] in Diethylether gegeben, bis die N₂-Entwicklung aufhörte. Nach 72 h wurde die Reaktionslösung getrocknet und das Produkt über präparative HPLC aufgereinigt: Wasser (A), MeCN (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 35 % B, 25 min 100 % B. Die O-Methylierungen von **27** und **28** führten zu 0.4 bzw. 0.6 mg des gleichen Produktes:

1,2,3,8-Tetramethoxy-6-methylantrachinon (**29**)

Gelb-rote Kristalle (0.4 und 0.6 mg).

Schmp. 160 °C (MeOH); Lit.: 162-163 °C.^[182]



¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ = 2.49 (bs, 3 H, 6-CH₃), 3.99 (s, 3 H, 1-OCH₃ oder 2-OCH₃), 4.01 (s, 3 H, 8-OCH₃), 4.03 (s, 3 H, 3-OCH₃), 4.04 (s, 3 H, 1-OCH₃ oder 2-OCH₃), 7.10 (bs, 1 H, 7-H), 7.58 (s, 1 H, 4-H), 7.67 (bs, 1 H, 5-H).

Ein ¹³C-NMR-Spektrum konnte nicht gemessen werden, da zu wenig Substanz vorhanden war.

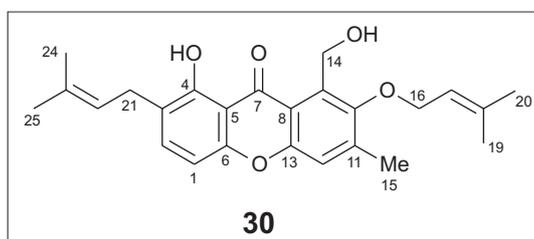
MS (EI): *m/z* (%): 342 [M]⁺ (42), 327 (100), 312 (17), 299 (14), 266 (10).

Die ¹H-NMR- und MS-Daten stimmten mit früher veröffentlichten Werten überein.^[182]

2.5.5 Isoemicellin (**30**)

Hellgelbe faserige Kristalle (8.0 mg).

Schmp. 112 °C (CH₂Cl₂/MeCN).



IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3503 (m), 2972 (w), 2916 (m), 2851 (w), 2360 (w), 1641 (m), 1606 (s), 1580 (m), 1462 (s), 1438 (s), 1260 (m), 1224 (s), 1063 (m), 1010 (m), 823 (m) cm⁻¹.

MS (EI): m/z (%): 408 $[M]^+$ (3), 340 (48), 339 (41), 322 (29), 307 (100), 284 (30), 267 (45), 256 (54), 69 (53), 41 (37).

$C_{16}H_{12}O_6$: Ber. 408.1937; Gef. 408.1940 (EIMS).

Tabelle 9. NMR-Daten von Isoemicellin (**30**) in $CDCl_3$.

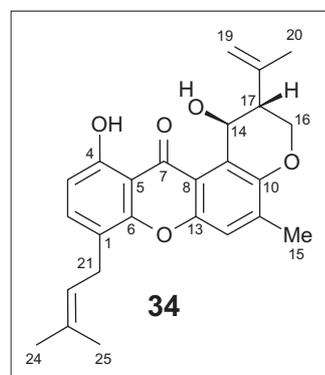
Position	1H [ppm]	^{13}C [ppm]	HMBC
1	6.87 <i>d</i>	106.0	3, 5, 6, 7
2	7.50 <i>d</i>	137.3	4, 6, 21
3		123.3	
4		159.1	
4-OH	12.9 <i>s</i>		3, 4, 5
5		108.9	
6		154.2	
7		184.9	
8		118.2	
9		134.0	
10		152.7	
11		142.9	
12	7.3 <i>d</i>	119.8	7, 8, 9, 10, 15
13		154.3	
14	5.13 <i>s</i>	57.4	8, 9, 10
15	2.47 <i>d</i>	18.0	10, 11, 12
16	4.45 <i>d</i>	72.4	10, 17, 18
17	5.62 <i>m</i>	119.8	19, 20
18		139.3	
19	1.72 <i>d</i>	18.1	17, 18
20	1.83 <i>s</i>	26.1	17, 18
21	3.40 <i>d</i>	27.5	2, 4, 22, 23
22	5.35 <i>m</i>	122.0	24, 25, 21
23		133.6	
24	1.76 <i>s</i>	18.3	22, 23
25	1.78 <i>d</i>	26.0	22, 23

2.5.6 Shamixanthon (**34**)

Gelbes Pulver (16.9 mg).

Schmp. 152 °C (MeOH); Lit.: 154-156 °C.^[64]

$[\alpha]_D^{20} = +25.2$ ($c = 0.33$ in $CHCl_3$); Lit.: +11.9
($c = 1.92$ in $CHCl_3$).^[64]



IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3504$ (w), 2973 (w), 2916 (w), 1639 (m), 1599 (m), 1576 (m), 1475 (s), 1429 (m), 1240 (m), 1048 (w) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.76$ (d, $J = 1.0$ Hz, 3 H, 25-H), 1.80 (bs, 3 H, 24-H), 1.86 (bs, 3 H, 20-H), 2.36 (d, $J = 1.0$ Hz, 3 H, 15-H), 2.75 (q, $J = 2.8$ Hz, 1 H, 17-H), 3.50 (m, 2 H, 21-H), 4.36 (dd, $J = 10.8, 3.0$ Hz, 1 H, 16- H_α), 4.43 (ddd, $J = 10.8, 3.5, 1.3$ Hz, 1 H, 16- H_β), 4.60 (q, $J = 0.8$ Hz, 1 H, 19- H_α), 4.81 (m, 1 H, 19- H_β), 5.32 (m, 1 H, 22-H), 5.42 (dd, $J = 3.0, 1.0$ Hz, 1 H, 14-H), 6.74 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 3-H), 7.30 (d, $J = 0.8$ Hz, 1 H, 12-H), 7.44 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 2-H), 12.6 (s, 1 H, 4-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.6$ (C-15), 18.1 (C-24), 22.8 (C-20), 26.0 (C-25), 27.7 (C-21), 45.2 (C-17), 63.5 (C-14), 64.8 (C-16), 109.5 (C-5), 109.9 (C-3), 112.5 (C-19), 117.1 (C-8), 119.1 (C-1), 119.6 (C-12), 121.2 (C-9), 121.9 (C-22), 133.5 (C-23), 136.7 (C-2), 138.6 (C-11), 142.9 (C-18), 149.7 (C-10), 152.5 (C-13), 153.0 (C-6), 160.0 (C-4), 184.7 (C-7).

MS (EI): m/z (%): 406 $[\text{M}]^+$ (87), 338 (95), 337 (100), 310 (50), 295 (97), 242 (23).

$^1\text{H-}$, $^{13}\text{C-}$ Daten stimmen gut mit den Daten aus der Literatur überein.^[64,183]

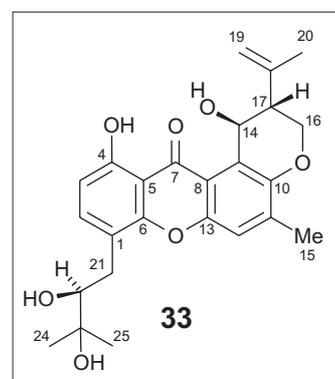
2.5.7 Tajixanthonhydrat (33)

Gelbes Pulver (6.7 mg).

Schmp. 195 °C (MeOH); Lit.: 195-196 °C.^[183]

$[\alpha]_D^{20} = -58.6$ ($c = 0.33$ in CHCl_3);

Lit.: -71.5 ($c = 2.3$ in CHCl_3).^[183]



$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.37$ (s, 3 H, 24-H), 1.42 (s, 3 H, 25-H), 1.85 (bs, 3 H, 20-H), 2.35 (d, $J = 1.0$ Hz, 3 H, 15-H), 2.70 (dd, 1 H, $J = 14.1, 10.3$ Hz, 1 H, 21- H_α), 2.74 (q, $J = 2.8$ Hz, 1 H, 17-H), 3.19 (dd, $J = 14.1, 1.8$ Hz, 1 H, 21- H_β), 3.74 (dd, $J = 10.5, 2.2$ Hz, 1 H, 22-H), 4.34 (dd, $J = 10.8, 3.0$ Hz, 1 H, 16- H_α), 4.42 (ddd, $J = 10.8, 3.5, 1.2$ Hz, 1 H, 16- H_β), 4.58 (q, $J = 0.8$ Hz, 1 H, 19- H_α), 4.81 (m, 1 H, 19- H_β), 5.40 (dd, $J = 3.0, 1.0$ Hz, 1 H, 14-H), 6.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 3-H), 7.22 (d, $J = 0.8$ Hz, 1 H, 12-H), 7.52 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 2-H), 12.4 (s, 1 H, 4-OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.6$ (C-15), 23.8 (C-24), 22.7 (C-20), 26.7 (C-25), 32.1 (C-21), 45.1 (C-17), 63.5 (C-14), 64.8 (C-16), 73.3 (C-23), 78.0 (C-22), 109.5 (C-5), 110.2

(C-3), 112.5 (C-19), 117.1 (C-8), 116.3 (C-1), 119.3 (C-12), 121.2 (C-9), 138.4 (C-2), 138.8 (C-11), 142.7 (C-18), 149.8 (C-10), 152.2 (C-13), 153.4 (C-6), 160.7 (C-4), 184.6 (C-7).

MS (EI): m/z (%): 440 $[M]^+$ (53), 410 (20), 397 (20), 372 (52), 371 (52), 333 (100), 283 (33), 271 (20), 255 (42).

^1H -, ^{13}C -Daten stimmen gut mit den Daten aus der Literatur überein.^[183]

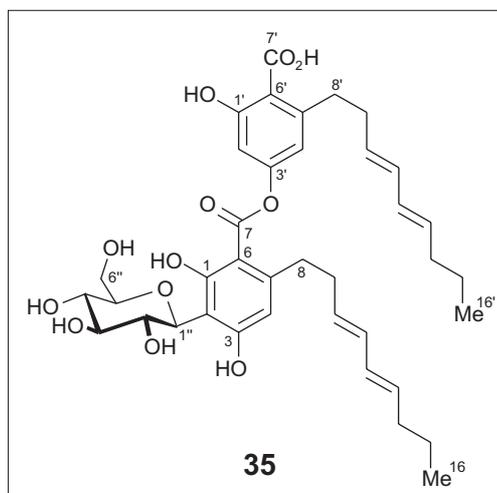
2.5.8 Stromemycin (35)

Rötlicher amorpher Feststoff (56.6 mg).

Schmp. 139 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -29$ ($c = 0.1$ in EtOH).

CD ($c = 0.05$ in EtOH): $\Delta\epsilon_{228} -2.2$,
 $\Delta\epsilon_{271} +1.4$, $\Delta\epsilon_{300} +0.4$, $\Delta\epsilon_{314} +0.9$.



IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3368$ (br.), 3016 (w), 2963 (m), 2924 (m), 2874 (w), 1659 (m), 1615 (m), 1575 (m), 1437 (w), 1250 (s), 1157 (s), 1081 (m), 983 (m) cm^{-1} .

MS (ESI, positiv): m/z 697.6 $[M+H]^+$; m/z 706.4 $[M_{H \rightarrow D}+D]^+$.

MS (FAB positiv, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 697 $[M+H]^+$.

Tabelle 10. NMR-Daten von Stromemycin (**35**) in MeOH-d₄.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	ROESY
1	163.0			
2	111.0			
3	164.4			
4	112.6	6.36	1, 2, 6, 7, 8, 1''	8
5	147.8			
6	105.9			
7	170.7			
8	37.7	2.98	4, 5, 6, 9	4, 10, 2', 4'
9	35.8	2.37	5, 8, 11, 12	
10	133.3 ^a	5.58	11, 12	8
11	132.4 ^a	5.98	13	
12	131.7 ^a	5.98	10, 14	
13	131.6 ^a	5.50	14	
14	35.8	2.01	13, 15, 16	
15	23.6	1.39	13, 14, 16	
16	14.0	0.89	14, 15	
1'	164.4			
2'	109.2	6.66	1', 3', 4', 6'	8
3'	154.3			
4'	116.2	6.58	2', 3', 6', 8'	8, 8'
5'	148.1			
6'	113.9			
7'	173.8			
8'	36.8	3.04	4', 5', 6', 9'	4', 10'
9'	36.2	2.37	5', 8', 11', 12'	
10'	133.7 ^a	5.58	11', 12'	8'
11'	132.6 ^a	5.98	13'	
12'	131.9 ^a	5.98	10', 14'	
13'	132.1 ^a	5.50	14'	
14'	35.8	2.01	13', 15', 16'	
15'	23.7	1.39	13', 14', 16'	
16'	14.0	0.89	14', 15'	
1''	76.1	4.94	1, 2, 3, 2'', 3'', 5''	3'', 5''
2''	73.1	4.03	2, 1'', 3''	4''
3''	80.0	3.47	2'', 4''	1''
4''	71.6	3.48	3'', 5'', 6''	2''
5''	82.6	3.41	4''	1''
6''	62.6	3.75/3.86	4'', 5''	

^a die gekennzeichneten ¹³C-Verschiebungen sind nicht eindeutig zuordbar.

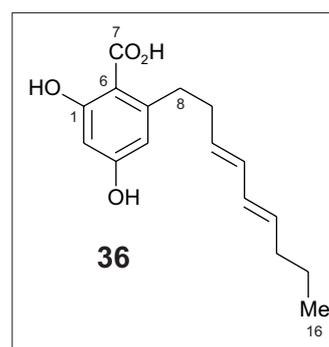
2.5.9 Methanolyse von **35**

Ein Milligramm **35** wurde in 2 mL einer 0.3 M NaOMe-Lsg. in MeOH gelöst. Nach 24 h bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgemisch mit HOAc angesäuert und das Produktgemisch durch präparative HPLC aufgetrennt: Wasser (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 40 % B, 25 min 85 % B. Die Methanolyseprodukte **37** und **36** wurden nach 8.5 bzw. 13 min eluiert. Wegen der sehr geringen Substanzmengen wurden diese Verbindungen nur durch ESIMS und ¹H-NMR charakterisiert.

6-(3,5-nonadienyl)-2,4-dihydroxybenzoesäure (36):

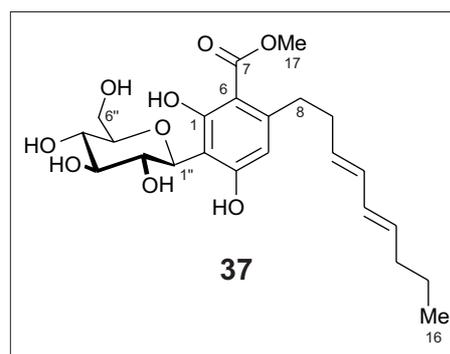
MS (ESI, positiv): m/z 277.4 $[M+H]^+$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH-d_4): δ = 0.90 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, 16-H), 1.40 (sext., J = ca. 7 Hz, 2 H, 15-H), 2.01 (q, J = ca. 7 Hz, 2 H, 14-H), 2.30 (q, J = 7.7 Hz, 2 H, 9-H), 2.94 (t, J = 7.7 Hz, 2 H, 8-H), 5.56 (m, 2 H, 10-H und 13-H), 6.0 (m, 2 H, 11-H und 12-H), 6.14 (bs, 1 H, 4-H), 6.20 (bs, 1 H, 2-H).

**3-(β -C-Glucosyl)-6-(3,5-nonadienyl)-2,4-dihydroxybenzoesäuremethylester (37):**

MS (ESI, positiv): m/z 453.7 $[M+H]^+$.

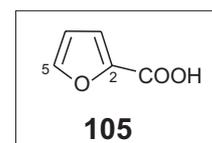
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH-d_4): δ = 0.91 (t, J = 7.4 Hz, 3 H, 16-H), 1.42 (sext., J = ca. 7 Hz, 2 H, 15-H), 2.04 (q, J = ca. 7 Hz, 2 H, 14-H), 2.27 (q, J = 7.7 Hz, 2 H, 9-H), 2.88 (t, J = 7.7 Hz, 2 H, 8-H), 3.39 (m, 1 H, 5'-H), 3.47 (m, 2 H, 3'-H und 4'-H), 3.75 (dd, J = 12.0, 5.0 Hz, 1 H, 6'-H_a), 3.85 (dd, J = 12.0, 2.3 Hz, 1 H, 6'-H_b), 3.91 (s, 3 H, 17-H), 4.20 (m, 1 H, 2'-H), 4.92 (d, J = 10.0 Hz, 1 H, 1'-H), 5.57 (m, 2 H, 10-H und 13-H), 6.0 (m, 2 H, 11-H und 12-H), 6.3 (s, 1 H, 2-H).

**2.5.10 2-Furansäure (105)**

Farblose Kristalle (14.4 mg).

Schmp. 129 °C (MeOH); Lit.: 131 °C.^[184]

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_4): δ = 7.69 (dd, J = 1.8, 0.8 Hz, 1 H, 5-H), 7.20 (dd, J = 2.5, 0.8 Hz, 1 H, 3-H), 6.60 (dd, J = 3.5, 1.8 Hz, 1 H, 4-H).



^{13}C -NMR (100 MHz, MeOH- d_4): δ = 113.1 (C-3), 119.2 (C-4), 146.6 (C-2), 148.2 (C-5), 161.9 (2-COOH).

MS (EI): m/z (%): 112 [M] $^+$ (100), 95 (75), 39 (35), 38 (11).

^1H -, ^{13}C - und MS-Daten stimmen gut mit den Daten einer authentischen Probe von 2-Furansäure überein.

2.6 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Penicillium chrysogenum* E01-10/3

2.6.1 Pilzmaterial, Extraktion und Isolierung der Inhaltsstoffe

Pilzstamm E01-10/3 wurde von Steffens^[27] aus einem Exemplar des Schwammes *Ircinia fasciculata* SCHMIDT (Irciniidae) isoliert, welches in einer Tiefe von 17.5 m in der Bucht von Fetovaia (Elba, Italien) gesammelt wurde. An Hand morphologischer Kriterien und durch die Anzucht auf verschiedenen diagnostischen Agar-Medien wurde der Pilz als *Penicillium chrysogenum* THOM (Trichocomaceae)^[86] identifiziert. Für die chemischen Untersuchungen wurde der Pilz als 10-L-Standkultur in WS-Flüssigmedium^[28] angezogen und nach einer Wachstumsperiode von 14 d mit 10 % EtOAc versetzt.

Kulturmedium und Pilzmycel wurde wie oben beschrieben (siehe, Experimententeil 2.4.1) extrahiert. Mycel- und Mediumextrakt wurden vereint und zwischen MeOH + 25 % Wasser und Petrolether partitioniert.

Für die HPLC-NMR-Experimente wurden 50 mg der Methanolfraction in 4 mL MeCN/MeOH- d_4 (3:1) gelöst und filtriert. Vom Filtrat wurden 100 μL einer HPLC unter folgenden Bedingungen unterzogen: Säule: Symmetry C₁₈ 4.6 x 250 mm (*Waters*); D₂O + 0.5 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 1 mL/min; 0 min 15 % B, 30 min 100 % B, 35 min 100 % B. Von den Verbindungen Roquefortin C (**18**) und Sorbicillacton A (**47**), die nach 12.1 bzw 16.3 min eluiert wurden, wurden online- ^1H -NMR-Spektren aufgenommen. Das NMR-Spektrum von **18** war identisch mit dem aus dem Extrakt von E00-24/37 erhaltenen online- ^1H -NMR-Spektrum derselben Substanz.

Sorbicillacton A (**47**):

HPLC- ^1H -NMR: δ = 7.21 (dd, J = 14.7, 11.0 Hz, 1 H, 3'-H), 6.69 (d, J = 15.4 Hz, 1 H, 3''-H), 6.45 (d, J = 15.4 Hz, 1 H, 2''-H), 6.34 (m, 1 H, 2'-H), 6.30 (m, 1 H, 4'-H), 6.19 (m, 1 H, 5'-H), 3.60 (s, 1 H, 6-H), 1.82 (d, J = 6.7 Hz, 3 H, 6'-H), 1.60 (s, 3 H, 7-H), 1.50 (s, 3 H, 8-H), 1.44 (s, 3 H, H-11).

Die Substanzen wurden aus den Extrakten verschiedener Anzuchten durch präparative HPLC isoliert: Wasser + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); Fluss 11 mL/min; 0 min 30 % B, 25 min 100 % B. Die Retentionszeiten der einzelnen Verbindungen waren: Meleagrinen (**38**; 8.0 min), Sorbifuranon C (**59**; 11.9 min), Sorbicillacton-A-Dihydrosorbicillacton-A-Gemisch (**47** + **53**; 12.7 min), Sorbifuranon B (**58**; 13.5 min), Sorbifuranon A (**54a**; 16.1 min), Sorbicillinol-Ethylvinylether-Addukt (**62a**; 20.0 min), Bisvertinolon (**64**; 22.1 min). Meleagrinen (**38**) wurde aus CH₂Cl₂ umkristallisiert.

Durch präparative HPLC unter isokratischen Bedingungen (Wasser + 0.05 % TFA (A), MeCN + 0.05 % TFA (B); 35 % B isokratisch; Fluss 12 mL/min) konnte die Sorbicillinol-A-Fraktion in Sorbicillacton A (**47**) und 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**) aufgetrennt werden. Die beiden Substanzen lagen im Pilzextrakt im Verhältnis 2.3:1 vor.

Die im Folgenden angegebenen Substanzmengen geben die zum Zeitpunkt der Charakterisierung und Strukturaufklärung vorhandene Menge an. Der Pilz produzierte in den verschiedenen Ansätzen stark variierende Mengen der unterschiedlichen Metaboliten, so dass keine sinnvollen Angaben zur Isolierungs-Ausbeute aus einer bestimmten Ansatzgröße gemacht werden können.

2.6.2 Sorbicillacton A (**47**)

Gelber kristalliner Feststoff (> 1 g)

Schmp. 205 °C (zers.; EtOAc/*n*-Heptan).

$[\alpha]_D^{20} = -939$ ($c = 0.2$ in MeOH).

CD ($c = 0.2$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{208} +16.7$, $\Delta\epsilon_{231} -21.2$, $\Delta\epsilon_{277} +21.0$, $\Delta\epsilon_{372} -20.9$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3257$ (br.), 3089 (w), 2980 (w), 2937 (w), 1771 (m), 1616 (s), 1555 (m), 1446 (w), 1410 (m), 1348 (m), 1264 (m), 1204 (m), 1067 (w), 993 (w), 944 (w) cm⁻¹.

MS (ESI, positiv): m/z 418 [M+H]⁺; m/z 459 [M+MeCN+H]⁺.

MS (FAB positiv, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 418 [M+H]⁺.

C₂₁H₂₄NO₈⁺ [M+H]⁺: Ber. 418.1502; Gef. 418.1515 (ESIMS).^[185]

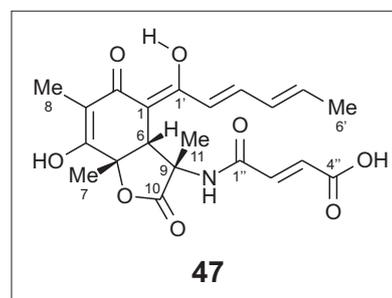


Tabelle 11. NMR-Daten von Sorbicillacton A (**47**) in THF-d₈.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	ROESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	99.6				
2	192.1				
3	110.9				
4	166.5				
5	81.0				
6	53.0	3.43 <i>s</i>	1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 1'	7, 11, 2'	
7	~25.0	1.55 <i>s</i>	5, 6	6	
8	7.3	1.54 <i>s</i>	2, 3, 4		
9	60.0				
10	173.0				
11	~26.0	1.42 <i>s</i>	6, 9, 10	6, 2', NH	
1'	169.7				
2'	121.7	6.38 <i>d</i>	1', 4'	6, 11	3' (14.7)
3'	139.1	7.19 <i>dd</i>	4', 5'	5'	2', 4' (11.0)
4'	132.0	6.28 <i>ddd</i>	6'		3', 5', 6' (1.3)
5'	136.9	6.08 <i>m</i>	3', 6'	3'	4' (14.5), 6' (6.2)
6'	18.5	1.83 <i>dd</i>	4', 5'		4', 5'
1''	162.5				
2''	136.0	6.67 <i>d</i>	1'', 3'', 4''	NH	3'' (15.4)
3''	131.2	6.49 <i>d</i>	1'', 2'', 4''		2''
4''	166.3				
1'-OH		16.60 <i>s</i>	1, 1', 2'		
NH		7.60 <i>s</i>	9, 10, 11, 1''	11, 2''	

2.6.3 O-Methylierung von Sorbicillacton A (**47**)

In 5 mL MeOH wurden 30 mg (71.9 μmol) Sorbicillacton A (**47**) gelöst und 200 μL conc. H₂SO₄ zugegeben. Nach 6 h Rühren bei Raumtemperatur wurden 100 mL Wasser zugegeben und das Gemisch zweimal mit je 100 mL EtOAc extrahiert. Nach Eindampfen der EtOAc-Phasen wurde der Rückstand durch präparative HPLC aufgereinigt. Man erhielt 18.6 mg einer gelben amorphen Substanz.

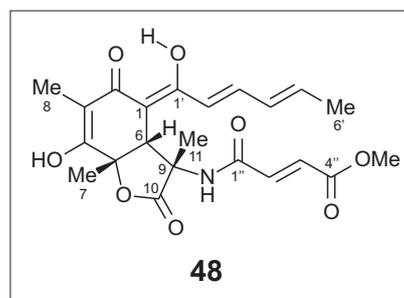
Sorbicillacton-A-methylester (**48**)

Ausbeute: 18.6 mg (43.2 mmol, 60 %).

Gelber amorpher Feststoff.

Schmp. 166-170 °C (THF).

$[\alpha]_D^{20} = -558$ ($c = 0.2$ in MeOH).



CD ($c = 0.2$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{208} +11.1$, $\Delta\epsilon_{231} -12.6$, $\Delta\epsilon_{278} +12.5$, $\Delta\epsilon_{370} -13.0$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3333$ (br.), 2931 (w), 1783 (m), 1730 (m), 1681 (s), 1612 (s), 1552 (s), 1442 (m), 1415 (m), 1384 (m), 1350 (s), 1310 (s), 1198 (m), 1176 (m), 1065 (m) cm^{-1} .

MS (ESI, positiv): m/z 432 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Tabelle 12. NMR-Daten von Sorbicillacton-A-methylester (**48**) in THF- d_8 .

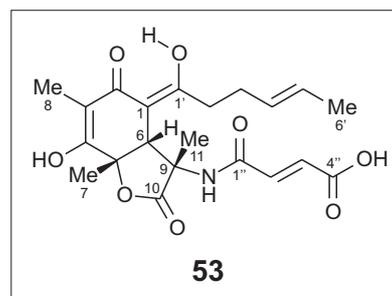
Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC
1	99.5		
2	192.0		
3	110.8		
4	166.7		
5	81.1		
6	53.2	3.47 <i>s</i>	1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 1'
7	~25.5	1.55 <i>s</i>	4, 5, 6
8	7.3	1.52 <i>s</i>	2, 3, 4
9	60.0		
10	173.0		
11	~26.0	1.42 <i>s</i>	6, 9, 10
1'	169.7		
2'	121.7	6.39 <i>d</i>	1', 3', 4'
3'	139.1	7.20 <i>dd</i>	1', 4', 5'
4'	131.9	6.28 <i>ddd</i>	2', 6'
5'	137.0	6.09 <i>m</i>	3', 6'
6'	18.6	1.82 <i>dd</i>	4', 5'
1''	162.3		
2''	136.3	6.71 <i>d</i>	1'', 3'', 4''
3''	130.3	6.52 <i>d</i>	1'', 4''
4''	165.9		
COOMe	51.8	3.69 <i>s</i>	4''
1'-OH		16.60 <i>bs</i>	
NH		7.66 <i>s</i>	9, 10, 11, 1''

2.6.4 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**)

Hellbrauner amorpher Feststoff (200 mg).

Schmp. 109-115 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -327$ ($c = 0.2$ in MeOH).



CD ($c = 0.2$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{194} -6.0$, $\Delta\epsilon_{223} +8.2$, $\Delta\epsilon_{248} -4.7$, $\Delta\epsilon_{270} +11.3$, $\Delta\epsilon_{331} -13.3$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3291$ (br.), 3065 (m), 2982 (m), 2931 (m), 1772 (m), 1717 (m), 1672 (s), 1557 (m), 1450 (w), 1384 (m), 1347 (s), 1223 (m), 1108 (w), 1065 (m), 969 (m) cm^{-1} .

MS (ESI, positiv): m/z 420 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_8^+ [\text{M}+\text{H}]^+$: Ber. 420.1658; Gef. 420.1646 (ESIMS).^[185]

Tabelle 13. NMR-Daten von 2',3'-Dihydrosorbicillacton A (**53**) in MeOH-d_4 .

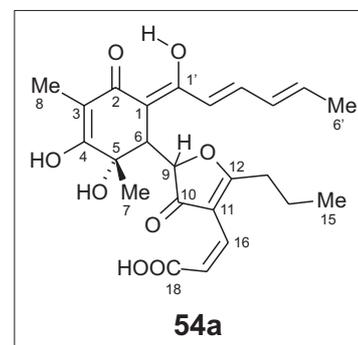
Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	ROESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	99.1				
2	192.3				
3	110.7				
4	167.0				
5	83.1				
6	54.1	3.48 <i>s</i>	1, 2, 4, 5, 7, 9, 11, 1'	7, 11, 2'	
7	25.1	1.62 <i>s</i>	4, 5, 6	6	
8	7.6	1.55 <i>s</i>	2, 3, 4		
9	61.1				
10	176.1				
11	25.9	1.50 <i>s</i>	6, 9, 10	6, 2'	
1'	179.9				
2'	33.8	α 2.38 <i>m</i> β 2.57 <i>m</i>	1, 1', 3', 4' 1, 1', 3', 4'	6, 11	2' α /3'
3'	30.7	2.38 <i>m</i>	2', 4', 5'		
4'	130.9	5.51 <i>m</i>	3', 6'		
5'	127.4	5.51 <i>m</i>	3', 6'		
6'	18.2	1.63 <i>dd</i>	4', 5'		4'/5'
1''	164.6				
2''	136.4	6.79 <i>d</i>	1'', 4''		3'' (15.5)
3''	132.4	6.52 <i>d</i>	1'', 4''		2''
4''	168.3				

2.6.5 Sorbifuranon A (**54a**)

Gelber amorpher Feststoff (11.7 mg).

Schmp. 107-110 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -10$ ($c = 0.1$ in MeOH).



CD ($c = 0.1$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{212} -1.8$, $\Delta\epsilon_{250} +3.2$, $\Delta\epsilon_{288} -2.9$, $\Delta\epsilon_{325} +2.0$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3407$ (br.), 2967 (m), 2937 (m), 2876 (w), 1708 (s), 1635 (s), 1443 (m), 1382 (m), 1342 (m), 1195 (m), 1078 (m) cm^{-1} .

MS (ESI, positiv): m/z 445 $[M+H]^+$.

MS (FAB positiv, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 445 $[M+H]^+$.

$C_{24}H_{29}O_8^+ [M+H]^+$: Ber. 445.1862; Gef. 445.1859 (FABMS).

Tabelle 14. NMR-Daten von Sorbifuranon A (**54a**) in MeOH- d_4 .

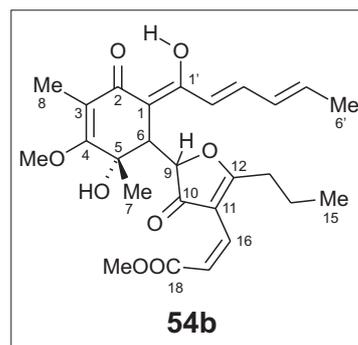
Position	^{13}C [ppm]	1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	102.5				
2	194.0				
3	109.2				
4	172.0				
5	71.9				
6	50.6	3.38 <i>d</i>	1, 2, 4, 5, 7, 10, 1'	7, 9, 2'	9 (1.5)
7	28.4	1.47 <i>s</i>	4, 5, 6	6	
8	7.9	1.73 <i>s</i>	2, 3, 4		
9	84.7	5.27 <i>d</i>	1, 5, 6, 10, 12	6	6, 13 (<1)
10	203.8				
11	115.6				
12	193.6				
13	33.2	2.42 <i>t</i>	11, 12, 14, 15	16	9, 14 (7.8)
14	20.3	1.4-1.6 <i>m</i>	12, 13, 15		13, 15 (7.3)
15	14.3	0.88 <i>t</i>	13, 14		14
16	130.6	6.30 <i>d</i>	10, 11, 12, 18	13	17 (11.9)
17	124.4	5.92 <i>d</i>	11, 18		16
18	169.4				
1'	169.1				
2'	121.9	6.16 <i>d</i>	1, 1', 3', 4'	6	3' (14.7)
3'	139.9	7.00 <i>dd</i>	1', 4', 5'	5'	2', 4' (10.9)
4'	132.7	6.24 <i>m</i>	5', 6'	6'	3', 5', 6' (1.4)
5'	137.4	6.02 <i>m</i>	3', 4', 6'	3'	4', 6' (6.8)
6'	18.8	1.84 <i>dd</i>	2', 4', 5'	4'	4', 5'

2.6.6 Methylierung von Sorbifuranon A (**54a**)

Zu einer Lösung von 4 mg **54a** in 2 mL MeOH/Wasser (9:1) wurde eine Diazomethanlösung^[181] gegeben, bis die N_2 -Entwicklung versiegte. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung getrocknet und das Produkt durch präparative HPLC aufgereinigt: Wasser (A), MeCN (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 25 % B, 30 min 100 % B. Das Hauptprodukt wurde nach 22.5 min eluiert. Nach dem Trocknen erhielt man 2.8 mg eines gelben amorphen Feststoffes.

4-O-Methylsorbifuranon-A-methylester (54b)

Da die Verbindung sich zersetzte, konnten nur NMR-Daten aufgenommen werden.

Tabelle 15. NMR-Daten von **54b** in MeOH-d₄.

Position	¹³ C [ppm] ^a	¹ H [ppm]	HMBC
1	102.4		
2	194.9		
3	119.4		
4	172.7		
5	72.8		
6	50.3	3.35 <i>s</i>	1, 2, 4, 5, 7, 10, 1'
7	28.6	1.46 <i>s</i>	4, 5, 6
8	9.4	1.84 <i>s</i>	2, 3, 4
9	85.1	5.36 <i>s</i>	1, 5, 6, 10, 12
10	203.2		
11	115.6		
12	193.4		
13	32.9	2.43 <i>t</i>	11, 12, 14, 15
14	20.4	1.4-1.6 <i>m</i>	
15	14.1	0.88 <i>t</i>	13, 14
16	130.4	6.31 <i>d</i>	10, 12, 18
17	123.3	5.92 <i>d</i>	11, 18
18	168.3		
1'	170.6		
2'	122.0	6.16 <i>d</i>	1', 4'
3'	140.9	7.04 <i>dd</i>	1'
4'	132.7	6.25 <i>m</i>	
5'	138.1	6.05 <i>m</i>	
6'	18.6	1.84 <i>dd</i>	4', 5'
4-OMe	61.9	4.00 <i>s</i>	4
COOMe	52.0	3.67 <i>s</i>	18

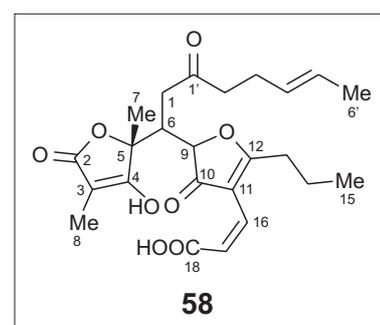
^a aus HMBC- und HMQC-Spektren

2.6.7 Sorbifuranon B (58)

Farblos amorpher Feststoff (6.3 mg).

Schmp. 80-85 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +12.3$ ($c = 0.1$ in MeOH).



CD ($c = 0.03$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{220} -3.9$, $\Delta\epsilon_{273} +4.1$, $\Delta\epsilon_{327} -0.8$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3405$ (br.), 2967 (m), 2942 (m), 1715 (s), 1659 (s), 1579 (m), 1441 (m), 1385 (m), 1316 (m), 1252 (m), 1166 (m), 1061 (m), 823 (w) cm^{-1} .

MS (ESI, positiv): m/z 447 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, negativ): m/z 445 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

MS (FAB positiv, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 447 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (FAB negativ, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 445 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Tabelle 16. NMR-Daten von Sorbifuranon B (**58**) in $\text{MeOH}-d_4$.

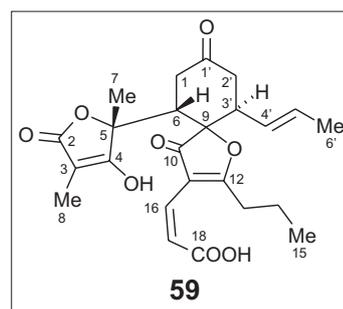
Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	37.3	α 2.29 <i>dd</i> β 2.68 <i>dd</i>	5, 6, 1' 5, 6, 1'		1 β (18.3), 6 (3.6) 1 α , 6 (7.3)
2	176.6				
3	97.0				
4	179.5				
5	84.4				
6	42.4	3.25 <i>dd</i>	1, 4, 5, 7, 10, 1'	7	1 α , 1 β
7	22.0	1.50 <i>s</i>	5, 6	6	
8	6.2	1.68 <i>s</i>	2, 3, 4		
9	84.9	4.68			
10	201.3				
11	115.7				
12	192.9				
13	32.9	2.60 <i>m</i>	11, 12, 14, 15	16	14
14	20.5	1.75 <i>m</i>	12, 13, 15		13, 15 (7.4)
15	14.3	1.02 <i>t</i>	13, 14		14
16	130.3	6.48 <i>d</i>	10, 11, 12, 17, 18	13	17 (11.7)
17	125.1	6.00 <i>d</i>	11, 18		16
18	169.0				
1'	208.8				
2'	43.3	2.42 <i>m</i>	1', 3', 4'		3'
3'	27.9	2.15 <i>m</i>	1', 2', 4', 5'		2', 5'
4'	131.0	5.4 <i>m</i>	5', 6'	6'	6'
5'	126.9	5.4 <i>m</i>	3', 6'		3', 6' (6.3)
6'	18.2	1.60 <i>dm</i>	4', 6'	4'	4', 5'

2.6.8 Sorbifuranon C (**59**)

Farbloser amorpher Feststoff (22.0 mg)

Schmp. 105 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -76.4$ ($c = 0.1$ in MeOH).



CD ($c = 0.03$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{213} -4.7$, $\Delta\epsilon_{247} +1.3$, $\Delta\epsilon_{270} -3.2$, $\Delta\epsilon_{316} +1.9$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3373$ (br.), 3175 (br.), 2967 (m), 2939 (m), 1699 (s), 1654 (s), 1440 (m), 1384 (m), 1260 (m), 1176 (m), 1047 (w) cm^{-1} .

Tabelle 17. NMR-Daten von Sorbifuranon C (**59**) in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	38.2	α 2.29 <i>dd</i> β 3.07 <i>dd</i>	5, 6, 9, 1', 2' 5, 6, 9, 1', 2'	7 7	1 α (16.0), 6 (6.3) 1 β , 6 (5.8)
2	176.2				
3	97.0				
4	179.1				
5	86.4				
6	44.7	2.76 <i>t</i>	1, 4, 5, 9, 10, 1', 3'	7	1 α , 1 β
7	24.5	1.58 <i>s</i>	4, 5, 6	1 α , 1 β , 6, 3'	
8	6.1	1.68 <i>s</i>	2, 3, 4		
9	90.7				
10	201.8				
11	115.0				
12	189.8				
13	32.7	α 2.57 <i>m</i> β 3.65 <i>m</i>	11, 12, 14, 15 11, 12, 14, 15	16 16	14 14
14	20.7	1.75 <i>m</i>	12, 13, 15		13 α , 13 β , 15 (7.4)
15	14.3	1.02 <i>t</i>	13, 14		14
16	129.5	6.50 <i>d</i>	10, 11, 12, 18	13 α , 13 β	
17	124.9	6.02 <i>d</i>	11, 18		
18	169.7				
1'	209.5				
2'	42.6	α 2.50 <i>dd</i> β 2.77 <i>dd</i>	9, 1', 3', 4' 9, 1', 3', 4'		2' β (16.1), 3' (5.7) 2' α , 3' (10.1)
3'	45.3	3.35 <i>m</i>	9, 10, 1', 2', 4', 5'	7, 5'	2' α , 2' β , 4' (8.4)
4'	128.2	5.24 <i>ddd</i>	3', 6'	6'	3', 5' (15.1), 6' (1.6)
5'	131.4	5.60 <i>m</i>	3', 6'	3'	4', 6' (6.4)
6'	18.2	1.62 <i>dd</i>	4', 5'	4'	4', 5'

MS (ESI, positiv): m/z 445 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (ESI, negativ): m/z 443 $[\text{M}-\text{H}]^-$.

MS (FAB positiv, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 445 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (FAB negativ, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 443 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

MS (EI): m/z (%): 444 $[\text{M}]^+$ (13), 426 (26), 317 (56), 299 (21), 273 (16), 249 (37), 231 (47), 229 (11), 221 (10), 205 (65), 204 (11), 203 (11), 177 (10), 165 (11), 95 (100), 71 (21), 67 (20), 55 (22), 44 (53).

$\text{C}_{24}\text{H}_{28}\text{O}_8$:

Ber. 444.1784;

Gef. 444.1785

(EIMS).

2.6.9 Ethylvinylether-Sorbicillinol-Addukt (**62a**)

Hellbrauner amorpher Feststoff (5.1 mg).

Schmp. 100-118 °C (MeOH/Wasser).

$[\alpha]_D^{20} = +219$ ($c = 0.1$ in MeOH).

CD ($c = 0.1$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{223} -2.5$, $\Delta\epsilon_{246} +1.8$, $\Delta\epsilon_{310} -9.7$, $\Delta\epsilon_{353} +8.1$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3425$ (br.), 2966 (w), 2926 (m), 2860 (w), 1728 (m), 1629 (m), 1451 (m), 1380 (m), 1092 (m), 1026 (m), 998 (m) cm^{-1} .

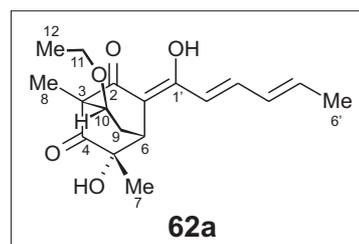


Tabelle 18. NMR-Daten des Sorbicillinol-Ethylvinylether-Adduktes (**62a**) in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	112.3				
2	198.3				
3	68.7				
4	210.4				
5	74.9				
6	41.7	3.17 <i>t</i>	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 1'	7, 2'	9 α (2.7), 9 β
7	24.0	1.15 <i>s</i>	4, 5, 6	6	
8	9.6	1.22 <i>s</i>	2, 3, 4, 10	10	
9	31.8	α 1.63 <i>m</i> β 2.85 <i>ddd</i>	5, 6, 10 1, 3, 5, 6		6, 9 β (13.8), 10 6, 9 α , 10 (8.4)
10	79.9	3.62 <i>m</i>	2, 3, 4, 6, 8, 11	8	9 α , 9 β
11	66.3	α 3.35 <i>m</i> β 3.58 <i>dq</i>	10, 12 10, 12		11 β (9.5), 12 11 α , 12 (7.0)
12	15.4	1.11 <i>t</i>	11		11 α , 11 β
1'	167.3				
2'	119.5	6.38 <i>d</i>	1, 3'	6	3' (14.9)
3'	142.9	7.27 <i>dd</i>	1', 4', 5'	5'	2', 4' (11.0)
4'	132.3	6.38 <i>m</i>	1', 6'		3', 5', 6' (1.5)
5'	139.7	6.20 <i>m</i>	3', 6'	3'	4', 6' (6.9)
6'	18.8	1.88 <i>dd</i>	4', 5'		4', 5'

MS (EI): m/z (%): 320 $[\text{M}]^+$ (30), 274 (81), 259 (13), 245 (48), 233 (11), 231 (28), 217 (18), 205 (31), 203 (24), 191 (33), 189 (14), 181 (35), 180 (23), 167 (24), 151 (45), 137 (22), 95 (100), 73 (26), 67 (36).

$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_5$:

Ber. 320.1624;

Gef. 320.1622

(EIMS).

2.6.10 Reaktion von Sorbicillinol-Acetat mit Ethylvinylether

Acht mg racemisches Sorbicillinol-Acetat (**41b**, siehe Schema 9), synthetisiert von Dr. H. Tsuruta nach einer literaturbekannten Vorschrift,^[100] wurden durch präparative HPLC gereinigt (Wasser (A), MeCN (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 10 % B, 40 min 100 % B), Sorbicillinol-Acetat wurde nach 29 min eluiert. Da es sich bei Sorbicillinol-Acetat um eine relativ instabile Verbindung handelt, wurden die Sorbicillinol-Acetat-haltigen Fraktionen aus der präparativen HPLC (11 mL; ca. 0.3 mg Sorbicillinol-Acetat pro mL MeCN-Wasser-Gemisch) nicht getrocknet, sondern direkt mit 100 μ L Ethylvinylether versetzt. Nach 24 h war die Reaktion abgeschlossen. Nach Trocknen der Reaktionslösung erhielt man 3.2 mg **62b** als zähes hellgelbes Öl.

Sorbicillinol-Acetat-Ethylvinylether-Addukt (**62b**)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3451 (br.), 2983 (m), 2939 (m), 2876 (w), 1738 (s), 1619 (m), 1571 (w), 1450 (w), 1373 (m), 1243 (s), 1094 (m), 1023 (m) cm^{-1} .

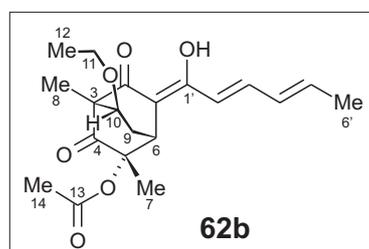


Tabelle 19. NMR-Daten von **62b** in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	NOESY	COSY (J_{HH} [Hz])
1	111.3				
2	197.2				
3	68.7				
4	204.0				
5	82.5				
6	39.0	3.91 <i>t</i>	1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 1'	7, 9 α , 9 β , 2'	9 α , 9 β
7	21.8	1.36 <i>s</i>	4, 5, 6	6	
8	9.9	1.26 <i>s</i>	2, 3, 4, 10	10	
9	32.2	α 1.72 <i>dt</i> β 2.48 <i>ddd</i>	1, 5, 6, 10 1, 3, 5, 6	6, 11 β 6, 10	6 (2.9), 9 β (14.3), 10 6 (2.7), 9 α , 10 (8.2)
10	79.3	3.75 <i>dd</i>	2, 3, 4, 6, 8, 11	8, 9 β	9 α (2.5), 9 β
11	66.4	α 3.36 <i>m</i> β 3.58 <i>dq</i>	10, 12 10, 12	9 α	11 β (9.5), 12 11 α , 12 (7.0)
12	15.6	1.09 <i>t</i>	11		11 α (7.0), 11 β
13	171.5				
14	21.4	2.07 <i>s</i>	5, 13		
1'	168.3				
2'	119.3	6.38 <i>d</i>	1, 3'	6	3' (15.0)
3'	143.8	7.32 <i>dd</i>	1', 2', 4', 5'	5'	2', 4' (11.0)
4'	132.4	6.40 <i>m</i>	1', 6'	6'	3', 5', 6' (1.5)
5'	140.7	6.23 <i>m</i>	3', 6'	3'	4', 6' (6.8)
6'	19.0	1.89 <i>d</i>	4', 5'	4'	4', 5'

MS (EI): m/z (%): 362 $[M]^+$ (21), 336 (14), 320 (20), 294 (29), 274 (25), 245 (18), 207 (53), 205 (30), 191 (18), 179 (15), 163 (14), 95 (69), 83 (20), 67 (22), 43 (100).

$C_{20}H_{26}O_6$: Ber. 362.1729; Gef. 362.1731 (EIMS).

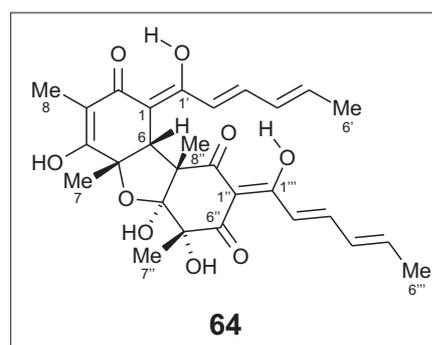
2.6.11 Bisvertinolon (64)

Gelber amorpher Feststoff (9.8 mg).

Schmp. 135 °C (MeOH);

Lit.: 127.5-135.5 °C (amorph aus $CHCl_3$);^[96]

156-158.3 °C (Diisopropylether).^[96]



$[\alpha]_D^{20} = -1099$ ($c = 0.1$ in MeOH);

Lit.: -1046 ($c = 0.91$ in $CHCl_3$),^[96] -495 ($c = 0.1$ in MeOH).^[98]

1H -NMR (600 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 1.28$ (s, 3 H, 7''-H), 1.41 (s, 3 H, 7-H), 1.42 (s, 3 H, 8-H), 1.46 (s, 3 H, 8''-H), 1.86 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H, 6'-H), 1.92 (d, $J = 6.9$ Hz, 3 H, 6'''-H), 3.84 (s, 1 H, 6-H), 6.15 (m, 1 H, 5'-H), 6.40 (m, 1 H, 4'''-H), 6.45 (m, 1 H, 5'''-H), 6.49 (m, 1 H, 4'-H), 6.65 (d, $J = 14.5$ Hz, 1 H, 2'-H), 7.27 (m, 1 H, 3'-H), 7.46 (d, $J = 15.5$ Hz, 1 H, 2'''-H), 7.55 (m, 1 H, 3'''-H).

^{13}C -NMR (150 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 7.9$ (C-8), 19.4 (C-6'), 19.8 (C-6'''), 23.3 (C-7''), 26.7 (C-7), 56.2 (C-6), 61.3 (C-3''), 80.4 (C-5''), 80.5 (C-5), 102.2 (C-1), 105.6 (C-4''), 110.7 (C-3), 122.3 (C-2'), 124.0 (C-2'''), 132.8 (C-4'''), 132.9 (C-4'), 137.7 (C-5'), 139.9 (C-3'), 147.7 (C-5'''), 148.1 (C-3'''), 167.8 (C-4), 169.6 (C-1'), 186.1 (C-1'''), 193.1 (C-2), 197.6 (C-6'), 201.6 (C-2'').

(Das Signal von C-1'' ist im ^{13}C -Spektrum nicht zu erkennen, wahrscheinlich wegen starker Verbreiterung durch H-D-Austausch.)

MS (FAB positiv, in 2-Nitrobenzylalkohol): m/z 513 $[M+H]^+$.

2.6.12 Meleagrín (38)

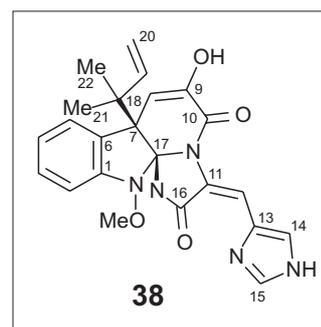
Weißer feinkristalliner Feststoff (234 mg).

Schmp. 210 °C (zers.; CH₂Cl₂);

Lit.: 250 °C (zers.; CH₂Cl₂ oder CHCl₃).^[89]

$[\alpha]_D^{20} = -115$ ($c = 0.1$ in MeOH);

Lit.: -116 ($c = 0.088$ in CHCl₃).^[35]



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 1.28$ (s, 3 H, 21-H oder 22-H), 1.31 (s, 3 H, 21-H oder 22-H), 3.74 (s, 3 H, NOCH₃), 5.00 (d, $J = 10.4$ Hz, 1 H, 20-H), 5.06 (d, $J = 17.2$ Hz, 1 H, 20-H), 5.40 (s, 1 H, 8-H), 6.08 (bs, 1 H, 19-H), 7.00 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 2-H), 7.07 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 4-H), 7.27 (t, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 3-H), 7.45 (s, 1 H, 14-H), 7.60 (d, $J = 7.6$ Hz, 1 H, 5-H), 7.97 (s, 1 H, 15-H), 8.29 (s, 1 H, 12-H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 24.2$ (breit, C-21 und C-22), 43.5 (C-18), 54.1 (C-7), 65.6 (NOCH₃), 103.2 (C-17), 108.3 (C-12), 110.8 (C-8), 112.9 (C-2), 113.8 (C-20), 124.5 (C-4), 126.0 (C-5), 126.8 (C-11), 127.3 (C-6), 128.6 (C-13), 129.5 (C-3), 131.1 (C-14), 137.5 (C-15), 144.3 (C-9 oder C-19), 144.5 (C-9 oder C-19), 148.1 (C-1), 160.8 (C-10), 166.9 (C-16).

MS (ESI, positiv): m/z 434 [M+H]⁺.

MS (EI): m/z (%): 433 [M]⁺ (21), 402 (12), 365 (76), 364 (46), 334 (26), 318 (30), 305 (36), 290 (13), 277 (49), 262 (14), 205 (16), 143 (24), 107 (34), 97 (24), 41 (100).

2.7 Isolierung von Inhaltsstoffen aus *Penicillium* sp. E00-2/7

2.7.1 Pilzmaterial, Extraktion und Isolierung der Reinsubstanzen

Der Pilz wurde von Steffens^[27] aus dem Inneren eines Schwammes der Art *Petrosia ficiformis* POIRET (Petrosiidae) isoliert, welcher aus einer Tiefe von 11-14 m vom Capo S. Andrea (Elba, Italien) stammt, für die chemische Untersuchung als 5-L-Standkultur in WS-Flüssigmedium^[28] angezogen und nach einer Wachstumsperiode von 14 d mit 10 % EtOAc versetzt.

Das Pilzmycel wurde abfiltriert, gefriergetrocknet und zweimal je 48 h mit 500 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) extrahiert. Die vereinigten und getrockneten Mycelextrakte löste man in 300 mL $\text{MeOH} + 3\%$ Wasser und extrahierte dreimal mit je 150 mL Petrolether. Nach Trocknen der Petroletherfraktion erhielt man 524 mg 'Petrolether-Extrakt'. Die Methanolfraction wurde ebenfalls getrocknet und zum Entsalzen zwischen 150 mL EtOAc und 50 mL Wasser partitioniert, man erhielt nach Trocknen der EtOAc-Phase 511 mg 'Ethylacetat-Extrakt'.

Das filtrierte Kulturmedium wurde dreimal mit je 800 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organische Phasen trocknete man und partitionierte sie auf die gleiche Weise wie den Mycelextrakt. Dabei wurden 101 mg 'Petrolether-Extrakt' und 634 mg 'Ethylacetat-Extrakt' erhalten.

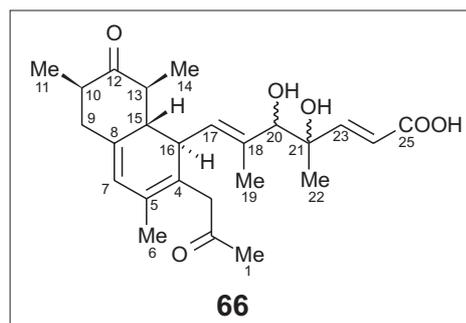
Die 'Ethylacetat-Extrakte' aus Mycel und Kulturfiltrat wurden vereinigt und durch präparative HPLC aufgetrennt: Wasser + 0.5 % TFA (A), MeCN + 0.5 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 20 % B, 40 min 100 % B. Die isolierten Substanzen, ihre Retentionszeiten und die isolierten Mengen waren: Hamigeronhydrat (**66**; 19.2 min, 9.8 mg), Hamigerin (**67**; 21.1 min, 6.3 mg), Cladosporin (**72**; 23.2 min, 13.1 mg), Citreohybridonol (**69**; 23.9 min, 12.1 mg), Hamigeron (**65**; 27.2 min, 15.1 mg), Atrovenetinon-Aceton-Addukt (**71**; 32.9 min, 7.1 mg). Hamigeron (**65**) wurde auf einer Kieselgelsäule mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 7\%$ MeOH als Eluens weiter aufgereinigt, man erhielt 5.9 mg Reinsubstanz.

2.7.2 Hamigeronhydrat (**66**)

Gelblicher amorpher Feststoff (9.8 mg).

Schmp. 79-81 °C ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$).

$[\alpha]_D^{20} = -134.1$ ($c = 0.2$ in MeOH).



CD ($c = 0.2$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{193} +5.5$, $\Delta\epsilon_{217} -0.6$, $\Delta\epsilon_{228} 0.0$, $\Delta\epsilon_{279} -10.1$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3430$ (br.), 2975 (m), 2932 (m), 1704 (s), 1455 (w), 1375 (m), 1165 (m), 1045 (w), 983 (w) cm^{-1} .

Tabelle 20. NMR-Daten von Hamigeronhydrat (**66**) in MeOH-d₄.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	COSY (J _{HH} [Hz])
1	29.7	2.15 <i>s</i>	2, 3	
2	209.6			
3	47.2	α 2.94 <i>d</i> β 3.51 <i>d</i>	2, 4, 5, 16 2, 4, 5, 16	3β (15.6) 3α (15.6)
4	124.7			
5	128.2			
6	18.2	1.80 <i>s</i>	4, 5, 7	
7	123.8	5.75 <i>s</i>	4, 6, 9, 15	
8	138.7			
9	43.6	α 2.02 <i>m</i> β 2.68 <i>m</i>	7, 8, 10 7, 8, 10, 12	9β, 10 9α
10	49.7	2.43 <i>m</i>	9, 11, 12	9α, 11 (6.5)
11	15.2	1.06 <i>d</i>	9, 10, 12	10
12	214.7			
13	50.3	2.43 <i>m</i>	12, 14, 15	14 (6.3), 15
14	11.4	1.03 <i>d</i>	12, 13, 15	13
15	51.4	1.73 <i>m</i>	4, 9, 13, 14, 16	13
16	39.7	3.14 <i>d</i>	3, 4, 5, 8, 13, 17, 18	17 (10.4)
17	131.7	5.26 <i>d</i>	4, 19, 20	16, 19 (1.39)
18	136.0			
19	14.6	1.74 <i>d</i>	17, 18, 20	17
20	83.2	3.82 <i>s</i>	17, 18, 19, 21, 22, 23	
21	76.8			
22	25.0	1.23 <i>s</i>	20, 21, 23	
23	155.1	7.00 <i>d</i>	21, 22, 24, 25	23 (15.8)
24	120.3	6.00 <i>d</i>	21, 23, 25	24
25	170.1			

Kopplungskonstante an C-20: $^1J_{C-20,20-H} = 143$ Hz.

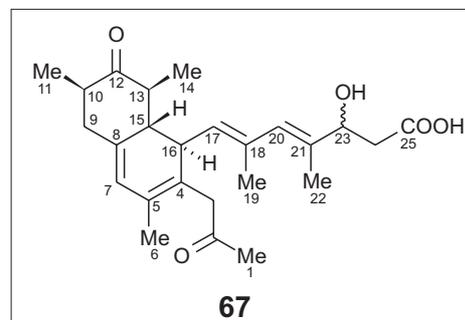
Die massenspektrometrische Bestimmung der Molekülmasse misslang, da in den EI- und CI-Spektren keine Molekülpeaks zu sehen waren, im ESI-Spektrum dagegen zu viele verschiedene Pseudomolekularionen.

2.7.3 Hamigerin (**67**)

Gelblicher amorpher Feststoff (6.3 mg).

Schmp. 80-85 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -185.2$ ($c = 0.1$ in MeOH).



CD ($c = 0.1$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{195} +4.5$, $\Delta\epsilon_{278} -12.3$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3437$ (br.), 2973 (m), 2936 (m), 2870 (w), 1757 (m), 1707 (s), 1451 (m), 1378 (m), 1226 (m), 1171 (m), 1066 (m) cm^{-1} .

Tabelle 21. NMR-Daten von Hamigerin (**67**) in MeOH- d_4 .

Position	^{13}C [ppm]	^1H [ppm]	HMBC	COSY (J_{HH} [Hz])
1	29.8	2.17 <i>s</i>	2, 3	
2	209.5			
3	47.5	α 2.96 <i>d</i> β 3.55 <i>d</i>	2, 4, 5, 16 2, 4, 5, 16	3 β (15.6) 3 α (15.6)
4	124.7			
5	128.7			
6	18.4	1.83 <i>s</i>	3, 4, 5, 7, 16	
7	124.0	5.80 <i>s</i>	4, 5, 6, 9, 15	
8	138.9			
9	43.7	α 1.99 <i>dd</i> β 2.70 <i>dd</i>	7, 8, 10, 12, 15 7, 8, 10	9 β (11.9), 10 (8.9) 9 α , 10 (6.5)
10	49.9	2.44 <i>m</i>	9, 12	9 α , 9 β , 11 (6.5)
11	15.3	1.06 <i>d</i>	9, 10, 12	10
12	214.6			
13	50.4	2.46 <i>m</i>	14, 15, 16	14 (6.5), 15 (12.5)
14	11.6	1.04 <i>d</i>	12, 13, 15	13
15	51.7	1.69 <i>d</i>	4, 8, 9, 13, 16, 17	13
16	40.0	3.17 <i>d</i>	3, 4, 5, 8, 13, 15, 17, 18	17 (10.0)
17	133.0	5.40 <i>d</i>	19, 20	16, 19 (1.2)
18	135.5			
19	14.1	1.76 <i>d</i>	17, 18, 20	17
20	81.6	3.94 <i>s</i>	5, 8, 17, 19, 21, 22	
21	94.5			
22	17.7	1.23 <i>s</i>	20, 21, 23	
23	70.1	4.54 <i>dd</i>	25	24 α (2.8), 24 β (7.2)
24	40.5	α 2.37 <i>dd</i> β 3.05 <i>dd</i>	21, 23, 25 21, 23, 25	24 β (18.0), 23 24 α , 23
25	178.4			

Die massenspektrometrische Bestimmung der Molekülmasse misslang, da in den EI- und CI-Spektren keine Molekülpeaks zu sehen waren, im ESI-Spektrum dagegen zu viele verschiedene Pseudomolekularionen.

2.7.4 Hamigeron (**65**)

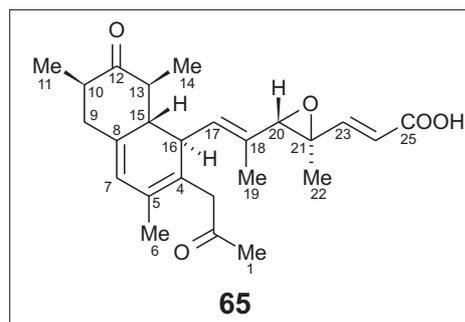
Farblos amorpher Feststoff (5.9 mg).

Schmp. 94-97 °C (MeOH/H₂O);

Lit.: keine Angabe.^[122]

$[\alpha]_D^{20} = -249.7$ ($c = 0.1$ in MeOH);

Lit.: -345 ($c = 0.4$ in MeOH).^[122]



CD ($c = 0.1$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{194} +7.7$, $\Delta\epsilon_{212} +2.4$, $\Delta\epsilon_{239} +8.7$, $\Delta\epsilon_{278} -22.2$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3429$ (br.), 2975 (m), 2936 (m), 1707 (s), 1446 (w), 1381 (m), 1178 (m), 1031 (w) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 1.04$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 14-H), 1.06 (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 11-H), 1.24 (s, 3 H, 22-H), 1.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H, 15-H), 1.74 (d, $J = 0.9$ Hz, 3 H, 19-H), 1.83 (s, 3 H, 6-H), 2.01 (dd, $J = 12.0, \sim 12$ Hz, 1 H, 9- H_α), 2.43 (m, 1 H, 10-H), 2.46 (m, 1 H, 13-H), 2.72 (dd, $J = 6.6, 12.0$ Hz, 1 H, 9- H_β), 2.82 (d, $J = 15.2$ Hz, 1 H, 3- H_α), 3.18 (d, $J = 10.5$ Hz, 1 H, 16-H), 3.28 (s, 1 H, 20-H), 3.57 (d, $J = 15.2$ Hz, 1 H, 3- H_β), 5.26 (dq, $J = 1.4, 10.5$ Hz, 1 H, 17-H), 5.80 (s, 1 H, 7-H), 6.00 (d, $J = 15.7$ Hz, 1 H, 24-H), 6.77 (d, $J = 15.7$ Hz, 1 H, 23-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH- d_4): $\delta = 11.4$ (C-14), 14.3 (C-19), 15.2 (C-11), 18.2 (C-6), 25.0 (C-22), 29.6 (C-1), 39.4 (C-12), 43.5 (C-9), 47.2 (C-3), 49.9 (C-10), 50.1 (C-13), 51.5 (C-15), 61.6 (C-21), 68.8 (C-20), 122.9 (C-24), 123.8 (C-7), 124.1 (C-4), 128.9 (C-5), 129.7 (C-17), 129.7 (C-18), 138.9 (C-8), 150.8 (C-23), 169.3 (C-25), 209.0 (C-2), 214.4 (C-12).

Kopplungskonstante am Oxiranring: $^1J_{\text{C-20,20-H}} = 175$ Hz.

MS (EI): m/z (%): 412 $[\text{M}]^+$ (66), 394 (13), 327 (15), 305 (11), 298 (15), 297 (14), 267 (19), 257 (27), 255 (65), 252 (23), 244 (20), 241 (22), 240 (22), 239 (20), 213 (26), 201 (35), 169 (39), 157 (29), 43 (100).

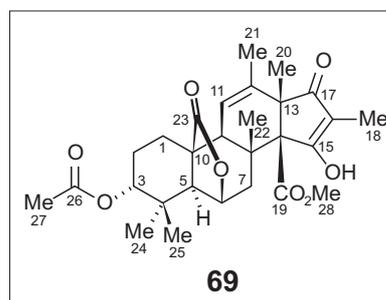
2.7.5 Citreohybridonol (69)

Farbloser amorpher Feststoff (12.1 mg).

Schmp. 218-220 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = +12.2$ ($c = 0.2$ in MeOH);

Lit.: $+67.3$ ($c = 0.066$ in CHCl_3).^[124]



CD ($c = 0.2$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{209} -28.6$, $\Delta\epsilon_{251} +15.0$, $\Delta\epsilon_{300} -3.3$.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.80 (s, 3 H, 25-H), 1.00 (s, 3 H, 24-H), 1.26 (s, 3 H, 20-H), 1.31 (s, 3 H, 22-H), 1.32 (m, 1 H, 1- H_α), 1.59 (s, 3 H, 18-H), 1.70 (m, 2 H, 2-H), 1.86 (dd, J = 1.5, 2.5 Hz, 3 H, 21-H), 2.03 (s, 3 H, 27-H), 2.06 (s, 1 H, 5-H), 2.11 (m, 1 H, 1- H_β), 2.45 (t, J = 2.2 Hz, 1 H, 9-H), 2.49 (dd, J = 4.4, 14.5 Hz, 1 H, 7- H_α), 3.37 (d, J = 14.5 Hz, 1 H, 7- H_β), 3.59 (s, 3 H, 28-H), 4.63 (dd, J = 2.0, 3.7 Hz, 1 H, 3-H), 4.84 (d, J = 4.5 Hz, 1 H, 6-H), 5.56 (m, 1 H, 11-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ = 6.5 (C-18), 17.8 (C-20), 20.7 (C-21), 20.9 (C-27), 22.1 (C-1), 22.7 (C-25), 23.1 (C-2), 24.5 (C-22), 26.5 (C-24), 35.5 (C-4), 38.2 (C-7), 43.4 (C-8), 45.2 (C-10), 51.9 (C-28), 53.1 (C-9), 56.2 (C-5), 57.0 (C-13), 71.6 (C-14), 77.6 (C-3), 79.9 (C-6), ~113 (C-16), 122.8 (C-11), 139.7 (C-12), 172.1 (C-26), 172.5 (C-19), 181.9 (C-23), ~195 (C-15), ~199 (C-17).

MS (ESI, positiv): m/z 501.5 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.7.6 Atrovetinon-Aceton-Addukt (71)

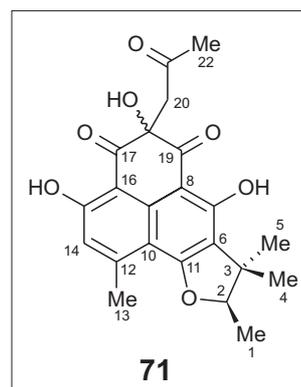
Gelblicher amorpher Feststoff (7.1 mg).

Schmp. 70-75 °C (MeOH);

Lit.: keine Angabe.^[127]

$[\alpha]_D^{20}$ = +25.9 (c = 0.1 in MeOH);

Lit.: keine Angabe.^[127]



CD (c = 0.1 in MeOH): $\Delta\epsilon_{255}$ +1.4, $\Delta\epsilon_{293}$ -0.4, $\Delta\epsilon_{340}$ +0.8.

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH-d_4): δ = 1.32 (d, J = 1.9 Hz, 3 H, 5-H), 1.49 (dd, J = 2.6, 6.7 Hz, 3 H, 1-H), 1.54 (d, J = 2.1 Hz, 3 H, 4-H), 2.15 (s, 3 H, 21-H), 2.80 (d, J = 0.9 Hz, 3 H, 13-H), 3.62 (dd, J = 4.0, 11.0 Hz, 1 H, 20- H_α), 3.67 (dd, J = 3.3, 11.0 Hz, 1 H, 20- H_β), 4.70 (qui, J = 6.6 Hz, 1 H, 2-H), 6.79 (d, J = 0.8 Hz, 1 H, 14-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH-d_4): δ = 14.9 (C-1), 21.1 (C-5), 24.5 (C-13), 26.2 (C-4), 29.8 (C-22), 44.7 (C-3), 51.2 (C-20), 75.9 (C-18), 93.0 (C-2), 107.0 (C-16), 110.9 (C-10), 118.8 (C-14), 119.7 (C-6), 139.1 (C-9), 149.9 (C-12), 166.7, 166.9, 167.7 (C-7, C-11 und C-15), 200.1 (C-19), 202.0 (C-17), 209.6 (C-21). Das Signal von C-8 konnte nicht identifiziert werden. Da es sich um ein Diastereomerenmisch handelt, lagen einige ^{13}C -Signale verdoppelt vor.

MS (ESI, positiv): m/z 399.8 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2.7.7 Cladosporin (72)

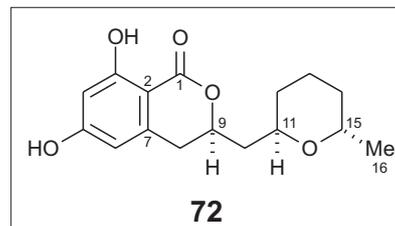
Gelber amorpher Feststoff (13.1 mg).

Schmp. 100-110 °C (Et₂O);

Lit.: 180-184 °C (Diisopropylether).^[129]

$[\alpha]_D^{20} = -16.8$ ($c = 0.2$ in MeOH);

Lit.: -23.3 ($c = 0.1$ in EtOH).^[186]



CD ($c = 0.2$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{296} +1.8$, $\Delta\epsilon_{223} -0.4$, $\Delta\epsilon_{236} +1.7$, $\Delta\epsilon_{249} +0.6$, $\Delta\epsilon_{267} +1.2$, $\Delta\epsilon_{298} -0.9$.

¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 1.19$ (d, $J = 6.5$ Hz, 3 H, 16-H), 1.32 (m, 1 H, 14-H _{α}), 1.39 (m, 1 H, 12-H _{α}), 1.70 (m, 1 H, 12-H _{β}), 1.70 (m, 2 H, 13-H), 1.70 (m, 1 H, 14-H _{β}), 1.78 (m, 1 H, 10-H _{α}), 2.12 (m, 1 H, 10-H _{β}), 2.90 (m, 2 H, 8-H), 3.92 (m, 1 H, 15-H), 4.13 (m, 1 H, 11-H), 4.67 (m, 1 H, 9-H), 6.20 (d, $J = 2.3$ Hz, 1 H, 4-H), 6.22 (m, 1 H, 6-H).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄): $\delta = 19.5$ (C-13), 20.1 (C-16), 31.6 (C-12), 32.9 (C-14), 34.5 (C-8), 39.4 (C-10), 68.5 (C-11), 68.5 (C-15), 78.0 (C-9), 101.8 (C-2), 102.3 (C-4), 108.1 (C-6), 143.7 (C-7), 165.8 (C-5), 166.4 (C-3), 171.6 (C-1).

MS (ESI, positiv): m/z 293.4 [M+H]⁺.

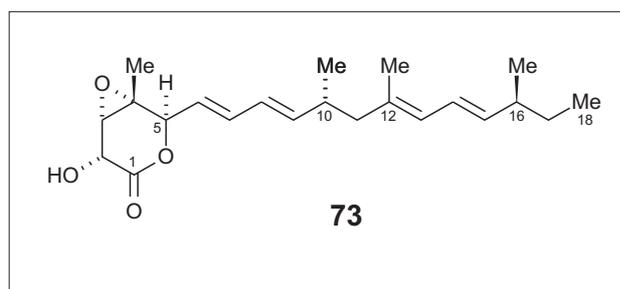
2.8 Isolierung von Nafuredin (73) aus Pilzstamm E00-5/5

Die Methanolfraction von Pilzstamm E00-5/5 (isoliert aus dem Schwamm *Oscarella lobularis*) wurde in Methanol gelöst und über RP18-Kartuschen gereinigt. Zur Entfernung von polaren Substanzen wurde der Extrakt anschließend in Wasser (40 mL) gelöst und dreimal mit EtOAc (je 30 mL) extrahiert. Nach Eindampfen der organischen Phasen erhielt man 58 mg gereinigten Extrakt, der in 500 mL Methanol gelöst und mittels präparativer HPLC gereinigt wurde: Wasser (A), MeCN + 0.5 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 25 % B, 25 min 75 % B, 30 min 100 % B. Nafuredin (73) wurde nach 34 min eluiert.

Nafuredin (73)

Weißer amorpher Feststoff (8.0 mg).

Schmp. 92 °C (MeOH);



Lit.: 105 °C (*n*-Hexan)^[187]

$[\alpha]_D^{20} = +81.8$ ($c = 0.1$ in CHCl_3); Lit.: $+89.9$ ($c = 0.1$ in CHCl_3).^[187]

¹H-NMR (600 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.86$ (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H, 18-H), 0.98 (d, $J = 3.6$ Hz, 3 H, 10- CH_3), 1.00 (d, $J = 3.6$ Hz, 3 H, 16- CH_3), 1.33 (m, 3 H, 17-H), 1.47 (s, 3 H, 4- CH_3), 1.70 (s, 3 H, 12- CH_3), 2.10 (m, 1 H, 16-H), 1.98 (m, 1 H, 11- H_α), 2.08 (m, 1 H, 11- H_β), 2.40 (m, 1 H, 10-H), 3.51 (s, 1 H, 3-H), 4.56 (s, 1 H, 2-H), 4.93 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 5-H), 5.45 (dd, $J = 7.8, 15.0$ Hz, 1 H, 15-H), 5.50 (dd, $J = 7.9, 15.1$ Hz, 1 H, 6-H), 5.75 (d, $J = 10.7$ Hz, 1 H, 13-H), 5.80 (dd, $J = 6.8, 15.0$ Hz, 1 H, 9-H), 6.01 (dd, $J = 10.4, 15.1$ Hz, 1 H, 8-H), 6.21 (dd, $J = 10.7, 15.1$ Hz, 1 H, 14-H), 6.39 (dd, $J = 10.4, 15.1$ Hz, 1 H, 7-H).

¹³C-NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 12.0$ (C-18), 16.8 (12- CH_3), 18.0 (4- CH_3), 19.7 (10- CH_3), 20.4 (16- CH_3), 30.1 (C-17), 35.1 (C-11), 38.9 (C-16), 47.5 (C-11), 58.5 (C-4), 58.8 (C-3), 68.3 (C-2), 80.4 (C-5), 122.3 (C-6), 124.9 (C-14), 126.3 (C-8), 127.3 (C-13), 133.9 (C-12), 138.1 (C-7), 139.1 (C-15), 145.4 (C-9), 170.7 (C-1).

MS (ESI, positiv): m/z 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Die NMR-Spektren stimmen gut mit den Daten aus der Literatur überein.^[187]

2.9 Isolierung von Cochliodinol (74) aus Pilzstamm E00-2/1

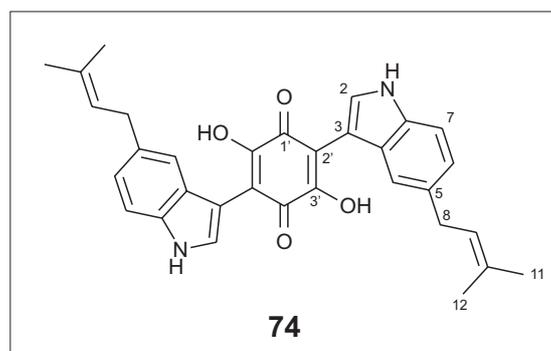
Der Extrakt des Stammes E00-2/1, welcher aus dem Schwamm *Petrosia ficiformis* isoliert worden war, wurde analog der Isolierung von Nafuredin (siehe voriger Abschnitt) entsalzt und durch präparative HPLC aufgetrennt. Nach 33 min wurde Cochliodinol (76) eluiert.

Cochliodinol (74)

Rotbrauner amorpher Feststoff (2.2 mg).

Schmp. 199-202 °C (MeOH);

Lit.: 206 °C (MeOH)^[188]



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, MeOH-d_4): $\delta = 1.73$ (d, $J = 1.0$ Hz, 3 H, 12-H), 1.75 (s, 3 H, 11-H), 3.41 (d, $J = 7.3$ Hz, 2 H, 8-H), 5.38 (m, 1 H, 9-H), 6.95 (dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, 1 H, 6-H), 7.3 (d, $J = 8.3$ Hz, 1 H, 7-H), 7.33 (q, $J = 0.8$ Hz, 1 H, 4-H), 7.50 (s, 1 H, 2-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOH-d_4): $\delta = 17.9$ (C-11), 26.0 (C-12), 35.7 (C-8), 105.5 (C-2), 112.0 (C-7), 121.8 (C-4), 123.3 (C-6), 126.1 (C-9), 128.3 (C-3a), 128.5 (C-2), 132.1 (C-10), 133.6 (C-5), 136.2 (C-7a), 210.1 (C-1').

Die Signale von C-2' und C-3' waren vermutlich wegen des Tautomerengleichgewichts stark verbreitert und somit im ^{13}C -Spektrum nicht erkennbar.

MS (EI): m/z (%): 508 $[\text{M}+2]^+$ (48), 506 $[\text{M}]^+$ (9), 492 (21), 439 (18), 385 (15), 383 (14), 371 (46), 185 (15), 133 (36).

Die $^1\text{H-NMR}$ - und MS-Daten stimmen gut mit den Daten aus der Literatur überein.^[188]

2.10 Synthese von Xestodecalacton A (75)

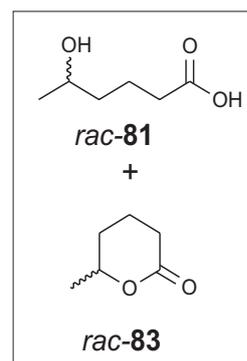
2.10.1 Darstellung von *rac*-84

In 300 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1) wurden 5 g (37.2 mmol) 5-Oxohexansäure (**82**, 97proz.) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden unter Rühren im Verlauf von 30 min portionsweise 4.23 g (112 mmol) NaBH_4 zugegeben. Nach weiteren 10 min bei 0 °C wurde ohne Kühlung gerührt, bis das Reaktionsgemisch auf Raumtemperatur war. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum wurde der Rückstand in 100 mL 2 M HCl aufgenommen und viermal mit je 30 mL CH_2Cl_2 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 30 mL Wasser gewaschen und über MgSO_4 getrocknet. Nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man ein Gemisch aus 5-Hydroxyhexansäure (*rac*-**81**) und δ -Caprolacton (*rac*-**83**) als leicht gelbliches Öl.

5-Hydroxyhexansäure (*rac*-**81**)

+ δ -Caprolacton (*rac*-**83**)

Ausbeute: 4.23 g [32.1 mmol, 86 % (berechnet als **81**)].

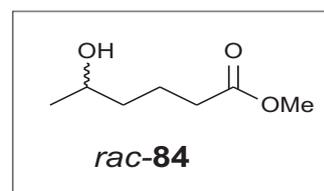


$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.12$ (d, $J = 6.3$ Hz, CHCH_3 von **81**), 1.35 (d, $J = 6.5$ Hz, CHCH_3 von **83**), 1.40 - 1.90 (m, je zweimal CH_2 von **81** und **83**), 2.25 - 2.60 (m, je CH_2 von **81** und **83**), 3.78 (m, CHCH_3 von **81**), 4.40 (m, CHCH_3 von **83**). Integrale sind nicht angegeben, da ein Gemisch zweier Verbindungen vorliegt.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.9, 21.5, 22.0, 23.78, 23.84, 29.6, 35.6, 39.0, 51.9, 67.8, 172.2, 174.5$.

In 37 mL abs. MeOH wurden 4.21 g des **81-83**-Gemisches gelöst. 3.5 g Kationentauscher (Bayer, Lewatit SC108, H^+ -Form) wurde mit abs. MeOH gewaschen und zu der Lösung gegeben. Anschließend wurde das Gemisch für 16 h zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das Reaktionsgemisch abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Durch Destillation des öligen Rückstandes im Vakuum (0.06 mbar) erhielt man den racemischen 5-Hydroxyhexansäuremethylester (*rac*-**84**).

rac-5-Hydroxyhexansäuremethylester (*rac*-**84**)



Ausbeute: 4.01 g [27.5 mmol, 74 % (berechnet für reines **83** als Edukt)].

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.80$ (d, $J = 6.2$ Hz, 3 H, CHCH_3), 1.43 (m, 2 H, CH_2), 1.70 (m, 2 H, CH_2), 2.34 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, CH_2), 3.66 (s, 3 H, COOCH_3), 3.80 (m, 1 H, CHCH_3).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.2, 23.7, 34.0, 38.7, 51.7, 67.7, 174.4$.

2.10.2 Darstellung von (*S*)-**84** [bzw. (*R*)-**84**]

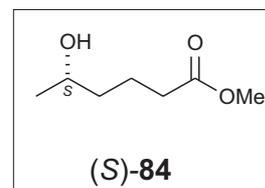
Ausgehend vom Acetonid des (2*S*,3*R*)-Dihydroxybutansäuremethylesters [(2*S*,3*R*)-**85**] wurde nach einer literaturbekannten^[141] Vorschrift mit einer Ausbeute von insgesamt 48 % das Acetonid des (4*S*,5*S*)-2-Hexensäuremethylesters [(4*S*,5*S*)-**86**] hergestellt.

Die Reduktion von (4*S*,5*S*)-**86** nach einer Vorschrift aus der Literatur lieferte (*S*)-5-Hydroxyhexansäuremethylester [(*S*)-**84**] nicht in ausreichender Reinheit und nur in schlechter Ausbeute, weshalb das Verfahren modifiziert wurde:

In 1 mL abs. MeOH wurden 50 mg (0.25 mmol) (4*S*,5*S*)-**86** gelöst und zu einer auf -20 °C vorgekühlten Suspension von 182 mg (7.5 mmol) Mg-Pulver in 2 mL abs. MeOH gegeben. Anschließend wurde 5 mg HgCl₂ zugegeben und zuerst 1.5 h lang bei -20 °C und dann 20.5 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurden 3 mL Diethylether zugegeben, und nach weiteren 5 min Rühren wurde das Reaktionsgemisch über eine mit Kieselgel gefüllte Fritte filtriert, die mit Diethylether nachgewaschen wurde. Nach vorsichtigem Abdampfen der Lösungsmittel im Vakuum erhielt man 32.5 mg eines Gemisches aus isomeren 5-Hydroxyhexensäuremethylestern. Dieses Gemisch wurde in 22 mL abs. MeOH gelöst, mit 38 mg Pd/C (10 %) versetzt und 27 h lang unter Wasserstoffatmosphäre (Atmosphärendruck) gerührt. Die Reaktionslösung wurde dann über Celite abfiltriert und das Lösungsmittel schonend im Vakuum abgedampft. Man erhielt (*S*)-5-Hydroxyhexensäuremethylester [(*S*)-**84**] als gelbliches Öl.

Zur Darstellung von (*R*)-5-Hydroxyhexensäuremethylester [(*R*)-**84**] wurde auf die gleiche Weise verfahren, jedoch ausgehend vom Acetonid des (2*R*,3*S*)-Dihydroxybutansäuremethylesters [(2*R*,3*S*)-**85**].

(*S*)-5-Hydroxyhexensäuremethylester [(*S*)-**84**]

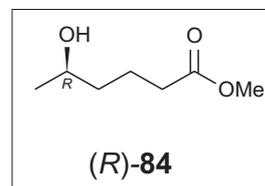


Ausbeute: 19.7 mg [0.135 mmol, 54 % bezogen auf (4*S*,5*S*)-**86**].

$[\alpha]_D^{20} = +2.1$ ($c = 0.27$ in CHCl₃);

NMR-Daten: siehe *rac*-**84**.

(*R*)-5-Hydroxyhexensäuremethylester [(*R*)-**84**]



Ausbeute: 19.7 mg [0.135 mmol, 78 % bezogen auf (4*R*,5*R*)-**86**].

$[\alpha]_D^{20} = -4.3$ ($c = 0.21$ in CHCl₃);

NMR-Daten: siehe *rac*-**84**.

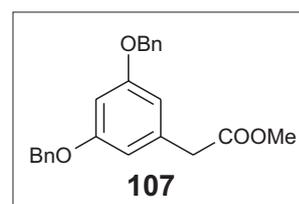
2.10.3 Darstellung von (3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäure (88)

2.10.3.1 Benzylierung von (3,5-Dihydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (87)

In 22.5 mL Aceton wurde 1 g (5.49 mmol) (3,5-Dihydroxyphenyl)-essigsäuremethylester (**87**) gelöst und nach Zugabe von 2.82 mL (24.5 mmol) Benzylchlorid und 6.77 g (48.9 mmol) K_2CO_3 21 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die filtrierte Reaktionslösung eingengt und über eine Kieselgelsäule (PE \rightarrow CH_2Cl_2) aufgereinigt. Man erhielt (3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäuremethylester (**107**) als gelblich-weißen Feststoff.

(3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäuremethylester (**107**)

Ausbeute: 1.92 g (5.3 mmol, 96.5 %).



Schmp. 62-64 °C (PE/ CH_2Cl_2);

Lit.: 63-64 °C (MeOH)^[189]

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ = 3.42 (s, 2 H, $ArCH_2COOMe$), 3.61 (s, 3 H, $COOCH_3$), 4.95 (s, 4 H, OCH_2Ar), 6.44 (s, 3 H, Ar-H), 7.20-7.50 (m, 10 H, Ar-H).

^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 41.9, 52.4, 70.6, 101.3, 108.9, 127.7, 128.2, 129.0, 136.5, 137.3, 160.5, 172.1.

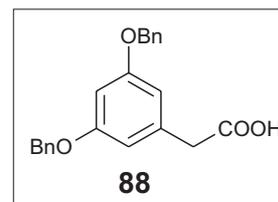
MS (EI): m/z (%): 362 [M]⁺ (5), 181 (9), 91 (100).

2.10.3.2 Verseifung von (3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäuremethylester (**107**)

In 44 mL 2 M KOH wurden 1.92 g (5.3 mmol) (3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäuremethylester (**107**) aufgeschlämmt und 50 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsgemisches wurden 14 mL 10 M Na_2HSO_4 -Lsg. zugegeben und die Suspension anschließend mehrfach mit Toluol extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und im Vakuum zur Trockne eingengt. Nach Umkristallisation des Rückstandes aus EtOAc/Cyclohexan erhielt man **88** in Form von farblosen Kristallen.

(3,5-Dibenzyloxyphenyl)-essigsäure (88)

Ausbeute: 1.48 g (4.26 mmol, 80.4 %).



Schmp. 105-106 °C (EtOAc/Cyclohexan);

Lit.: 104-106 °C (EtOAc/Cyclohexan)^[144]

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 3.51 (s, 2 H, ArCH₂COOMe), 4.94 (s, 4 H, OCH₂Ar), 6.50 (s, 3 H, Ar-H), 7.20-7.50 (m, 10 H, Ar-H).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 41.5, 70.5, 101.5, 109.0, 128.0, 128.4, 129.0, 135.7, 137.1, 160.5, 177.0.

MS (EI): *m/z* (%): 348 [M]⁺ (5), 181 (9), 91 (100), 65 (13).

2.10.4 Darstellung von 5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäuremethylester (89)

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 750 mg (2.15 mmol) **88** in 19 mL abs. CH₂Cl₂ gelöst und die Lösung mit 489 mg (2.37 mmol) DCC und einer Spatelspitze DMAP versetzt. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurden 299 mg (2.05 mmol) *rac*-**84** zugefügt, und die Mischung wurde 1.5 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernen des ausgefallenen Harnstoffderivates durch Filtration lieferte Säulenchromatographie auf Kieselgel (*n*-Hexan/EtOAc 9:1 → 1:1) das Produkt *rac*-5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäuremethylester (*rac*-**89**) als schwach gelbes Öl. (*S*)-**89** und (*R*)-**89** wurden entsprechend durch Verwendung von (*S*)-**84** bzw. (*R*)-**84** dargestellt.

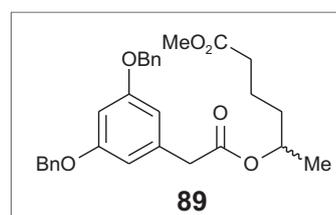
5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäuremethylester (89)

Ausbeute: 806 mg [1.69 mmol, 78.6 % (für *rac*-**89**)];

für (*S*)-**89**: 54.3 %; für (*R*)-**89**: 52.0 %.

$[\alpha]_D^{20} = +5.2$ (*c* = 0.98 in CHCl₃) für (*S*)-**89**;

$[\alpha]_D^{20} = -3.2$ (*c* = 0.96 in CHCl₃) für (*R*)-**89**.



IR (Film): $\tilde{\nu} = 3440$ (br.), 3033 (w), 2975 (w), 2950 (m), 2872 (w), 1734 (s), 1595 (s), 1453 (s), 1378 (m), 1292 (m), 1254 (m), 1162 (s), 1058 (m), 834 (m), 739 (m), 699 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.21$ (d, $J = 6.2$ Hz, 3 H, OCHCH_3), 1.50-1.70 (m, 4 H, zweimal CH_2), 2.30 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H, CH_2), 3.53 (s, 2 H, ArCH_2), 3.68 (s, 3 H, COOCH_3), 4.92 (m, 1 H, OCHCH_3), 5.05 (s, 4 H, OCH_2Ar), 6.57 (m, 3 H, ArH), 7.30-7.50 (m, 10 H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.2, 21.1, 34.0, 35.5, 42.3, 51.9, 70.5, 71.4, 101.3, 108.8, 127.9, 128.4, 129.0, 136.7, 137.3, 160.4, 171.3, 174.1$.

MS (EI): m/z (%): 476 $[\text{M}]^+$ (6), 181 (10), 129 (25), 91 (100), 69 (6), 65 (7).

Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{29}\text{H}_{32}\text{O}_6$ (476.57): C 73.02, H 6.77; gef.: C 72.79, H 6.74.

2.10.5 Darstellung von 5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäure (90)

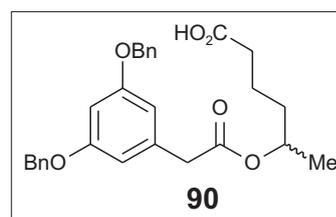
Zu 8 mL HMPA wurden 75 mg (0.157 mmol) *rac*-**89** und 46 mg (0.9 mmol) getrocknetes NaCN gegeben. Diese Mischung wurde 23 h auf 85 °C erhitzt, anschließend wurden 100 mL 2 M HCl zugegeben und zweimal mit je 100 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Das Reaktionsprodukt wurde durch Chromatographie auf einer Kieselgelsäule aufgereinigt (*n*-Hexan/EtOAc 8:2 dann EtOAc/MeOH 8:2). Man erhielt *rac*-**90** als schwach gelbes Öl. (*S*)-**90** und (*R*)-**90** wurden entsprechend durch Verwendung von (*S*)-**89** bzw. (*R*)-**89** dargestellt.

5-[(3,5-Dibenzyloxyphenyl)acetoxy]-hexansäure (90)

Ausbeute: 58 mg [0.126 mmol, 80.0 % (für *rac*-**90**);
für (*S*)-**90**: 62.3 %; für (*R*)-**90**: 71.3 %.

$[\alpha]_D^{20} = +4.1$ ($c = 0.76$ in CHCl_3) für (*S*)-**90**;

$[\alpha]_D^{20} = -1.9$ ($c = 0.91$ in CHCl_3) für (*R*)-**90**.



IR (Film): $\tilde{\nu} = 2927$ (m), 1729 (m), 1696 (m), 1595 (s), 1447 (m), 1378 (m), 1345 (m), 1301 (m), 1164 (s), 1059 (m), 1029 (m), 738 (m), 696 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.15$ (d, $J = 6.2$ Hz, 3 H, OCHCH_3), 1.50-1.70 (m, 4 H, zweimal CH_2), 2.25 (m, 2 H, CH_2), 3.45 (s, 2 H, ArCH_2), 4.85 (m, 1 H, OCHCH_3), 4.95 (s, 4 H, OCH_2Ar), 6.46 (m, 3 H, ArH), 7.25-7.40 (m, 10 H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 20.2, 20.9, 33.9, 35.4, 42.3, 70.5, 71.4, 101.3, 108.9, 136.7, 137.2, 160.4, 171.4, 178.7$.

MS (ESI, positiv): m/z 463 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

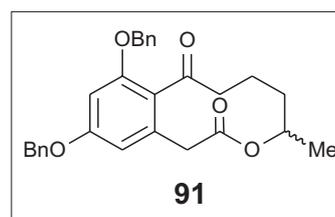
Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{O}_6$ (462.53): C 72.71, H 6.54; gef.: C 72.51, H 6.79.

2.10.6 Darstellung von *O,O*-Dibenzylxestodecalacton A (**91**)

In 4.2 mL TFA/TFAA (2:1) wurden 90 mg (0.195 mmol) *rac*-**90** unterstützt durch Ultraschall gelöst und 105 min bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Anschließend wurde das TFA/TFAA-Gemisch im Vakuum entfernt und das Produkt durch PSC auf einer Kieselgelplatte ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3:1) gereinigt.

O,O-Dibenzylxestodecalacton A (**91**)

Ausbeute: 36.7 mg [0.083 mmol, 42.5 % (für *rac*-**91**)];
für (*S*)-**91**: 27.6 %; für (*R*)-**91**: 31.0 %.



$[\alpha]_D^{20} = -28.1$ ($c = 0.09$ in CHCl_3) für (*S*)-**91**;

$[\alpha]_D^{20} = +32.2$ ($c = 0.24$ in CHCl_3) für (*R*)-**91**.

IR (Film): $\tilde{\nu} = 2958$ (w), 2925 (m), 2853 (w), 1728 (m), 1681 (w), 1601 (m), 1454 (w), 1434 (w), 1378 (w), 1332 (w), 1260 (m), 1156 (w), 1077 (m), 1047 (m), 1028 (m), 802 (w), 737 (w), 698 (w) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.20$ (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, OCHCH_3), 1.40-1.70 (m, 3 H), 2.0 (m, 1 H), 2.75 (m, 1 H), 2.95 (m, 1 H), 3.45 (m, 1 H), 4.30 (m, 1 H), 4.82 (m, 1 H), 5.05 (s, 4 H, ArCH_2O), 6.40 (s, 1 H, ArH), 6.57 (s, 1 H, ArH), 7.30-7.50 (m, 10 H, ArH); möglicherweise aufgrund dynamischer Effekte waren die Signale des Lactonrings verbreitert.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 29.9, 37.1, 40.7, 70.4, 71.0, 99.4, 109.3, 127.7, 127.8, 128.42, 128.47, 128.89, 128.92, 136.4, 136.5, 160.5, 208.1$; Einige Signale, vornehmlich des Lactonrings, sind im ^{13}C -Spektrum nicht sichtbar, dies ist vermutlich auf dynamische Effekte zurückzuführen.

MS (ESI, positiv): m/z 445 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Elementaranalyse (%): ber. für $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{O}_5$ (444.52): C 75.65, H 6.35; gef.: C 75.22, H 6.52.

2.10.7 Hydrogenolyse von **91** zu Xestodecalacton A (**75**)

In 25 mL THF/MeOH (1:1) wurden 36.7 mg (0.0825 mmol) *rac*-**91** unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Nach Zugabe von 42 mg Pd/C (10 %) wurde das Gemisch bei Raumtemperatur unter Wasserstoffatmosphäre (Normaldruck) gerührt. Nach 2 h wurde die Reaktion durch Abfiltrieren des Katalysators abgebrochen und das Filtrat eingengt. Das Rohprodukt (33.1 mg) wurde durch präparative HPLC weiter aufgereinigt: Wasser (A), MeCN (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 20 % B, 20 min 50 % B, 25 min 100 % B. Xestodecalacton A (**75**) wurde von 15.0 bis 16.0 min eluiert. Nach Trocknen der Fraktionen erhielt man **75** als amorphes weißes Pulver.

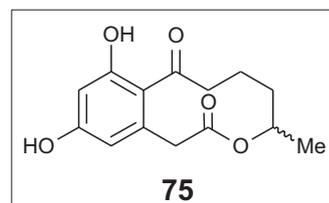
Eine Optimierung der teilweise geringen Ausbeuten wurde nicht durchgeführt, da das Ziel der Synthese in erster Linie die Aufklärung der absoluten Konfiguration von Xestodecalacton A war.

Xestodecalacton A (**75**)

Ausbeute: 7.9 mg [0.030 mmol, 36.4 % (für *rac*-**75**)];

für (*R*)-**75**: 55.8 % (insgesamt 7.4 mg);

von (*S*)-**75** wurde eine sehr geringe Menge, ausreichend nur für die HPLC-Untersuchungen erhalten.



Schmp. 180-190 °C (zers. ohne Schmelzen; MeCN/Wasser);

Lit.: keine Angabe.^[135]

$[\alpha]_D^{20} = +56,8$ ($c = 0.24$ in CHCl_3) für (*R*)-**83**; Lit.: $+28.3$ ($c = 0.31$ in MeOH).^[135]

CD von (*R*)-**75** ($c = 0.1$ in MeOH): $\Delta\epsilon_{197} +6.6$, $\Delta\epsilon_{214} +0.3$, $\Delta\epsilon_{220} +1.2$, $\Delta\epsilon_{264} -5.0$, $\Delta\epsilon_{314} 6.3$.

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3436$ (s), 2925 (m), 2847 (w), 1715 (s), 1658 (s), 1621 (m), 1590 (s), 1468 (m), 1377 (m), 1261 (s), 1244 (s), 1163 (s), 1038 (m) cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.14$ (d, $J = 6.3$ Hz, 3 H, OCHCH_3), 1.50 (m, 1 H, CH_2), 1.80-1.95 (m, 3 H, CH_2), 2.70-2.80 (m, 1 H, CH_2), 3.03 (ddd, $J = 15.9, 10.8, 2.1$ Hz, 1 H, CH_2), 3.45 (d, $J = 18.5$ Hz, 1 H, ArCOCH_2), 3.98 (d, $J = 18.3$ Hz, 1 H, ArCOCH_2), 4.75 (m, 1 H, OCHCH_3), 6.13 (dd, $J = 2.2, <1$ Hz, 1 H, ArH), 6.25 (dd, $J = 2.2, <1$ Hz, 1 H, ArH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): $\delta = 21.19$ (OCHCH_3), 23.9, 38.0, 41.3, 47.0, 75.8, 102.6, 110.7, 122.9, 136.2, 158.9, 161.0, 172.0 (CH_2COOCH), 211.8 (ArCOCH_2).

MS (EI): m/z (%): 264 $[\text{M}]^+$ (75), 246 (77), 231 (17), 217 (34), 205 (65), 194 (44), 189 (13), 176 (16), 167 (73), 162 (25), 149 (100), 141 (26), 129 (34), 97 (34).

$\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$: Ber. 264.0998; Gef. 264.1000 (für *rac*-**75**; EIMS).

Natürliches Xestodecalacton A (**75**) sowie synthetisches (*R*)-, (*S*)- und *rac*-**75** wurden durch HPLC an chiraler Phase analysiert (Säule: Chiralcel OD-RH, 4.6 x 150 mm; Eluenten: Wasser + 0.05 % TFA(A), MeCN (B); Fluss 0.5 mL/min; 0 min 20 % B, 30 min 35 % B, 39 min 80 % B). (*R*)-**75** wurde nach 13.9 min (*S*)-**75** nach 14.5 min eluiert. Durch Koelutionsexperimente wurde festgestellt, dass der Naturstoff identisch mit (*R*)-**75** ist.

3 Isolierung von Naturstoffen aus Bakterien

3.1 Isolierung von 2-Methylthionaphthochinon (95)

Der *n*-Butanol-Extrakt (100-150 mg) einer 500-mL-Bakterienkultur (isoliert, kultiviert und extrahiert durch Dr. N. Thakur, Universität Mainz) wurde zuerst durch Gelchromatographie auf Sephadex LH-20 aufgetrennt (Säule: 23 x 3 cm; Eluent: MeOH; Fraktionsgröße: 18 mL). Fraktionen 14 und 15 wurden nach Entfernen des Lösungsmittels einer präparativen HPLC unterzogen: Wasser + 0.5 % TFA (A), MeCN + 0.5 % TFA (B); Fluss 12 mL/min; 0 min 0 %

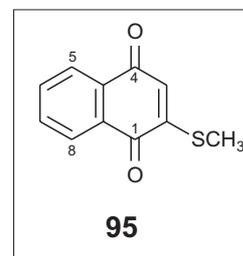
B, 30 min 100 % B. Die nach 23 min eluierte Verbindung ergab nach dem Trocknen 0.5 mg einer schwach gelben kristallinen Substanz, die nach Auswertung der spektroskopischen Daten als 2-Methylthionaphthochinon (**95**) identifiziert wurde.

2-Methylthionaphthochinon (**95**)

Schwach gelbe Kristalle.

Schmp. 176-178 °C (MeOH);

Lit.: 165-166 °C (EtOH);^[190] 185-186 °C (Benzol-EtOH).^[191]



¹H-NMR (400 MHz, MeOH-d₄): δ 8.00 (m, 2 H, 5-H und 8-H), 7.80 (m, 2 H, 6-H und 7-H), 6.62 (s, 1 H, 3-H), 2.29 (s, 3 H, 2-SCH₃).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH-d₄): δ = 13.9 (SCH₃), 127.5, 127.7, 128.0, 133.5, 133.8, 134.7, 135.7, 157.9, 183.0, 183.4.

MS (EI): *m/z* (%): 204 [M]⁺ (100), 189 (67), 176 (23), 133 (14), 104 (13), 89 (21), 76 (21), 75 (11), 50 (11).

Die ¹H-NMR- und die MS-Daten stimmen gut mit den Daten aus der Literatur überein.^[191]

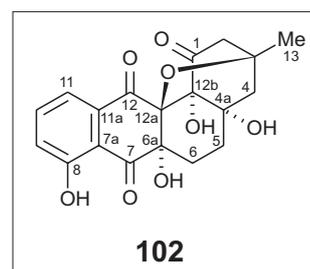
3.2 Naturstoffe aus Actinomyceten (von Prof. Fiedler, Tübingen)

3.2.1 AK1030B (**102**)

Farbloser kristalliner Feststoff.

Schmp. 212 °C (MeOH).

$[\alpha]_D^{20} = -51$ (*c* = 0.05 in MeOH).



CD (*c* = 0.1 in MeOH): $\Delta\epsilon_{192} -3.7$, $\Delta\epsilon_{210} 0.0$, $\Delta\epsilon_{227} -3.2$, $\Delta\epsilon_{261} +1.6$, $\Delta\epsilon_{283} +2.8$, $\Delta\epsilon_{351} -1.4$.

Tabelle 22. NMR-Daten von 1030B (**102**) in Dioxan-d₈.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	ROESY	COSY
1	204.2				
2	48.2	2.45 <i>s</i>	1, 3, 4, 12b, 13	4α, 13	4β
3	76.3				
4	47.3	α 1.80 <i>d</i> β 2.30 <i>d</i>	2, 4a, 5 2, 3, 5, 12b, 13	2, 4a-OH, 13 4a-OH, 5α, 13	4β 2, 4α
4a	71.5				
4a-OH		4.05 <i>s</i>	4, 4a	4α, 5α, 5β, 6β	
5	30.0	α 1.60 <i>m</i> β 2.05 <i>ddd</i>	4a, 6, 6a, 12b 4, 4a, 6, 6a	4a-OH, 4β 4a-OH, 6a-OH, 12b-OH	6β, 5β 6β, 5α
6	26.0	α 2.10 <i>m</i> β 2.45 <i>m</i>	4a, 5, 6a, 12a 5, 6a	6a-OH	6β 5α, 5β, 6α
6a	77.6				
6a-OH		5.10 <i>s</i>	6a, 7, 12a	5β, 6α	
7	199.7				
7a	116.0				
8	162.3				
8-OH		11.25 <i>s</i>	7a, 8, 9, 10	6β, 9	
9	124.8	7.30 <i>dd</i>	7a, 8, 11	8-OH	10, 11
10	136.9	7.66 <i>dd</i>	8, 11a		9, 11
11	119.3	7.55 <i>dd</i>	7a, 9, 12		9, 10
11a	134.1				
12	192.8				
12a	80.1				
12b	78.9				
12b-OH		5.95 <i>s</i>	1, 4a, 12a, 12b	5β	
13	24.7	1.15 <i>s</i>	2, 3, 4		

Tabelle 23. NMR-Daten von 1030B (**102**) in CDCl₃.

Position	¹³ C [ppm]	¹ H [ppm]	HMBC	ROESY	COSY (J _{HH} [Hz])
1	205.2				
2	48.0	α 2.55 <i>d</i> β 2.62 <i>dd</i>	1, 3, 4, 12b, 13 3, 4, 12b, 13	11 11	2β (19.0) 2α, 4β (2.5)
3	75.9				
4	46.9	α 1.97 <i>d</i> β 2.35 <i>dd</i>	2, 3, 4a, 5, 12b 2, 3, 5, 12b, 13		4β (14.8) 4α, 2β
4a	71.7				
5	30.1	α 1.83 <i>ddd</i> β 2.07 <i>ddd</i>	4, 4a, 6, 6a, 12b 4, 4a, 6	4β	6α, 6β, 5β (13.5) 6α, 6β (~14), 5α
6	25.6	α 2.32 <i>ddd</i> β 2.43 <i>ddd</i>	4a, 5, 6a, 7, 12a 5, 6a, 7		6β, 5α (~2.5), 5β (4.0) 6α (15.0), 5α (~5), 5β
6a	77.4				
7	198.6				
7a	115.6				
8	162.4				
8-OH		11.50 <i>bs</i>			
9	125.0	7.30 <i>dd</i>	7, 7a, 8, 11	13	10 (8.3), 11 (1.1)
10	136.7	7.63 <i>dd</i>	8, 11a	13	9, 11 (7.4)
11	119.6	7.58 <i>dd</i>	7, 7a, 9, 12	2α, 2β, 13	9, 10
11a	133.2				
12	192.5				
12a	79.9				
12b	78.5				
13	25.4	1.24 <i>s</i>	1, 2, 3, 4, 4a, 12a	4β, 9, 10, 11	

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3422$ (br.), 2930 (m), 1742 (s), 1706 (m), 1655 (s), 1458 (m), 1329 (m), 1279 (m), 1232 (m), 1185 (m), 1161 (m), 1098 (m), 1055 (m) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 374 $[\text{M}]^+$ (100), 356 (11), 274 (12), 253 (13), 245 (18), 233 (13), 217 (12), 189 (17), 121 (21), 43 (37).

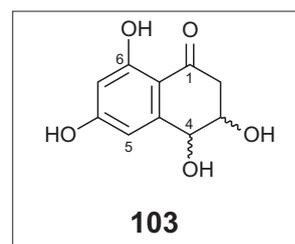
$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$: Ber. 374.1002; Gef. 374.1000 (EIMS).

3.2.2 4-Hydroxyscytalon (104)

Bräunlicher amorpher Feststoff.

Schmp. 142-145 °C (MeOH);

Lit.: 166 °C (für ein *trans*-Isomer aus *Pyricularia oryzae*).^[172]



$[\alpha]_D^{20} = -5$ ($c = 0.1$ in EtOH); Lit.: +75 (bei 400 nm ohne Konzentrationsangabe in EtOH, für ein *trans*-Isomer aus *Pyricularia oryzae*),^[172] -56 ($c = 0.25$ in 95 % EtOH, für ein *cis*-Isomer aus *Verticillium dahliae*).^[173]

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, MeOH-d_4):

cis-Isomer: $\delta = 2.78$ (dd, $J = 17.4, 4.0$ Hz, 1 H, 2- H_α), 2.87 (dd, $J = 17.4, 6.8$ Hz, 1 H, 2- H_β), 4.23 (m, 1 H, 3-H), 4.73 (d, $J = 2.5$ Hz, 1 H, 4-H), 6.56 (dd, $J = 2.3, 1.0$ Hz, 1 H, 5-H), 6.19 (m, 1 H, 7-H);

trans-Isomer: $\delta = 2.62$ (dd, $J = 17.2, 9.0$ Hz, 1 H, 2- H_α), 2.95 (dd, $J = 17.2, 4.3$ Hz, 1 H, 2- H_β), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 4.48 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 4-H), 6.61 (dd, $J = 2.4, 1.0$ Hz, 1 H, 5-H), 6.19 (m, 1 H, 7-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, MeOH-d_4):

cis-Isomer: $\delta = 43.6$ (C-2), 70.6 (C-3), 71.5 (C-4), 102.7 (C-7), 109.0 (C-5), 110.5 (C-8a), 148.1 (C-4a), 166.5 (C-6), 167.1 (C-8), 202.0 (C-1);

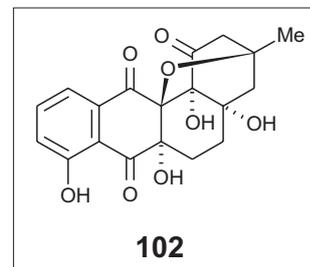
trans-Isomer: $\delta = 44.49$ (C-2), 71.9 (C-3), 73.9 (C-4), 102.7 (C-7), 108.5 (C-5), 110.5 (C-8a), 148.6 (C-4a), 166.5 (C-6), 167.1 (C-8), 201.6 (C-1).

MS (EI): m/z (%): 210 $[\text{M}]^+$ (65), 192 $[\text{M-H}_2\text{O}]^+$ (23), 166 (23), 137 (100), 58 (39), 46 (40), 45 (35).

^1H -, ^{13}C - und MS-Daten stimmen mit den Daten aus der Literatur überein.^[172,173]

A Struktur- und Ortsparameter der Röntgenbeugungsanalyse von AK1030B (102)**Kristallographischer Abschnitt**

Summenformel:	$C_{19}H_{18}O_8$	
Molekulargewicht:	374.35	
a [pm]:	793.4(6)	
b [pm]:	835.4(6)	
c [pm]:	1326.1(10)	
V [pm ³]:	$875.2 \times 10^6(11)$	
Z:	2	
d(ber.) [g·cm ⁻³]:		1.542
Kristallsystem:		monoklin
Raumgruppe:		$P2_1$
Datenaufnahme:		
Diffraktometer:		Bruker AXS P4
Strahlung:		Mo $K\alpha$
Monochromator:		Graphit
Kristallgröße [mm]:		0.65 x 0.75 x 0.45
Datenaufnahmemodus:		ω -scan
Θ -Bereich [Grad]:		2.58 – 25.7
Reziproke Gitterkonstante		$h = -9 \rightarrow 9$ $k = -10 \rightarrow 10$ $l = 0 \rightarrow 16$
Zahl der gemessenen Reflexe:		10505
davon symmetrieunabhängig:		3303
beob. Reflexe $F > 3\sigma(F)$:		3216
Lin. Abs. Koeff. [mm ⁻¹]:		0.12
Abs. Korrektur:		empirisch (SADABS II)
Strukturanalyse und Verfeinerung:		
Verhältnis Parameter/ F_0 :		9.4
R, R_w :		0.051, 0.127
Größter Differenzpeak:		$0.42 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$
Größte Differenzlücke:		$0.29 \text{ e}\text{\AA}^{-3}$
verwendetes Programm:		SHELXTL-Plus



Ortsparameter [$\times 10^{-4}$] und isotrope Temperaturkoeffizienten $U(\text{eq})$ [$\text{pm}^2 \times 10^{-1}$]

	X	Y	Z	$U(\text{eq})$
C(10)	-530(3)	4018(3)	6023(2)	13(1)
O(10)	-1734(2)	4290(2)	5428(2)	16(1)
C(20)	-394(4)	2629(4)	6746(2)	14(1)
C(30)	1458(3)	2424(3)	7156(2)	16(1)
C(40)	2543(4)	2295(4)	6263(2)	16(1)
C(41)	2452(3)	3836(3)	5623(2)	13(1)
O(41)	1983(3)	3535(2)	4583(2)	16(1)
C(50)	4144(3)	4717(3)	5677(2)	15(1)
C(60)	4784(3)	5192(4)	6747(2)	15(1)
C(61)	3484(3)	6157(3)	7258(2)	13(1)
O(61)	3156(2)	7677(2)	6797(2)	15(1)
C(70)	4061(3)	6483(3)	8370(2)	15(1)
O(70)	5558(2)	6388(3)	8683(2)	18(1)
C(71)	2784(4)	7067(4)	9021(2)	16(1)
C(80)	3296(4)	7748(4)	9966(2)	19(1)
O(80)	4925(3)	7822(3)	10347(2)	25(1)
C(90)	2095(4)	8413(4)	10542(2)	19(1)
C(100)	391(4)	8330(4)	10201(2)	19(1)
C(110)	-133(4)	7613(4)	9292(2)	16(1)
C(111)	1049(4)	7017(3)	8689(2)	13(1)
C(120)	464(3)	6282(4)	7694(2)	14(1)
O(120)	-995(2)	6388(3)	7344(2)	21(1)
C(121)	1748(3)	5305(3)	7173(2)	13(1)
O(121)	1967(2)	3852(2)	7737(1)	13(1)
C(122)	1109(3)	4975(3)	6056(2)	14(1)
O(122)	826(2)	6365(3)	5490(2)	14(1)

	X	Y	Z	U(eq)
C(130)	1730(4)	1047(4)	7882(2)	19(1)
C(140)	6626(4)	10041(4)	7748(3)	22(1)
O(140)	5906(3)	9401(3)	6828(2)	20(1)

Die isotropen Temp.-Koeffizienten U sind definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors.

AK1030B (**102**) kristallisierte mit einem Molekül Methanol aus (C(140) und O(140)).

LITERATUR UND ANMERKUNGEN

- [1] J. Loh, R. W. Carlson, W. S. York, G. Stacey, Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 14446-14451.
- [2] Fleming, The antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in isolation of *B. influenzae*, *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- [3] Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman, Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria, *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66-69.
- [4] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, A. T. McPhail, Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- [5] G. H. Svoboda, Alkaloids of *Vinca rosea*. IX. Extraction and characterization of leurosidine and leurocristine, *Lloydia* **1961**, *24*, 173-178.
- [6] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, Natural products as sources of new drugs over the period of 1981-2002, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
- [7] W. Bergmann, D. C. Burke, Spongothymidine and spongouridine from *Cryptotethya crypta*, *J. Org. Chem.* **1955**, *20*, 1501-1507.
- [8] Y. Hirata, D. Uemura, Halichondrins – antitumor polyether macrolides from a marine sponge, *Pure Appl. Chem.* **1986**, *58*, 701-710.
- [9] J. B. Hart, R. E. Lill, S. J. H. Hickford, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, The halichondrins: chemistry, biology, supply and delivery, In *Drugs from the Sea* (Hrsg.: N. Fusetani), Karger, Basel, **2003**, 134-153.
- [10] S. P. Gunasekela, M. Gunasekela, R. E. Longley, G. K. Schulte, Discodermolide, a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discoderma dissoluta*, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912-4915.
- [11] M. Olivera, ω -Conotoxin MVIIA: from marine snail venom to analgesic drug, In *Drugs from the Sea* (Hrsg.: N. Fusetani), Karger, Basel, **2003**, 74-85.
- [12] G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, D. L. Herald, E. Arnold, J. Clardy, Isolation and structure of bryostatin 1, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846-6848.
- [13] F. H. Blackhall, M. Ranson, J. A. Radford, B. W. Hancock, M. Soukop, A. T. McGown, A. Robbins, G. Halbert, G. C. Jayson, A phase II trial of bryostatin 1 in patients with non-Hodgkin's lymphoma, *Br. J. Cancer* **2001**, *84*, 465-469.

- [14] J. Faulkner, M. K. Harper, M. G. Haygood, C. E. Salomon, E. W. Schmidt, Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances, In *Drugs from the Sea* (Hrsg.: N. Fusetani), Karger, Basel, **2003**, 107-119.
- [15] Mendola, Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743, In *Drugs from the Sea* (Hrsg.: N. Fusetani), Karger, Basel, **2003**, 120-133.
- [16] V. Cuomo, I. Palomba, A. Perretti, A. Guerriero, M. D'Ambrosio, F. Pietra, Antimicrobial activities from marine fungi, *J. Mar. Biotechnol.* **1995**, 2, 199-204.
- [17] Müller, W. Löffler, *Mykologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1982**.
- [18] J. Kohlmeyer, E. Kohlmeyer, *Marine Mycology: The Higher Fungi*, Academic Press, London, **1979**.
- [19] K. Schaumann, Marine Pilze, In *Mikrobiologie des Meeresbodens* (Hrsg.: L. A. Meyer-Reyl, M. Köster), Gustav Fischer, Jena, **1993**, 144-195.
- [20] T. B. Johnson, F. K. Sparrow, *Fungi in Oceans and Estuaries*, Hafner, New York, **1961**.
- [21] H. Nau, P. Steinberg, M. Kietzmann, *Lebensmitteltoxikologie*, Thieme, Stuttgart, **2003**.
- [22] von Wartburg, R. Traber, Cyclosporins, fungal metabolites with immunosuppressive activities, *Prog. Med. Chem.* **1988**, 25, 1-33.
- [23] W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffmann, J. Rothcock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, J. Springer, Mevinolin, a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutary-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 3957-3961.
- [24] G. F. Newton, E. P. Abraham, Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D- α -amino adipic acid, *Nature* **1955**, 175, 548.
- [25] M. Varoglu, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, P. Crews, Asperazine, a selective cytotoxic alkaloid from a sponge-derived culture of *Aspergillus niger*, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7078-7079.
- [26] M. K. Renner, P. R. Jensen, W. Fenical, Neomangicols: structures and absolute stereochemistries of unprecedented halogenated sesterterpenes from a marine fungus of the genus *Fusarium*, *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 8346-8354.
- [27] S. Steffens, Prokaryoten und mikrobielle Eukaryoten in marinen Schwämmen – ökologische, mikromorphologische und molekularbiologische Untersuchungen. Dissertation, Universität Bonn, **2003**.
- [28] L. J. Wickerham, The taxonomy of yeasts, *US Dept. Agric. Wash. D. C., Tech. Bull.* **1951**, 1029, 1-56.
- [29] D. J. Faulkner, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 1-49.

- [30] D. J. Faulkner, Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1-48.
- [31] S. Michael, C. G. Thompson, M. Abramovitz, *Artemia salina* as a test organisms for a bioassay, *Science* **1956**, *123*, 464.
- [32] J.-F. Verbist, C. Sallenave, Y.-F. Pouchus, Marine fungal substances, *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2000**, *24*, 979-1092.
- [33] A. Strobel, Rainforest endophytes and bioactive products, *Crit. Rev. Biotechnol.* **2002**, *22*, 315-333.
- [34] Bringmann, G. Lang, Full absolute stereostructures of natural products directly from crude extracts: the HPLC-MS/MS-NMR-CD 'triad', In *Marine Molecular Biotechnology* (Hrsg.: W. E. G. Müller), Springer, Berlin, **2003**, 89-116.
- [35] Laatsch, H. *Antibase 2000, A Natural Products Database for Rapid Structure Determination*, Chemical Concepts, Weinheim **2000**.
- [36] SciFinder Scholar, Version 2002, American Chemical Society.
- [37] Frisvad, U. Thrane, Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indexes and UV-VIS spectra (diode array detection), *J. Chromatogr.* **1987**, *404*, 195-214.
- [38] G. Bringmann, M. Wohlfarth, M. Heubes, Observation of exchangeable protons by high-performance liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and - electrospray ionization mass spectrometry: a useful tool for the hyphenated analysis of natural products, *J. Chromatogr. A* **2000**, *904*, 243-249.
- [39] Albert, Liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy, *J. Chromatogr. A* **1999**, *856*, 199-211.
- [40] R. J. Ogg, P. B. Kingsley, J. S. Taylor, WET, a T₁- and B₁-insensitive water-suppression method for in vivo ¹H NMR spectroscopy, *J. Magn. Reson., Ser. B* **1994**, *104*, 1-10.
- [41] G. Bringmann, M. Wohlfarth, H. Rischer, M. Heubes, W. Saeb, S. Diem, M. Herderich, J. Schlauer, A photometric, 'biomimetic' screening method for dimeric naphthylisoquinoline alkaloids and complete on-line stereochemical assignment of a dimer, by the analytical triad, LC-MS, LC-NMR, LC-CD in crude plant extracts, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2571-2577.
- [42] S. Ohmomo, T. Sato, T. Utagawa, M. Abe, Isolation of festuclavine and three new indole alkaloids, roquefortine A, B, and C from the cultures of *Penicillium roqueforti*, *Agric. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 1333-1334.
- [43] E. Oxford, H. Raistrick, P. Simonart, Griseofulvin, C₁₇H₁₇O₆Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* DIERCKX, *Biochem. J.* **1939**, *33*, 240-248.
- [44] E. Finkelstein, B. Amichai, M. H. Grunwald, Griseofulvin and its uses. *Int. J. Antimicrob. Ag.* **1996**, *6*, 189-194.

- [45] W. Holzapfel, Isolation and structure of cyclopiazonic acid, a toxic metabolite of *Penicillium cyclopium*, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2101-2119.
- [46] E. Göger, R. T. Riley, Interaction of cyclopiazonic acid with rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. Effect on Ca²⁺ binding and Ca²⁺ permeability. *Biochem. Pharmacol.* **1989**, *38*, 3995-4003.
- [47] R. Bentley, Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3801-3825.
- [48] M. Clark, C. D. Hufford, L. W. Robertson, Two metabolites from *Aspergillus flavipes*, *Lloydia* **1977**, *40*, 146-151.
- [49] Banerji, R. Ray, Auranamide, a new phenylalanine derivative isolated from *Piper aurantiacum*, *Indian J. Chem., Sect. B* **1981**, *20B*, 597-598.
- [50] Die FCPC wird von KROMATON TECHNOLOGIES hergestellt; für weitere Informationen siehe www.kromaton.com.
- [51] Y. Ito, High-speed countercurrent chromatography, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1986**, *17*, 65-143.
- [52] N. Nimura, H. Ogura, T. Kinoshita, Reversed-phase liquid chromatographic resolution of amino acid enantiomers by derivatization with 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl- β -D-glucopyranosyl isothiocyanate, *J. Chromatogr.* **1980**, *202*, 375-379.
- [53] P. Marfey, Determination of D-amino acids. II. Use of a bifunctional reagent, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene, *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.
- [54] G. Bringmann, G. Lang, S. Steffens, K. Schaumann, Petrosifungins A and B, novel cyclodepsipeptides from a sponge derived *Penicillium* sp., *J. Nat. Prod.*, im Druck.
- [55] M. S. C. Pedras, L. I. Zaharia, D. E. Ward, The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity, *Phytochemistry* **2002**, *59*, 579-596.
- [56] Dorschner, H. Lardy, Specificity of ion transport induced by beauvericin, *Antimicrob. Agents Chemother.* (1961-70), Volume Date **1969**, 11-14.
- [57] V. R. Hedge, M. S. Puar, T. M. Chan, P. Dai, P. R. Das, M. Patel, Sch 217048: a novel cyclodepsipeptide with neurokinin antagonist activity, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 9584-9586.
- [58] N. J. McCorkindale, R. L. Baxter, Brevigellin, a benzoylated cyclodepsipeptide from *Penicillium brevicompactum*, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 1795-1801.
- [59] J. Birch, J. J. Wright, The structural elucidation and some aspects of the biosynthesis of the brevianamides-A and -E, *Tetrahedron* **1970**, *26*, 2329-2344.
- [60] R. R. M. Paterson, M. J. S. Simmonds, C. Kemmelmeier, W. M. Blaney, Effects of brevianamide A, its photolysis product brevianamide D, and ochratoxin A from two

- Penicillium* strains in the insect pests *Spodoptera frugiperda* and *Heliothis virescens*, *Mycol. Res.* **1990**, *94*, 538-542.
- [61] A. Bird, I. M. Campbell, Disposition of mycophenolic acid, brevianamide A, asperphenamate, and ergosterol in solid cultures of *Penicillium brevicompactum*, *Appl. Environ. Microbiol.* **1982**, *43*, 345-348.
- [62] H. Sadler, T. J. Simpson, The determination by NMR methods of the structure and stereochemistry of astellatol, a new and unusual sesterterpene, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1989**, *21*, 1602-1604.
- [63] O. D. Hensens, D. Zink, J. M. Williamson, V. J. Lotti, R. S. L. Chang, M. A. Goetz, Variocolin, a sesterterpenoid of novel skeleton from *Aspergillus variegator* MF138, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3399-3403.
- [64] K. Chexal, C. Fouweather, J. S. E. Holker, T. J. Simpson, K. Young, Structure of shamixanthone and tajixanthone, metabolites of *Aspergillus variegator*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1974**, 1584-1593.
- [65] K. Chexal, J. S. E. Holker, T. J. Simpson, K. Young, Structure of variecoxanthenes A, B, and C, metabolites of *Aspergillus variegator*. Conversion of variecoxanthone A into (\pm)-de-C-prenylepishamixanthone, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1975**, 543-548.
- [66] G. Bringmann, G. Lang, S. Steffens, E. Günther, K. Schaumann, Evariquinone, isoemicellin, and stromemycin from a sponge derived strain of the fungus *Emericella variegator*, *Phytochemistry* **2003**, *63*, 437-443.
- [67] R. H. Thomson, *Naturally Occurring Quinones III*, Chapman and Hall, London, **1987**, 460.
- [68] W. K. Chan, W. D. Crow, Chemical constituents of *Eriococcus confusus* Maskell. I. The quinonoid pigments, *Aust. J. Chem.* **1966**, *19*, 1701-1708.
- [69] H. J. Banks, D. W. Cameron, M. J. Crossley, Polyhydroxyanthraquinones and their glucosides from *Eriococcus coriaceus* (Hemiptera: Insecta), *Aust. J. Chem.* **1976**, *29*, 2231-2245.
- [70] Ishida, T. Hamasaki, Y. Hatsuda, The structure of two new metabolites, emerin and emericellin, from *Aspergillus nidulans*, *Agr. Biol. Chem.* **1975**, *39*, 2181-2184.
- [71] A. Ballantine, D. J. Francis, C. H. Hassall, J. L. C. Wright, The molecular structure of arugosin, a metabolite of a wild-type strain of *Aspergillus rugulosus*, *J. Chem. Soc. C* **1970**, 1175-1182.
- [72] K. Chexal, J. S. E. Holker, T. J. Simpson, Structures and biosynthesis of minor metabolites from variant strains of *Aspergillus variegator*, *J. Chem. Soc., Perkin 1* **1975**, 549-554.

- [73] J. Malmstrom, C. Christophersen, A. F. Barrero, J. E. Oltra, J. Justicia, A. Rosales, Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Emericella varicolor*, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 364-367.
- [74] G. Bringmann, G. Lang, W. Ziebuhr, K. Ohlsen, W. E. G. Müller, U. Hentschel, German Patent Application, DE 103 29 874.6, Tajixanthonhydrat und Tajixanthonhydrat-Derivate, deren biologische Aktivitäten und deren Verwendung, filed 2. Juli 2003.
- [75] P. S. Stewart, J. W. Costerton, E. P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science* **1999**, *284*, 1318-1322.
- [76] P. S. Stewart, J. W. Costerton, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet* **2001**, *358*, 135-138.
- [77] H. C. Neu, The crisis in antibiotic resistance, *Science* **1992**, *257*, 1064-1073.
- [78] J. Stephenson, Worry grows as antibiotic-resistant bacteria continue to gain ground, *JAMA* **1997**, *278*, 2049-2050.
- [79] Katsuyama, N. Akiyama, T. Ohno, Japanese Patent, JP 2002284604, Auxiliary agent containing farnesol for controlling biofilm formation, disclosure 10.03.2002.
- [80] Bardshiri, C. R. McIntyre, T. J. Simpson, R. N. Moore, L. A. Trimble, J. C. Vederas, Biosynthesis of tajixanthon and shamixanthon by *Aspergillus varicolor*: incorporation of oxygen-18 gas, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, *21*, 1404-1406.
- [81] T. Yasuzawa, Y. Saitoh, H. Sano, Structures of KS-501 and KS-502, two new inhibitors of Ca²⁺ and calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 336-343.
- [82] J. Ferrari, C. Terreaux, S. Sahpaz, J. D. Msonthi, K. Wolfender, K. Hostettmann, Benzophenone glycosides from *Gnidia involucrate*, *Phytochemistry* **2000**, *54*, 883-889.
- [83] S. Huneck, C. Djerassi, D. Becker, M. Barber, M. von Ardenne, K. Steinfelder, R. Tümmler, Massenspektrometrie, von Depsiden, Depsidonen, Dibenzofuranen und Diphenylbutadienen mit positiven und negativen Ionen, *Tetrahedron* **1968**, *24*, 2707-2755.
- [84] Hopmann, M. A. Knauf, K. Weithmann, J. Wink, Aventis Pharma Deutschland G.m.b.H., PCT International Patent Application, WO 01/44264 A2, Preparation of stromemycins as stromelysin inhibitors, disclosure 21.06.2001.
- [85] Claydon, J. F. Grove, M. Pople, Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 937-943.
- [86] Thom, Cultural studies of species of *Penicillium*, *Bull. Bur. Anim. Ind. US Dep. Agric.* **1910**, *118*, 1-109.

- [87] K. B. Raper, C. Thom, *A manual of the penicillia*, Williams and Wilkins, Baltimore/Maryland, **1949**.
- [88] G. Kozlovskii, V. P. Zhelivonova, V. M. Adanin, T. V. Antipova, A. V. Shnyreva, A. N. Viktorov, The biosynthesis of low-molecular-weight nitrogen-containing secondary metabolites – Alkaloids – by the resident strains of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium expansum* isolated on board the mir space station, *Microbiology* **2002**, *71*, 773-777.
- [89] K. Kawai, K. Nozawa, S. Nakajima, Y. Iitaka, The structures of meleagrins and 9-*O*-*p*-bromobenzoylmeleagrins, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 94-98.
- [90] H. Hikino, S. Nabetani, T. Takemoto, Structure and biosynthesis of chrysogin, a metabolite of *Penicillium chrysogenum*, *Yakugaku Zasshi* **1973**, *93*, 619-623.
- [91] J. Cram, M. Tishler, Isolation of several compounds from clinical penicillin, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, *70*, 4238-4239.
- [92] Abe, O. Sugimoto, K. Tanji, A. Hirota, Identification of the quinol metabolite 'sorbicillinol', a key intermediate postulated in bisorbicillinoid biosynthesis, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12606-12607.
- [93] S. Sperry, G. J. Samuels, P. Crews, Vertinoid polyketides from the saltwater culture of the fungus *Trichoderma longibrachiatum* separated from a *Haliclona* marine sponge, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 10011-10014.
- [94] Abe, K. Yamamoto, A. Hirota, Novel fungal metabolites, demethylsorbicillin and oxosorbicillinol, isolated from *Trichoderma* sp. USF-2690, *Bioscience Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 620-622.
- [95] Abe, T. Murata, A. Hirota, Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus, *Bioscience Biotechnol. Biochem.* **1998**, *62*, 661-666.
- [96] L. S. Trifonov, H. Hilpert, P. Floersheim, A. S. Dreiding, D. M. Rast, R. Skrivanova, L. Hoesch, Bisvertinols: a new group of dimeric vertinoids from *Verticillium intertextum*, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 3157-3179.
- [97] R. Andrade, W. A. Ayer, P. P. Mebe, The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. 1. Isolation of the metabolites and the structure of trichodimerol, *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 2526-2535.
- [98] M. Kontani, Y. Sakagami, S. Marumo, First β -1,6-glucan biosynthesis inhibitor, bisvertinolone isolated from fungus, *Acremonium strictum* and its absolute configuration, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 2577-2580.
- [99] D. Barnes-Seeman, E. J. Corey, A two-step total synthesis of the natural pentacycle trichodimerol, a novel inhibitor of TNF- α production, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1503-1504.

- [100] K. C. Nicolaou, G. Vassilikogiannakis, K. B. Simonsen, P. S. Baran, Y.-L. Zhong, V. P. Vidali, E. N. Pitsinos, E. A. Couladouros, Biomimetic total synthesis of bisorbicillinol, bisorbibutenolide, trichodimerol, and designed analogues of the bisorbicillinoids, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 3071-3079.
- [101] J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, A practical guide for the assignment of the absolute configuration of alcohols, amines and carboxylic acids by NMR, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 2915-2925.
- [102] Horeau, A. Nouaille, Microméthode de détermination de la configuration des alcools secondaires par dedoublement cinétique. Emploi de la spectrographie de masse, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2707.
- [103] H. D. Flack, G. Bernardinelli, Absolute structure and absolute configuration, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1999**, *55*, 908-915.
- [104] X. Huang, N. Fujioka, G. Pescitelli, F. E. Köhn, R. T. Williamson, K. Nakanishi, N. Berova, Absolute configurational assignments of secondary amines by a CD-sensitive dimeric zinc-porphyrin host, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10320-10335.
- [105] Bringmann, K.-P. Gulden, Y. F. Hallock, K. P. Manfredi, J. H. Cardelina II, M. R. Boyd, B. Kramer, J. Fleischhauer, Circular dichroism of michellamines: independent assignment of axial chirality by calculated and experimental CD spectra, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 7807-7814.
- [106] Bringmann, K. Messer, K. Wolf, J. Mühlbacher, M. Grüne, R. Brun, A. M. Louis, Dioncophylline E from *Dioncophyllum thollonnii*, the first 7,3'-coupled Dioncophyllaceous naphthylisoquinoline alkaloid, *Phytochemistry* **2002**, *60*, 389-397.
- [107] J. Mühlbacher, Molecular Modelling und Chiralität: Aufklärung der absoluten Konfiguration von Natur- und Wirkstoffen mit ungewöhnlichem Circular-Dichroismus, Dissertation, Universität Würzburg, **2003**.
- [108] Bringmann, J. Mühlbacher, C. Reppes, J. Fleischhauer, MD-based CD calculations on the absolute axial configuration of the naphthylisoquinoline alkaloid dioncophylline A, *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 1273-1278.
- [109] Bringmann, G. Lang, J. Mühlbacher, K. Schaumann, S. Steffens, P. G. Rytik, U. Hentschel, J. Morschhäuser, R. Brun, W. E. G. Müller, Sorbicillactone A, a structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-derived fungus, In *Marine Molecular Biotechnology* (Hrsg.: W. E. G. Müller), Springer, Berlin, **2003**, 231-253.
- [110] Bringmann, G. Lang, J. Mühlbacher, K. Schaumann, S. Steffens, W. E. G. Müller, German Patent Application, DE 102 38 257.3, Sorbicillacton A und Sorbicillacton-A-Derivate; Verfahren zu ihrer Herstellung, sie enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung, filed 21. August 2002.

- [111] L. S. Trifonov, J. H. Bieri, R. Prewo, A. S. Dreiding, L. Hösch, D. M. Rast, Isolation and structure elucidation of three metabolites from *Verticillium intertextum*: sorbicillin, dihydrosorbicillin and bisvertinoquinol, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 4243-4256.
- [112] Oh, S. Lee, H.-S. Lee, D.-H. Lee, S. Y. Lee, H.-T. Chung, T. S. Kim, T.-O. Kwon, Germination inhibitory constituents from *Erigeron annuus*, *Phytochemistry* **2002**, *61*, 175-179.
- [113] S. Kyrmyzguel, N. Goeren, S.-W. Yang, G. A. Cordell, C. Bozok-Johansson, Spinonin, a novel glycoside from *Ononis spinosa* subsp. *leiosperma*, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 378-181.
- [114] M. C. Paul, E. Zubia, M. J. Ortega, J. Salvia, New polypropionates from *Siphonaria pectinata*, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2303-2308.
- [115] R. Andrade, W. A. Ayer, L. S. Trifonov, The metabolites of *Trichoderma longibrachiatum*. III. Two new tetrionic acids 5-hydroxyvertinolide and bislongiquinolide, *Aust. J. Chem.* **1997**, *50*, 255-257.
- [116] Abe, K. Yamamoto, T. Arakawa, A. Hirota, The biosynthesis of bisorbicillinoids: Evidence for a biosynthetic route from bisorbicillinol to bisorbibutenolide and bisorbicillinolide, *Chem. Comm.* **2001**, 23-24.
- [117] N. Otomo, H. Sato, S. Sakamura, Novel phytotoxins produced by the causal fungus of the shoot blight of larches, *Agr. Biol. Chem.* **1982**, *46*, 861-863.
- [118] S. Danishefsky, M. Bednarski, Lanthanide catalysis of cycloadditions of heterodienes with enol ethers, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 721-724.
- [119] G. Kozlovskii, N. G. Vinokurova, S. M. Ozerskaya, Peculiarities of alkaloid formation in *Penicillium chrysogenum* from soils of different climatic zones, *Microbiology* **1998**, *67*, 397-400.
- [120] R. Puls, E. Ladyman, Roquefortine toxicity in a dog, *Can. Vet. J.* **1988**, *29*, 569.
- [121] M. Kobayashi, H. Uehara, K. Matsunami, S. Aoki, I. Kitagawa, Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale cecilia*, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 7925-7928.
- [122] Breinholt, A. Kjoer, C. E. Olsen, B. R. Rassing, C. N. Rosendahl, Hamigerone and dihydrohamigerone: two acetate-derived, antifungal metabolites from *Hamigera avellanea*, *Acta Chem. Scand.* **1997**, *51*, 1241-1244.
- [123] Y. Shintani, K. Hayashi, Y. Nozaki, Japanese Patent, JP 09110780, Microtubule polymerization-inhibiting TAN-2342 manufacture with *Curvularia*, disclosure 28.04.1997.

- [124] S. Kosemura, H. Miyata, K. Matsunaga, S. Yamamura, Biosynthesis of citreohybridones, the metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3883-3886.
- [125] S. Kosemura, K. Matsunaga, S. Yamamura, M. Kubota, S. Ohba, The structures of citreohybridone A and B novel sesterterpenoid-type metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citro-viride* B. IFO 6200 and 4692, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3543-3546.
- [126] N. Narasimhachari, L. C. Vining, The pigments of *Penicillium herquei*, *Can. J. Chem.* **1963**, *41*, 641-648.
- [127] W. A. Ayer, Y. Hoyano, M. S. Pedras, I. van Altena, Metabolites produced by the scleroderris canker fungus *Gremmeniella abietina*, *Can. J. Chem.* **1986**, *64*, 1585-1589.
- [128] M. Scott, W. van Walbeek, Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*, *J. Antibiot.* **1971**, *24*, 747-755.
- [129] P. Springer, H. G. Cutler, F. G. Crumley, R. H. Cox, E. E. Davis, J. E. Thean, Plant growth regulatory effects and stereochemistry of cladosporin, *J. Agric. Food. Chem.* **1981**, *29*, 853-855.
- [130] F. Grove, Asperentin, its methyl ethers, and 5'-hydroxyasperentin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1972**, 2400-2406.
- [131] D. Takano, T. Nagamitsu, H. Ui, K. Shiomi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, I. Kuwajima, S. Omura, Absolute configuration of nafuredin, a new specific NADH-fumarate reductase inhibitor, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3017-3020.
- [132] D. Takano, T. Nagamitsu, H. Ui, K. Shiomi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, I. Kuwajima, S. Omura, Total synthesis of nafuredin, a selective NADH-reductase inhibitor, *Org. Lett.* **2001**, *3*, 2289-2291.
- [133] S. Omura, H. Miyadera, H. Ui, K. Shiomi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, T. Nagamitsu, D. Takano, T. Sunazuka, A. Harder, H. Kölbl, M. Namikoshi, H. Miyoshi, K. Sakamoto, K. Kita, An anthelmintic compound, nafuredin, shows selective inhibition of complex I in helminth mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 60-62.
- [134] W. A. Jerram, A. G. McInnes, W. S. G. Maass, D. G. Smith, A. Taylor, J. A. Walter, Chemistry of cochliodinol, a metabolite of *Chaetomium* species, *Can. J. Chem.* **1975**, *53*, 727-737.
- [135] A. Edrada, M. Heubes, G. Brauers, V. Wray, A. Berg, U. Gräfe, M. Wohlfarth, J. Mühlbacher, K. Schaumann, Sudarsono, G. Bringmann, P. Proksch, Online analysis of xestodecalactones A-C, novel bioactive metabolites from the fungus *Penicillium cf. montanense* and their subsequent isolation from the sponge *Xestospongia exigua*, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1598-1604.

- [136] Kinoshita, T. Sasaki, M. Awata, M. Takada, S. Yaginuma, Structure of sporostatin (M5032), an inhibitor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 961-964.
- [137] Y. Murakami, A. Ishii, S. Mizuno, S. Yaginuma, U. Yoshimasa, Sporostatin, a novel and selective inhibitor of EGF receptor kinase, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 4145-4150.
- [138] Lai, Y. Shizuri, S. Yamamura, K. Kawai, Y. Terada, H. Furukawa, Novel curvularin-type metabolites of a hybrid strain ME 0005 derived from *Penicillium citreo-viride* IFO 6200 and 4692, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 2241-4.
- [139] F. Bracher, B. Schulte, An enantiodivergent synthesis of both enantiomers of the macrocyclic lactone curvularin, *Liebigs Ann. Recl.* **1997**, 1979-1982.
- [140] Machleidt, E. Cohnen, R. Tschesche, Synthesen von DL-Mevalonsäure-3,5-cyclophosphat und D,L-Mevalonsäure-5-phosphat, *Liebigs Ann. Chem.* **1962**, *655*, 70-80.
- [141] G. H. Lee, C. S. Pak, Total synthesis of (*R*)-(-)-sulcatol, (*2R*)-6-methyl-5-hepten-2-ol, *Bull. Korean Chem. Soc.* **1999**, *20*, 619-620.
- [142] S.-K. Kang, S.-G. Kim, D.-C. Park, J.-S. Lee, W.-J. Yoo, C. S. Pak, Reductive elimination of acetones, cyclic carbonates, or cyclic sulfites of γ,δ -dihydroxy (*E*)- α,β -unsaturated esters: an efficient route to δ -hydroxy (*E*)- β,γ -unsaturated esters and δ -hydroxy esters, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 9-10.
- [143] Müller, B. Siegfried, S_N2 reactions with carboxylic esters. Selective cleavage of methyl esters, *Helv. Chim. Acta* **1974**, *57*, 987-994.
- [144] H. Gerlach, 2-(Trimethylsilyl)äthylester als Carboxylschutzgruppe; Anwendung bei der Synthese des (-)-(*S*)-Curvularins, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 3039-3044.
- [145] W. C. Fuqua, S. C. Winans, E. P. Greenberg, Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators, *J. Bacteriol.* **1994**, *176*, 269-275.
- [146] F. Gaill, Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents, *FASEB* **1993**, *7*, 558-565.
- [147] U. Hentschel, L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker, M. Horn, Microbial diversity of marine sponges, In *Marine Molecular Biotechnology* (Hrsg.: W. E. G. Müller), Springer, Berlin, **2003**, 59-88.
- [148] D. M. Bollag, P.A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, C. M. Woods, Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2325-2533.

- [149] H. Shigemori, M. A. Bae, K. Yazawa, T. Sasaki, J. Kobayashi, Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromona* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4317-4320.
- [150] Imamura, M. Nishijima, K. Adachi, H. Sano, Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by a marine actinomycete, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 241-246.
- [151] Y. Murakami, Y. Oshima, T. Yasumoto, Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*, *Bull. Jp. Soc. Sci. Fish.* **1982**, *48*, 69-72.
- [152] Wiens, B. Luckas, F. Brümmer, M. Shokry, A. Ammar, R. Steffen, R. Batel, B. Diehl-Seifert, H. C. Schröder, W. E. G. Müller, Okadaic acid: a potential defense molecule for the sponge *Suberites domuncula*, *Mar. Biol.* **2003**, *142*, 213-223.
- [153] C. A. Bewley, N. D. Holland, D. J. Faulkner, Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts, *Experientia* **1996**, *52*, 716-722.
- [154] L. Harris, Current status of antiangiogenic factors, *Br. J. Haematol.* **2000**, *109*, 477-489.
- [155] Folkman, Tumor angiogenesis: tumor implications, *N. Engl. J. Med.* **1971**, *285*, 1182-1186.
- [156] V. Brower, Tumor angiogenesis - new drugs on the block, *Nature Biotechnol.* **2000**, *17*, 963-968.
- [157] M. R. Custodio, I. Prokic, R. Steffen, C. Koziol, R. Borojevic, F. Brümmer, M. Nickel, W. E. G. Müller, Primmorphs generated from dissociated cells of sponge *Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and death, *Mech. Ageing Dev.* **1998**, *105*, 45-59.
- [158] F. Fieser, R. H. Brown, Synthesis of naphthoquinones for studies of the inhibition of enzyme systems, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 3609-3614.
- [159] Ishii, T. Kawasumi, Y. Igarashi, T. Kodama, Y. Minoda, 2-Methylthio-1,4-naphthoquinone, a unique sulfur-containing quinone from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Hydrogenobacter thermophilus*, *J. Bacteriol.* **1987**, *169*, 2380-2384.
- [160] G. Bringmann, G. Lang, H. Tsuruta, W. E. G. Müller, H. C. Schröder, N. L. Thakur, A. N. Thakur, German Patent Application, DE 103 43 798.3, 2-Methylthio-1,4-Naphthochinon und 2-Methylthio-1,4-Naphthochinon-Derivate, Verfahren zu ihrer Herstellung, sie enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung, filed 22. Oktober 2003.

- [161] W. E. G. Müller, N. L. Thakur, A. N. Thakur, A. Krasko, M. Korzhev, M. M. Indap, G. Le Penec, S. Perovic-Ottstadt, H. C. Schröder, G. Lang, G. Bringmann, Lectin-mediated canal formation in primmorphs from the sponge *Suberites domuncula* involves the expression of a CD36 receptor-ligand system: modulation by a sponge-derived anti-angiogenic compound, *J. Cell. Sci.*, im Druck.
- [162] J. Kerns, S. Naganathan, P. Dowd, F. M. Finn, B. Carr, Thioalkyl derivatives of vitamin K₃ and vitamin K₃ oxide inhibit growth of Hep3B and HepG2 cells, *Bioorg. Chem.* **1995**, *23*, 101-108.
- [163] M. Dewick, *Medicinal Natural Products*, John Wiley & Sons, New York, **1997**.
- [164] H. Tanaka, A. Kuroda, H. Marusawa, H. Hatanaka, T. Kino, T. Goto, M. Hashimoto, T. Taga, Structure of FK506 a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5031-5033.
- [165] H. Sternberg, E. T. Wright, M. Oura, A new antifungal antibiotic, amphotericin B, *Antibiotics Ann.* **1956**, 566-573.
- [166] W. Fairbrother, B. L. Williams, Two new antibiotics. Antibacterial activity of novobiocin and vancomycin, *Lancet* **1956**, *271*, 1177-1178.
- [167] Maier, J. Müller, P. Schneider, H.-P. Fiedler, I. Groth, F. S. K. Tayman, F. Teltschik, C. Günther, G. Bringmann, (2*E*,4*Z*)-Decadienoic acid and (2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoic acid, two herbicidal metabolites from *Streptomyces viridochromogenes* Tü 6105, *Pesticide Sci.* **1999**, *55*, 733-739.
- [168] Dieter, A. Hamm, H.-P. Fiedler, M. Goodfellow, W. E. G. Müller, R. Brun, W. Beil, G. Bringmann, Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkaliphilic *Streptomyces* strain, *J. Antibiot.* **2003**, *56*, 639-646.
- [169] Hamm, Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese von Naturstoffen aus tropischen Heilpflanzen und Bodenorganismen, Dissertation, Universität Würzburg, **2003**.
- [170] K. Maksimenka, Quantenchemische CD-Rechnungen zur Aufklärung der absoluten Konfigurationen chiraler Natur- und Wirkstoffe, Dissertation, Universität Würzburg, voraussichtlich **2005**.
- [171] J. Rohr, R. Thiericke, Angucycline group antibiotics, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, *9*, 103-137.
- [172] Iwasaki, H. Muro, K. Sasaki, S. Nozoe, S. Okuda, Isolations of phytotoxic substances produced by *Pyricularia oryzae* Cavara, *Tetrahedron Lett.* **1973**, *37*, 3537-3542.
- [173] A. Bell, R. D. Stipanovic, J. E. Puhalla, Pentaketide metabolites of *Verticillium dahliae*, *Tetrahedron* **1976**, *32*, 1353-1356.
- [174] J. Flügge, *Grundlagen der Polarimetrie*, Zeiss Verlag, Oberkochen/Württ., **1965**, S. 62 u. S. 88.

- [175] Zum Aufbau der Kühlapparatur und zum Detail weiterer Anwendungsmöglichkeiten siehe: D. Stalke, *Chem. Soc. Rev.* **1998**, 27, 171-178.
- [176] Bruker-AXS Inc., *SAINTE-NT*, Madison WI **2000**.
- [177] G. M. Sheldrick, *SADDABS 2.0*, University of Göttingen **2000**.
- [178] G. M. Sheldrick, Phase annealing in SHELX-90: direct methods for larger structures, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1990**, A46, 467-473.
- [179] G. M. Sheldrick, *ShelXL-97, Program for Crystal Structure Refinement*, **1997**, University of Göttingen.
- [180] Wohlfarth, Die Aufklärung der Biogenese strukturell ungewöhnlicher Alkaloide aus *Triphyophyllum* (Dioncophyllaceae) und *Antidesma* (Euphorbiaceae) und Entwicklung und Einsatz der 'Triade' zur phytochemischen online-Analytik: HPLC-MS/MS, HPLC-NMR und HPLC-CD, Dissertation, Universität Würzburg, **2002**.
- [181] J. de Boer, H. J. Backer, in *Organic Syntheses, Collective Volume IV* (Hrsg.: J. Rabjohn), John Wiley & Sons, New York, **1963**, 250-253.
- [182] G. Roberge, P. Brassard, A regiospecific synthesis of anthragallols, *Synthesis* **1981**, 5, 381-383.
- [183] J. S. E. Holker, R. D. Lapper, T. J. Simpson, Tajixanthone: ¹³C nuclear magnetic resonance spectrum and feedings with [1-¹³C]- and [2-¹³C]-acetate, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1974**, 2135-2140.
- [184] K. B. Hicks, M. S. Feather, The acid-catalyzed dehydration of 1-benzylamino-1-deoxy-D-threo-pentulose, 1-dibenzylamino-1-deoxy-D-fructuronic acid, and D-glucuronic acid, *Carbohydr. Res.* **1977**, 54, 209-215.
- [185] Hochauflösende ESI-Massenspektren wurden von der Fa. *Agilent* (Waldbronn) auf einem LC/MSD-TOF-Gerät gemessen.
- [186] H. Fujimoto, T. Fujimaki, E. Okuyama, M. Yamazaki, Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*, *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47, 1426-1432.
- [187] H. Ui, K. Shiomi, Y. Yamaguchi, R. Masuma, T. Nagamitsu, D. Takano, T. Sunazuka, M. Namikoshi, S. Omura, Nafuredin, a novel inhibitor of NADH-fumarate reductase, produced by *Aspergillus niger* FT-0554, *J. Antibiot.* **2001**, 54, 234-238.
- [188] Hörcher, E. Schwenner, B. Franck, Totalsynthese des Cochliodinols, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 1765-1771.
- [189] K. Ichinose, Y. Ebizuka, U. Sankawa, Mechanistic studies on the biomimetic reduction of tetrahydroxynaphthalene, a key intermediate in melanin biosynthesis, *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 192-196.

- [190] Kametani, H. Nemoto, M. Takeuchi, M. Takeshita, K. Fukumoto, A novel alkylation in the 4-position of isoquinoline derivatives, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1977**, 386-390.
- [191] G. Coll, J. Morey, A. Costa, J. M. Saa, Direct lithiation of hydroxyaromatics, *J. Org. Chem.* **1988**, 53, 5345-5348.

Danke

Zum Abschluss möchte ich noch allen danken, die auf die ein oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Natürlich ist die folgende Liste weder vollständig noch spielt die Reihenfolge irgendeine Rolle.

Ich danke ...

- ... meinen "mikrobiologischen" Kooperationspartnern Rüdiger Stöhr (IFM Kiel) und Stefan Steffens (AWI Bremerhaven), ohne die mir bald die Arbeit ausgegangen wäre.
- ... Manuela Michel, die todesmutig mein "Lieblingsprojekt" in Angriff genommen und auch erfolgreich zu Ende geführt hat.
- ... dem "Sorbi-Team", Tobias Gulder, Marion Fetters, Stefanie Böhm für ihren "heldenhaften" Einsatz.
- ... Marcus Heubes, Michael Wohlfarth, Andreas Hamm und Kim Messer, von denen ich vieles über Naturstoffisolierung und HPLC gelernt habe.
- ... Michael Dreyer, der sofort zur Stelle war wenn technische Probleme auftraten.
- ... "meinen" F-Praktikanten Volker Müller, Sebastian Merkel und Paul Dopf.
- ... M. Grüne und E. Ruckdeschel für die Unterstützung bei der Messung der NMR-Spektren.
- ... allen Leuten im Arbeitskreis (auch den Ehemaligen) für die stete Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Name: Gerhard Lang
geboren am: 26. Mai 1974 in Hamilton, Kanada
Staatsangehörigkeit: deutsch, kanadisch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1980 – 1984 Grund- und Hauptschule Weil im Schönbuch
1984 – 1993 Schönbuch-Gymnasium Holzgerlingen

Hochschulausbildung

10/1994 – 11/1998 Studium der Lebensmittelchemie, Universität Karlsruhe,
Abschluss: Staatsexamen Teil A

04 – 12/1999 Diplomarbeit "*Isolierung und Charakterisierung von Glyoxal-Arginin-Modifikationen*" bei Dr. M. Glomb am Institut für Lebensmittelchemie der TU Berlin

seit 01/2000 Doktorarbeit bei Prof. Dr. G. Bringmann am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg (Thema: "*Isolierung und Charakterisierung neuer Naturstoffe aus Schwamm-assoziierten Mikroorganismen*")