

Isolierung und Charakterisierung von neuen Naturstoffen aus marinen Pilzen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Nils Jansen

Kiel 2012

Referent: Prof. Dr. Johannes F. Imhoff
Korreferent: Prof. Dr. Frank Sönnichsen

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2012

Zum Druck genehmigt: Kiel, 05.12.2012

gez. Prof Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Die vorliegende Arbeit wurde am Kieler Wirkstoff-Zentrum am Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel von Januar 2009 bis September 2012 unter der Anleitung von Prof. Dr. Johannes F. Imhoff durchgeführt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgesellschaft verfasst habe, und dass sie nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit, auch Teile davon, wurden noch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln wurden keine weiteren verwendet. Sie wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Dies ist mein erstes und einziges Promotionsverfahren.

Kiel, den 12.12.2012

Nils Jansen

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Meer als Quelle von Naturstoffen.....	5
1.2	Marine Pilze und bekannte Naturstoffe.....	14
1.3	Dereplikation	18
1.4	Epigenetische Modulatoren	21
1.5	Ziel und Struktur der Arbeit.....	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Nährmedien und Puffer	24
2.2	Vor-Screening-Ansätze für die Identifizierung von Naturstoffen	28
2.3	Herstellung der Extrakte von Großansätzen.....	28
2.4	Aufarbeitung der epigenetischen Ansätzen	29
2.5	Aufreinigung der Extrakte	30
2.6	Chromatographie.....	30
2.6.1	Analytische HPLC-DAD/MS	30
2.6.2	Präparative LC-UV/VIS	31
2.6.3	Semi-Präparative HPLC-DAD	32
2.7	Dereplikation	32
2.8	NMR-Spektroskopie und optische Rotation	32
2.9	CD-Spektroskopie	33
2.10	HRESI-MS-Spektroskopie.....	33
2.11	UV/VIS-Spektroskopie.....	34
2.12	Bioassays.....	35
2.12.1	Antibiotische Bioassays	35
2.12.2	Bioassays auf Wirkung gegen Phytopathogene	35
2.12.3	Enzyminhibitionsassays	36
2.12.4	Zytotoxizitätsassays	36
2.13	Chemische Synthesen	36
2.13.1	Darstellung von Isochromophilon X	36
2.14	Chemikalien	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Dereplikation der Screening-Ansätze	38
3.2	<i>Eurotium rubrum</i>	42
3.2.1	Chemisches und Aktivitätsscreening der Sekundärmetabolite	42
3.2.2	Großansatz	43

3.2.3	Medienvariation.....	46
3.2.4	Identifikation der antimikrobiellen Aktivität gegen <i>B. subtilis</i>	46
3.2.5	Zusammenfassung	47
3.3	<i>Lewia infectoria</i>	48
3.3.1	Chemisches- und Aktivitätsscreening der Sekundärmetabolite	49
3.3.2	Großansatz	50
3.3.3	NMR-Daten der Hauptmetabolite.....	51
3.3.4	Medienvariation und Bioaktivitäten	51
3.3.5	Zusammenfassung	52
3.4	<i>Eutypella scoparia</i>	53
3.4.1	Chemisches- und Aktivitätsscreening der Sekundärmetabolite	53
3.4.2	Medienvariation.....	53
3.4.3	Großansatz	54
3.4.4	Zusammenfassung	55
4	<i>Bartalinia robillardoides</i>	56
4.1	Taxonomie und Assoziation mit <i>Tethya aurantium</i>	57
4.1.1	DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung.....	57
4.2	Medienvariation und Großansatz	59
4.3	Chromatographische Aufarbeitung.....	59
4.4	Sekundärmetabolite.....	60
4.4.1	Helicusin A.....	60
4.4.2	Helicusin A-methylester	63
4.4.3	Helicusin E	65
4.4.4	Isochromophilon X	67
4.4.5	Isochromophilon XI	73
4.4.6	Deacetylsclerotiorin.....	75
4.4.7	Bartanolid.....	77
4.5	Bioaktivität	80
4.6	Epigenetische Modulatoren	82
5	Diskussion	83
5.1	Screening-Ansätze	83
5.2	Spezifisches Screening zur Veränderung des Metabolitspektrums.....	85
5.2.1	<i>Eurotium rubrum</i>	86
5.2.2	<i>Lewia infectoria</i>	87
5.2.3	<i>Eutypella scoparia</i>	89

5.3	<i>Bartalinia robillardoides</i>	90
5.4	Abschließende Diskussion	97
6	Zusammenfassung	99
7	Summary	100
8	Anhang	102
9	Danksagung	104
10	Abkürzungsverzeichnis	106
12	Literatur	108

1 Einleitung

Seit Jahrtausenden extrahieren die Menschen aus Pflanzen und Tieren Naturstoffe, um sie als Heilmittel, Duftstoffe, Färbemittel oder Gifte zu verwenden. Vor allem Substanzen aus Pflanzen wurden wegen ihrer analgetischen und heilenden Wirkungen gegen Schmerzen und Krankheiten verarbeitet. Als wohl ältestes Beispiel seien hier die Pflanzen- und Kräuterextrakte erwähnt, die in den altägyptischen Papyrus Ebers'-Schriftrollen beschrieben sind (Joachim, 1890). Die Extrakte sollten demnach gegen verschiedene Krankheitsbilder wie Wurmbefall und Kopfschmerzen helfen. Die Hochkulturen Indiens, Vorderasiens und Ägyptens verwendeten gegen Kopfschmerzen den ausgekochten Sud von Weidenrinde. Weidenrinde enthält Phenolglykoside und Salicin. Im menschlichen Körper wird aus Salicin Salicylsäure metabolisiert und hat eine ähnlich starke entzündungshemmende und schmerzlindernde Wirkung wie Acetylsalicylsäure. Da Salicylsäure magenreizende Nebenwirkungen besitzt, wurde durch synthetische Derivatisierung die Verträglichkeit verbessert und das wohl erfolgreichste Medikament aller Zeiten, bekannt als Aspirin[®], entwickelt (Kuhnert, 1999).

Dieser traditionelle Gebrauch von Pflanzenextrakten inspirierte die Pharmaindustrie und die universitären Forschungseinrichtungen zur Suche nach neuen Wirkstoffen aus Pflanzen, Tieren und sogar Mikroorganismen. Bis heute sind über eine Million Naturstoffe isoliert und beschrieben worden (Berdy, 2005). Der Großteil wurde aus Pflanzen isoliert und summiert sich auf 500.000 bis 600.000 Verbindungen. Die Isolierung von mikrobiell produzierten Naturstoffen hingegen bekam erst im Jahre 1928 deutlich mehr Aufmerksamkeit. Sir Alexander Fleming entdeckte in seinen Staphylokokken-Kulturen den Schimmelpilz *Penicillium notatum*, von dem eine Wachstumshemmung auf die Bakterien ausging. Fleming forschte zuerst nur mit der Kulturbrühe von *P. notatum*-Kulturen, eine Isolierung der bioaktiven Substanz gelang noch nicht. Er konnte jedoch zeigen, dass der gebildete Stoff nur Gram-positive Bakterien abtötete, nicht aber Gram-negative Bakterien und Zellen von Kaninchen und Menschen. Fleming benannte zuerst die angeimpfte Kulturflüssigkeit und später dann nur die eigentliche Substanz als Penicillin G. Eine Verwendung als Medikament war jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht vorgesehen. Erst 1938 gelang es Howard W. Florey und Ernst B. Chain, die Substanz aufzureinigen (Abraham *et al.*, 1941). Sie testeten den Wirkstoff therapeutisch an Mäusen. Die erste Gabe als Medikament fand im August 1941 statt. Penicillin war fortan ein Medikament, welches für die Soldaten des 2. Weltkrieges und später auf dem gesamten Globus als Antibiotikum Verwendung fand. Diese Entdeckung steht für einen Wendepunkt in der modernen Medizin und wurde mit dem Nobelpreis für Medizin 1945 geehrt (Liljestrand, 1945). 1942 realisierte Hans Knöll die erste großtechnische Produktion von Penicillin G aus *Penicillium chrysogenum* auf dem europäischen Festland.

Nach dieser Technik wird auch heute noch in Europa das Antibiotikum produziert. Durch die Fermentation im Industriemaßstab und anschließender halbsynthetische Derivatisierung können heutzutage kostengünstig alle vermarkteten β -Lactam Antibiotika hergestellt werden. Die fermentative Herstellung der Antibiotika ist eins der herausragenden Beispiele der Biotechnology in den letzten 50 Jahren (Elander, 2003).

Der Erfolg des Penicillins beflügelte die Forschung auf dem Gebiet der mikrobiellen Wirkstoffe. Bis heute sind über 50.000 Substanzen aus Mikroorganismen isoliert worden, wovon knapp die Hälfte bioaktive Wirkungen zeigen (Berdy, 2005). Die Pharmaindustrie setzte hingegen in den letzten Jahren auf das Screening von vollsynthetisch hergestellten Substanzen, um einen möglichst bioaktiven und verträglichen Wirkstoff zu entdecken. Zum Großteil wurden dabei die bekannten pharmakologisch wichtigen Leitstrukturen als Vorlage verwendet. Dafür werden in High-Throughput-Screening (HTS)-Ansätzen immer noch so viele Substanzen wie möglich synthetisiert und anschließend in Bioassays getestet, um eine möglichst hohe Trefferquote zu erzielen. Zunehmend fließen in die Synthesen Erkenntnisse aus der *in silico* 3D-Struktursimulation von Rezeptoren ein. In Simulationen werden für die Bindetaschen von Rezeptoren passgenaue Liganden geformt und mit bekannten Leitstrukturen verbunden (Livingstone, 2000). Die Voraussetzung für die *in silico* Wirkstoffentwicklung sind genaue Kenntnisse über den molekularen Bau therapeutisch relevanter Zielmoleküle. Dies ist jedoch in vielen Fällen nicht gegeben (Proksch, 2005). Das einzige Medikament, welches aus der kombinatorischen Chemie hervorgegangen ist, ist das antitumoral wirksame Sorafenib (**1**) (Butler, 2004). Es wirkt, indem es das Wachstum von Krebszellen verlangsamt und die vaskuläre Versorgung der Krebszellen zerstört. Das als Orphan-Drug in der EU zugelassene Medikament wird vor allem gegen fortgeschrittenen Nierenkrebs eingesetzt.

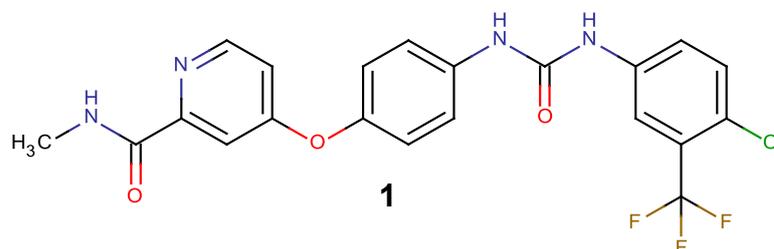


Abbildung 1: Sorafenib (**1**) (Handelsname Nexavar[®]) ist ein Multi-Kinase-Inhibitor und wird in der Behandlung von fortgeschrittenem Nierenkrebs verwendet. Es zählt zu den Orphan-Arzneimitteln und ist das einzige Medikament, welches aus der kombinatorischen Chemie für neue bioaktive Substanzen hervorging.

Die Diversität der synthetischen Wirkstoffe ist durch die beschränkte Anzahl an Leitsubstanzen, sowie die eingeschränkte Realisierbarkeit bzw. Wirtschaftlichkeit von chemischen Reaktionen limitiert. Die chemische Diversität von Naturstoffen hingegen ist das

Ergebnis evolutionärer Entwicklung der Stoffwechselprozesse von Organismen über Millionen von Jahren. In der Evolution der Organismen ist ein Stoffwechsel entstanden, der Substanzen aus der Umwelt aufnehmen, als Energiequelle nutzen und die Abbauprodukte aus dem Organismus ausschleusen kann. Häufig wird in Primär- und Sekundärstoffwechsel unterschieden, wobei meist keine klare Abgrenzung möglich ist:

Der Primärstoffwechsel ist in allen Lebensformen vorhanden und bezieht sich auf die Produktion von Substanzen, die dem Organismus das Überleben sichern (Kreis, 2007). Der Primärstoffwechsel umfasst sowohl Energie- und Baustoffwechsel für den Grundumsatz und den Aufbau des Organismus, als auch die Assimilation, Dissimilation und Biotransformation von Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen.

Im Sekundärstoffwechsel werden in der Regel niedermolekulare Verbindungen produziert, bei denen die Funktion im Organismus bzw. im ökologischen Umfeld häufig noch unbekannt ist. Sekundärmetabolite zeichnen sich durch eine hohe chemische Diversität und die ausgesprochen hohe Anzahl an Hydroxy- und Ethergruppen aus. Im Vergleich dazu weisen synthetische Substanzen aus der kombinatorischen Chemie eher eine hohe Anzahl an Aromaten, Amin- und Amidgruppen auf (Müller *et al.*, 2000).

Die biologischen Stoffwechselprozesse wurden so optimiert, dass sie mit möglichst wenigen Reaktionen und mit substrattoleranten Enzymen einen Naturstoff produzieren. So ist gewährleistet, dass der Prozess energieeffizient abläuft und mit wenigen Enzymen eine große Anzahl an Metaboliten produziert werden kann. Besonders der mikrobielle Stoffwechsel ist durch äußere Stressfaktoren auf die Produktion von Naturstoffen optimiert und zeichnet sich durch die strikt regulierte Biosynthese aus. Beeindruckend an dem mikrobiellen Sekundärstoffwechsel ist das breite Spektrum der biologischen Aktivitäten. Die verschiedenen biologischen Aktivitäten beruhen auf den hauptsächlichen Lebensweisen (z.B. Schutzaktivitäten sessiler Lebensformen) und den besetzten ökologischen Nischen. Basierend auf der vielfältigen Verwendung der Substanzen als Kommunikations-, Schutz- oder Abwehrstoff muss deren Chemie demzufolge möglichst vielfältig ausfallen, um ein möglichst breites Spektrum abzudecken. Die Bandbreite der Bioaktivitäten reicht von Hemmung der Thrombozytenaggregation (Mayer *et al.*, 2011) und Aktivität als Radikalfänger (Debbab *et al.*, 2011), als auch antimikrobieller (Donia & Hamann, 2003), antituberkulotischer (El Sayed *et al.*, 2000), antiviraler (El Sayed, 2000), antiparasitärer (Kayser *et al.*, 2002), antihelminthischer, antimalarischer, antiprotozoischer, antikoagulativer, antiinflammatorischer, antidiabetischer und zytostatischer Aktivität, bis hin zu Effekten auf das kardiovaskuläre, Immun- und Nervensystem (Mayer *et al.*, 2010; Waters *et al.*, 2010; Mayer *et al.*, 2011). Aber nicht nur auf die Vielfalt kommt es an, sondern auch auf die Potenz und die Wasserlöslichkeit der Sekundärmetabolite. Die Naturstoffe müssen zum einen eine ausreichende Wasserlöslichkeit aufweisen, um aus dem Organismus ausgeschleust werden

zu können und zum anderen eine hinreichend starke biologische Aktivität, da die ausgeschleusten Naturstoffe der Verdünnung mit dem umgebenden Meerwasser unterliegen (Haefner, 2003).

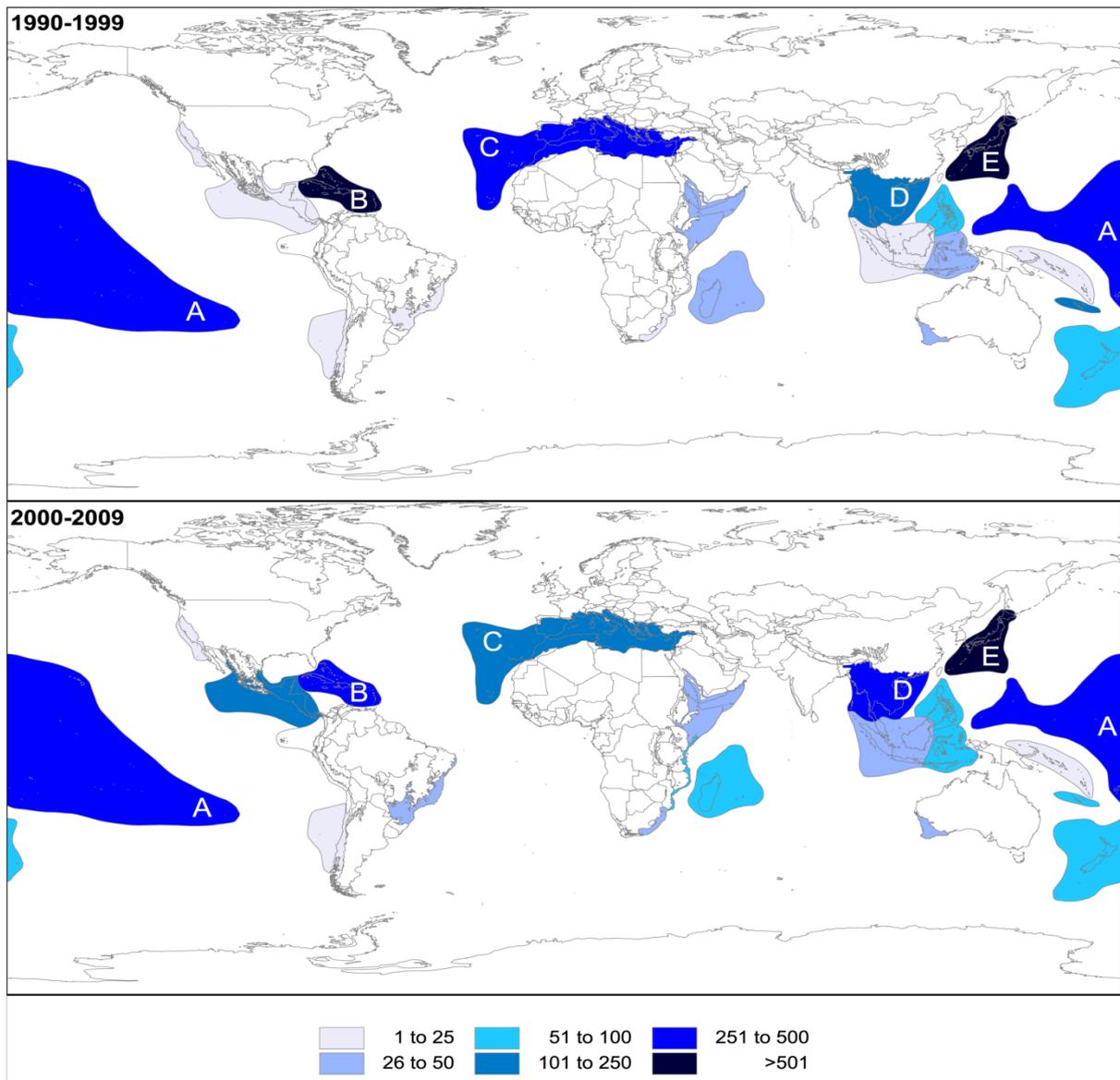


Abbildung 2: Die Grafik zeigt die Anzahl von neuen Naturstoffen isoliert aus marinen Invertebraten zwischen 1990 und 2000. Das ergiebigste Gebiet (bzw. meist erforschte) sind die japanischen Gewässer, insgesamt wurden hier über 1.000 neue Naturstoffe aus marinen Invertebraten isoliert. Oben sind die 90er Jahre angegeben, unten die 10 Jahre ab 2000. (A – Polynesien-Mikronesien, B – Karibische Inseln, C – Mittelmeerbecken, D – Indien-Burma, E – Japan) (Leal et al., 2012).

Zur ökologischen Funktionalität kommt also meist auch eine pharmakologische Wirkung hinzu. Mikroorganismen verwenden die produzierten Naturstoffe beispielsweise als Kommunikationsmittel (Botenstoffe), zum Schutz vor Konkurrenten oder für die „chemische Kriegsführung“ gegen Fraßfeinde (Galeano *et al.*, 2011). Anfänglich wurden große Stammsammlungen mit terrestrischen Mikroorganismen auf deren Sekundärmetabolite hin

untersucht. Die mühsame und detaillierte Suche führte zwar zu einigen wichtigen Leitstrukturen für Medikamente, wie z.B. Streptomycin, aber die Problematik der Mehrfachisolierung von bereits bekannten oder einfachen Derivaten wurde immer größer (Berdy, 2005). Ein Ansatz zur Lösung des Problems war die Erforschung von Mikroorganismen aus bisher weniger untersuchten Lebensräumen. Gut geeignet dafür war der marine Bereich, denn er deckt ca. 70 % der Gesamtoberfläche der Erde ab (Pidwirny, 2006) und ist mit über 20.000 isolierten Metaboliten aus Makro- und Mikroorganismen vergleichsweise wenig erforscht (Blunt *et al.*, 2012b). Durch aufwendige Probenahmen mit moderner Technik konnte eine Vielzahl an Proben auch aus unzugänglichen Habitaten, wie zum Beispiel der Tiefsee, ins Labor gebracht werden. Die meisten Untersuchungen stützten sich vor allem auf Makroorganismen wie Schwämme, Mantel- und Nesseltiere und die mit ihnen in Symbiose lebenden Mikroorganismen (Blunt *et al.*, 2012b). Abbildung 2 verdeutlicht die Verteilung von neuen Naturstoffen, die aus marinen Invertebraten isoliert wurden. Beeindruckend ist hier die große Anzahl von neuen marinen Naturstoffen, die aus japanischen marinen Invertebraten innerhalb von 20 Jahren isoliert wurden (Leal *et al.*, 2012).

1.1 Das Meer als Quelle von Naturstoffen

Die Untersuchung von marinen Organismen zur Gewinnung von bioaktiven Naturstoffen hat ihren Ursprung vor etwa 60 Jahren. Bergmann und Feeney legten mit der Entdeckung der ersten beiden marinen Naturstoffe, Spongothymidin (**2**) und Spongouridin (**3**) aus dem Schwamm *Cryptetethia crypta*, den Grundstein der marinen Naturstoffforschung (Bergmann & Feeney, 1951).

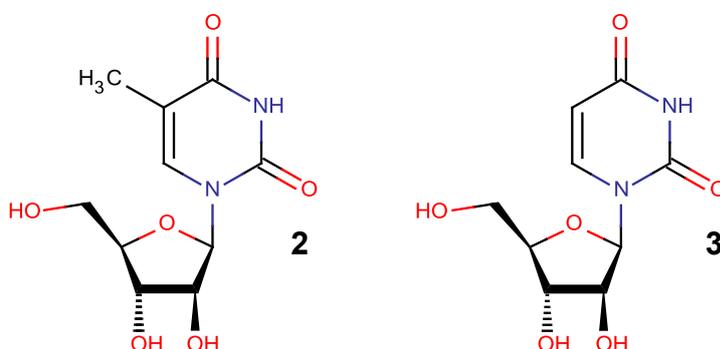


Abbildung 3: Spongothymidin (**2**) und Spongouridin (**3**) wurden erstmals aus *Cryptetethia crypta* isoliert (Bergmann & Feeney, 1951). Das Grundgerüst ist der Zucker Arabinose, welcher mit den Nucleobasen Thymin und Uridin verknüpft ist.

Der große Durchbruch kam erst 1969 mit der Entdeckung zweier Prostaglandin-Derivate aus der karibischen Hornkoralle *Plexaura homomalla* (Weinheimer & Spraggins, 1969). Prostaglandine waren zu dieser Zeit gerade als Mediatorstoffe für beispielsweise die Entstehung von Fieber und Entzündungen bekannt geworden. Diese Entdeckung regte die pharmazeutischen und universitären Forschungsgruppen dazu an, marine Naturstoffe als mögliche Wirkstoffe zu berücksichtigen. Durchschnittlich kommen mehr als 50 % der in den letzten 25 Jahren zugelassenen Medikamente direkt aus der Natur oder sind von einem Naturstoff abgeleitet (Newman & Cragg, 2007). Wie bereits erwähnt, wurden bis dato insgesamt über 20.000 Naturstoffe aus marinen Organismen isoliert (Blunt *et al.*, 2012b), wobei die Entdeckung vieler dieser Substanzen erst in den letzten Jahren folgte (siehe Abbildung 4).

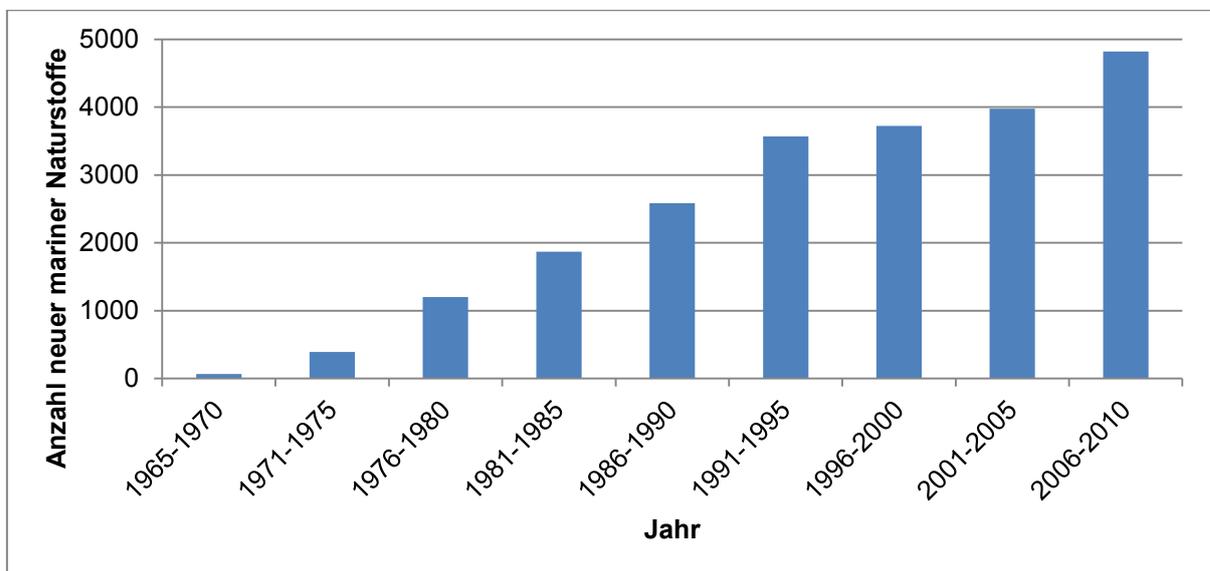


Abbildung 4: Gesamtzahl an neuen marinen Naturstoffen isoliert aus marinen Organismen, sortiert nach der Erstveröffentlichung. Modifiziert nach Blunt *et al.* (2003; 2004; 2005; 2006; 2007; 2008; 2009; 2010; 2011; 2012b).

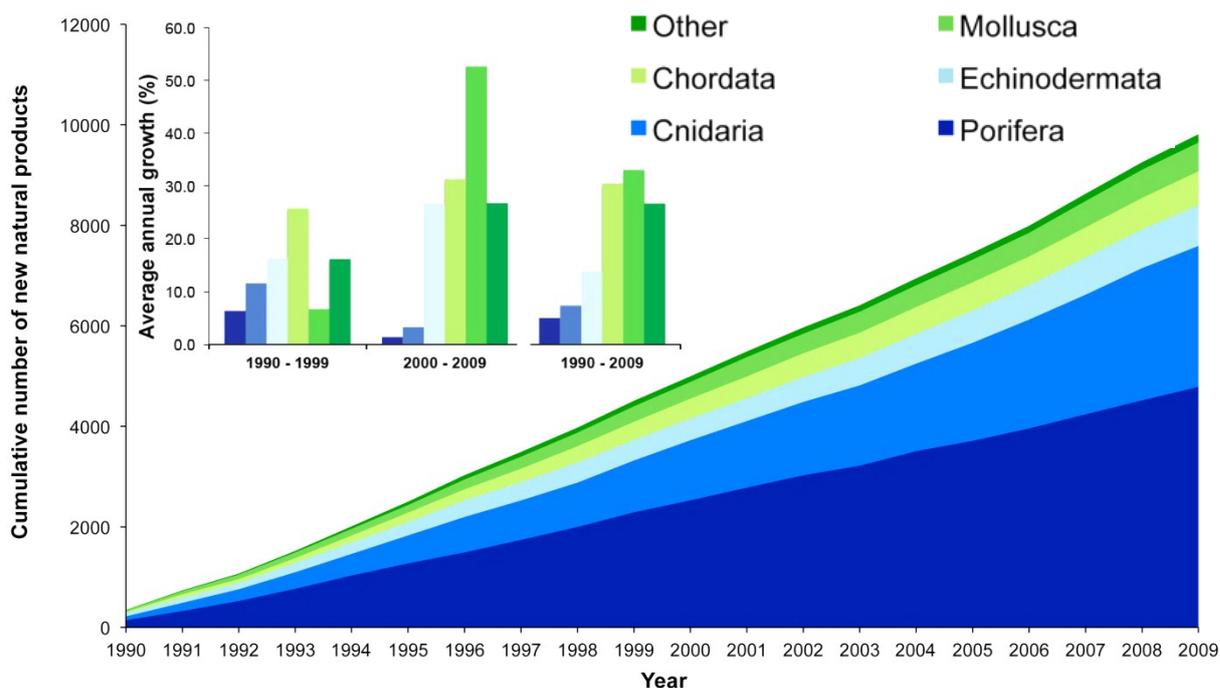


Abbildung 5: Neue Wirkstoffe aus marinen Invertebraten (kumulierte Anzahl) sortiert nach ihrem Phylum von 1990 bis 2009 (Leal *et al.*, 2012).

Abbildung 5 zeigt die Verteilung der marinen Organismen, aus denen Naturstoffe isoliert wurden. Knapp 50 % der in den Jahren 1990 bis 2009 isolierten Substanzen kamen aus Schwämmen.

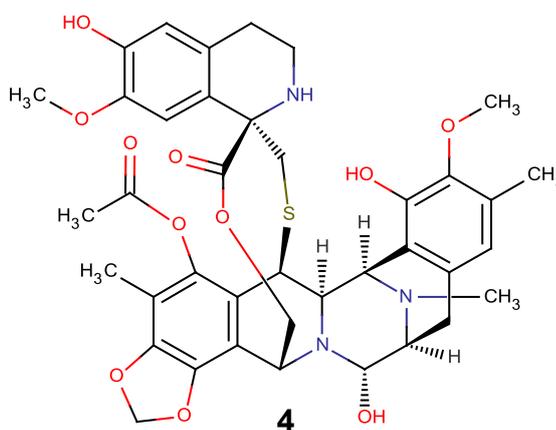
Die isolierten Substanzen stellten sich in ihrem Aufbau ebenso divers dar wie ihre biologische Aktivität. Trotz der großen Anzahl an bioaktiven Substanzen erreichten bisher nur sieben die Zulassung als Medikament. Die Entdeckung einer bioaktiven Substanz führt nicht zwangsläufig zu einer Etablierung als Medikament (de la Calle, 2012). Dies hat meist folgende Gründe:

Zum einen kann eine bioaktive Substanz neben den therapeutischen auch immer Nebenwirkungen (z.B. Toxische Wirkungen, Wechselwirkungen, etc.) haben, die eine Verwendung als Medikament ausschließen können. Das aktuellste Beispiel ist Cerivastatin (Handelsname: Lipobay[®]), ein Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer. Es wurde 1997 in der EU als Medikament zugelassen und 2001 wieder vom Markt genommen. Durch Wechselwirkungen mit Gevilon[®] (INN: Gemfibrozil, ein lipidsenkendes Medikament) kam es Ende 1998 zum ersten Todesfall, worauf 51 weitere Todesfälle weltweit innerhalb von 3 Jahren folgten (Furberg & Pitt, 2001; Imbs, 2002).

Zum zweiten richten sich einige Bioaktivitäten nur gegen Krankheitsbilder mit einer geringen Anzahl an erkrankten Personen. Somit würden sich die entstandenen Kosten für die langwierigen klinischen Studien durch den Verkauf des Medikamentes nicht decken. Die Einführung des Orphan Drug Status 1983 in den USA für „Arzneimittel für seltene Leiden“

sollte aus diesem Grund den Pharmafirmen die Entwicklung von Medikamenten für seltene Krankheiten attraktiv gestalten. Die Zulassung als Orphan Drug sichert dem Pharmaunternehmen die Exklusivmarktrechte für 10 Jahre, sowie eine gebührenfreie und beschleunigte Zulassung. In der EU haben zurzeit 62 Substanzen den Orphan Drug Status (European Commission, Mai 2012).

Das größte Problem bei der Etablierung eines Medikamentes ist die Bereitstellung von ausreichend Substanzmenge für Testungen, präklinische und klinische Studien und für den späteren Markt. Der jährliche Bedarf an Wirkstoff nach erfolgter Markteinführung liegt bei 1-5 kg (Hart *et al.*, 2000). Eine ökonomisch und ökologisch sinnvolle Extraktion von Substanzen direkt aus einem Makroorganismus, vor allen Dingen nach Entnahme aus der Natur von marinen Invertebraten, ist nicht zu rechtfertigen und unrealistisch. Die Extraktion von Ecteinascidin (ET) 743 (**4**) aus Seescheiden stellt die Schwierigkeiten beispielhaft dar: ET-743 (INN: Trabectedin, Handelsname: Yondelis[®]) wurde 2007 der Orphan Drug Status als Medikament für die Therapie gegen Weichteilkarzinome erteilt (European Commission, Mai 2012). In diesem Zug wurden für klinische Studien größere Mengen ET-743 benötigt. Die Extraktion aus einer Tonne Frischgewicht der Seescheide *Ecteinascidia turbinata* brachte lediglich ein Gramm Reinsubstanz hervor. Die erfolgreiche Etablierung einer Aquakultur an Land (Mendola, 2000), in der die Seescheiden herangezogen wurden, lieferte 250 t Biomasse, aus der letztendlich 200 g ET-743 gewonnen werden konnten (Proksch *et al.*, 2006). Die Infrastrukturen solcher Aquakulturen sind teuer und durch ihre Störanfälligkeit gegenüber Fraßfeinden, pathogenen Mikroorganismen, Umwelteinflüssen (auch Unwettern oder extremen Wetterlagen) und Fremdkontamination schlecht zu handhaben. Die Wahl der optimalen Parameter für eine Aquakultur wie pH-Wert, Temperatur und Salzgehalt bedarf einer langen Erprobung und ist überdies noch organismenspezifisch. Aquakulturen sind also nur bedingt geeignet für die Anzucht mariner Makroorganismen, um anschließend größere Mengen des Naturstoffes zu isolieren.



Ein Ansatz zur Lösung des dritten Problems stellt die Kultivierung von Mikroorganismen dar. Mikroorganismen sind aus nahezu jedem beliebigen Substrat isolierbar (z. B. Seewasser, Bodenproben, Pflanzen, Tieren, etc.) und sie lassen sich hervorragend zu Tausenden in Kryokonservierungen lagern. Die anschließende Reaktivierung und *in vitro* Anzucht auf Nährmedien ist meist unproblematisch und kostengünstig. Das Up-scaling kann optimiert werden, auch in Skalen von bis zu einem Volumen von mehreren zehntausend Litern (Prosch, 2005). Die für jeden Mikroorganismus spezifischen Kulturbedingungen lassen sich in miniaturisierten Parallelansätzen relativ leicht ermitteln. Eine Variation der Kulturparameter kann einen großen Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten in Bezug auf Menge und Diversität haben (Bode *et al.*, 2002). Die Produktion von Sekundärmetaboliten erreicht bei einem Großteil der Mikroorganismen ein Maximum bereits in den ersten Tagen bis Wochen nach der Inokulation. Die Ernte der Kultur und anschließende chromatographische Isolierung der Reinsubstanzen ist auch im Industriemaßstab durchführbar (Schaufelberger *et al.*, 1991).

Bei ET-743 beispielsweise konnte durch die Einbeziehung einer fermentativen Produktionsstufe das Verfahren deutlich vereinfacht werden: Die Vorstufe Safracin B wird im Bakterium *Pseudomonas fluorescens* produziert. Durch Veränderung der Fermentationsbedingungen konnte die Produktion optimiert werden und als Vorstufe steht Cyanosafracin B kostengünstig und im Kilomaßstab bereit. In einfachen chemischen Syntheseschritten kann diese Vorstufe großtechnisch zu ET-743 umgewandelt werden. Der Nachschub konnte somit um ein Vielfaches gesteigert werden (Cuevas *et al.*, 2000; Galeano *et al.*, 2011; Wilde *et al.*, 2012).

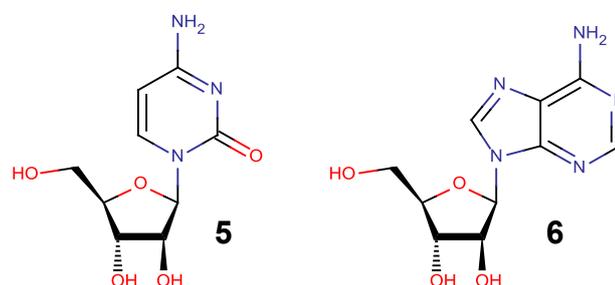


Abbildung 7: Struktur von Cytarabin (5) und Vidarabin (6), zwei als Medikamente zugelassene Derivate, die sich von 2 und 3 ableiten.

Dass das Meer eine gute Quelle für neue Natur- und Wirkstoffe ist, zeigt ein Blick in die Pipeline der Kandidaten für Medikamente (Tabelle 1). Die Anzahl der heute zugelassenen Medikamente mit Wirkstoffen oder Leitstrukturen aus dem Meer beläuft sich auf sieben.

Davon sind die chemischen Strukturen von zweien direkt aus der Natur übernommen worden und die anderen fünf sind Derivate von Naturstoffen, wobei die Grundstruktur im Derivat wiederzufinden ist (Gerwick & Moore, 2012). 1974 wurden Cytarabin (**5**) in der EU und den USA, sowie Vidarabin (**6**) in der EU als Medikament zugelassen. Beide Substanzen wurden von den ältesten marinen Naturstoffen, **2** und **3**, abgeleitet. Erst 30 Jahre später, 2004, wurde wieder ein mariner Naturstoff als Medikament zugelassen. Aus der Kegelschnecke *Conus magus* konnte ω -Conotoxin MVIIA (**7**) isoliert werden. Die Kegelschnecke verwendet diese Substanz als Gift, um Fische kurzzeitig zu paralysieren. ω -Conotoxin besteht aus 25 Aminosäuren, die mit 3 Disulfidbrücken quervernetzt sind.

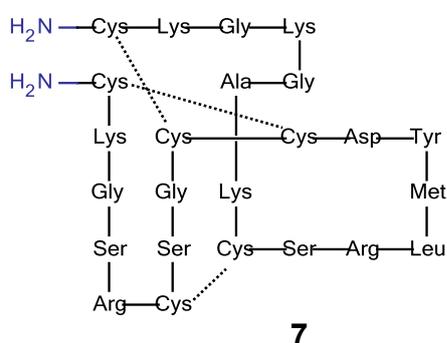


Abbildung 8: ω -Conotoxin MVIIA (**7**) (INN: Ziconotid, Handelsname: Prialt®) besteht aus 25 Aminosäuren, die über drei Schwefelbrücken quervernetzt sind. Es wird als Schmerzmittel meist intrathekal injiziert.

Im humanen Nervensystem blockiert das Toxin die Calcium-Kanäle an den Synapsen und verhindert somit die Ausschüttung von Neurotransmittern (Arias, 2006). Dem Nachteil, dass es nur intrathekal verabreicht werden kann, stehen mehrere Vorteile von Ziconotid gegenüber. Die Wirkung als Schmerzmittel ist ca. 1.000-fach stärker als die des Morphins (Möriz, 2007) und es wirkt bereits im picomolaren Bereich. Es tritt auch nach längerer Anwendung keine Gewöhnung des Patienten ein, so dass eine Dosissteigerung nicht notwendig ist (Jiang *et al.*, 1999). Heutzutage wird ω -Conotoxin synthetisch hergestellt und als Prialt® (INN: Ziconotide) vermarktet. Prialt® wird seit 2005 zur Schmerztherapie bei Patienten mit Krebs und AIDS verwendet (Canellos, 2012).

Kurze Zeit später, 2007, erhielt dann das oben genannte ET-743 (**4**) die europäische Zulassung als Medikament gegen Weichteilkrebs (Molinski *et al.*, 2009) und 2009 die Zulassung für die Anwendung bei Eierstockkrebs (Sessa & D'Incalci, 2011). In den USA befindet sich ET-743 noch in der klinischen Phase III.

Weitere marine Naturstoffe, die entweder von der FDA oder von der EU zugelassen wurden, sind:

- **Eribulinmesylat (8)** ist ein synthetisch gewonnenes Analogon des aus Schwämmen isolierten Polyethers Halichondrin B. Halichondrin B war bis vor kurzem noch in der klinischen Phase II. Bei der Bereitstellung ausreichender Mengen gab es wie bei ET-743 Schwierigkeiten. Eine Extraktion vom Schwamm *Halichondria okadai* sowie eine chemische Totalsynthese des Halichondrin B waren möglich, aber weder ökologisch noch wirtschaftlich vertretbar. Das vollsynthetisch hergestellte Eribulinmesylat besitzt ein äquivalentes antiproliferatives Potential wie Halichondrin B und bindet an Tubulin an der Bindestelle für Vinca-Alkaloide (Barboza *et al.*, 2012). Es wird als Halaven[®] von Eisai Inc. vermarktet.

- **Brentuximab vedotin (Adcetris[®])** ist der neueste Wirkstoff in der Liste der zugelassenen Medikamente und leitet sich von dem Wirkstoff Dolastatin 10 ab. Dolastatin 10 wurde erstmals aus einem Seehasen (*Dolabella auricularia*) aus dem Indischen Ozean isoliert und später als Metabolit des marinen Cyanobakteriums *Symploca* sp. identifiziert. Die klinischen Studien verliefen für diesen Wirkstoff und für das wasserlösliche Derivat Auristatin PE wegen mangelnder Wirksamkeit und induzierter peripherer Neuropathie nicht erfolgreich. Durch Verknüpfung von Dolastatin 10 mit einem Derivat von Monomethylauristatin E (Zytostatikum) entstand ein Antikörper-Wirkstoff-Konjugat. Da Dolastatin 10 selektiv an die Zellmembranproteine CD30 auf Zellen des Hodgkin-Lymphoms bindet, kann anschließend das Zytostatikum die Zellen zerstören. Die FDA Zulassung erfolgte im August 2011 und es wird von Seattle Genetics vermarktet (Katz *et al.*, 2011; Canellos, 2012; Gerwick & Moore, 2012).

- Das siebte zugelassene Medikament wird aus Fischöl verschiedener Fischarten halbsynthetisch hergestellt und ist als Lipidsenker auf dem Markt (D, A: **Zodin[®]**, Omacor[®]; USA: Lovaza[®]). Es besteht aus Estern langkettiger, mehrfach ungesättigter Omega-3-Fettsäuren. Es wird zur Behandlung von Hypertriglyzeridämie und als Sekundärprävention nach Myokardinfarkten verwendet (Barter & Ginsberg, 2008; Dayspring, 2011).

- In Phase III wartet **Plitidepsin (9)** auf die Zulassung zum Medikament in der Krebstherapie (Tabelle 1). Plitidepsin (Aplidin[®]) ist ein Derivat von Didemnin B und wird von PharmaMar vermarktet. Der Wirkstoff für Aplidin[®] wird von *Aplidium albicans* (Seescheide) produziert und zeigt sehr ähnliche Wirkungen wie Didemnin B (Apoptose von Krebszellen (Staats *et al.*, 2004)), jedoch ohne die Nebenwirkung wie Ermüdung oder anaphylaktische Reaktionen (Molinski *et al.*, 2009).

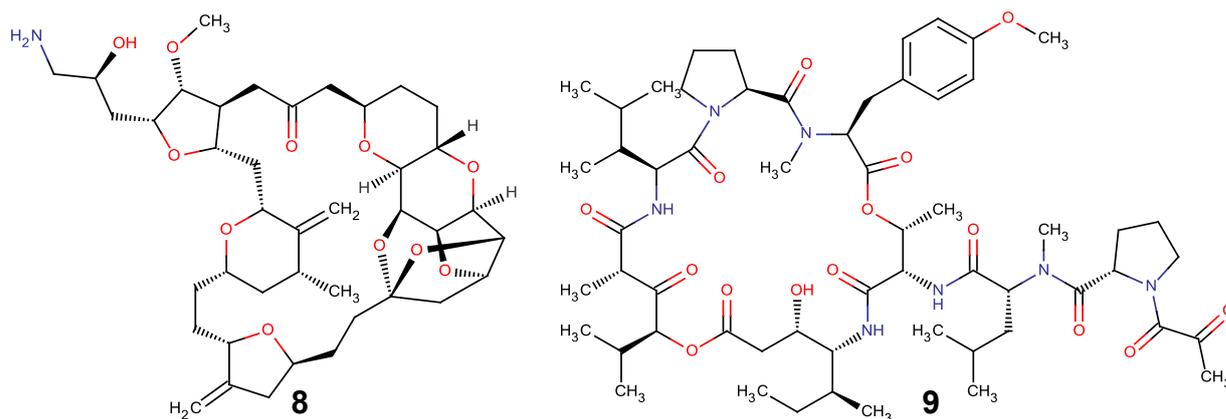


Abbildung 9: Eribulinmesylat (**8**), zugelassen als Medikament und Plitidepsin (**9**) in der klinischen Phase III.

Tabelle 1 fasst die oben genannten Medikamente zusammen und zeigt welche marinen Naturstoffe, Analoga und Derivate sich zurzeit in den klinischen Phasen I bis III befinden und getestet werden. Angegeben sind neben dem INN und Handelsnamen auch die chemische Klasse und die Wirkung, sowie der marine Organismus, aus dem der Naturstoff isoliert oder abgeleitet wurde.

Tabelle 1: In der Entwicklung befindliche Kandidaten für Medikamente, die aus marinen Organismen isoliert wurden und nun als Naturstoffe, Analoga oder Derivate getestet werden; Modifiziert nach Mayer *et al.* (2010) und aktualisiert (Gerwick & Moore, 2012; PharmaMar, Juni 2012; Seattle Genetics, Juni 2012; Celldex Therapeutics, Mai 2012; Eisai GmbH, Mai 2012; National Cancer Institute, Mai 2012), Stand Juni 2012. k.A. = keine Angaben

Klinischer Status	Internationaler Freiname (INN)	Handelsname	Mariner Organismus	Chemische Klasse	Wirkung
Zugelassen	Cytarabin, Ara-C	Cytosar-U [®]	Schwamm	Nukleosid	Zytostatisch
	Vidarabin, Ara-A	Vira-A [®]	Schwamm	Nukleosid	Antiviral
	Ziconotid	Prialt [®]	Kegelschnecke	Peptid	Analgetisch
	Trabectedin (ET-743)	Yondelis [®]	Seescheide	Alkaloid	Zytostatisch
	Brentuximab vedotin (SGN-35) (Seattle Genetics, Juni 2012)	Adcetris [®]	Weichtier	Antikörper	Zytostatisch
	Eribulin mesylate (Eisai GmbH, Mai 2012)	Halaven [®]	Schwamm	Makrolid	Zytostatisch
	Omega-3-Säurethylester	Zodin [®] , Omacor [®] ,	Fisch	Omega-3-Fettsäuren	Lipidsenkend

Fortsetzung der Tabelle 1

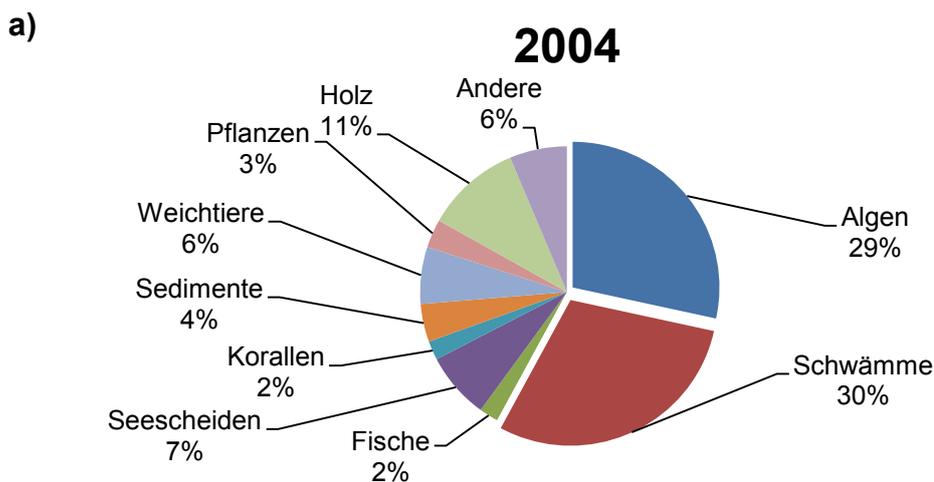
Klinischer Status	Internationaler Freiname (INN)	Handelsname	Mariner Organismus	Chemische Klasse	Wirkung
Phase III	Plitidepsin (PharmaMar, Juni 2012)	Aplidin®	Seescheide	Depsipeptid	Zytostatisch
Phase II	DMXBA (GTS-21)	k.A.	Wurm	Alkaloid	Antipsychotisch
	Plinabulin (NPI-2358)	k.A.	Pilz	Diketopiperazin	Zytostatisch
	Elisidepsin	Irvalec®	Weichtier	Depsipeptid	Zytostatisch
	PM1004	Zalypsis	Nacktschnecke	Alkaloid	Zytostatisch
	Tasidotin, Synthadotin (ILX-651)	k.A.	Bakterium	Peptid	Zytostatisch
	Pseudopterosins	k.A.	Weichkoralle	Diterpenglykosid	Wundheilend
	Glembatumumab Vedotin CDX-011 (Celldex Therapeutics, Mai 2012)	k.A.	Weichtier	Antikörper- Wirkstoff- Konjugat	Zytostatisch
	PM01183 (PharmaMar, Juni 2012)	k.A.	Weichtier	Alkaloid	Zytostatisch
Phase I	Bryostatin 1	k.A.	Moostierchen	Polyketid	Zytostatisch
	Hemiasterlin	k.A.	Schwamm	Tripeptid	Zytostatisch
	Marizomib (Salinosporamid A)	k.A.	Bakterium	β-Lakton-γ- Lactam	Zytostatisch
	PM060184 (PharmaMar, Juni 2012)	k.A.	Schwamm	k.A.	Zytostatisch
	SGN-75 (Seattle Genetics, Juni 2012)	k.A.	Weichtier	Antikörper- Wirkstoff- Konjugat	Zytostatisch
	ASG-5ME (Seattle Genetics, Juni 2012)	k.A.	Weichtier	Antikörper- Wirkstoff- Konjugat	Zytostatisch

1.2 Marine Pilze und bekannte Naturstoffe

Die Definition von marinen Pilzen ist nicht eindeutig, denn sie sind eher eine ökologische als eine physiologische oder taxonomische Eingliederung. In der Wissenschaft werden zwei Gruppen von marinen Pilzen unterschieden. Zum einen obligat marine Pilze, die nur in marinen Habitaten wachsen und sporulieren, und zum anderen die fakultativ marinen Pilze, die aus marinen Habitaten isoliert wurden und unter marinen sowie terrestrischen Bedingungen wachsen und gegebenenfalls sporulieren können (Kohlmeyer & Kohlmeyer, 1979).

Eine Vielzahl von Pilzsporen wird ins Meer eingetragen und von marinen sessilen Strudlern (z. B. Schwämme) herausgefiltert. Ob solche Pilzsporen nun in Meerwasser wachsen können oder nur auf Grund der Symbiose zum Wirtsorganismus überleben oder nur in persistenten Stadien überleben, bleibt zu klären (Proksch *et al.*, 2008; Debbab *et al.*, 2011). Im Folgenden werden aus dem Meer isolierte Stämme als „marine Pilze“ bezeichnet.

Marine Pilzstämme sind von nahezu jedem marinen Substrat der Welt isoliert worden. Dazu zählen: anorganische Substrate (Sedimente, sandige Habitate, künstliche Substrate und die Wassersäule); marine Pflanzen (Seegras, Algen, Treibholz oder andere höhere Pflanzen, hauptsächlich Mangrovenbäume); marine Invertebraten (hauptsächlich Schwämme aber auch Korallen, Seescheiden, Seegurken, Muscheln, Krebse); sowie Vertebraten (meist Fische) (Rateb & Ebel, 2011). Die Abbildung 10 zeigt die prozentuale Verteilung von neuen Substanzen aus marinen Pilzen, eingeteilt nach dem Habitat der Pilze.



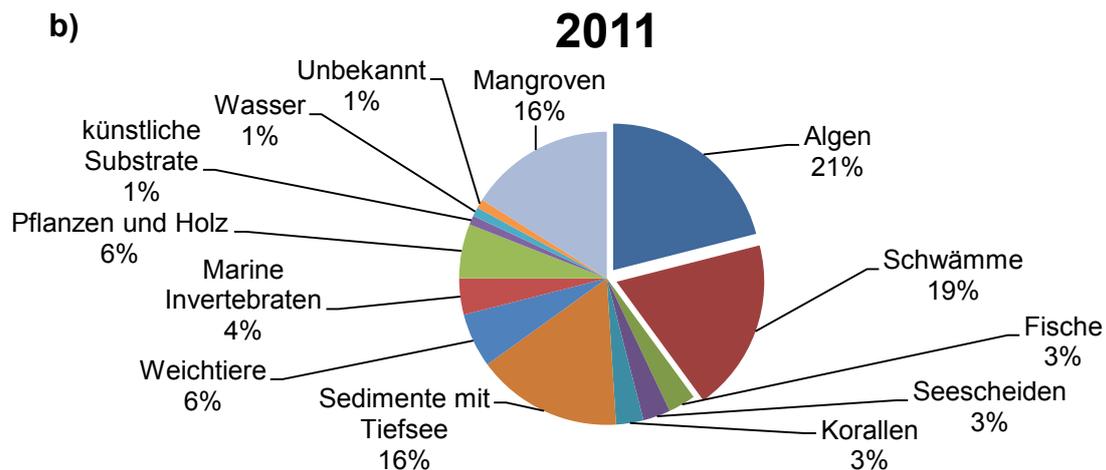


Abbildung 10: Prozentualer Anteil von neuen Substanzen aus marinen Pilzen aufgeteilt nach dem jeweiligen Habitat, aus dem der jeweilige Pilz isoliert wurde. a) Aufteilung nach Bugni und Ireland (2004); b) Aufteilung nach Rateb und Ebel (2011).

Auffällig ist, dass Algen, gefolgt von Schwämmen und Mangroven, die augenscheinlich potentesten Habitate für die Isolation von Pilzen, die neue Substanzen produzieren, sind. Ein Vergleich der Grafik von Bugni und Ireland (2004) mit der Graphik von Rateb und Ebel (2011) (jeweils Abbildung 10) zeigt deutlich die Veränderungen. Die bis 2011 neu hinzugekommenen Gruppen sind die Habitate aus der Tiefsee, wobei alle Proben aus dem Sediment genommen wurden, und aus den Mangroven. Dies ist erklärbar zum einen durch die besseren technischen Möglichkeiten den Tiefseebereich zu beproben, zum anderen ist die Zahl der chinesischen Publikationen über Mangroven Habitate in den letzten Jahren deutlich gestiegen.

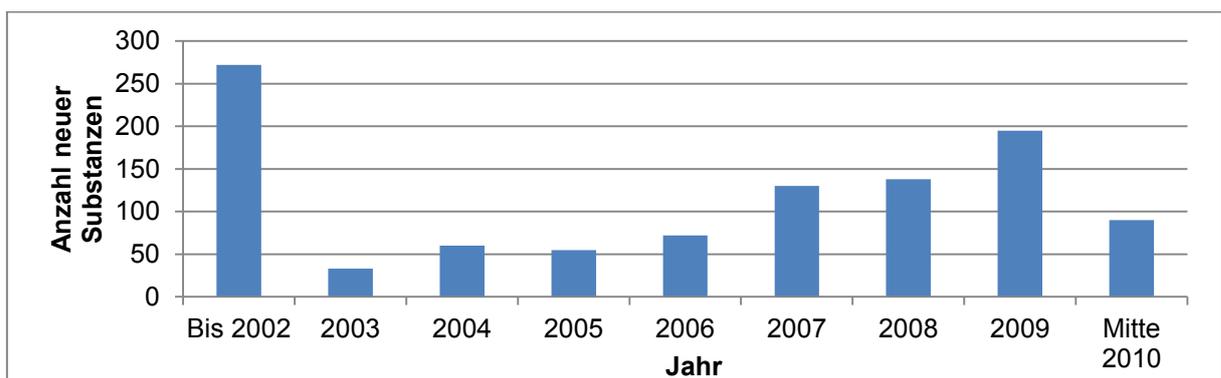


Abbildung 11: Zahl der neuen Substanzen isoliert aus marinen Pilzen. Das Jahr bezieht sich auf die Veröffentlichung. (Modifiziert nach Rateb und Ebel (2011))

Der stete Anstieg an veröffentlichten Publikationen und Patenten ist ein eindeutiges Zeichen für die Bedeutung von marinen Pilzen als Quelle für neue Naturstoffe. Aus den *in vitro* kultivierten Pilzen wurden bis Mitte 2010 über 1.000 Substanzen isoliert (Rateb & Ebel, 2011) (Abbildung 11). Zurzeit befindet sich davon nur eine einzige in der klinischen Testung (siehe Tabelle 1). Das Verhältnis entspricht also 1:1.000. Betrachtet man die Gesamtanzahl aller pharmakologisch relevanten Naturstoffe in klinischen Studien, die aus marinen Organismen isoliert wurden, kommt man auf 121 Substanzen. Stellt man dieser Zahl die Gesamtzahl aller isolierten Naturstoffe aus marinen Organismen gegenüber, kommt man auf Verhältnis von ungefähr 1:165 (Blunt *et al.*, 2012b; Gerwick & Moore, 2012). Vorausgesetzt marine Pilze besitzen das gleiche Potential zur Wirkstoffproduktion wie marine Organismen allgemein, sollte entsprechend der statistischen Verteilung der Fund eines neuen Wirkstoffes aus einem Pilz sehr wahrscheinlich sein.

Die erwähnte einzige Substanz ist das Zytostatikum Plinabulin (**10**). Plinabulin wird halbsynthetisch aus Halimide (**11**) in 15 Schritten hergestellt (siehe Abbildung 12). Halimide selbst wird aus dem Pilz *Aspergillus ustus* isoliert. Plinabulin ist ein Diketopiperazinderivat mit eventueller antineoplastischer Aktivität. Es zerstört selektiv die vaskuläre Tumorversorgung und den Tumor selbst durch Apoptose (Yakushiji *et al.*, 2011). Es befindet sich zurzeit in Phase II der klinischen Studien (Nerus Pharmaceuticals, Mai 2012).

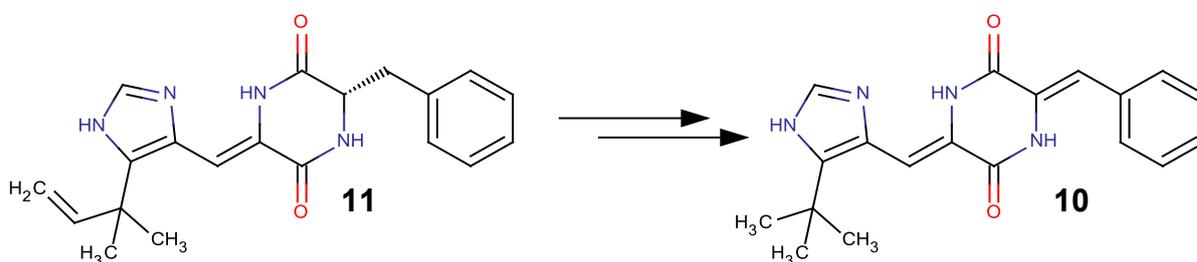


Abbildung 12: Reaktion von Halimide (*S*-(-)-Phenylahistin) (**11**) in 15 Schritten zu Plinabulin (**12**). Modifiziert nach Yakushiji *et al.* (2011).

Das Potential mariner Pilze für die Entdeckung neuer Naturstoffe ist hinlänglich bekannt, damit Plinabulin nicht das einzige erfolgreiche Beispiel bleibt, sind weitere Untersuchungen der marinen Pilze unerlässlich. Dabei hat sich die Herangehensweise gewandelt. Während man früher nacheinander große Mengen an biologischem Material (z.B. Schwämme, Algen, Wasser) extrahiert und Reinsubstanzen isoliert hat, werden heutzutage kleinste Mengen von Makroorganismen eingesammelt und im Labor die assoziierten Mikroorganismen untersucht (Bis zu 40 % der Biomasse von Schwämmen kann aus Mikroorganismen bestehen) (Proksch *et al.*, 2002). Sämtliche Mikroorganismen werden nach dem Vorbild der terrestrischen Wirkstoffforschung in Stammsammlungen unter optimalen Bedingungen konserviert. Auch

das Kieler Wirkstoff-Zentrum (KiWiZ) pflegt eine solche Stammsammlung und hat mit ca. 15.000 marinen Stämmen aus aller Welt eine der größten Stammsammlungen weltweit.

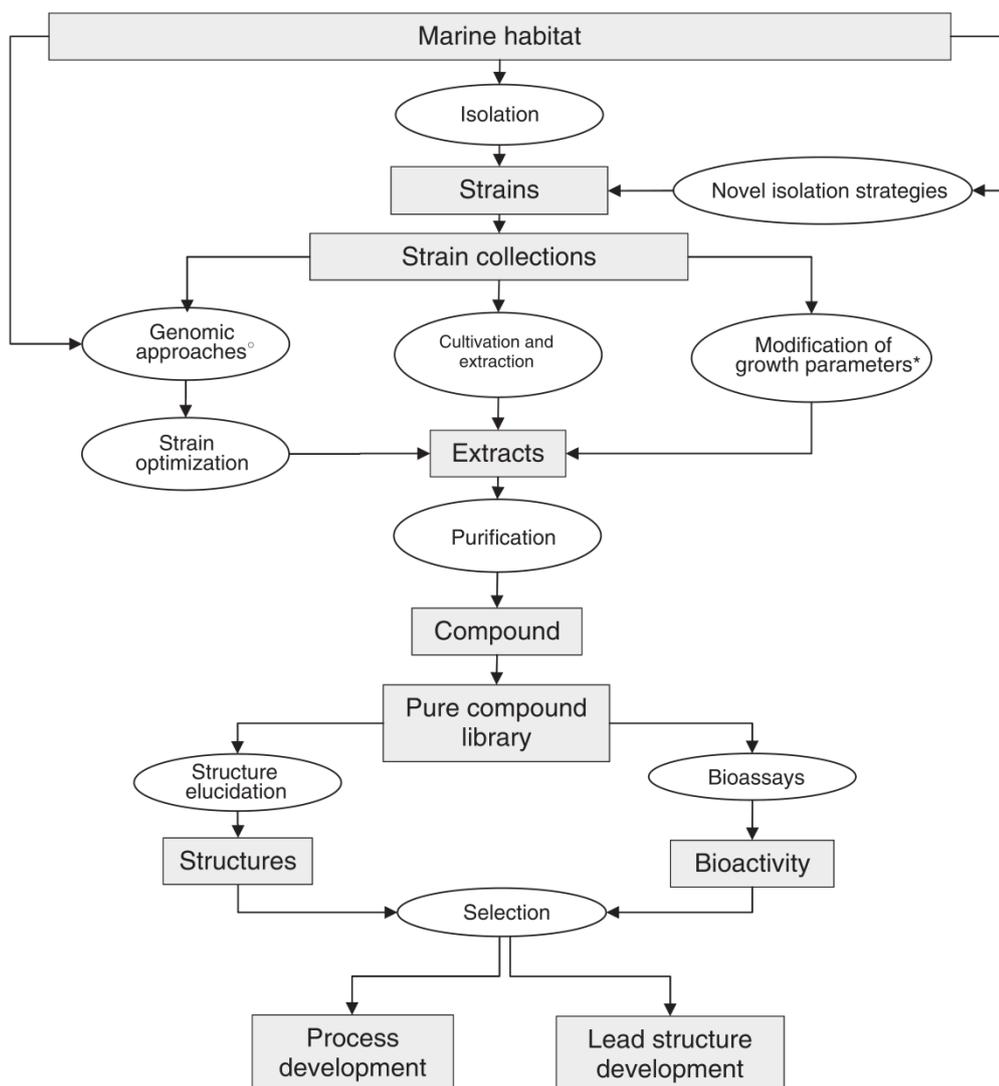


Abbildung 13: Fließdiagramm vom Habitat zur Reinsubstanz, die als Leitstruktur oder in der Prozessentwicklung verwendet werden. Nach diesem Schema wird im Kieler Wirkstoff-Zentrum am GEOMAR (KiWiZ) Aufklärung von Naturstoffen aus marinen Mikroorganismen zur nachhaltigen Produktion durchgeführt; ° Genomische Ansätze beinhalten Genome mining, Metagenomik, molekulare Manipulation von Mikroben, um die „silent gene cluster“ zu aktivieren; * Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Temperatur und Nährstoffe können verändert werden, zu dem können Stimulation, Kokultivierung und die Verwendung von epigenetischen Modulatoren die Zusammensetzung der Sekundärmetabolite beeinflussen; modifiziert nach Imhoff *et al.* (2011).

Aus dieser Stammsammlung werden bis zu hundert Stämme gleichzeitig kultiviert und in miniaturisierten Parallelansätzen nach dem o.g. Fließschema (Abbildung 13) auf ihre Sekundärmetabolitproduktion und Bioaktivität untersucht. Dabei sind drei Aspekte sehr wichtig:

- I. Kultivierungsparameter wie pH-Wert, Temperatur und Nährstoffe können verändert werden. Eine Stimulation, Kokultivierung oder die Verwendung von epigenetischen Modulatoren können die Zusammensetzung von Sekundärmetaboliten ebenso

beeinflussen. Diese Methode wird als OSMAC-Prinzip (One Strain – MAny Compounds) bezeichnet und es gibt viele Varianten der Durchführung (Bode *et al.*, 2002; Fischbach & Clardy, 2007; Imhoff *et al.*, 2011).

- II. Eine frühzeitige Dereplikation ist unentbehrlich, denn nur sie kann weitere kosten- und zeitintensive Schritte ersparen (Definition und Methodik siehe Kapitel 1.3).
- III. Ein breites Panel an Bioassays ist unerlässlich. Der gesamte Rohextrakt kann bereits als Einheit gegen Standardorganismen (wie z.B. auf antibiotischer Aktivität gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Bakterien) getestet werden. Die Reinsubstanzen aus der bioaktivitätsgesteuerte Isolierung können anschließend in weiteren Bioassays getestet werden, wie auf die Aktivität gegen Hefen, Pilze, spezifische Humanpathogene, Fisch-pathogene Mikroorganismen, sowie Enzymaktivitätstest und zellbasierte Assays (z.B. Krebszelllinien). Eine schnelle und frühzeitige Aussage über die Aktivität des Rohextraktes bzw. einzelner Rohsubstanzen ist damit möglich.

Durch die Verknüpfung von chemischem und biologischem Screening kann die weitere Isolierung, Fraktionierung und Charakterisierung von neuen bioaktiven Naturstoffen gut gesteuert werden.

Die beiden folgenden Beispiele illustrieren die erfolgreiche Durchführung dieses Schemas über die Isolierung von neuen Naturstoffen aus marinen Pilzen im KiWiZ. Erstens die Isolierung von Eutypoiden aus einem *Penicillium* sp., der aus einer Wasserprobe der Nordsee isoliert wurde. Der Stamm produzierte vier verschiedene neue Eutypoide, sowie das bekannte Diketopiperazin Fellutanin. Die vier Eutypoide zeigten inhibitorische Enzymaktivität gegen Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) im unteren μ M-Bereich (Schulz *et al.*, 2010). Zweitens die Isolierung und Strukturaufklärung von zwei neuen Cyclodepsipeptiden aus *Scopulariopsis brevicaulis*, welcher aus dem marinen Schwamm *Tethya aurantium* isoliert wurde. Die beiden neuen Cyclodepsipeptide, Scopularid A und B, wurden zusammen mit dem bekannten Naturstoff Paxillin isoliert. Scopularid A und B zeigten eine schwache Aktivität gegen Gram-positive Bakterien, aber eine signifikante Hemmung von drei Tumorzelllinien (Yu *et al.*, 2008).

1.3 Dereplikation

Eine Definition von Dereplikation ist: die Differenzierung neuer Metabolite von bekannten Verbindungen in einem Rohextrakt mit Naturstoffen (Blunt *et al.*, 2012a). Dafür werden chromatographische und spektroskopische Methoden verwendet und die Daten in Datenbanken abgeglichen (Nielsen *et al.*, 2011).

Bei der Suche nach neuen Naturstoffen ist es von großer Bedeutung, bekannte Verbindungen möglichst früh zu identifizieren. Eine Identifizierung sollte möglichst aus dem Rohextrakt erfolgen, um Mehrfachisolierungen von Naturstoffen zu vermeiden und somit Zeit und Kosten zu sparen (Berdy, 2005). Naturstoffe von Pilzen aus marinen Habitaten sind noch weitgehend unerforscht, jedoch kommen in ihren Extrakten häufig Metabolite vor, die bereits aus terrestrischen Pilzen beschrieben wurden. Eine erfolgreiche Dereplikation lässt sich heutzutage mit den modernen Mitteln der Technik bereits im Rohextrakt durchführen (Cordell & Shin, 1999; Fredenhagen *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2011; Smyth *et al.*, 2012). Im KiWiZ werden dafür die chromatographischen Methoden der High-Performance-Liquid-Chromatography (HPLC) verwendet. Zur Detektion von UV/VIS-Spektren wird ein Diode-Array-Detector (DAD), sowie zur Bestimmung der Molekülmasse ein Electron-Spray-Ionization-Massenspektrometer (ESI-MS) mit Ionenfalle verwendet. Die UV/VIS-Absorption liefert wichtige Informationen über das chromophore Zentrum und über die Anwesenheit von konjugierten Doppelbindungen (Larsen *et al.*, 2005). Ein Problem bleibt aber immer bestehen: Einige Naturstoffe absorbieren nicht oder nur extrem schwach im UV/VIS-Bereich und können somit mit der verwendeten Methode nicht derepliziert werden (Blunt *et al.*, 2012a).

Mit der Entwicklung der ESI-MS Spektroskopie vor ca. 20 Jahren können nun Naturstoffe schonend und sensitiv ionisiert werden. Bei positiver ESI treten hauptsächlich einfach protonierte und Natrium-Addukt Ionen auf, die gut detektiert und identifiziert werden können (Smedsgaard & Frisvad, 1996). Zusätzlich ist die Fragmentierungsrate bei dieser Ionisierungsmethode gering und Modifizierungen kommen hauptsächlich als $[M+H-H_2O]^+$, $[M+H-2(H_2O)]^+$, $[M+H-3(H_2O)]^+$ und $[M+H-CO_2]^+$ vor (Larsen *et al.*, 2005). Ein Nachteil dieser Ionisierung ist, dass einige Substanzklassen nicht oder nur unzureichend ionisiert werden. Darunter fallen Antrachinone (Phenole und Carbonyle in konjugierten Systemen akzeptieren keine positive Ladung) und kleine Moleküle mit einer Carboxylgruppe in Nachbarschaft zu einem konjugierten System (Nielsen *et al.*, 2011). Koppelt man die ESI mit einem hochauflösenden Massenspektrometer (z.B. microTOF II, Bruker) können mit einem Programm Summenformeln berechnet werden. Jedes Ergebnis wird dabei auf Plausibilität geprüft und gewichtet. Die Suche stützt sich nun nicht mehr nur auf eine ungefähre Masse, sondern auf eine explizite Summenformel. Zusätzlich sind Isotopenmuster mess- und auswertbar und können unter Umständen bei der Bestimmung der Summenformel einen entscheidenden Hinweis geben. Charakteristisch sind vor allen Dingen Isotopenmuster von Chlor, Brom und Schwefel (Pretsch *et al.*, 2000).

Aber auch hochauflösende Massenspektrometer können ein unzureichendes Ergebnis liefern (wegen starker Fragmentierung, Matrix-Effekte, etc.) bzw. die Dereplikation der Summenformel führt zu keinem Ergebnis. Als nächster Schritt zur vollständigen

Identifizierung bzw. Aufklärung der Struktur werden NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Experimente durchgeführt. Die Verwendung eines HPLC-NMR-Systems (Bobzin *et al.*, 2000) ist wegen des apparativen Aufwands und der Kosten eher selten anzutreffen. Mit einem HPLC-NMR-System ist es jedoch möglich, im stop-flow-Betrieb NMR-Spektren von Fraktionen direkt aus dem Rohextrakt zu messen (Bringmann *et al.*, 2002). Deutlich häufiger wird der Weg über Großansatz, präparative Aufarbeitung und Messung der Reinsubstanzen im NMR-Spektrometer genommen. Die Auswertung beider Methoden ist aber identisch und liefert aus 2D- und 3D-NMR-Spektren ausreichend Daten für eine Strukturaufklärung. Die Vorgehensweise bei der Strukturaufklärung ist gut von Rodríguez *et al.* (2012) und Mangoni (2012) beschrieben worden. Die Abbildung 14 versinnbildlicht die konventionelle Herangehensweise an die Dereplikation.

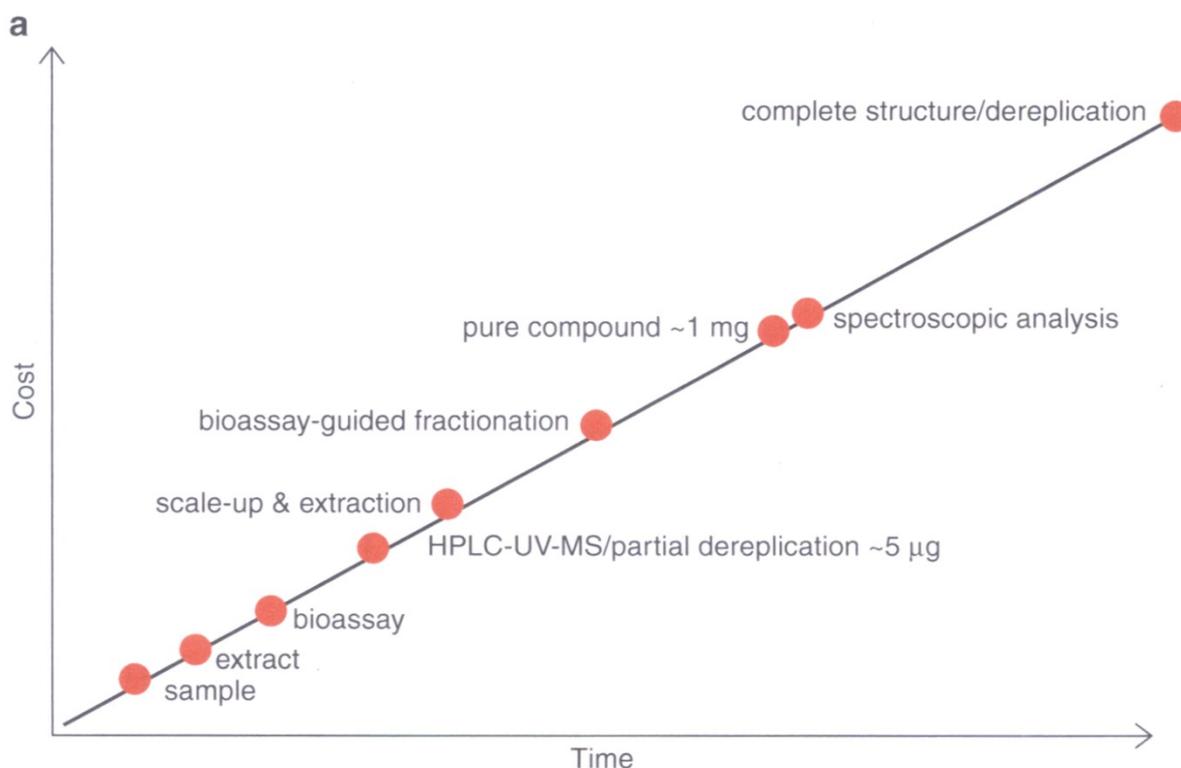


Abbildung 14: Konventioneller Ansatz zur Dereplikation von Naturstoffen. Gezeigt ist die Kosten-Zeit Korrelation einzelner Schritte auf dem Weg zur Strukturaufklärung von Reinsubstanzen (Blunt *et al.*, 2012a).

Die experimentell ermittelten Daten (UV/VIS-Absorption, Molekülmasse und Ergebnisse aus NMR-Experimenten) werden in kommerziellen Datenbanken [wie AntiMarine (Laatsch, 2006), Dictionary of natural products (DNP) (Blunt & Munro, 2011), SciFinder[®] (Scifinder, 2012), ISI Web of KnowledgeSM] sowie im KiWiZ mit einer hauseigene Datenbank abgeglichen und bewertet.

1.4 Epigenetische Modulatoren

Epigenetik wird heute definiert als die Untersuchung der erblichen Veränderungen in der Genomfunktion, die ohne eine Änderung der DNA-Sequenz auftreten (Esteller, 2008). Hauptsächlich ist dies die Veränderung der Chromatinstruktur, hervorgerufen durch DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen. Durch die Methylierung wird das Bindevverhalten der ablesenden Enzyme verändert und durch die Veränderung der Histone wird die räumliche Struktur des Chromatins abgewandelt, so dass in Konsequenz die Genexpressionsmuster verändert werden.

Vor allen Dingen die Modifikation der Kern-Histone, die als Gerüst bei der Aggregation fungieren, ist bei der Expression von einigen Genen von essenzieller Bedeutung (Biel *et al.*, 2005). Zu den häufigsten Modifikationen zählen Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung, aber auch die anderen Modifikationen steuern die Genexpression signifikant (Kouzarides, 2007; Cichewicz, 2010).

Die DNA-Methylierung in Pilzen beeinflusst einige vitale Funktionen (Antequera *et al.*, 1985; Goyon *et al.*, 1996; Hosny *et al.*, 1997), wozu die Veränderung der Gentranskription und Regulierung der Transkriptionsbrüche gehören (Rountree & Selker, 1997; Bird, 2002; Suzuki & Bird, 2008). Die Methylierungsrate in den Modelorganismen *Aspergillus flavus* und *Neurospora crassa* liegt bei 0,25 bis 1,5 % vom Gesamtcytosingehalt (Foss *et al.*, 1993; Gowher *et al.*, 2001), aber auch Werte bis 2,9 % sind vor allem in Sporen von *Phycomyces blakesleeanus* beobachtet worden (Antequera *et al.*, 1985). Methylierungen führen in der Regel zu einer verminderten Ableserate (Verdecken von Genen, Anlegen von „silent gene clusters“). Um die Methylierungsrate zu verändern, werden DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wie beispielsweise 5-Azacytidin (**12**) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (**13**) genutzt.

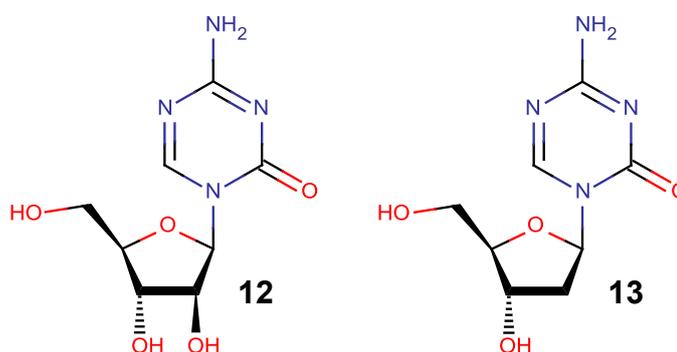


Abbildung 15: Die beiden DNA-Methyltransferase-Inhibitoren 5-Azacytidin (**12**) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (**13**)

Die beiden Substanzen werden während der Dereplikation der DNA und während der Transkription der RNA anstelle von Cytidin eingebaut. Die Methylierung an C-5 durch die DNA-Methyltransferasen ist aufgrund der Azagruppe nicht mehr möglich. In der Literatur sind

Versuche beschrieben, bei denen eine Zugabe von verschiedenen DNA-Methyltransferase-Inhibitoren zur Kultur eine Veränderung der Produktion von Sekundärmetaboliten zur Folge hatte (Cihák, 1974; Rountree & Selker, 1997; Fisch *et al.*, 2009; Cichewicz, 2010; Wang *et al.*, 2010). Dabei reichen bereits Konzentrationen der Inhibitoren im micromolaren Bereich. Beispielhaft sei hier die Veränderung beim gut untersuchten Modellorganismus *N. crassa* erwähnt (Tamaru & Selker, 2001; Selker *et al.*, 2002; Selker *et al.*, 2003; Tamaru *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2008).

Zu einer Kultur von *N. crassa* wurden 30 µM 5-Azacytidin hinzugegeben und die Produktion der Karotinoide nahm signifikant zu. Bei höheren Konzentrationen (100 und 300 µM) verringerte sich die Produktion knapp unter das Niveau ohne Zusatz und veränderte ebenfalls die Reproduktionsstruktur des Organismus (Kritsky *et al.*, 2001). Eine Veränderung der Zusammensetzung der Sekundärmetabolite konnte nicht beobachtet werden. Dies wurde jedoch bei *Cladosporium cladosporioides* durch Zugabe von 5-Azacytidin beobachtet werden. Der Pilz produzierte nur in den epigenetisch veränderten Kulturen Oxylipide (Cichewicz, 2010).

1.5 Ziel und Struktur der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entdeckung von neuen bioaktiven Substanzen aus marinen Pilzen nach rationaler Auswahl aus einer Stammsammlung. Dabei wurde nach der Methode „test and then isolate“ (Gerwick & Moore, 2012) bzw. bioaktivitätsgesteuerte Isolierung von Naturstoffen (Harvey, 2008) vorgegangen. Aus der hauseigenen Stammsammlung wurden dazu marine filamentöse Pilze ausgewählt, für die bereits Bioaktivitätsdaten von Rohextrakten der Kulturen vorlagen.

Die Kriterien zur Auswahl der Pilzstämme waren:

- In der Literatur relativ unbekannte Spezies
- Im Rohextrakt mindestens eine starke antibiotische Aktivität in einem von neun Bioassays
- Stämme aus „Hotspot“-Regionen (Abbildung 2) wurden bevorzugt

Die ausgewählten Stämme wurden auf folgende Punkte untersucht:

- Dereplikation von bekannten Substanzen und Strukturaufklärung von neuen Substanzen zur Beschreibung des Sekundärmetabolitspektrums.
- Veränderbarkeit der Produktion von Sekundärmetaboliten, insbesondere der Veränderung der Zusammensetzung des Metabolitspektrums, mittels der OSMAC-Strategie von Bode *et al.* (2002).

Mittels dieser Untersuchungen sollen aus einer großen Auswahl möglichst rational Stämme gefunden werden, die ein besonders großes Potential zur Entdeckung neuer bioaktiver Substanzen haben. Daher beschäftigt sich abschließend das Kapitel 4 mit dem Schwamm-assoziierten Pilz *Bartalinia robillardoides*. Aus diesem Stamm konnten neue Naturstoffe isoliert werden. Dabei wurden folgende Aspekte untersucht:

- Welche isolierte Substanz zeigt welche Bioaktivität? Gibt es zytostatisches Potential? In welchen Bereichen liegen die IC_{50} -Werte ausgewählter Bioassays?
- Kann die absolute Stereochemie der Substanzen durch Circular Dichroismus (CD)-Spektroskopie und NMR-Experimente ermittelt werden?
- Sind Helicusin A-methylester und Isochromophilon X biosynthetische Metabolite oder Produkte einer semisynthetischen Reaktion?
- Kann die Produktion der Sekundärmetabolite durch die Zugabe eines epigenetischen Modulators effektiv verändert werden?

Die Hoffnung für die Entdeckung neuer Naturstoffe ruht auf dem Verhalten der Pilze unter Laborbedingungen. Denn wenn die Pilze ihr volles Potential ausschöpfen, steigt die Wahrscheinlichkeit, neue Naturstoffe zu isolieren. Um dieses Potential zu stimulieren, können verschiedenste Techniken verwendet werden. Aber auch die verwendeten Methoden für die Anzucht bis zur Darstellung der Reinsubstanzen müssen optimiert sein, um ein breites Spektrum an Metaboliten zu detektieren und zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien und Puffer

Alle Medien wurden mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) angesetzt. Für die Verwendung als Festmedium wurden jeweils 15,0 g Bacto™ Agar pro Liter hinzugegeben. Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt. Die Medien wurden bei feuchter Hitze, 120 °C, 1 bar, 20 min autoklaviert.

Malzextrakt (2,0 % ME)

20,0 g Malzextrakt
1,0 L VE-Wasser
pH 4,5 – 4,9

Malz-Hefe-Medium (MH)

30,0 g Malzextrakt
5,0 g Hefeextrakt
1,0 L VE-Wasser

Malzextrakt mit NaCl (ME)

20,0 g Malzextrakt
17,0 g Natriumchlorid
1,0 L VE-Wasser
pH 4,5 – 4,9

Malzextrakt mit Tropic Marine (ME+TM)

20,0 g Malzextrakt
17,0 g Tropic Marine Salt
1,0 L VE-Wasser
pH 4,5 – 4,9

Modifiziertes Wickerham-Medium (WSP30)

3,0 g Hefeextrakt
3,0 g Malzextrakt
5,0 g Pepton aus Sojamehl
10,0 g D-Glucose-Monohydrat
30,0 g Natriumchlorid
1,0 L VE-Wasser
pH 6,0 – 6,5

WSP30 mit Tropic Marine (WSP30+TM)

3,0 g	Hefeextrakt
3,0 g	Malzextrakt
5,0 g	Pepton aus Sojamehl
10,0 g	D-Glucose-Monohydrat
30,0 g	Tropic Marine Salt
1,0 L	VE-Wasser
pH 6,0 – 6,5	

Hafer-Medium

20,0 g	Haferkleie
1,0 L	VE-Wasser
pH 7,0	

Potato-Glucose-Medium (PDA)

4,0 g	Kartoffelextrakt
20,0 g	D-Glucose-Monohydrat
1,0 L	VE-Wasser

Potato-Carrot-Medium

10,0 g	frisch geriebene Bio-Karotte
10,0 g	frisch geriebene Bio-Kartoffel
1,0 L	VE-Wasser

M90-Medium

30,0 g	Malzextrakt
3,0 g	Pepton aus Sojamehl
1,0 L	VE-Wasser
pH 5,6	

M186-Medium

3,0 g	Malzextrakt
3,0 g	Hefeextrakt
5,0 g	Pepton aus Sojamehl
10,0 g	D-Glucose-Monohydrat
1,0 L	VE-Wasser

Roggen-Medium

50,0 g	Roggenvollkornmehl
5,0 g	D-Glucose-Monohydrat
500 µL	Vitamin B1-Lösung (1 mg/mL)
1,0 L	VE-Wasser
pH 6,5	

GYM4-Medium

4,0 g	D-Glucose-Monohydrat
4,0 g	Malzextrakt
4,0 g	Hefeextrakt
2,0 g	Calciumcarbonat
1,0 L	VE-Wasser
pH 7,2	

Soja-Pepton-Mannit-Medium (SM)

20,0 g	Pepton aus Sojamehl
20,0 g	D(-)-Mannit
30,0 g	Natriumchlorid
1,0 L	VE-Wasser

Soja-Pepton-Mannit-Medium mit Tropic Marine (SM+TM)

20,0 g	Pepton aus Sojamehl
20,0 g	D(-)-Mannit
30,0 g	Tropic Marine Salt
1,0 L	VE-Wasser

Malz-Hefe-Medium (MYA)

3,0 g	Hefeextrakt
3,0 g	Malzextrakt
5,0 g	Bacto™ Pepton
10,0 g	D-Glucose-Monohydrat
1,0 L	VE-Wasser

Malz-Hefe-Glucose-Medium (MYG)

0,4 g	Hefeextrakt
1,0 g	Malzextrakt
0,4 g	D-Glucose-Monohydrat
1,0 L	VE-Wasser
pH 5,6	

Marine Broth (MB)

37,4 g Marine Broth
1,0 L VE-Wasser
pH 7,4 - 7,8

Sabouraud-Medium

1,0 g Bacto™ Pepton
2,0 g D-Glucose-Monohydrat
1,0 L VE-Wasser
pH 5,6

Erbsen-Medium

150 g gekochte Erbsen
5,0 g D-Glucose-Monohydrat
0,1 mg Thiamin
1,0 L VE-Wasser
pH 5,6

PBS-Puffer

8,0 g Natriumchlorid
0,2 g Kaliumchlorid
1,4 g Na₂HPO₄
0,2 g KH₂PO₄
1,0 L VE-Wasser
pH 7,4

2.2 Vor-Screening-Ansätze für die Identifizierung von Naturstoffen

Hier wird das standardisierte Vorgehen für die Vor-Screening-Ansätze beschrieben. Sollte es bei den untersuchten Stämmen Abweichungen geben, werden diese im Ergebnisteil bei dem jeweiligen Stamm erwähnt.

Für einen Vor-Screening-Ansatz wurde für je einen Stamm ein 100 mL Erlenmeyerkolben verwendet. In dem Erlenmeyerkolben wurden 20 mL WSP30-Medium vorgelegt, autoklaviert und mit 0,25 cm² gut angewachsener Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde zuerst 7 Tage bei 28 °C und 120 rpm geschüttelt und dann weitere 14 Tage bei 28 °C im Stand inkubiert. Nach insgesamt 21 Tagen im Dunkeln wurden 20 mL Ethylacetat (EtOAc) hinzugegeben und mit dem Ultra-Turrax bei 16.000 U/min solange durchgemixt, bis ein homogenes Gemisch entstand. Anschließend wurde das Kultur-Lösungsmittel-Gemisch in ein Falcon-Tube überführt und bei 4.700 rpm 10 min zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen, in ein Zentrifugenglas überführt und in der SpeedVac bei 40 °C und ca. 100 mbar bis zur Trockne eingengt. Der Niederschlag wurde mit 500 µL resuspendiert und durch einen 0,2 µm PTFE-Filter in ein HPLC-Vial filtriert. Ein Aliquot von 15 µL wurde in der HPLC-DAD/MS chromatographisch aufgetrennt und die UV/VIS-Absorption, sowie die Molekülmasse gemessen. Der nicht verwendete Teil des Rohextraktes wurde für die Bioaktivitätstestungen verwendet (siehe Kapitel 2.12.1).

2.3 Herstellung der Extrakte von Großansätzen

Hier wird das standardisierte Vorgehen für die Kultivierung und Extraktion von Großansätzen beschrieben. Sollte es bei den untersuchten Stämmen Abweichungen geben haben, werden diese im Ergebnisteil bei dem jeweiligen Stamm erwähnt.

Die Anzucht des jeweiligen Stammes erfolgte in 10 L Kulturmedium. Das Medium wurde in zehn 2 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane aufgeteilt. Für die Inokulation wurde jeweils ¼ Agarplatte verwendet, die gut mit der Pilzkultur bewachsen war. Die Erlenmeyerkolben mit der Kulturbrühe wurden 21 Tage lang bei 28 °C kultiviert. Die Kultivierung wurde bei dem Großteil der Ansätze als Standkultur durchgeführt. Zeigte ein Pilz in der Schüttelkultivierung ein besseres Wachstum, so wurde der Ansatz bei 28 °C und 120 rpm in zehn 2 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane kultiviert.

Nach 3 Wochen wurde der Inhalt der Erlenmeyerkolben extrahiert. Bei Standkulturen wurden der Kulturüberstand (KÜ) und das Mycel getrennt voneinander extrahiert. Bei Schüttelkulturen wurde jeweils ein Erlenmeyerkolben analog der Vorgehensweise wie beim KÜ von Standkulturen extrahiert.

Jeweils 1 L KÜ wurde mit 400 mL EtOAc überschichtet und ca. 30 s lang kräftig geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde die Kulturbrühe verworfen und die organische Phase mit 100 mL VE-Wasser gewaschen. Die organischen Phasen wurden im Rundkolben vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Der Niederschlag wurde mit Methanol (MeOH) suspendiert und in ein Braunglasvial überführt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C mittels Stickstoff verdampft und das Gewicht des Rohextraktes bestimmt. Der trockene Rohextrakt lagerte bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung.

Das Mycel aus den Erlenmeyerkolben wurde jeweils in ein Becherglas überführt und mit 150 mL 96 %igem Ethanol überschichtet. Das Gemisch wurde mit einem Ultra-Turrax bei 16.000 U/min homogenisiert, bis eine Suspension entstand. Der Niederschlag wurde bei 4.000 rpm 10 min in der Zentrifuge separiert und anschließend wurde die organische Phase dekantiert. Das Lösungsmittel der vereinigten organischen Phasen wurde im Vakuum entfernt. Der Niederschlag wurde mit MeOH suspendiert und in ein Braunglasvial überführt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C mittels Stickstoff verdampft und das Gewicht des Rohextraktes bestimmt. Der trockene Rohextrakt lagerte bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung.

2.4 Aufarbeitung der epigenetischen Ansätzen

Der Stamm LF550 wurde auf ME 2 % Festmedium als Vorkultur angezogen, bis die Platte gut bewachsen war. Es wurden in sechs 2 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane jeweils 1 L 2 % ME-Medium vorgelegt und mit jeweils ¼ Agarplatte inokuliert. Die Erlenmeyerkolben mit der Kulturbrühe wurden zuerst sechs Tage lang bei 22 °C und 120 rpm kultiviert. Anschließend wurde zu den Kulturen eine wässrige 5-Azacytidin Lösung gegeben, so dass zwei Kolben 50 µM, zwei Kolben 5 µM und zwei Kolben keinen Zusatz enthielten. Die Kolben wurden unter den gleichen Bedingungen weitere 18 Tage lang kultiviert. Anschließend wurden alle Kolben einzeln extrahiert. Dazu wurde ein Kolbeninhalt mit 500 mL EtOAc überschichtet und mit einem Ultra-Turrax gut homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 5.000 rpm 10 min lang zentrifugiert und anschließend abdekantiert. Die organischen Phasen wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das Trockengewicht wurde bestimmt und dann mit 1 mL MeOH gelöst. 10 µL der methanolischen Lösung wurden in 990 µL MeOH verdünnt und anschließend ein Aliquot von 15 µL in das analytische HPLC-System injiziert. Das Zellmaterial wurde ebenfalls im Vakuum bis zur Trockne gefriergetrocknet und gewogen.

2.5 Aufreinigung der Extrakte

Bei einigen Rohextrakten war es notwendig, die Probe vor der chromatographischen Fraktionierung zu entfetten. Dazu wurde der trockene Rohextrakt mit wenig MeOH gelöst und anschließend mit wenig n-Hexan überschichtet. Das Vial wurde kurz geschüttelt und die Phasentrennung abgewartet. Die n-Hexan-Phase wurde mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Der Vorgang wurde wiederholt und anschließend die methanolische Phase bei 40 °C mittels Stickstoff verdampft. Der trockene Rohextrakt lagerte bei 4 °C bis zur weiteren Aufarbeitung.

2.6 Chromatographie

Wasser für die Chromatographie wurde über eine Milli-Q-Anlage (Millipore) gereinigt und entionisiert. Acetonitril (ACN) und Methanol (MeOH) hatten die Reinheitsstufe HPLC Gradient Grade. Alle Lösungsmittel wurden durch Verwendung einer mechanischen Online-Entgaser-Einheit entgast.

2.6.1 Analytische HPLC-DAD/MS

Für die Analyse des Rohextraktes und zur Feststellung von Reinheitsgrad, UV/VIS-Absorption und Molekülmasse wurden die entsprechenden Proben mit einem gekoppelten System bestehend aus HPLC mit DAD und MS gemessen. Zur Vorbereitung wurden die Proben in MeOH gelöst, durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert und mit MeOH auf eine Endkonzentration von ca. 0,1 mg/mL verdünnt. Für die Analyse wurden 15 µL der Probe in die HPLC-DAD/MS injiziert. Die chromatographische Auftrennung erfolgte per monolithischer Umkehrphase (Reversed Phase: RP) an einer unpolaren stationären Phase, die als lipophile Alkylreste Octadecylgruppen trug (Phenomenex, Onyx monolithic C₁₈, 100 x 3.0 mm, endcapped). Die mobile Phase bestand aus einem Zweikomponenten-Gradienten: Milli-Q-Wasser und ACN, jeweils angesäuert auf 0,1 % Ameisensäure; Gradient: 0 min 5 % ACN, 4 min 60 % ACN, 6 min 100 % ACN; Fluss 2,0 mL/min. Der Säulenofen war stets auf 40 °C temperiert.

LaChrom Elite, VWR-Hitachi:

Organizer

Diode Array Detector L-2450

Column Oven L-2300

Autosampler L-2200

Pump L-2130

Steuer- und Auswertesoftware: Hystar und Hystar Post Processing, Bruker

Die Molekülmassen wurden mit einem ESI-Ionenfallen-Detektor gemessen. Die Messung fand im Positiv-Modus statt, womit es primär zur Bildung von Monomer-Ionen ($[M+H]^+$, $[M+Na]^+$) kam. Seltener wurden Dimer-Ionen ($[2M+H]^+$, $[2M+Na]^+$) und Kalium-Addukte ($[M+K]^+$) gebildet. Für die Messung lag eine Spannung von 3500 V an. Stickstoff wurde zum einen als Verneblergas mit 2,7 bar eingesprüht und zum anderen als Trockengas mit 9 L/min und 350 °C in die Verneblerkammer eingeleitet.

Das Massenspektrometer (analytisch) bestand aus folgenden Komponenten:

esquire4000, Bruker

Steuer- und Auswertesoftware: esquireControl und DataAnalysis, Bruker

Nitrogen Gas Generator LCMS 30-0, Dornick Hunter

Kompressor DK50 2x2V/110, Ekom Air

Vakuumpumpe DS402, Varian

Fraktionssammler Foxy Jr., ISCO

2.6.2 Präparative LC-UV/VIS

Ausgewählte Extrakte wurden mit der präparativen LC (Liquid Chromatography)-UV/VIS chromatographisch aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurde der Niederschlag in MeOH gelöst und durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert. Das System war aus den unten aufgeführten Komponenten aufgebaut. Die mobile Phase bestand aus einem Zweikomponenten-Gradienten (Milli-Q-Wasser und ACN, jeweils angesäuert auf 0,1 % Ameisensäure) und wurde je nach Extrakt variiert. Die Fließgeschwindigkeit war stets 100 mL/min. Die Trennung erfolgte per Umkehrphasen (RP)-Chromatographie auf einer Gemini-NX 10u C₁₈ (100 Å, Axia-packed, 100 x 50,00 mm, Phenomenex) Säule, die bei Raumtemperatur (22 °C) verwendet wurde. Die Wellenlänge am Detektor wurde so gewählt, dass möglichst viele Substanzen detektiert werden konnten. Das Lösungsmittel aller produkthaltigen Fraktionen wurde im Vakuum entfernt. Der Niederschlag wurde mit MeOH suspendiert und in Braunglasvials überführt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C mittels Stickstoff getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

LC-Anlage (präparativ 1):

LaPrep, VWR International:

Pumpe: P311

UV/VIS-Detektor: P110

Smartline Autosampler 3900, Knauer

Dynamic Mixing Chamber, Knauer

Fraktionssammler: Labocol Vario2000, Labomatic

Steuer- und Auswertesoftware: EZChrom Elite, VWR International

2.6.3 Semi-Präparative HPLC-DAD

Ausgewählte Extrakte sowie ausgewählte Fraktionen von der präparativen LC-UV/VIS wurden an der semi-präparativen HPLC-DAD zu Reinsubstanzen chromatographisch aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurde der Niederschlag in MeOH gelöst und durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert. Das System war aus den unten aufgeführten Komponenten aufgebaut. Die mobile Phase bestand aus einem Zweikomponenten-Gradienten (Milli-Q-Wasser und ACN, jeweils angesäuert auf 0,1 % Ameisensäure) und wurde je nach Extrakt variiert. Die Trennung erfolgte per RP-Chromatographie auf einer Gemini-NX 5u C₁₈ (100 Å, Axia-packed, 100 x 21,20 mm, Phenomenex) Säule oder per Normalphasen (NP)-Chromatographie auf einer Kieselgel Säule (Luna Silica 5u, 100 Å, 250 x 10.00 mm, Phenomenex), die jeweils bei Raumtemperatur (22 °C) verwendet wurden. Das Lösungsmittel aller produkthaltigen Fraktionen wurde im Vakuum entfernt. Der Niederschlag wurde mit MeOH suspendiert und in Braunglasvials überführt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C mittels Stickstoff getrocknet und anschließend bei 4 °C gelagert.

HPLC-Anlage (präparativ 2):

LaChrom Elite, Merck-Hitachi:

Organizer

Diode Array Detector L-2450

Autosampler L-2200

externe Pumpe L-7150, VWR-Hitachi

Steuer- und Auswertesoftware: EZChrom Elite, VWR International

2.7 Dereplikation

Die erhaltenen Daten (UV/VIS-Absorption, Molekülmasse, Summenformel und NMR-Spektren) wurden mit den Datenbanken Antibase (Laatsch, 2007), Dictionary of Natural Products (Blunt & Munro, 2011) und der hausinternen Datenbank abgeglichen, um möglichst frühzeitig bekannte Substanzen zu dereplizieren.

2.8 NMR-Spektroskopie und optische Rotation

Sämtliche NMR-Experimente wurden in der spektroskopischen Abteilung des Otto Diels-Institut an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel gemessen. Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance 600 Spektrometer (600 MHz und 150 MHz) mit Cryoprobenkopf oder mit einem Bruker DRX500 (500 MHz und 125 MHz) aufgenommen. Die Restprotonen-

bzw. Restkohlenstoffsignale des jeweiligen deuterierten Lösungsmittels wurden als Referenz verwendet.

Die Messungen für die optische Rotation der Reinsubstanzen wurden ebenfalls am o.g. Institut gemessen. Es wurde ein Polarimeter Model 241 (Perkin-Elmer) verwendet.

2.9 CD-Spektroskopie

Die Messungen und die Auswertung der CD-Daten wurden an der Universität Würzburg, Institut für organische Chemie, AG Prof. Dr. Bringmann, von Dr. Torsten Bruhn, Yasmin Hemberger und Franziska Witterauf durchgeführt. Die CD-Spektren wurden auf einem JASCO J-715 Circular Dichroism Spectropolarimeter gemessen. MeOH wurde als Lösungsmittel verwendet.

2.10 HRESI-MS-Spektroskopie

Zur Bestimmung der exakten Molekülmasse wurde ein Benchtop-Time-of-Flight Massenspektrometer verwendet. Alle Proben wurden als Reinsubstanzen mittels Direktinjektion analysiert. Die entsprechenden Proben wurden mit MeOH gelöst, durch einen 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter filtriert und mit MeOH auf eine Endkonzentration von 0,05 mg/mL verdünnt. Die Kalibrierung des Massenspektrometers wurde mit einer Natriumformiat-Lösung (5 mM NaOH, 0,2 % Ameisensäure in Isopropanol:Milli-Q-Wasser (1:1, v/v)) durchgeführt. Die Kalibrierlösung wurde mit einer Spritzenpumpe (Fließgeschwindigkeit 5 µL/min) injiziert. Die Probe wurde mittels Spritzenpumpe ebenfalls mit 5 µL/min injiziert. Stickstoff wurde als Verneblergas bei einem Druck von 0,8 bar eingesprüht, sowie als Trocknungsgas mit 5 L/min und 200 °C eingeleitet. Die Moleküle wurden mit einer Spannung von 5.000 V positiv ionisiert und beschleunigt. Die Detektion fand im Massenbereich von 50-1.000 m/z statt.

Hochauflösendes Massenspektrometer (exakte Masse):

MicrOTOF II, Bruker

Steuer- und Auswertesoftware: microOTOFcontrol und DataAnalysis, Bruker

Nitrogen Gas Generator LCMS 30-0, Dornick Hunter

Kompressor DK50 2x2V/110, Ekom Air

Vakuumpumpe HS602, Varian

Für die chromatographische Auftrennung und Messung von mehreren Stereoisomeren wurde ein gekoppeltes System aus HPLC-DAD und HRESI-MS verwendet. Das System war aus unten aufgeführten Komponenten aufgebaut. Die mobile Phase bestand aus einem

Zweikomponenten-Gradienten (Milli-Q-Wasser und ACN, jeweils angesäuert auf 0,1 % Ameisensäure) und wurde je nach Extrakt variiert. Die Fließgeschwindigkeit der Eluenten betrug 1,5 mL/min. Die Trennung erfolgte per chiraler RP-Chromatographie auf einer LUX 5u Amylose-2 (Stationäre Phase: Amylose-tris(5-chloro-2-methylphenylcarbamate), 1.000 Å, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) Säule und auf einer LUX 5u Cellulose-1 (Stationäre Phase: Cellulose-tris(3,5-dimethylphenylcarbamate), 1.000 Å, 250 x 4,6 mm, Phenomenex) Säule, die jeweils auf 40 °C temperiert wurde. Die Messung erfolgte mit den oben genannten Parametern, außer dass die Proben mit 300 µL/min injiziert wurden.

HPLC-Anlage (exakte Masse):

LaChrom Elite, VWR-Hitachi:

Organizer

Diode Array Detector L-2455

Column Oven L-2300

Autosampler L-2200

Pump L-2130

Steuer- und Auswertesoftware: microTOFcontrol und Hystar, Bruker

2.11 UV/VIS-Spektroskopie

Alle UV/VIS-Spektren der Proben wurden mit einem OceanOptics Spektrometer im Wellenlängenbereich von 200 bis 1.000 nm gemessen. Die Spektren wurden bei 700 nm auf null kalibriert und das methanolische Referenzspektrum abgezogen. Die Konzentration der Lösungen betrug jeweils 0,02 mg/mL. Integrationszeit: 50 ms, Scans zur Mittelwertbildung: 20, Pixel Boxcar Width: 10. Der Extinktionskoeffizient wurde über drei Messungen gemittelt. Das Spektrometer bestand aus folgenden Komponenten:

Spektrometer, OceanOptics Inc.:

Lichtquelle: Micropak DT-Mini-2-GS

Detektor: USB4000

Optische Faser: QP400-025-SR

Absorptionszelle: 100-QS, 10,00 mm, Hellma GmbH & Co. KG

2.12 Bioassays

Alle Rohextrakte der Vorscreening-Ansätze wurden in neun verschiedenen antibiotischen Bioassays auf ihre inhibierende Wirkung bei 50 µg im Test getestet. Ausgesuchte Reinsubstanzen wurden zusätzlich in weiteren Bioassays getestet.

Alle Reinsubstanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und auf eine 10 mM Lösung verdünnt. Die Substanzen wurden in eine 96-well-Platte pipettiert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt.

2.12.1 Antibiotische Bioassays

Die Bioassays mit *Bacillus subtilis* (B.s.), *Staphylococcus lentus* (S.l.), *Xanthomonas campestris* (X.c.) und *Candida albicans* (C.a.) wurden wie bei Schulz *et al.* (2011) beschrieben durchgeführt. Die Bioassays mit den Testorganismen *Escherichia coli* (E.c.) wurden analog zu *B. subtilis* durchgeführt. Die Bioassays mit den Testorganismen *Pseudomonas fluorescens* (P.fl.), *Erwinia amylovora* (E.a.) und *Ralstonia solanacearum* (R.s.) wurden analog zu *C. albicans* durchgeführt, jedoch mit Chloramphenicol als Positivkontrolle.

2.12.2 Bioassays auf Wirkung gegen Phytopathogene

Septoria tritici

S. tritici (BASF, Deutschland) wurde in MYG-Medium für vier Tage angezogen, anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0,03 verdünnt und in die 96-well-Platte pipettiert, so dass eine Endkonzentration der Reinsubstanzen von 100 µM vorlag. Nach einer Inkubation von 48 Stunden bei 20 °C wurden 10 µL einer Resazurinlösung (0,2 mg/mL PBS-Puffer) in jedes Well pipettiert und weitere 5-30 min inkubiert. Die Vitalität der Organismen wurde anhand der reduktiven Umsatzrate von Resazurin zu Resorufin bestimmt, indem die Absorption bei 600 nm (Referenz 690 nm) gemessen wurde. Die Werte wurden mit einer Positiv- (0,5 µM Boscalid) und einer Negativkontrolle (keine Substanz) verglichen.

Trichophyton rubrum

Für die Inokulation wurden 5x10⁴ Sporen/mL des Pilzstammes *T. rubrum* (Universitäts-Hautklinik Kiel, Deutschland) in Sabouraud-Medium verdünnt, in die 96-well-Platte pipettiert, so dass eine Endkonzentration der Reinsubstanzen von 100 µM vorlag. Nach 72 Stunden bei 28 °C wurden 10 µL einer Resazurinlösung (0,2 mg/mL PBS-Puffer) in jedes Well pipettiert und weitere 5-30 min inkubiert. Die Vitalität der Organismen wurde anhand der reduktiven Umsatzrate von Resazurin zu Resorufin bestimmt, indem die Absorption bei

600 nm (Referenz 690 nm) gemessen wurde. Die Werte wurden mit einer Positiv- (0,5 μM Clotrimazol) und einer Negativkontrolle (keine Substanz) verglichen.

Phytophthora infestans

Für die Inokulation wurden 10^4 Sporen/mL des Pilzstammes *P. infestans* (BASF, Deutschland) in Erbsen-Medium verdünnt, in die 96-well-Platte pipettiert, so dass eine Endkonzentration der Reinsubstanzen von 100 μM vorlag. Nach 72 Stunden bei 20 °C wurden 10 μL einer Resazurinlösung (0,2 mg/mL PBS-Puffer) in jedes Well pipettiert und weitere 5-30 min inkubiert. Die Vitalität der Organismen wurde anhand der reduktiven Umsatzrate von Resazurin zu Resorufin bestimmt, indem die Absorption bei 600 nm (Referenz 690 nm) gemessen wurde. Die Werte wurden mit einer Positiv- (0,5 μM Cycloheximide) und einer Negativkontrolle (keine Substanz) verglichen.

2.12.3 Enzyminhibitionsassays

Die Enzyminhibitionsassays gegen die Enzyme Phosphodiesterase 4 (PDE4) und Acetylcholinesterase (AChE) wurden durchgeführt wie bei Schulz *et al.* (2011) und Kim *et al.* (2011) beschrieben.

2.12.4 Zytotoxizitätsassays

Zur Bestimmung der Sensitivität der Zelllinien KIF5 und HepG2 gegen eine Reinsubstanz wurde die metabolische Aktivität mit dem CellTiterBlue Cell Viability Assay (Promega) gemessen. Die menschlichen Fibroblastzellen (KIF5) wurden vom Institut für Experimentelle Tumorforschung im Krebszentrum Nord – CCC, Sektion für Molekulare Onkologie, UKSH Kiel bereitgestellt. Die menschlichen hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) erworben. Die Zytotoxizitätsassays wurden wie bei Schulz *et al.* (2011) beschrieben durchgeführt, abgesehen von der Zellkonzentration, die bei 5.000 Zellen pro Vial für KIF5 und 10.000 Zellen pro Vial für HepG2 lagen.

2.13 Chemische Synthesen

2.13.1 Darstellung von Isochromophilon X

Die Synthese wurde durchgeführt wie bei Wei und Yao (2005) beschrieben.

Es wurden 11,00 mg (0,023 mM) Helicisin A in 1,15 mL Dichlormethan gelöst. Anschließend wurden 1,55 μL (0,026 mM) 2-Aminoethanol hinzugegeben und das Reaktionsgefäß kurz geschwenkt. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur innerhalb von wenigen Minuten ab.

2.14 Chemikalien

2-Aminoethanol	Fluka
5-Azacytidin	Fluka
Acetonitril, HPLC Gradient Grade	VWR Prolabo
Aluminiumoxide, activated basic, standard grade, ~150 mesh, 58 Å	Sigma-Aldrich
Ameisensäure für Massenspektrometrie	Fluka
Bacto™ Agar	BD
Bacto™ Hefeextrakt	BD
Bacto™ Malzextrakt	BD
Bacto™ Pepton	BD
Chloroform- <i>d</i> 6, 99,8 Atom % D	Aldrich
D(-)-Mannit für die Mikrobiologie	Merck
D(+)-Glucose-Monohydrat für Mikrobiologie	Merck
Dichlormethan	Roth
Dimethylsulfoxid für Zellkultur	AppliChem
Ethanol 99 %, vergällt	Walter CMP
Ethylacetat, PESTANAL	Fluka
Haferkleie	BioGreno
Helium N50, 99,999 %	Air Liquid
Isopropanol ≥99,8 % p.a., ACS,ISO	Roth
Kartoffel-Extrakt	Fluka
Marine Broth	Difco
Methanol, HPLC Gradient Grade	J.T. Baker
Methanol- <i>d</i> 4, 99,8 % Atom D	Roth
Natriumchlorid, 99,8 %	Roth
Natriumhydroxid >99 %, p.a., ISO	Roth
n-Hexan, Rotisolv HPLC	Roth
Pepton aus Sojabohnenmehl, papainisch verdaut für die Mikrobiologie	Merck
Salzsäure, 32 % reinst	Carl Roth
Tropic Marine Salt	Knutzen
Wasser/Isopropanol 1:1 (v/v), Chromosolv, LC-MS	Fluka

3 Ergebnisse

Marine Naturstoffe stellen bereits einen Großteil der neu isolierten Sekundärmetabolite dar. 2010 wurden 1003 neue marine Naturstoffe publiziert (Blunt *et al.*, 2012b). Die Untersuchung mariner Mikroorganismen als Quelle neuer bioaktiver Naturstoffe ist nach wie vor ein lohnendes Ziel. Insbesondere Schwämme zeichnen sich als gute Habitate für Pilze aus, denn aus den assoziierten Pilzen wurden bis jetzt die meisten bioaktiven Substanzen isoliert. Sie verzeichnen zwar nicht die höchste Zuwachsrate an neuen Naturstoffen pro Jahr, aber Schwamm-assoziierte Pilze sind mit knapp 50 % aller entdeckten Naturstoffe die potentesten Produzenten (Leal *et al.*, 2012) (siehe Abbildung 5, Seite 7).

In der vorliegenden Arbeit sollten marine Pilze nach rationaler Auswahl auf ihre Naturstoffe hin untersucht werden.

Da die Hoffnung auf der Entdeckung eines wirksamen bzw. bioaktiven neuen Naturstoffs ruht, wurden zunächst alle Stämme in Vor-Screening-Ansätzen kultiviert. Nach erfolgreicher Kultivierung und Extraktion wurden die Rohextrakte in antibiotischen Bioassays auf antibiotische Wirkung getestet. Zeigte ein Stamm bei der Testung mindestens eine starke Inhibierung eines Testorganismus, wurde der Stamm ausgewählt und eine chemische Dereplikation durchgeführt. Dazu wurde der Pilz in WSP30-Medium erneut kultiviert, um zum einen die Reproduzierbarkeit zu überprüfen und zum anderen ausreichend Substanz für weitere Untersuchungen zu erhalten. Konnten aus einem Rohextrakt nicht alle oder kein Metabolit derepliziert werden, so wurde der Pilz in einem 10 L Großansatz erneut kultiviert und anschließend extrahiert. Die Kultivierung, Extraktion und Dereplikation ist in den folgenden Kapiteln für die von mir ausgewählten Pilze beschrieben. Zuerst werden die Ergebnisse der Screening-Ansätze beschrieben, anschließend die Ergebnisse von den untersuchten Stämmen *Eurotium rubrum*, *Lewia infectoria* und *Eutypella scoparia*, sowie letztendlich die Ergebnisse des Stammes *Bartalinia robillardoides*. Der Stamm *B. robillardoides* bekommt eine Sonderstellung, da aus ihm vier neue Naturstoffe isoliert werden konnten. Insgesamt wurden sieben Substanzen isoliert. Die Strukturaufklärung aller Substanzen wurde mit den Daten aus ein- und zweidimensionalen NMR-Experimenten durchgeführt. Die absolute Konfiguration wurde, wo es möglich war, mittels CD-Spektroskopie ermittelt.

3.1 Dereplikation der Screening-Ansätze

Aus der Stammsammlung des KiWiZ wurde eine Gruppe von 101 Stämmen betrachtet, woraus 17 Stämme ausgewählt wurden, die den Kriterien aus Kapitel 1.5 entsprachen. Alle Stämme, die für ein weiteres Screening kultiviert wurden, sind in Tabelle 2 zusammengefasst

und wurden in drei Gruppen eingeteilt. Im oberen Teil der Tabelle sind die Pilze aufgelistet, bei denen nach erneuter und erfolgreicher Kultivierung Substanzen aus dem Rohextrakt derepliziert werden konnten. Hinter jedem Pilz sind die produzierten Substanzen, verwendete Daten zur Dereplikation, Molekülmasse und UV/VIS-Absorptionen beschrieben. Im mittleren, grauhinterlegten Bereich sind vier Stämme aufgelistet, die ein großes Potential zur weiteren Analyse ergaben. Aus einem Rohextrakt konnten einige Metabolite nicht bekannten Substanzen zugeordnet werden. Die weiteren Untersuchungen zu den vier Stämmen sind in den nächsten Kapiteln ausführlich beschrieben. Im unteren Teil der Tabelle sind sechs Stämme aufgelistet, bei denen die erneute Kultivierung erfolgreich war, jedoch die weiteren Untersuchungen nicht durchführbar oder sinnvoll waren.

Zusammengefasst bedeutet das, dass elf Stämme intensiv untersucht wurden. Aus der erneuten Kultivierung als Großansatz ließen sich elf Rohextrakte herstellen (siehe Abbildung 16). Aus sieben dieser Rohextrakte konnten zwölf Substanzen identifiziert und literaturbekannten Substanzen zugeordnet werden. Die verbleibenden vier Rohextrakte (aus den grauhinterlegten Stämmen) zeigten ein recht komplexes Metabolitspektrum, so dass eine erneute Anzucht als Großansatz, Extraktion und eine Isolierung der Metabolite zu Reinsubstanzen erforderlich war. Aus den vier Stämmen konnten insgesamt 31 Substanzen isoliert werden. Von diesen 31 Substanzen konnten vier keiner literaturbekannten Substanz zugeordnet werden und sind somit neue Naturstoffe aus marinen Pilzen.

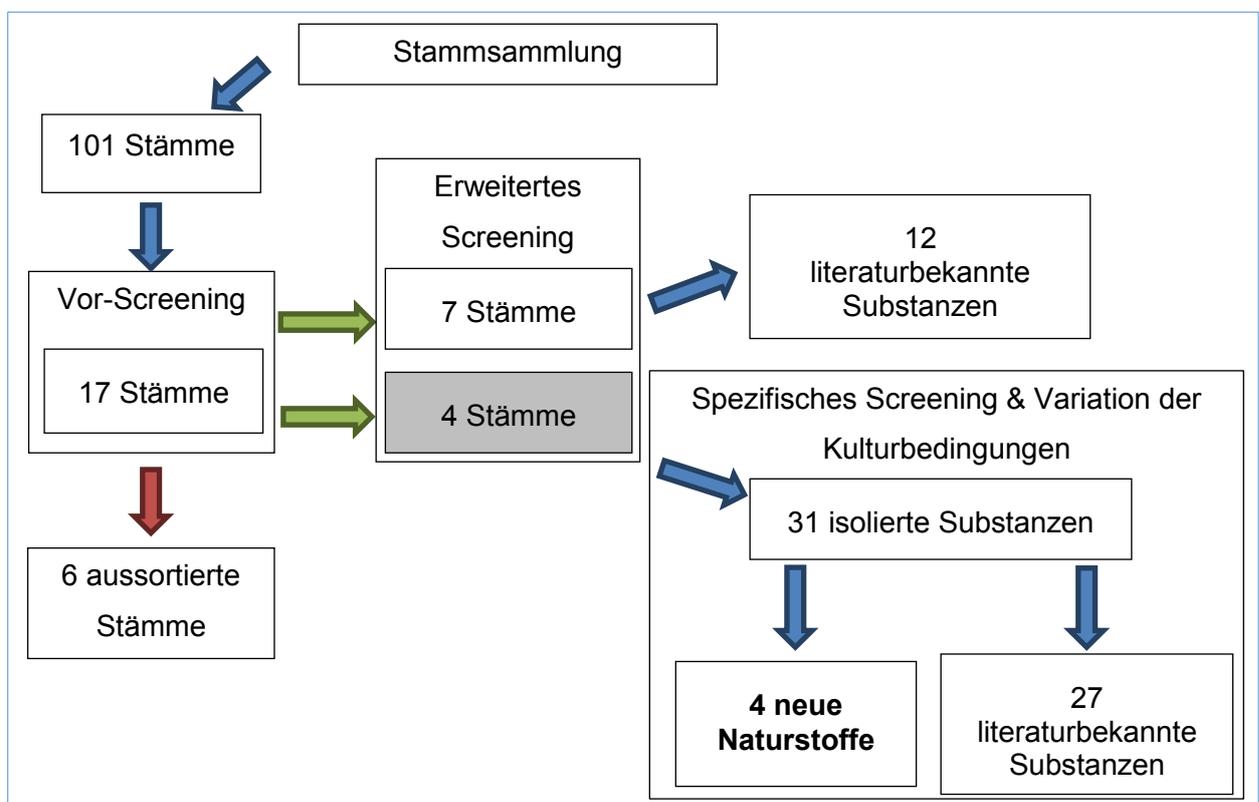


Abbildung 16: Flussschema der Arbeit, es soll das Vorgehen zur Auswahl und weiteren Bearbeitung der Pilzstämme verdeutlichen.

Tabelle 2: In der Tabelle sind alle Stämme, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, aufgelistet. Im oberen Bereich befinden sich die Stämme, aus denen durch Dereplikation die produzierten Sekundärmetabolite bestimmt werden konnten. Im mittleren grauhinterlegtem Bereich sind die Stämme aufgelistet, die unbekannte Substanzen produzierten. Im unteren Teil sind die Stämme zusammengefasst, bei denen eine weitere Untersuchung nicht möglich oder nicht sinnvoll war.

Stammnummer	Name	Herkunft	Substanzen	Dereplikation	Molekülmasse [m/z]	UV-Absorption max. [nm]
KF433	<i>Engyodontium album</i>	Nördlich von Læsø, Dänemark, Ostsee	Linolsäurederivat (Christie <i>et al.</i> , 2007)	UV/VIS, MS, NMR	354	
			Antibiotic SCH210971 / SCH210972 ^a (Yang <i>et al.</i> , 2006)	UV/VIS, MS	445	230, 270 sh, 295
LF054	<i>Verticillium fungicola</i>	Banjole, Kroatien, Mittelmeer	F2928-1 ^a (Kanai <i>et al.</i> , 2005)	UV/VIS, MS	472	220, 300
			Tenuazonsäure ^a (Harvan & Pero, 1974)	UV/VIS, MS	197	220, 275
LF662	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Tiefseeebene vor Kreta, östliches Mittelmeer	4-Hydroxyequisetin ^a (Phillips <i>et al.</i> , 1989)	UV/VIS, MS, NMR	389	210, 225, 290
			Unbekannte Substanz, die nicht ionisiert ^b			250, 280 sh, 410
LF840	<i>Helicoma isiola</i>	unbekannt	6-Methylsalicylsäure ^a (Mandal & Roy, 2008)	UV/VIS, MS, NMR	152	215, 240, 305
LF851	<i>Acremonium strictum</i>	Westküste Afrika, Polarstern Expedition ANT11/5	Ergost-4,6,8(14),22-tetraen-3-on ^a (Gonzalez <i>et al.</i> , 1983)	UV/VIS, MS	391	350
LF937	<i>Aspergillus</i> sp.	Westküste Afrika, Polarstern-Expedition ANT11/5	2-Acetyl-3-amino-5-hydroxy-1,4-naphthoquinon (Soonthornchareonnon <i>et al.</i> , 1999)	UV/VIS, MS	231	260, 295
			WIN 64821 (Barrow <i>et al.</i> , 1993)	UV/VIS, MS	664	240, 300
			Sydonsäure (Li <i>et al.</i> , 2012)	UV/VIS, MS, NMR	266	220, 245, 300

KF427	<i>Fusarium</i> sp.	Elba, Italien, Mittelmeer	Equisetin (Hellwig <i>et al.</i> , 2002)	UV/VIS, MS	373	210, 230, 270 sh, 295
LF858	<i>Eurotium rubrum</i>	Westküste Afrika, Polarstern Expedition ANT11/5	Unbekannte Substanzen*			
KF238	<i>Lewia infectoria</i>	Elba, Italien, Mittelmeer	Unbekannte Substanzen*			
LF271	<i>Eutypella scoparia</i>	St. Giovanni, Italien, Mittelmeer	Unbekannte Substanzen*			
LF550	<i>Bartalinia robillardoides</i>	Limski-Fjord, Kroatien, Mittelmeer	Unbekannte Substanzen*			
KF004	<i>Tolypocladium cylindrosporum</i>	Elba, Italien, Mittelmeer	Eine erneute Kultivierung zeigte, dass die chemische Zusammensetzung der Extrakte dem chemischen Profil der Extrakte des jeweiligen Stammes aus dem Vor-Screening nicht entsprach.			
KF109	<i>Leptosphaeria</i> sp.	Elba, Italien, Mittelmeer	Eine erneute Kultivierung zeigte, dass die chemische Zusammensetzung der Extrakte dem chemischen Profil der Extrakte des jeweiligen Stammes aus dem Vor-Screening nicht entsprach.			
LF064	<i>Phialemonium obovatum</i>	Limski-Fjord, Kroatien, Mittelmeer	Die UV/VIS-Absorptionen der Metabolite waren so gering, dass eine sinnvolle chromatographische Trennung des Rohextraktes mit der beschriebenen Methode nicht möglich war.			
LF111	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Banjole, Kroatien, Mittelmeer	Das Wachstum der Kultur und die Produktion der Sekundärmetabolite waren sehr gering. Eine ausreichende Bereitstellung des Extrakts war somit nicht gegeben.			
LF305	<i>Doratomyces</i> sp.	Helgoland, Deutschland, Nordsee	Das Wachstum der Kultur und die Produktion der Sekundärmetabolite waren sehr gering. Eine ausreichende Bereitstellung des Extrakts war somit nicht gegeben.			
LF667	<i>Auxarthron reticulatum</i>	Westküste Afrika, Polarstern- Expedition ANT11/5	Die UV/VIS-Absorptionen der Metabolite waren so gering, dass eine sinnvolle chromatographische Trennung des Rohextraktes mit der beschriebenen Methode nicht möglich war.			

*: Unbekannte Substanzen, die aus dem Rohextrakt der Screening-Ansätze nicht derepliziert werden konnten.

^a: Substanz, deren Produktion in diesem Organismus noch nicht beschrieben wurde.

^b: Unbekannte Substanz, die im UV/VIS absorbiert, aber in der ESI-MS nicht ionisiert und detektiert werden kann.

3.2 *Eurotium rubrum*

Auf der Polarstern-Expedition ANT11/5 (1994) von Kapstadt nach Bremerhaven wurden Proben aus marinen Habitaten genommen. Aus einer dieser Proben konnte ein Pilzstamm isoliert werden, der mittels 18S-rDNA-Sequenzierung phylogenetisch zu *Eurotium rubrum* (AB002084.1) zugeordnet wurde. Die Sequenzlänge betrug 1253 bp und erzielte eine 99 %ige Übereinstimmung mit der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz.

Dieser Stamm LF858 wurde ausgewählt, weil eine vollständige Dereplikation aus dem Rohextrakt des Screening-Ansatzes nicht möglich war und weil der Rohextrakt starke Inhibitionen gegen *B. subtilis* und *S. lentus* aufwies.

3.2.1 Chemisches und Aktivitätsscreening der Sekundärmetabolite

Die Auswertung des Vor-Screenings der Sekundärmetabolite (Methode: Kapitel 2.2) ergab, dass der in WSP30+MW-Medium kultivierte Stamm im Chromatogramm des Rohextraktes ein breites Metabolitspektrum aufwies (siehe DAD-Chromatogramm in Abbildung 17). In der Literatur ist für *Eurotium* sp. die Produktion von vielen verschiedenen Metaboliten beschrieben, wobei im Wesentlichen Derivate aus der Gruppe der Auroglaucine und der Echinuline produziert werden (Yan *et al.*, 2012). Die Testung des entsprechenden Rohextraktes gegen neun ausgewählte Testorganismen (siehe Kapitel 2.12.1) zeigte starke antimikrobielle Aktivitäten gegen zwei der Testorganismen (*B. subtilis* und *S. lentus*, weitere Ergebnisse Tabelle 3).

Tabelle 3: Inhibitorische Aktivitäten des Rohextraktes aus dem Screening-Ansatz von *E. rubrum*. (Abkürzungen und Methoden siehe Kapitel 2.12.1).

Organismus	<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.l.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>C.a.</i>	<i>P.s.</i>	<i>X.c.</i>	<i>E.a.</i>	<i>R.s.</i>
Inhibition [%]	80-100	< 20	80-100	< 20	< 20	< 20	< 50	< 20	< 20

Der Stamm wurde für weitere Untersuchungen ausgewählt, weil er antibakterielle Wirkungen und ein breites Spektrum an Metaboliten zeigte. Da eine Vielzahl an Metaboliten aus der Gattung bekannt war, wurde das Hauptaugenmerk auf die schwächer produzierten Metabolite gelegt, die bisher nicht charakterisiert worden waren. Da die Veränderung des Nährstoffangebotes bei Pilzen eine Veränderung des Sekundärstoffwechsels initiieren kann, wurde durch Medienvariation versucht, eine Veränderung des Sekundärmetabolismus des Stammes hervorzurufen.

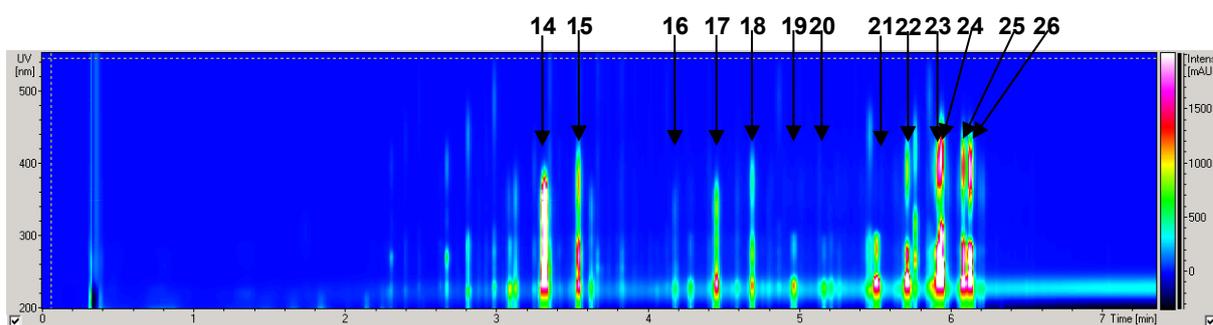


Abbildung 17: DAD-Chromatogramm des Rohextraktes aus dem Vor-Screening-Ansatz von *E. rubrum*. Die Zuordnung der Nummern zu den Substanzen ist in Tabelle 4 gegeben.

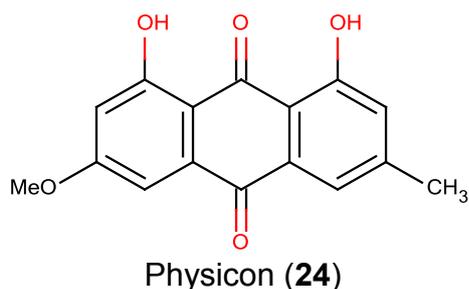
3.2.2 Großansatz

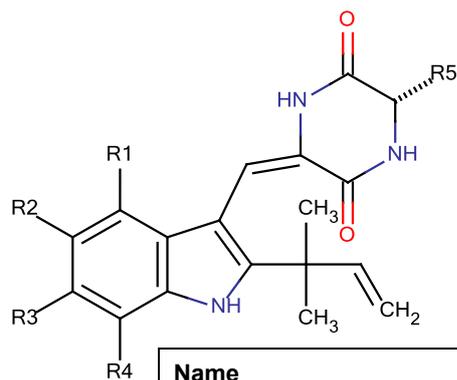
Die Kultivierungsbedingungen wichen für diesen Stamm von der Standardmethode ab (siehe Kapitel 2.3). Die Kultivierung erfolgte in 10 L WSP30+MW-Medium (WSP30-Medium mit Meerwasser statt mit VE-Wasser) für 21 Tage. Das Medium wurde in zwölf 2 L Erlenmeyerkolben ohne Schikane aufgeteilt und mit jeweils $\frac{1}{4}$ Agarplatte der Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde 1 Woche bei 28 °C zuerst als Schüttelkultur bei 120 rpm und anschließend 2 Wochen als Standkultur kultiviert. Die Extraktion erfolgte nach den in Kapitel 2.3 beschriebenen Methoden. Bei der Extraktion wurde das Mycel vom Kulturüberstand getrennt und separat bearbeitet. Jeweils ein Aliquot wurde in das analytische HPLC-DAD/MS System injiziert. Die Zusammensetzung des chemischen Profils der Metabolite von Kulturüberstand und Mycel war identisch. Folgende Substanzen konnten durch Dereplikation aus dem Rohextraktes des Kulturüberstandes identifiziert werden (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Alle aus dem Stamm *Eurotium rubrum* isolierten und identifizierten Substanzen mit der Molekülmasse und den UV/VIS-Absorptionen.

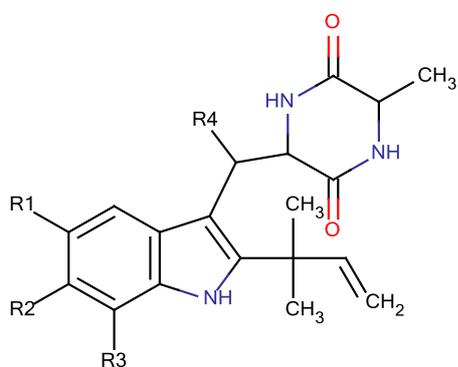
Name	Molekülmasse [m/z]	UV-Absorption max. [nm]	Nummer
Neoechinulin A (Slack <i>et al.</i> , 2009)	323	229, 286, 292, 338	14
Neoechinulin B (Slack <i>et al.</i> , 2009)	321	228, 273, 284, 374	15
Variecolorin E (Wang <i>et al.</i> , 2007)	407	230, 285, 345	16
Isoechinulin A (Wang <i>et al.</i> , 2007)	391	227, 289, 341	17
Neoechinulin C (Marchelli <i>et al.</i> , 1977)	389	231, 275, 290, 380	18
Arestrictin A (Itabashi <i>et al.</i> , 2006)	477	228, 274, 283, 291	19
Dehydrovariecolorin (Li <i>et al.</i> , 2008)	459	225, 336	20
Echinulin (Wang <i>et al.</i> , 2007)	461	230, 279, 286,	21
Cristatin A (Itabashi <i>et al.</i> , 2006)	459	222, 290, 330	22
1',2'-Dihydroauroglucin (Ishikawa <i>et al.</i> , 1984)	300	227, 273, 391	23
Physcion (Smetanina <i>et al.</i> , 2007)	284	226, 253, 265, 283, 435	24
Flavoglaucin (Ishikawa <i>et al.</i> , 1984)	304	236, 274, 394	25
1',2',3',4'-Tetrahydroauroglucin (Slack <i>et al.</i> , 2009)	302	230, 274, 394	26

Für die Gattung *Eurotium* sind viele der oben aufgeführten Substanzen beschrieben. Einige Substanzen, wie Variecolorin E, sind noch nicht direkt aus der Gattung *Eurotium* isoliert worden. Deren Derivate, wie Variecolorin G, wurden bereits aus der Gattung isoliert. Arestrictin und Cristatin A sind bisher nur aus *Aspergillus restrictus* und *A. penicilloides* beschrieben worden (Itabashi *et al.*, 2006). Aber auch diese beiden Substanzen besitzen ein 3-Methyl-6-([2-(2-methyl-3-buten-2-yl)-1H-indol-3-yl]methyl)-2,5-piperazinedion-Grundgerüst und zählen somit zu den Echinulinen.





Name	R1	R2	R3	R4	R5
Neoechinulin A (14)	H	H	H	H	-Me
Neoechinulin B (15)	H	H	H	H	=CH ₂
Variecolorin E (16)	H		H	H	-Me
Isoechinulin A (17)	H		H	H	-Me
Neoechinulin C (18)	H	H		H	=CH ₂
Dehydrovariecolorin L (20)			H	H	-Me
Cristatin A (22)	H	H			-Me



Name	R1	R2	R3	R4
Echinulin (21)		H		H
Arestrictin A (19)	H			OH

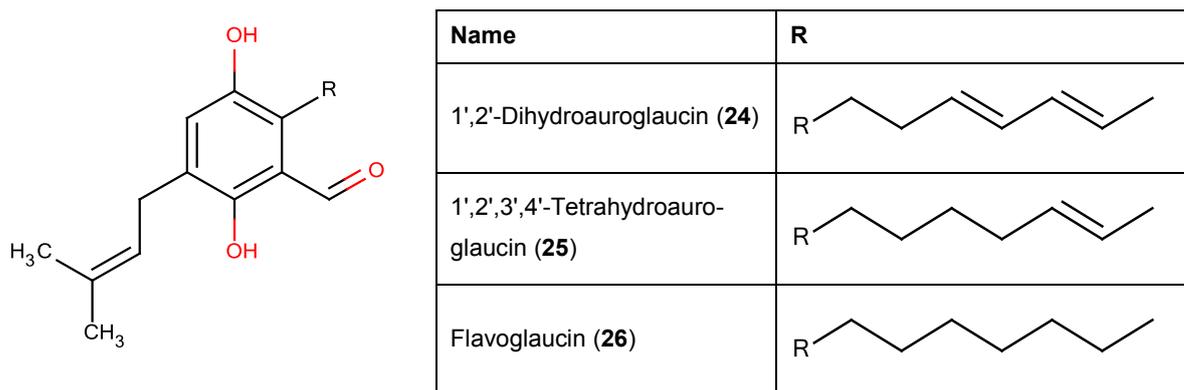


Abbildung 18: Strukturen der 13 isolierten Substanzen aus dem Pilz *Eurotium rubrum* LF858.

3.2.3 Medienvariation

Um die Produktion der Sekundärmetabolite zu stimulieren, wurde der Stamm LF858 in fünf verschiedenen Medien angeimpft. Es wurden die folgenden Medien ausgewählt: 2,0 % ME, ME+TM, MB, SM+TM und WSP30+TM. 120 mL Medium wurde jeweils in 300 mL Erlenmeyerkolben gefüllt, angeimpft und 3 Wochen als Standkultur bei 28 °C kultiviert. Der Stamm wuchs in 2,0 % ME-Medium nicht an und daher wurde dieser Ansatz verworfen. Die Ansätze aller anderen Medien wurden mit EtOAc extrahiert und aufgearbeitet. Die Auswertung der UV/VIS-Chromatogramme ergab, dass alle Stämme die gleichen Sekundärmetabolite produzierten, wohingegen die Produktionsmenge von Medium zu Medium variierte. Im SM+TM-Medium war die Produktion am geringsten, wohingegen sie im WSP30+TM am höchsten war. Repräsentativ für die Produktionsmenge wurden die Integralflächen des Peaks von Neoechinulin A in den UV/VIS-Chromatogrammen verwendet, um die Produktivität zu beurteilen. Im Vergleich zum SM+TM-Medium war die Integralfläche im WSP30+TM-Medium um das Zehnfache größer, was einer Steigerung der Produktion um das Zehnfache entspricht.

3.2.4 Identifikation der antimikrobiellen Aktivität gegen *B. subtilis*

Ein Aliquot des Rohextraktes des 10 L-Ansatzes in WSP30+MW-Medium wurde in eine 96-well-Platte fraktioniert, um möglichst einzelnen Substanzen eine inhibitorische Aktivität zuweisen zu können. Der fraktionierte Rohextrakt wurde gegen *Bacillus subtilis* getestet. Nur zwei benachbarte Fraktionen zeigten eine hohe antibakterielle Aktivität, die der Substanz Neoechinulin A zugeordnet werden konnte.

3.2.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass der Stamm ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten, wie auch in der Literatur beschrieben, produziert. Alle Substanzen konnten durch Dereplikation mittels der Daten von UV-Absorption, Molekülmasse und teilweise NMR-Spektren bekannten Substanzen zugeordnet werden. Die antibakterielle Wirkung des Rohextraktes konnte auf eine einzige Substanz, Neoechinulin A, zurückgeführt werden.

Die Medienvariation konnte den Stamm nicht zur Produktion von anderen Sekundärmetaboliten stimulieren. Jedoch war eine Veränderung der Produktionsmenge zu beobachten, wobei der Stamm LF858 in WSP30+TM-Medium am besten produzierte.

3.3 *Lewia infectoria*

Der Stamm KF238, der als *Lewia infectoria* phylogenetisch eingruppiert wurde, zeigte eine starke antibakterielle Wirkung, speziell gegen *Staphylococcus lentus* (S.I., siehe Tabelle 6) im Rohextrakt. Da in der Stammsammlung des KiWiZ mehrere Stämme sind (Tabelle 5), die als *L. infectoria* eingruppiert wurden, wurden zwei weitere Stämme für die Untersuchung hinzugezogen. Zusätzlich waren die Stämme LF177 und LF240 bereits von Wiese *et al.* (2011) untersucht.

Tabelle 5: Die in der Stammsammlung des KiWiZ enthaltenen Stämme von *Lewia infectoria*. Zu den jeweiligen Stämmen ist der Beprobungsort angegeben.

Stamnummer	Herkunft
KF238	Elba, Italien, Mittelmeer, 2001
KF240	
KF250	
KF265	
KF285	
KF286	
KF310	
LF897	Polarstern-Expedition ANT11/5, 1994
LF891	
LF917	
LF999	
LF177	Limski-Fjord, Kroatien, Mittelmeer, 2005
LF240	(Wiese <i>et al.</i> , 2011)

Der Stamm KF310 (Elba, Italien, Mittelmeer) wurde ausgewählt, weil die Testung des Screening-Ansatzes auf Bioaktivität ein potenteres Spektrum aufwies als die beiden anderen ausgewählten Stämme (siehe Tabelle 6). Der Stamm LF999 wurde ausgewählt, da er sich hinsichtlich der Probenentnahmestelle unterschied und keine Bioaktivität zeigt. Die Probe, aus der LF999 isoliert wurde, wurde während der Polarstern-Expedition ANT11/5 1994 vor der Küste Westafrikas genommen.

Die Fragestellung bei diesen Stämmen war, ob alle dieselben Sekundärmetabolite produzieren und ob die Produktion der nicht bekannten Substanzen durch Veränderung der Kulturbedingungen stimuliert werden kann.

3.3.1 Chemisches- und Aktivitätsscreening der Sekundärmetabolite

Alle Stämme aus Tabelle 5 von unterschiedlichen Probeentnahmestellen zeigten das gleiche Metabolitspektrum bei der Kultivierung im gleichen Medium. Für genauere Untersuchungen wurden repräsentativ drei Stämme ausgewählt. Die drei Stämme KF238, LF999 und KF310 zeigten unterschiedliche Bioaktivitäten. Aus dem Screening-Ansatz von KF238 wurde Infectopyron anhand der UV/VIS-Absorption und Molekülmasse derepliziert. Ein weiterer Peak konnte Phomenin A bzw. B zugeordnet werden. Die Entscheidung für eine der beiden möglichen Strukturen war anhand der UV/VIS- und MS-Daten nicht möglich. Der Unterschied war die *E/Z*-Konfiguration der äußersten Doppelbindung der Seitenkette. Erst nach der Aufarbeitung zur Reinsubstanz konnte die Konfiguration anhand der Ergebnisse aus den NMR-Experimenten zugeordnet werden.

Tabelle 6: Inhibitorische Aktivitäten der Rohextrakte von KF238, KF310 und LF999. Die Angaben sind in Prozent angegeben. Grün hinterlegte Felder zeigen starke Aktivitäten, das orange hinterlegte Feld eine moderate Aktivität. Abkürzungen und Methoden siehe Kapitel 2.12.1

Organismus	<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.l.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>C.a.</i>	<i>P.s.</i>	<i>X.c.</i>	<i>E.a.</i>	<i>R.s.</i>
KF238	< 50	< 20	100-80	< 20	< 20	< 50	< 20	< 20	< 20
KF310	100-80	< 20	< 50	80-50	< 20	< 20	100-80	< 50	< 20
LF999	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20

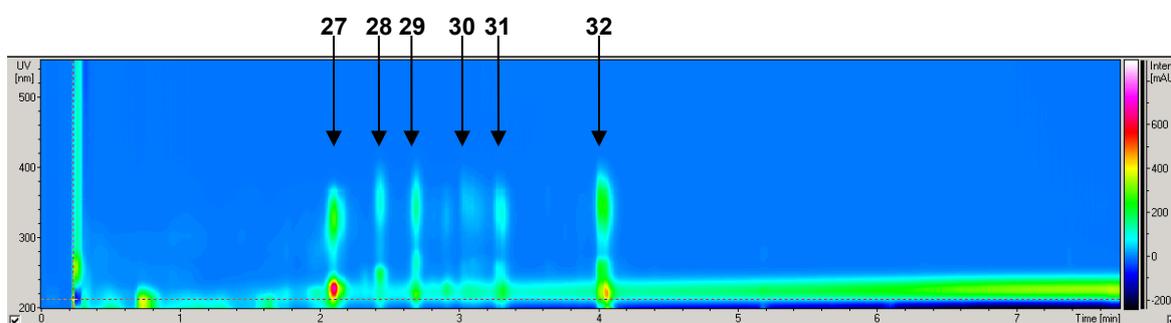


Abbildung 19: DAD-Chromatogramm des Rohextraktes aus dem Vor-Screening-Ansatz von *L. infectoria*. Die Kultivierung des Stamms KF238 erfolgte in WSP30-Medium. Die Zuordnung der Nummern zu den Substanzen ist in Tabelle 7 angegeben.

3.3.2 Großansatz

Aus dem Großansatz von KF238 in WSP30-Medium konnten nach chromatographischer Trennung folgende Substanzen identifiziert werden.

Infectopyron, Phomenin A und Novaezelandin A wurden aus *Alternaria infectoria* bereits beschrieben, alle anderen Substanzen sind weder aus der Gattung *Alternaria* noch aus *Lewia* bekannt.

Tabelle 7: Alle aus dem Stamm *Lewia infectoria*, KF238, isolierten und identifizierten Substanzen mit der Molekülmasse und den UV/VIS-Absorptionen.

Name	Molekülmasse [m/z]	UV-Absorption max. [nm]	Nummer
Rosellisinaldehyd (Tezuka <i>et al.</i> , 1994)	268	225, 325	27
Phomapyrone D (Pedras & Chumala, 2005)	222	210, 250, 350	28
Infectopyron (Ivanova <i>et al.</i> , 2010)	264	215, 260, 345	29
Phomapyrone E (Pedras & Chumala, 2005)	250	215, 230, 335	30
Novaezelandin A (Ivanova <i>et al.</i> , 2010)	194	210, 285	31
Phomenin A (Ivanova <i>et al.</i> , 2010)	234	255, 345	32

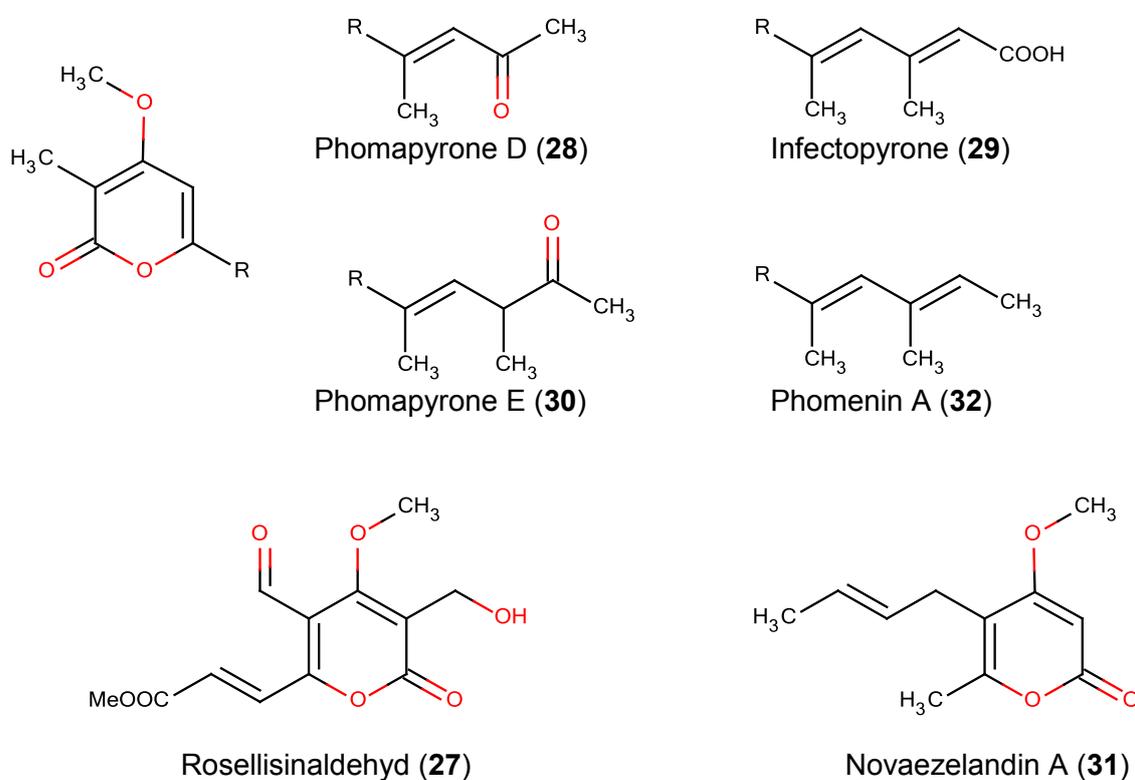


Abbildung 20: Strukturen aller sechs Substanzen, die aus dem Rohextrakt des Pilzes *Lewia infectoria* KF238 isolierten wurden.

3.3.3 NMR-Daten der Hauptmetabolite

Für die Identifizierung und Aufklärung der Stereochemie von Infectopyron und Phomenin A wurden zusätzlich NMR-Experimente durchgeführt.

Phomenin A:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ_{H} 6.99 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.72 (m, 1H), 4.02 (s, 1H), 2.12 (s, 1H), 1.92 (s, 1H), 1.90 (s, 1H), 1.81 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H).

Infectopyron:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, MeOD): δ_{H} 6.99 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 5.85 (m, 1H), 4.01 (s, 3H), 2.26 (d, $J = 1.0$ Hz, 3H), 2.13 (d, $J = 1.3$ Hz, 3H), 1.91 (s, 3H).

Durch den Vergleich mit Literaturwerten (Ivanova *et al.*, 2010) konnte die Zuordnung der beiden Sekundärmetabolite bestätigt werden.

3.3.4 Medienvariation und Bioaktivitäten

KF238 wurde in sechs verschiedenen Medien kultiviert, um die Produktion von weiteren Sekundärmetaboliten zu stimulieren. Die Auswahl bestand aus den Komplexmedien GPY, WSP30, MHM, 2% ME, PDA und Hafer. Zusätzlich wurde in jedem Medium als Schüttel- und als Standkultur kultiviert. Die Auswertung der UV/VIS-Chromatogramme und der Molekülmasse ergab, dass keine weiteren Sekundärmetabolite produziert wurden. Phomenin A trat in fünf von den sechs oben genannten Medien (GPY, WSP30, MHM, 2% ME, PDA) als Hauptmetabolit auf. Infectopyron hingegen war bei der Kultivierung in Hafer-Medium als Schüttelkultur der Hauptmetabolit. Das Verhältnis zwischen Phomenin A und Infectopyron wurde anhand der Integrale der UV/VIS-Absorption bestimmt und lag bei ungefähr 1:9 im Hafer-Medium und 9:1 für alle anderen Medien.

Die Bioaktivitäten von den Reinsubstanzen Phomenin A und Infectopyron wurden experimentell ermittelt und die Ergebnisse in Tabelle 8 aufgelistet. Dabei ist zu beobachten, dass die Aktivitäten sich deutlich von denen im Vor-Screening-Ansatz unterscheiden. Die anderen Substanzen konnten aufgrund zu geringer Ausbeute nicht getestet werden.

Tabelle 8: Bioaktivitäten der beiden Hauptmetabolite, die aus *Lewia infectoria* isoliert wurden. Angegeben sind die prozentualen Inhibitionen gegen die Organismen, sowie die getesteten Konzentrationen.

Organismus Substanz	<i>Trichophyllum rubrum</i> (100 μM)	<i>Phytophthora infestans</i> (50 μM)	<i>Septoria tritici</i> (100 μM)	ProteinTyrosin Phosphatase 1B (10 μM)	NIH 3T3- Zellen (10 μM)	Hep G2 Zellen (10 μM)
Phomenin A	34 %	31 %	27 %	0 %	0 %	0 %
Infectopyron	48 %	0 %	50 %	39 %	0 %	0 %

3.3.5 Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass alle aufgelisteten Stämme aus Tabelle 5 im gleichen Kulturmedium ein identisches chemisches Profil der Metabolite aufwiesen. Die Stämme LF177 und LF240, untersucht von Wiese *et al.* (2011), produzierten ebenfalls die beiden Hauptmetabolite. Aus dem Großansatz von KF238 konnten sechs Substanzen isoliert werden. Die beiden Hauptmetabolite wurden mittels NMR-Experimenten als die literaturbekannten Substanzen Infectopyron und Phomenin A identifiziert. Durch eine Variation der Medien konnte zwar nicht das chemische Profil der Metabolite beeinflusst werden, aber die Produktionsrate der beiden Hauptmetabolite konnte beeinflusst werden. Im Hafer-Medium war die Produktionsrate für Infectopyron höher als in allen anderen untersuchten Medien. In den anderen Medien war die Produktionsrate von Phomenin A am höchsten. Die Aktivitäten der beiden Reinsubstanzen unterschieden sich deutlich von denen des Rohextraktes der Screening-Ansätze.

3.4 *Eutypella scoparia*

Der Stamm LF271 wurde aus dem Hornkieselschwamm *Ircinia* sp. isoliert. Die Probenahme fand bei St. Giovanni, Italien, statt. Dieser Standort zählt nach Leal *et al.* (2012) zu den „Hotspot“-Standorten (siehe Abbildung 2). Außerdem ist diese Art nur einmal in der KiWiZ-Stammsammlung konserviert. Mittels ITS-rDNA-Sequenzierung wurde der Stamm phylogenetisch zu *Eutypella scoparia* MUT 485 (AF373064) zugeordnet. Die Sequenzlänge betrug 572 bp und erzielte eine 100 %ige Übereinstimmung mit der in der NCBI-Datenbank hinterlegten Sequenz.

3.4.1 Chemisches- und Aktivitätsscreening der Sekundärmetabolite

Aus dem Vor-Screening-Ansatz in WSP30-Medium konnten die Molekülmassen nicht eindeutig identifiziert werden und die produzierten Sekundärmetabolite waren nur in geringer Konzentration vorhanden. Ein Aktivitätsscreening des Screening-Ansatzes wurde nicht durchgeführt.

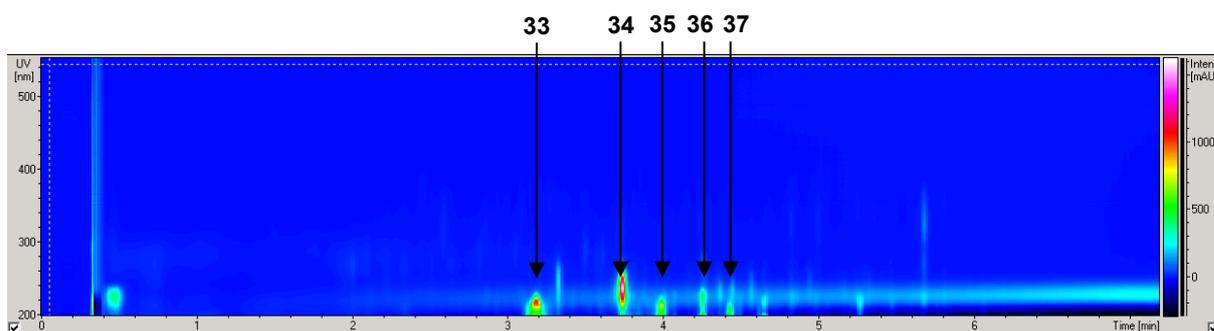


Abbildung 21: DAD-Chromatogramm des Rohextraktes aus dem Vor-Screening-Ansatz von *E. scoparia*. Die Kultivierung des Stamms LF271 erfolgte in 3 % ME-Medium. Die Zuordnung der Nummern zu den Substanzen ist in Tabelle 9 angegeben.

3.4.2 Medienvariation

Der Stamm LF271 wurde zuerst als Großansatz in WSP30-Medium als Schüttel- und Standkultur kultiviert. Das Wachstum des Ansatzes war in beiden Ansätzen moderat. Die HPLC-DAD/MS Analyse eines Aliquoten ergab, dass der Pilz in diesem Medium nur wenige Metabolite produziert. Durch Veränderung der Kulturparameter wurde versucht, die Produktion der Sekundärmetabolite zu stimulieren. Der Stamm wurde daraufhin in GPY, Hafer und 3 % ME-Medium jeweils als Stand- und Schüttelkultur kultiviert. Das Ergebnis der Medienvariation ergab, dass der Pilz in 3 % ME-Medium als Schüttelkultur am besten produziert.

3.4.3 Großansatz

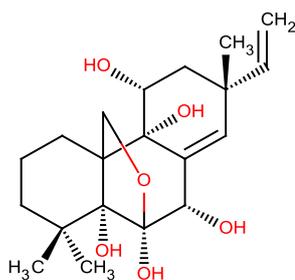
Im experimentellen UV/VIS-Chromatogramm waren acht Substanzen erkennbar: Der Stamm wurde in zweimal 10 L 3 % ME-Medium als Schüttelkultur kultiviert und nach sieben Tagen bzw. 16 Tagen extrahiert. Die Extraktionen erfolgten zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, da die Konzentration von Diaporthein A und B im Rohextrakt nach sieben Tagen am höchsten war. Nach 16 Tagen war hingegen die Konzentration von Scoparasin A im Rohextrakt am höchsten.

Der Extrakt vom Großansatz wurde mit dem präparativen HPLC-System chromatographisch in sieben Fraktionen getrennt. Fünf Reinsubstanzen konnten anhand der gemessenen Molekülmasse, UV/VIS-Absorption und NMR-Spektren identifiziert werden (siehe Tabelle 9). Bei den verbliebenen zwei Fraktionen stellten sich folgende Probleme:

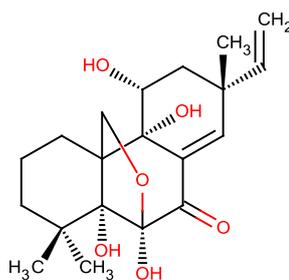
- I. Die Reinsubstanzen zerfielen unter Licht- und Wärmeeinwirkung in kleinere Fragmente.
- II. Die Bestimmung der Molekülmasse des Mutterions war aufgrund von starker Fragmentbildung nicht eindeutig möglich.
- III. Bei einer Fraktion stellte sich zudem das Problem, dass zwei Substanzen nahezu die gleichen Retentionszeiten hatten und eine Trennung auf den vorhandenen Säulen nicht möglich war.

Tabelle 9: Aus dem Großansatz von LF271 in 3 % ME-Medium als Schüttelkultur isolierte und identifizierte Substanzen mit den Molekülmassen und den UV/VIS-Absorptionen.

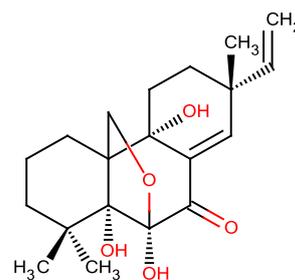
Name	Molekülmasse [m/z]	UV-Absorption max. [nm]	Nummer
Diaporthein A (Dettrakul <i>et al.</i> , 2003)	366	215	33
Diaporthein B (Dettrakul <i>et al.</i> , 2003)	364	220	34
Scoparasin A (Pongcharoen <i>et al.</i> , 2006)	525	225 sh, 275, 280	35
Scopararane A (Pongcharoen <i>et al.</i> , 2006)	348	215	36
Scoparasin B (Pongcharoen <i>et al.</i> , 2006)	543	225 sh, 276, 280	37



Diaporthein A (**33**)



Diaporthein B (**34**)



Scopararane (**36**)

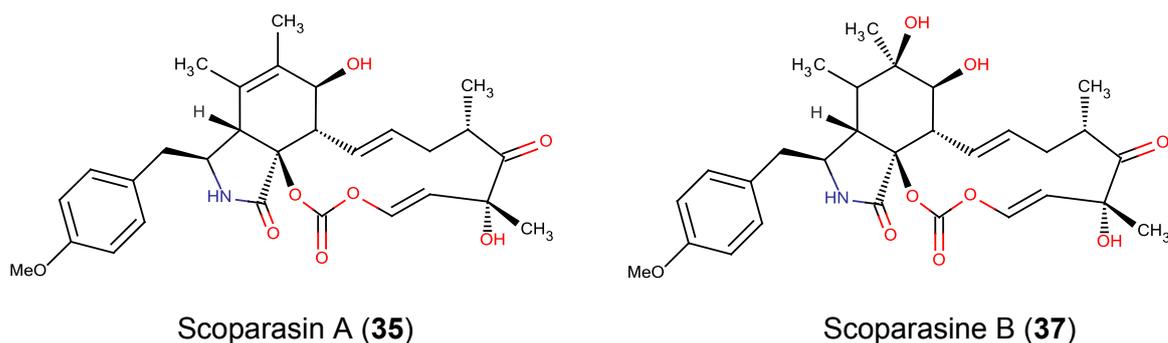


Abbildung 22: Gezeigt sind die fünf Strukturen von den Substanzen, die aus dem Rohextrakt des Pilzes *Eutypella scoparia* LF271 isoliert wurden.

3.4.4 Zusammenfassung

Der Stamm LF271 wurde ausgewählt, da er aus einer „Hotspot“-Region isoliert wurde und weil er nur einmal in der KiWiZ-Stammsammlung konserviert war. Die fünf Substanzen aus Tabelle 9 konnten eindeutig literaturbekanntem Substanzen zugeordnet werden. Alle Substanzen wurden bereits aus der Gattung *Eutypella* isoliert und beschrieben. In den zwei verbliebenen Fraktionen befanden sich Substanzen, die nicht getrennt werden konnten, unter Einfluss von UV-Licht zerfielen bzw. bei der die Molekülmasse aufgrund starker Fragmentierung nicht bestimmbar war.

4 *Bartalinia robillardoides*

In der Literatur wird die Art *Bartalinia robillardoides* als Produzent von Paclitaxel beschrieben (Gangadevi & Muthumary, 2008). Paclitaxel wird in der Medizin bereits als Medikament gegen Krebs eingesetzt. Es wurde erstmals aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) isoliert (Wani *et al.*, 1971).

Im Gegensatz zu anderen bekannten Stämmen der Gattung *B. robillardoides*, die als endophytische Pilze beschrieben wurden, wurde dieser Stamm aus dem marinen Schwamm *Tethya aurantium* isoliert. Die Probenahme, Isolierung und Konservierung wurde durchgeführt wie bei Wiese *et al.* (2011) beschrieben.

Erste Screening-Experimente wurden von Frau Silber durchgeführt und in ihrer Diplomarbeit beschrieben (Silber, 2009). In dem untersuchten Stamm konnte die Produktion von Paclitaxel nicht festgestellt werden. Der Stamm LF550 wurde für diese Arbeit ausgewählt, weil die Probe, aus der dieser Stamm isoliert wurde, aus einer „Hotspot“-Region genommen wurde und weil in der „DNP“-Datenbank nur ein Naturstoff (Paclitaxel) für diese Gattung beschrieben war. Der Stamm, kultiviert in ME-Medium, zeigte im chemischen Profil zudem noch eine große Anzahl an produzierten Sekundärmetaboliten. Diese Eigenschaften machten den Stamm zu einem besonders interessanten Pilz.

Aus dem Pilz konnten vier neue, sowie drei aus anderen Produzenten bekannte Sekundärmetabolite isoliert werden. Nach der Extraktion und Aufreinigung konnten die literaturbekannten Substanzen als Helicusin A (**38**) (Yoshida *et al.*, 1995), Helicusin A-methylester (**39**) (Yoshida *et al.*, 1995) und Deacetylsclerotiorin (**40**) (Sun *et al.*, 1996) identifiziert werden. Insgesamt konnten sechs der sieben Metabolite in die Stoffgruppe der Azaphilone eingeordnet werden. Kriterien für die Einordnung als Azaphilon sind ein 7-Hydroxy-7-methyl-isochromen-6,8-dion-Grundgerüst (siehe Abbildung 23) (Chruma *et al.*, 2009), insbesondere das chirale Zentrum an C-7 (Osmanova *et al.*, 2010), und ein 4H-Pyranring mit einer hohen Affinität zu primären Aminen (Wei & Yao, 2005).

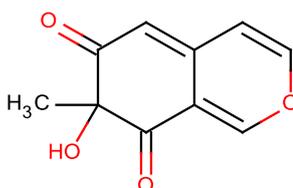


Abbildung 23: Das Grundgerüst, von dem sich alle Azaphilone ableiten lassen. Das charakteristische Merkmal eines Azaphilons, das Stereozentrum C-7 mit der Methyl- und der Hydroxygruppe, ist gut erkennbar.

Da am Grundgerüst der isolierten Metabolite ein Chloratom gebunden ist, zählen die Substanzen zu den Chloroazaphilonen. Neben den bekannten Verbindungen konnten folgende neue Chloroazaphilone identifiziert werden: Helicusin E (**41**), Isochromophilon X (**42**) und Isochromophilon XI (**43**). Ebenfalls als neue Verbindung konnte Bartanolid (**44**), ein zehn-gliedriger Laktoring mit einer Crotonsäure-Seitenkette, isoliert werden.

4.1 Taxonomie und Assoziation mit *Tethya aurantium*

4.1.1 DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung

Um die mit *Tethya aurantium* assoziierten Pilzisolat zu analysieren, wurden die DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung wie bei Wiese *et al.* (2011) beschrieben durchgeführt. Der berechnete phylogenetische Stammbaum ist in Abbildung 25 gezeigt und basiert auf der rDNA-Sequenzierung der ITS1-5.8-ITS2-Region. Der rote Kasten markiert den Stamm LF550. Die größte Sequenzübereinstimmung lag bei *Bartalinia robillardoides* isolate CBS 122686 (EU552102.1) vor.

Morphologisch gesehen besitzt der Pilz die gleichen Merkmale wie in der Literatur beschrieben (Gangadevi & Muthumary, 2008). Abbildung 24 zeigt einen Vergleich der Koloniemorphologie des verwendeten Stammes mit der des Typstammes. Typisch sind die weißen Ränder und die Verfärbung zur Koloniemitte hin.

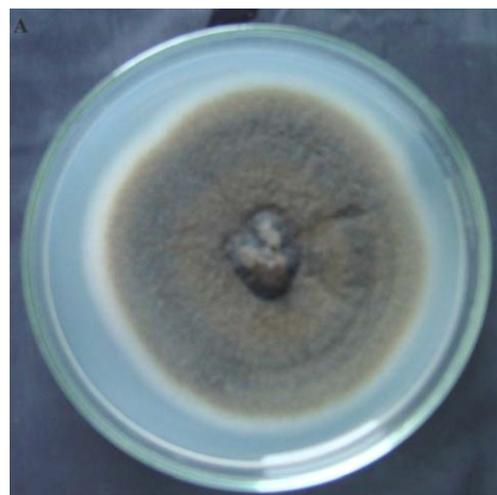
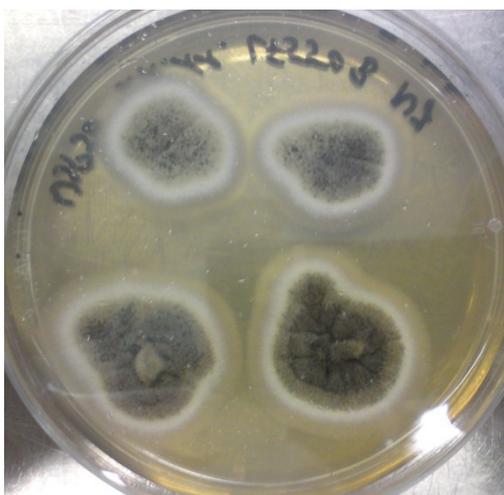


Abbildung 24: Makroskopische Aufnahme von zwei Petrischalen mit dem Pilz *B. robillardoides*. Links: 4 Tage alte Kultur auf WSP30-Medium, Rechts: Petrischale mit einem *B. robillardoides* Stamm (AMB-9, MUBL Nr. 662) auf PDA-Medium zum Vergleich (Gangadevi & Muthumary, 2008).

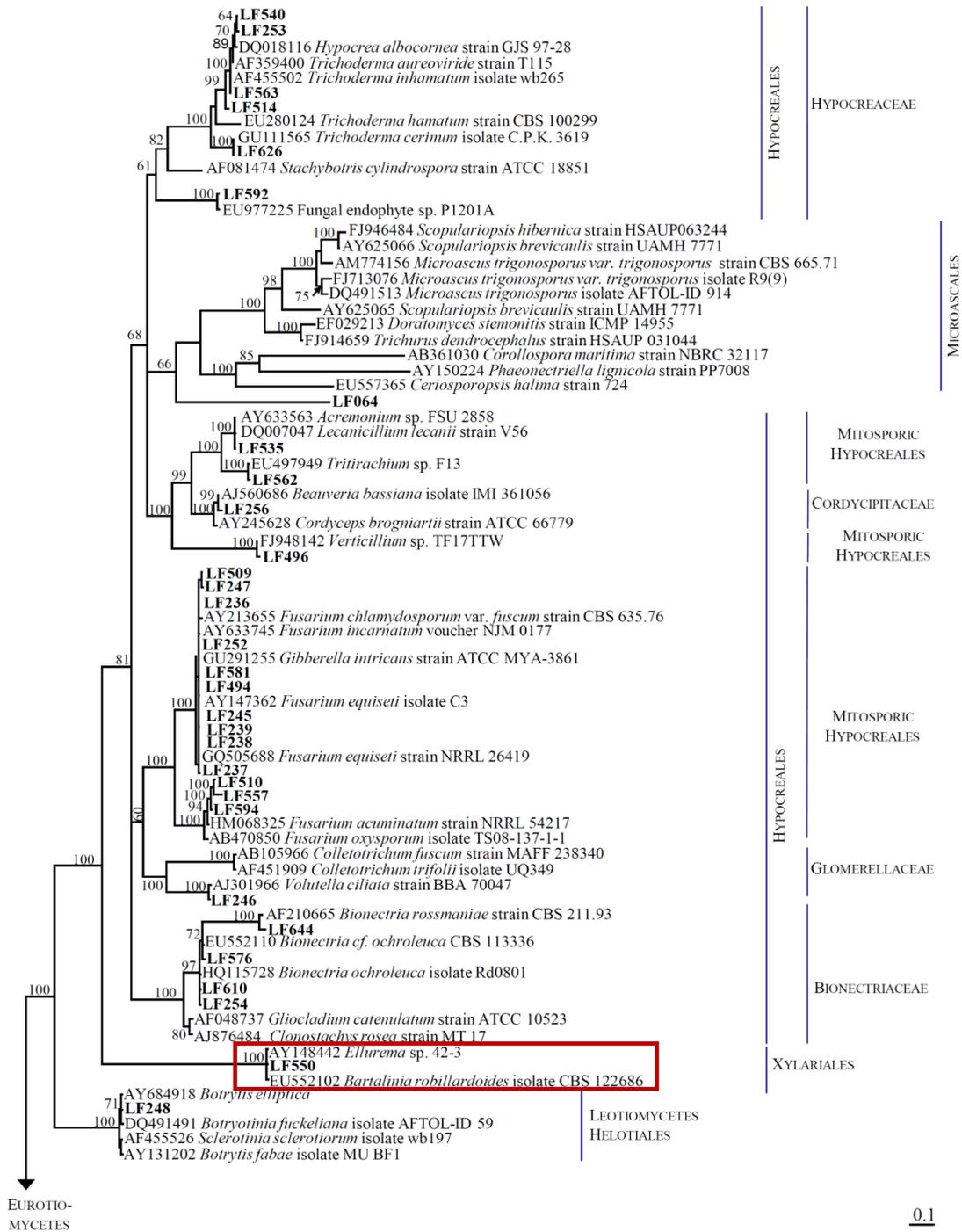


Abbildung 25: Ausschnitt des phylogenetischen Baumes der mit *Tethya aurantium* assoziierten Pilzisolat basierend auf der ITS1-5.8-ITS2 rDNA-Sequenzierung. Weitere Details siehe Wiese *et al.* (2011). Der rote Kasten markiert den Stamm LF550. Die größte Sequenzübereinstimmung lag bei *Bartalinia robillardoides* isolate CBS 122686 (EU552102.1) vor.

4.2 Medienvariation und Großansatz

In der Diplomarbeit von Frau Silber (2009) wurde der Pilz in verschiedenen Medien kultiviert. Das Ergebnis war, dass der Pilz in dem ME-Medium mehrere Metabolite produzierte, die zudem auffällige UV/VIS-Absorptionen zeigten. Durch Dereplikation war es jedoch nicht möglich, diese Substanzen zuzuordnen.

Durch weitere Vorversuche wurden verschiedene Parameter wie Temperatur, Kulturgefäß, etc. variiert. Es stellte sich heraus, dass der Pilz als Schüttelkultur bei 22 °C im Dunkeln ein gutes Wachstum zeigte. Für jeden Großansatz wurden 10 L Medium zu je 1 L in 2 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane angesetzt. Die Vorkultur wuchs auf ME-Agar 4-7 Tage, bis ein starkes Wachstum erkennbar war. Zur Inokulation des Mediums wurde ¼ Agarplatte in jeweils einen Erlenmeyerkolben überführt. Die Extraktion wurde nach 21 Tagen, wie in Kapitel 2.3 beschrieben, durchgeführt. Das DAD-Chromatogramm der Analyse eines Aliquots des Rohextraktes ist in Abbildung 26 zu sehen. Es zeigt die Absorptionsmuster der isolierten Substanzen.

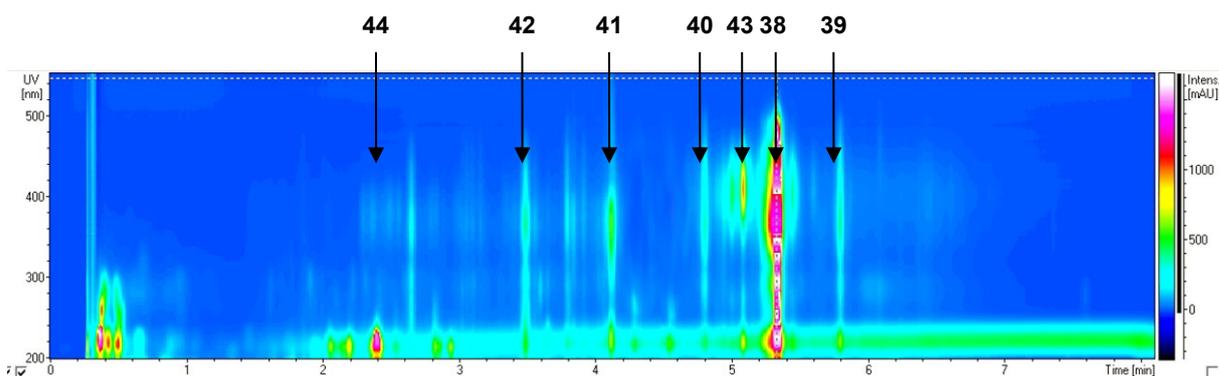


Abbildung 26: UV/VIS-Chromatogramm vom Rohextrakt des Stamms LF550. Helicusin A (**38**), Helicusin A-methylester (**39**), Deacetylsclerotiorin (**40**), Helicusin E (**41**), Isochromophilon X (**42**), Isochromophilon XI (**43**) und Bartanolid (**44**).

4.3 Chromatographische Aufarbeitung

Der Rohextrakt wurde an dem präparativen LC-UV/VIS-System (Durchführung siehe Kapitel 2.5 und 2.6.2) in 14 Fraktionen aufgetrennt. Der Gradient verlief von 10 % ACN auf 86 % ACN in 26 min. Anschließend wurde die Säule 3 min lang mit 100 % ACN gespült und für die nächste Messung die Säule mit 10 % ACN 5 min lang konditioniert. Die UV-Detektion erfolgte bei 220 nm. Da in den erhaltenen Fraktionen noch nicht überall Reinsubstanzen vorlagen, wurden die Fraktionen aus der präparativen Aufarbeitung an dem semi-präparativen HPLC-DAD-System nochmals chromatographisch getrennt.

4.4 Sekundärmetabolite

Die resultierenden Reinsubstanzen wurden mit dem analytischen HPLC-System analysiert, um die Reinheit zu bestimmen und um erste Informationen aus der UV/VIS-Absorption und der Molekülmasse zu erhalten. Anschließend erfolgte die Strukturaufklärung mittels Summenformelberechnung aus dem HRESI-MS und mittels der Auswertung der Daten aus den NMR-Experimenten. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte anhand der Daten aus experimentellen CD-Messungen. Im Folgenden sind nun die isolierten Substanzen detailliert beschrieben:

4.4.1 Helicusin A

Für die Dereplikation wurde in den verschiedenen Datenbanken nach den experimentellen Daten von Molekülmasse, UV/VIS-Absorption und der Anwesenheit eines Chloratoms in der Summenformel gesucht. Die Suche lieferte als Ergebnis vier Substanzen (Helicusin A-D), die sich in der Anordnung der Doppelbindung zwischen C-2' und C-4' unterschieden. Durch NMR-Experimente konnte die Lage der Doppelbindung aufgeklärt werden und somit der literaturbekannten Substanz Helicusin A zugeordnet werden (siehe Vergleich Tabelle 10). In den NMR-Spektren konnte für die 3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl-Seitenkette ein doppelter Signalsatz beobachtet werden. Dies könnte auf eine *E/Z*-Isomerie hinweisen.

IUPAC Name: (3*E*)-5-([(7*S*)-5-Chloro-3-[(1*E*,3*E*,5*S*)-3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl]-7-methyl-6,8-dioxo-7,8-dihydro-6*H*-isochromen-7-yl]oxy)-3-methyl-5-oxo-3-pentenoic acid

Summenformel: C₂₅H₂₈ClO₇

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 76,5 mg / 10 L Kulturmedium

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 223 (4,33), 267 (sh) (4,01), 286 (4,11), 297 (sh) (4,07), 364 (4,44), 392 (sh) (4,36), 420 (sh) (4,22), 445 (sh) (4,07), 480 (sh) (3,67)

NMR-Daten:**Tabelle 10:** Vergleich der gemessenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten (600 MHz and 150 MHz, CDCl_3) mit veröffentlichten Daten für Helicusin A

Nr.	Experimentelle Daten			Literaturdaten (Yoshida <i>et al.</i> , 1995)		
	δ_{C}	δ_{H}	Multi. (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H}	Multi. (J in Hz)
1	152.8	7.95	s	152.7	7.96	s
3	158.1			158.0		
4	106.5	6.65	s	106.4	6.66	s
4a	138.8			138.7		
5	118.9			110.8		
6	191.9			191.5		
7	84.2			84.2		
8	186.1			186.1		
8a	114.5			114.5		
9	115.7	6.08	d (15.6)	115.6	6.08	d (15.6)
10	142.8	7.06	d (15.7)	142.8	7.07	d (15.6)
11	132.0			131.9		
12	148.8	5.70	d (9.8)	148.8	5.71	d (9.4)
13	35.1	2.48	m	35.1	2.49	m
14	30.1	1.34	m	30.1	1.33	m
		1.43	m		1.43	m
15	11.9	0.86	t (7.5)	11.9	0.87	t (7.2)
16	20.2	1.01	d (6.6)	20.2	1.01	d (6.5)
17	12.4	1.84	s	12.3	1.85	s
18	22.5	1.58	s	22.5	1.59	s
1'	164.8			164.6		
2'	117.9	6.01	s	118.0	6.02	s
3'	154.3			153.9		
4'	45.5	3.19	s	45.5	3.21	s
5'	173.1			174.5		
6'	19.3	2.19	d (0.8)	19.3	2.20	d (0.7)

HRESI-MS: m/z 475,1518 [$M+H^+$] (berechnet für $C_{25}H_{28}^{35}ClO_7$: m/z 475,1518).

Die gemessene exakte Molekülmasse (Abbildung 27a) von Helicisin A entspricht genau der berechneten Molekülmasse (Abbildung 27b). Das Isotopenmuster wurde auf Grundlage der Summenformel $C_{25}H_{28}ClO_7$ berechnet. In beiden Fällen ist die Isotopenverteilung des Chloratoms gut erkennbar.

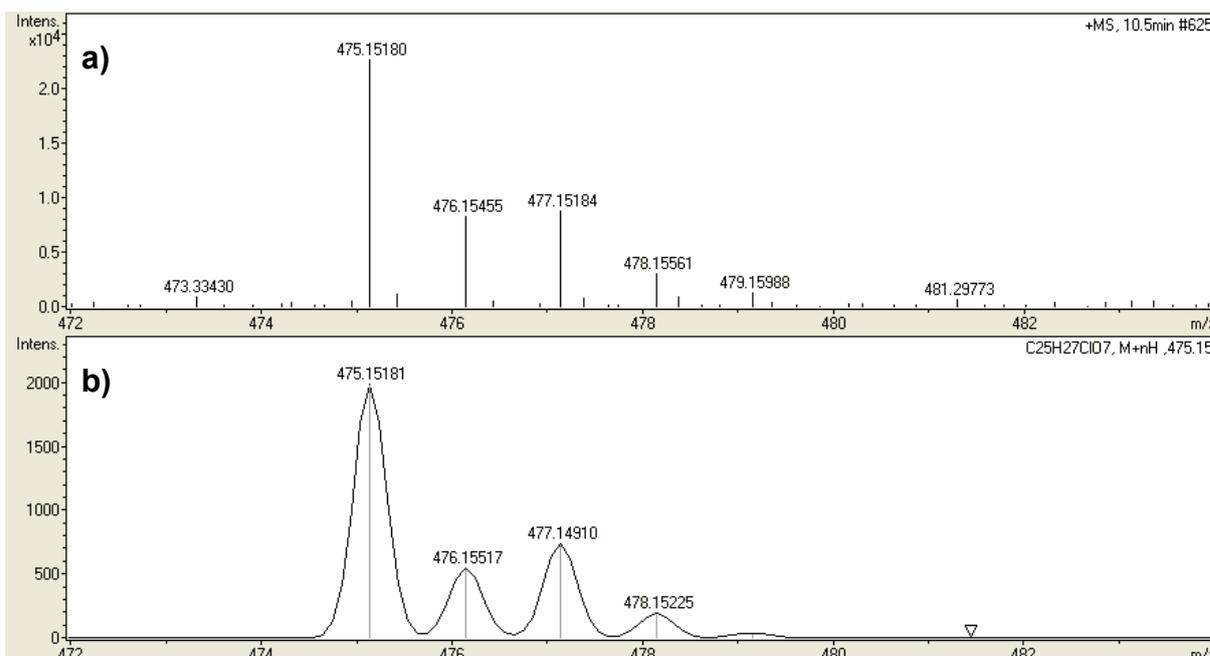
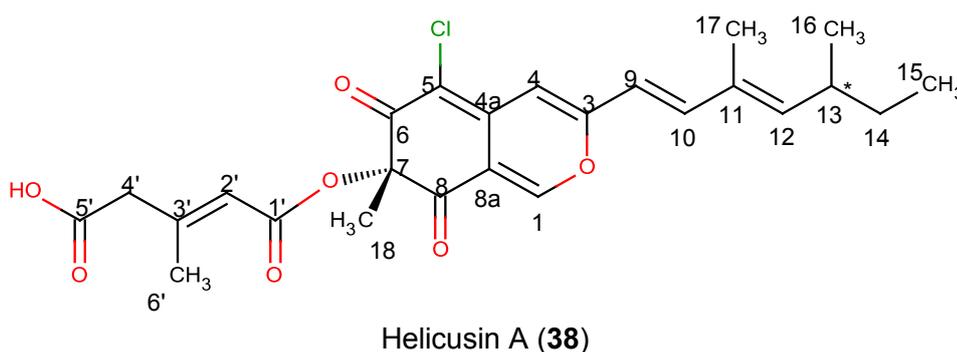


Abbildung 27: Gemessenes HR-Massenspektrum von Helicisin A (a) im Vergleich mit dem berechneten Massenspektrum für die Summenformel $C_{25}H_{28}ClO_7$ (b). In beiden Fällen ist das Isotopenmuster von Chlor zu erkennen.

CD-Spektroskopie:

Anhand der gemessenen CD-Spektren konnte die Konfiguration an C-7 bestimmt werden. Der negative Cotton-Effekt im Bereich von 340 bis 420 nm konnte durch den Vergleich mit Literaturwerten der Position C-7 zugeordnet werden und als S-Konfiguration identifiziert werden. Die Bestimmung der Konfiguration des zweiten Stereozentrums an C-13 war weder mit CD- noch mit NOESY-Experimenten möglich.



4.4.2 Helicusin A-methylester

Die Recherche bezüglich den experimentellen UV/VIS-Daten und Molekülmasse ergab in den Datenbanken keine Übereinstimmung. Das Isotopenmuster aus dem HRESI-MS-Spektrum deutete auf ein Chloratom in der Summenformel hin. Der Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit den Spektren von Helicusin A ergab, dass sich nur ein Signal unterschied. Das Signal bei 52.2 ppm konnte einer, an eine Carboxylatgruppe gebundenen, Methylgruppe zugeordnet werden. Da solche Methylester häufig Produkte von chemischen Reaktionen sind, wurde die Extraktion und Aufarbeitung einer Kultur auf ME-Festmedium methanolfrei durchgeführt. Zur Extraktion wurde EtOAc und zur Aufarbeitung ACN verwendet, denn mit diesen beiden Lösungsmitteln bilden sich keine Ester. Die Injektion in das HPLC-System erfolgte ebenfalls mit ACN. Die Auswertung ergab, dass im Massenspektrum die Molekülmasse von Helicusin A-methylester (489 m/z) nicht erkennbar war. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Reinsubstanz Helicusin A bei längerem Kontakt mit MeOH langsam zu Helicusin A-methylester reagierte. Die ablaufende Veresterung wurde anhand der Molekülmasse 489 m/z und der Retentionszeit von Helicusin A-methylester bestätigt. In den NMR-Spektren konnte ebenfalls für die 3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl-Seitenkette ein doppelter Signalsatz beobachtet werden. Dies könnte auf eine *E/Z*-Isomerie hinweisen.

Summenformel: $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{ClO}_7$

Aussehen: gelber Feststoff

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 221 (4,22), 273 (3,93), 284 (3,94), 297 (sh) (3,90), 371 (4,27), 384 (sh) (4,26), 412 (sh) (4,14), 444 (sh) (3,90), 480 (sh) (3,47)

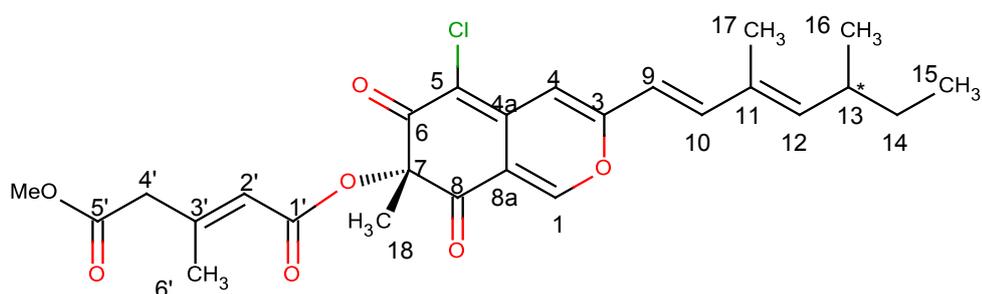
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7.95 (1H, s, H-1), 7.06 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-10), 6.66 (1H, s, H-4), 6.08 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H-9), 5.98 (1H, s, H-2'), 5.71 (1H, d, $J = 9.9$ Hz, H-12), 3.70 (3H, s, COOCH_3), 3.17 (2H, d, $J = 0.8$ Hz H-4'), 2.48 (1H, m, H-13), 2.17 (3H, d, $J = 1.2$ Hz, H-6'), 1.85 (3H, d, $J = 1.1$ Hz, H-17), 1.59 (3H, s, H-18), 1.44 (1H, m, H-14a), 1.33 (1H, m, H-14b), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.87 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ_{C} 191.9 (C, C-8), 186.0 (C, C-6), 169.8 (C, C-5'), 164.7 (C, C-1'), 158.0 (C, C-3), 154.6 (C, C-3'), 152.7 (CH, C-1), 148.8 (CH, C-12), 142.8 (CH, C-10), 138.6 (C, C-4a), 119.3 (CCl, C-5), 117.6 (CH, C-2'), 115.7 (CH, C-9), 114.6 (C, C-8a), 106.4 (CH, C-4), 84.2 (C, C-7), 52.2 (COOCH_3) 45.9 (CH_2 , C-4'), 35.1 (CH, C-13), 30.0 (CH_2 , C-14), 22.5 (CH_3 , C-18), 20.2 (CH_3 , C-16), 19.2 (CH_3 , C-6'), 12.3 (CH_3 , C-17), 11.9 (CH_3 , C-15).

HRESI-MS: m/z 489,1687 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{26}\text{H}_{30}^{35}\text{ClO}_7$: m/z 489,1675).

CD-Spektroskopie:

Anhand der gemessenen CD-Spektren konnte die Konfiguration an C-7 bestimmt werden. Der negative Cotton-Effekt im Bereich von 340 bis 420 nm konnte durch den Vergleich mit Literaturwerten der Position C-7 zugeordnet werden und als S-Konfiguration identifiziert werden. Die Bestimmung der Konfiguration des zweiten Stereozentrums an C-13 war weder mit CD- noch mit NOESY-Experimenten möglich.



Helicusin A-methylester (**39**)

4.4.3 Helicusin E

Für Helicusin E wurde in den Datenbanken mittels experimentellen UV/VIS-Daten, Molekülmasse und einer Summenformel mit einem Chloratom recherchiert. Es wurden jedoch keine bekannten Substanzen, auf die diese Kriterien zutrafen gefunden. Die Massendifferenz zwischen Helicusin A und Helicusin E betrug 34 und gab einen ersten Hinweis auf das Vorhandensein von zwei zusätzlichen Hydroxygruppen in Helicusin E. Der Vergleich der NMR-Daten mit denen von Helicusin A zeigte viele Übereinstimmungen. Die Grundstruktur und die (2*E*)-3-Methyl-2-pentendioyl-Seitenkette wurden anhand der nahezu identischen Signale postuliert. Im ¹H-NMR-Spektrum konnte eine deutliche Hochfeld-Verschiebung von CH₃-17 und CH-12 beobachtet werden. Dies ließ auf eine Veränderung der Nachbarschaft durch einen Substituenten mit positivem mesomerem bzw. induktivem Effekt schließen. Da die ¹H-NMR-Spektren je einmal in CDCl₃ und in MeOD-*d*₄ gemessen wurden, konnte man zwei zusätzliche Signale erkennen, die den Rückschluss auf zwei Hydroxygruppen zuließen. Protonen von Hydroxygruppen der zu messenden Struktur werden in MeOD-*d*₄ durch Deuteriumatome ausgetauscht, weswegen sie nicht koppeln und kein Signal erzeugen. In CDCl₃ ist dieser Effekt nicht gegeben und somit die Hydroxygruppen der Struktur im ¹H-NMR-Spektrum sichtbar. Die plausibelste Möglichkeit war eine Addition von zwei Hydroxygruppen an die Doppelbindung zwischen C-11 und CH-12, welche ein vicinales Diol ergab. In den NMR-Spektren konnte für die 3,5-dimethyl-1-hepten-3,4-dihydroxy-1-yl-Seitenkette ein doppelter Signalsatz beobachtet werden. Dies könnte auf eine *E/Z*-Isomerie hinweisen.

Da der Naturstoff unbekannt war, wurde der Struktur der Name Helicusin E gegeben.

Summenformel: C₂₅H₃₀ClO₉

Aussehen: gelber Niederschlag

Ausbeute: 9,2 mg / 10 L Kulturmedium

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 219 (4,13), 244 (sh) (4,08), 291 (3,99), 300 (sh) (3,98), 359 (4,13), 375 (sh) (4,08), 400 (sh) (3,86), 420 (sh) (3,68), 450 (sh) (3,36), 485 (sh) (2,57)

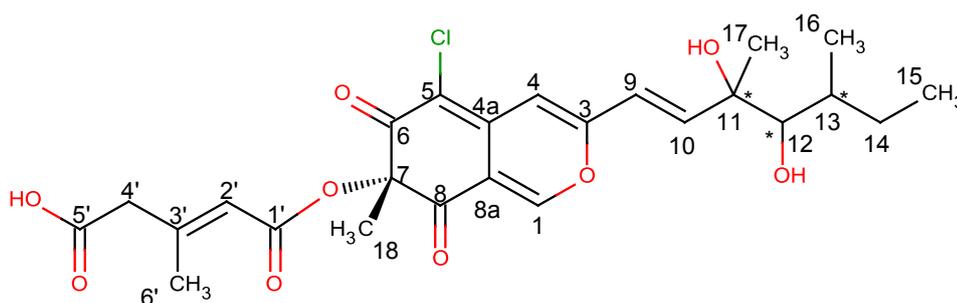
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7.93 (1H, s, H-1), 6.70 (1H, s, H-4), 6.68 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-10), 6.44 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-9), 6.00 (1H, d, H-2'), 3.54 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-12), 3.20 (2H, s, H-4'), 2.26 (1H, s, OH-12), 2.19 (3H, s, H-6'), 1.71 (1H, m, H-13), 1.58 (3H, s, H-18), 1.44 (1H, m, H-14a), 1.41 (1H, s, OH-11), 1.37 (3H, s, H-17), 1.33 (1H, m, H-14b), 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.93 (3H, t, $J = 8.4$ Hz, H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, CDCl_3): δ_{C} 191.7 (C, C-8), 186.3 (C, C-6), 173.2 (C, C-5'), 164.7 (C, C-1'), 156.6 (C, C-3), 154.3 (C, C-3'), 152.8 (CH, C-1), 145.5 (CH, C-10), 138.5 (C, C-4a), 119.7 (CH, C-9), 117.8 (CH, C-2'), 114.7 (C, C-8a), 111.7 (CCl, C-5), 107.6 (CH, C-4), 84.2 (C, C-7), 45.5 (CH_2 , C-4'), 35.4 (CH, C-13), 28.63 (CH_2 , C-14), 22.4 (CH_3 , C-18), 19.3 (CH_3 , C-17), 17.7 (CH_3 , C-6'), 13.4 (CH_3 , C-16), 11.9 (CH_3 , C-15).

HRESI-MS: m/z 509,1573 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{25}\text{H}_{30}^{35}\text{ClO}_9$: m/z 509,1585). Das Isotopenmuster ließ auf die Anwesenheit eines Chloratoms schließen.

CD-Spektroskopie:

Anhand der gemessenen CD-Spektren konnte die Konfiguration an C-7 bestimmt werden. Der negative Cotton-Effekt im Bereich von 340 bis 420 nm konnte durch den Vergleich mit Literaturwerten dieser Position zugeordnet werden und als S-Konfiguration identifiziert werden. Die Bestimmung der Konfiguration der drei anderen Stereozentren mittels CD- und NMR-Experimenten war nicht möglich.



Helicusin E (41)

4.4.4 Isochromophilon X

Die Daten von UV/VIS-Absorption und Molekülmasse konnten in keiner Datenbank einer bekannten Substanz zugeordnet werden. Das Isotopenmuster im Massenspektrum, ähnlich wie beim Helicusin A, deutete auf die Anwesenheit eines Chloratoms in der Summenformel hin. Die ungerade Molekülmasse wies auf eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül hin. Die experimentellen NMR-Daten deuteten auf eine strukturelle Ähnlichkeit zu Helicusin A an, jedoch traten zwei weitere Signale auf, die einer dritten Seitenkette zugeordnet wurden. In den NMR-Spektren konnte ebenfalls für die 3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl-Seitenkette ein doppelter Signalsatz beobachtet werden. Dies könnte auf eine *E/Z*-Isomerie hinweisen. Die Substanz wird ab sofort als Isochromophilon X bezeichnet.

IUPAC Name: (7R)-7-(acetyloxy)-5-chloro-3-((1E,3E,5S)-3,5-dimethyl-1,3-heptadienyl)-2-(2-hydroxyethyl)-7-methyl-6,8(2H,7H)-isoquinolinedion

Summenformel: C₂₇H₃₃ClNO₇

Aussehen: roter Feststoff

Ausbeute: 21,1 mg / 10 L Kulturmedium

Drehwinkel: $[\alpha]_D^{20}$ -138 ° (c 0,0225, MeOH)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 226 (4,30), 370 (4,25)

¹H-NMR (600 MHz, MeOD-*d*₄): δ_H 8.17 (1H, s, H-1), 7.20 (1H, s, H-4), 7.11 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-10), 6.58 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-9), 5.97 (1H, d, *J* = 1.1 Hz, H-2'), 5.78 (1H, d, *J* = 9.6 Hz, H-12), 4.24 (2H, m, H-1''), 3.85 (2H, m, H-2''), 3.21 (2H, s, H-4'), 2.54 (1H, m, H-13), 2.15 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, H-6'), 1.92 (3H, d, *J* = 1.0 Hz, H-17), 1.52 (3H, s, H-18), 1.47 (1H, m, H-14a), 1.36 (1H, m, H-14b), 1.04 (3H, d, *J* = 6.7 Hz, H-16), 0.90 (3H, t, *J* = 7.4 Hz, H-15)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, MeOD- d_4): δ_{C} 195.2 (C, C-8), 185.7 (C, C-6), 173.4 (C, C-5'), 166.3 (C, C-1'), 156.1 (C, C-3'), 151.9 (C, C-3), 148.7 (CH, C-12), 148.3 (C, C-4a), 146.4 (CH, C-10), 144.5 (CH, C-1), 133.9 (C, C-11), 118.7 (CH, C-2'), 117.3 (CH, C-9), 116.4 (CCl, C-5), 112.6 (CH, C-4), 101.4 (C, C-8a), 85.7 (C, C-7), 61.1 (CH₂, C-2''), 57.4 (CH₂, C-1''), 46.6 (CH₂, C-4'), 36.2 (CH, C-13), 31.2 (CH₂, C-14), 23.7 (CH₃, C-18), 20.6 (CH₃, C-16), 19.3 (CH₃, C-6'), 12.7 (CH₃, C-17), 12.4 (CH₃, C-15)

HRESI-MS: m/z 518,1941 [M+H]⁺ (berechnet für C₂₇H₃₃³⁵ClNO₇: m/z 518,1940).

Strukturaufklärung:

Die Summenformel wurde mittels HRESI-MS als C₂₇H₃₃ClNO₇ bestimmt. Das Isotopenmuster im Massenspektrum bestätigte die Anwesenheit eines Chloratoms im Molekül. Die Anzahl der Kohlenstoffe in der Summenformel stimmte mit der Anzahl an Signalen im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum überein. Das $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ -Experiment ermöglichte die Zuordnung der direkt gebundenen Wasserstoffatome zu den 27 Kohlenstoffsignalen. Es wurden fünf Methylgruppen, vier Methylengruppen, sechs olefinische Methingruppen und eine Alkylmethingruppe identifiziert. Die restlichen 11 Signale waren quartäre Kohlenstoffatome. Vier davon wurden Carbonylkohlenstoffatomen, sechs wurden olefinischen Kohlenstoffatomen und eines wurde als Kohlenstoffatom verbunden mit einem Sauerstoffatom zugeordnet. Es war offensichtlich, dass Isochromophilon X ebenfalls zu der Gruppe der Chloroazaphilone gehört. Im Vergleich mit literaturbekannten Strukturteilstücken (Yoshida *et al.*, 1995; Nam *et al.*, 2000; Michael *et al.*, 2003) konnte die Zuordnung zum Isoquinolin-6,8-dion-Grundgerüst mit einer 3,5-Dimethyl-1,3-heptadien-1-yl-Seitenkette erfolgen. Eine weitere Seitenkette war über eine Esterbindung an C-7 geknüpft und konnte der in Helicisin A beschriebenen Seitenkette (2*E*)-3-Methyl-2-pentendisäure zugeordnet werden. Die dritte Seitenkette wurde als an ein Stickstoffatom gebundener Hydroxyethylrest, wie bei Isochromophilon VI (Michael *et al.*, 2003), identifiziert.

Die 3,4-Dimethyl-1,3-heptadienyl-Seitenkette besaß zwei Spinsysteme, wobei das erste Spinsystem aus zwei Methylgruppen [CH₃-15 (δ_{H} 0.90, δ_{C} 12.4) und CH₃-16 (δ_{H} 1.04, δ_{C} 20.6)], einer Methylengruppe [CH_a-14 (δ_{H} 1.47, δ_{C} 31.2) / CH_b-14 (δ_{H} 1.36, δ_{C} 31.2)] und zwei Methingruppen bestand [CH-13 (δ_{H} 2.54, δ_{C} 36.2) und CH-12 (δ_{H} 5.78, δ_{C} 148.7)]. Das COSY-Experiment führte zu zwei Erkenntnissen: I. CH₃-15 war in Nachbarschaft zu CH₂-14 und II. CH-13 zeigte Kopplungen zu CH₂-14, zur Methylgruppe CH₂-16 und zur olefinischen Methingruppe CH-12. Das erste Spinsystem war durch das quartäre Kohlenstoffatom C-11 vom zweiten Spinsystem getrennt. Das zweite Spinsystem bestand aus zwei olefinischen Methingruppen [CH-10 (δ_{H} 7.11, δ_{C} 146.4) und CH-9 (δ_{H} 6.58, δ_{C} 117.3)]. C-9 verband die

Seitenkette mit dem Grundgerüst an C-3 (δ_C 151.9). Eine dritte Methylgruppe CH₃-17 (δ_H 1.92, δ_C 12.7) war an C-11 gebunden, was durch die Korrelation von C-17 zu C-10 und C-12 im ¹H-¹³C-HMBC-Experiment zu erkennen war. Die Seitenkette war somit komplett zugeordnet.

Im Grundgerüst wiesen die chemischen Verschiebungen von CH-1 (δ_H 8.17, δ_C 144.5) und C-3 (δ_C 151.9) auf ein Stickstoffatom in Nachbarschaft hin. CH-1 korrelierte mit C-3 über eine long-range ¹H-¹³C-HMBC-Kopplung über das Stickstoffatom. Zusätzlich zeigte CH-1 Korrelationen zu C-8a (δ_C 101.4), C-4a (δ_C 148.3) und C-8 (δ_C 195.2). Diese Korrelationen sind wichtige Hinweise für die Verknüpfung der quartären Kohlenstoffatome im Zweiringsystem des Isoquinolin-6,8-dion-Grundgerüsts. Die ¹H-¹³C-HMBC-Korrelationen des olefinischen Protonensignals von CH-4 unterstützten die beschriebene Struktur. Die chemische Verschiebung von CCI-5 wies auf eine Chlorierung an dieser Stelle hin. Die bekannten Chloroazaphilone sind ebenfalls an dieser Position chloriert und zeigen die gleiche chemische Verschiebung. Der Tieffeld-Verschiebungen von C-6 (δ_C 185.7) und C-8 wurden zwei Ketogruppen zugeordnet und vervollständigten damit die Struktur des Isoquinolin-6,8-dion Grundgerüsts. Die C-1' (δ_C 166.3) Kopplungen von der an dem Grundgerüst gebundenen Methylgruppe CH₃-18 (δ_H 1.52, δ_C 23.7) wies auf die direkte Nachbarschaft zu den beiden Ketogruppen, sowie zum Kohlenstoffatom C-7 (δ_C 85.7) hin.

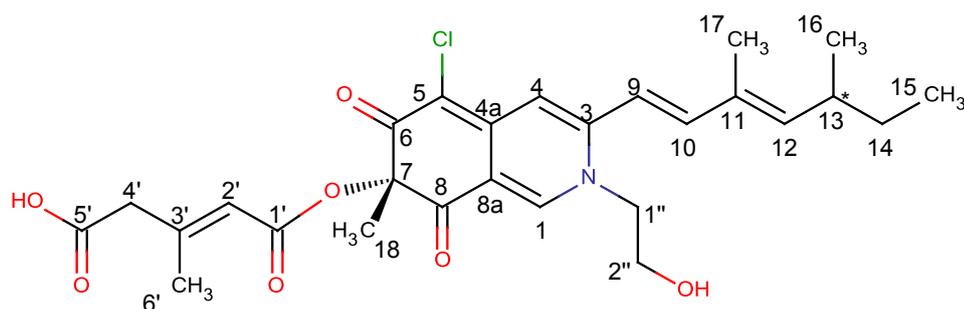
Die ¹H-¹³C-HMBC-Kopplungen von CH₂-1" (δ_H 4.24, δ_C 57.4) zu CH-1 und zu C-3 sowie die chemische Verschiebung bewiesen, dass CH₂-1" an das Stickstoffatom im Grundgerüst gebunden war. Das COSY-Experiment konnte beweisen, dass CH₂-1" und CH₂-2" (δ_H 3.85, δ_C 61.1) ein kleines Spinsystem ausbildeten und sich in direkter Nachbarschaft befanden. Wie die chemische Verschiebung von CH₂-2" zeigte, war CH₂-2" mit einer Hydroxygruppe substituiert. Die Seitenkette wurde als 2-Hydroxyethylrest identifiziert.

Die dritte Seitenkette war verzweigt und bestand aus einer Methylgruppe [CH₃-6' (δ_H 2.15, δ_C 19.3)], einer Carboxylgruppe [C-5' (δ_C 173.4)], einer Methylengruppe [CH₂-4' (δ_H 3.21, δ_C 46.6)], einem quartären Kohlenstoffatom [C-3' (δ_C 156.2)], einer olefinischen Methingruppe [CH-2' (δ_H 5.97, δ_C 118.7)], und einem als Ester verknüpften quartären Kohlenstoffatom [C-1' (δ_C 166.3)]. In der Seitenkette war kein Spinsystem vorhanden, weswegen sich die Aufklärung auf die ¹H-¹³C-HMBC-Daten stützte. CH₂-4' korrelierte auf der einen Seite mit C-5' und auf der anderen Seite mit CH-2'. CH-2' hingegen korrelierte mit CH-1' und CH-3'. CH₃-6' zeigte Korrelationen zu allen Kohlenstoffatomen in dieser Seitenkette, weswegen der Methylgruppe eine zentrale Position zugewiesen wurde. Durch diese Hinweise war die einzig plausible Struktur ein (2E)-3-Methyl-2-pentendioyl-Rest. Der Vergleich von Kopplungskonstanten und chemischen Verschiebungen aus dem ¹H-NMR-

Experiment mit Daten von Yoshida *et al.* (1995) bestätigte die Anordnung der Gruppen und die Anordnung der Doppelbindung.

Die einzig plausible Verbindungsstelle zum Grundgerüst war C-7, wobei die chemische Verschiebung von C-7 diese Annahme unterstützte.

Aus allen vorher genannten Hinweisen konnte die folgende Struktur für Isochromophilon X konstruiert werden.



Isochromophilon X (**42**)

CD-Spektroskopie:

Die Bestimmung der Konfiguration an C-7 konnte anhand der CD-Daten bei diesem Molekül nicht durchgeführt werden. Die Konfiguration wurde durch ein Spiking-Experiment ermittelt. Dazu wurde Helicusin A mit bekannter S-Konfiguration an C-7 durch eine semisynthetische Reaktion mit 2-Aminoethanol (Reaktionsbedingungen siehe Kapitel 2.13.1) zu Isochromophilon X umgesetzt. Das hergestellte Isochromophilon X wurde an chiraler Säule getrennt und die Retentionszeit bestimmt. Anschließend wurde das aus dem Pilz isolierte Isochromophilon X an chiraler Säule getrennt und die Retentionszeit bestimmt. Der Vergleich beider Messungen zeigte, dass die Retentionszeiten identisch waren. Somit stimmte die Konfiguration von Isochromophilon X an C-7 mit der von Helicusin A überein.

NMR-Daten:**Tabelle 11:** Daten aus den NMR-Experimenten (600 MHz, 150 MHz, MeOD-*d*₄) für Isochromophilon X

No.	δ_C	δ_H	Multi. (<i>J</i> in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	144.5	8.17	s		3, 5, 4a, 8, 8a, 1''	1''
3	151.9					
4	112.6	7.20	s		3, 5, 8, 8a, (9)	
4a	148.3					
5	116.4					
6	185.7					
7	85.7					
8	195.2					
8a	101.4					
9	117.3	6.58	d (15.5)	10	4, 10, 11, 12	17, 1''
10	146.4	7.11	d (15.5)	9	3, 9, 11, 12, 17	12
11	133.9					
12	148.7	5.78	d (9.6)	13, (17)	10, 13, 14, 17, 16	10, 14b, 16
13	36.2	2.54	m	12, 14, 16	11, 12, 14, 16, 15	14a, 16, 17
14a		1.47	m	13, 15	12, 13, 15, 16	13
14b	31.2	1.36	m	13, 15	12, 13, 15, 16	12
15	12.4	0.90	t (7.4)	14	13, 14	
16	20.6	1.04	d (6.7)	13	12, 13, 14	12, 13
17	12.7	1.92	d (1.0)	(12)	10, 11, 12, (14), (16)	9, 13
18	23.7	1.52	s		6, 7, 8	
1'	166.3					
2'	118.7	5.97	d (1.1)	(6')	1', 3', 4', 6'	4'
3'	156.1					
4'	46.6	3.21	s		2', 4', 5', 6'	2', 6'
5'	173.4					
6'	19.3	2.15	d (1.2)	(2')	1', 2', 3', 4', 5'	4'
1''	57.4	4.20	m	2''	1, 3, 2''	1, 9
2''	61.1	3.85	m	1''	1''	

Synthese von Isochromophilon X:

In der Literatur ist die hohe Affinität von Azaphilonen zu Amino-Verbindungen beschrieben. Aus diesem Grund wurde die biosynthetische Produktion von Isochromophilon X angezweifelt und von einer chemischen Reaktion ausgegangen. Die retrosynthetische Analyse von Isochromophilon X führte zu Helicusin A und 2-Aminoethanol (siehe Abbildung 28). Die Darstellung von Isochromophilon X aus Helicusin A erfolgte nach der in Kapitel 2.13.1 beschriebenen Vorschrift. Die Reaktion lief innerhalb weniger Minuten fast vollständig ab. Ein Aliquot des Reaktionsgemisches wurde mit dem HPLC-DAD/MS-System gemessen, um erstens zu bestätigen, dass Isochromophilon X gebildet wurde und um zum zweiten die Ausbeute zu bestimmen. Die Bildung von Isochromophilon X konnte zum einen durch die Molekülmasse und UV/VIS-Absorption, zum anderen durch ein Spiking-Experiment bestätigt werden. Die Ausbeute wurde anhand der Integralfächen im „Extracted Ion Chromatogram“-Modus für die Massen 518 und 475 m/z durchgeführt. Die Ausbeute des dargestellten Isochromophilon X lag bei über 99 %.

Um zu kontrollieren, ob 2-Aminoethanol in Malzmedium vorhanden ist, wurde Helicusin A in frisch hergestelltes Malzmedium gegeben und der Reaktionsansatz einen Tag lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Diese lange Zeit sollte dem Helicusin A die Möglichkeit geben, mit eventuell vorhandenem 2-Aminoethanol zu reagieren. Eine Analyse des Reaktionsansatzes konnte zeigen, dass sich Helicusin A nicht zu Isochromophilon X umgesetzt hatte.

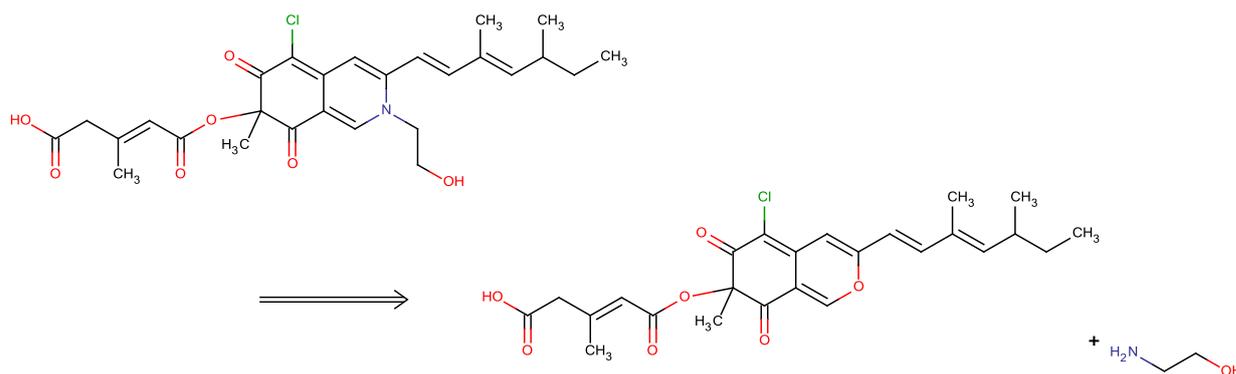


Abbildung 28: Retrosyntheschema zur Darstellung von Isochromophilon X

4.4.5 Isochromophilon XI

Die Recherche nach UV/VIS-Daten und Molekülmasse ergab mögliche Treffer in der „DNP“-Datenbank, aber das Kriterium eines Chloratoms in der Summenformel ließ keinen Treffer übrig. Der Großteil der NMR-Signale konnte zu den entsprechenden NMR-Signalen des Helicusin A zugeordnet werden. Das Signal von CH-1 fehlte, jedoch waren zwei Dubletts bei 4.76 und 4.05 ppm erkennbar. Die Kopplungskonstanten waren jeweils 12.5 Hz. Im ^1H - ^{13}C -HSQC-Experiment korrelierten beide Protonen mit einem Kohlenstoff, was für eine CH_2 -Gruppe sprach. Der Großteil der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum konnten durch den Vergleich mit denen von Helicusin A ebenfalls zugeordnet werden. Jedoch war eine starke Hochfeld-Verschiebung von C-1 von 152.8 auf 70.1 ppm zu erkennen. Auch das in Nachbarschaft befindliche C-8a wurde von 114.5 auf 68.0 ppm Hochfeld verschoben. Die Massendifferenz zwischen Helicusin A und Isochromophilon XI betrug 18. Aus diesen Hinweisen ergab sich eine Addition einer Hydroxygruppe an C-8a und eines Protons an C-1. In den NMR-Spektren konnte ebenfalls für die 3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl-Seitenkette ein doppelter Signalsatz beobachtet werden. Dies könnte auf eine *E/Z*-Isomerie hinweisen. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Isochromophilon X wurde der Name für diese Struktur fortlaufend als Isochromophilon XI vergeben.

Summenformel: $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{ClO}_8$

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 12,5 mg / 10 L Kulturmedium

UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ): 220 (4,09), 269 (3,75), 395 (4,23)

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ_{H} 7.07 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-10), 6.19 (1H, s, H-4), 6.04 (1H, d, $J = 15.7$ Hz, H-9), 5.94 (1H, s, H-2'), 5.66 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, H-12), 4.76 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-1a), 4.05 (1H, d, $J = 12.5$ Hz, H-1b), 3.18 (2H, s, H-4'), 2.46 (1H, m, H-13), 2.15 (3H, s, H-6'), 1.85 (3H, s, H-17), 1.82 (3H, s, H-18), 1.41 (1H, m, H-14a), 1.31 (1H, m, H-14b), 0.99 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-16), 0.86 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-15)

4.4.6 Deacetylsclerotiorin

Für Deacetylsclerotiorin wurde in den Datenbanken nach den experimentellen UV/VIS-Daten, der Molekülmasse und der Summenformel mit einem Chloratom gesucht. Die Kombination der Kriterien ergab keine Treffer. Beim Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit den Spektren von Helicusin A konnte der Großteil der Signale zugeordnet werden. Die Signale aus der (2*E*)-3-Methyl-2-pentendioyl-Seitenkette für CH-2', CH₂-4' und CH₃-6' waren im ^1H -NMR-Spektrum nicht zu erkennen. Hingegen trat im ^1H -NMR-Spektrum ein Signal bei 3.42 ppm auf, dass als Proton einer Hydroxygruppe gedeutet wurde. Die Massendifferenz zwischen Helicusin A und Deacetylsclerotiorin betrug 126 und entsprach damit genau der Masse der (2*E*)-3-Methyl-2-pentendioyl-Seitenkette. In der mir zugänglichen Literatur wurde die Extraktion von Deacetylsclerotiorin aus einem Mikroorganismus noch nicht beschrieben.

IUPAC Name: 5-Chloro-3-[3,5-dimethyl-1,3-heptadien-1-yl]-7-hydroxy-7-methyl-6*H*-2-benzopyran-6,8(7*H*)-dion

Summenformel: C₁₉H₂₂ClO₄

Aussehen: gelber Feststoff

Ausbeute: 16,3 mg / 10 L Kulturmedium

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 220 (3,99), 262 (3,80), 283 (3,81), 365 (4,05), 385 (sh) (4,02), 420 (sh) (3,88), 444 (sh) (3,69), 480 (sh) (3,25)

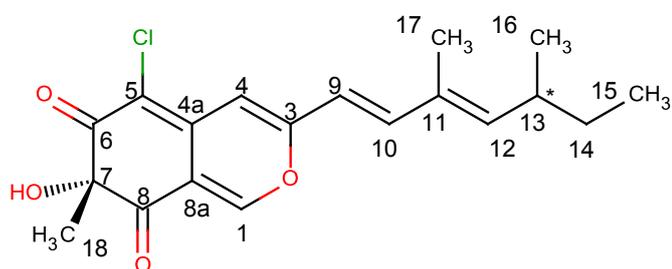
^1H -NMR (600 MHz, CDCl₃): δ_{H} 7.94 (1H, s, H-1), 7.09 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-10), 6.63 (1H, s, H-4), 6.09 (1H, d, J = 15.7 Hz, H-9), 5.73 (1H, d, J = 10.0 Hz, H-12), 3.42 (1H, s, OH), 2.49 (1H, m, H-13), 1.85 (3H, d, J = 1.0 Hz, H-17), 1.59 (3H, s, H-18), 1.44 (1H, m, H-14a), 1.32 (1H, m, H-14b), 1.01 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-16), 0.86 (3H, t, J = 7.5 Hz, H-15)

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl₃): δ_{C} 194.0 (C, C-8), 189.7 (C, C-6), 158.6 (C, C-3), 151.6 (CH, C-1), 149.3 (CH, C-12), 146.7 (CH, C-10), 143.4 (C, C-4a), 132.0 (CH, C-11), 118.0 (CCl, C-5), 115.6 (CH, C-9), 115.1 (C, C-8a), 106.0 (CH, C-4), 83.9 (C, C-7), 35.2 (CH, C-13), 30.0 (CH₂, C-14), 28.8 (CH₃, C-18), 20.2 (CH₃, C-16), 12.4 (CH₃, C-17), 12.0 (CH₃, C-15)

HRESI-MS: m/z 349,1205 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₉H₂₂³⁵ClO₄: m/z 349,1201).

CD-Spektroskopie:

Anhand der experimentellen CD-Spektren konnte die Konfiguration an C-7 bestimmt werden. Der negative Cotton-Effekt im Bereich von 340 bis 420 nm konnte durch den Vergleich mit Literaturwerten dieser Position zugeordnet werden und als *S*-Konfiguration identifiziert werden. Die CD-Spektren von Deacetylsclerotiorin, Helicusin A und Helicusin A-methylester zeigten alle identische Cotton-Effekte. Dies bestätigt, dass die drei Substanzen die gleiche Konfiguration an C-7 haben. Die Bestimmung der Konfiguration des zweiten Stereozentrums an C-13 war nicht möglich.

Deacetylsclerotiorin (**40**)

4.4.7 Bartanolid

Die Recherche bezüglich der experimentellen Daten von UV/VIS-Absorption und Molekülmasse der Substanz ergab vier Treffer. Wurde das Suchergebnis mit der berechneten Summenformel aus dem HRESI-MS-Spektrum von $C_{14}H_{21}O_6$ verglichen, konnten keine Übereinstimmungen mehr gefunden werden. Die UV/VIS-Absorptionsmuster und das Isotopenmuster entsprachen nicht denen der Chloroazaphilone. Der Vergleich auch von NMR-Daten mit den Daten der Chloroazaphilone zeigte, dass es sich um eine andere Substanzklasse handeln musste. Die NMR-Daten wiesen auf eine strukturelle Ähnlichkeit zu kleinen Polyketiden hin. Da die Struktur sich als unbekannt herausstellte, wurde die neue Struktur als Bartanolid bezeichnet.

Summenformel: $C_{14}H_{21}O_6$

Aussehen: weißlicher Feststoff

Ausbeute: 3,6 mg / 10 L Kulturmedium

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ $[\alpha]_D^{20}$ -36° (c 0,210, MeOH)

UV λ_{max}^{MeOH} nm (log ϵ): 220 (4,04)

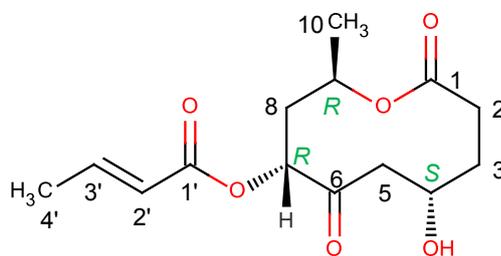
HRESI-MS: m/z 285,1338 $[M+H]^+$ (berechnet für: m/z 285,1333).

Strukturaufklärung:

Bartanolid zeigte strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen kleinen Polyketiden, wie beispielsweise Acetoxymultiplolide (Wu *et al.*, 2008) oder Achaetolide (Pilli *et al.*, 2000). Der Vergleich mit den NMR-Spektren der Azaphilone zeigte, dass es sich um eine andere Substanzklasse handelte. Die Anzahl der Kohlenstoffatome aus der berechneten Summenformel $C_{14}H_{21}O_6$ stimmten mit der Anzahl der Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum überein. Neun der Kohlenstoffatome formten den zehngliedrigen Laktoneering. Eine Methylgruppe war in Nachbarschaft des Esters und eine Seitenkette war über einen weiteren Ester an den Ring gebunden. Im COSY-Experiment konnten drei separate Spinsysteme beobachtet werden, wobei zwei zum Ring gehörten und das dritte System in der Seitenkette vorlag. C-1 (δ_C 173.5) konnte auf Grund der chemischen Verschiebung dem quartären Laktonesterkohlenstoffatom zugeordnet werden. In Nachbarschaft befand sich die Methylengruppe CH_2 -2 (δ_C 28.5, δ_H 2.58 und 2.38). CH_2 -2 war Teil des ersten Spinsystems,

welches bis zur Methylengruppe CH₂-5 (δ_C 42.8, δ_H 2.82 und 2.28) reichte. Des Weiteren gehörten noch die Methylengruppe CH₂-3 (δ_C 27.8, δ_H 2.20 und 1.68), sowie die Hydroxymethingruppe CH-4 (δ_C 66.2, δ_H 4.38) dazu. Das erste System war über eine Carbonylgruppe C-6 (δ_C 209.4) mit einem zweiten Spinsystem verbunden. Die Verbindung zwischen den beiden Spinsystemen konnte durch die long-range Kopplungen im ¹H-¹³C-HMBC von H-5, H-7 und H-8 zu C-6 bestätigt werden. Das zweite System bestand aus einer Methylgruppe CH₃-10 (δ_C 20.1, δ_H 1.24), einer Methylengruppe CH₂-8 (δ_C 40.5, δ_H 2.35 und 2.18) und zwei mit Sauerstoffatomen verknüpfte Methingruppen, CH-7 (δ_C 77.0, δ_H 5.02), sowie CH-9 (δ_C 67.9, δ_H 5.28). Durch die long-range Kopplung im ¹H-¹³C-HMBC von H-9 zu C-1 konnte der Ringschluß über die Esterbindung bestätigt werden. Analog dazu konnte eine long-range Kopplung von H-7 zu C-1' (δ_C 167.0) beobachtet werden, die ebenfalls einer Esterbindung zugeschrieben wurde. Mit der Estergruppe verknüpft ist die Seitenkette bestehend aus zwei Methingruppen, CH-2' (δ_C 122.7, δ_H 6.00) und CH-3' (δ_C 148.5, δ_H 7.00), sowie einer Methylgruppe CH₃-4' (δ_C 18.3, δ_H 1.96). Durch die Kopplungskonstanten der beiden Methingruppen von 15.6 Hz wurde die Konfiguration der Doppelbindung als *E*-Konfiguration angenommen.

Aus allen vorher genannten Hinweisen konnte die folgende Struktur für Bartanolid konstruiert werden.



Bartanolid (**44**)

CD-Spektroskopie:

In Verbindung mit den gemessenen NOE-Daten konnte die absolute Konfiguration der Struktur anhand der CD-Daten aufgeklärt werden. Mithilfe der NOE-Daten konnte man direkt darauf schließen, dass H-7 und H-9 entweder beide *S*- oder *R*-konfiguriert sein mussten. Ausschlaggebend waren dabei die NOE-Korrelationen zwischen H-3' mit H-5a und H-9, sowie H-9 mit H-5a (siehe grüne Pfeile Abbildung 29). Die NOE-Daten geben jedoch keine Auskunft über die Konfiguration von C-4. Es blieben also vier mögliche Konfigurationen übrig: *SRR*, *RSS*, *SSS* oder *RRR* (Benennung der Stereozentren im Uhrzeigersinn). Die Kopplungskonstante von 11.5-Hz zwischen H-5a und H-4 ließ darauf schließen, dass der Winkel bei ca. 180° liegen musste. Diese Konfiguration war nur möglich, wenn die *SRR*- oder *RSS*-Konfiguration vorlag. Zum Vergleich sind noch mal die berechneten Kopplungskonstanten für die *SRR*- und *RRR*-Konfigurationen, sowie die experimentelle

Kopplungskonstante in Abbildung 29 zu sehen. Die Konfigurationen *RSS* und *SSS* sind nicht dargestellt, da sie sich zu *SRR* und *RRR* spiegelbildlich verhalten und die gleichen Kopplungskonstanten ergeben würden.

Durch den Vergleich der experimentellen Online-CD-Daten mit den berechneten CD-Daten für die *SRR*- und *RSS*-Konfiguration konnte gezeigt werden, dass die *SRR*-Konfiguration die beste Übereinstimmung hatte (siehe Abbildung 30). Die absolute Konfiguration von Bartanolid ist oben gezeigt.

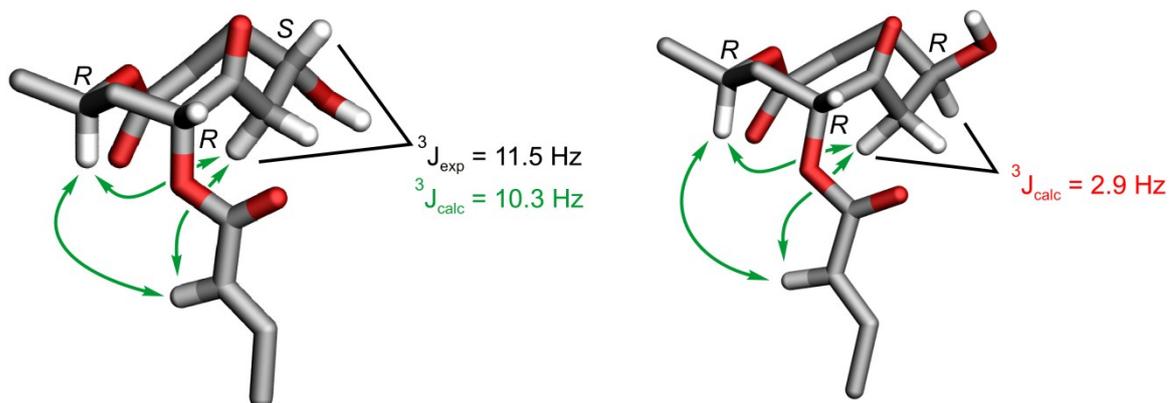


Abbildung 29: Zwei mögliche Konfigurationen von Bartanolid mit den berechneten Kopplungskonstanten zwischen H-5a und H-4. Die grünen Pfeile verdeutlichen die NOE-Korrelationen zwischen H-5a, H-9 und H-3'.

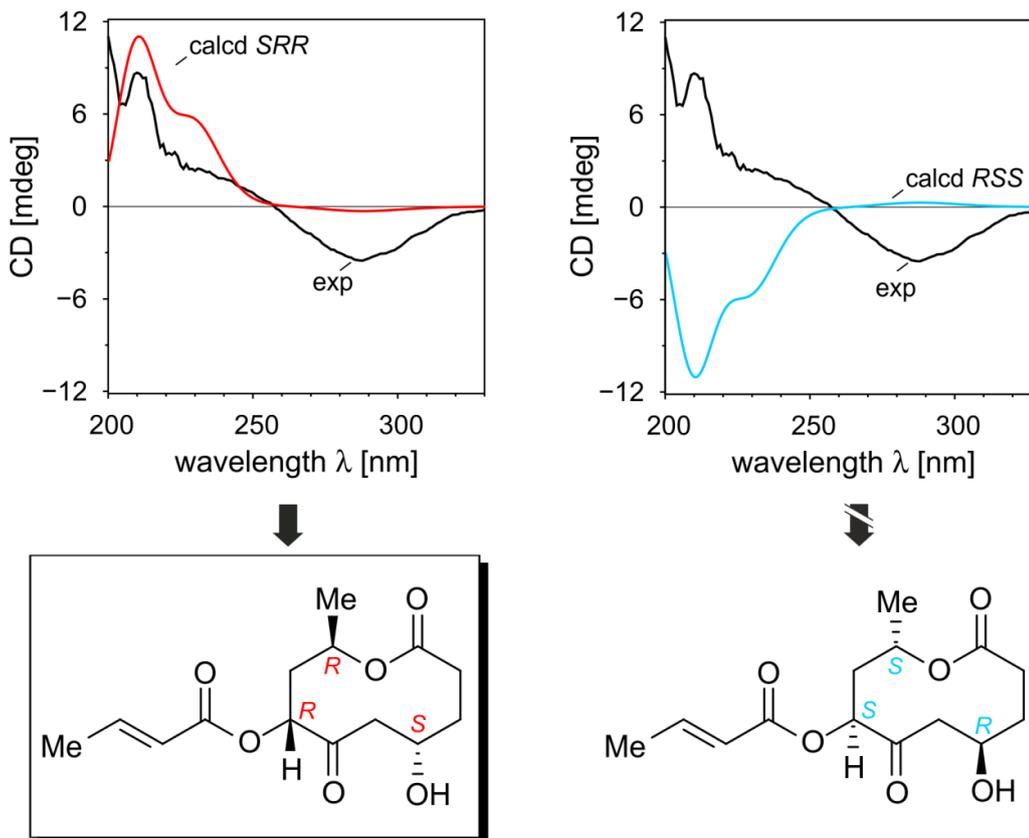


Abbildung 30: Der Vergleich zwischen berechneter CD-Spektren (rot: *SRR*-Konfiguration und blau: *RSS*-Konfiguration) und dem experimentellen CD-Spektrum (schwarz).

NMR-Daten:**Tabelle 12:** Daten aus den NMR-Experimenten (600 MHz, 150 MHz, MeOD-*d*₄) für Bartanolid

No.	δ_C	δ_H	Multi. (J in Hz)	COSY	HMBC	NOESY
1	173.5					
2a	28.5	2.58	ddd (18.2, 6.3, 2.3)	3	1, 3, 4	2b, 3b, 3a, 5a
2b		2.38	ddd (18.2, 12.8, 1.8)			3b, 3a, 8b, 2a
3a	27.8	2.20	dddd (15.5, 12.8, 2.3, 2.3)	2, 4	1, 2, 5	2a, 2b, 3b, 4
3b		1.68	dddd (15.5, 6.3, 4.5, 1.8)			3a, 4
4	66.2	4.38	dddd (11.5, 4.5, 4.5, 2.3)	3, 5	2, 5	3a, 3b, 5a, 5b
5a	42.8	2.82	dd (18.3, 11.5)	4	3, 4, 6	4, 5b, 9
5b		2.28	dd (18.3, 4.5)			5a
6	209.4					
7	77.0	5.02	dd (6.0, 1.8)	8	6, 8, 9, 1'	5a, 8b
8a	40.5	2.35	ddd (14.6, 12.5, 1.8)	7, 9	6	7, 8b, 9, 10
8b		2.18	ddd (14.6, 6.0, 2.4)			2b
9	67.9	5.28	ddq (12.5, 6.5, 2.4)	8, 10	1, 7, 8, 10	5a, 8a, 8b, 10
10	20.1	1.24	d (6.5)	9	8, 9	8a, 8b, 9
1'	167.0					
2'	122.7	6.00	dq (15.6, 1.8)	3', 4'	1', 4'	3', 4', 5a
3'	148.5	7.15	dq (15.6, 7.0)	2', 4'	1', 2', 4'	5a, 9, 2', 4'
4'	18.3	1.96	dd (1.8, 7.0)	2', 3'	2', 3'	2', 3'

4.5 Bioaktivität

Die Bioaktivitäten wurden von allen Reinsubstanzen, die aus dem Pilz *Bartalinia robillardoides* isoliert wurden, getestet. Um eine möglichst gute Aussage über die Bioaktivitäten zu erhalten, wurde ein breites Panel an Bioassays getestet. Die Ergebnisse aus den Tests des Rohextrakts in neun verschiedene Bioassays gaben einen ersten Hinweis der Bioaktivität. In Tabelle 13 ist gezeigt, dass der Rohextrakt *Bacillus subtilis* stark hemmt, jedoch die anderen Organismen nicht signifikant hemmt. Da dies nur ein erster Eindruck des Rohextraktes ist, wurden für die Reinsubstanzen einzelne IC₅₀-Werte bestimmt. In Tabelle 14 sind nur die Bioassays aufgelistet, in denen eine signifikante Hemmung zu beobachten war. Die Felder mit einer guten inhibierenden Wirkung sind grün hinterlegt. Es wurden weitere Bioassays durchgeführt, die jedoch keine Hemmung zeigten und nicht aufgelistet sind. Darunter waren: Krebszelllinien (HepG2, KIF5, NIH 3T3, HT29), Enzymassays (Glykogensynthasekinase, Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B, Reverse Transkriptase), antibakterielle Assays (*Staphylococcus lentus*, *Propionibacterium acnes*, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, *Xanthomonas campestris*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora*, *Ralstonia solanacearum*) und antifungische Assays (*Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*).

Tabelle 13: Prozentuale Hemmung der Bioassays von dem Rohextrakt des Vor-Screeningansatzes von *Bartalinia robillardoides*. (Abkürzungen und Methoden siehe Kapitel 2.12.1).

Organismus	<i>B.s.</i>	<i>E.c.</i>	<i>S.l.</i>	<i>P.fl.</i>	<i>C.a.</i>	<i>P.s.</i>	<i>X.c.</i>	<i>E.a.</i>	<i>R.s.</i>
Inhibition [%]	100-80	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20

Tabelle 14: Ausgewählte Bioaktivitäten der isolierten Substanzen aus dem Pilz *Bartalinia robillardoides*. Die grün hinterlegten Felder markieren IC₅₀-Werte <15 µM, also signifikante Aktivitäten.

	Antibakteriell		Antifungisch			Enzymassays	
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Septoria tritici</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	Phosphodiesterase 4	Acetylcholinesterase
Helicusin A (38)	>100 µM	>100 µM	24,4 µM	7,6 µM (±2,20)	7,23 µM (±1,20)	>10 µM	2,10 µM (±0,36)
Helicusin A-methylester (39)	>100 µM	>150 µM	>150 µM	>100 µM	>60 µM	>10 µM	>50 µM
Deacetylsclerotiorin (40)	38,8 µM	43,6 µM	24,0 µM	7,45 µM (±2,05)	2,83 µM (±0,59)	2,79 µM (±0,05)	>50 µM
Helicusin E (41)	>100 µM	>100 µM	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>10 µM	>50 µM
Isochromophilon X (42)	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>100 µM	>80 µM	11,7 µM (±0,80)	nicht bestimmt
Isochromophilon XI (43)	55,6 µM	78,4 µM	>100 µM	>100 µM	41,5 µM	8,30 µM (±1,14)	>50 µM
Bartanolid (44)	>100 µM	>100 µM	>200 µM	>100 µM	>100 µM	>10 µM	>50 µM
IC ₅₀ -Werte der Positivkontrolle	Chloramphenicol 1,45 µM (±0,13)	Chloramphenicol 2,13 µM (±0,11)	Nystatin 5,80 µM (±2,80)	Boscalid 0,53 µM	Clotrimazole 0,2 µM	Rolipam 0,75 µM (±0,05)	Huperzine <0,1 µM

4.6 Epigenetische Modulatoren

Durch Veränderung der Medien konnte bereits die Produktion von neuen Sekundärmetaboliten stimuliert werden. Deshalb wurde versucht durch den Zusatz von einem epigenetischen Modulator zur Kultur die Produktion ebenfalls zu stimulieren. Als epigenetischer Modulator wurde 5-Azacytidin zur Kultur von *Bartalinia robillardoides* zugesetzt. Wie in der Einleitung beschrieben, gehört 5-Azacytidin zur Gruppe der DNA-Methyltransferase-Inhibitoren.

Der Stamm wurde, wie in Kapitel 2.4 beschrieben, kultiviert und die Kolbeninhalte getrennt voneinander aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Probe mit 0 μM 5-Azacytidin diente als Referenz. Im chemischen Profil der Ansätze konnten keine Veränderung der Zusammensetzung der Sekundärmetabolite festgestellt werden. Die Ausbeuten waren jedoch stark gestiegen. Im Vergleich zur Kontrolle war die Probe mit 5 μM 5-Azacytidin mit 11,20 g Trockengewicht/L Kulturmedium und 108,3 mg Rohextrakt/L Kulturmedium mehr als dreimal so gut gewachsen. Bei der Probe mit 50 μM 5-Azacytidin war die Differenz nicht ganz so signifikant. Mit 5,61 g/L Trockengewicht und 63,7 mg/L Rohextrakt war der Wachstumsertrag nur doppelt so hoch wie der der Kontrolle.

Tabelle 15: Dargestellt sind die Ausbeuten von Trockengewicht und von Substanzmenge, jeweils der Mittelwert von 2 Kolbeninhalten.

Konzentration des 5-Azacyditin	Trockengewicht [g/L]	Extraktgewicht [mg/L]
0 μM	3,37	38,7
5 μM	11,20	108,3
50 μM	5,61	63,7

5 Diskussion

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Entdeckung von neuen bioaktiven Substanzen aus marinen Pilzen. Die ermittelten Daten sind in den vorangegangenen Kapiteln präsentiert worden. Hier sollen diese Daten unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert werden:

- Welche Ergebnisse und Schlüsse konnten aus einem Screening von verschiedenen marinen Pilzen einer Stammsammlung gezogen werden? Ist eine Dereplikation von bekannten Substanzen aus neuen Organismen durchführbar?
- Sind die Kriterien für die Auswahl von Stämmen aus einer Stammsammlung richtig gewählt worden? Dabei ist unter anderem zu beantworten, ob „Hotspot“-Standorte mariner Biodiversität eine Quelle für Produzenten neuer Naturstoffe sind.
- Welches Potential haben die ausgewählten Pilze in Bezug auf die Sekundärmetabolitproduktion und Bioaktivität? Welchen Einfluss haben Veränderungen der Kultivierungsbedingungen auf die Produktion von Sekundärmetaboliten?

5.1 Screening-Ansätze

In der Stammsammlung des KiWiZ befinden sich mehrere Tausend Pilzstämme. Da im Rahmen einer Dissertation nur wenige Stämme wirklich intensiv untersucht werden können, war eine Auswahl nach effizienten Kriterien unausweichlich. In der ersten Auswahl waren 101 Stämme aus der Stammsammlung. Die Selektierung einzelner Pilze erfolgte nach den folgenden Kriterien (siehe ebenso Kapitel 1.5):

- In der Literatur relativ wenig beschriebene Spezies. Das bedeutet, dass in der „Dictionary of natural products“-Datenbank (Blunt & Munro, 2011) nach der Gattung des Stammes gesucht wurde. Die Grenze wurde auf 50 für die entsprechende Gattung beschriebene Substanzen gelegt. Unterhalb dieser Grenze wurde der Pilz bezüglich seiner Naturstoffproduktion als wenig erforscht eingestuft. In der Internetdatenbank „Web of knowledgeSM“ (KnowledgeSM, 2012) wurde ebenfalls nach der Gattung recherchiert und das Resultat auf das Vorhandensein des Wortes „structure“ verfeinert. Die Grenze wurde hier auf 100 Publikationen festgelegt. Diese Werte beruhen auf Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe.
- Rohextrakt der Screening-Ansätze zeigte mindestens eine starke antibiotische Aktivität gegen einen Testorganismus. Da alle Rohextrakte der Vor-Screening-Ansätze gegen neun antibiotische Bioassays getestet wurden, konnte eine Vorauswahl von bioaktiven Rohextrakten erfolgen. Die Wahrscheinlichkeit, weitere

bioaktive Substanz aus einem Rohextrakt mit bioaktivem Potential zu isolieren ist groß.

- Stämme von „Hotspot“-Standorten (siehe Abbildung 2) wurden bevorzugt. Dieses Kriterium wurde gewählt, weil diese Regionen in der Literatur als sehr potente Standorte für neue Naturstoffe aus Pilzen, die aus marinen Invertebraten isoliert wurden, angesehen werden (Leal *et al.*, 2012). In einigen Regionen lag die Anzahl von neu beschriebenen Naturstoffen bei über 500 Substanzen innerhalb von 10 Jahren. Die Wahrscheinlichkeit ebenfalls neue Naturstoffe aus Stämmen dieser Herkunft zu finden, wurde als hoch eingeschätzt.

Die Kriterien verkleinerte die Anzahl an Pilzen auf 17 verschiedene Pilzstämme. Diese stammten alle aus verschiedenen Gattungen (Detailliertes Flussschema siehe Seite 39 Abbildung 16). Die 17 Stämme wurden aus Proben von neun verschiedenen Habitaten isoliert, wovon fünf Standorte den sogenannten „Hotspot“-Regionen der biologischen Diversität zugeordnet werden. Nach einer erneuten Kultivierung konnten aus dieser Auswahl sechs Stämme aus Machbarkeitsgründen nicht weiter bearbeitet werden. Entweder war die Kultivierung und somit das chemische Profil nicht reproduzierbar, die produzierte Menge war für eine sinnvolle chromatographische Trennung zu gering oder die UV/VIS-Absorptionen waren zu gering, um sie mit dem DAD-Detektor zu analysieren.

Ersteres ist ein bekanntes Phänomen (Imhoff *et al.*, 2011), kann aber auch auf eine Kontamination der Screening-Ansätze oder der erneuten Anzucht zurückzuführen sein. Die zweite Problematik hätte sicherlich mit einem sehr großen Kultivierungsansatz gelöst werden können, hätte aber den Labormaßstab überschritten. Für die dritte Problematik gab es keine zur Verfügung stehende methodische Alternative, denn bei den verwendeten Methoden war die Absorption im UV/VIS-Bereich zwingend erforderlich. Zum einen ist eine Dereplikation ohne UV/VIS-Daten nicht möglich bzw. es kann keine Einschränkung der Datenbanktreffer erfolgen. Zum anderen ist eine chromatographische Trennung der Rohextrakte zu Reinsubstanzen an den vorhandenen HPLC-Systemen nicht möglich, denn die zur Verfügung stehenden chromatographischen Trennverfahren wurden anhand der Signalstärke des UV/VIS-Detektors durchgeführt.

Im erweiterten Screening wurden also insgesamt elf Stämme in Großansätzen (10 L) kultiviert und nach dem Standardschema (siehe Kapitel 2.3) aufgearbeitet. Bei den Großansätzen der Pilzkulturen entsprach die chemische Zusammensetzung der Extrakte dem chemischen Profil der Extrakte des jeweiligen Stammes aus dem Vor-Screening (100 mL Maßstab, Daten aus KiWiZ-Datenbank, unveröffentlicht). Insgesamt konnten 43 Metabolite detektiert werden. Zwölf dieser Metabolite konnten anhand von experimentellen

UV/VIS- und MS-Daten und teilweise mit Daten von NMR-Experimenten derepliziert werden. In der Tabelle 2 (Seite 40) sind die sieben Stämme aufgelistet, aus denen die zwölf Substanzen isoliert wurden, mit den Molekülmassen, charakteristischen UV/VIS-Absorptionen und den verwendeten Dereplikationsdaten für die Substanzen.

Bei der Dereplikation der Substanzen fiel auf, dass einige Substanzen lediglich aus anderen Organismen bekannt waren. Beispielhaft sei hier der Stamm LF840 (*Helicoma isiola*) erwähnt, aus dem 6-Methylsalicylsäure isoliert werden konnte. Die Substanz wurde mittels der experimentellen UV/VIS-, MS- und NMR-Daten eindeutig derepliziert. Die Recherche in verschiedenen Datenbanken konnte die Substanz mit der Gattung *Helicoma* nicht in Verbindung bringen. In der „DNP“-Datenbank ist die Isolierung von 6-Methylsalicylsäure aus den Organismen *Eriodictyon angustifolium*, *Botryosphaeria rhodina*, *Phoma sorghina*, *Phyllosticta*, *Penicillium* spp. und *Streptomyces* spp. beschrieben. Somit ist diese Arbeit der erste Nachweis für die Produktion von 6-Methylsalicylsäure in *Helicoma isiola*. Insgesamt wurden sechs Substanzen entdeckt, deren Isolation erstmalig aus den jeweiligen Pilzgattungen in der vorliegenden Arbeit beschrieben wurde. Die Substanzen sind in der Tabelle 2 mit einem ^a gekennzeichnet.

In den folgenden Abschnitten sollen die vier grau hinterlegten Stämme, die intensiver untersucht wurden (siehe Tabelle 2 und Abbildung 16, Seite 39) dezidiert diskutiert werden.

5.2 Spezifisches Screening zur Veränderung des Metabolitspektrums

Die vier grau hinterlegten Stämme (LF858, KF238, LF271 und LF550) wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt, da bei ihnen eine Dereplikation aus den Rohextrakten der Vor- und erweiterten Screening-Ansätze nicht möglich war, d.h. dass es sich bei den Metaboliten um neue Substanzen handeln könnte. Um das Metabolitspektrum dieser Pilze darüber hinaus zu erweitern, wurde außerdem der Einfluss von Veränderungen der Kultivierungsbedingungen auf den Sekundärstoffwechsel erforscht. Das Potential sollte durch die Stimulation nach dem OSMAC-Prinzip (Bode *et al.*, 2002; Fischbach & Clardy, 2007; Imhoff *et al.*, 2011) ausgeschöpft werden.

Insbesondere möchte ich hier einen dieser vier Stämme hervorheben. Der Stamm *Bartalinia robillardoides* (siehe Kapitel 5.3) zeigte sich als sehr potenter Kandidat für die Produktion von neuen Sekundärmetaboliten. Aus diesem Stamm konnten vier neue Naturstoffe isoliert werden. Durch die Stimulierung nach dem OSMAC-Prinzip konnte das Potential zur Produktion von neuen Sekundärmetaboliten erfolgreich ausgeschöpft werden. Um das Potential des Pilzes weiter zu stimulieren, wurde ein epigenetischer Modulator verwendet.

5.2.1 *Eurotium rubrum*

Ein *Eurotium rubrum* Stamm wurde aus einer marinen Probe isoliert, die auf der Polarstern-Expedition ANT11/5 1994 von Kapstadt nach Bremerhaven genommen wurde. Diese Fahrtroute zählt zu einem großen Teil nach Leal *et al.* nicht zu „Hotspot“-Standorten. *Eurotium rubrum* ist ubiquitär im Erdboden zu finden, wird in der Literatur aber auch als mariner Pilz beschrieben (Smetanina *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Die im chemischen Screening entdeckte Vielfalt der Sekundärmetabolitproduktion konnte in mehreren Großansätzen reproduziert werden. Aus dem in WSP30-Medium kultivierten Stamm LF858 konnten insgesamt 13 Substanzen isoliert werden. Alle 13 Substanzen wurden chromatographisch zu Reinsubstanzen aufgearbeitet. Neun Substanzen konnten aufgrund der gleichen Grundgerüste den Echinulinen (**45**) zugeordnet werden. Bei Echinulinen sind der Diketopiperazin-Ring und das Indol-Grundgerüst mit einer 2-Methyl-3-buten-2-yl-Seitenkette charakteristisch (siehe Abbildung 31). Viele der Substanzen wurden bereits aus der Gattung *Eurotium* isoliert und beschrieben. Die Isolierung von Variecolorin E aus *Eurotium* sp. wurde in der mir zugänglichen Literatur noch nicht beschrieben. Die Produktion für den Organismus ist aber dennoch nicht überraschend, denn zum einen gehört Variecolorin E ebenfalls zur Gruppe der Echinuline, kommt also aus dem gleichen Biosyntheseweg, und zum anderen wurde Variecolorin E bereits aus dem nahen Verwandten *Aspergillus varicolor* isoliert (Wang *et al.*, 2007). Außerdem konnten drei Metabolite aus der Gruppe der Auroglaucine sowie Physicon isoliert werden, die bereits aus *Eurotium* sp.-Stämmen isoliert wurden (Ishikawa *et al.*, 1984; Smetanina *et al.*, 2007; Slack *et al.*, 2009).

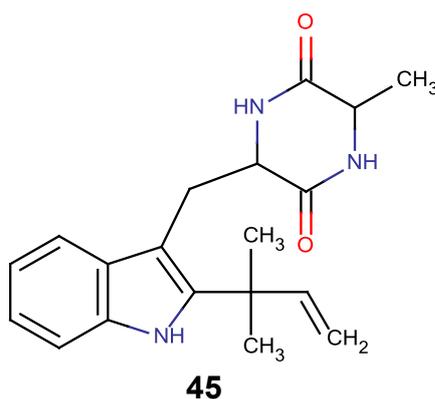


Abbildung 31: Charakteristisches Grundgerüst der Echinuline, hier das strukturell Einfachste: Preechinulin (**45**).

Da der Pilz unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen bereits 13 Metabolite produziert, wurde ein sehr potenter Biosynthesemechanismus erwartet. Durch Variation der Kulturmedien sollte versucht werden, diesen Mechanismus weiter zu stimulieren, um zusätzliche Metabolite zu isolieren. Der Stamm wurde dazu in fünf verschiedenen Medien (2,0 % ME, ME+TM, MB, SM+TM und WSP30+TM) kultiviert. Der Ansatz in 2 % ME-Medium

wurde verworfen, da der Pilz in diesem Medium nicht anwuchs. In den anderen vier Medien konnte ein gutes Mycelwachstum festgestellt werden. Da im Gegensatz zum 2 % ME-Medium alle anderen Medien Natriumchlorid enthalten, ist davon auszugehen, dass Natriumchlorid notwendig für das Wachstum des Pilzes ist. In der Literatur ist für *Eurotium* sp. beschrieben, dass die Kultivierung in kochsalzhaltigen Medien durchgeführt wurde (Ishikawa *et al.*, 1984; Smetanina *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012). Die Auswertung der experimentellen Daten des Rohextraktes ergab, dass sich die Zusammensetzung der Sekundärmetabolite im Vergleich zum Rohextrakt aus WSP30-Medium nicht verändert hatte. Die Menge an produziertem Rohextrakt – und damit der Metabolite – variierte hingegen und war aus SM+TM-Medium am geringsten und aus WSP30+TM-Medium am meisten. Repräsentativ für die Produktionsmenge wurden die Integralflächen von Neoechinulin A in den UV/VIS-Chromatogrammen verwendet, um die Produktivität zu beurteilen. Im Vergleich zum SM+TM-Medium war die Integralfläche im WSP30+TM-Medium um das zehnfache größer. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Variation der Kulturbedingungen nicht die Gene neuer Biosynthesewege anzuschalten vermochte, jedoch regulatorischen Einfluss auf die in allen Medien verwendeten Biosynthesewege nahmen. Die Aktivität des Rohextraktes gegen *Bacillus subtilis* konnte der Substanz Neoechinulin A zugeordnet werden. Kuramochi *et al.* (2008) haben neben einer Totalsynthese für Neoechinulin A auch eine zytoprotektive Aktivität gegen Peroxynitrite aus SIN-1 in PC12 Zellen beschrieben. Für alle anderen Substanzen sind in der Literatur antibakterielle, antifungische, antileishmaniale und antimalaria Aktivitäten beschrieben (Slack *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2012).

5.2.2 *Lewia infectoria*

In der Stammsammlung des KiWiZ sind 13 Stämme hinterlegt, die als *Lewia infectoria* identifiziert worden waren. Die Stämme wurden aus drei verschiedenen Habitaten isoliert: I. Proben, die durch Tauchgänge an der italienischen Mittelmeerinsel Elba gesammelt wurden; II. Proben, die während der Polarstern-Expedition ANT11/5 1994 gesammelt wurden; III. Proben aus einem Schwamm, der im kroatischen Limski-Fjord gesammelt wurde. Aus den letzteren wurden zwei *Lewia infectoria* Stämme isoliert, die bei Wiese *et al.* (2011) charakterisiert wurden.

Da bekannt ist, dass verschiedene Stämme einer Art durchaus sehr verschiedene Metabolitspektren aufweisen können (Bringmann *et al.*, 2010), war die Fragestellung bei diesen Stämmen, ob alle dieselben Sekundärmetabolite produzieren und ob die Produktion der Sekundärmetabolite durch eine Veränderung der Kulturbedingungen stimuliert werden kann.

Der Vergleich der experimentellen Daten von den Rohextrakten der Vor-Screening-Ansätze im gleichen Medium zeigte, dass alle Stämme das gleiche Metabolitspektrum aufwiesen. Wegen dieser Erkenntnis wurde nur ein Stamm für weitere Untersuchungen verwendet. Ivanova *et al.* (2010) konnten ebenfalls zeigen, dass vier *Alternaria infectoria* Stämme (Anamorphe von *L. infectoria*) von vier verschiedenen Probenstandorten die gleichen Sekundärmetabolite produzieren.

Aus einem Großansatz in WSP30-Medium konnten insgesamt sechs Metabolite (siehe Tabelle 7) isoliert und durch Dereplikation einer literaturbekannten Substanz zugeordnet werden. Bei einem der sechs Metabolite konnte anhand der experimentellen UV/VIS- und MS-Daten keine Zuordnung zu Phomenin A oder B durchgeführt werden. Die beiden Substanzen unterscheiden sich in der Konfiguration der endständigen Doppelbindung in der Seitenkette. Aus den Daten der experimentellen NMR-Experimente konnte durch Vergleich mit Daten aus der Literatur die Metabolite als Phomenin A und Infectopyron identifiziert werden (Ivanova *et al.*, 2010). Infectopyron, Phomenin A und Novaezelandin A wurden aus *Alternaria infectoria* bereits beschrieben (Ivanova *et al.*, 2010), alle anderen Substanzen sind weder aus der Gattung *Alternaria* noch aus *Lewia* beschrieben. Für Phomenin A, ebenso als Phomapyron A beschrieben, wurde ein Biosynthesewege beschrieben (Pedras & Chumala, 2005; Cutignano *et al.*, 2012), der auch für die Produktion von Phomapyron D und E genutzt wird. Auch der Biosyntheseweg für Rosellisinaldehyd ähnelt dem eben genannten für die Bildung von Phomopyronen (Tezuka *et al.*, 1994). Der Unterschied besteht lediglich in der Verknüpfung und somit Bildung des Pyronrings.

Der Stamm wurde in insgesamt sechs verschiedenen Medien kultiviert, um die Produktion von Sekundärmetaboliten zu stimulieren. Die Auswertung der experimentellen Daten des Rohextraktes ergab, dass sich die Zusammensetzung im Vergleich zum Rohextrakt aus WSP30-Medium nicht verändert hatte. Es konnte aber auch hier gezeigt werden, dass das Medium einen Einfluss auf die Produktivität hatte. In fünf von sechs Medien wurde anhand der Integrale der UV/VIS-Absorptionen von Phomenin A und Infectopyron die Produktionsrate bestimmt. Es wurde beobachtet, dass Phomenin A in fünf von sechs verwendeten Medien als Hauptmetabolit auftrat. Infectopyron hingegen war bei der Kultivierung in Hafer-Medium als Schüttelkultur der Hauptmetabolit. Die Bioaktivitäten von den Reinsubstanzen Phomenin A und Infectopyron wurden ermittelt und die Ergebnisse in Tabelle 8 aufgelistet. Die in Tabelle 6 gemachten Beobachtungen, dass alle drei ausgewählten Stämme unterschiedliche Aktivitäten in den Bioassays der Screening-Ansätze hatten, konnte nicht reproduziert werden. In der Literatur wird Infectopyron als potentes Mykotoxin beschrieben (Larsen *et al.*, 2003), wobei es nicht zytostatisch wirkt (Ivanova *et al.*, 2010). Diese beschriebenen Eigenschaften decken sich gut mit den von mir beobachteten Eigenschaften der Bioaktivität.

5.2.3 *Eutypella scoparia*

Dieser Pilz wurde aus einer Probe des Hornkieselschwammes *Ircinia* sp. isoliert. Die Probenahme fand bei St. Giovanni, Italien, Mittelmeer, statt. Für diesen Stamm, der nur einmal in der Stammsammlung konserviert war, wurden im Vorscreening keine Bioassays durchgeführt. Der Stamm wurde ausgewählt, da er zwei Kriterien erfüllte, zum einen ist die Gattung ein seltener Vertreter, und zum anderen stammte der Schwamm aus einem „Hotspot“-Gebiet.

Die Kultivierung bei unseren Standardbedingungen (siehe Kapitel 2.3) zeigte, dass der Stamm nur moderat wuchs. Der Stamm wurde daraufhin erneut in WSP30-Medium, diesmal als Schüttelkultur, kultiviert und zusätzlich in drei weiteren Medien (GPY, Hafer und 3 % ME), jeweils als Schüttel- und Standkultur in einem Erlenmeyerkolben mit einer Schikane. Der Medienvariationsversuch zeigte, dass die Menge an produziertem Rohextrakt aus 3 % ME-Medium als Schüttelkultur am höchsten war. Die Auswertung der UV/VIS- und MS-Daten bestätigte durch die hohen Intensitäten der Signale die starke Produktionsrate im 3 % ME-Medium. Eine Veränderung der Zusammensetzung des chemischen Profils konnte nicht festgestellt werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die Menge an verschiedenen Metaboliten Maxima zu unterschiedlichen Extraktionszeitpunkten zeigten. Die Auswertung der experimentellen UV/VIS- und MS-Messungen ergab, dass im Rohextrakt acht Metabolite vorhanden waren. Die Dereplikation aus dem Rohextrakt war nur schwer durchführbar, da die Absorptionsmaxima im unteren Wellenlängenbereich (215-220 nm) lagen. Dieses Suchkriterium führte bei der Recherche in den verwendeten Datenbanken zu einer Vielzahl an Treffern.

Die präparative chromatographische Trennung des Rohextraktes eines 10 L Großansatzes ergab sieben Fraktionen. Insgesamt konnten in den ersten fünf Fraktionen fünf Substanzen anhand der gemessenen Molekülmasse, UV/VIS-Absorption und NMR-Spektren einer bekannten Substanz (siehe Tabelle 9, Seite 15) zugeordnet werden. In der sechsten Fraktion waren zwei Substanzen, die eine nahezu identische Retentionszeit hatten. Eine Trennung auf den vorhandenen Säulen war auch bei isokratischer Elution nicht möglich. Zusätzlich war die exakte Zuordnung der Molekülmasse in den MS-Spektren nicht möglich, da eine starke Fragmentbildung beobachtet wurde und das Mutterion nicht zu identifizieren war. Diese Beobachtung konnte auch bei der siebten Fraktion beobachtet werden. Hinzu kommt, dass die Substanz in dieser Fraktion nicht UV-stabil war und in kleinere Derivate zerfiel (Wakimoto & Abe, 2012).

Die in Tabelle 9 beschriebenen Substanzen wurden alle aus der Gattung *Eutypella* bereits isoliert. Insgesamt sind in der „DNP“-Datenbank für diese Gattung zwölf Substanzen hinterlegt. Es sind zwei Strukturen dabei, die jeweils eine instabile Gruppe, ein Epoxid und ein cyclisches Carbonat, besitzen. Diese können vor allen Dingen unter leicht sauren

Bedingungen oder Einwirkung von UV-Strahlung leicht zerfallen. Es ist anzunehmen, dass in meiner sechsten und siebten Fraktion ebenfalls Substanzen vorkommen, die ähnlich instabile Gruppen besitzen. Im Hinblick auf weitere chromatographische Trennungen und experimentelle Messungen sowie einer Etablierung der Substanzen als Medikamente sind solch instabile Substanzen nur schwer zu handhaben.

Bioassays der isolierten Reinsubstanzen wurden nicht durchgeführt, da die nicht zerfallenen Substanzen literaturbekannt waren und bereits Bioaktivitäten beschrieben wurden (Dettrakul *et al.*, 2003; Pongcharoen *et al.*, 2006).

5.3 *Bartalinia robillardoides*

In der Literatur wird *Bartalinia robillardoides* als Produzent für Paclitaxel beschrieben (Gangadevi & Muthumary, 2008). Bis dato ist Paclitaxel der einzige Metabolit, der für die Gattung *Bartalinia* beschrieben wurde. Die Ergebnisse in der Diplomarbeit von Frau Silber (2009) zeigten, dass eine Medienvariation die Sekundärmetabolitproduktion verändern konnte. Aus dem mir vorliegenden Stamm der Spezies *B. robillardoides*, kultiviert in 2 % ME-Medium, konnten insgesamt sieben Substanzen isoliert werden, wovon vier unbekannt und drei bekannte Naturstoffe waren. Paclitaxel konnte weder aus Kulturen in 2 % ME-Medium noch im MB-, TSB-, SPM- oder WSP30-Medium isoliert werden. Eine der unbekannt Substanz zeigte strukturelle Ähnlichkeiten zu kleinen Polyketiden wie beispielsweise Acetoxymultiplolid (Wu *et al.*, 2008) oder Achaetolid (Pilli *et al.*, 2000). Die verbleibenden sechs Substanzen wurden wegen ihren charakteristischen Eigenschaften in die Gruppe der Chloroazaphilone eingeordnet. Chloroazaphilone sind Azaphilone mit einem Chloratom. Außerdem charakteristisch für diese Gruppe ist ein 7-Hydroxy-7-methyl-isochromen-6,8-dion-Grundgerüst (Chruma *et al.*, 2009) mit einer hohen Affinität zu primären Aminen (Wei & Yao, 2005). Azaphilone werden unter anderem als Pigmente verwendet und haben eine breitgefächerte Bioaktivität (siehe Referenzen in Osmanova *et al.*, 2010). Ebenfalls in diesem Review sind über 170 Azaphilone aus 13 verschiedenen Pilzfamilien beschrieben worden. Davon zählen 51 zu den Chloroazaphilonen und sind lediglich aus den fünf Gattungen *Penicillium*, *Chaetomium*, *Emericella*, *Talaromyces* und *Fusarium* (Osmanova *et al.*, 2010) isoliert worden. Die Isolierung der Azaphilone bzw. Chloroazaphilone aus einem Pilz ist also nicht ungewöhnlich, aber bis jetzt ist die Produktion von Azaphilonen bzw. Chloroazaphilonen aus der Gattung *Bartalinia* in der Literatur noch nicht beschrieben worden.

Helicusin A konnte durch Vergleich der literaturbekannten Daten mit den experimentellen Daten von Molekülmasse, UV/VIS-Absorption und NMR-Experimente derepliziert werden.

Die Bestimmung der absoluten Konfiguration erfolgte mit experimentellen CD-Daten. Die Konfiguration an C-7 konnte als S-Konfiguration aus den CD-Spektren ermittelt werden, die Konfiguration an C-13 jedoch nicht. Das chirale Zentrum C-13 liegt zu weit außerhalb des chromophoren Zentrums, um noch einen akzeptablen und brauchbaren Cotton-Effekt zu erzeugen. Erschwerend kommt hinzu, dass die Doppelbindung zwischen C-11 und C-12, sowie zwischen C-9 und C-10 in der *E*-Konfiguration nicht stabil ist und sich zur *Z*-Konfiguration umlagert. Die *E/Z*-Isomerisierung ist in leicht saurem Milieu sogar noch begünstigt (Germain *et al.*, 2011). Da die Substanzen mit säurehaltigen Lösungsmitteln von den chromatographischen Säulen eluiert werden, kann dort leicht eine Isomerisierung stattfinden. Die vielen möglichen Konfigurationen, alleine dieser Seitenkette, sind zu komplex und auch rechnerisch schwer lösbar, um sie per CD-Spektroskopie zu bestimmen.

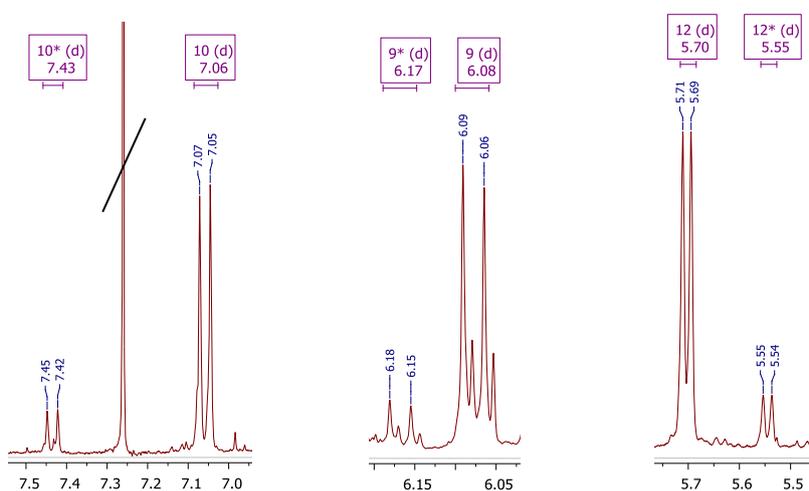


Abbildung 32: Ausschnitte aus einem in CDCl_3 gemessenem ^1H -NMR-Spektrum von Helicisin A. Die Nummern an den Multiplets geben die Protonen-Position im Helicisin A an. Die mit * markierten Multiplets sind Signale, die von einer anderen Konfiguration herrühren.

Im experimentellen ^1H -NMR-Spektrum von Helicisin A ist die *E/Z*-Isomerisierung gut zu erkennen. Vor allen Dingen bei den Signalen von H-10, H-9 und H-12 kann man, wie in Abbildung 32 gezeigt, gut einen doppelten Signalsatz erkennen.

Helicisin A-methylester konnte ebenfalls wie Helicisin A durch Vergleich von literaturbekannten und experimentellen Daten derepliziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass Helicisin A-methylester kein Sekundärmetabolit des Stammes ist, sondern ein Artefakt aus der Herstellung der Rohextrakte. Der Rohextrakt wurde immer wieder mit MeOH gelöst, um ihn beispielsweise in ein Braunglasvial zu überführen oder für eine weitere chromatographische HPLC-Messung zu lösen. Durch die wiederholte Zugabe von MeOH könnte die Säuregruppe von Helicisin A mit MeOH verestert werden. Um diesem Gedankengang nachzugehen, wurde die Herstellung eines Extraktes anstelle mit MeOH mit

ACN durchgeführt. Die Analyse der experimentellen Daten der UV/VIS- und MS-Messungen zeigten, dass es weder eine UV/VIS-Absorption im Bereich der Retentionszeit von Helicusin A-methylester noch eine Molekülmasse von 489 m/z gab. Somit war der Beweis für die Bildung eines Artefakts erbracht (Maltese *et al.*, 2009).

Zur Bestimmung der Absolutkonfiguration wurden die Daten der CD-Spektren ausgewertet. Das Ergebnis war, dass die Spektren von Helicusin A-methylester und Helicusin A die gleichen Cotton-Effekte aufwiesen. Aus diesen Informationen und durch den Vergleich mit literaturbekannten Werten konnte die S-Konfiguration von C-7 geschlussfolgert werden. Die Konfiguration an C-13 konnte, wegen den gleichen Gründen wie bei Helicusin A, nicht ermittelt werden.

Die dritte bekannte Substanz ist **Deacetylsclerotiorin**. Die Struktur zeigte in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren große Ähnlichkeiten zu der Struktur von Helicusin A und wurde ebenfalls anhand von Literaturdaten (Abraham *et al.*, 1941) zugeordnet. Die absolute Konfiguration konnte auch bei diesem Molekül nur teilweise aufgeklärt werden. Die Messung der CD-Spektren ergab, dass aufgrund des gleichen chromophoren Zentrums in diesem Molekül wie in Helicusin A und Helicusin A-methylester, derselbe Cotton-Effekt zu beobachten war. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass auch in diesem Molekül C-7 in der S-Konfiguration vorliegt. Die Konfiguration an C-13 konnte, aus den gleichen Gründen wie bei Helicusin A, nicht ermittelt werden.

In der mir zugänglichen Literatur ist die Extraktion von Deacetylsclerotiorin aus einem Mikroorganismus noch nicht beschrieben. Lediglich die chemische Reaktion von Sclerotiorin zu Deacetylsclerotiorin ist beschrieben (Chong *et al.*, 1971; Tomoda *et al.*, 1999). Dies ist somit die erste Beschreibung der Extraktion von Deacetylsclerotiorin aus einem Mikroorganismus, in diesem Fall dem Pilz *B. robillardoides*.

Isochromophilon X ist ebenfalls in dieser Arbeit das erste Mal als Naturstoff beschrieben worden. Die Strukturaufklärung wurde anhand von 1D- und 2D-NMR-Experimenten durchgeführt. Alle Hinweise aus den Spektren führten letztendlich zu der einzig plausiblen Struktur, die in Kapitel 4.4.4 gezeigt ist. Es wurde versucht die Stereochemie für diese Struktur anhand von gemessenen CD-Spektren aufzuklären. Das Problem dabei war, dass es für das chromophore Zentrum keine bekannten CD-Spektren gab, mit denen ein Vergleich gemacht werden konnte. Auch die Berechnung aller möglichen Isomere für zwei Stereozentren und mindestens einer Doppelbindung mit E/Z-Isomerisierung beläuft sich auf ca. 100.000 Möglichkeiten und ist unrealistisch. Der Vergleich der CD-Spektren zwischen Helicusin A und Isochromophilon X brachte ebenfalls keine Erkenntnisse, da durch den Austausch von Sauerstoff durch Stickstoff das chromophore Zentrum nicht mehr identisch war und der daraus resultierende Cotton-Effekt einer anderer war. Um wenigstens die Konfiguration an C-7 zu bestimmen wurde ein Spiking-Experiment durchgeführt. Als

Ergebnis konnte gezeigt werden, dass die Retentionszeiten an chiraler Phase von semisynthetischem und isoliertem Isochromophilon X identisch waren. Daraus lässt sich ableiten, dass die Konfigurationen an C-7 ebenfalls identisch sein müssen. Die Konfiguration von C-13 konnte aus den gleichen Gründen wie bei Helicusin A nicht bestimmt werden.

Für dieses neue Molekül wurde der Name Isochromophilon X gewählt, da die strukturellen Ähnlichkeiten mit denen der anderen neun Isochromophilonen (Arai *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996; Michael *et al.*, 2003) am besten übereinstimmten. Ausschlaggebend war vor allem die Übereinstimmung der Aminoethanol-Seitenkette bei Isochromophilon VI für die Einreihung zu den Isochromophilonen.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die semisynthetische Reaktion von Helicusin A mit 2-Aminoethanol in Dichlormethan Isochromophilon X dargestellt werden konnte (Wei & Yao, 2005). Um zu kontrollieren, ob 2-Aminoethanol in Malzmedium vorkommt, wurde Helicusin A zu frisch hergestelltem Malzmedium gegeben. Bei der Analyse mittels HPLC-DAD/MS-System konnte keine Umsetzung zu Isochromophilon X beobachtet werden. Das lässt darauf schließen, dass kein 2-Aminoethanol in Malzmedium vorkommt. Da 2-Aminoethanol als biogenes Amin aus Serin enzymatisch decarboxyliert werden kann und als Synthesevorstufe für Alkaloide und Hormone dient, wird angenommen, dass der Mikroorganismus der Produzent für 2-Aminoethanol ist (Kane, 1989; Wiebe *et al.*, 1989).

Isochromophilon XI ist ebenfalls ein neuer Naturstoff, der meiner Erkenntnis nach das erste Mal aus einem Mikroorganismus isoliert wurde. Die Strukturaufklärung wurde größtenteils durch den Vergleich der NMR-Daten von Helicusin A und Isochromophilon X durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass die Signale von CH-1 und C-8a in den NMR-Spektren nicht die erwartete Verschiebung hatten. Es wurden im ^1H -NMR-Spektrum zwei zusätzliche Dubletts und im ^{13}C -NMR-Spektrum die Signale weiter im Hochfeld beobachtet. Die Massendifferenz zwischen Helicusin A und Isochromophilon XI betrug 18. Aus diesen Hinweisen ergab sich eine Addition einer Hydroxygruppe an C-8a und eines Protons an C-1. Die absolute Stereochemie konnte für dieses Molekül nicht bestimmt werden. Obwohl das CD-Spektrum relativ ähnlich zu den Spektren von Helicusin A und Helicusin-A-methylester ist, können daraus keine brauchbare Schlussfolgerung für die Konfiguration an C-7 gezogen werden (Berova *et al.*, 2007). Die hohe konformative Flexibilität von Isochromophilon XI und das veränderte chromophore Zentrum sowie die zusätzlichen Stereozentren machen eine CD-Messung nicht mehr sinnvoll. Die Namensgebung für dieses Molekül beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit zu anderen Isochromophilonen. Die Nummerierung wurde weiter fortgeführt und das Molekül als Isochromophilon XI bezeichnet.

Helicusin E ist der dritte neue Naturstoff, der aus dem Stamm isoliert werden konnte. Die Strukturaufklärung beruhte hauptsächlich auf dem Vergleich der experimentellen NMR-Daten zu Helicusin A. Die chemische Verschiebung von C-11 und C-12 war nicht mit denen von

Helicisin A identisch. Aufgrund der deutlichen Hochfeld-Verschiebung beider Signale in den gemessenen NMR-Spektren und der Massendifferenz zwischen Helicisin A und E konnte auf die Addition von zwei Hydroxygruppen geschlossen werden. Die Addition erfolgte als vicinales Diol an die C-11 und C-12 Positionen. Die Stereochemie konnte nur für C-7 aufgeklärt werden. Die S-Konfiguration wurde durch den Vergleich der gemessenen CD-Spektren zwischen Helicisin A und E bestimmt. Das war möglich, da die chromophoren Zentren und der Cotton-Effekt im Bereich von 340 bis 420 nm bei den beiden Molekülen identisch waren (Steyn & Vleggaar, 1976; Yoshida *et al.*, 1995). Die Bestimmung der drei anderen Stereozentren C-11, C-12 und C-13 war nicht möglich. Die drei Zentren lagen zum einen zu weit vom chromophoren Zentrum entfernt, um einen nützlichen und brauchbaren Cotton-Effekt im CD-Spektrum zu sehen. Außerdem sind die Konformations- und Konfigurationsänderungen in der Seitenkette von C-10 bis C-14 so vielfältig, dass ein Abgleich zwischen dem gemessenen CD-Spektrum und allen berechneten Möglichkeiten nicht möglich ist. Zum anderen war der Versuch, die Konformation bzw. Konfiguration anhand von Daten experimenteller NOESY-Messungen zu bestimmen, ebenfalls nicht gelungen. Bei der Bestimmung der Bindungslängen anhand der Intensität der Kopplungen im NOESY-Spektrum muss mindestens ein NOE-Wert auf eine bekannte Bindungslänge geeicht werden. Es konnte zwar eine Kopplung gefunden werden, die als Referenz verwendet wurde, aber dieser Wert konnte nicht auf andere Kopplungen übertragen werden. Die Komplexität des experimentellen NOESY-Spektrums war zu hoch. Wichtige Kopplungen wie H-17 zu H-13 lagen so nah an den Diagonalsignalen und im Hochfeld, dass eine korrekte Bestimmung der Intensität des Signals und damit des NOE-Wertes nicht möglich war. Eine Bestimmung der Absolutkonfiguration ist wahrscheinlich nur mit einer Röntgenkristallstrukturanalyse möglich. Dafür sind jedoch Kristalle notwendig, die nur aus einer ausreichenden Menge Reinsubstanz im, für die Kristallisation, optimalen Lösungsmittel hergestellt werden können (Massa, 2009)

Bartanolid, ist der vierte neue Naturstoff bei dem sowohl die Struktur als auch die Konfiguration der Stereozentren bestimmt werden konnte. In der mir zugänglichen Literatur ist diese Substanz noch nicht beschrieben worden. Zuallererst war jedoch auffällig, dass sich die Daten der UV/VIS-Absorptionen und auch der NMR-Spektroskopie von den vorher beschriebenen Naturstoffen deutlich unterschieden. Die einzige UV/VIS-Absorption lag bei 220 nm, im Massenspektrum der HRESI-MS war das Isotopenmuster eines Chloratoms nicht zu erkennen und die Signale in den experimentellen NMR-Spektren zeigten nicht die charakteristischen Verschiebungen, wie sie für die Gruppe der Chloroazaphilone beschrieben wurden. Nach der Strukturaufklärung zeigten sich Ähnlichkeiten zu anderen kleinen Polyketiden, wie beispielsweise Acetoxymultiplolid (Wu *et al.*, 2008) oder Achaetolid (Pilli *et al.*, 2000). Der Name für den zehngliedrigen Laktoring mit einer Crotonat-

Seitenkette wurde wegen der strukturellen Ähnlichkeit den beiden oben genannten Strukturen angelehnt. Der Name weist zudem auf den Organismus hin, aus dem Bartanolid erstmalig isoliert wurde.

Die **Bioaktivitäten** aller sechs isolierten Chloroazaphilone und des Bartnolids wurden in insgesamt 25 Bioassays getestet. Bartanolid zeigte in keinem Bioassay eine inhibierende Wirkung. Die Ergebnisse der Chloroazaphilone sind in Tabelle 14, Seite 21 aufgelistet und die IC_{50} -Werte $<15 \mu\text{M}$ grün hinterlegt. Aufgrund der relativ ähnlichen Struktur der isolierten Chloroazaphilone wurde erwartet, dass die Bioaktivitäten vergleichbar sind. Bei der Auswertung der Aktivitäten fällt jedoch auf, dass es eine große Varianz gibt. Helicusin A zeigt Aktivitäten im unteren micromolaren Bereich gegen *Septoria tritici*, *Trichophyton rubrum* und der Acetylcholinesterase. Die Veresterung von Helicusin A zu Helicusin A-methylester reicht aus, um die Aktivitäten vollständig abzuschwächen. Das gleiche Phänomen ist bei Helicusin E zu beobachten. Der Unterschied zwischen Helicusin A und E ist lediglich die Dihydroxylierung der Seitenkette. Die Eliminierung der Seitenkette an C-7 hat hingegen nur geringe Auswirkungen auf die Aktivitäten. Die inhibitorischen Aktivitäten gegen *S. tritici* und *T. rubrum* ist im gleichen micromolaren Bereich. Die enzyminhibitorische Aktivität gegenüber der Acetylcholinesterase ist nicht mehr vorhanden, dafür aber gegen das Enzym Phosphodiesterase. Isochromophilon X und XI zeigten enzyminhibitorische Aktivitäten gegen die Phosphodiesterase im unteren micromolaren Bereich. Im Vergleich zu den Referenzsubstanzen sind die IC_{50} -Werte zwar höher, aber alle isolierten Substanzen zeigten keine Aktivitäten in den experimentellen Zytotoxizitätsassays. Eine Verwendung als antifungaler, antibakterieller oder enzyminhibitorischer Wirkstoff ist also unter Umständen möglich. Dass Azaphilone eine hohe Varianz an Bioaktivitäten haben, konnten auch Osmanova *et al.* (2010) in ihrem Review zeigen. Sie beschreiben neben antibiotischen, antifungischen und antiviralen Aktivitäten auch zytotoxische, antiinflammatorische, antioxidative und nematizide Aktivitäten. Mapari *et al.* (2010) verwenden Azaphilone, die keine Bioaktivitäten aufweisen, als Pigmente. Wie die Ergebnisse der Bioassays von Helicusin A-methylester und Helicusin E zeigen, ist eine Verwendung als Pigmente, auch aufgrund der starken gelben Farbe, möglich.

Medienvariation. Wie eingangs erwähnt, wurde durch die Variation der Medien die Produktion von neuen Sekundärmetaboliten stimuliert. Eine weitere Option der Stimulierung war die Verwendung von epigenetischen Modulatoren. Eine Versuchsreihe sollte zeigen, wie sich die Zugabe von 5-Azacytidin zu dem Stamm *B. robillardoides* auswirkte. Dazu wurden zwei verschiedene Konzentrationen 5-Azacytidin den Kulturen zugesetzt. Die Auswahl der Konzentrationen erfolgte nach den beschriebenen Erfahrungen von Cichewicz (2010). Ein Kulturansatz ohne Zusatz von 5-Azacytidin wurde als Referenz verwendet. Im Metabolitspektrum konnte keine Veränderung der Zusammensetzung beobachtet werden,

jedoch veränderte sich der Ertrag: Wie in Tabelle 15, Seite 82 aufgelistet, verdreifachen sich sowohl Biomasse als das Gewicht des Rohextrakts (also der Substanzmenge pro Liter) bei der Zugabe von 5 μM 5-Azacytidin im Vergleich zur Referenz. Bei der Zugabe von 50 μM 5-Azacytidin ist nur eine Verdopplung zu beobachten. Die entsprechenden Produktionsraten sind in allen drei Fällen jedoch mit ca. 10,5 mg Rohextrakt pro g Trockengewicht gleich. Daraus lässt sich ableiten, dass die Zugabe von 5-Azacytidin weder das Sekundärmetabolitspektrum noch die Produktionsrate verändert, sondern das Wachstum der Kultur stimuliert. Daraus resultierte eine höhere Gesamtausbeute. Dieser Effekt war bei der Zugabe von 5 μM 5-Azacytidin am stärksten: Durch die Zugabe von 5 μM 5-Azacytidin (entspricht lediglich 1,22 mg pro Liter Medium, umgerechnet knapp 50 Cent pro Liter) konnte der Ertrag aus einem Liter Kulturmedium verdreifacht werden (Entspricht einer Ertragssteigerung von 200 %). Kritsky *et al.* (2001) konnten für den Modellorganismus *N. crassa* ähnliche Beobachtungen machen. Bei der Zugabe von 10 μM 5-Azacytidin konnte die Ausbeute an produzierte Menge von Karotinoiden pro Gramm Trockengewicht um 30 % gesteigert werden. Unter biotechnologischen Gesichtspunkten ist eine solche Steigerung der Produktion für die Optimierung eines Fermentationsprozesses von großem Interesse. In weiteren Versuchsreihen sollte zum einen der Bereich näher eingegrenzt werden, um die Effizienz zu steigern und zum anderen mit weiteren epigenetischen Modulatoren, wie zum Beispiel 5-Aza-2'-deoxycytidin, Methylthioadenosin oder Histon-Modulatoren, weitere Stimulierungen induzieren (Biel *et al.*, 2005; Brakhage & Schroeckh, 2011; Strauss & Reyes-Dominguez, 2011). Möglicherweise ist das Potential dieses Stammes bei weitem noch nicht ausgeschöpft.

5.4 Abschließende Diskussion

In der abschließenden Diskussion möchte ich die oben genannten Fragen zusammenfassen und ein Fazit geben.

Die Aufgabe, aus einer Stammsammlung effektiv Stämme auszuwählen, ist nicht trivial. Es müssen zuallererst Kriterien festgelegt werden, die die Auswahl auf eine bearbeitbare Anzahl an Stämmen einschränken. Im Hinblick auf das Ziel der hier vorliegenden Arbeit, *neue* Naturstoffe aus marinen Pilzen zu isolieren, sollten die Kriterien die Wahrscheinlichkeit für den Fund von neuen Naturstoffen erhöhen. Ein Kriterium wurde direkt mit dem Thema der Arbeit festgelegt. Es wurden Pilze ausgewählt, die mariner Herkunft waren. Der stete Anstieg an veröffentlichten Publikationen und die jährlichen Reviews von Blunt *et al.* sind ein eindeutiges Zeichen für die Bedeutung von marinen Pilzen als Quelle im Bereich der marinen Naturstoffforschung. Von den insgesamt über 150.000 bekannten Naturstoffen (Blunt & Munro, 2011) sind ungefähr 22.000 als marine Naturstoffe (Laatsch, 2006) beschrieben worden. Aus den *in vitro* kultivierten Pilzen wurden bis Mitte 2010 über 1.000 Substanzen aus Pilzen isoliert (Aly *et al.*, 2011; Jones, 2011; Rateb & Ebel, 2011). Wenn man die Zahlen von neuen Naturstoffen gegenüberstellt, ist klar, dass das Potential für neue *mykologische* Naturstoffe bei weitem noch nicht ausgeschöpft ist. Die weiteren Kriterien für die Auswahl wurden von mir kritisch gewählt, so dass die Entdeckung für neue Naturstoffe am wahrscheinlichsten war. Die Bedingung, dass eine der drei Kriterien erfüllt sein musste, war anfänglich gesehen, eine effektive Möglichkeit die Anzahl der potentiellen Stämme deutlich einzuschränken. Die Ergebnisse zeigten jedoch, dass die Erfüllung eines der drei Kriterien für eine gute Auswahl nicht ausreicht. Es zeigte sich, dass mindestens zwei der drei Kriterien erfüllt sein sollten. Erst dann ist die Wahrscheinlichkeit für die Isolierung neuer Naturstoffe groß genug. Zusätzlich ist dann noch eine Variation der Kultivierungsbedingungen nach dem OSMAC-Prinzip unerlässlich. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, stellen epigenetische Modulatoren eine weitere potente Möglichkeit zur Stimulierung der Naturstoffproduktion dar. Die Anwendung von epigenetischen Modulatoren bei solchen Stämmen, die min zwei von drei Kriterien erfüllen, sollte häufiger erfolgen.

Der ausgewählte Stamm LF937 soll die Entscheidung für die Festlegung von zwei Bedingungen exemplarisch verdeutlichen. LF937 wurde phylogenetisch zu der Gattung *Aspergillus* sp. zugeordnet und ist in der Literatur ein gut beschriebener Pilz mit vielen bekannten Metaboliten. Die Herkunft des Stammes lag nicht in einer „Hotspot“-Region wie sie von Leal *et al.* (2012) beschrieben wurde. Der Stamm zeigte im Rohextrakt eine starke und zwei moderate antibiotische Aktivitäten. Da ein Kriterium (Bioaktivität) erfüllt war, wurde er für die weitere Untersuchung ausgewählt. Die Dereplikation der Sekundärmetabolite zeigte jedoch, dass die drei produzierten Sekundärmetaboliten literaturbekannte Substanzen

zugeordnet werden konnten. Bei diesem Pilz war die Wahrscheinlichkeit neue bioaktive Naturstoffe zu isolieren zu gering.

Der Stamm LF550 (*B. robillardoides*) hingegen erfüllte zwei der geforderten Kriterien. Zum einen waren sehr wenige Publikationen über diesen Pilz veröffentlicht worden und zum anderen lag der Probenort in einem „Hotspot“-Gebiet. Der Rohextrakt des Vor-Screening-Ansatzes aus WSP30-Medium zeigte jedoch keine Hemmungen in den antibiotischen Bioassays. Somit waren zwei der Kriterien (Publikationen und „Hotspot“-Standort) erfüllt. Die erfolgreiche Medienvariation nach dem OSMAC-Prinzip stimulierte den Pilz zur Produktion von neuen Naturstoffen.

Auch bei den für weitere Untersuchungen ausgewählten und oben beschriebenen Stämmen KF238, LF271 und LF858 wurden die Medien variiert. Die Variationen der Kultivierungsbedingungen verliefen dennoch nicht zu Gunsten von neuen Metaboliten. Jedoch konnte für alle Stämme ein Medium gefunden werden, in dem die Produktivität des Stammes erhöht wurde. Auch bei diesen drei Stämmen waren zwei Auswahlkriterien erfüllt. Die Herkunft aller Stämme war eine „Hotspot“-Region und alle Stämme waren in der Literatur wenig beschriebene Pilze. Bei weiteren Screenings der Stammsammlung sollten mindestens zwei der oben genannten Kriterien erfüllt sein. Sobald ein potentieller Kandidat gefunden wurde, sind Variationen der Kultivierungsbedingungen nach dem OSMAC-Prinzip zu empfehlen. Weiterhin sollte die Stimulierung mittels epigenetischer Modulatoren unbedingt als Möglichkeit der Variation mit einbezogen werden. Die Bedeutung von neu entdeckten Naturstoffen ist in der Literatur gut beschrieben: Vor allen Dingen *kleine* bioaktive Naturstoffe sind für die Entwicklung neuer Medikamente hoch interessant (Newman & Cragg, 2007; Blunt *et al.*, 2011).

6 Zusammenfassung

Auf der Suche nach neuen bioaktiven Substanzen bietet die Natur unvergleichbare Ressourcen. Die Anzahl an neuen Naturstoffen aus dem marinen Habitat ist im Vergleich zur Anzahl an terrestrischen Naturstoffen zwar noch geringer, nimmt aber stetig zu. Neben Makroorganismen sind vor allen Dingen marine Mikroorganismen eine gute Quelle für neue Naturstoffe aus dem Meer. Die Kultivierung von marinen Mikroorganismen ist in Bezug auf die Kosten, die Zeit und der Umgang mit äußeren Störeinflüssen deutlich einfacher, als die Anzucht von Makroorganismen in Aquakulturen oder gar die Entnahme aus der Natur. Von allen zurzeit in den klinischen Phasen I bis III befindlichen Wirkstoffen wurde nur ein einziger aus einem Pilz isoliert. Plinabulin wurde aus dem Pilz *Aspergillus ustus* isoliert und zeigt antineoplastische Aktivitäten. Damit dies nicht der einzige mykologische Wirkstoff bleibt, sind die Untersuchungen von marinen Pilzen unerlässlich. In der vorliegenden Arbeit wurden drei Kriterien festgelegt und überprüft, um aus einer großen Anzahl an Stämmen den potentesten Produzenten für neue bioaktive Substanzen herauszufiltern. Zum Ende der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Erfüllung von nur einem meiner drei Kriterien nicht ausreicht, um effizient eine Auswahl für einen Pilz zu treffen, der neue bioaktive Substanzen produzieren kann. Die Auswahl sollte sich eher auf zwei der drei Kriterien stützen.

Aus einem Set von 101 Stämmen aus der Stammsammlung des Kieler Wirkstoff-Zentrums wurde anhand der Kriterien die Anzahl auf elf zu untersuchende Stämme reduziert. Aus zehn dieser elf Stämme wurden 36 Metabolite isoliert und durch Dereplikation literaturbekannten Substanzen zugeordnet. Besonders auffällig war der elfte Pilz *Bartalinia robillardoides*, denn aus ihm konnten vier neue und teilweise bioaktive Substanzen (Helicusin E, Isochromophilon X, Isochromophilon XI und Bartanolid) sowie drei literaturbekannte Substanzen (Helicusin A, Helicusin A-methyllester und Deacetylsclerotiorin) isoliert werden. Sechs wurden in die Gruppe der Chloroazaphilone eingeordnet und der Siebente zeigte Ähnlichkeiten zu anderen kleinen Polyketiden. Wegen seiner erstmaligen Isolierung und der Ähnlichkeiten wurde er als Bartanolid bezeichnet. Für alle Naturstoffe wurde die Struktur aufgeklärt und für Bartanolid komplett die absolute Konfiguration bestimmt. Da der Pilz für einen äußerst potenten Produzenten gehalten wurde, wurde versucht, die Sekundärmetabolitproduktion durch Variation der Kultivierungsbedingungen (OSMAC-Prinzip) zu verändern. Die Verwendung von einem epigenetischen Modulator verlief erfolgreich und das Wachstum des Pilzes konnte um das Dreifache gesteigert werden.

Marine Pilze sind überaus potente Naturstoffproduzenten, denn bis dato sind über 1.000 neue Naturstoffe aus Pilzen isoliert worden. Diese offerieren ein breites Spektrum an Aktivitäten und besitzen teilweise sogar pharmakologisch relevante Aktivitäten. Nur die intensive Forschung kann das Potential von marinen Pilzen ausschöpfen, um die stete Nachfrage nach effizienteren Medikamenten und Leitstrukturen für neue Wirkstoff zu decken.

7 Summary

In search of new bioactive compounds nature offers unparalleled resources. The number of bioactive natural products obtained from the marine habitat compared to the number of terrestrial compounds is still smaller but it is increasing steadily. Besides macroorganisms, marine microorganisms are a particularly good source for gaining unknown natural products from the sea. The cultivation of marine microorganisms is cheaper, less time consuming and external disturbances are less probable and easier to handle than in the cultivation of macroorganisms in aquacultures or even sampling natural macroorganisms. Of all natural agents, which reached the clinical phases I to III, only one was derived from a fungi. Plinabulin was isolated from the fungus *Aspergillus ustus* and exhibits antineoplastic activities. To enhance the number of mycological agents, a further investigation of marine fungi is essential. In the course of this thesis, three criteria were established and verified to gain the most potent fungal producers of new bioactive substances from the large number of strains. And it was shown that if only one of the three criteria is fulfilled the selection is not efficient enough to find a new producer of new secondary metabolites. Two of the three criteria have to be fulfilled to find a new fungus that is capable of producing new compounds. On the basis of these criteria eleven strains were chosen from a set of 101 strains from the strain collection of the Kieler Wirkstoff-Zentrum. 36 metabolites were isolated from ten of these eleven strains and were identified with the help of dereplication. The eleventh fungus *Bartalinia robillardoides* was striking as it did not only produce three already known compounds (Helicusin A, Helicusin A-methyl ester and Deacetylsclerotiorin), but furthermore four new and partly bioactive substances were isolated (Helicusin E, Isochromophilon X, Isochromophilon XI und Bartanolid). Of these seven substances six were affiliated to the group of chloroazaphilones and the seventh showed remarkable similarities to smaller polyketides. Due to its origin and similarities it was called Bartanolid. The structure of all the new substances was elucidated and for Bartanolid even the absolute configuration was determined. As the fungus was thought to be very potent, the cultivation conditions were varied to enhance the secondary metabolite productions (OSMAC-principle). The growth of *Bartalinia robillardoides* was stimulated successfully until it was three times its original size by using an epigenetic modulator.

Thitherto a thousand new natural products have been isolated from marine fungi and thus marine fungi are prolific resources of new bioactive substances. They offer a broad spectra of activities and some are even pharmacological relevant. To meet the growing demand for new efficient drugs and drug leads, intensive research in the field of marine fungi will be required in the future.

8 Anhang

Tabelle 16: Gezeigt sind die Ergebnisse der antibiotischen Bioassays von den Extrakten der Vor-Screening-Ansätze. Abkürzungen und Methoden siehe Kapitel 2.12.1. Grün hinterlegte Felder heben die starken Aktivitäten hervor, das orangene Feld eine moderate Aktivität. Alle Inhibitionen sind in Prozentangaben angegeben.

Name	Stamm	B.s.	E.c.	S.l.	P.fl.	C.a.	P.s.	X.c.	E.a.	R.s.
<i>Acremonium strictum</i>	LF851	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Aspergillus</i> sp.	LF937	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Engyodontium album</i>	KF433	100-80	< 20	100-80	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Fusarium</i> sp.	KF427	100-80	< 20	100-80	< 20	< 20	< 20	< 20	< 50	< 20
<i>Helicoma isiola</i>	LF840	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	LF662	100-80	< 20	100-80	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20
<i>Verticillium fungicola</i>	LF054	< 50	< 20	80-50	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20

Tabelle 17: Die aus dem Set von 101 Stämmen aussortierte Pilze, die nicht den vorgegebenen Kriterien entsprachen.

<i>Acremonium alternatum</i>	LF767
<i>Apiospora montagnei</i>	LF926
<i>Arthrinium marii</i>	KF267
<i>Arthrinium sacchari</i>	KF235
<i>Ascomycete</i> sp.	LF941
<i>Asteromyces cruciatus</i>	LF692
<i>Bensingtonia</i> sp.	LF697
<i>Candida zeylanoides</i>	KF132
<i>Cirrenalia macrocephala</i>	LF744
<i>Corollospora comata</i>	LF731
<i>Cryptococcus carnescens</i>	KF159
<i>Cryptococcus foliicola</i>	KF158
<i>Culcitalna achraspora</i>	LF756
<i>Culcitalna achraspora</i>	LF816
<i>Culcitalna achraspora</i>	LF693
<i>Culcitalna achraspora</i>	LF813

<i>Microascus cirrosus</i>	LF823
<i>Nectria lugdunensis</i>	LF755
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	KF243
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	KF244
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	KF245
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	KF246
<i>Paraconiothyrium variabile</i>	LF886
<i>Penicillium</i> sp.	LF928
<i>Petriella setifera</i>	LF759
<i>Phaeotheca triangularis</i>	KF172
<i>Phaeotheca triangularis</i>	KF175
<i>Phialocephala</i> sp.	LF768
<i>Pichia guilliermondii</i>	LF743
<i>Pichia guilliermondii</i>	KF170
<i>Pichia guilliermondii</i>	LF762
<i>Pichia guilliermondii</i>	LF787

Fortsetzung der Tabelle 17

<i>Dendryphiella salina</i>	LF770
<i>Doratomyces stemonitis</i>	KF134
<i>Eupenicillium javanicum</i>	KF266
<i>Exophiala oligosperma</i>	KF182
<i>Exophiala oligosperma</i>	KF184
<i>Exophiala oligosperma</i>	KF186
<i>Exophiala oligosperma</i>	KF187
<i>Exophiala</i> sp.	KF178
<i>Exophiala</i> sp.	KF185
<i>Gibberella avenacea</i>	KF130
<i>Haloguignardia irritans</i>	LF739
<i>Halosphaeriaceae</i> sp	LF821
<i>Humicola</i> sp.	LF727
<i>Hypocrea lixii</i>	KF270
<i>Hypocrea</i> sp.	LF758
<i>Kondoa aeria</i>	KF166
<i>Lecythophora hoffmannii</i>	LF927
<i>Lewia eureka</i>	KF268
<i>Lulworthia fucicola</i>	LF774
<i>Lulworthia fucicola</i>	LF776
<i>Lulworthia fucicola</i>	LF771
<i>Lulworthia fucicola</i>	LF797
<i>Lulworthia</i> sp.	LF779
<i>Lulworthia</i> sp.	LF847
<i>Lulworthia uniseptata</i>	LF848
<i>Lulworthia uniseptata</i>	LF706

<i>Pichia guilliermondii</i>	LF790
<i>Pleosporales</i> sp.	LF742
<i>Pseudallescheria fusioidea</i>	LF714
<i>Pseudallescheria</i> sp.	LF695
<i>Pseudallescheria</i> sp.	LF698
<i>Pseudallescheria</i> sp.	LF699
<i>Pseudallescheria</i> sp.	LF701
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	KF162
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	KF161
<i>Rhodosporidium diobovatum</i>	KF171
<i>Rhodotorula glutinis</i>	KF174
<i>Rhodotorula lysiniphila</i>	KF156
<i>Rhodotorula lysiniphila</i>	KF157
<i>Rhodotorula lysiniphila</i>	KF165
<i>Rhodotorula lysiniphila</i>	LF980
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KF163
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KF168
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KF173
<i>Rhodotorula sloofiae</i>	KF169
<i>Sakaguchia dacryoidea</i>	KF164
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	KF155
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	KF167
<i>Trichoderma</i> sp.	LF704
<i>Umbelopsis ramanniana</i>	LF757
<i>Verticillium dahliae</i>	LF825
<i>Verticillium</i> sp.	KF269

9 Danksagung

Ich möchte mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes F. Imhoff für die Möglichkeit, meine Promotion als Chemiker in der Forschungseinheit „Marine Mikrobiologie“ durchzuführen, bedanken. Die eingeräumten Freiheiten für die Bearbeitung dieses tollen Themas ließen viel Platz für persönliche Ideen.

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. Frank Sönnichsen für die Übernahme der Zweitkorrektur und für die Möglichkeit, in der spektroskopischen Abteilung des Otto Diels-Institut für organische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, die NMR-Experimente durchführen zu lassen. Des Weiteren danke ich für die vielen „Nachhilfestunden“ zur Auffrischung meiner verstaubten NMR-Kenntnisse und für die konstruktiven Diskussionen zur Aufklärung der Strukturen. Ich möchte mich ebenso bei Marion Höftmann und Gitta Kohlmeyer-Yilmaz für „Alles“ rund ums Thema NMR bedanken.

Ich danke meinen Betreuern Dr. I. Kajahn, Dr. D. Schulz und Dr. B. Ohlendorf. Meiner letzten Betreuerin Dr. Antje Labes danke ich ganz besonders für die tolle Unterstützung in der letzten Phase meiner Doktorarbeit. Sie hatte im letzten Jahr immer ein offenes Ohr für Fragen und Sorgen. Ihre Korrekturen waren meist schneller zurück als mir lieb war. Danke für den Druck! ;-)

Ich möchte mich bei meinen ehemaligen und aktuellen Doktorandenbüro-Mitbewohnern bedanken, die mir eine tolle unvergessliche Zeit bereitet haben. Die vielen Lacher, fachbezogene und fachfremde Diskussionen sowie der Scanner des KiWiZ bleiben mir unvergessen. Danke an Herwig, Tim, Franz, Kerstin und Anne. Johanna bin ich zu einem besonderen Dank verpflichtet, da sie nicht nur meine Arbeit durchgelesen hat, während sie eigentlich selbst schreiben sollte, sondern ich war mit ihr auch auf vielen Konferenzen, was immer witzig und erheiternd war.

Nicht unerwähnt sollen natürlich alle anderen ehemaligen und aktuellen Mitarbeiter der Forschungseinrichtung Marine Mikrobiologie, ganz speziell das Team aus dem KiWiZ, sein. Ich habe mit und bei euch unglaublich gerne gearbeitet.

Die Durchführung der CD-Experimente fand an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Bringmann statt. Ich bedanke mich bei Dr. Torsten Bruhn, Franziska Witterauf und Yasmin Hemberger für die Durchführung und Auswertung der CD-Spektren.

An dieser Stelle sei auch meinen Eltern mal ein riesen Dank ausgesprochen, da sie mich zum einen durch die Schul- und Studiumzeit gebracht haben und zum anderen mich immer unterstützt haben wo und wie es ging.

Meinem Bruder möchte ich ebenfalls für seinen Teil der Unterstützung in jeder Hinsicht danken.

Meiner Abzugsnachbarin, Diplomparkerin und Promotionspartnerin möchte ich den herzlichsten Dank aussprechen. Kathrin, danke für die tollen Momente mit Dir! Hawaii, wir kommen!!

Meiner Oma möchte ich noch mit auf den Weg geben: „Jetzt bin ich Doktor!“

10 Abkürzungsverzeichnis

1D	Eindimensional
2D	Zweidimensional
2 % ME-Medium	2 % Malzextrakt-Medium
ACN	Acetonitril
AchE	Acetylcholinesterase
<i>B.s.</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bp	Basenpaare
<i>C.a.</i>	<i>Candida albicans</i>
CDCl ₃	Chloroform- <i>d</i> ₃
COSY	(Homonuclear) correlation spectroscopy
DAD	Dioden-Array-Detector, Photodioden-Array-Detektor
d	Dublett
dd	Dublett vom Dublett
ddd	Dublett vom Dublett vom Dublett
dddd	Dublett vom Dublett vom Dublett vom Dublett
dq	Dublett vom Quartett
<i>E.a.</i>	<i>Erwinia amylovora</i>
<i>E.c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
HRESI-MS	High resolution electron spray ionization mass spectra
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
INN	engl. International Nonproprietary Name, Internationaler Freiname
KiWiZ	Kieler Wirkstoff-Zentrum
m	Multipllett
MB-Medium	Marine Broth-Medium
ME+TM-Medium	Malzextrakt mit Tropic Marine Medium
ME-Medium	Malzextrakt mit Natriumchlorid Medium
MeOD- <i>d</i> ₄	Methanol- <i>d</i> ₄
MH-Medium	Malz-Hefe-Medium
MYA-Medium	Malzextrakt-Hefe-Medium

MYG-Medium	Malzextrakt-Hefe-Glucose-Medium
NMR	Kernspinresonanz
NOE(SY)	Nuclear overhauser enhancement spectroscopy, Kern-Overhauser-Effekt (NOE)
OSMAC	One Strain – Many Compounds
<i>P.fl.</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>P.s.</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PDA-Medium	Potato-Carrot-Medium
<i>R.s.</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
RP	Reversed phase, Umkehrphase
rpm	Umdrehung pro Minute
s	Singulett
<i>S.l.</i>	<i>Staphylococcus lentus</i>
SM+TM-Medium	SM mit Tropic Marine Medium
SM-Medium	Soja-Pepton-Mannit-Medium
t	Triplet
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
WSP30+TM-Medium	WSP30 mit Tropic Marine Medium
WSP30-Medium	Modifiziertes Wickerham-Medium
<i>X.c.</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>

12 Literatur

- Abraham E.P., Chain E., Fletcher C.M., Gardner A.D., Heatley N.G., Jennings M.A. & Florey H.W. (1941) Further observations on penicillin. *The Lancet* 238: 177-189.
- Aly A.H., Debbab A. & Proksch P. (2011) Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Divers.* 50: 3-19.
- Antequera F., Tamame M., Villanueva J.R. & Santos T. (1985) Developmental modulation of DNA methylation in the fungus *Phycomyces blakesleeanus*. *Nucleic Acids Res.* 13: 6545-6558.
- Arai N., Shiomi K., Tomoda H., Tabata N., Yang D.J., Masuma R., Kawakubo T. & Omura S. (1995) Isochromophilones III - VI, inhibitors of acyl-CoA : cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium multicolor* FO-3216. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 48: 696-702.
- Arias H.R. (2006) Marine toxins targeting ion channels. *Mar. Drugs* 4: 37-69.
- Barboza N.M., Medina D.J., Budak-Alpdogan T., Aracil M., Jimeno J.M., Bertino J.R. & Banerjee D. (2012) Plitidepsin (Aplidin) is a potent inhibitor of diffuse large cell and Burkitt lymphoma and is synergistic with rituximab. *Cancer Biol. Ther.* 13: 114-122.
- Barrow C.J., Cai P., Snyder J.K., Sedlock D.M., Sun H.H. & Cooper R. (1993) WIN 64821, a new competitive antagonist to substance P, isolated from an *Aspergillus* sp.: structure determination and solution conformation. *J. Org. Chem.* 58: 6016-6021.
- Barter P. & Ginsberg H.N. (2008) Effectiveness of combined statin plus omega-3 fatty acid therapy for mixed dyslipidemia. *Am. J. Cardiol.* 102: 1040-1045.
- Berdy J. (2005) Bioactive microbial metabolites - A personal view. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 58: 1-26.
- Bergmann W. & Feeney R.J. (1951) Contributions to the study of marine Products XXXII. The nucleosides of sponges I. *J. Org. Chem.* 16: 981-987.
- Berova N., Di Bari L. & Pescitelli G. (2007) Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chem. Soc. Rev.* 36: 914-931.
- Biel M., Wascholowski V. & Giannis A. (2005) Epigenetics - An epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew. Chem., Int. Ed.* 44: 3186-3216.
- Bird A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21.

- Blunt J.W. & Munro M.H.G. (2011) Dictionary of natural products on DVD. *Chapman & Hall / CRC, Boca Raton*.
- Blunt J.W., Munro M.H.G. & Upjohn M. (2012a) The role of databases in marine natural products research. In: *Handbook of marine natural products*, Vol. 1 Fattorusso E, Gerwick WH & Tagliatalata-Scafati O, ed., p.389-421. Springer Netherlands.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2003) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 20: 1-48.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2004) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 21: 1-49.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2005) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 22: 15-61.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2006) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 23: 26-78.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2010) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 27: 165-237.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2011) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28: 196-268.
- Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G. & Prinsep M.R. (2012b) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29: 144-222.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2007) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 24: 31-86.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2008) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 25: 35-94.
- Blunt J.W., Copp B.R., Hu W.P., Munro M.H.G., Northcote P.T. & Prinsep M.R. (2009) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 26: 170-244.
- Bobzin S.C., Yang S. & Kasten T.P. (2000) LC-NMR: a new tool to expedite the dereplication and identification of natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 342-345.
- Bode H.B., Bethe B., Höfs R. & Zeeck A. (2002) Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chem. Bio. Chem.* 3: 619-627.
- Brakhage A.A. & Schroeckh V. (2011) Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet. Biol.* 48: 15-22.

- Bringmann G., Wohlfarth M., Rischer H., Schlauer J. & Brun R. (2002) Extract screening by HPLC coupled to MS–MS, NMR, and CD: a dimeric and three monomeric naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus griffithii*. *Phytochemistry* 61: 195-204.
- Bringmann G., Lang G., Bruhn T., Schaffler K., Steffens S., Schmaljohann R., Wiese J. & Imhoff J.F. (2010) Sorbifuranones A-C, sorbicillinoid metabolites from *Penicillium* strains isolated from Mediterranean sponges. *Tetrahedron* 66: 9894-9901.
- Bugni T.S. & Ireland C.M. (2004) Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 21: 143-163.
- Butler M.S. (2004) The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67: 2141-2153.
- Canellos G.P. (2012) Brentuximab vedotin and Panobinostat: new drugs for hodgkin's lymphoma—Can they make one of medical oncology's chemotherapy success stories more successful? *J. Clin. Oncol.* 30: 2171-2172.
- Celldex Therapeutics, Product Pipeline, Abgerufen: Mai 2012.
http://www.celldextherapeutics.com/wt/page/pipeline_redirect.
- Chong R., King R.R. & Whalley W.B. (1971) The chemistry of fungi. Part LXI. The synthesis of (+/-)-sclerotiorin, of (+/-)-4,6-dimethylocta-trans-2,trans-4-dienoic acid, and of an analogue of rotiorin. *J. Chem. Soc. (C)* 3566-3571.
- Christie W., Dobson G. & Adlof R. (2007) A practical guide to the isolation, analysis and identification of conjugated linoleic acid. *Lipids* 42: 1073-1084.
- Chruma J.J., Moon S.-J. & Sanford Jr W.E. (2009) Azaphilone α -bromoacetates (AzBs): Fluorescent linchpin reagents for the inter- and intramolecular cross-linkage of primary amines to thiols. *Lett. Org. Chem.* 6: 367-371.
- Cichewicz R.H. (2010) Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Nat. Prod. Rep.* 27: 11-22.
- Cihák A. (1974) Biological Effects of 5-Azacytidine in Eukaryotes. *Oncology* 30: 405-422.
- Cordell G.A. & Shin Y.G. (1999) Finding the needle in the haystack. The dereplication of natural product extracts. *Pure Appl. Chem.* 71: 1089-1094.
- Cuevas C., Pérez M., Martín M.J., Chicharro J.L., Fernández-Rivas C., Flores M., Francesch A., Gallego P., Zarzuelo M., de la Calle F., García J., Polanco C., Rodríguez I. & Manzanares I. (2000) Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafracin B. *Org. Lett.* 2: 2545-2548.
- Cutignano A., Villani G. & Fontana A. (2012) One metabolite, two pathways: convergence of polypropionate biosynthesis in fungi and marine molluscs. *Org. Lett.* 14: 992-995.

- Dayspring T.D. (2011) Understanding hypertriglyceridemia in women: clinical impact and management with prescription omega-3-acid ethyl esters. *Int. J. Womens Health* 3: 87-97.
- de la Calle F. (2012) *Marine biodiversity as source of new anticancer compounds. The experience of PharmaMar*, SUBMARINER Blue Biotechnology Cooperation Event: New Strategies and Future Perspective, Kiel.
- Debbab A., Aly A.H. & Proksch P. (2011) Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Divers.* 49: 1-12.
- Dettrakul S., Kittakoop P., Isaka M., Nopichai S., Suyarnsestakorn C., Tanticharoen M. & Thebtaranonth Y. (2003) Antimycobacterial pimarane diterpenes from the Fungus *Diaporthe* sp. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 1253-1255.
- Donia M. & Hamann M.T. (2003) Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet. Infect. Dis.* 3: 338-348.
- Du F.-Y., Li X.-M., Li C.-S., Shang Z. & Wang B.-G. (2012) Cristatumins A–D, new indole alkaloids from the marine-derived endophytic fungus *Eurotium cristatum* EN-220. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22: 4650-4653.
- Eisai GmbH, Stationen einer Erfolgsgeschichte, Abgerufen: Mai 2012.
<http://www.eisai.de/Historie.399.0.html>.
- El Sayed K.A. (2000) Natural products as antiviral agents. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 24, Part E Atta ur R, ed., p.473-572. Elsevier.
- El Sayed K.A., Bartyzel P., Shen X., Perry T.L., Zjawiony J.K. & Hamann M.T. (2000) Marine natural products as antituberculosis agents. *Tetrahedron* 56: 949-953.
- Elander R.P. (2003) Industrial production of β -lactam antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61: 385-392.
- Esteller M. (2008) Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358: 1148-1159.
- European Commission, Orphanet Berichtsreihe - Verzeichnis der in Europa zugelassenen Orphan Drugs von 2010, Abgerufen: Mai 2012.
http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/DE/Verzeichnis_der_in_Europa_zugelassenen_Orphan_Drugs.pdf.
- Fisch K.M., Gillaspay A.F., Gipson M., Henrikson J.C., Hoover A.R., Jackson L., Najjar F.Z., Wagele H. & Cichewicz R.H. (2009) Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 1199-1213.
- Fischbach M.A. & Clardy J. (2007) One pathway, many products. *Nat. Chem. Biol.* 3: 353-355.

- Foss H., Roberts C., Claeys K. & Selker E. (1993) Abnormal chromosome behavior in *Neurospora* mutants defective in DNA methylation. *Science* 262: 1737-1741.
- Fredenhagen A., Derrien C. & Gassmann E. (2005) An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ ions. *J. Nat. Prod.* 68: 385-391.
- Furberg C.D. & Pitt B. (2001) Withdrawal of cerivastatin from the world market. *Curr. Control Trials Cardivasc. Med.* 2: 205-207.
- Galeano J.E., Rojas J.J. & Martinez A. (2011) Pharmacological developments obtained from marine natural products and current pipeline perspective. *Nat. Prod. Commun.* 6: 287-300.
- Gangadevi V. & Muthumary J. (2008) Taxol, an anticancer drug produced by an endophytic fungus *Bartalinia robillardoides* Tassi, isolated from a medicinal plant, *Aegle marmelos* Correa ex Roxb. *World J. Microb. Biot.* 24: 717-724.
- Gao J., Radwan M., León F., Wang X., Jacob M., Tekwani B., Khan S., Lupien S., Hill R., Dugan F., Cutler H. & Cutler S. (2011) Antimicrobial and antiprotozoal activities of secondary metabolites from the fungus *Eurotium repens*. *Medicinal Chemistry Research* published online.
- Germain A.R., Bruggemeyer D.M., Zhu J., Genet C., O'Brien P. & Porco J.A. (2011) Synthesis of the azaphilones (+)-sclerotiorin and (+)-8-O-methylsclerotiorinamine utilizing (+)-sparteine surrogates in copper-mediated oxidative dearomatization. *J. Org. Chem.* 76: 2577-2584.
- Gerwick William H. & Moore Bradley S. (2012) Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* 19: 85-98.
- Gonzalez A.G., Barrera J.B. & Tolfdo Marante F.J. (1983) The steroids and fatty acids of the basidiomycete *Scleroderma polyrhizum*. *Phytochemistry* 22: 1049-1050.
- Gowher H., Ehrlich K.C. & Jeltsch A. (2001) DNA from *Aspergillus flavus* contains 5-methylcytosine. *FEMS Microbiol. Lett.* 205: 151-155.
- Goyon C., Rossignol J.-L. & Faugeron G. (1996) Native DNA repeats and methylation in *Ascobolus*. *Nucleic Acids Res.* 24: 3348-3356.
- Haefner B. (2003) Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug. Discov. Today* 8: 536-544.
- Hart J.B., Lill R.E., Hickford S.J.H., Blunt J.W. & Munro M.H.G. (2000) The halichondrins: chemistry, biology, supply and delivery. In: *Drugs from the Sea*, Fusetani N, ed., p.134-153. Karger, Basel.

- Harvan D.J. & Pero R.W. (1974) Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid. *J. Chromatogr. A* 101: 222-224.
- Harvey A.L. (2008) Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* 13: 894-901.
- Hellwig V., Grothe T., Mayer-Bartschmid A., Endermann R., Geschke F.U., Henkel T. & Stadler M. (2002) Altersetin, a new antibiotic from cultures of endophytic *Alternaria* spp. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activities. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 55: 881-892.
- Hosny M., Païs de Barros J.-P., Gianinazzi-Pearson V. & Dulieu H. (1997) Base composition of DNA from glomalean fungi: high amounts of methylated cytosine. *Fungal Genet. Biol.* 22: 103-111.
- Imbs J.L. (2002) Conséquences inattendues d'un effet indésirable attendu de la cérivastatine. *La Revue de Médecine Interne* 23: 1-3.
- Imhoff J.F., Labes A. & Wiese J. (2011) Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnol. Adv.* 29: 468-482.
- Ishikawa Y., Morimoto K. & Hamasaki T. (1984) Flavoglaucin, a metabolite of *Eurotium Chevalieri*, its antioxidation and synergism with tocopherol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61: 1864-1868.
- Itabashi T., Matsuishi N., Hosoe T., Toyazaki N., Udagawa S., Imai T., Adachi M. & Kawai K. (2006) Two new dioxopiperazine derivatives, arestrictins A and B, isolated from *Aspergillus restrictus* and *Aspergillus penicilloides*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 54: 1639-1641.
- Ivanova L., Petersen D. & Uhlig S. (2010) Phomenins and fatty acids from *Alternaria infectoria*. *Toxicon* 55: 1107-1114.
- Jiang Z.D., Jensen P.R. & Fenical W. (1999) Lobophorins A and B, new antiinflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9: 2003-2006.
- Joachim H. (1890) *Papyrus Ebers, Das älteste Buch über Heilkunde aus dem 16. Jahrhundert v. Chr.* übersetzt von Joachim H., Berlin.
- Jones E.B.G. (2011) Fifty years of marine mycology. *Fungal Divers.* 50: 73-112.
- Kanai Y., Tatsumi Y., Tokiwa T., Watanabe Y., Fujimaki T., Ishiyama D. & Okuda T. (2005) F2928-1 and -2, new antifungal antibiotics from *Cladobotryum* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 58: 507-513.
- Kane M.T. (1989) Effects of the putative phospholipid precursors, inositol, choline, serine and ethanolamine, on formation and expansion of rabbit blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 87: 275-279.

- Katz J., Janik J.E. & Younes A. (2011) Brentuximab Vedotin (SGN-35). *Clin. Cancer Res.* 17: 6428-6436.
- Kayser O., Kiderlen A.F. & Croft S.L. (2002) Natural products as potential antiparasitic drugs. In: *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. Volume 26, Part G Atta ur R, ed., p.779-848. Elsevier.
- Kim B.-Y., Willbold S., Kulik A., Helaly S.E., Zinecker H., Wiese J., Imhoff J.F., Goodfellow M., Süssmuth R.D. & Fiedler H.-P. (2011) Elaiomycins B and C, novel alkylhydrazides produced by *Streptomyces* sp. BK 190. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 64: 595-597.
- Thomsen Reuter™, Web of Knowledge™, Abgerufen: 2012.
<https://apps.webofknowledge.com>.
- Kohlmeyer J. & Kohlmeyer E. (1979) *Marine Mycology: The Higher Fungi*. Academic Press, New York.
- Kouzarides T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.
- Kreis W. (2007) *Prinzipien des Sekundärstoffwechsels*. Pharmakognosie - Phytopharmazie, Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kritsky M.S., Filippovich S.Y., Afanasieva T.P., Bachurina G.P. & Russo V.E.A. (2001) Effect of inhibitors of enzymatic DNA methylation on the formation of reproductive structures and carotenoid production in *Neurospora crassa*. *Appl. Biochem. Micro.* 37: 243-247.
- Kuhnert N. (1999) Hundert Jahre Aspirin®. *Chem. unserer Zeit* 33: 213-220.
- Kuramochi K., Aoki T., Nakazaki A., Kamisuki S., Takeno M., Ohnishi K., Kimoto K., Watanabe N., Kamakura T., Arai T., Sugawara F. & Kobayashi S. (2008) Synthesis of neoechinulin A and derivatives. *Synthesis* 23: 3810-3818.
- AntiMarin: a combination database formed from AntiBase and MarinLit, Abgerufen: 2006.
- Laatsch H. (2007) *Antibase 2007 SciDex -The Natural Product identifier*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Larsen T.O., Perry N.B. & Andersen B. (2003) Infectopyrone, a potential mycotoxin from *Alternaria infectoria*. *Tetrahedron Lett.* 44: 4511-4513.
- Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E. & Frisvad J.C. (2005) Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 22: 672-695.
- Leal M.C., Puga J., Serodio J., Gomes N.C.M. & Calado R. (2012) Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades--where and what are we bioprospecting? *PLoS ONE* 7: 1-15.

- Li D., Xu Y., Shao C.-L., Yang R.-Y., Zheng C.-J., Chen Y.-Y., Fu X.-M., Qian P.-Y., She Z.-G., Voogd N.J.d. & Wang C.-Y. (2012) Antibacterial bisabolane-type sesquiterpenoids from the sponge-derived fungus *Aspergillus* sp. *Mar. Drugs* 10: 234-241.
- Li D.L., Li X.M., Li T.G., Dang H.Y. & Wang B.G. (2008) Dioxopiperazine alkaloids produced by the marine mangrove derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*. *Helv. Chim. Acta* 91: 1888-1893.
- Liljestrand, G., The Nobel Prize in Medicine - Award Ceremony Speech, Abgerufen: 1945. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/press.html.
- Livingstone D.J. (2000) The characterization of chemical structures using molecular properties. A survey. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 40: 195-209.
- Maltese F., van der Kooy F. & Verpoorte R. (2009) Solvent derived artifacts in natural products chemistry. *Nat. Prod. Commun.* 4: 447-454.
- Mandal S.K. & Roy S.C. (2008) Titanocene(III) chloride mediated radical-induced synthesis of 3,4-dihydroisocoumarins: synthesis of (±)-hydrangenol, (±)-phyllodulcin, (±)-macrophyllol and (±)-thunberginol G. *Tetrahedron* 64: 11050-11057.
- Mangoni A. (2012) Strategies for structural assignment of marine natural products through advanced NMR-based techniques. In: *Handbook of marine natural products*, Vol. 1 Fattorusso E, Gerwick WH & Tagliatela-Scafati O, ed., Springer Netherlands.
- Mapari S.A.S., Thrane U. & Meyer A.S. (2010) Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol.* 28: 300-307.
- Marchelli R., Dossena A., Pochini A. & Dradi E. (1977) The structures of five new didehydropeptides related to neoechinulin, isolated from *Aspergillus amstelodami*. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 713-717.
- Massa W. (2009) Experimentelle Methoden. In: *Kristallstrukturbestimmung*, Massa W, ed., p.93-128. Vieweg+Teubner, Wiesbaden.
- Mayer A.M.S., Rodríguez A.D., Berlinck R.G.S. & Fusetani N. (2011) Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153: 191-222.
- Mayer A.M.S., Glaser K.B., Cuevas C., Jacobs R.S., Kem W., Little R.D., McIntosh J.M., Newman D.J., Potts B.C. & Shuster D.E. (2010) The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* 31: 255-265.
- Mendola D. (2000) Aquacultural Production of Bryostatin 1 and Ecteinascidin. In: *Drugs from the Sea*, Vol. 1. Fusetani N, ed., p.120-133. Karger, Tokyo.

- Michael A.P., Grace E.J., Kotiw M. & Barrow R.A. (2003) Isochromophilone IX, a novel GABA-containing metabolite isolated from a cultured fungus, *Penicillium* sp. *Aust. J. Chem.* 56: 13-15.
- Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L. & Saludes J.P. (2009) Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8: 69-85.
- Möritz A. (2007) Medizin aus dem Meer. *Medizinische Monatszeitschrift für Pharmazeuten* 30: 103-107.
- Müller H., Brackhagen O., Brunne R., Henkel T. & Reichel F. (2000) Natural products in drug discovery. *Ernst Schering Res. Found. Workshop* 32: 205-213.
- Nam J.Y., Kim H.K., Kwon J.Y., Han M.Y., Son K.H., Lee U.C., Choi J.D. & Kwon B.M. (2000) 8-O-Methylsclerotiorinamine, antagonist of the Grb2-SH2 domain, isolated from *Penicillium multicolor*. *J. Nat. Prod.* 63: 1303-1305.
- National Cancer Institute at the National Institute of Health, NCI Drug Dictionary, Abgerufen: Mai 2012. <http://www.cancer.gov/drugdictionary>.
- Nerus Pharmaceuticals, Nereus Pharmaceuticals Completes Enrollment of Phase 2 ADVANCE Clinical Trial of Plinabulin in Non-Small Cell Lung Cancer, Abgerufen: Mai 2012. http://www.nereuspharm.com/news_06222010.shtml.
- Newman D.J. & Cragg G.M. (2007) Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70: 461-477.
- Nielsen K.F., Månsson M., Rank C., Frisvad J.C. & Larsen T.O. (2011) Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J. Nat. Prod.* 74: 2338-2348.
- Osmanova N., Schultze W. & Ayoub N. (2010) Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochem. Rev.* 9: 315-342.
- Pedras M.S.C. & Chumala P.B. (2005) Phomapyrones from blackleg causing phytopathogenic fungi: isolation, structure determination, biosyntheses and biological activity. *Phytochemistry* 66: 81-87.
- PharmaMar, Five compounds under clinical development, Abgerufen: Juni 2012. <http://www.pharmamar.com/products-professionals.aspx>.
- Phillips N.J., Goodwin J.T., Fraiman A., Cole R.J. & Lynn D.G. (1989) Characterization of the fusarium toxin equisetin: the use of phenylboronates in structure assignment. *J. Am. Chem. Soc.* 111: 8223-8231.
- Pidwirny M. (2006) *Introduction to the Oceans*. Fundamentals of Physical Geography.
- Pilli R.A., Victor M.M. & de Meijere A. (2000) First total synthesis of aspinolide B, a new pentaketide produced by *Aspergillus ochraceus*. *J. Org. Chem.* 65: 5910-5916.

- Pongcharoen W., Rukachaisirikul V., Phongpaichit S., Rungjindamai N. & Sakayaroj J. (2006) Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *J. Nat. Prod.* 69: 856-858.
- Pretsch E., Bühlmann P. & Affolter C. (2000) *Structure determination of organic compounds*. Springer.
- Proksch P. (2005) Bedeutung von Naturstoffen für die Pharmazie. Externe Expertise für das WBGU-Hauptgutachten. In: *Welt im Wandel - Armutsbekämpfung durch Umweltpolitik, Hauptgutachten 2004*, Wissenschaftlicher Beirat der Bundesregierung Globale Umweltveränderungen, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Proksch P., Edrada R.A. & Ebel R. (2002) Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 125-134.
- Proksch P., Edrada-Ebel R. & Ebel R. (2006) Apotheke am Meeresgrund: Bioaktive Naturstoffe aus marinen Schwämmen. *Biologie in unserer Zeit* 36: 150-159.
- Proksch P., Ebel R., Edrada R., Riebe F., Liu H., Diesel A., Bayer M., Li X., Lin W.H., Grebenyuk V., Mueller W.E.G., Draeger S., Zuccaro A. & Schulz B. (2008) Sponge-associated fungi and their bioactive compounds: the Suberites case. *Bot. Mar.* 51: 209-218.
- Rateb M.E. & Ebel R. (2011) Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.* 28: 290-344.
- Rodríguez J., Crews P. & Jaspers M. (2012) Contemporary strategies in natural products structure elucidation. In: *Handbook of marine natural products*, Vol. 1 Fattorusso E, Gerwick WH & Tagliatalata-Scafati O, ed., p.423-517. Springer Netherlands.
- Rountree M.R. & Selker E.U. (1997) DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. *Genes Dev.* 11: 2383-2395.
- Schauvelberger D.E., Koleck M.P., Beutler J.A., Vatakis A.M., Alvarado A.B., Andrews P., Marzo L.V., Muschik G.M., Roach J., Ross J.T., Lebherz W.B., Reeves M.P., Eberwein R.M., Rodgers L.L., Testerman R.P., Snader K.M. & Forenza S. (1991) The large-scale isolation of bryostatin 1 from *Bugula neritina* following current good manufacturing practices. *J. Nat. Prod.* 54: 1265-1270.
- Schulz D., Ohlendorf B., Zinecker H., Schmaljohann R. & Imhoff J.F. (2010) Eutypoids B-E produced by a *Penicillium* sp. strain from the North Sea. *J. Nat. Prod.* 74: 99-101.
- Schulz D., Beese P., Ohlendorf B., Erhard A., Zinecker H., Dorador C. & Imhoff J.F. (2011) Abenquines A-D: aminoquinone derivatives produced by *Streptomyces* sp. strain DB634. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 64: 763-768.
- SciFinder Scholar, American Chemical Society, Abgerufen: 2012. <https://scifinder.cas.org>.

- Seattle Genetics, A diversified pipeline with a singular focus on patient need, Abgerufen: Juni 2012. http://www.seagen.com/product_pipeline.php.
- Selker E.U., Freitag M., Kothe G.O., Margolin B.S., Rountree M.R., Allis C.D. & Tamaru H. (2002) Induction and maintenance of nonsymmetrical DNA methylation in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 16485-16490.
- Selker E.U., Tountas N.A., Cross S.H., Margolin B.S., Murphy J.G., Bird A.P. & Freitag M. (2003) The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature* 422: 893-897.
- Sessa C. & D'Incalci M. (2011) Trabectedin in ovarian cancer: could we expect more? *Ann. Oncol.* 22: 7-8.
- Silber J. (2009) Stimulation und chemische Analyse der Sekundärmetabolitproduktion in marinen Pilzen; Diplomarbeit, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Kiel.
- Slack G.J., Puniani E., Frisvad J.C., Samson R.A. & Miller J.D. (2009) Secondary metabolites from *Eurotium species*, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycological Research* 113: 480-490.
- Smedsgaard J. & Frisvad J.C. (1996) Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomy and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts. *J. Microbiol. Methods* 25: 5-17.
- Smetanina O.F., Kalinovskii A.I., Khudyakova Y.V., Slinkina N.N., Pivkin M.V. & Kuznetsova T.A. (2007) Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. *Chem. Nat. Compd.* 43: 395-398.
- Smith K.M., Kothe G.O., Matsen C.B., Khlafallah T.K., Adhvaryu K.K., Hemphill M., Freitag M., Motamedi M.R. & Selker E.U. (2008) The fungus *Neurospora crassa* displays telomeric silencing mediated by multiple sirtuins and by methylation of histone H3 lysine 9. *Epigenetics & Chromatin* 1.
- Smyth W.F., Smyth T.J.P., Ramachandran V.N., O'Donnell F. & Brooks P. (2012) Dereplication of phytochemicals in plants by LC-ESI-MS and ESI-MSn. *Trend Anal. Chem.* 33: 46-54.
- Soonthornchareonnon N., Suwanborirux K., Bavovada R., Patarapanich C. & Cassady J.M. (1999) New cytotoxic 1-azaanthraquinones and 3-aminonaphthoquinone from the stem bark of *Goniothalamus marcanii*. *J. Nat. Prod.* 62: 1390-1394.
- Staats P.S., Yearwood T., Charapata S.G., Presley R.W., Wallace M.S., Byas-Smith M., Fisher R., Bryce D.A., Mangieri E.A., Luther R.R., Mayo M., McGuire D. & Ellis D. (2004) Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or aids: A randomized controlled trial. *J. Am. Med. Assoc.* 291: 63-70.
- Steyn P.S. & Vlegaar R. (1976) The structure of dihydrodeoxy-8-epi-austdiol and the absolute configuration of the azaphilones. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 204-206.

- Strauss J. & Reyes-Dominguez Y. (2011) Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genet. Biol.* 48: 62-69.
- Sun X.L., Takayanagi H., Matsuzaki K., Tanaka H., Furuhashi K. & Omura S. (1996) Synthesis and inhibitory activities of isochromophilone analogues against gp120-CD4 binding. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 49: 689-692.
- Suzuki M.M. & Bird A. (2008) DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Gen.* 9: 465-476.
- Tamaru H. & Selker E.U. (2001) A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-283.
- Tamaru H., Zhang X., McMillen D., Singh P.B., Nakayama J., Grewal S.I., Allis C.D., Cheng X.D. & Selker E.U. (2003) Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* 34: 75-79.
- Tezuka Y., Huang Q., Kikuchi T., Nishi A. & Tubaki K. (1994) Studies on the metabolites of mycoparasitic fungi. I. metabolites of *Cladobotryum varium*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 42: 2612-2617.
- Tomoda H., Matsushima C., Tabata N., Namatame I., Tanaka H., Bamberger M.J., Arai H., Fukazawa M., Inoue K. & Omura S. (1999) Structure-specific inhibition of cholesteryl ester transfer protein by azaphilones. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 52: 160-170.
- Wakimoto T. & Abe I. (2012) Labile natural products. *Med. Chem. Commun.* 3: 866-870.
- Wang W.-L., Lu Z.-Y., Tao H.-W., Zhu T.-J., Fang Y.-C., Gu Q.-Q. & Zhu W.-M. (2007) Isoechinulin-type alkaloids, varicolorins A-L, from halotolerant *Aspergillus varicolor*. *J. Nat. Prod.* 70: 1558-1564.
- Wang X.R., Sena J.G., Hoover A.R., King J.B., Ellis T.K., Powell D.R. & Cichewicz R.H. (2010) Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. *J. Nat. Prod.* 73: 942-948.
- Wani M.C., Taylor H.L., Wall M.E., Coggon P. & McPhail A.T. (1971) Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 2325-2327.
- Waters A.L., Hill R.T., Place A.R. & Hamann M.T. (2010) The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21: 780-786.
- Wei W.G. & Yao Z.J. (2005) Synthesis studies toward chloroazaphilone and vinyllogous gamma-pyridones: Two common natural product core structures. *J. Org. Chem.* 70: 4585-4590.

- Weinheimer A.J. & Spraggins R.L. (1969) The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-*epi*-PGA₂ and its acetate, methyl ester) in the Gorgonian *Plexaura homomalla* Chemistry of Coelenterates. XV. *Tetrahedron Lett.* 10: 5185-5188.
- Wiebe M.G., Robson G.D. & Trinci A.P.J. (1989) Effect of choline on the morphology, growth and phospholipid composition of *Fusarium graminearum*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2155-2162.
- Wiese J., Ohlendorf B., Blümel M., Schmaljohann R. & Imhoff J.F. (2011) Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. *Mar. Drugs* 9: 561-585.
- Wilde V.L., Morris J.C. & Phillips A.J. (2012) Marine natural products synthesis. In: *Handbook of marine natural products*, Vol. 1 Fattorusso E, Gerwick WH & Tagliatela-Scafati O, ed., p.601-673. Springer Netherlands.
- Wu S.H., Chen Y.W., Shao S.C., Wang L.D., Li Z.Y., Yang L.Y., Li S.L. & Huang R. (2008) Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.* 71: 731-734.
- Yakushiji F., Tanaka H., Muguruma K., Iwahashi T., Yamazaki Y. & Hayashi Y. (2011) Water-soluble prodrug of antimicrotubule agent plinabulin: effective strategy with click chemistry. *Chem. Eur. J.* 17: 12587-12590.
- Yan H.-J., Li X.-M., Li C.-S. & Wang B.-G. (2012) Alkaloid and anthraquinone derivatives produced by the marine-derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*. *Helv. Chim. Acta* 95: 163-168.
- Yang D.J., Tomoda H., Tabata N., Masuma R. & Omura S. (1996) New isochromophilones VII and VIII produced by *Penicillium* sp. FO-4164. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 49: 223-229.
- Yang S.-W., Mierzwa R., Terracciano J., Patel M., Gullo V., Wagner N., Baroudy B., Puar M., Chan T.-M., McPhail A.T. & Chu M. (2006) Chemokine receptor CCR-5 inhibitors produced by *Chaetomium globosum*. *J. Nat. Prod.* 69: 1025-1028.
- Yoshida E., Fujimoto H., Baba M. & Yamazaki M. (1995) Four new chlorinated azaphilones, helicusins A-D, closely related to 7-*epi*-sclerotiorin, from an ascomycetous fungus, *Talaromyces helicus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 43: 1307-1310.
- Yu Z., Lang G., Kajahn I., Schmaljohann R. & Imhoff J.F. (2008) Scopularides A and B, cyclodepsipeptides from a marine sponge-derived fungus, *Scopulariopsis brevicaulis*. *J. Nat. Prod.* 71: 1052-1054.