

Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus epiphytischen Mikroorganismen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Dissertation

von

Diplom-Biologin Anne Pietzner, geb. Wodtke

geboren am 11.10.1984 in Rostock

2015

Referent: Prof. Dr. Markus Kalesse

Korreferent: Prof. Dr. Marc Stadler

Tag der Promotion: 05.02.2015

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Markus Kalesse in der Zeit von September 2011 bis November 2014 in der Abteilung Medizinische Chemie am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig angefertigt.

Kurzfassung

Anne Pietzner

Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus epiphytischen Mikroorganismen

Schlagworte: Naturstoffe, Epiphyten, Strukturaufklärung

Die vorliegende Dissertation umfasst die Beschreibung der Isolierung und der Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus epiphytischen Mikroorganismen. Aufgrund ihres distinkten Sekundärmetabolismus stellen diese eine hoffnungsvolle Quelle neuer Naturstoffe dar. Untersucht wurden vier Epiphyten (*Pseudomonas syringae*, *Sporobolomyces* sp., *Cladosporium herbarum* und *Aureobasidium pullulans*), welche in Voruntersuchungen biologische Aktivitäten gegen den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* und verschiedene Mikroorganismen zeigten. Aus den epiphytischen Mikroorganismen wurden im Zuge dieser Arbeit eine Vielzahl bekannter Sekundärmetabolite identifiziert, wodurch die biologischen Aktivitäten der Extrakte größtenteils begründet werden konnten. Des Weiteren wurden aus dem epiphytischen *Aureobasidium pullulans* ISch31 acht neuartige Naturstoffe isoliert und charakterisiert. Es handelte sich um polyketidische Strukturen die auf verschiedene biologische Aktivitäten getestet wurden und zum Teil nennenswerte Bioaktivitäten aufwiesen. Als zusätzliches Projekt wird die Aufreinigung von synthetischem Baceridin beschrieben. Baceridin wurde 2011 am HZI in Braunschweig aus einem epiphytische *Bacillus* isoliert und als Proteasom-Inhibitor identifiziert.

Ein kleiner Teil der Dissertation beschäftigt sich mit der Optimierung einer neuen Methode zur Dereplikation bekannter Naturstoffe aus komplexen biologischen Extrakten. Das „Molecular Networking“ wurde während eines Auslandsaufenthaltes (Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego), in Zusammenarbeit mit den Arbeitskreisen GERWICK *et al.* und DORRESTEIN *et al.*, entwickelt. In dieser Arbeit werden Extrakte aus einem Cyanobakterium und einer Alge analysiert und bekannte Sekundärmetabolite mittels „Molecular Networking“ derepliziert.

Abstract

Anne Pietzner

Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from epiphytic microorganisms

Keywords: Natural products, epiphytes, structure elucidation

This dissertation covers the isolation and structure elucidation of secondary metabolites from epiphytic microorganisms. Based on their distinct secondary metabolism, they represent a promising source for new natural products. Four strains of epiphytes (*Pseudomonas syringae*, *Sporobolomyces* sp., *Cladosporium herbarum* and *Aureobasidium pullulans*) were investigated. In pre-screenings they showed biological activities against the apple scab inducing fungus *Venturia inaequalis* and different microorganisms. It was possible to isolate a high number of known metabolites from the epiphytic microorganisms, whose known biological activities explained those of the extracts as well. In addition, eight new natural products from the epiphytic *Aureobasidium pullulans* ISch31 were isolated and characterized. They were classified as polyketides. These new natural products were also tested in bioactivity assays and some of them showed considerable biological activities. A small part of the main topic deals with the final purification of synthetic baceridin. Baceridin was isolated in 2011 at the HZI, Braunschweig from an epiphytic *Bacillus* and was identified as a proteasom inhibitor.

A minor part of this dissertation describes the establishment of a new method for the dereplication of known natural products from complex biological extracts. The method “Molecular Networking” was developed during an external stay at the Scripps Institution of Oceanography, UC San Diego, in cooperation with the research groups GERWICK *et al.* and DORRESTEIN *et al.* In this work, extracts from a cyanobacterium and an alga were analyzed. The known secondary metabolites were dereplicated with the help of “Molecular Networking”.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Die Bedeutung von Naturstoffen für den Menschen	10
1.2 Epiphytische Mikroorganismen als Quelle neuer bioaktiver Naturstoffe	12
1.3 Naturstoffe aus epiphytischen Mikroorganismen	17
1.4 Ziel der Arbeit	22
2 Ergebnisse und Diskussion	24
2.1 Isolierung von Naturstoffen aus <i>Pseudomonas syringae</i> IBI56	24
2.2 Isolierung von Naturstoffen aus <i>Sporobolomyces</i> sp. H16	28
2.3 Isolierung von Naturstoffen aus <i>Cladosporium herbarum</i> IPk15	30
2.4 Isolierung von Naturstoffen aus <i>Aureobasidium pullulans</i> ISch31	35
2.4.1 Der Stamm <i>Aureobasidium pullulans</i> ISch31	35
2.4.2 Prä-Screening von <i>Aureobasidium pullulans</i> ISch31	36
2.4.3 Aufarbeitung der ersten Fermentation von <i>Aureobasidium pullulans</i> ISch31	40
2.4.3.1 Untersuchung von Liamocinen und Exophilinen	41
2.4.3.1.1 Identifizierung von Liamocinen und Exophilinen	41
2.4.3.1.2 „Molecular Networking“ zur Dereplikation von Liamocinen und Exophilinen	44
2.4.3.1.3 Biologische Aktivitäten der Liamocine und Exophilinen	46
2.4.3.1.4 Bestimmung der Stereochemie der 3,5-Dihydroxycecanensäureester	47
2.4.3.2 Isolierung von Reinsubstanzen	50
2.4.3.2.1 Isolierung von niedermolekularen Polyketiden	50
2.4.3.2.2 Strukturaufklärung der unbekannten Polyketide	52
2.4.3.2.2.1 Strukturaufklärung von Naturstoff 1	52
2.4.3.2.2.2 Strukturaufklärung von Naturstoff 2	54
2.4.3.2.2.3 Strukturaufklärung von Naturstoff 3	58
2.4.3.2.3 Überlegungen zur Biosynthese der Naturstoffe 1 , 2 und 3	60
2.4.3.2.4 Untersuchungen zur Bioaktivität der Naturstoffe 1 , 2 und 3	62
2.4.4 Aufarbeitung der zweiten Fermentation von <i>Aureobasidium pullulans</i> ISch31	63
2.4.4.1 Isolierung von unbekannten Sekundärmetaboliten	63
2.4.4.2 Strukturaufklärung und Untersuchungen von PKS-NRPS-Hybrid-Synthase Produkten	65
2.4.4.2.1 Strukturaufklärung von Desmethylprototenellin D	65
2.4.4.2.2 Untersuchungen zur Konfiguration von Desmethylpretenellin A und Desmethylprototenellin D	68
2.4.4.2.3 Hypothetische Biosynthese von Desmethylpretenellin A und Desmethylprototenellin D	71
2.4.4.2.4 Strukturaufklärung von Naturstoff 4	73

2.4.4.2.5	Überlegungen zur Biosynthese von Naturstoff 4	76
2.4.4.2.6	Untersuchungen zur Bioaktivität der PKS-NRPS-Synthase-Produkte.....	78
2.4.4.3	Strukturaufklärung und Charakterisierung der Naturstoffe 5 - 7	79
2.4.4.3.1	Strukturaufklärung von Naturstoff 5	79
2.4.4.3.2	Strukturaufklärung von Naturstoff 6	81
2.4.4.3.3	Strukturaufklärung von Naturstoff 7	83
2.4.4.3.4	Untersuchungen zur Stereochemie der Naturstoffe 5 - 7	85
2.4.4.3.5	Untersuchungen zur Bioaktivität der Naturstoffe 5 – 7	86
2.5	Aufreinigung von synthetischem Baceridin.....	86
2.5.1	Isolierung, Strukturaufklärung, Totalsynthese und biologische Aktivität des Baceridins	86
2.5.2	Aufreinigung des synthetischen Baceridins.....	88
2.6	"Molecular Networking" als neue Methode zur Dereplikation bekannter Naturstoffe	90
2.6.1	Beschreibung der Methode „Molecular Networking“	90
2.6.2	Anwendung und Optimierung des „Molecular Networking“	92
3	Zusammenfassung und Ausblick	99
4	Experimenteller Teil	102
4.1	Instrumentelle Analytik und chromatographische Methoden	102
4.2	Chemikalien	105
4.3	Isolierung von Naturstoffen aus epiphytischen Mikroorganismen	105
4.3.1	Test zur Untersuchung von biologischen Aktivitäten	105
4.3.2	Isolierung von Naturstoffen aus <i>Pseudomonas syringae</i> IBi56.....	107
4.3.3	Isolierung von Naturstoffen aus <i>Sporobolomyces</i> sp. H16	113
4.3.4	Isolierung von Naturstoffen aus <i>Cladosporium herbarum</i> IPk15.....	116
4.3.5	Isolierung von Naturstoffen aus <i>Aureobasidium pullulans</i> ISch31	121
4.3.6	Aufreinigung von synthetischem Baceridin und Isobaceridin	136
4.4	Entwicklung der Methode des „Molecular Networking“ anhand komplexer Extrakte aus einem Cyanobakterium und einer Alge	138
	Literaturverzeichnis.....	140
	Spektrenanhang	149

Abkürzungsverzeichnis

[D ₆]DMSO	deuteriertes Dimethylsulfoxid
[α] ²² _D	spezifischer Drehwert (RT, 589 nm)
°C	°Celsius
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
a	axial
Å	Angström
Abb.	Abbildung
ACP	acyl carrier protein
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
CDCl ₃	deuteriertes Chloroform
Cer	Cerium(IV)-Ammoniumnitrat
CH ₃ CN	Acetonitril
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
COSY	correlated spectroscopy
d	Tage
Da	Dalton
DAD	Dioden Array Detektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	distortionless enhancement by polarisation transfer
DMEM	Dulbecco`s modified eagle`s medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Leibniz-Institut-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
e	equatorial
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high pressure liquid chromatography
EI	Elektronenstoß-Ionisation
HRESI	hochauflösende Elektrospray-Ionisation
HSP	Hitzeschockprotein
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
HZI	Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ITS	internal transcribed spacer
J	Kopplungskonstante
KMnO ₄	Kaliumpermanganat
L	Liter
M	Multiplizität
m/z	Masse zu Ladungs-Verhältnis
max.	maximal
MeOD	deuteriertes Methanol

MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIC	minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mol	Mol
MS	Massenspektrometrie
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear overhauser enhancement spectroscopy
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthase
OD	Optische Dichte
PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PDB	potato dextrose broth
PKS	Polyketidsynthase
pmol	Picomolar
ppm	parts per million
präp.	präparative
R	Rest
R_f	Retentionsfaktor
ROESY	rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
RP	reversed phase
t_R	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SPE	solid phase extraction
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TENS	Tenellin-Synthetase
TOCSY	total correlation spectroscopy
Tof	time of flight
t_R	Retentionszeit
TRIS	2-Amino-2-Hydroxymethyl-Propan-1,3-Diol
TSA	Trypton Soja Agar
TSB	tryptic soy broth
TSB	Trypticase-Soja-Bouillon
UPLC	ultra high performance liquid chromatography
upm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	ultraviolettes Licht/sichtbares Licht
VLC	vacuum liquid chromatography
z. B.	zum Beispiel
δ_C	^{13}C chemische Verschiebung
δ_H	^1H chemische Verschiebung
ϵ	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung von Naturstoffen für den Menschen

Naturstoffe besitzen seit Jahrtausenden eine immense Bedeutung für die Gesundheit des Menschen. Bis zum 20. Jahrhundert spielten Pflanzen in der Anwendung als Heilmittel eine übergeordnete Rolle. Bereits im alten Ägypten wurde der Einsatz von Pflanzenextrakten beschrieben, welche schmerzlindernde Wirkungen besaßen.¹ Im Laufe der Zeit konnten einzelne Verbindungen isoliert werden und gezielt als Pharmazeutika eingesetzt werden. Einige der Naturstoffe, wie Morphin (**9**) oder Digitoxin (**10**), wurden direkt appliziert, andere hingegen mussten chemisch modifiziert werden, um als Heilmittel Einsatz zu finden.² Ein bekannter Vertreter der optimierten Naturstoffe ist die Acetylsalicylsäure (**11**), welche als Aspirin gegen Schmerzen und Fieber angewendet wird. Der ursprüngliche Naturstoff ist die Salicylsäure die unter anderem von der Weide gebildet wird.³ Seit dem 20. Jahrhundert verschob sich der Focus der Suche nach neuen Naturstoffen auf die Mikroorganismen. Diese besitzen einen ausgeprägten Sekundärstoffwechsel, in dem eine Vielzahl von Substanzen mit unterschiedlichsten Funktionen gebildet wird. Die Vielfältigkeit der Mikroorganismen und deren individuelle Sekundärmetabolite führen zu der Synthese unzähliger Strukturen, welche sich der Mensch vor allem im pharmazeutischen Bereich zu Nutze macht. Das wohl bekannteste mikrobielle Sekundärmetabolit ist das 1928 von Alexander Fleming entdeckte Antibiotikum Penicillin G (**12**) aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum*.⁴ Die Suche nach pharmazeutisch wirksamen Substanzen erstreckte sich in den letzten Jahrzehnten auf viele verschiedene Mikroorganismen, vornehmlich auf Bakterien und Pilze, zu denen auch die Hefen zählen.⁵ Durch biologisches und chemisches Screening konnten eine Reihe bioaktiver Substanzen isoliert, modifiziert und in der pharmazeutischen Anwendung etabliert werden. Beispiele wichtiger Gruppen von Antibiotika natürlichen Ursprungs sind die Cephalosporine, Tetracycline, Statine und Cyclosporine. Zu den bedeutenden Vertretern dieser Stoffklassen zählen Cefaclor (**13**), Doxycyclin (**14**), Lovastatin (**15**) und Cyclosporin A (**16**).^{6,7,8}

Einleitung

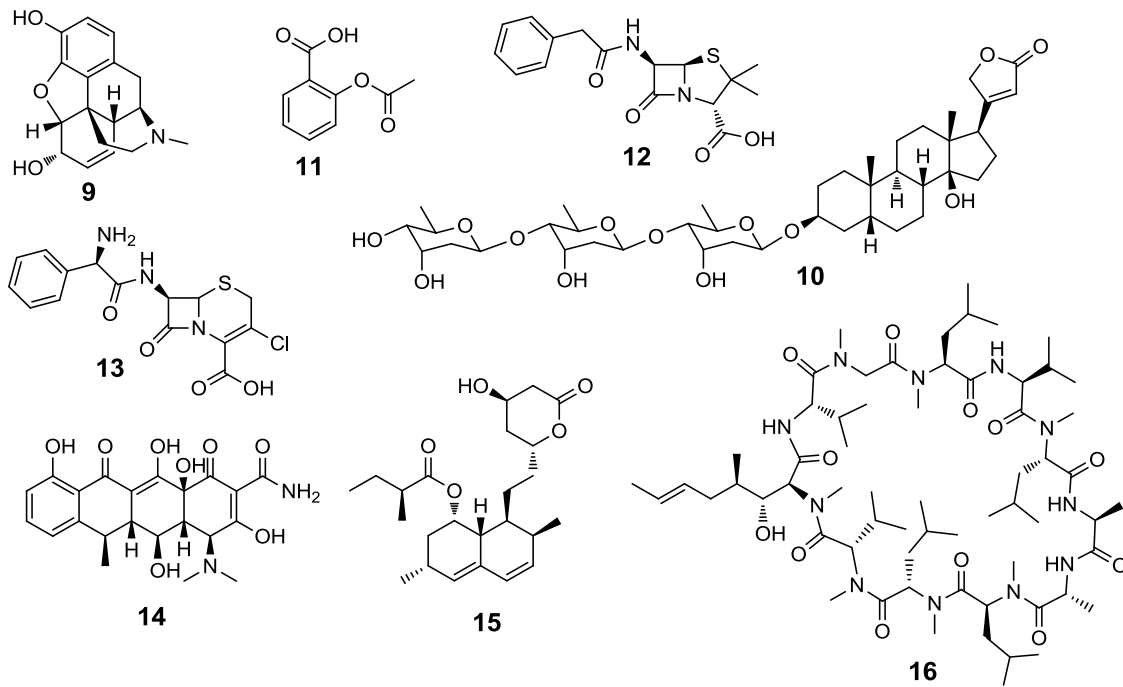


Abb. 1: Beispiele für Antibiotika natürlichen Ursprungs. Morphin (**9**), Digitoxin (**10**), Acetylsalicylsäure (**11**), Penicillin G (**12**), Cefaclor (**13**), Doxycyclin (**14**), Lovastatin (**15**), Cyclosporin A (**16**)

Nicht nur in der Medizin, sondern auch im Bereich des biologischen Pflanzenschutzes finden Naturstoffe oder von ihnen abgeleitete Verbindungen Einsatz. Spinosad (**17**), ein Gemisch aus Spinosyn A und D, wird als Bioinsektizid erfolgreich angewendet.⁹ Eine weitere wichtige Gruppe von landwirtschaftlich eingesetzten Pflanzenschutzmitteln sind die fungiziden Strobilurine. Das Azoxystrobin (**18**) als Vertreter der naturstoffabgeleiteten Strobilurine gehört zu den weltweit am häufigsten verkauften Fungiziden.¹⁰

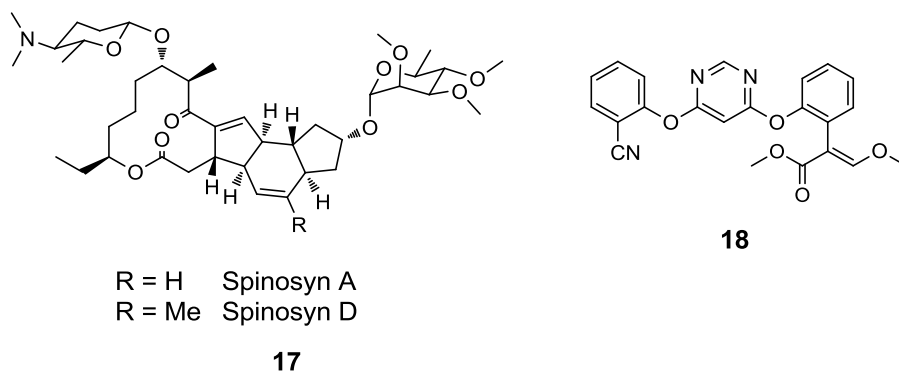


Abb. 2: Beispiele für Pflanzenschutzmittel biologischen Ursprungs. Spinosad (**17**), Azoxystrobin (**18**)

Zunehmende Resistenzen human- oder phytopathogener Mikroorganismen, neue Krankheitserreger oder bisher nicht oder nur eingeschränkt behandelbare Krankheiten erfordern zunehmend das Auffinden neuer Wirkstoffe. Naturstoffe

besitzen enormes Potential im medizinischen Sektor. Die chemische Diversität der Sekundärmetabolite aus natürlichen Quellen führt zu einer Vielzahl von biologischen Aktivitäten mit unterschiedlichen Wirkmechanismen und Targets. Bedeutende Wirkungen von natürlichen Sekundärmetaboliten können z. B. antibakteriell, antifungal, antiviral oder auch cytotoxisch gegen Krebszellen sein.⁵ In den Jahren 1981 bis 2006 waren etwa 60% der neu eingeführten Pharmazeutika natürlichen Ursprungs. Vor allem in der Entwicklung von Antiinfektiva und Antitumor-Medikamenten spielten Naturstoffe als Leitstrukturen eine übergeordnete Rolle.¹¹

1.2 Epiphytische Mikroorganismen als Quelle neuer bioaktiver Naturstoffe

Um neue bioaktive Substanzen aufzufinden, erweitert sich die Auswahl der zu untersuchenden Mikroorganismen stetig. Das Habitat und die Vergesellschaftung einzelner Arten spielt dabei eine übergeordnete Rolle. Durch die Anpassung an extreme Umweltverhältnisse, Konkurrenz der Arten untereinander oder symbiontische Beziehungen entstehen spezialisierte Sekundärstoffwechselwege, aus denen häufig Strukturen mit biologischer Aktivität hervorgehen.

Eine für die Naturstoffchemie sehr interessante Gruppe von Mikroorganismen bilden die Epiphyten. Die epiphytische Lebensweise ist eine eigene ökologische Nische und wird von Vertretern aus verschiedenen Organismengruppen vollzogen. Der populärste Epiphyt in der Biologie ist die Orchidee, die als Luftwurzler auf Bäumen des tropischen Regenwaldes gedeiht. Neben den pflanzlichen Vertretern, zu denen neben den höheren Pflanzen ebenso Algen zählen, müssen den Epiphyten jedoch zusätzlich einige Nematoden, Viren Bakterien und Hefen, aber auch filamentöse Pilze und Protozoen zugeordnet werden.¹² Die epiphytische Lebensweise kann sich auf die Oberfläche aller Pflanzenteile erstrecken.¹³ In Anbetracht der Vielfältigkeit von Wechselwirkungen verschiedener Organismengruppen mit Pflanzen innerhalb der epiphytischen Lebensweise wäre folgende Definition für den Epiphyten passend: Ein Organismus, der auf einer Pflanze wächst, aber nicht auf dieser parasitiert.¹⁴

Bei der Auswahl der für das Screening geeigneten epiphytischen Mikroorganismen mit interessanten Sekundärmetaboliten bieten Pflanzen das zweifellos bestzugänglichste Habitat. Auf der Oberfläche der verschiedenen pflanzlichen Organe sind unzählige epiphytisch lebende Bakterien, Hefen und filamentöse Pilze

Einleitung

angesiedelt. Sie existieren auf der Wurzel- und Blattoberfläche, sind aber ebenso auf Blüten und Knospen vertreten.¹³ Die größte Dichte der Epiphyten befindet sich jedoch im Wurzel- und Blattbereich. Beide Lebensräume wurden entsprechend bezeichnet. Die Mikroorganismen, welche auf den Wurzeln leben, bilden zusammen mit der Wurzeloberfläche die Rhizosphäre. Das Habitat der Blattoberfläche mit den auf ihr lebenden Epiphyten ist die Phyllosphäre.¹²

Die Phyllosphäre bietet ein extrem durch Schwankungen beeinflusstes Habitat und beherbergt daher eine Reihe stark an diesen Lebensraum angepasster Bakterien, Hefen und filamentöser Pilze. Sie ist gekennzeichnet durch ständig wechselnde physikalische Bedingungen wie hohe Temperaturdifferenzen, eingeschränkte Wasserverfügbarkeit und extreme Trockenheit, zum Teil starke UV-Strahlung und veränderliche Windverhältnisse. Aufgrund der beschränkten Ausdehnung des Lebensraumes existiert zusätzlich physiologischer Stress der Mikroorganismen untereinander, welcher durch Antibiose und Konkurrenz um das beschränkte Nährstoffangebot geprägt ist.¹³ Dieser Stress führt zur Herausbildung von Methoden zur effizienteren Nährstoffaufnahme wie die Bildung von Biosurfactanten oder Siderophoren.¹⁵ Ebenso müssen die Mikroorganismen Resistenzmechanismen gegen pflanzliche Abwehrstoffe und konkurrierende Mikroorganismen besitzen. Die Kombinationen der genannten Faktoren, insbesondere die Konkurrenz der Mikroorganismen untereinander und der damit einhergehenden Biokontrolle, führt zur Herausbildung eines besonderen Sekundärstoffwechsels, welcher diese Organismengruppe zu einer hochinteressanten Quelle von bioaktiven Naturstoffen macht.¹⁶ Diese könnten sowohl als Biopestizide gegen phytopathogene Mikroorganismen Einsatz finden, aber ebenso die Basis neuer Pharmazeutika wie Antiinfektiva oder Antikancerogene darstellen. Obwohl die epiphytischen Mikroorganismen der Phyllosphere großes Potential in der Naturstoffchemie besitzen, gehören sie zu den eher geringer untersuchten Spezies. Die Mehrheit der bisherigen Untersuchungen an der Phyllosphäre zielte vorwiegend darauf ab, das ökologische Verhalten der Phytopathogenen zu charakterisieren. Mithilfe der Kenntnisse über Wechselwirkungen in der mikrobiellen Gemeinschaft werden anschließend Möglichkeiten zur biologischen Kontrolle entwickelt. Relativ früh konnten Zusammenhänge zwischen Pflanzenkrankheiten und epiphytischen, mikrobiellen Gemeinschaften auf der Blattoberfläche gewonnen werden.

Einleitung

In einer der ersten Quellen über epiphytisch lebende Mikroorganismen wurde bereits 1903 beschrieben, dass bestimmte Bakterien ständig auf Blättern existieren und sich von bodenlebenden Bakterien unterscheiden.¹⁷ Im Jahr 1904 konnten erstmals 40 auf der Pflanzenoberfläche lebende Mikroorganismen isoliert werden.¹⁸ Die Vermutung, dass Pflanzenkrankheiten durch Bakterien beeinflusst werden können, wurde 1911 von SMITH geäußert. Er bezeichnete die auf der Pflanzenoberfläche angesiedelten Bakterien erstmalig als epiphytisch.¹⁹ In den darauf folgenden Jahrzehnten etablierte sich die Erkenntnis, dass die Oberfläche von Pflanzen als Habitat von verschiedenen Bakterien, Hefen und Pilzen genutzt wird.¹⁷ In diversen Veröffentlichungen wurde die Isolierung und Bestimmung unterschiedlicher Arten von Epiphyten beschrieben.^{20,21,22} Die Annahme, dass Epiphyten in Bezug auf Pflanzenkrankheiten antagonistisch wirken und erheblich zur Resistenz gegen Pflanzenkrankheiten beitragen wurde 1947 von SIMMONDS formuliert. Er untersuchte Weizenkeimlinge, die mit dem Phytopathogen *Helminthosporium sativum* befallen waren. Wurden die Samen mit Bakterien, welche ebenfalls von Samen isoliert wurden, behandelt, konnte die Krankheit vermindert werden.^{23,24} Aufgrund der bis dahin gewonnenen Erkenntnisse verstärkte sich das Interesse an Epiphyten zunehmend. Der Lebensraum Phyllosphäre wurde genauer charakterisiert und die epiphytischen Mikroorganismen auf der Suche nach Biopestiziden bestimmt und analysiert. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde der Lebensraum Phyllosphäre präzise aufgeklärt und beschrieben. Es konnten einige generell vertretende Gattungen der Bakterien, Hefen und Pilze identifiziert und bereits als Biopestizide etabliert werden.

Die Bakterien bilden mit einer Dichte von 10^6 bis 10^8 Zellen/cm² die größte Gruppe der Mikroorganismen der Phyllosphäre.¹³ Einige ubiquitär vertretende Gattungen sind *Bacillus*, *Streptomyces* und *Pseudomonas*. Hefen bilden ebenfalls eine große Masse der Epiphyten auf der Blattoberfläche. Häufig vorkommende Gattungen sind *Alternaria*, *Cladosporium* und *Aureobasidium*. Filamentöse Pilze als Epiphyten existieren vornehmlich im Bereich der Rhizosphäre und sind im Blattbereich eher sporadisch angesiedelt.²⁵

Das Habitat Phyllosphäre und die in ihm wirkenden extremen physikalischen und physiologischen Bedingungen führen zu hochspezialisierten Anpassungsmechanismen, welche zum Teil bereits weitgehend aufgeklärt werden konnten. Zum Schutz

Einleitung

vor starker UV-Strahlung bilden zahlreiche Epiphyten eine Pigmentierung. Vor allem unter Pseudomonaden, z. B. *Pseudomonas syringae*, ist dieser Schutzmechanismus weit verbreitet.²⁶ Als Schutz vor Austrocknung durch Hitze oder unzureichende Wasserverfügbarkeit werden von einigen Epiphyten schleimbildende, extrazelluläre Polysaccharide (EPS) gebildet und ausgeschieden.²⁷ Die EPS-Schicht spielt ebenso eine Rolle im Schutz vor reaktiven Sauerstoffradikalen, welche durch die photosynthetische Aktivität der Blattzellen in großer Anzahl vorhanden sind.²⁸ Um der Situation der eingeschränkten Nährstoffverfügbarkeit entgegen zu wirken, existieren verschiedene mikrobielle Möglichkeiten der Anpassung. Ein bei Pseudomonaden häufig auftretender Mechanismus ist die Bildung von Biosurfactanten. Diese oberflächenaktiven Substanzen ermöglichen den epiphytischen Individuen eine gesteigerte Nährstoffaufnahme durch verbesserte Diffusionsfähigkeit der Energiequellen und höhere Beweglichkeit der Zellen.¹³ Eine von Pseudomonaden synthetisierte Substanz zur Biosurfactantbildung ist das Tolaasin (*Pseudomonas tolaasi*).²⁹ Eine weitere Möglichkeit das Nährstoffangebot auf der Pflanzenoberfläche zu erhöhen, bildet die Biosynthese und Ausscheidung von Pflanzenhormonen durch epiphytische Mikroorganismen. *Pantoea agglomerans* produziert Indol-3-Essigsäure (IAA), welche die Freisetzung von Sacchariden aus den pflanzlichen Zellen der Blätter auslöst.³⁰ Die freigesetzten Substanzen können anschließend durch den epiphytischen Mikroorganismus als Energiequellen genutzt werden.

Die für die Naturstoffchemie wichtigsten Adaptionen der Epiphyten liegen jedoch in den spezialisierten Sekundärstoffwechselprodukten, die zur Verdrängung anderer Arten aus dem begrenzten Lebensraum dienen. Durch die auftretende Konkurrenz um Nährstoffe und Habitat werden Substanzen unterschiedlichster Stoffklassen gebildet, um konkurrierende Mikroorganismen aus dieser ökologischen Nische zu verdrängen. Werden auf diese Weise phytopathogene Mikroorganismen unterdrückt, handelt es sich neben der Verteidigung des Lebensraumes um eine biologische Kontrolle von Pflanzenkrankheiten.

Die Möglichkeit des gezielten Einsatzes von Epiphyten oder aus ihnen isolierten Substanzen als Biopestizide besitzt immenses Potential im Schutz vor Pflanzenkrankheiten. Der Schwerpunkt der Forschung konzentriert sich daher auf epiphytische Mikroorganismen, die in der Lage sind Sekundärmetabolite zu bilden, um phytopathogene Mikroorganismen zu inhibieren. Diese Organismen sollten die

Einleitung

epiphytische Lebensweise auf Pflanzen vollziehen, die eine große wirtschaftliche Bedeutung besitzen. Die größte Anzahl dieser Pflanzen bilden jene, welche als Nahrungsmittel verwertet und vertrieben werden. Dazu zählen Grundnahrungsmittel wie verschiedene Getreidesorten, Gemüsepflanzen und ebenso Obstsorten. Auch Schnittblumen und Algen zählen zu den wirtschaftlich relevanten Pflanzensorten und sind häufig anfällig für verschiedenste Pflanzenkrankheiten. Um wirtschaftliche Einbußen durch Infektionen der Nutzpflanzen zu verhindern, werden diese auf eventuelle Epiphyten mit antagonistischer Wirkung gegen Phytopathogene untersucht. Die jeweiligen Stämme können nach erfolgreichem Testverfahren zur Biokontrolle der Krankheitserreger eingesetzt werden.¹⁷ Ebenso interessant gestaltet sich die Suche nach den Substanzen, die für die antipathogene Wirkung verantwortlich sind. Die Aufklärung der Strukturen und Wirkmechanismen ermöglichen den gezielten Einsatz als Biopestizide.

Die biologische Bekämpfung von phytopathogenen Mikroorganismen besitzt im Vergleich zur chemischen Kontrolle einige Vorteile. Aufgrund verschiedenster Faktoren geraten synthetisierte Pestizide zunehmend in die Kritik.³¹ Die negativen Auswirkungen der häufig halogenhaltigen Verbindungen auf Mensch und Umwelt sind enorm. Des Weiteren erfordert eine chemische Kontrolle häufige Applikationen des Pestizids und bedingt großen wirtschaftlichen Aufwand bzw. hohe Kosten durch zahlreiche erforderliche Anwendungen.³² Auch die zunehmende Resistenz der phytopathogenen Populationen gegen chemische Pestizide bereitet große Probleme im Bereich des Pflanzenschutzes. Mikrobielle Krankheitserreger entwickeln mit hoher Frequenz Resistenzen, welche die chemische Kontrolle erschweren.³³

Neben dem wirtschaftlichen Potential zur Ertragssteigerung von Nutzpflanzen stellen die epiphytischen Sekundärmetabolite attraktive Strukturen für die Anwendung im pharmazeutischen Sektor dar. Die Resistenz der mikrobiellen, humanen Krankheitserreger gegen etablierte Antibiotika ist ein weitreichendes Problem, das die Suche nach neuen Strukturen erfordert. Das Screening von Mikroorganismen auf antibiotisch wirksame Substanzen erfordert die Auswahl attraktiver Arten mit besonderen Sekundärstoffwechselwegen. Epiphyten repräsentieren durch ihre vielseitigen Anpassungen eine solche Gruppe. Aufgrund des bisher eher geringen Interesses an den Epiphyten der Phyllosphäre ist die Wahrscheinlichkeit der Isolation neuer bioaktiver Wirkstoffe groß.

1.3 Naturstoffe aus epiphytischen Mikroorganismen

In bisherigen Untersuchungen konnten bereits einige vielversprechende Substanzen isoliert werden. Diese zeigen Bioaktivität gegen phyto- und humanpathogene Mikroorganismen. Eine Möglichkeit der Bildung dieser Naturstoffe durch Epiphyten ist die Verwertung von pflanzlichen Sekundärstoffen, die aus kleineren Verletzungen nach mechanischen Reizen austreten können. Dabei werden vor allem aromatische Polyhydroxybenzoesäuren zu fungiziden Verbindungen decarboxyliert.³⁴ *Rhanella aquatilis*, ein Epiphyt von *Rosa rugosa*, decarboxyliert Gallussäure und Protocatechusäure zu den fungiziden Reaktionsprodukten 1,2,3-Trihydroxybenzol (**19**) und Catechol (**20**) (Abb.3).³⁵ Beide Produkte zeigen Bioaktivität gegen den Oomyceten *Pythium ultimum* bzw. den Humanparasiten und Nahrungsschädling *Aspergillus flavus*.

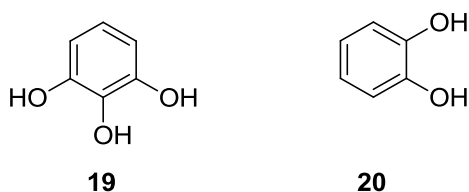


Abb. 3 Sekundärmetabolite aus dem Epiphyten *Rhanella aquatilis*. 1,2,3-Trihydroxybenzol (**18**), Catechol (**19**)

Ein bereits etwas ausführlicher betrachtetes Habitat für epiphytische Mikroorganismen bieten Algen. Das gesteigerte Interesse an diesen Epiphyten resultiert vor allem aus der enormen Bedeutung von bestimmten Algen als Nahrungsmittel im ostasiatischen Raum. Sie sind ebenso anfällig für Phytopathogene wie landlebende Pflanzen und entsprechend hervorgerufene Krankheiten dieser Algen verringern die Jahresproduktion des unersetzlichen Lebensmittels deutlich.³⁶ Die Suche nach bioaktiven Substanzen aus den auf Algen besiedelten Mikroorganismen gegen entsprechende Phytopathogene liegt nahe. Tatsächlich wurden bereits Strukturen bioaktiver Sekundärmetabolite aus einigen Vertretern aufgeklärt und auf Bioaktivität gegen Krankheitserreger getestet.^{36,37,38,39} Beispielsweise wurden aus dem mit der Alge *Porphyra yezoensis* assoziiert lebenden Schimmelpilz *Cladosporium* sp. verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe isoliert.³⁶ Dazu gehören Phenylessigsäure (**21**) oder das Diketopiperazin Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**). Diese Substanzen inhibieren die algenpathogenen Mikroorganismen *Pythium porphyrae* und den Oomyceten *Olpidiospsis* sp. und besitzen großes Potential im Einsatz als biologische Fungizide.³⁶ In einer weiteren Literaturquelle wurde ein auf

Einleitung

einer marinen Alge beheimateter *Pseudomonas*-Stamm auf Bioaktivität gegen MRSA (Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus*) beschrieben. Es konnte der Sekundärmetabolit 2,4-Diacetylphloroglucinol (**23**) identifiziert werden, welches den humanpathogenen MRSA-Stamm inhibiert.³⁸

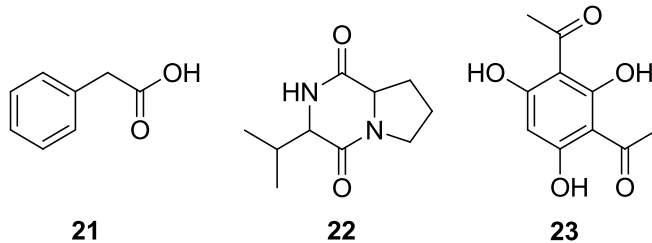


Abb. 4: Phenyllessigsäure (**21**) und Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**) aus einem Algen-assoziierten *Cladosporium* sp., 2,4-Diacetylphloroglucinol (**23**) aus einem Algen-assoziierten *Pseudomonas*-Stamm.

Drei chemisch und biologisch sehr vielversprechende Sekundärmetabolite: (-)-8-O-Methyltetrangomycin (**24**), 8-O-Methyltetrangulol (**25**) und 8-O-Methyl-7-Deoxo-7-Hydroxytetrangomycin (**26**) wurden aus einem, auf der Eibe (*Taxus baccata*) lebenden epiphytischen Streptomyceten isoliert (Abb. 5).⁴⁰ Es handelt sich um Tetracyclin-verwandte Verbindungen, welche antimikrobielle Wirkungen gegen *Bacillus cereus* und *Listeria monocytogenes* zeigten. Des Weiteren besaßen sie schwache cytotoxische Aktivitäten gegen verschiedene Tumorzelllinien.

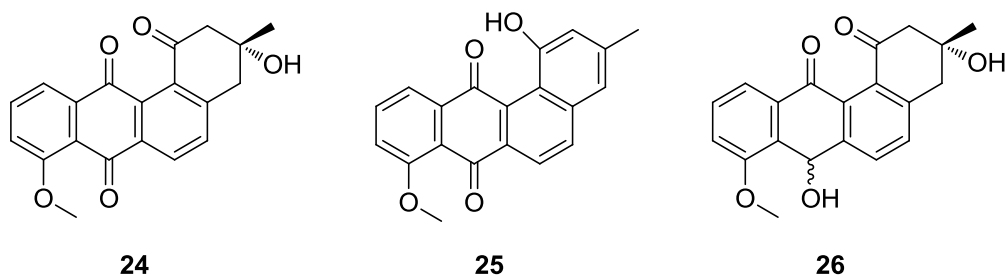


Abb. 5: (-)-8-O-Methyltetrangomycin (**24**), 8-O-Methyltetrangulol (**25**) und 8-O-Methyl-7-Deoxo-7-Hydroxytetrangomycin (**26**) aus einem epiphytischen Streptomyceten.

Ein weit verbreiteter Epiphyt ist das Enterobakterium *Pantoea agglomerans* (früher: *Erwinia herbicola*), welches in großem Maße auf der Oberfläche von Blättern vieler Pflanzenarten beheimatet ist. Es wurden bereits Antagonismen zu phytopathogenen Mikroorganismen beschrieben, die dieses Bakterium zu einem beliebten Forschungsobjekt machen. Ein phytopathogener Mikroorganismus, welcher durch *Pantoea agglomerans* inhibiert wird, ist *Xanthomonas translucens*. Das Bakterium löst eine weitverbreitete Weizenkrankheit aus.⁴¹ *Pseudomonas syringae* gehört zu den generell vertretenden Phytopathogenen und löst unter anderem die Kornfäule

der Gerste aus. *Pseudomonas. syringae* kann ebenso durch den Epiphyten *Pantoea agglomerans* inhibiert werden.⁴² Die inhibitorische Wirkung auf Phytopathogene ermöglicht die Verwendung von *Pantoea agglomerans* zur biologischen Kontrolle. Ein bestimmter Stamm (*Pantoea agglomerans* C9-1) wird bereits als Biopestizid eingesetzt und unter dem Namen BlightBan C9-1 vertrieben.⁴³

Aus mehreren *Pantoea agglomerans* Stämmen konnten bereits antibiotisch wirksame Substanzen näher charakterisiert werden (Abb. 6). Zwei dieser Strukturen sind die Peptidantibiotika Pantocin A (**27**) und Pantocin B (**28**), welche ursprünglich aus einem epiphytischen, auf dem Apfel lebenden Stamm isoliert wurden.^{44,45} Pantocin A (**27**) hindert auf diese Weise die Histidin-Synthese, Pantocin B (**29**) unterbindet die Arginin-Bildung.⁴⁶ Aufgrund der Wirkmechanismen beider Substanzen ist der Einsatz im humanen Organismus ungeeignet. Sie bilden jedoch interessante Modellschubstanzen für eventuelle neue antibiotische Strukturen. Aus einem weiteren Stamm von *Pantoea agglomerans* konnte das Andrimid (**29**) isoliert werden. Es handelt sich um ein Peptidotikum, welches die bakterielle Acetyl-CoA Carboxylase inhibiert und somit die Fettsäurebiosynthese unterbindet.^{47,48} Da es sich bei dem Target des Antibiotikums um ein bakterielles Enzym handelt, ist die Anwendung im pharmazeutischen Bereich vielversprechend. Aus einem *Pantoea agglomerans* Stamm, der von der Phyllosphäre der Sojabohne stammte, wurde das Peptidantibiotikum 2-Amino-3-(Oxiran-2,3-Dicarboxamido)-Propanoyl-Valin (**30**) isoliert.⁴⁹ Es inhibiert das phytopathogene Bakterium *Erwinia amylovora*, den Auslöser des Feuerbrands, in verschiedenen Rosaceae-Gewächsen. Das 2-Amino-3-(Oxiran-2,3-Dicarboxamido)-Propanoyl-Valin (**30**) zeigte weiterhin Bioaktivität gegen die humanpathogene Hefe *Candida albicans*.

Einleitung

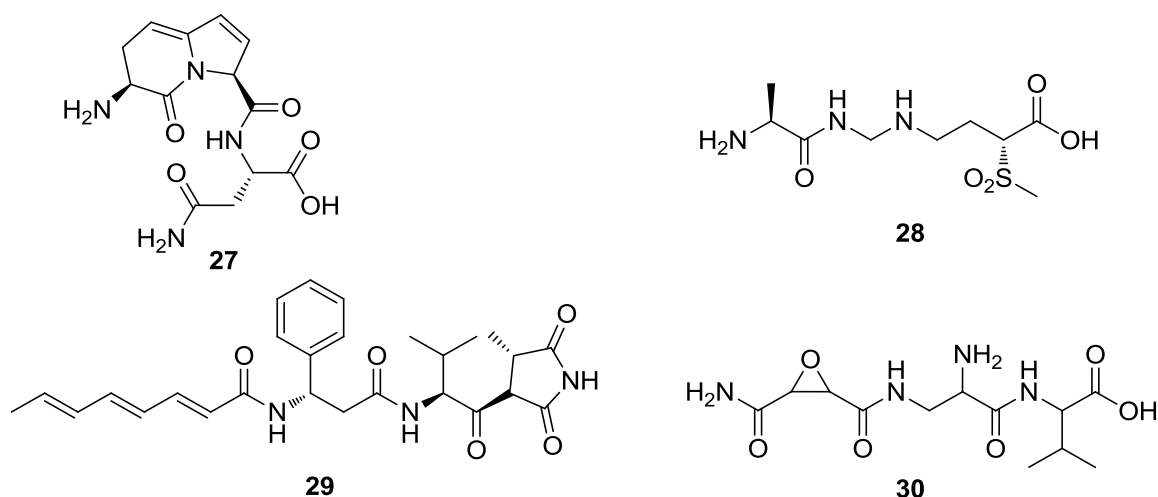


Abb. 6: Pantocin A (**27**), Pantocin B (**28**), Andrimid (**29**), 2-Amino-3-(Oxiran-2,3-Dicarboxamido)-Propanoyl-Valin (**30**) aus *Pantoea agglomerans* Stämmen

Zwei ebenfalls sehr interessante Verbindungen konnten aus dem Epiphyten *Paraphaeospora* sp. isoliert werden. Der Pilz stammt von Nadeln der *Pinus densiflora*. Von zwei, mit dem Antibiotikum Culpin verwandten, Naturstoffen konnten die Strukturen aufgeklärt werden. Es handelt sich um 2,3-Didehydropalitantin (**31**) und Culpin-1-β-Galactopyranosid (**32**) (Abb. 7).⁵⁰

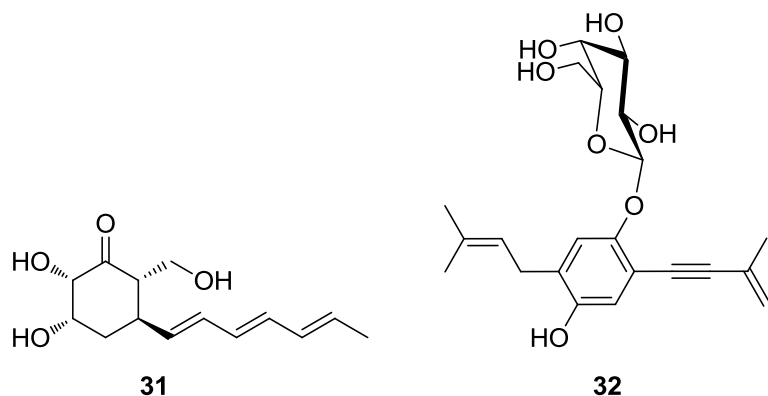


Abb. 7: 2,3-Didehydropalitantin (**31**) und Culpin-1-β-Galactopyranosid (**32**) aus dem Epiphyten *Paraphaeospora* sp..

In der Arbeitsgruppe Kalesse *et al.* (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) konnte ein cyclisches Hexapeptid, produziert von einem epiphytischen *Bacillus* Stamm, identifiziert werden.⁵¹ Das Bakterium wurde von Blütenblättern der *Arabidopsis thaliana* isoliert und der *Bacillus-cereus*-Gruppe zugeordnet. Bei der peptidischen Struktur handelte es sich um das Baceridin (**33**) (Abb.8). In Bioaktivitätstests zeigte es geringe Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* und moderate Cytotoxizität gegen L929 Maus-Fibroblasten (IC₅₀ 2 µg/mL). Weitere Untersuchungen zur Identifizierung des Targets in eukaryotischen Zellen ergaben,

Einleitung

dass es sich bei dem Hexapeptid um einen Proteasom-Inhibitor handelte. Aufgrund des interessanten Targets stellt das Baceridin (**33**) eine hoffnungsvolle Leitstruktur dar. In Abschnitt 2.5 wird näher auf das Baceridin (**33**) eingegangen.

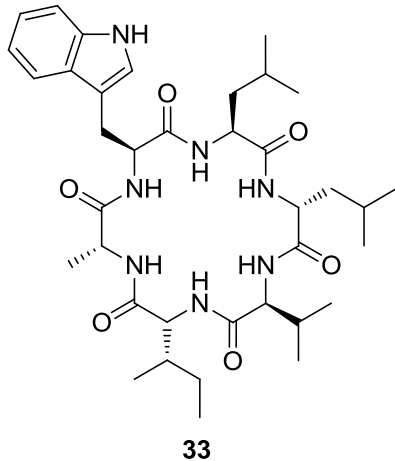


Abb. 8: Baceridin (**33**) aus einem epiphytischen *Bacillus*-Stamm.

Neben den bereits beschriebenen Organismen besitzen eine Reihe weiterer Epiphyten inhibitorische Wirkungen gegenüber phytopathogenen Mikroorganismen. Allerdings konnten aus einer Vielzahl der Individuen noch keine bioaktiven Substanzen isoliert werden. Die Charakterisierung und Strukturaufklärung dieser Moleküle könnte dementsprechend eine große Anzahl weiterer bioaktiver Substanzen hervorbringen, die sowohl als Biopestizide als auch als Pharmazeutika eingesetzt werden können.

Beispielsweise konnte ein Antagonismus von epiphytisch, auf den Kelchblättern der Rose lebenden Bakterien und Fungi gegen die Grauschimmelfäule beobachtet werden.⁵² Grauschimmelfäule wird von *Botrytis cinerea* ausgelöst und wird durch vier von der Phyllosphäre isolierten Mikroorganismenstämmen gehemmt. Eine deutliche Inhibierung tritt durch *Exophiala jeanselmei* und einen *Erwinia*-Stamm auf. Ebenso wurde beobachtet, dass die Resistenz von Mais gegen eine bestimmte Krankheit in Abhängigkeit von der Diversität der Epiphyten der Phyllosphäre beeinflusst wird. Bei einer höheren Anzahl von epiphytischen Arten auf der Oberfläche der Nutzpflanze kann eine größere Resistenz gegen Phytopathogene wie z. B. *Cochliobolus heterostrophus* beobachtet werden.⁵³

Eine weitere Nutzpflanze, die hohe wirtschaftliche Einbußen in Folge des Befalls von Phytopathogenen erfährt, ist der Kulturapfel (*Malus domestica*). Die weltweit

bedeutendste Apfelkrankheit ist der Apfelschorf, der infolge des Befalls mit dem Pilz *Venturia inaequalis* ausgelöst wird.⁵⁴ Aufgrund der enormen finanziellen Verluste, die der Apfelschorf verursacht, wird permanent nach effizienten Strategien zur Eindämmung der Krankheit gesucht. Die Bekämpfung der Pflanzenkrankheit erfolgt größtenteils mit chemischen Fungiziden. Es sind bis zu 20 Applikationen pro Saison erforderlich, um den Apfelschorferreger zu kontrollieren.⁵⁵ Die dementsprechend hohen Kosten der Bekämpfung von *Venturia inaequalis* entsprechen etwa einem Drittel der weltweiten Investitionen in die chemische Behandlung von Obstsorten zum Schutz vor Phytopathogenen.⁵⁵ Das Ausmaß dieser Kosten veranlasste bereits verschiedene Untersuchungen, die auf das Auffinden von alternativen Kontrollmechanismen der Krankheit abzielten. Eine vielversprechende Möglichkeit ist auch hier die Biokontrolle durch epiphytische Mikroorganismen der Phyllosphäre. Mehrere Organismen konnten isoliert, bestimmt und kultiviert werden und zeigten zum Teil deutliche Bioaktivität gegen *Venturia inaequalis*. Mikroorganismen, die Bioaktivität gegen den Apfelschorferreger zeigten, gehören zu verschiedenen Stämmen der bakteriellen Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus* oder *Erwinia*. Aber auch Hefen und Pilze konnten isoliert werden und zeigten Bioaktivität gegen den Apfelschorferreger. Beispiele für Hefe-Gattungen der Phyllosphäre des Apfels sind *Candida*, *Sporobolomyces* und *Rhodotorula*, isolierte Pilze gehörten unter anderem zu den Gattungen *Cladosporium* oder *Fusarium*.⁵⁶

1.4 Ziel der Arbeit

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war das Auffinden neuer Naturstoffe aus Pflanzen-assoziierten, epiphytischen Mikroorganismen. Epiphytische Mikroorganismen stellen eine hochinteressante Quelle neuer Naturstoffe dar, da sie extremen Schwankungen der Umweltbedingungen und einem hohen Konkurrenzdruck ausgesetzt sind, sowie verschiedene Wechselwirkungen mit Pflanzen eingehen. Diese Faktoren führen zu einem ausgeprägten Sekundärstoffwechsel und zur Biosynthese einer Vielzahl an strukturell vielfältigen Sekundärmetaboliten. Die zu untersuchenden Mikroorganismen fielen in einem biologischen Screening antagonistischer Bakterien, Hefen und Pilze gegen Pilzkrankheiten am Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover auf. Sie zeigten antagonistische Wirkung gegen den Apfelschorferreger *Venturia inaequalis* indem sie die Sporenkeimung oder das Mycelwachstum des Pilzes inhibierten. Zusätzlich konnten

Einleitung

für einige der Isolate weitere biologische Aktivitäten gegen grampositive und gramnegative Bakterien sowie Hefen ermittelt werden. Diese Ergebnisse gaben Anlass zur Identifikation der aktiven Sekundärmetabolite. In dieser Arbeit sollten diese biologisch aktiven Naturstoffe aus den Fermentationsmedien der epiphytischen Mikroorganismen isoliert und ihren Substanzklassen zugeordnet werden. Das übergeordnete Ziel war dabei das Auffinden bisher unbekannter Sekundärmetabolite. Im Vordergrund standen die Strukturaufklärung und die chemische Charakterisierung dieser Metabolite mittels NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie und analytischen Methoden wie z. B. UV/Vis Spektroskopie. Parallel dazu erfolgten Bioaktivitätsuntersuchungen der Reinsubstanzen. Im optimalen Fall können somit aktive Sekundärmetabolite als neue Leitstrukturen für den biologischen Pflanzenschutz oder für pharmazeutische Anwendungen wie Antiinfektiva oder Zytostatika identifiziert werden.

Die zu untersuchenden Mikroorganismen stammen aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover. Sie wurden aufgrund signifikanter antagonistischer Wirkungen gegen *Venturia inaequalis* ausgewählt und stellen Vertreter verschiedener Organismengruppen dar. Das chemische Screening dieser Arbeit umfasste das Bakterium *Pseudomonas syringae*, die Hefe *Sporobolomyces* sp. und den Pilz *Cladosporium herbarum*. Des Weiteren wurde ein epiphytisches Isolat von *Arabidopsis thaliana* untersucht. Die Gattung des Organismus war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bestimmt. Im Zuge dieser Arbeit wurde das Isolat als *Aureobasidium pullulans* identifiziert. Alle epiphytischen Mikroorganismen stammen aus einer seit 1988 ohne Fungizideinsatz geführten Obstanlage des Niederelbischen Obstanbaugebietes (Altes Land, Hechthausen) und wurden im Rahmen einer Doktorarbeit taxonomisch charakterisiert.⁵⁶

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Isolierung von Naturstoffen aus *Pseudomonas syringae* IBI56

Der Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* IBI56 wurde aus der Phyllosphäre eines Kulturapfels isoliert und charakterisiert. Die Taxonomische Charakterisierung erfolgte mittels einer phänotypischen Klassifizierung, (Gramfärbung, Untersuchung von ausgeschiedenen, fluoreszierenden Pigmenten) und durch Polyaminmuster-, sowie Fettsäuremuster-Analysen. Der Stamm wurde auf Bioaktivitäten gegen verschiedene Organismen untersucht.⁵⁶ *Pseudomonas syringae* IBI56 verursachte in diesen Untersuchungen eine starke, 87%ige, *in vitro* Hemmung der Konidienkeimung des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*. Zusätzlich wurde eine moderate Hemmung (57%) des Mycelwachstums verzeichnet. Des Weiteren trat eine moderate Hemmung von *Bacillus subtilis* in einem Plattendiffusionstest auf, in welchem ein Hemmhof von 18 mm gemessen werden konnte. Diese ermittelten Ergebnisse gaben Anlass zu näheren Untersuchungen des Mikroorganismus. Bei *Pseudomonas syringae* handelt sich um ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium, welches sowohl als Epiphyt und auch als Endophyt in den Apoplasten von pflanzlichen Zellen vorkommt.⁵⁷ Interessanterweise unterscheiden sich die epiphytischen *Pseudomonaden* von den endophytisch existierenden Stämmen in der Biosynthese und Exkretion von Sekundärmetaboliten. Die epiphytische Lebensweise und damit einhergehende Stressfaktoren sind verantwortlich für die Ausbildung eines angepassten Sekundärstoffwechsels. Beispielsweise wird das Syringomycin vorrangig von epiphytischen *Pseudomonas syringae* Stämmen gebildet. Ebenso werden die peptidischen Syringoline von epiphytischen *Pseudomonaden*-Stämmen, aber nicht von endophytischen synthetisiert.⁵⁸ Diese Peptide aktivieren in der Pflanze Gene zur Bildung von Abwehrstoffen gegen phytopathogene Pilze, was eine Resistenz der Pflanze gegen diese Schädlinge hervorruft.⁵⁹ Ziel war es, in dieser Arbeit die für die Bioaktivität verantwortlichen Verbindungen aus dem epiphytischen *Pseudomonas syringae* IBI56 zu identifizieren.

Für die Untersuchung der biosynthetisierten Sekundärmetabolite aus *Pseudomonas syringae* IBI56 wurde eine 6 L Kultur des Epiphyten fermentiert. Zur Adsorption der durch das Bakterium ins Medium ausgeschiedenen Sekundärmetabolite wurde dem Medium während der Kultivierung 2% Amberlite XAD-16 zugefügt. Das Adsorber-

Harz wurde anschließend separiert und mit verschiedenen Lösungsmitteln eluiert. Die Ausbeute des Rohextraktes entsprach 785 mg. Dieser wurde in Plattendiffusionstests auf Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Auch nach mehrfacher Durchführung der Assays konnte nur eine sehr schwache Aktivität gegen die genannten Mikroorganismen detektiert werden. Das ^1H -NMR-Spektrum des Rohextraktes zeigte eine auffällige Anhäufung von Signalen im Bereich zwischen 3.9 und 4.3 ppm. Dieser Bereich der chemischen Verschiebung von Protonen deutet auf die Existenz von peptidischen Strukturen hin. Es handelte sich um die charakteristischen Signale der α Protonen von Aminosäuren. Um die Vermutung zu bestätigen, wurde der Rohextrakt zunächst mittels Säulenchromatographie an Kieselgel durch fünf verschiedene Lösungsmittel bzw. Lösungsmittelgemische unterschiedlicher Polarität aufgetrennt. Alle erhaltenen Fraktionen wurden durch Dünnschichtchromatographie untersucht. Entsprechend der R_f -Werte der Verbindungen in den einzelnen Fraktionen wurden diese vereint. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen mittels HPLC-UV-MS zeigte eine Vielzahl von niedermolekularen Strukturen mit Molekülmassen zwischen m/z 200 – 290 und schwachen UV/Vis Absorptionen. Die Fraktionen wurden auf Bioaktivität gegen die drei bereits erwähnten Mikroorganismen in Plattendiffusionstests untersucht. Keine der Fraktionen hemmte das Wachstum von *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 oder *Saccharomyces cerevisiae*. Die Hauptmetabolite der Fraktionen wurden mit verschiedenen präparativen HPLC-Methoden teilweise isoliert und identifiziert. Auf eine vollständige Charakterisierung der Naturstoffe wurde im Zuge des Derivationsprozesses verzichtet. Alle isolierten und identifizierten Naturstoffe aus *Pseudomonas syringae* IBI56 sind literaturbekannte Verbindungen. Es handelt sich ausschließlich um cyclische Dipeptide, den sogenannten Diketopiperazine. Diese niedermolekularen Substanzen sind Sekundärmetabolite, die von einer Vielzahl von Mikroorganismen produziert werden. Sie können vielfältige biologische Funktionen und Wirkungen besitzen. Bakterien nutzen sie als Quorum Sensing Signale zur Zell-Zell-Kommunikation, bei Pflanzen können sie als Pheromone oder Bitterstoffe agieren.^{60,61,62} Einige Diketopiperazine besitzen mäßige antibakterielle Aktivitäten gegen grampositive und gramnegative Bakterien. Dabei können sie auch antimutagene Wirkung gegen pathogene Bakterien wie *Salmonella* aufweisen.⁶³ Weiterhin wurden fungizide Wirkungen beschrieben, die gegen eine Vielzahl von

phytopathogenen Pilzen vorliegen.^{64,65} Sogar anticancerogene Wirkungen auf menschliche Krebszellen sowie Schutzfunktionen im humanen Gehirn werden einigen Diketopiperazinen zugeschrieben.^{66,60} In dieser Arbeit konnten 10 unterschiedliche Diketopiperazine identifiziert werden. Die meisten von ihnen besitzen Prolin als eine der integrierten Aminosäuren. Abbildung 9 zeigt die in dieser Arbeit isolierten Diketopiperazine.

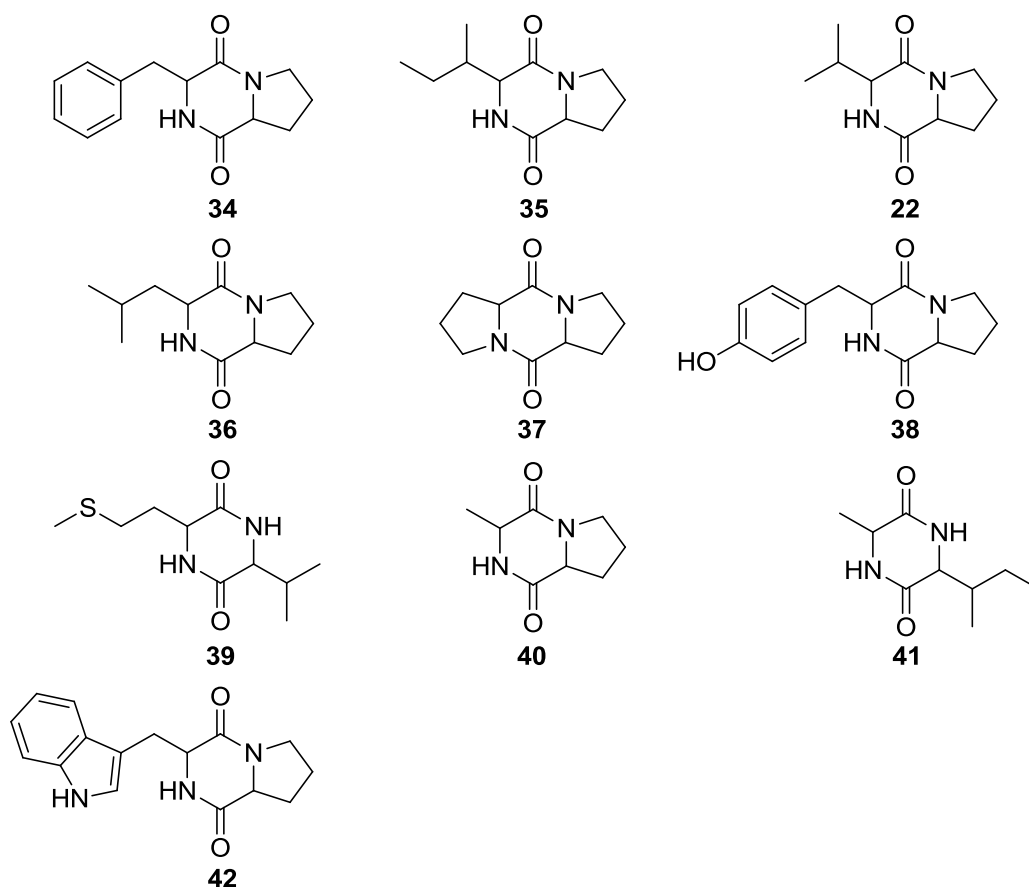


Abb. 9: Identifizierte Diketopiperazine aus *Pseudomonas syringae* IBI56. Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**), Cyclo-Isoleucyl-Prolyl (**35**), Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**), Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**), Cyclo-Prolyl-Prolyl (**37**), Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**), Cyclo-Methionyl-Valyl (**39**), Cyclo-Alanyl-Prolyl (**40**), Cyclo-Alanyl-Isoleucyl (**41**), Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**)

Die 1D-NMR-Spektren der isolierten Strukturen ließen schnell Rückschlüsse über die Strukturen der Naturstoffe zu. In den meisten Fällen wurden ausschließlich ^1H NMR-Spektren benötigt, um die Strukturen als Diketopiperazine zu identifizieren. Die bereits erwähnten α -Protonen der Aminosäuren sowie typische Signale von Aminosäureseitenketten waren signifikante Indikatoren der Dipeptide. In ^{13}C -NMR-Spektren konnten eindeutig die Signale der beiden Carbonylkohlenstoffe der Amidbindungen bestimmt werden. Sie besitzen charakteristische chemische Verschiebungen zwischen 164 und 169 ppm. Die Messung von 2D-NMR-Spektren war in den meisten Fällen nicht für die Strukturaufklärung erforderlich.

Aus denen mit den lipophilen Lösungsmittelgemischen gewonnenen Fraktionen durch Säulenchromatographie konnten Diketopiperazine mit unpolaren Aminosäureseitenketten isoliert werden. Die aus diesen Fraktionen identifizierten Diketopiperazine sind Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**), Cyclo-Isoleucyl-Prolyl (**35**), Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**) und Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**). Für Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) wurde eine schwache Hemmung von gramnegativen Bakterien beschrieben.⁶⁷ Einige Aminosäuren mit aliphatischen Seitenketten wie das Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**), Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**) oder Cyclo-Isoleucyl-Prolyl (**35**) können das Wachstum von Bakterien hemmen, allerdings ohne eine Lysis der Mikroorganismen auszulösen.⁶⁸ Interessant ist auch die Inhibierung der Aflatoxin-Produktion in *Aspergillus parasiticus* durch Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**).⁶⁹ Die einzigen nicht-prolinhaltigen Diketopiperazine, die aus *Pseudomonas syringae* IBi56 isoliert werden konnten, waren das Cyclo-Alanyl-Isoleucyl (**41**) und Cyclo-Methionyl-Valyl (**39**). Aus weiteren Fraktionen, die mit polaren Lösungsmittelgemischen gewonnen wurden, konnten die prolinhaltigen Diketopiperazine Cyclo-Prolyl-Prolyl (**37**), Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**), Cyclo-Alanyl-Prolyl (**40**) und Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**) isoliert werden. Für die meisten der genannten Verbindungen wurden schwache antibakterielle Eigenschaften in der Literatur beschrieben.^{70,71} Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) und Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**) beispielsweise hemmen Kationen-Kanäle in Prokaryoten und führen zum Absterben der Bakterien.⁷²

Die umfassend in der Literatur beschriebenen Aktivitäten der Diketopiperazine konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Alle aufgereinigten Dipeptide wurden in Plattendiffusionstests gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Keines der bakteriellen Sekundärmetabolite zeigte nennenswerte Aktivität gegen einen der Mikroorganismen. Einzig bei Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) konnte eine leichte Schwächung des Bakterienwachstums von *Bacillus subtilis* beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass die durch *Pseudomonas syringae* IBi56 produzierten Diketopiperazine mit hoher Wahrscheinlichkeit nur in Kombination antibiotische Aktivitäten auf die drei Mikroorganismen besitzen.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass in den Untersuchungen des epiphytischen *Pseudomonas syringae* IBi56 Stamm eine Reihe von Diketopiperazinen als Hauptkomponenten des Extraktes identifiziert werden konnten. Es handelt sich

ausschließlich um literaturbekannte Verbindungen, die durch eine Vielzahl von Mikroorganismen gebildet werden. Allerdings wurde in der Literatur bisher nicht die Bildung dieser Vielzahl an Diketopiperazinen durch *Pseudomonas syringae* beschrieben. Es konnte festgestellt werden, dass die Bioaktivität des Bakteriums gegen *Bacillus subtilis* nicht auf bestimmte Sekundärmetabolite zurückzuführen, sondern Ursache der Kombination verschiedener Diketopiperazine ist.

2.2 Isolierung von Naturstoffen aus *Sporobolomyces* sp. H16

Die epiphytische Hefe *Sporobolomyces* sp. H16 konnte von einem Blatt eines Kulturapfels isoliert werden.⁵⁶ Identifiziert wurde der Stamm mittels morphologischer Charakterisierung, sowie der Untersuchung der Kohlehydratverwertung nach VAN DER WALT und YARROW.⁷³ Ergänzend wurden Analysen der Ubichinone und Zellproteine durchgeführt. In anschließenden Untersuchungen zeigten Extrakte der Hefe starke Hemmungen in Plattendiffusionstests gegen *Bacillus subtilis* und *Micrococcus luteus*. Die biologische Aktivitäten hervorrufenden Sekundärmetabolite aus *Sporobolomyces* sp sollen in dieser Arbeit durch deren Isolierung und Strukturaufklärung identifiziert werden.

Die Kultivierung von *Sporobolomyces* sp. erfolgte in einer 3 L Fermentation unter Zugabe von Amberlite XAD-16. Anschließende Elution des Adsorber-Harzes mit Methanol und die Aufarbeitung des dadurch gewonnenen Extraktes ergaben 166.5 mg Rohextrakt. Dieser wurde auf Bioaktivität in Plattendiffusionstests gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Es konnten darin keine Aktivitäten gegen das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* K12 und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ermittelt werden. Lediglich im Plattendiffusionstest gegen *Bacillus subtilis* konnte mit einer Bewuchsschwächung (2 cm Hemmhof) eine schwache Aktivität des Hefeextraktes dokumentiert werden. In Abgleich mit den erwähnten Voruntersuchungen lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass Extrakte der Hefe vor allem grampositive Bakterien zu hemmen scheinen.

Der Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit fünf verschiedenen Lösungsmitteln bzw. Lösungsmittelgemischen als Eluenten aufgetrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden mithilfe von Dünnschichtchromatographien analysiert und hinsichtlich ihrer R_f -Werte vereinigt.

Die Analyse der vereinigten Fraktionen fand durch analytische HPLC-UV-MS statt. Es wurde schnell deutlich, dass nur wenig Sekundärmetabolite der Hefe in den Fraktionen vorhanden waren. Ausschließlich die ersten beiden durch Säulenchromatographie an Kieselgel gewonnenen Fraktionen enthielten nennenswerte Konzentrationen an isolierbaren Metaboliten. Es liegt nahe, dass *Sporobolomyces* sp. unter den angewandten Anzuchtmethoden keinen ausgeprägten Sekundärstoffwechsel ausbildete. Trotz dessen wurden die beiden erwähnten Fraktionen näher untersucht, die Hauptkomponenten zum Teil isoliert und deren Struktur aufgeklärt. Im Zuge der Dereplikation wurde keine komplette Charakterisierung der Naturstoffe vorgenommen, da es sich um literaturbekannte, ausreichend beschriebene Verbindungen handelte. Die zur Identifizierung der Sekundärmetabolite genutzten Methoden waren NMR-Spektroskopie, vor allem ^1H -NMR-Spektroskopie und einigen Fällen HPLC-UV-MS. In Abbildung 10 sind die aus *Sporobolomyces* sp. identifizierten Sekundärmetabolite dargestellt.

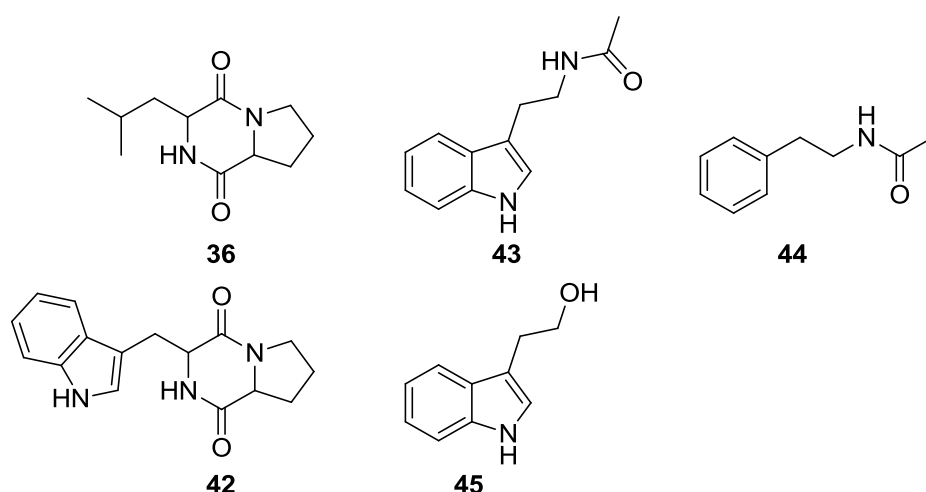


Abb. 10: Identifizierte Sekundärmetabolite aus *Sporobolomyces* sp.. Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**), Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**), N-Acetyltryptamin (**43**), N-Acylphenethylamin (**44**), Tryptophol (**45**)

Die erste, durch Säulenchromatographie erhaltene Fraktion enthielt neben einigen Strukturen mit lipidischem Charakter zwei Hauptmetabolite. Sie wurden mit einer präparativen HPLC getrennt und aufgereinigt. Die Strukturaufklärung ergab, dass es sich bei den Verbindungen um das Diketopiperazin Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**) und den Aromaten N-Acetylphenethylamin (**44**) handelte. Beide Naturstoffe wurden bereits aus verschiedenen Organismen wie z.B. Pilzen und Bakterien beschrieben.^{74,75,67,76} N-Acetylphenethylamin (**44**) wirkt unter anderem als Dopamin-Rezeptor-Agonist, für Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**) wurden antibakterielle Aktivitäten gegen *Micrococcus luteus*

und *Escherichia coli* beschrieben.^{77,67} Aus der zweiten, durch die Säulenchromatographie erhaltenen Fraktion wurden mittels einer präparativen RP-HPLC drei bekannte Naturstoffe isoliert. Mit N-Acetyltryptamin (**43**) konnte eine, zum bereits beschriebenen N-Acetylphenethylamin (**44**) verwandte Struktur aufgereinigt werden. Verschiedene Pilze wie z. B. *Penicillium*-Arten sind bekannte Produzenten dieses Sekundärstoffes.⁷⁸ In Bioassays konnten cytotoxische Aktivitäten gegen verschiedene Krebszelllinien festgestellt werden.⁷⁹ Weiterhin wurde ein zweites Diketopiperazin, das Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**), isoliert. Der dritte, aus der erwähnten Fraktion isolierte Naturstoff ist das Tryptophol (**45**). Es handelt sich um ein Tryptophan-Derivat, welches ein häufig produziertes Sekundärmetabolit in Pflanzen und Mikroorganismen ist. In *Saccharomyces cerevisiae* besitzt es die Funktion als Quorum Sensing Signal, es wurden aber auch antifungale Effekte beschrieben.^{80,81}

Abschließend ist festzuhalten, dass die ermittelte antibakterielle Wirkung des Rohextraktes wahrscheinlich auf die enthaltenen Diketopiperazine zurückzuschließen ist. In Kombination rufen sie, wie bereits in Kapitel 2.1 beschrieben, Bioaktivität gegen das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* hervor. Auf Bioaktivitätstests der isolierten Reinsubstanzen aus *Sporobolomyces* sp. wurde in dieser Arbeit verzichtet, da es sich um ausreichend untersuchte Naturstoffe handelt. Die Hefe produziert unter den angewandten Anzuchtbedingungen nur wenige isolierbare Substanzen. Die Biosynthese weiterer aktiver Sekundärstoffe ist unter *in vivo* Bedingungen jedoch nicht auszuschließen.

2.3 Isolierung von Naturstoffen aus *Cladosporium herbarum* IPk15

Der Stamm *Cladosporium herbarum* IPk15 wurde von einem Blatt eines Kulturapfels isoliert und charakterisiert.⁵⁶ Die Bestimmung erfolgte anhand der morphologischen Charakterisierung der Nebenfruchtformen (Anamorphe). Extrakte des Stammes fielen in einem Screening gegen *Venturia inaequalis* auf, da eine signifikante Inhibierung des Myzelwachstums (71%ige *in vitro* Hemmung) und der Konidienkeimung (63%ige *in vitro* Hemmung) stattfand. Bei *Cladosporium herbarum* handelt es sich um einen ubiquitär vorkommenden Pilz.⁸² Er wurde unter anderem aus der Luft, aus Erdproben oder von der Oberfläche von Pilzen oder Menschen isoliert.^{82,83,84,85,86} Bekannt ist er ebenso als endophytisch lebender Organismus, unter adäquaten klimatischen Bedingungen nutzt er als Epiphyt die Blattoberfläche gesunder Blätter als Habitat. Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung der Bioaktivität von

Ergebnisse und Diskussion

Extrakten des Stammes *Cladosporium herbarum* IPk15 gegen *Venturia inaequalis* durch Isolierung und Identifizierung der verantwortlichen Naturstoffe.

Zur durchzuführenden Isolierung der Sekundärmetabolite des Mikroorganismus wurde eine 3 L Fermentation unter Zugabe von Amberlite XAD-16 kultiviert. Die durch das Amberlite XAD-16 adsorbierten Naturstoffe wurden mit verschiedenen Lösungsmitteln eluiert. Der so gewonnene Extrakt wurde durch eine Ethylacetat-Wasser-Extraktion weiter zum Rohextrakt aufgereinigt. In Anschluss wurde eine Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt, um die Substanzen des Rohextraktes entsprechend ihrer Polaritäten in fünf Fraktionen zu trennen. Die verbliebene wässrige Phase der Ethylacetat-Wasser-Verteilung wurde nochmals mit *n*-Butanol extrahiert. Die durch die Säulenchromatographie erhaltenen fünf Fraktionen, der erwähnte *n*-Butanol-Extrakt und der Rohextrakt wurden auf Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die gewonnenen Ergebnisse der Plattendiffusionstests.

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> K12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AWF2A	---	---	1* cm
AWF2B	---	---	1.5* cm
AWF2C	2 cm	---	1.3* cm
AWF2D	---	---	---
AWF2E	1.8* cm	---	---
Rohextrakt	1.5* cm	---	1.1 cm
Butanol-Extrakt	---	1.6* cm	1.7* cm

Tab. 1: Ergebnisse der Plattendiffusionstests der erhaltenen Fraktionen des Extraktes aus einer Fermentation von *Cladosporium herbarum* IPk15. Angabe der Hemmhöfe (Lysis) [cm]. (* keine deutliche Lysis aber signifikante Hemmung des Wachstums)

Die drei Fraktionen AWF2A – AWF2C wiesen mit Hemmhöfen von 1 cm – 1.5 cm moderate Aktivitäten gegen *Saccharomyces cerevisiae* auf. Fraktion AW2C verursachte zusätzlich zur Aktivität gegen die Hefe mit einem Hemmhof von 2 cm eine deutliche Lysis von *Bacillus subtilis* und zeigte damit eine starke Aktivität gegen das grampositive Bakterium. Fraktion AWF2E hemmte *Bacillus subtilis* moderat durch die Auslösung eines Hemmhofes von 1.8 cm. Die Untersuchung des Rohextraktes auf Aktivitäten gegen die drei Mikroorganismen ergab - vergleichbar zu den fünf getesteten Fraktionen aus der Säulenchromatographie - moderate Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* (Hemmhof 1.5 cm) und *Saccharomyces cerevisiae* (Hemmhof 1.7 cm). Auffällig war, dass der *n*-Butanol Extrakt zusätzlich zu der Aktivität gegen

Saccharomyces cerevisiae (Hemmhof 1.7 cm) Aktivität gegen *Escherichia coli* K12 zeigte (Hemmhof 1.6 cm). In keiner weiteren der untersuchten Fraktionen konnte die Aktivität gegen das gramnegative Bakterium detektiert werden. Im *n*-Butanol-Extrakt müssen dementsprechend Naturstoffe enthalten sein, die nicht durch die Ethylacetat-Wasser-Verteilung extrahiert werden konnten. Es ist festzuhalten, dass in einigen Fällen die zusätzliche Extraktion der wässrigen Phase mit *n*-Butanol durchaus sinnvoll scheint. Die durch die Säulenchromatographie an Kieselgel erhaltenen Fraktionen und der *n*-Butanol-Extrakt wurden mittels HPLC-UV-MS analysiert. Alle Fraktionen sowie der *n*-Butanol-Extrakt enthielten eine Vielzahl an unpolaren, UV-inaktiven Substanzen. Die Auswertung der gemessenen ¹H-NMR-Spektren der Proben ergab, dass es sich bei den UV-inaktiven Strukturen um Fettsäuren bzw. Glycerol-Verbindungen handelte, die in verhältnismäßig hohen Konzentrationen in den Fraktionen angereichert waren. Ursache der Isolierung großer Mengen an Fetten und Fettsäuren ist wahrscheinlich, dass das aus der Fermentation separierte Amberlite XAD 16 nicht komplett vom Mycel des Fungus getrennt werden konnte. Die Elution des Amberlite XAD 16-Mycel Gemischs führte zur Anreicherung von Membranbestandteilen des Pilzes im Rohextrakt die als UV-inaktive, unpolare Substanzen in der HPLC-UV-MS detektiert wurden. In den ersten drei lipophileren Fraktionen der Säulenchromatographie wurden eine Reihe von isolierbaren Naturstoffe detektiert. Der Abgleich der analytischen Daten dieser Verbindungen mit der Naturstoff-Datenbank Dictionary of Natural Products ergab eine Vielzahl an Strukturvorschlägen der untersuchten Peaks. Sichere Aussagen über die Strukturen konnten jedoch nicht getätigt werden. Einige der Verbindungen wurde daher isoliert und die Strukturen durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie ermittelt. Zur Isolierung der Sekundärmetabolite wurden verschiedene präparative HPLC Methoden angewendet. Es konnten acht Strukturen in reiner Form isoliert werden. Bei den isolierten Verbindungen aus *Cladosporium herbarum* IPK15 handelt es sich um Vertreter aus verschiedenen Strukturklassen. Da es sich bei den erhaltenen Naturstoffen um literaturbekannte Verbindungen handelte, wurden diese im Zuge der Dereplikation nicht vollständig charakterisiert. Weiterhin wurden keine Bioaktivitätsuntersuchungen vorgenommen, da diese ausreichend in Literaturquellen dokumentiert sind. Abbildung 11 stellt die in dieser Arbeit isolierten Naturstoffe aus *Cladosporium herbarum* IPK15 dar.

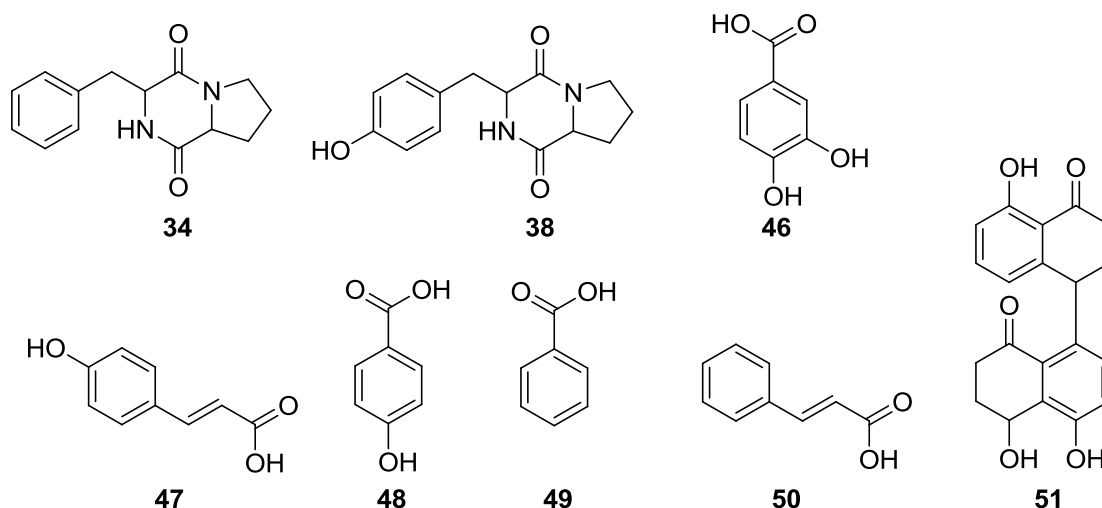


Abb. 11: Identifizierte Sekundärmetabolite aus *Cladosporium herbarum* IPk15. Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**), Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**), 3,4-Dihydroxybenzoessäure (**46**), *p*-Coumarsäure (**47**), *p*-Hydroxybenzoessäure (**48**), Benzoessäure (**49**), Zimtsäure (**50**), Cladosporol C (**51**)

Aus der Säulenchromatographie-Fraktion AWF2A konnte mittels präparativer RP-HPLC die Hauptkomponente der Fraktion, Benzoessäure (**49**), und die Nebenkompente, Zimtsäure (**50**), isoliert werden. Strukturell lassen sich die Verbindungen in die Gruppe der phenylischen Sekundärmetabolite einordnen. Aus der Säulenchromatographie Fraktion AWF2B, die durch Elution mit Ethylacetat gewonnen wurde, konnten weitere Vertreter dieser Substanzklasse durch eine präparative RP-HPLC in reiner Form erhalten werden. Die isolierten Hauptkomponenten der Fraktion waren 3,4-Dihydroxybenzoessäure (**46**), *p*-Hydroxybenzoessäure (**48**) und *p*-Coumarsäure (**47**). Phenylische Sekundärmetabolite wie Benzoessäurederivate oder Phenylpropanderivate sind häufig produzierte Strukturen in Pflanzen, sie werden aber auch von einer Reihe von Pilzen oder Mikroorganismen synthetisiert bzw. befinden sich in deren Metabolismus als katabole Produkte des Abbaus von pflanzlichen Polyphenylen wie dem Lignin.^{87,88} Zimtsäure (**50**) konnte bereits aus einem marinen *Cladosporium* sp. Stamm isoliert werden. Sie zeigte in Bioaktivitäts-Assays starke Hemmungen gegen die fäulniserregenden Bakterien *Loktanella hongkongensis* und *Ruegeria* sp.⁸⁹ *p*-Coumarsäure (**47**) wurde z. B. aus dem Pilz *Fistulina hepatica* isoliert und besaß in anschließenden Test antioxidative Wirkung gegen reaktive Sauerstoffspezies.⁹⁰ Beide Phenylpropanderivate wurden als Precursor für die Biosynthese von Ubichinon in Pflanzen, einigen Pilzen und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben, welches in der Atmungskette als Elektronenüberträger dient.⁹¹ Die Isolierung von Benzoessäurederivaten wie die in dieser Arbeit isolierten 3,4-Dihydroxybenzoessäure

(46), *p*-Hydroxybenzoesäure (48) und Benzoesäure (49) wurden bereits aus verschiedenen Pilzen beschrieben.^{92,93,94} Sie besitzen Funktionen als Chelatoren und Antioxidantien, antibakterielle Wirkungen aber auch fungizide Effekte.^{92,95,87} Möglicherweise handelt es sich bei den in dieser Arbeit isolierten phenolischen Verbindungen um Abbauprodukte von pflanzlichen Polyphenolen wie dem Lignin. Der Abbau dieser Polymere geschieht in degradativen, natürlichen Stoffwechselkreisläufen unter anderem durch Pilze.⁹⁶ Auch die Fähigkeit des Abbaus von Polyphenolen durch *Cladosporium*-Stämme wurde bereits beschrieben.^{97,98} Da die Fermentation des Stammes *Cladosporium* IPK15 in Tryptic Soy Broth erfolgte, handelt es sich eventuell bei den isolierten phenolischen Komponenten um intermediäre Stoffwechselprodukte des Abbaus der pflanzlichen Polyphenole des Mediums. Enzymatische Prozesse setzen diese in Monomere um und anschließend erfolgen oxidative Reaktionen zur weiteren Metabolisierung der Verbindungen. Ein weiterer Naturstoff, der aus der mit Ethylacetat erhaltenen Säulenchromatographie-Fraktion isoliert werden konnte, ist Cladosporol C (51). Es wurde durch eine präparative RP-HPLC als Reinstoff erhalten. Cladosporol C (51) ist neben vier weiteren Cladosporolen, Cladosporol A, B, D, und E ein bekanntes durch *Cladosporium* biosynthetisiertes Sekundärmetabolit. Die Cladosporole wurden ursprünglich aus *Cladosporium tenuissimum* isoliert und hemmten in Bioaktivitätsassays den bohnen-schädigenden Pilz *Uromyces appendiculatus*.⁹⁹ In einem Screening auf anticancerogene Strukturen besaß Cladosporol A hemmende Wirkung gegen Darmkrebszellen.¹⁰⁰ Zwei weitere Naturstoffe konnten durch Elution der Kieselgelsäule mit einem Gemisch aus 75% Ethylacetat und 25% Methanol aufgereinigt werden. Mittels einer präparativen RP-Chromatographie konnten die beiden Diketopiperazine Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (38) und Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (34) erhalten werden. Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (34) wurde bereits aus einem marinen *Cladosporium* isoliert. Es besaß in Bioaktivitätsuntersuchungen antibakterielle Eigenschaften.⁸⁹ Weitere bioaktive Wirkungen von Diketopiperazinen wurden in Kapitel 2.1 beschrieben.

In Bezugnahme der aus *Cladosporium herbarum* IPK15 isolierten Naturstoffe auf die durchgeführten Bioaktivitäts-Untersuchungen können Zusammenhänge geschlossen werden. Die phenolische Komponenten enthaltenen Fraktionen der Säulenchromatographie zeigten hemmende Wirkung auf *Saccharomyces cerevisiae*. Die fungiziden, in der Literatur beschriebenen Wirkungen derartiger Strukturen

wurden damit bestätigt.⁹⁵ Parallel dazu lässt sich daraus auch die biologische Aktivität des Extraktes gegen *Venturia inaequalis* begründen. Ebenso besitzt Cladosporol C (**51**), wie bereits beschrieben, antifungale Wirkungen, welche sich in der Hemmung von *Saccharomyces cerevisiae* und *Venturia inaequalis* durch *Cladosporium herbarum* IPK15 Extrakte dokumentieren ließen. Die antibakterielle Wirkung von Diketopiperazinen konnte durch einen Plattendiffusionstest mit der Fraktion AWF2C, aus welcher Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) und Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) isoliert wurden, bestätigt werden. Die Fraktion zeigte starke Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*. Diese starke Bioaktivität weist darauf hin, dass die Kombination der beiden genannten Diketopiperazine eine effektive antibakterielle Hemmung auslöst. Der *n*-Butanol-Extrakt besaß als einzige getestete Probe Bioaktivität gegen das gramnegative Bakterium *Escherichia coli*. Diese Aktivität konnte nicht aufgeklärt werden, da es mit den zur Verfügung stehenden Isolationsmethoden nicht möglich war die Vielzahl an UV-inaktiven Substanzen des Extraktes zu isolieren. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass durch das Screening von *Cladosporium herbarum* IPK15 die Bioaktivität gegen *Venturia inaequalis* und *Bacillus subtilis* hervorruhenden Hauptmetabolite isoliert und identifiziert werden konnten.

2.4 Isolierung von Naturstoffen aus *Aureobasidium pullulans* ISch31

2.4.1 Der Stamm *Aureobasidium pullulans* ISch31

Der zu untersuchende Mikroorganismus stammt aus der Stammsammlung des Institutes für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover (Arbeitskreis Prof. Georg Auling). Es handelte sich um ein bis zu Beginn dieser Arbeit nicht charakterisiertes epiphytisches *Arabidopsis thaliana* Isolat. In einem biologischen Screening, auf der Suche nach epiphytischen Antagonisten des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis*, zeigte dieses Isolat in Plattendiffusionstests vollständige Wachstumshemmungen von *Bacillus subtilis* (Hemmhof-Durchmesser: 2.6 cm) und *Mycobacterium phlei* (Hemmhof-Durchmesser: 1.7 cm). Zusätzlich hemmten Extrakte des Stammes das Mycelwachstum des Apfelschorferregers *Venturia inaequalis* (86%ige Hemmung).⁵⁶

Im Zuge dieser Arbeit wurde das Isolat als *Aureobasidium pullulans* identifiziert (Abb. 12). Die Bestimmung des hefeähnlichen Pilzes erfolgte über die morphologische Charakterisierung sowie über den Vergleich der molekularbiologischen Daten der

Regionen von ITS und ribosomaler Small Subunit. Die Identifikation des Stammes wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Mikrobielle Wirkstoffe am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig durchgeführt.

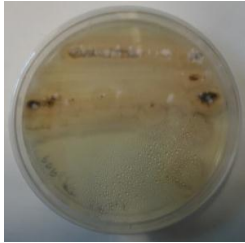


Abb. 12: Der Stamm *Aureobasidium pullulans* ISch31 nach mehrwöchiger Inkubation bei RT auf PDA-Platte.

Aureobasidium pullulans ist ein ubiquitär vertretender Saprophyt.^{101,102} Phylogenetisch zählt die Gattung *Aureobasidium* zu den Ascomyceten (Ordnung Dothideales, Familie Dothioraceae).¹⁰³ Aufgrund der morphologisch sichtbaren Melaninproduktion vieler Varietäten von *Aureobasidium pullulans* wird der Organismus auch als „schwarze Hefe“ bezeichnet.¹⁰⁴ Bekannt ist er für seinen Einsatz in der biotechnologischen Produktion von Pullulan (Poly- α -1,6-Maltotriose) oder einer Reihe von hydrolytischen Enzymen.^{105,106,107} Aber auch die Biosynthese von aktiven Sekundärmetaboliten wie Peptide, Diketopiperazine, Indol-Derivate oder veresterte Dihydroxydecanensäuren konnte dokumentiert werden.^{108,109,110,111} In dieser Arbeit sollte die biologische Aktivität des Stammes *Aureobasidium pullulans* ISch31 durch die Isolierung der für diese verantwortlichen Sekundärmetabolite begründet werden. Der Focus lag dabei auf bisher unbekannten Naturstoffen, deren Strukturen aufgeklärt und charakterisiert werden sollten.

2.4.2 Präscreening von *Aureobasidium* ISch31

Um einen Überblick über die Produktion von Sekundärmetaboliten durch *Aureobasidium pullulans* ISch31 zu erhalten und Reisolation von bekannten Strukturen in größeren Fermentationsansätzen zu verringern wurde ein Präscreening des Stammes durchgeführt. Dafür wurde eine 2 L Kultur unter Zusatz von Amberlite XAD-16 fermentiert. Die an das Amberlite XAD-16 adsorbierten Substanzen wurden mit Methanol eluiert. Zur weiteren Aufreinigung des Eluats wurde eine Ethylacetat-Wasser-Extraktion durchgeführt und diese führte nach Einengung des organischen Lösungsmittels zu 806 mg Rohextrakt. Der gewonnene Rohextrakt wurde im Anschluss durch eine Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel in neun Fraktionen getrennt. Diese wurden mittels HPLC-MS-UV analysiert und zum Teil

Ergebnisse und Diskussion

weiter aufgearbeitet. Parallel dazu wurden die im Präscreening erhaltenen Fraktionen bzw. der Rohextrakt auf Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Tabelle 2 fasst die Ergebnisse der entsprechenden Plattendiffusionstests zusammen.

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> K12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AWE2A	---	1,5***	---
AWE2B	---	1,5***	---
AWE2C	0,4*, 1,2**	1,5**	1*
AWE2D	0,5*, 1,5**	2***	1,3***
AWE2E	0,5*, 1,5**	1,5***	---
AWE2F	2*	2***	---
AWE2G	0,8***	1*	---
AWE2H	1,5***	2*	---
Rohextrakt	1,5***	2*	0,4*, 0,8**

Tab. 2: Ergebnisse der Plattendiffusionstests der erhaltenen Fraktionen des Extraktes aus einer Fermentation von *Aureobasidium pullulans* ISch31. Angabe der Hemmhöfe [cm]. * vollständige Lysis, ** keine vollständige Lysis, aber deutliche Hemmung des Wachstums, *** geringe Hemmung des Wachstums

Die Ergebnisse der Plattendiffusionstests ergaben, dass alle getesteten Proben aus *Aureobasidium pullulans* ISch31 Bioaktivitäten aufwiesen. Der Rohextrakt löste eine starke Lysis (Hemmhofdurchmesser 2 cm) des gramnegativen Bakteriums *Escherichia coli* K12 aus. Weiterhin besaß er nennenswerte Bioaktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae*. Auch das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* wurde, jedoch nur moderat, vom Rohextrakt inhibiert. In den Bioaktivitätstests der Fraktionen der Säulenchromatographie konnten die Aktivitäten des Rohextraktes wiedergefunden und zum Teil auf bestimmte Fraktionen eingegrenzt werden. Nennenswert ist die starke Bioaktivität der Fraktionen AWE2G und AWE2H gegen *Escherichia coli* K12. In diesen beiden Fraktionen befanden sich die hydrophoberen Naturstoffe des Extraktes. Die mit Abstand stärkste Aktivität gegen *Bacillus subtilis* konnte Fraktion AWE2F zugeordnet werden. Lediglich zwei Fraktionen, AWE2C und AWE2D, besaßen Bioaktivität gegen *Saccharomyces cerevisiae*, wobei Fraktion AWE2C starke Aktivität durch die Lysis der Hefe aufwies. Die erzielten Ergebnisse der Plattendiffusionstests bestätigten die Vermutung, dass eine Vielzahl von Naturstoffen im Extrakt von *Aureobasidium pullulans* ISch31 enthalten waren, die unterschiedliche biologische Aktivitäten besitzen. Ziel der weiteren Untersuchungen war es, die Sekundärmetabolite zu identifizieren und ihnen die biologischen Aktivitäten zuzuordnen.

Auffällig in den HPLC-UV-MS und NMR-Spektren der einzelnen Fraktionen war eine hohe Konzentration verwandter, UV-inaktiver Substanzen. Diese wurden mithilfe der Massen- und NMR-Spektren als Liamocine und Exophiline identifiziert. Eine genauere Analyse dieser Verbindungen erfolgt in Kapitel 2.4.3.1. Zusätzlich konnten einige literaturbekannte Strukturen detektiert und teilweise reisoliert werden. Da es sich um bereits dokumentierte Verbindungen handelte, wurden die reisolierten Strukturen im Zuge der Dereplikation nicht komplett neu charakterisiert. Die Identifizierung dieser Strukturen erfolgte mittels ^1H -NMR-Spektroskopie, UV/Vis-Spektroskopie und/oder Massenspektrometrie und anschließendem Abgleich der Daten mit den Datenbanken Dictionary of Natural Products (Chapman & Hall/CRC Chemical Database) und SciFinder (CAS). Es handelte sich um niedermolekulare Naturstoffe, die bereits aus einer Vielzahl von Mikroorganismen isoliert werden konnten. In Abbildung 13 sind die bereits literaturbekannten in dieser Arbeit isolierten Naturstoffe aus *Aureobasidium pullulans* ISch31 dargestellt.

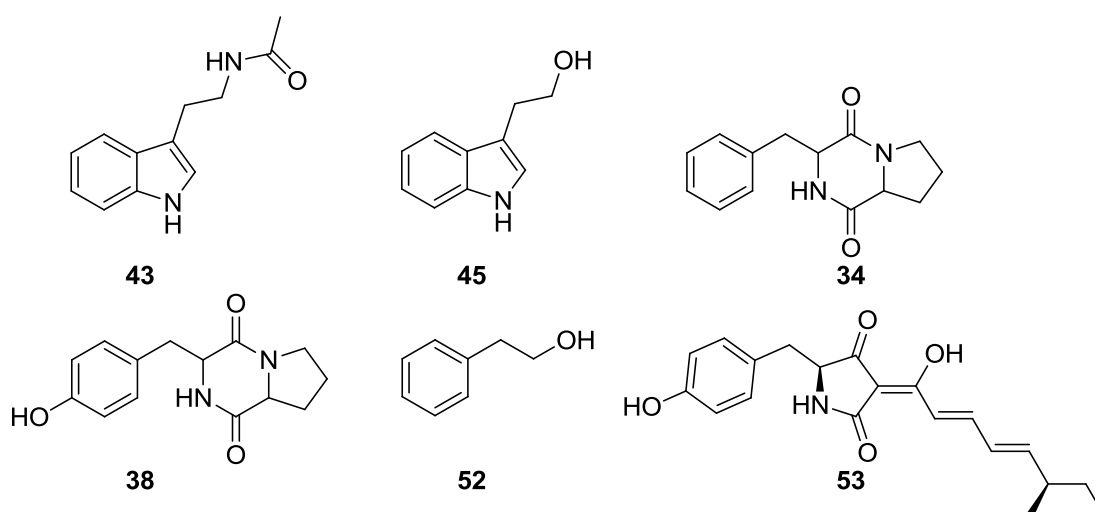


Abb. 13: Im Präscreening identifizierte Sekundärmetabolite aus *Aureobasidium pullulans* ISch31. N-Acetyltryptamin (**43**), Tryptophol (**45**), Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**), Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**), 2-Phenylethanol (**52**), Desmethylpretellenin A (**53**)

3-Indolethanol oder Tryptophol (**45**) konnte direkt mittels einer Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt werden. Die Elution des Kieselgels mit Ethylacetat führte zu nahezu reinem Tryptophol (**45**) in Fraktion AWE2E. Es handelt sich um ein Abbauprodukt der Aminosäure Tryptophan und wird in Zusammenhang mit der Induktion der Schlafkrankheit gebracht.^{112,113} Es konnte unter anderem aus der Hefe *Candida albicans* isoliert werden und besitzt gegen diese autoantibiotische Wirkung.⁸¹ Im durchgeführten Plattendiffusionstest verursachte die Fraktion AWE2E eine vollständige Lysis von *Bacillus subtilis*

(Hemmhofdurchmesser 0.5 cm) und eine geringe Hemmung des Wachstums von *Escherichia coli* K12 (Hemmhofdurchmesser 1.5 cm). N-Acetyltryptamin (**43**) ist ebenfalls ein Tryptophan-Derivat und zählt zu den Indolalkaloiden. Strukturell unterscheidet es sich von Melatonin nur durch das Fehlen einer Methoxygruppe am aromatischen Ringsystem. Es wurde im Präscreening von *Aureobasidium pullulans* ISch31 durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel und präparative RP-HPLC aufgereinigt und anschließend identifiziert. Aus derselben Säulenchromatographie-Fraktion konnte Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) durch eine präparativen RP-HPLC erhalten werden. Mittels hochaufgelöster Massenspektrometrie konnte ein weiteres Diketopiperazin, das Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**), detektiert werden. Diketopiperazine werden von einer Vielzahl von Mikroorganismen gebildet. Die biologischen Aktivitäten der Diketopiperazine wurden bereits in Abschnitt 2.1. beschrieben. Die Hemmung von *Bacillus subtilis* durch die Diketopiperazine enthaltende Fraktion (Hemmhofdurchmesser 2 cm) bestätigte erneut die antibakterielle Wirkung der Dipeptide in bestimmter Kombination untereinander. Wie schon im Abschnitt 2.3 der Untersuchung des *Cladosporium herbarum* IPk15 Extraktes beobachtet, scheint die Kombination der Diketopiperazine Cyclo-Phenyl-Prolyl (**34**) und Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) starke biologische Aktivität gegen *Bacillus subtilis* zu besitzen. Ein weiteres, im Präscreening detektiertes Sekundärmetabolit war das 2-Phenylethanol (**52**). Es konnte mittels einer Säulenchromatographie an Kieselgel des Rohextraktes aufgereinigt werden. Das Eluentengemisch 50% Ethylacetat/ 80% Heptan ergab nahezu reines 2-Phenylethanol (**52**) in Fraktion AWE2C. Eine weitere Fraktion (AWE2D), gewonnen durch das Eluentengemisch 80% Ethylacetat/ 20% Heptan enthielt als Hauptkomponente ebenfalls 2-Phenylethanol (**52**). Es ist ein ubiquitär produziertes Sekundärmetabolit und besitzt antifungale sowie antibakterielle Bioaktivitäten.¹¹⁴ Es wird z. B. von *Candida albicans*, ebenso wie das Tryptophol (**45**), als Autoantibiotikum gebildet.⁸¹ Die durchgeführten Plattendiffusionstests bestätigten die literaturbekannten Aktivitäten des niedermolekularen Naturstoffes. Beide 2-Phenylethanol (**52**) enthaltende Fraktionen zeigten deutliche Hemmung des Wachstums von *Bacillus subtilis* (Hemmhofdurchmesser 1,5 cm) und geringe Hemmungen des Wachstums von *Escherichia coli* K12 (Hemmhofdurchmesser 2 cm) und *Saccharomyces cerevisiae* (Hemmhofdurchmesser 1,3 cm). Ein Hauptmetabolit im HPLC-UV Spektrum mit einem UV-Maximum bei 350 nm konnte aus Fraktion AWE2F isoliert werden. Es handelt sich um Desmethylpretenellin A (**53**). Die

Tetramsäure ist eine Vorstufe des 2-Pyridons Tenellin,¹¹⁵ erstmals isoliert aus dem insektenpathogenen Pilz *Beauveria bassiana*.¹¹⁶ Das Desmethylpretenellin A (**53**) konnte bisher ausschließlich von Cox et al. durch homologe Rekombinations-experimente im Zuge von Tenellin-Biosynthese-Studien in *Aspergillus oryzae* identifiziert werden.¹¹⁷ Die Isolierung der Verbindung aus *Aureobasidium pullulans* ISch31 ist daher der erste Nachweis der Biosynthese dieses Sekundärmetaboliten in einem Wildtyp-Stamm. In Abschnitt 2.4.4 wird die Konfiguration, Biosynthese und Bioaktivität des Sekundärmetaboliten genauer betrachtet.

Zusammenfassend ist anzumerken, dass mittels des Präscreenings von *Aureobasidium pullulans* ISch 31 eine Reihe von bioaktiven Naturstoffen identifiziert werden konnte. Die in dieser Arbeit ermittelten biologischen Aktivitäten dieser Sekundärmetabolite in Plattendiffusionstests gegen verschiedene Mikroorganismen bestätigten Literaturquellen der Verbindungen. Es konnte festgestellt werden, dass eine Vielzahl weiterer interessanter Sekundärmetabolite im Extrakt von *Aureobasidium pullulans* ISch31 enthalten waren. Der Abgleich von Massenspektren und UV/Vis Daten mit den Naturstoffdatenbanken ergab keine eindeutigen Übereinstimmungen. Um diese Verbindungen zu isolieren und die Strukturen aufzuklären wurden weitere Fermentationen zur Gewinnung von zusätzlicher Menge an Rohextrakt angeschlossen.

2.4.3 Aufarbeitung der ersten Fermentation von *Aureobasidium pullulans* ISch31

Im Anschluss an das Präscreening wurde eine Fermentation des Stammes *Aureobasidium pullulans* ISch31 im 3 L Maßstab durchgeführt. Um die Separierung der an das XAD-16 Amberlite gebundenen Sekundärmetabolite zu gewährleisten, erfolgte die Elution mit Lösungsmitteln (Methanol und etwas Aceton). Nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel bis zur wässrigen Phase wurde diese mit Ethylacetat extrahiert, um Salze und stark polare Substanzen wie Farbstoffe abzutrennen. Für eine erste Auftrennung des entstandenen Rohextraktes wurde eine Unterdruck-Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt. Der Extrakt wurde dabei mit verschiedenen Lösungsmittel oder Lösungsmittelgemischen mit zunehmender Polarität in fünf Fraktionen getrennt (AWG2A – AWG2E), welche mittels HPLC-UV-MS analysiert und in Plattendiffusionstests auf Bioaktivität gegen *Escherichia coli*

Ergebnisse und Diskussion

K12, *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* getestet wurden. Tabelle 3. fasst die Ergebnisse der Plattendiffusionstests zusammen.

	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i> K12	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AWG2A	---	---	---
AWG2B	---	---	---
AWG2C	2.4	---	1.2
AWG2D	2.2	---	---
AWG2E	1.4*	---	0.4*

Tab. 3: Ergebnisse der Plattendiffusionstests der erhaltenen Fraktionen des Extraktes aus einer Fermentation von *Aureobasidium pullulans* ISch31. Angabe der Hemmhöfe (Lysis) [cm]. (* keine deutliche Lysis aber signifikante Hemmung des Wachstums)

In Bezugnahme der Ergebnisse der Plattendiffusionstests aus dem Präscreening von *Aureobasidium pullulans* ISch31 (Abschnitt 2.4.2) wurde die biologische Aktivität von Extrakten des Stammes gegen *Bacillus subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae* bestätigt. Es konnte jedoch keine biologische Aktivität gegen *Escherichia coli* K12 reproduziert werden. Auch nach einer zweiten Durchführung der Plattendiffusionstests mit den fünf erhaltenen Fraktionen aus der Säulenchromatographie an Kieselgel konnte diese nicht detektiert werden. Ursache dafür liegt eventuell in der höheren Konzentration von Naturstoffen in den getesteten Proben des Präscreenings. Für die darin durchgeführte Säulenchromatographie an Kieselgel wurde eine höhere Anzahl von Eluenten mit geringeren Polaritätsdifferenzen genutzt, was zu einer größeren Anzahl von Fraktionen mit besser Auftrennung und höher konzentrierten Sekundärmetaboliten führte. Da das Augenmerk in der Aufarbeitung der in diesem Abschnitt beschriebenen Fermentation primär auf die Isolierung neuer Naturstoffe sowie die Identifizierung von Liamocinen und Exophilinen gelegt wurde, wurden diese Ergebnisse der Plattendiffusionstests zunächst vernachlässigt.

2.4.3.1 Untersuchung von Liamocinen und Exophilinen

2.4.3.1.1 Identifizierung von Liamocinen und Exophilinen

Auffällig in den HPLC-UV-MS Spektren aller Fraktionen waren Hauptpeaks, welche ausschließlich in den Massenspuren sichtbar wurden und keine UV-Aktivitäten aufwiesen. Als detektierte Ionen der einzelnen Substanzen dominierten jeweils zwei pseudomolekulare Ionen $[M+Na]^+$ und $[M+H-H_2O]^+$. Die strukturelle Verwandtschaft der Ester wurde durch charakteristische Fragmentierungen deutlich, welche die Identifizierung dieser Naturstoffe als Liamocine beziehungsweise Exophiline zuließ.

Ergebnisse und Diskussion

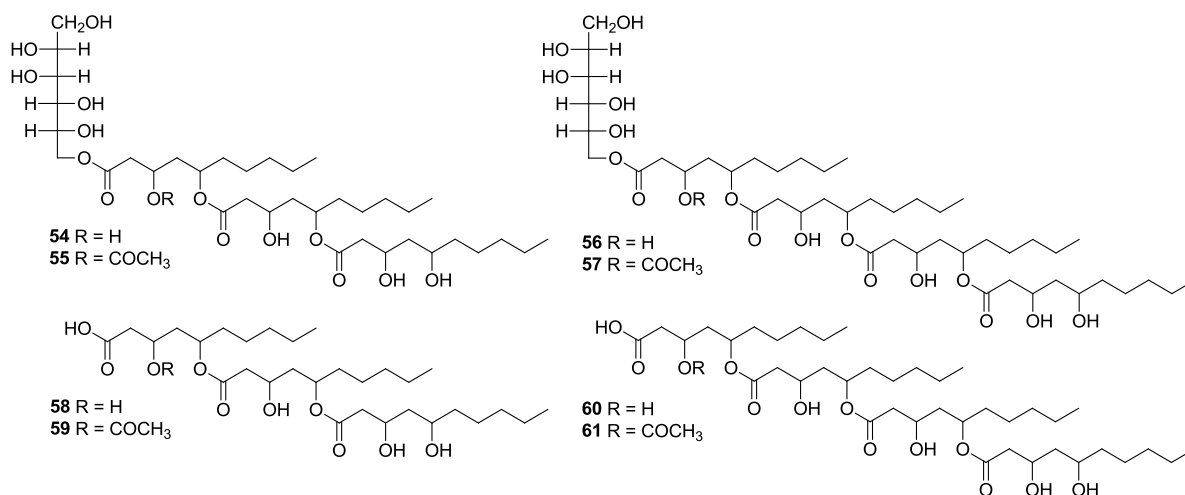


Abb. 14: Literaturbekannte Liamocine und Exophile aus *Aureobasidium pullulans*. Liamocin A1 (**54**), Liamocin A2 (**55**), Liamocin B1 (**56**), Liamocin B2 (**57**), Exophilin A1 (**58**), Exophilin A2 (**59**), Exophilin B1 (**60**), Exophilin B2 (**61**)

Liamocine besitzen Mannit als Kopfgruppe und drei bis vier über 1,5-Polyesterbindungen verknüpfte 3,5-Dihydroxydecanoatreste. Ebenso können partielle Acetylierungen der Struktur vorliegen. Vier Liamocine konnten bereits aus *Aureobasidium pullulans* NRRL 50380 isoliert werden.¹¹⁸ Es handelte sich um zwei Vertreter der Liamocin A Klasse mit je drei Acyl-Gruppen und zwei Vertretern der Liamocin B Klasse mit je vier Acyl-Gruppen. Liamocin A1 (**54**) und B1 (**56**) sind nicht acetyliert, während Liamocin A2 (**55**) und Liamocin B2 (**57**) Acetylierungen an 3`Position besitzen. Exophile bestehen ebenfalls aus den 1,5-verlinkten Poly-3,5-Dihydroxydecanoatresten, besitzen allerdings keine Mannit-Kopfgruppe. Aus dem Stamm *Aureobasidium pullulans* NRRL 50380 konnten zusätzlich zu den Liamocinen vier Exophile isoliert werden. Es handelte sich, vergleichbar zu den Liamocinen, um zwei Substanzen der A Klasse mit drei Acylresten und zwei Verbindungen der B Klasse mit vier Acylresten. Exophilin A1 (**58**) und B1 (**60**) sind nicht acetyliert, Exophilin A2 (**59**) und B2 (**61**) sind an 3`Position acetyliert. Exophilin A1 (**58**) konnte auch aus dem marinen Pilz *Exophiala pisciphila* isoliert werden.¹¹⁹ Abbildung 14 fasst die literaturbekannten Liamocine und Exophile zusammen. In dieser Arbeit konnten eine Reihe bekannter Liamocine und Exophile anhand der Analyse von HPLC-MS-Daten identifiziert werden. Abbildung 15 stellt die Identifizierung und charakteristischen Fragmentierungen der Exophile und Liamocine am Beispiel des Exophilin B1 (**60**) dar. Abgebildet sind die MS Daten (B), die MS-MS-Daten (C) sowie das gesamte HPLC-Chromatogramm mit Massen- und UV-Spur (A). Eine sich stetig wiederholende Fragmentierung war der Verlust von Fragmenten mit der Größe von 186 Da, welche der Abspaltung der O-verknüpften 3,5-Dihydroxydecanoatreste

Ergebnisse und Diskussion

entsprach. Zusätzlich konnten in den Spektren eine Vielzahl an Fragmenten detektiert werden, die dem Verlust von Wasser zugeordnet wurden (Δ -18 Da).

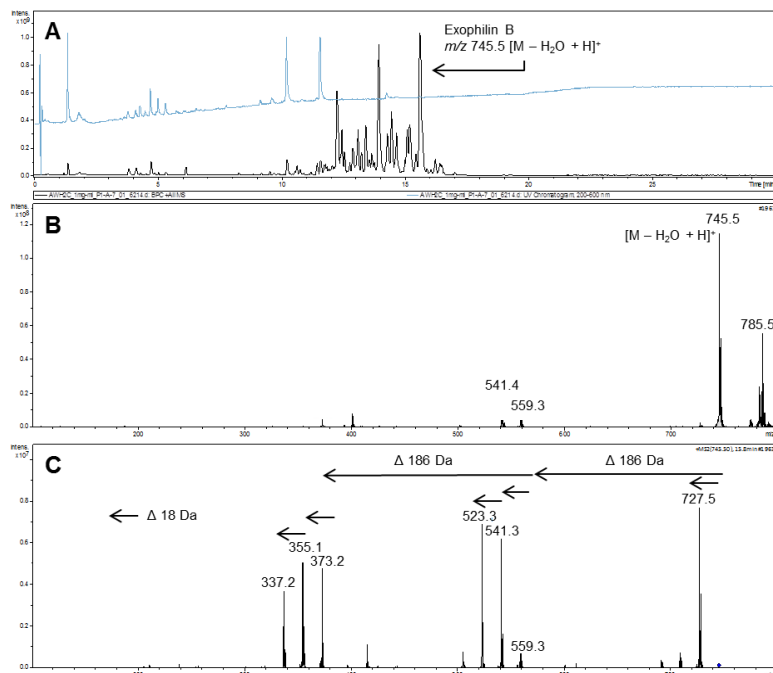


Abb. 15: HPLC-UV-MS Analyse von Liamocinen und Exophilinen anhand von Exophilin B1 (**60**). **A:** UV Chromatogramm (Detektion bei 200 – 600 nm, blau), BPC (schwarz), **B:** MS-Daten von Exophilin B1, **C:** MS-MS-Daten von Exophilin B1 (**60**). (Charakteristische Fragmentierungen der Liamocine und Exophiline wurden beschriftet.)

Anhand dieser typischen, beschriebenen Fragmentierungen konnten weitere Liamocine und Exophiline in den Fraktionen des Extraktes nachgewiesen werden.

Tabelle 4 stellt die in den einzelnen Fraktionen und im Rohextrakt identifizierten Verbindungen dieser Stoffklasse dar. Zur Erstellung der Tabelle wurden ausschließlich die Hauptpeaks analysiert, da kleinere Signale durch die gegenseitige Überlagerung der hohen Anzahl von strukturell verwandten Verbindungen schlecht zu bestimmen waren.

Struktur	Fraktion	t_r	m/z	
			$[M+H-H_2O]^+$	$[M+Na]^+$
Liamocin A1	AWG2C	12.3 min	723	763
Liamocin B1	AWG2C, AWG2D, Butanol-Extrakt	14.1 min	909	949
Exophilin A1	AWG2B	13.4 min	559	599
Exophilin B1	AWG2B, AWG2C, AWG2D, Butanol-Extrakt	15.2 min	745	785

Tab. 4: In einzelnen Fraktionen identifizierte Liamocine und Exophiline durch Auswertung von HPLC-MS-Daten.

In den einzelnen Fraktionen der Säulenchromatographie an Kieselgel dominierten Liamocin A1 (**54**), Liamocin B1 (**56**), Exophilin A1 (**58**) und Exophilin B1 (**60**). Zusätzlich zu diesen bereits bekannten Verbindungen konnte eine Vielzahl an Derivaten dieser Stoffklasse detektiert werden. Die MS, beziehungsweise MS-MS-Messungen ließen aufgrund der typischen Fragmentierung dieser Stoffklasse eine eindeutige Zuordnung zu. Um diese Verwandtschaft der Strukturen zu bestätigen und eventuell sehr niedrig konzentrierte Derivate sichtbar zu machen, wurde die Methode „Molecular Networking“ angewendet.

2.4.3.1.2 „Molecular Networking“ zur Dereplikation von Liamocinen und Exophilinen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode „Molecular Networking“ zur Analyse der Liamocine und Exophiline genutzt. Eine genaue Erläuterung der Methode erfolgt in Abschnitt 2.6. Die MS und MS-MS-Daten der Fraktionen aus der Säulenchromatographie an Kieselgel wurden mittels HPLC-MS generiert. Die geclusterten Daten bildeten nach der Visualisierung das „Molecular Network“. Dieses bestand aus verschiedenen Clustern, welche jeweils verschiedenen Substanzklassen entsprachen.

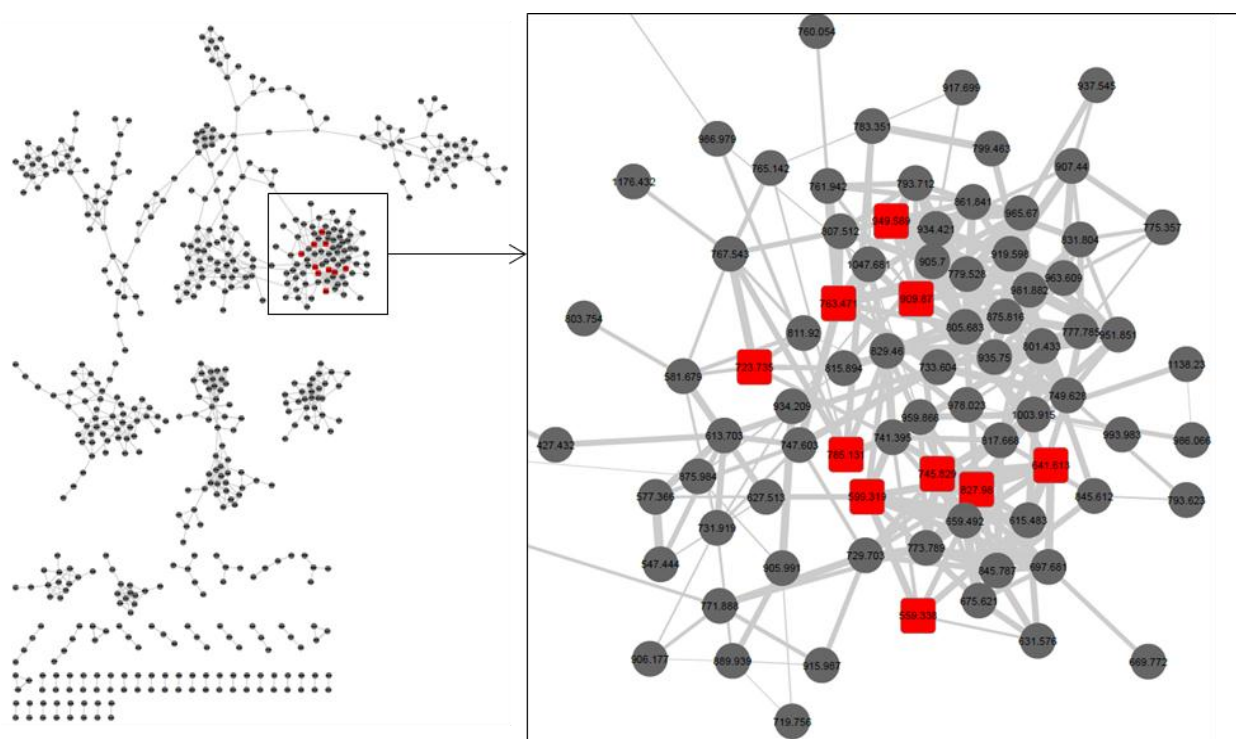


Abb. 16: Molecular Network der Sekundärmetabolite aus *Aureobasidium pullulans* ISch31 mit vergrößertem Exophilin/Liamocin-Cluster. (rote „nodes“: literaturbekannte Liamocine oder Exophiline, graue „nodes“: unbekannte Derivate der Liamocine oder Exophiline“)

Ergebnisse und Diskussion

Aufgrund der charakteristischen Fragmentierungen dieser Verbindungen konnte der Liamocin/Exophilin-Cluster schnell identifiziert werden. (Abb. 16) Die bereits bekannten Strukturen wurden in der Abbildung rot markiert. Es existieren zum Teil verschiedene Ionen einer Verbindung, also z. B. $[M+H-H_2O]^+$ oder $[M+Na]^+$ Addukte, welche die gleiche Verbindung repräsentieren, aber unterschiedlich fragmentieren und somit getrennte „nodes“ bilden. Der Cluster enthält ebenso eine hohe Anzahl an „nodes“, die keinen bekannten Liamocinen oder Exophilinen entsprechen. Es kann davon ausgegangen werden, dass *Aureobasidium pullulans* ISch31 eine Vielzahl noch unbekannter Derivate dieser Strukturklasse bildet. Mittels der Methode des „Molecular Networkings“ konnten diese sichtbar gemacht werden. Teilweise handelt es sich um minimal konzentrierte Substanzen, die durch normale HPLC-MS-Analyse nicht oder nur schwer zu erkennen sind. Mithilfe der MS-MS-Daten können die Fragmentierungen analysiert werden, welche dann Aufschlüsse über die Struktur geben können. In Tab. 5 werden einige analysierte „nodes“ zusammengefasst. Bei „nodes“, die keinem literaturbekannten Liamocin oder Exophilin zugeordnet werden konnten, wurden hypothetische Möglichkeiten von Derivaten vorgeschlagen. Die entsprechenden MS-MS-Daten aller betrachteten „nodes“ befinden sich im Anhang.

node		Fraktion	Vorschlag der Art der Derivatisierung bzw. Dereplikation bekannter Strukturen
$[M-H_2O+H]^+$	$[M+Na]^+$		
723.735	763.471	AWG2B, AWG2C, AWG2D, Butanol-Fraktion	Liamocin A1
909.870	949.589	AWG2C, AWG2D, Butanol-Fraktion	Liamocin B1
559.338	599.319	AWG2B, AWG2C, AWG2D, AWG2E, Butanol-Fraktion	Exophilin A1
745.829	785.131	AWG2B, AWG2C, AWG2D, AWG2E, Butanol-Fraktion	Exophilin B1
	641.613	AWG2B, Butanol-Extrakt	Exophilin A2
	827.980	AWG2C	Exophilin B2
			zusätzliche Hydroxylierung an einem 3,5-Dihydroxydecansäurerestes des Exophilin B1 ($\Delta + 16$)
761.942	801.433	AWG2C	zusätzliche Hydroxylierung an einem 3,5-Dihydroxydecansäurerestes des Exophilin A1 ($\Delta + 16$)
581.679		AWG2B, Butanol-Extrakt	zwei zusätzliche Hydroxylierungen an 3,5-Dihydroxydecansäurerestes des Exophilin B1 ($\Delta + 32$)
777.785	807.512	AWG2C, AWG2D	

Tab. 5: Analyse ausgewählter „nodes“ des „Molecular Networks“ aus dem Extrakt von *Aureobasidium pullulans* ISch31.

Hervorzuheben ist, dass mittels dieser Methode zwei weitere bekannte Vertreter der Substanzklasse identifiziert werden konnten. Es handelt sich um die acetylierten Verbindungen Exophilin A2 (**59**) und Exophilin B2 (**61**). Sie lagen im Extrakt nur in geringster Konzentration vor, bildeten jedoch „nodes“ im Network und konnten mittels

charakteristischer Fragmentierungen in Massenspektren identifiziert werden. Bei den Strukturvorschlägen der Derivate handelt es sich ausschließlich um Hypothesen, die jedoch aufgrund der Fragmentierungen wahrscheinlich sind.

2.4.3.1.3 Biologische Aktivitäten der Liamocine und Exophiline

Einige der bekannten Liamocine und Exophiline wurden bereits auf verschiedene Aktivitäten untersucht. Exophilin A1 (**58**) zeigte moderate Aktivität gegen grampositive Bakterien, z.B. *Staphylococcus aureus* mit einem MIC von 50 µg/ml.¹¹⁹ Des Weiteren wurde berichtet, dass Extrakte Liamocin-produzierender *Aureobasidium pullulans* Stämme Aktivitäten gegen Brustkrebs- und Zervixkarzinom-Zelllinien aufwiesen.¹²⁰ Hinsichtlich der in dieser Arbeit durchgeführten Plattendiffusionstests mit Fraktionen des Extraktes von *Aureobasidium pullulans* ISch31 lässt sich eine Parallele mit der in der Literatur beschriebenen biologischen Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* ziehen. In drei der fünf getesteten Fraktionen (AWG2B – AWG2D) konnte Bioaktivität gegen das ebenfalls grampositive Bakterium *Bacillus subtilis* ermittelt werden. Die Fraktionen AWG2B und AWG2C lösten eine Lysis des Bakteriums aus (Hemmhöfe 2.4 cm und 2.2 cm) Fraktion AWG2D rief eine deutlich sichtbare Hemmung des Wachstums hervor. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Liamocine bzw. Exophiline biologische Aktivität gegen grampositive Bakterien aufweisen. Zur Bestätigung dieser Vermutung müssen jedoch weitere Untersuchungen mit verschiedenen grampositiven Bakterien durchgeführt werden. Die bereits ermittelten Bioaktivitäten und die Kenntnis über die Existenz zusätzlicher Derivate dieser Stoffklasse geben Anlass zur weiteren Untersuchung dieser Verbindungen. Die fehlende UV-Aktivität und die hohe Konzentration einer Vielzahl von Derivaten mit ähnlichen Retentionszeiten erschwerten die Isolierung einzelner Strukturen aus dem vorliegenden Extrakt. Es gelang nicht Reinsubstanzen durch präparative UV-Vis-gekoppelte RP-HPLC bzw. präparative Dünnschichtchromatographie zu isolieren. Eine Möglichkeit zur Aufreinigung dieser UV-inaktiven Substanzen wäre die Kopplung einer präparativen HPLC mit einem alternativen Detektor, wie z. B. einem RI-Detektor oder einem Massenspektrometer. Zur Verzögerung der Retentionszeiten der Liamocine und Exophiline sollte ein isokratischer Gradient gewählt werden.

2.4.3.1.4 Bestimmung der Stereochemie der 3,5-Dihydroxydecanensäureester

Zur Bestimmung der Stereochemie der 3,5-Dihydroxydecanensäurereste wurde das in der Aufarbeitung einer der Fermentationen von *Aureobasidium pullulans* ISch31 identifizierte 3-Hydroxy-5-Decanolid (**62**) als Modellsubstanz genutzt.

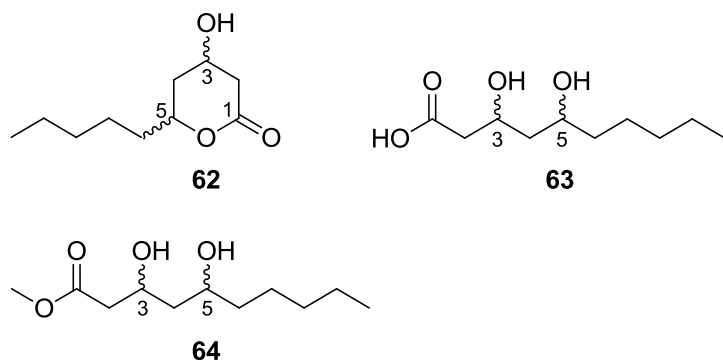


Abb. 17: 3-Hydroxy-5-Decanolid (**62**), Methyl-3,5-Dihydroxydecanesäure (**63**) und 3,5-Dihydroxydecanesäure (**64**) aus Fraktion AWH2BR1 der Aufreinigung des *Aureobasidium pullulans* ISch31 Extraktes.

In der Literatur wird das 3-Hydroxy-5-Decanolid (**62**) als Abbauprodukt von 3,5-Dihydroxydecanesäureresten der Liamocine bzw. Exophiline beschrieben.^{119,111} Mithilfe der Aufklärung der Stereozentren des Lactons können dementsprechend Rückschlüsse über die Konfiguration der 3,5-Dihydroxydecanesäuren getätigt werden. Die ermittelten Konfigurationen der Stereozentren an Position 3 und 5 des δ -Lactons konnten daher auf die Hydroxylgruppen der 3,5-Dihydroxydecanesäuren an den Positionen 3 und 5 übertragen werden.

Das 3-Hydroxy-5-Decanolid (**62**) konnte mittels HRESIMS und 1D- bzw. 2D-NMR-Spektren in Fraktion AWH2BR1 (Abschnitt 2.4.3.2.1) identifiziert werden. Die Fraktion enthielt zusätzlich Methyl-3,5-Dihydroxydecanesäure (**64**) und 3,9-Dihydroxytetradeca-5,7-diensäure (**5**). 3,5-Dihydroxydecanesäure (**63**) wurde ebenfalls in Fraktion AWH2BR1 detektiert, konnte jedoch ausschließlich in der Massenspur der HRESIMS-HPLC identifiziert werden. In der Analyse von 1D- und 2D-NMR-Spektren konnten die Signale den einzelnen Verbindungen zugeordnet werden. Die HRESIMS-Messungen bestätigten die ermittelten Strukturen. Abbildung. 18 zeigt einen Ausschnitt des 1D-NOESY-NMR-Spektrums der Fraktion AWH2BR1 im Bereich zwischen δ_H 1.5 ppm und 4.75 ppm. Im abgebildeten Abschnitt des Spektrums befinden sich die zur Bestimmung der Stereochemie notwendigen Signale der Protonen 1-H bis 5-H des δ -Lactons. Zur genauen Bestimmung der Multiplizität und der Kopplungskonstanten wurden die Parameter der Darstellung des NMR-

Ergebnisse und Diskussion

Spektrums optimiert (line broadening: -1.11, gaussian blur: 0.3). Die vergrößert abgebildeten Signale und ihre ermittelten Multiplizitäten werden in Abb 18 dargestellt.

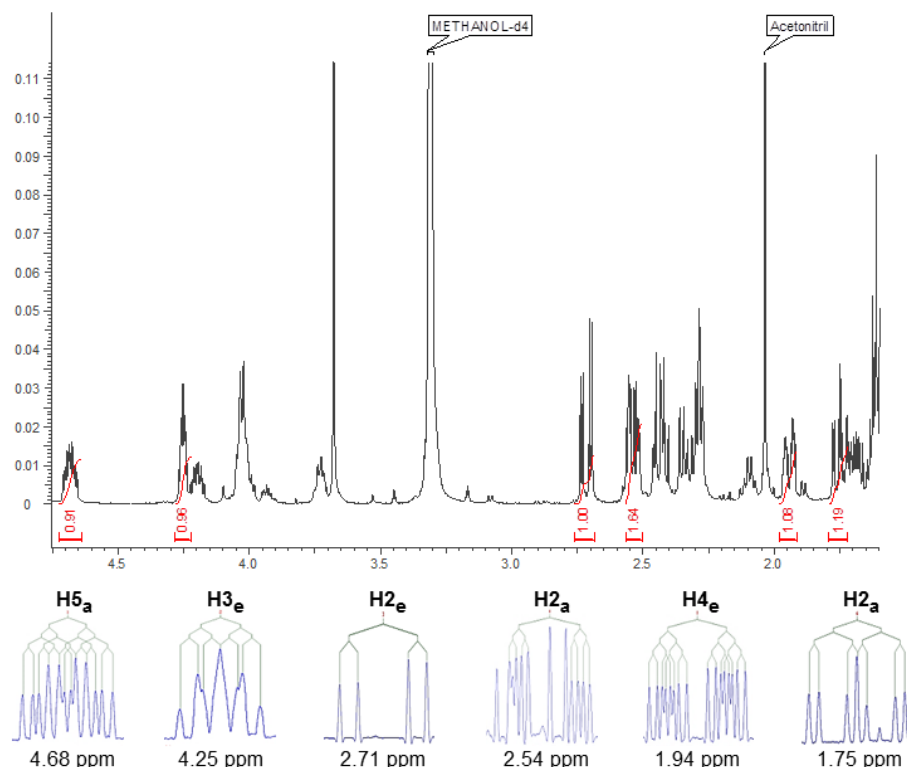
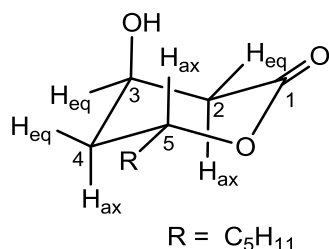


Abb. 18: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion AWH2BR1 (1.6 ppm – 1.75 ppm) mit den zur Konfigurationsanalyse des 3-Hydroxy-5-Decanolids verwendeten Signalen sowie die schematische Darstellung ihrer Multiplizitäten.

Folgende Multiplizitäten und Kopplungskonstanten wurden aus den für die Konfigurationsanalyse des 3-Hydroxy-5-Decanolids relevanten Protonen ermittelt: **H-5_a** δ_{H} 4.68 ppm (dddd, $J = 11.3 \text{ Hz}, 7.9 \text{ Hz}, 4.8 \text{ Hz}, 3.2 \text{ Hz}$), **H-3_a** δ_{H} 4.25 ppm (ddd, $J = 6.9 \text{ Hz}, 4.1 \text{ Hz}, 3.0 \text{ Hz}$), **H-2_e** δ_{H} 2.71 ppm (dd, $J = 17.5 \text{ Hz}, 6.9 \text{ Hz}$), **H-2_a** δ_{H} 2.54 ppm (ddd, $J = 17.5 \text{ Hz}, 3.5 \text{ Hz}, 1.8 \text{ Hz}$), **H-4_e** 1.94 δ_{H} (dddd, $J = 14.3 \text{ Hz}, 4.1 \text{ Hz}, 3.2 \text{ Hz}, 1.8 \text{ Hz}$), **H-2_a** δ_{H} 1.75 (ddd, $J = 14.3 \text{ Hz}, 11.3 \text{ Hz}, 3.0 \text{ Hz}$). Die Interpretation der Signale und Kopplungskonstanten erfolgte basierend auf der Annahme, dass der Ring des Lactons in Sesselkonformation vorliegt. Nach intensiver Analyse der Kopplungskonstanten zwischen entsprechenden Protonen konnten diese als *axial* bzw. *equatorial* zugeordnet werden (Abb 19).

Ergebnisse und Diskussion



$$\begin{array}{lll}
 {}^2J_{2a,2e} = 17.5 \text{ Hz} & {}^3J_{3e,4a} = 3.0 \text{ Hz} & {}^2J_{4a,4e} = 14.3 \text{ Hz} \\
 {}^3J_{2a,3e} = 6.9 \text{ Hz} & {}^3J_{3e,4e} = 4.1 \text{ Hz} & {}^3J_{4a,5a} = 11.3 \text{ Hz} \\
 {}^3J_{2e,3e} = 3.5 \text{ Hz} & & {}^3J_{4e,5a} = 3.2 \text{ Hz} \\
 {}^4J_{2e,4e} = 1.8 \text{ Hz} & &
 \end{array}$$

Abb. 19: Sesselkonfiguration des 3-Hydroxy-5-Decanolids und Kopplungen der beteiligten Protonen. (geminal 2J , vicinal 3J , W-Kopplung 4J)

5-H wurde als axiales Proton bestimmt, da eine große vicinale Kopplung von 11.4 Hz zu einem Proton an Position 4 vorlag, welches demzufolge ebenfalls in axialer Position vorliegen musste. Die Kopplungskonstanten der Protonen an Position 4 zum 3-H waren mit 4.1 Hz und 3.0 Hz niedrig. Es lagen somit eine ae und eine ee Kopplung vor, was eine equatoriale Lage des 3-H vermuten ließ. Zwischen 3-H und den Protonen an Position 2 mussten dementsprechend je eine ee und ae Kopplung, jedoch keine aa Kopplung existieren. Die Kopplungskonstanten betrugen 3.5 Hz und 6.5 Hz. Die Zuordnung als ee und ae Kopplungen konnte anhand dieser beiden Kopplungskonstanten nicht eindeutig bestätigt werden. Es wurde jedoch eine Kopplungskonstante von 1.8 Hz zwischen 4- H_e und dem zweiten Proton an Position 2 ermittelt werden, was eine räumliche Kopplung beider Protonen vermuten ließ. Es handelt sich bei dieser Kopplung um eine charakteristische W-Kopplung. Diese tritt ausschließlich bei ee Kopplungen in Sechsringen auf. Das somit als equatorial festgelegte Proton zeigte zum 3-H die Kopplungskonstante 6.9 Hz, das axiale Proton koppelte mit dem equatorialen 3-H mit 3.5 Hz. Die relative Stereochemie des Lactons wurde anhand dieser Ergebnisse als *syn* bestimmt. Dieses Ergebnis und der Vergleich mit Literaturdaten von 3-Hydroxy-5-Decanoliden führte zur Festsetzung der absoluten Stereochemie als (3*R*,5*R*)-3-Hydroxy-5-Decanolid (**62**). Der Vergleich der NMR-Daten mit den Literaturdaten eines synthetisierten, ursprünglich aus *Acremonium recifei* isolierten, (3*R*,5*R*)-3-Hydroxy-5-Decanolids bestätigte diesen Vorschlag.^{121,122} Das aus dem Exophilin A1 Produzenten *Exophiala pisciphila* isolierte 3-Hydroxy-5-Decanolid besaß ebenso die (3*R*,5*R*)-Konfiguration. Die Stereozentren der 3,5-Dihydroxydecansäurereste wurden entsprechend als 3*R*,5*R* beschrieben.¹¹⁹ Die absolute Konfiguration der 3,5-Dihydroxydecansäurereste der

Liamocine und Exophiline wurde mithilfe der stereochemischen Informationen des (3*R*,5*R*)-3-Hydroxy-5-Decanolids (**62**) als 3*R*,5*R* festgelegt. Daraus schlussfolgernd besitzt auch das beschriebene methylierte 3,5-Dihydroxydecansäurederivat (**64**) diese Konfiguration. In der Literatur gibt es eine dokumentierte Quelle zu Stereozentren dieser Verbindungen aus einem marinen *Aureobasidium pullulans*. Es konnte eine 3,5-Dihydroxydecansäure isoliert werden, welche auf die (3*R*,5*R*)-Konfiguration festgelegt wurde.¹²³ Zugriff auf NMR-Daten dieser Dihydroxydecansäure war nicht möglich, trotzdem bestätigt diese postulierte Konfiguration die in dieser Arbeit ermittelte Stereochemie der (3*R*,5*R*)-3,5-Dihydroxydecansäure (**63**). Stereochemische Informationen zu den Decansäureresten der Exophiline und Liamocine wurden bisher nicht in der Literatur dokumentiert. Abbildung 20 stellt die aus *Aureobasidium pullulans* ISch31 produzierten Naturstoffe der in diesem Abschnitt besprochenen Strukturklasse dar.

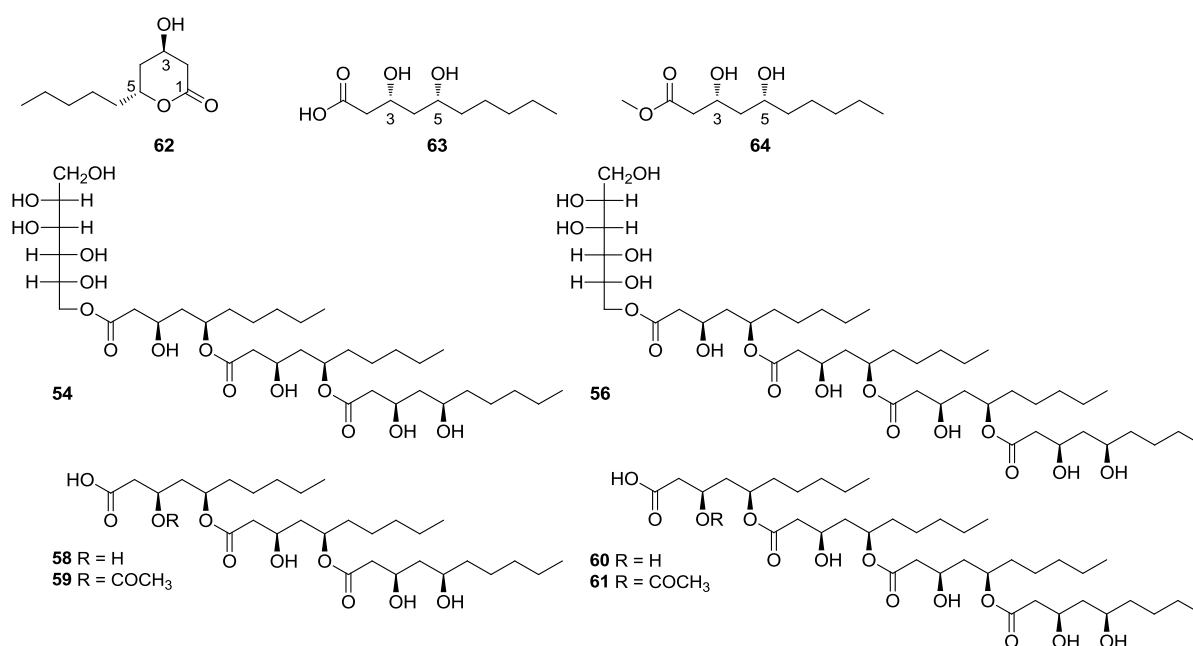


Abb. 20: Konfigurationen des 3-Hydroxy-5-Decanolids (**62**), der 3,5-Dihydroxydecansäure (**63**), der Methyl-3,5-Dihydroxydecansäure (**64**) sowie der Liamocine und Exophiline aus *Aureobasidium pullulans* ISch31. Liamocin A1 (**54**), Liamocin B1 (**56**), Exophilin A1 (**58**), Exophilin A2 (**59**), Exophilin B1 (**60**), Exophilin B2 (**61**)

2.4.3.2 Isolierung von Reinsubstanzen

2.4.3.2.1 Isolierung von niedermolekularen Polyketiden

In denen mit unpolaren Lösungsmitteln eluierten Fraktionen der Säulenchromatographie an Kieselgel konnten verschiedene Sekundärmetabolite mit ähnlichen UV-Spektren und Massen zwischen m/z 223 und m/z 265 detektiert werden. Die UV-Spektren der Strukturen zeigten jeweils zwei Maxima, wobei das erste Maximum bei

Ergebnisse und Diskussion

etwa $\lambda_{\max}$ 195 nm bis 210 nm und das zweite bei etwa 280 nm bis 290 nm lag. Der Abgleich der analytischen Werte mit der Naturstoff-Datenbank Dictionary of Natural Products ergab keine Übereinstimmung mit bekannten Naturstoffen. Die Strukturen wurden anschließend durch verschiedene chromatographische Schritte aufgereinigt. Erschwert wurde die Isolierung von Reinsubstanzen durch die vergleichbar hohe Menge an Liamocinen und Exophilinen in den Fraktionen des Extraktes. Durch Zusatz von Ameisensäure konnten die Retentionszeiten der Liamocine und Exophiline verzögert werden, so dass die Zielstrukturen meist kürzere Retentionszeiten besaßen und isoliert werden konnten.

Aus Fraktion AWG2A konnten zwei Substanzen mittels einer präparativen RP-HPLC aufgereinigt werden. Naturstoff **2** erwies sich in Methanol als instabil und wurde trocken bei -7 °C gelagert. Zusätzlich erfolgten jegliche präparative Methoden zügig und, wenn möglich, unter Lichtabschluss. Furanon **1** erwies sich als stabil und besaß eine etwas geringere Retentionszeit als Naturstoff **2**, was auf eine höhere Polarität des Moleküls hindeutete.

Aus Fraktion AWG2B wurde in einer präparativen RP-HPLC eine Hauptkomponente isoliert. Die Aufreinigung der Struktur erfolgte durch einen zweiten präparativen RP-HPLC Schritt, um verbliebene Liamocine bzw. Exophiline abzutrennen. Aus Fraktion AWG2B1 konnte so Naturstoff **3** erhalten werden. Der Naturstoff erwies sich als stabil und wurde trocken bei 4 °C gelagert.

Alle aus diesem Extrakt erhaltenen Naturstoffe wurden analysiert und charakterisiert. Abbildung 21 zeigt schematisch die Aufreinigungsschritte der drei Substanzen.

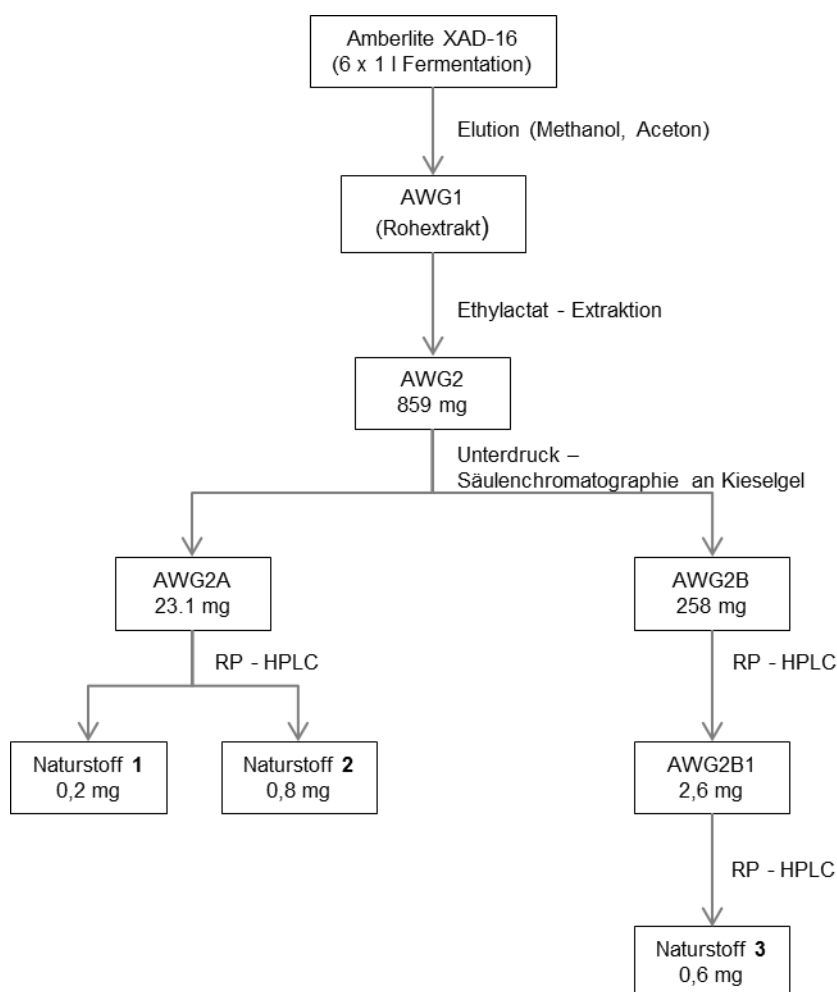


Abb. 21: Isolierungsschema der unbekannten Polyketide **1**, **2** und **3**

2.4.3.2.2 Strukturaufklärung der unbekannten Polyketide

2.4.3.2.2.1 Strukturaufklärung von Naturstoff **1**

Der gelbliche Feststoff besaß in der HRESIMS-HPLC eine Retentionszeit von 5.96 min, das hochaufgelöste HRESIMS-Massenspektrum ergab ein Molekularion $[M+H]^+$ von m/z 223.0969 sowie ein Natrium-Addukt $[M+Na]^+$ bei m/z 245.0787. Die aus der hochaufgelösten Masse berechnete Summenformel $C_{12}H_{14}O_4$ entsprach einem Doppelbindungsäquivalent von 6. Im Massenspektrum konnte ein sehr dominantes Fragment von m/z 155.0337 detektiert werden. Das UV/Vis-Spektrum zeigte zwei Maxima bei 203 nm und bei 276 nm. Im 1H -NMR-Spektrum konnten 4 vinyliche Protonen (7-H, δ_H 6.15 ppm, 8-H, δ_H 7.34 ppm, 9-H, δ_H 6.32 ppm, 10-H, δ_H 6.32 ppm) determiniert werden, die mithilfe von HSQC-NMR ihren korrelierten Kohlenstoffen zugeordnet wurden. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe im ^{13}C -NMR bestätigten den vinylichen Charakter der CH-Gruppen C-7 (δ_C 127.8 ppm), C-8 (δ_C 146.3 ppm), C-9 (δ_C 131.5 ppm) und C-10 (δ_C 142.8 ppm). Über 1H ,

^1H -COSY-NMR-Spektroskopie konnten die vier CH-Gruppen als zwei konjugierte Doppelbindungen identifiziert werden. Die vicinale Kopplung zwischen 7-H und 8-H betrug $^3J = 15.5 \text{ Hz}$ und deutete daher auf den *trans*-Charakter dieser Doppelbindung. Leider überlagerten sich die Protonen-Signale der zweiten Doppelbindung (9-H, 10-H) zu einem Multiplett, so dass die Kopplungskonstanten nicht sicher bestimmt werden konnten. Die sich im Multiplett wiederholende Kopplungskonstante von 15.3 Hz deutet jedoch auf eine *trans*-Konfiguration der zweiten Doppelbindung zwischen 9-H und 10-H hin. C-11 konnte mittels ^1H , ^1H -COSY-NMR als eine mit 9-H koppelnde, Methylgruppe ($\delta_{\text{C}} 18.8 \text{ ppm}$; $\delta_{\text{H}} 1.89 \text{ ppm}$) zugeordnet werden, welche die vinyliche Kette terminiert. Im HMBC-NMR konnten zwischen 7-H bzw. 8-H und C-6 Kopplungen beobachtet werden. C-6 wurde aufgrund der Tieffeldverschiebung des Signals bei $\delta_{\text{C}} 197.7 \text{ ppm}$ als Ketogruppe identifiziert.

Mithilfe der 1D-NMR-Spektren konnten zwei, ins Tieffeld verschobene CH_2 -Gruppen identifiziert werden (C-4 $\delta_{\text{C}} 72.5 \text{ ppm}$, 4-H $\delta_{\text{H}} 4.93 \text{ ppm}$, C-12 $\delta_{\text{C}} 58.5 \text{ ppm}$, 12-H $\delta_{\text{H}} 4.51 \text{ ppm}$), welche auf die Nachbarschaft von elektronenziehenden Gruppen deuteten. Beide Gruppen zeigten Singulett-Multiplizität im Protonenspektrum, jedoch schwache gegenseitige Kopplungen im ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum. Mittels HMBC-NMR konnten ausgehend von 4-H und 12-H Kopplungen zu drei quartären Kohlenstoffen bestimmt werden (C-1 $\delta_{\text{C}} 176.6 \text{ ppm}$, C-2 $\delta_{\text{C}} 121.2 \text{ ppm}$, C-3 $\delta_{\text{C}} 166.5 \text{ ppm}$). C-1 deutete hinsichtlich der chemischen Verschiebung ins Tieffeld auf eine Esterbindung hin. Anhand der chemischen Verschiebungen und Kopplungen der genannten Signale im HMBC-NMR konnten diese zu einer substituierten Furanonuntereinheit erklärt werden. Des Weiteren konnten im HMBC-NMR schwache Kopplungen von 5-H zu den quartären Kohlenstoffen C-1 und C-2, sowie zu C-6 ermittelt werden. Die Konnektivität der terminalen, polyketidischen Kette zur Furanoneinheit wurde somit bestätigt. Bei der aufgeklärten Struktur handelt sich um ein Hydroxymethylfuranon, substituiert mit einer oxidierten, vinylichen Seitenkette.

An C-5 befinden sich zwei CH-acide Wasserstoffatome. Im ^1H -NMR-Spektrum, welches nach kurzer Lagerung bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen wurde, konnte diese Gruppe infolge des Protonenaustausches gegen Deuterium nicht eindeutig identifiziert werden. Ebenso ist das Signal des zugehörigen Kohlenstoffs sehr schwach. In einem vorher, direkt nach der Isolierung gemessenen ^1H -NMR-Spektrum wurde ein

Ergebnisse und Diskussion

deutliches Signal bei δ_{H} 3.66 ppm detektiert. Durch die 2D-NMR-Spektren und entsprechende Kopplungen zu anderen Signalen wurde die CH_2 Gruppe jedoch bestätigt. Abbildung 22 und Tabelle 6 veranschaulichen Auswertung der NMR-Daten von Furanon **1**.

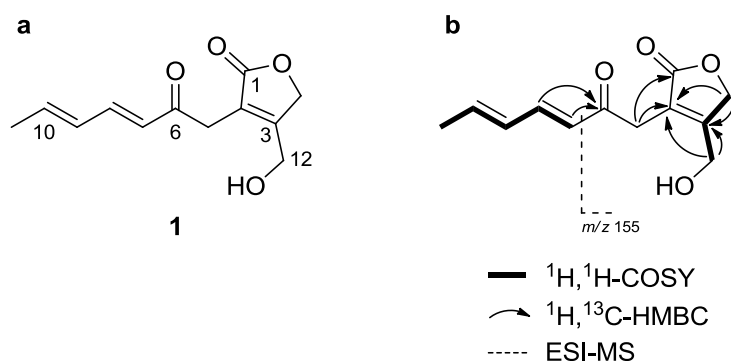


Abb. 22: a) Naturstoff **1**. b) COSY-Korrelationen, wichtige HMBC-Kopplungen und MS-Fragmentierung für Naturstoff **1**

Atom	δ_{c}	Typ	δ_{H}	m	$J[\text{Hz}]$	COSY	TOCSY	HMBC
1	176.8	C						(4, 5, 12)
2	121.1	C						4, 12, (5)
3	166.5	C						4, 12
4	72.5	CH_2	4.93	s			12, (5)	2, 3, (1)
5	30.8	CH_2	3.66	s			(4, 12)	(1, 2, 6)
6	197.8	C						4, 7, 8, (12)
7	127.8	CH	6.15	d	15.5	8	8, 9, 10, 11	6, 9
8	146.3	CH	7.34	dd	9.9, 15.5	7, 9	7, 9, 10, 11	6, 10
9	131.5	CH	6.32	m		8, 10	7, 8, 10, 11	7, 8, 11
10	142.8	CH	6.32	m		9, 11	7, 8, 9, 11	8, 11, (9)
11	18.8	CH_3	1.89	d	5.8	10	7, 8, 9, 10	9, 10
12	58.5	CH_2	4.51	s			4, (5)	2, 3, 4, (1, 6)

Tab. 6: Zusammenfassung der NMR-Daten von Naturstoff **1**

2.4.3.2.2.2 Strukturaufklärung von Naturstoff **2**

Der gelblich bis orange Feststoff konnte als zweite Hauptkomponente aus Fraktion AWG2A aufgereinigt werden. Mittels verschiedenen NMR-Techniken und HRESIMS wurde die Struktur aufgeklärt. Das UV/Vis-Spektrum wies mehrere Maxima auf. Die Maxima bei 201 nm und 281 nm deuteten auf Doppelbindungen bzw. eine aromatische Untereinheit. Im HRESIMS Massenspektrum wurden zwei Hauptsignale detektiert. Beide Signale entsprachen einer Masse von m/z 229 $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$. Das HRESIMS ergab ein Natrium Addukt mit m/z 269.0790 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, die resultierende

Ergebnisse und Diskussion

Summenformel der Struktur entsprach $C_{14}H_{14}O_4$ mit einem Doppelbindungsäquivalent von 8.

Im direkt nach der Isolierung aufgenommenen 1H -NMR-Spektrum konnten charakteristische Signale, δ_H 6.20 ppm und δ_H 6.24 ppm, eines substituierten Phenylrestes sowie Signale eines Diensystems von δ_H 6.22 ppm bis δ_H 7.35 ppm identifiziert werden. Zusätzlich existierte ein Aldehyd-Signal bei δ_H 9.86 ppm. Die nach kurzer Lagerung bei 4 °C gemessenen 1D- und 2D-NMR-Spektren zeigten ein Gemisch aus zwei Strukturen. Die Ursache dafür lag in einer Tautomerisierung der Struktur durch Lagerung in Methanol. Da die Struktur eine schlechte Löslichkeit $CDCl_3$ und CD_3CN besaß, wurden weitere Spektren trotz des Tautomerisierungseffektes in MeOD als Lösungsmittel gemessen. Die Strukturauflösung erfolgte anschließend mit den 1D- und 2D-NMR-Spektren des Gemischs aus zwei Verbindungen. Die Zuordnungen erfolgten auf Grundlage des direkt nach der Isolierung aufgenommenen Protonenspektrums und entsprechenden Korrelationen in 2D-NMR-Spektren. Die Verbindungen konnten beide aufgeklärt werden. Zugehörige NMR-Daten werden in dieser Arbeit getrennt voneinander angegeben.

Bei der ursprünglich isolierten Struktur handelt es sich um Aldehyd **2**. Analog zu Furanon **1** wurde ein konjugiertes Diensystem mit terminaler Methylgruppe durch 1H -NMR, COSY- bzw. TOCSY-NMR-Spektren bestimmt. Das HMBC-NMR-Spektrum zeigte eine Korrelation vom 9-H des Diensystems zu einer Carbonylgruppe bei δ_C 199.3 ppm bzw. zu 7-H, welches im 1H -NMR-Spektrum einem Singulett bei δ_H 4.19 ppm entsprach und durch ein phasensensitives HSQC-NMR-Spektrum als CH_2 -Gruppe bestimmt wurde. 7-H koppelte wiederum im HMBC-NMR-Spektrum mit zwei quartären Kohlenstoffen des Phenylrestes, welche chemische Verschiebungen von δ_C 142.9 ppm und δ_C 114.2 ppm besaßen sowie mit 5-H. Durch weitere Korrelationen im HMBC-NMR konnten die Kohlenstoffe des Phenylrestes zugeordnet werden. Die chemischen Verschiebungen von C-2 bei δ_C 167.4 ppm und C-4 bei δ_C 166.8 ppm wiesen auf zwei Hydroxylierungen des Aromaten hin. Im COSY-NMR konnte eine schwache Korrelation zwischen den beiden aromatischen Protonen 3-H und 5-H detektiert werden. Die Kopplungskonstante wurde im 1H -NMR-Spektrum ermittelt und entsprach 2.4 Hz, was auf eine *meta*-Kopplung der aromatischen Protonen deutete. Des Weiteren konnte eine Kopplung des Aldehydsignals bei δ_H

Ergebnisse und Diskussion

9.86 ppm mit den Kohlenstoffen des aromatischen Systems im HMBC-NMR bestimmt werden. Als aromatischer Substituent konnte nach entsprechenden Zuordnungen der Signale als 2,4-Dihydroxybenzaldehyd determiniert werden. Die Zuordnung des 14-H zum C-14 war im HSQC-NMR nicht möglich und geschah über das HMBC-NMR-Spektrum, in welchem diese eindeutig zuzuordnen war. Die ermittelten NMR Daten des Aldehyds **2** sind in Abbildung 23 und Tabelle 7 zusammengefasst.

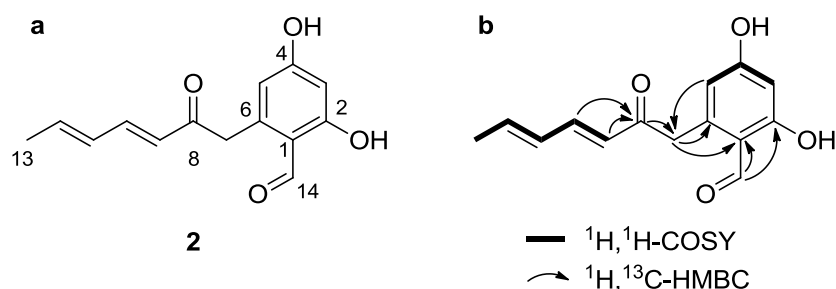


Abb. 23: a Naturstoff **2**. b COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Naturstoff **2**

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	$J[\text{Hz}]$	COSY	TOCSY	HMBC
1	114.2	C						3, 5, 7, 14
2	167.4	C						3, 14
3	102.5	CH	6.20	d	2.4	5	5	1, 5, 14
4	166.8	C						3, 5
5	112.9	CH	6.24	d	2.4	3	3, 7	1, 3, 6, 7
6	142.8	C						7, (14)
7	44.8	CH ₂	4.19	s			5	1, 5, 6, 8
8	199.3	C						7, 9, 10
9	127.6	CH	6.22	d	15.3	10	7, 10, 11, 12, 13	8, 11, 12
10	146.0	CH	7.35	m		9, 11	9, 11, 12, 13	8, 11, 12, 13
11	131.5	CH	6.33	m		10, 12	9, 10, 12, 13	9, 10, 13
12	142.9	CH	6.33	m		11, 13	9, 10, 11, 13	9, 10
13	18.9	CH ₃	1.88	d	5.8	12	9, 10, 11, 12	11, 12
14	194.4	CH	9.86	s			7	1, 2, 3, (6)

Tab. 7: Zusammenfassung der NMR-Daten von Naturstoff **2**

Ergebnisse und Diskussion

Das Tautomerisierungsprodukt von Naturstoff **2** (**2***) (Abb. 24) zeigte in den 1D-NMR-Spektren signifikante Unterschiede zu denen des Aldehyds **2**.

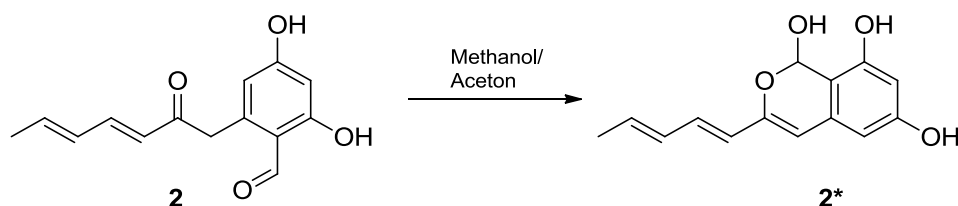


Abb. 24: Tautomerisierung von Naturstoff **2** in Methanol und Aceton

Es fehlten die Signale der Aldehydfunktionalität, der CH₂ Gruppe an Position 7 und der Carbonylgruppen. Dafür existierten das zusätzliche Signal einer in das Tieffeld verschobenen CH-Gruppe bei δ_{H} 6.16 ppm und δ_{C} 96.8 ppm und das Signal einer CH Gruppe mit Doppelbindungscharakter bei δ_{H} 5.83 ppm und δ_{C} 106.1 ppm. Durch 2D-NMR-Korrelationen konnte diese CH Gruppe einem Triensystem zugeordnet werden. Auch das Tautomerisierungsprodukt zeigte im ¹H-NMR-Spektrum eine *meta*-Kopplung am Aromaten, welche durch Kopplungen von 3-H und 5-H im COSY-NMR bestätigt wurde. Anstelle der Korrelation des aromatischen Ringes mit dem Aldehyd trat eine Kopplung zum tieffeldverschobenen CH-9 auf. Als Schlussfolgerung musste durch Lagerung in Methanol ein Ringschluss zu einem Halbacetal erfolgt sein. Abbildung 25 und Tabelle 8 veranschaulichen die Auswertung der ermittelten NMR-Daten des Tautomerisierungsproduktes **2***.

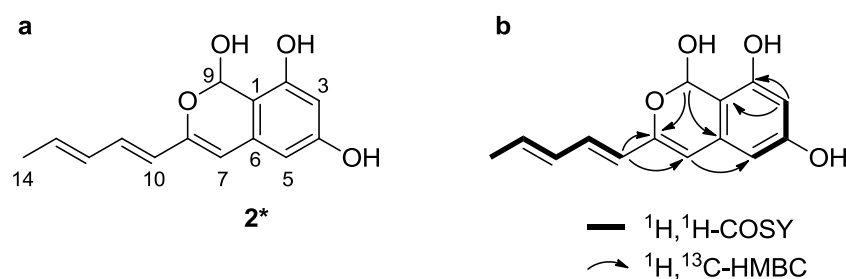


Abb. 25: **a** Tautomerisierungsprodukt von Naturstoff **2** (**2***). **b** COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für das Tautomerisierungsprodukt von Naturstoff **2** (**2***)

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	J[Hz]	COSY	TOCSY	HMBC
1	107.9	C						3, 5, 7
2	160.1	C						3, 5
3	102.1	CH	6.18	d	2.4	5	5	1, 2, 4, 5
4	156.2	C						3, 7, (5)
5	103.2	CH	6.06	d	2.4	3	3, (7)	1, 2, 3, 7, (4)
6	134.1	C						9
7	106.1	CH	5.83	s			5	1, 5, 8, 10, (4)
8	150.6	C						7, 9, 10, 11
9	96.8	CH	6.16	s				6, 8
10	125.4	CH	6.01	d	15.1	11	11, 12, 13, 14	7, 8, 12, (11)
11	131.2	CH	6.76	dd	11.0, 15.1	10, 12	10, 12, 13, 14	7, 8, 13
12	132.7	CH	6.19	m		11, 13, (14)	10, 11, 13, 14	10, 13, 14
13	132.5	CH	5.87	dq	6.8, 13.8	12, 14	10, 11, 12, 14	10, 11, 14
14	18.5	CH ₃	1.81	dd	1.3, 6.8		10, 11, 12, 13	12, 13, (11)

Tab. 8: Zusammenfassung der NMR-Daten von Naturstoff 2*

2.4.3.2.2.3 Strukturaufklärung von Naturstoff 3

Der Naturstoff **3** wurde als orangefarbener bis bräunlicher Feststoff isoliert. Im HRESIMS konnte das Molekularion m/z 263.0919 $[M+H]^+$ detektiert werden. Die sich daraus ergebende Summenformel der Struktur entsprach $C_{14}H_{14}O_5$ mit einem Doppelbindungsäquivalent von 8. Analytische Parameter wie UV-Maxima bei λ_{max} 204 nm und 280 nm und die Retentionszeit der LC-MS deuteten strukturell auf ein Derivat des aus Fraktion AWG2A isolierten Aldehyds **2** hin. Die Summenformel unterschied sich ausschließlich durch die Addition eines Sauerstoffatoms. Auch die ermittelten NMR-Daten der Verbindung deuteten auf eine strukturelle Verwandtschaft der Strukturen hin. Im 1H -NMR-Spektrum existierten vergleichbare Signale eines substituierten Phenylrestes mit zwei aromatischen Protonen bei δ_H 6.26 ppm und δ_H 6.28 ppm, deren Kopplungskonstante von 1.9 Hz einer *meta*-Kopplung entsprach. Ebenso enthielt das Protonenspektrum Signale einer Kette mit terminaler Methylgruppe sowie eines Diensystems. Im Gegensatz zum Aldehyd **2** gab es jedoch kein Signal einer Aldehydgruppe. Des Weiteren lag das Signal einer CH_2 Gruppe mit δ_H 3.54 ppm etwas hochfeldverschoben vor. Im ^{13}C -NMR-Spektrum konnte anstelle des Aldehydsignals das Signal einer Carbonylgruppe bei δ_c 175.3 ppm identifiziert werden, deren chemische Verschiebung auf den Charakter einer Carboxylgruppe deutete. Bezüglich der Summenformel und der Existenz der Carboxylgruppe lag bei der isolierten Verbindung der Austausch der Aldehydfunktionalität der Verbindung **2** gegen eine Carboxylgruppe nahe. Diese Vermutung bestätigte sich durch die

Ergebnisse und Diskussion

Auswertung von 2D-NMR-Spektren. Im HMBC-NMR korrelierte 7-H mit C-14 sowie mit weiteren Signalen des aromatischen Phenylrestes. Weitere Kopplungen entsprachen den Korrelationen, welche im HMBC-NMR von Aldehyd **2** ermittelt wurden. Auch in COSY- und TOCSY-NMR-Spektren bestätigten sich die analogen Spinsysteme beider Verbindungen. Tabelle 9 und Abb. 26 veranschaulichen die Auswertung der ermittelten NMR-Daten des Naturstoffes **3**.

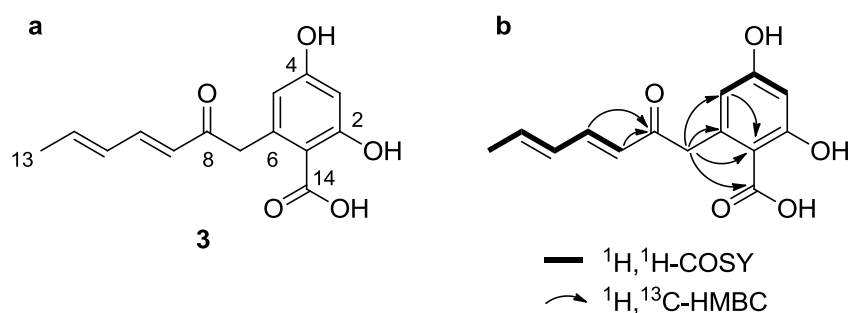


Abb. 26: a Naturstoff **3**. b COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Naturstoff **3**

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	$J[\text{Hz}]$	COSY	TOCSY	HMBC
1	120.4	C						5, 7
2	159.8	C						3
3	102.6	CH	6.26	d	1.9	5	5	2, 4, 5
4	161.6	C						3, 5
5	111.4	CH	6.28	d	1.9	3	3, 7	1, 3, 4, 7
6	137.6	C						7
7	40.6	CH ₂	3.54	s			5	1, 5, 6, 14
8	198.5	C						9, 10
9	131.0	CH	6.54	d	15.3	10	10, 11, 12, 13	8, 11
10	145.7	CH	7.09	dd	15.3, 10.8	9, 11	9, 11, 12, 13	8, 12, (11)
11	131.9	CH	6.31	dd	14.8, 10.8	10, 12	9, 10, 12, 13	12, 13, (9, 10)
12	141.5	CH	6.21	m		11, 13	9, 10, 11, 13	10, 11, 13
13	18.9	CH ₃	1.86	d	6.7	12	9, 10, 11, 12	11, 12
14	175.3	C						7

Tab. 9: Zusammenfassung der NMR Daten von Naturstoff **3**

2.4.3.2.3 Überlegungen zur Biosynthese der Naturstoffe **1**, **2** und **3**

Biosynthetisch gibt es derzeit keine dokumentierten Untersuchungen von strukturell vergleichbaren Furanonen. Eventuell wird Furanon **1** durch eine PKS synthetisiert und durch Acetylierung derivatisiert und anschließend cyclisiert. Es müssen jedoch Biosyntheseuntersuchungen angeschlossen werden, um sichere Aussagen zu tätigen. Es konnten bereits ähnliche Strukturen aus verschiedenen Pilzen isoliert werden. Abbildung 27 stellt einige bekannte Beispiele dieser Naturstoffgruppe dar.

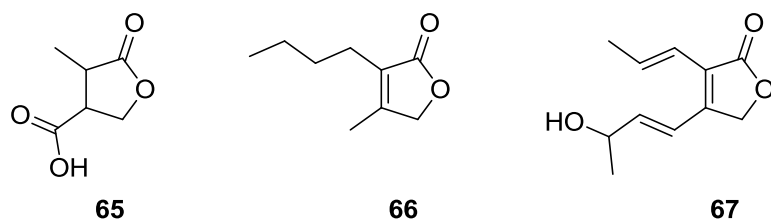


Abb. 27: Literaturbekannte, mit Naturstoff **1** verwandte, Furanone. Methylparaconsäure (**65**) aus *Penicillium rubrum*, Lacton **66** aus *Nermania serpens*, Pestalafuranone J (**67**) aus *Pestalotiopsis besseyi*

Methylparaconsäure (**65**) wurde aus einem extremophilen *Penicillium rubrum* isoliert.¹²⁴ Paraconsäuren zeigten antitumor-Wirkungen gegen verschiedene Krebszelllinien.¹²⁵ Lacton **66** konnte aus Extrakten von *Nermania serpens* identifiziert werden.¹²⁶ Eine Gruppe von, mit Naturstoff **1** strukturell verwandten Furanonen, die Pestalafuranone, wird von einem *Nigrospora* sp. Stamm und von *Pestalotiopsis besseyi* gebildet. Ein Beispiel dieser Substanzklasse ist das Pestalafuranon J (**67**). Die Strukturen besaßen in Bioaktivitätsuntersuchungen keine antitumor-Wirkung, jedoch moderate antifungale Effekte.^{127,128}

Die beiden isolierten, aromatischen Sekundärmetabolite **2** und **3** stammen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus einem gemeinsamen Biosyntheseweg. Aufgrund dieser Annahme wurde die hypothetische Biosynthese der Naturstoffe gemeinsam betrachtet. Es handelt sich um aromatische Polyketide, genauer um Orsellinsäurederivate. Die Biosynthese dieser Verbindungen ist weit verbreitet unter Pilzen. In Abb. 28 sind einige Beispiele von verwandten Naturstoffen zu denen in dieser Arbeit isolierten Sekundärmetaboliten abgebildet.

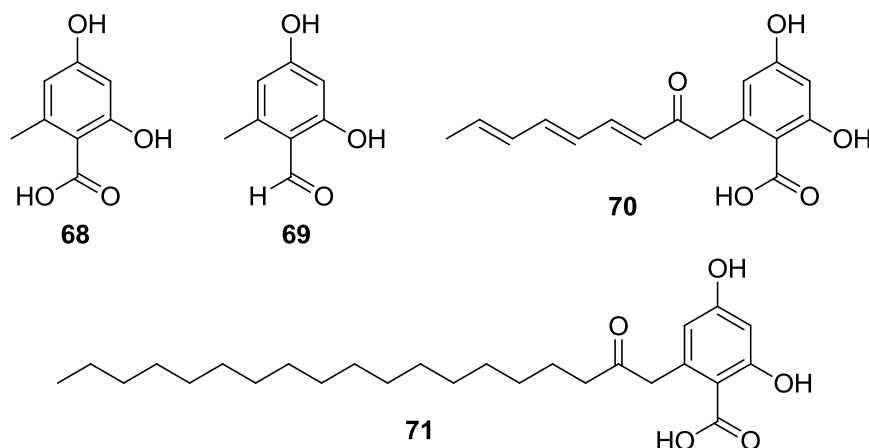


Abb. 28: Biosynthetisch verwandte Strukturen mit Naturstoff **2** und **3**. Orsellinsäure (**68**) z.B. aus *Aspergillus nidulans*, Orsellinaldehyd (**69**) z.B. aus *Aspergillus nidulans*, Orsellinsäurederivat (**70**) aus *Aspergillus nidulans*, Orsellinsäurederivat (**71**) aus *Neurospora crassa*.

Eine der niedermolekularen dargestellten Polyketide ist die Orsellinsäure (**68**). Sie konnte unter anderem aus *Aspergillus nidulans* isoliert werden. Die Biosynthese zweier weiterer verwandter Strukturen, die eine Aldehyd-Funktion besitzen, konnten in diesem *Aspergillus nidulans* Stamm detektiert werden. Es handelt sich um Orsellinaldehyd (**69**) und ein Orsellinsäurederivat (**70**), das im Gegensatz zum Naturstoff **3** eine zusätzliche Doppelbindung in der Kette besitzt.¹²⁹ Eine verlängerte aliphatische Kette eines aromatischen Polyketids enthält ein aus *Neurospora crassa* isoliertes Sekundärmetabolit (**71**).¹³⁰ Die Biosynthese der dargestellten Naturstoffe wurde bereits aufgeklärt. Orsellinsäure (**68**) und Orsellinaldehyd (**69**) werden durch eine gewöhnliche NR-PKS synthetisiert. Die Strukturen stellen Tetraketide dar, die durch den Einbau von 3 x Malonyl CoA synthetisiert werden. Die Abspaltung vom Enzym erfolgt im Falle der Orsellinsäure reduktiv durch die R-Domäne oder beim Orsellinaldehyd hydrolytisch.¹³¹ Die literaturbekannten Sekundärmetabolite **70** und **71** werden durch mechanistisch vergleichbare Biosynthesewege gebildet. Sie sind Produkte einer Typ III PKS, die mit einer FAS kombiniert ist. Die Typ III PKS präferiert auch ungewöhnliche, CoA-aktivierte Starter wie Fettsäuren oder Cinnamoyl. Diese werden durch eine Fettsäuresynthase gebildet und direkt auf die PKS übertragen. Die PKS III verlängert den Starter im Falle der betrachteten Verbindungen mit Pentaketiden, die zu den aromatischen Untereinheiten cyclisieren.^{132,130} Es erscheint naheliegend, dass die Naturstoffe **2** und **3** ebenso durch einen solchen FAS Typ III PKS Hybrid synthetisiert werden. Als Starter dient das durch eine Typ III PKS synthetisierte Hexadiensystem, welches um ein Pentaketid aus vier Malonyl-CoA-Einheiten verlängert wird. Abbildung 29 stellt diesen

hypothetischen Biosyntheseweg vereinfacht dar. Die Ursache in der Bildung des Aldehyds oder der Carbonsäure kann nicht sicher bestimmt werden. Eventuell handelt es sich, wie bereits beschrieben, ebenso um unterschiedliche Arten der Abspaltungen vom Enzym. Entweder erfolgt diese reduktiv oder hydrolytisch. Um sichere Aussagen zu tätigen müssen Biosynthesestudien durchgeführt werden.

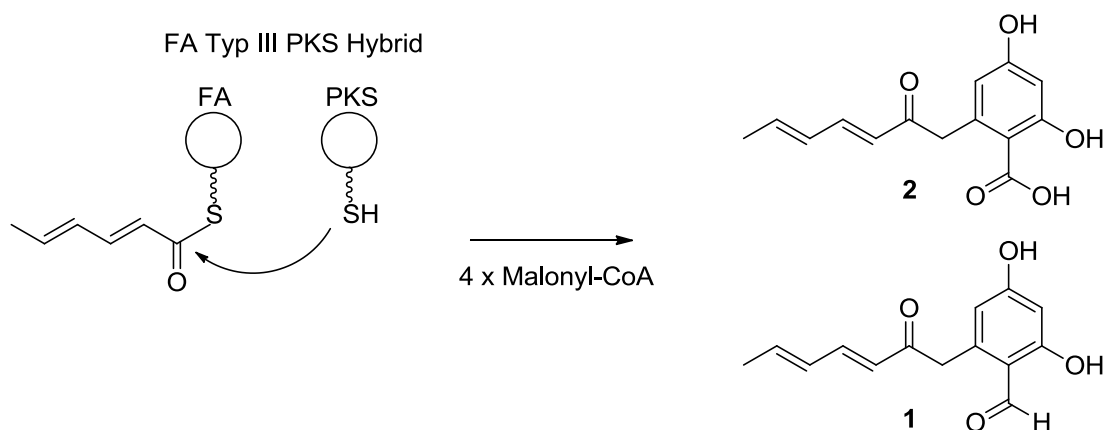


Abb. 29: Hypothetische Biosynthese von Naturstoff **2** und **3**. (Grafische Darstellung in Anlehnung an HERTWECK *et al.*)¹³²

2.4.3.2.4 Untersuchungen zur Bioaktivität der Naturstoffe **1**, **2** und **3**

Die als Reinstoffe isolierten Naturstoffe **1**, **2** und **3** wurden auf Bioaktivität gegen das Hitzeschockprotein Hsp90 (*heat shock protein*) getestet. Hitzeschockproteine bilden ein interessantes Target, da sie mit Krankheiten wie Krebs, Alzheimer oder Malaria in Zusammenhang gebracht werden. Die Durchführung der Assays erfolgte am Institut für Biophysik (AG Carsten Zeilinger) der Leibniz Universität Hannover in standardisierten Assays.¹³³ Keine der Verbindungen besaß signifikante Aktivität gegen das Protein. Eine schwache Hemmung konnte jedoch durch Furanon **1** erzielt werden. Bei einer Konzentration von $\geq 0.5 \mu\text{M}$ existierte eine geringfügige Inhibierung von Hsp90. Es ist denkbar, dass das Furanon **1** gegen andere Chaperone höhere biologische Aktivitäten besitzt. Untersuchungen zur Bestätigung dieser Vermutung müssen angeschlossen werden.

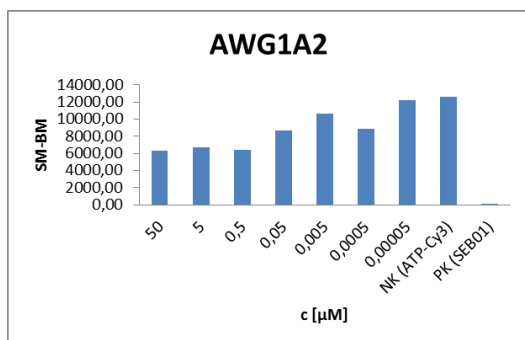


Abb. 30: Inhibierung von Hsp90 durch unterschiedliche Konzentrationen von Naturstoff **1**. x-Achse: Konzentration Naturstoff **1** [µM], y-Achse: Aktivität Hsp90. NK Negativkontrolle. PK Positivkontrolle.

Für Naturstoff **2** konnte eine moderate Aktivität gegen L929-Mausfibroblasten festgestellt werden. Der IC_{50} betrug 7 µg/mL. Die isolierte Menge des reinen Naturstoffs **3** reichte für Cytotoxizitätsuntersuchungen nicht aus. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zwischen Naturstoff **2** und **3** ist für Naturstoff **3** ebenfalls cytotoxische Aktivität gegen L929-Mausfibroblasten zu erwarten. In durchgeführten Plattendiffusionstests zeigte keine der Strukturen Bioaktivitäten gegen die Mikroorganismen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae*.

2.4.4 Aufarbeitung der zweiten Fermentation von *Aureoabsidium pullulans* ISch31

2.4.4.1 Isolierung von unbekannten Sekundärmetaboliten

Im Prä-Screening des Stammes *Aureobasidium pullulans* ISch31 konnte in der HPLC-UV-Analyse neben Desmethylpretenellin A (**53**) ein weiteres, dominantes Derivat dieser Struktur detektiert werden. Der Vergleich der Retentionszeiten, DAD Spektren und Massen beider Verbindungen führte zur Erkenntnis, dass es sich um eine strukturell sehr ähnliche Substanz handeln musste. Die Retentionszeit des Derivates war etwas kürzer als die des Desmethylpretenellin A (**53**), was auf eine höhere Polarität des Derivates schließen ließ. Beide Strukturen zeigten in den DAD-Spektren Maxima zwischen 340 und 350 nm und unterschieden sich in der Masse um 17 Da. Für das Derivat konnte in der HPLC-UV-MS-Analyse das pseudomolekulare Ion $340.15 [M+H-H_2O]^+$ detektiert werden. Um das unbekannte Derivat aufzureinigen, wurde das Amberlite XAD-16 von 2 x 3 L Kulturen mit verschiedenen Lösungsmitteln eluiert und der erhaltene Rohextrakt weiter aufgearbeitet. Es wurde als Desmethylprototenellin D (**8**) identifiziert und charakterisiert. Die Isolierung des Desmethylprototenellin D (**8**) wurde erschwert, da

Ergebnisse und Diskussion

es sich sehr als instabil herausstellte. Um die Verbindung vor Zersetzung und Coagulation zu schützen, wurden die Arbeitsschritte zügig durchgeführt. Die Lagerung erfolgte grundsätzlich trocken bei $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In der analytischen HPLC-UV-MS der Fraktion AWH2B konnte eine weitere Verbindung mit einem zum Desmethylpretenellin A (**53**) ähnlichen DAD-Spektrum detektiert werden. Das Molekularion 294.13 [M+H]^+ der Verbindung **4** ließ ebenfalls auf das Vorhandensein eines Stickstoffatoms schließen und führte zur Vermutung, dass es sich um eine weitere, dem Desmethylpretenellin A (**53**) ähnliche Struktur handeln musste. Sie wurde ebenfalls isoliert und als Pyridon **4** charakterisiert.

Bei der Analyse der Fraktion AWH2B fielen weitere Substanzen aufgrund vergleichbarer UV-Spektren auf, da sie alle ein Absorptionsmaximum um die 230 nm besaßen. Die Naturstoffe wurden mittels mehrerer präparativer RP-HPLC-Schritte aufgereinigt. Die Trennung wurde hinsichtlich sich ähnelnder Retentionszeiten erschwert. Drei der Substanzen konnten isoliert und analysiert werden. Es handelte sich um die Naturstoffe **5**, **6** und **7**. Die allgemeinen Schritte der Aufreinigung des Extraktes und der Isolierung von Reinsubstanzen werden in Abb. 31 schematisch dargestellt.

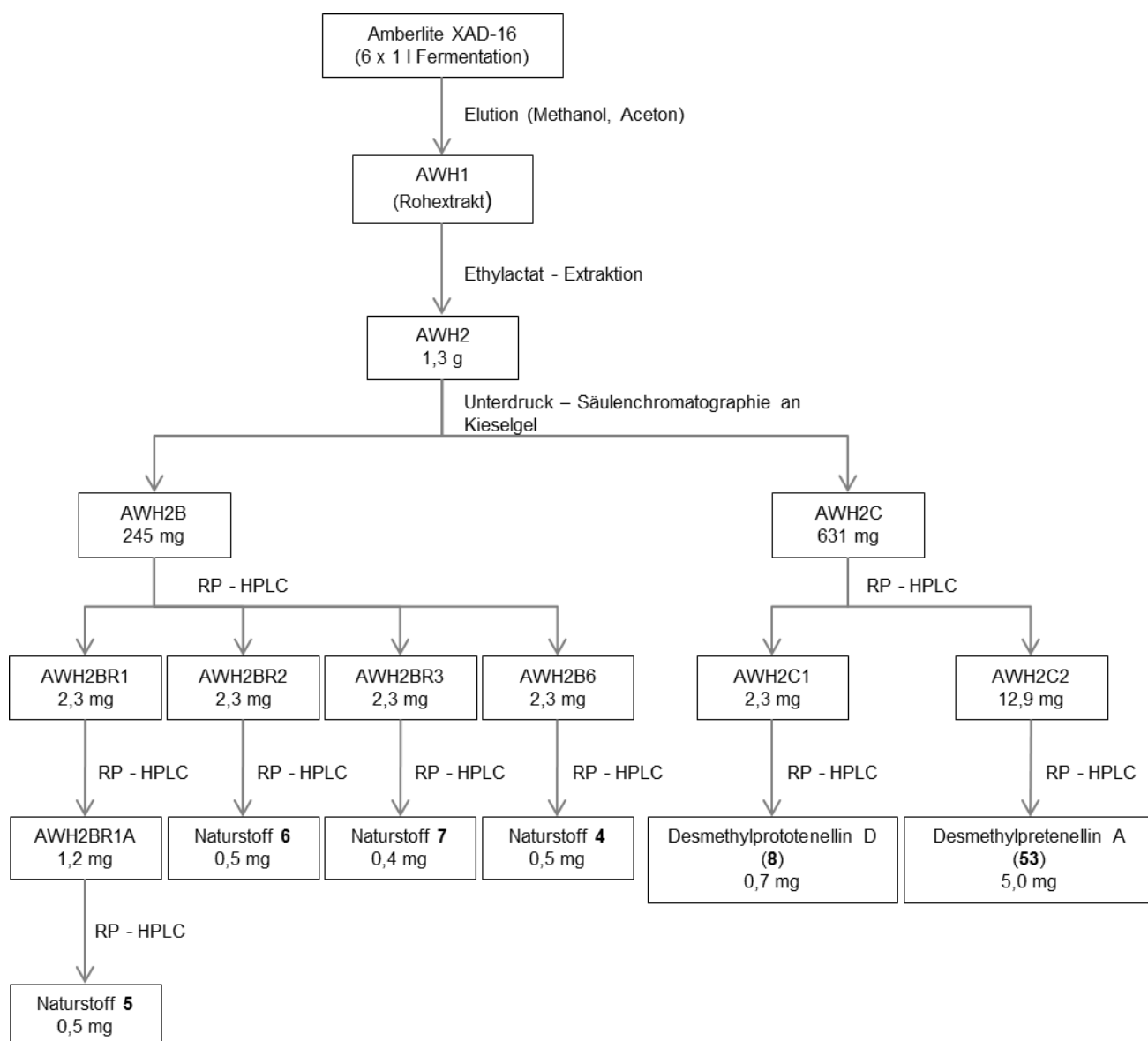


Abb. 31: Isolierungsschema für die Naturstoffe **4,5,6,7**, Desmethylpretenellin A (**53**) und Desmethylprototenellin D (**8**).

2.4.4.2 Strukturaufklärung und Untersuchungen von PKS-NRPS-Hybrid-Synthese Produkten

2.4.4.2.1 Strukturaufklärung von Desmethylprototenellin D

Die Struktur des gelben Feststoffs wurde mittels HRESIMS und 1D- bzw. 2D-NMR-Spektroskopie aufgeklärt. NMR-Spektren wurden ausschließlich in über Aluminiumoxid filtriertem, deuteriertem Chloroform gemessen. Bei Messungen in unfiltriertem Chloroform zersetzte sich die Struktur aufgrund des aciden Charakters des Lösungsmittels.

Das HRESI-Massenspektrum zeigte ein Molekularion von m/z 358.1648 $[M+H]^+$ und ein Ion nach Wasserabspaltung von m/z 340.1548 $[M+H-H_2O]^+$. Aus der hochaufgelösten Masse ergab sich die Summenformel $C_{20}H_{23}NO_5$, welche einem

Doppelbindungsäquivalent von 10 entsprach. Im UV/Vis-Spektrum wurden Absorptionsmaxima bei 226 nm, 364 nm und 372 nm detektiert, welches somit starke Ähnlichkeit zu dem des Desmethylpretenellin A (**53**) besaß. Mithilfe von HSQC-NMR-Spektroskopie wurden die im ^1H -NMR detektierten Protonen denen an diese direkt gebundenen Kohlenstoffe zugeordnet. Aufgrund charakteristischer chemischer Verschiebungen von Protonen und deren direkt gebundenen Kohlenstoffen konnte eine substituierte Phenyl-Untereinheit (δ_{H} 6.80 ppm, δ_{H} 7.25 ppm; δ_{C} 115.8 ppm, δ_{C} 128.5 ppm) identifiziert werden. Des Weiteren ließen die chemischen Verschiebungen auf zwei konjugierte Doppelbindungen (δ_{H} 6.23 ppm - 7.52 ppm; δ_{C} 119.4 ppm - 155.0 ppm), drei Carbonylgruppen (δ_{C} 175.6 ppm, δ_{C} 176.3 ppm, δ_{C} 195.2 ppm) und zwei ins Tieffeld verschobene Signale von CH-Gruppen (δ_{H} 3.92 ppm, δ_{H} 4.70 ppm; δ_{C} 65.5 ppm, δ_{C} 74.5 ppm) schließen, die jeweils auf eine Hydroxylierung oder direkt gebunden Stickstoff hindeuteten. Durch ein ^1H , ^1H -COSY-Spektrum konnten drei Strukturelemente bestimmt werden. Eine ^1H , ^1H -TOCSY-NMR Messung bestätigte die drei verschiedenen Protonen-Spinsysteme. Durch ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR wurden die Strukturelemente zusammengefügt. Eine der Untereinheiten der Struktur konnte als eine polyketidische Kette mit zwei konjugierten Doppelbindungen und zwei terminalen Methylgruppen bestimmt werden. Die Existenz einer Phenyluntereinheit konnte durch zwei, mit den aromatischen Protonen koppelnden Kohlenstoffen (C-16, C-19), bestätigt werden. Weiterhin wurde eine Kopplung zwischen C-16 und 15-H detektiert, dessen tieffeldverschobenes Signal bei δ_{H} 4.70 ppm auf eine Hydroxylierung hindeutete. Im COSY-NMR-Spektrum wurde eine Kopplung vom 15-H zum 5-H deutlich. Das HMBC-Spektrum zeigte eine Kopplung zwischen 5-H und dem ins Tieffeld verschobene C-4 (δ_{C} 195.2 ppm). Die chemischen Verschiebungen des C-4, sowie der quartären Kohlenstoffe C-2 δ_{C} 175.6 ppm, C-3 δ_{C} 99.5 ppm und C-6 δ_{C} 176.3 ppm deuten auf das Vorhandensein einer Tetransäure-Untereinheit hin. Der Vergleich der chemischen Verschiebungen dieser Kohlenstoffe mit den Verschiebungen der Kohlenstoffe des in dieser Arbeit isolierten Desmethylpretenellin A (**53**) und der Literaturwerte des Desmethylpretenellin A bestätigen diese Annahme.¹¹⁷ HMBC-Kopplungen zu C-2 und C-3 konnten im HMBC-NMR aufgrund der Distanz der nächstgelegenen Protonen (5-H, 7-H) nicht determiniert werden. Isomerieeffekte der Tetransäureuntereinheit erschwerten die Sichtbarkeit der Kopplungen im NMR Experiment zusätzlich. Der quartäre Kohlenstoff des 3-Acyl-Substituenten der Tetransäureunter-

einheit korrelierte im HMBC-NMR mit den Protonen 7-H und 8-H. Die Verknüpfung der polyketidischen Kette mit der Tetransäureuntereinheit konnte somit belegt werden. Die im $^1\text{H},^1\text{H}$ -COSY-NMR identifizierte Polyketiduntereinheit konnte durch die Kopplungen der beteiligten Kohlenstoff- und Wasserstoffatome bestätigt werden. Mithilfe der Kopplungskonstanten 3J der vinylichen Protonen (7-H, 8-H, 9-H, 10-H) wurden die Konfigurationen der beiden Doppelbindungen als *trans* bestimmt. Die 3J Kopplung zwischen 7-H und 8-H betrug 15.3 Hz, die zwischen 9-H und 10-H entsprach 15.1 Hz. Beide Kopplungskonstanten belegten entsprechend der Karplus-Beziehung die *trans* (*E*) Konfigurationen der Doppelbindungen. Abb. 32 und Tabelle 10 fassen die Ergebnisse und Auswertung der NMR-Spektren zusammen.

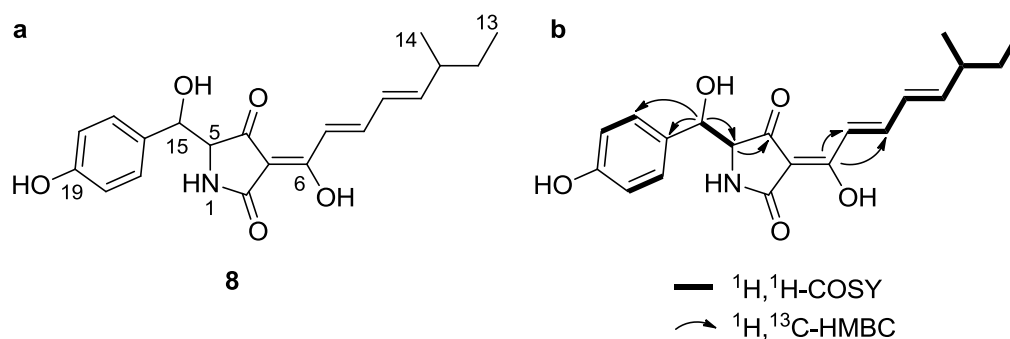


Abb. 32: **a** Desmethylprototenellin D (8). **b** COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Desmethylprototenellin D (8).

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	$J[\text{Hz}]$	COSY	TOCSY	HMBC
1		NH	5.66					
2	175.6	C						
3	99.5	C						
4	195.2	C						5
5	65.5	CH	3.92	d	8.2	15	15	4, 15
6	176.3	C						7, 8
7	119.4	CH	7.07	d	15.3	8	8, 9, 10, (11, 12, 14)	6, 9, (8)
8	147.3	CH	7.52	dd	15.3, 11.0	7, 9	7, 9, 10, (11, 14)	6, 9, 10
9	128.1	CH	6.34	dd	15.1, 11.0	8, 10	7, 8, 10, 11, 12, 13, 14	7, 8, 10, 11
10	155.0	CH	6.23	dd	15.1, 7.6	9, 11	7, 8, 9, 11, 12, 13, 14	8, 9, 11, 12, 14
11	39.4	CH	2.25	m		10, 12, 14	9, 10, 12, 13, 14, (7, 8)	9, 10, 12, 13, 14
12	29.4	CH ₂	1.42	m		11, 13	11, 13, 14, (9, 10)	10, 11, 13, 14
13	11.8	CH ₃	0.89	t	7.1	12	11, 12, 14, (9, 10)	11, 12
14	19.5	CH ₃	1.06	d	6.7	11	9, 10, 11, 12, 13, (7, 8)	10, 11, 12
15	74.4	CH	4.70	d	8.2	5	5	17/21, (5)
16	130.8	C						(15, 18/20)
17	128.5	CH	7.25	d	7.5	18	18	(15, 19, 21)
18	115.8	CH	6.8	d	7.5	17	17	(16, 19, 20)
19	156.4	C						17/21, 18/20
20	115.8	CH	6.8	d	7.5	21	21	15, 17, 19
21	128.5	CH	7.25	d	7.5	20	20	16, 18, 19

Tab. 10: Zusammenfassung der NMR-Daten von Desmethylprototenellin D (8).

2.4.4.2.2 Untersuchungen zur Konfiguration von Desmethylpretenellin A und Desmethylprototenellin D

Biosynthetisch ist davon auszugehen, dass die beiden in *Aureobasidium pullulans* ISch31 produzierten Verbindungen an Position 5 und 11 gleiche stereochemische Konfigurationen besitzen. Die Strukturen werden daher gemeinsam betrachtet. Die Stereochemie des aus *Aureobasidium pullulans* ISch31 isolierten Desmethylpretenellin A (**53**) wurde durch den Vergleich von ¹H-NMR-Daten mit denen von Prototenellin E (**72**), einer strukturell verwandten Acyltetramsäure, determiniert (Abb. 33). Prototenellin E (**72**) wurde von Cox et al. im Zuge von TENS Expressionsversuchen in *Beauvaria bassiana* isoliert und beschrieben.¹³⁴ Es besitzt eine zusätzliche Methylgruppe am C-7 und konnte daher in Bezug auf die Stereozentren an den Positionen C-11 und C-5 mit Desmethylpretenellin A (**53**) vergleichend herangezogen werden.

Ergebnisse und Diskussion

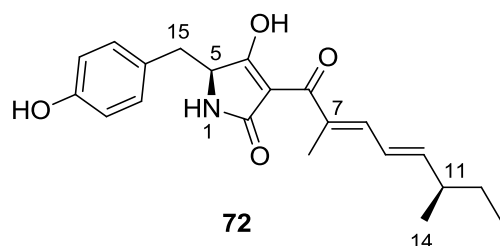


Abb. 33: Prototenellin E (**72**) aus *Beauvaria bassiana*.

Die aliphatische Methylgruppe des Prototenellin E (**72**) besitzt die D-Konfiguration, der Aminosäureanteil der Tetramsäure ist das L-Tyrosin.¹³⁴ Die chemischen Verschiebungen sowie die Kopplungskonstanten der entsprechenden Protonen (δ_{H} 3.95 ppm (dd, $J = 9.9, 3.4$ Hz, 5-H), δ_{H} 2.60 ppm (dd, $J = 10.1, 14.0$ Hz, 16-H_a), δ_{H} 3.27 ppm (dd, $J = 3.4, 14.0$ Hz, 16-H_b), 1.09 (d, $J = 6.7$ Hz, 14-H)) stimmen weitgehend mit denen des Desmethylpretenellin A (**53**) (δ_{H} 3.97 ppm (dd, $J = 9.9, 3.4$ Hz, 5-H), δ_{H} 2.60 ppm (dd, $J = 10.1, 14.0$ Hz, 15-H_a), δ_{H} 3.22 ppm (dd, $J = 3.4, 14.0$ Hz, 15-H_b), 1.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 14-H) überein. Es ist davon auszugehen, dass die Methylgruppe des Desmethylpretenellin A (**53**) bzw. des Desmethylprototenellin D (**8**) ebenso D-Konfiguration besitzt und die natürlich vorkommende Aminosäure L-Tyrosin eingebaut wurde.

In Bezug auf die Hydroxylgruppe an Position 15 des Desmethylprototenellin D (**8**) wurde eine weitere aus *Beauvaria bassiana* isolierte Verbindung, das Prototenellin D (**73**), herangezogen (Abb. 34). Es konnte von Cox et al. als Camphanylester auskristallisiert werden und besitzt im Vergleich zu Desmethylprototenellin D (**8**) eine zusätzliche Methylierung an Position 9.¹³⁴

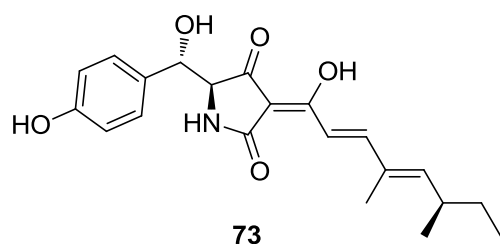


Abb. 34: Prototenellin D (**73**) aus *Beauvaria bassiana*.

Die Methylgruppe 14-CH₃ dieses Tetramsäurederivates (**73**) besitzt ebenfalls die D-Konfiguration, als Aminosäure wurde das L-Tyrosin eingebaut. Die Stereochemie der Hydroxylgruppe entspricht im Prototenellin D (**73**) der D-Konfiguration. Ausgehend

Ergebnisse und Diskussion

von diesen Ergebnissen werden in dieser Arbeit analoge Konfigurationen der Stereozentren des Desmethylprototenellin D (**8**) angenommen.

Um diese Vermutung zu stützen, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Zunächst wurde die vicinale Kopplungskonstante 3J zwischen 5-H und 15-H betrachtet. Ausgehend von der Bildung eines hypothetischen Sechsrings durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Wasserstoff an 15-OH und dem Sauerstoff an C-4 deutet die Kopplungskonstante $^3J_{5a, 15a}$ 8.2 Hz auf eine *anti*-Konfiguration der Protonen 5-H und 15-H. Des Weiteren wurde die Murata-Methode zur Bestimmung der Konfiguration mithilfe von heteronuklearen Kopplungskonstanten angewendet.¹³⁵ Für diese Bestimmung wurde ein HSQC-HECADE-NMR-Spektrum aufgenommen, um Protonen-Kohlenstoff Kopplungskonstanten zu determinieren. Aufgrund der sehr geringen Konzentration der Probe und der somit schlechten Auflösung des Spektrums gab dieses nur bedingt Auskunft über die heteronukleare Kopplung. Die geminale Kopplungskonstante zwischen C-15 und 5-H konnte näherungsweise ermittelt werden. Mit 2J 8.1 Hz entsprach sie einer großen geminalen Kopplungskonstante. In Anwendung der Murata-Methode bedeutet dies, dass die Hydroxylgruppe an C-15 *gauche* zum geminalen 5-H positioniert ist. Die Protonen beider Funktionalitäten stehen somit *anti* zueinander. Mit dieser Bestimmung der relativen Stereochemie wurde die Annahme, dass L-Tyrosin in die Tetransäureuntereinheit integriert ist und die Hydroxylgruppe in der D-Konfiguration vorliegt, zusätzlich bestätigt.

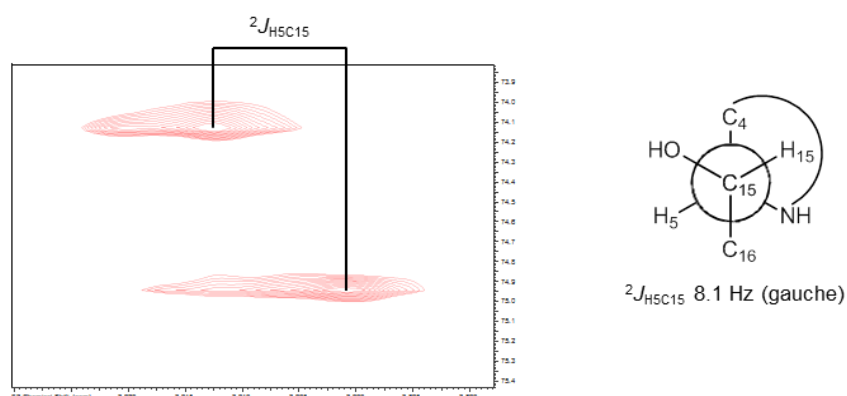


Abb. 35: Bestimmung der geminalen Kopplungskonstante zwischen 5-H und C-15 des Desmethylprototenellin D (**8**) mittels Murata-Methode

Die ermittelten Konfigurationen der Stereozentren von Desmethylpretenellin A (**53**) und Desmethylprototenellin D (**8**) werden in Abbildung 36 zusammengefasst.

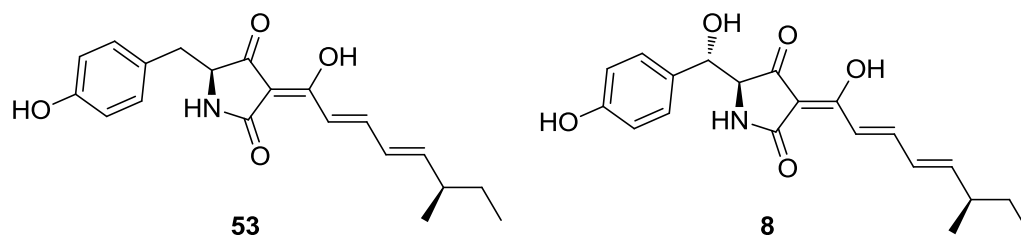


Abb. 36: Konfigurationen von Desmethylpretenellin A (**53**) und Desmethylprototenellin D (**8**).

2.4.4.2.3 Hypothetische Biosynthese von Desmethylpretenellin A und Desmethylprototenellin D

Desmethylprototenellin D (**8**) und das ebenfalls in dieser Arbeit isolierte Desmethylpretenellin A (**53**) sind 2-Acyl-Tetramsäuren und biosynthetisch verwandte Strukturen. Die hypothetischen Biosynthesewege werden daher zusammen diskutiert. Es handelt sich um Produkte einer PKS-NRPS. In *Beauveria bassiana* konnte ein solches Enzym bereits charakterisiert werden. Codiert wird diese Tenellin Synthetase (TENS) durch das Gen *tenS*.¹¹⁵ Die Expression von TENS führt in *Beauveria bassiana* zur Synthese von Pretenellin A (**74**), einer zum Desmethylpretenellin A (**53**) und Desmethylprototenellin D (**8**) strukturell verwandten Acyltetramsäure. Sie unterscheidet sich lediglich durch eine zusätzliche Methylgruppe vom Desmethylpretenellin A (**53**) (Abb. 37).

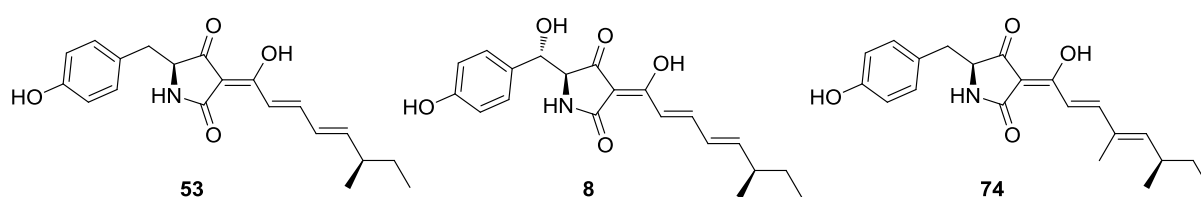


Abb. 37: Vergleich der Strukturen von Desmethylpretenellin A (**53**), Desmethylprototenellin D (**8**) und Pretenellin A (**74**).

Biosynthetische Bausteine des Pretenellin A (**74**) sind die Aminosäure Tyrosin oder ein para-ständig oxidiertes Phenylalanin,^{136,115} eine Polyketid-Untereinheit und zwei S-Adenosyl-Methionin-Einheiten.¹¹⁷ In Anlehnung an die Biosynthese des Pretenellin A (**74**) wurde die hypothetische Biosynthese des Desmethylpretenellin A (**53**) und des Desmethylprototenellin D (**8**) konstruiert (Abb. 38).^{137,115}

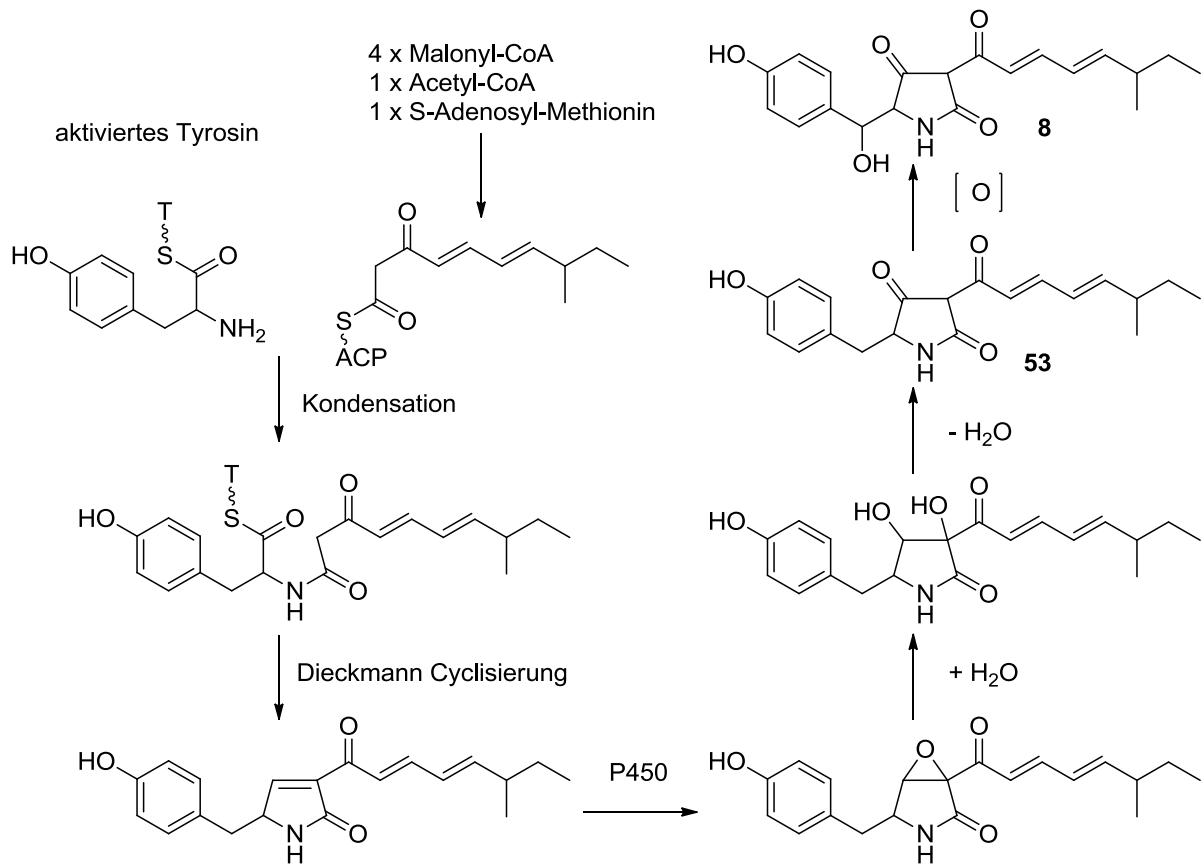


Abb. 38: Hypothetische Biosynthese von Desmethylpretenellin A (**53**) und Desmethylprototenellin D (**8**). (Grafische Darstellung in Anlehnung an COX et al.)^{115,137}

Grundbausteine des Desmethylpretenellin A (**53**) und des Desmethylprototenellin D (**8**) sind Tyrosin bzw. Phenylalanin und eine durch S-Adenosyl-Methionin methylierte Pentaketid-Untereinheit. Die Aminosäure wird an der Adenylierungsdomäne der NRKS aktiviert und an die T-Domäne (thiolation domain) transferiert. Die aktivierte Aminosäure kondensiert mit der an der ACP-Domäne (acyl carrier protein domain) gebundenen Pentaketid-Untereinheit und wird zu einem an der T-Domäne gebundenen N- β -Ketoacylaminothioester umgewandelt. Anschließend erfolgen die Abspaltung des Intermediates und die Cyclisierung durch eine Dieckmann Cyclisierung. Das PKS-NRPS-Produkt wird dann mittels Cytochrom P450 epoxidiert und darauf folgend zum Diol hydrolysiert. Eine Dehydratation führt dann zur Acyltetramsäure, welche zur Ketofom tautomerisieren kann. Die Hydroxylierung an Position 15 des Desmethylprototenellin D (**8**) geschieht eventuell erneut durch Cytochrom P450, der genaue Mechanismus wurde jedoch noch nicht aufgeklärt.¹³⁷ Angelehnt an die Tenellin Biosynthese handelt es sich bei dem an Position 15 hydroxylierten Desmethylprototenellin D (**8**) um eine Vorstufe zur Ringexpansion, wobei die Hydroxylierung oxidative Umlagerungen hervorruft und somit zur Bildung

eines 2-Pyridons führt.¹³⁸ In dieser Arbeit konnte das korrespondierende Biosyntheseprodukt Desmethyltenellin nicht isoliert werden.

2.4.4.2.4 Strukturaufklärung von Naturstoff **4**

Der isolierte Naturstoff **4** zeigte bezüglich der Retentionszeit, des UV/Vis-Spektrums und des R_f -Wertes starke Ähnlichkeit zu den analytischen Daten des Desmethylpretenellin **A** (**53**) und Desmethylprototenellin **D** (**8**). Die Absorptionsmaxima im UV/Vis-Spektrum lagen bei λ_{max} 211 nm und 333 nm, die Retentionszeit in der HRESIMS-HPLC und der R_f – Wert entsprachen 10.99 min bzw 0.3. Durch HRESIMS konnte das Molekularion $294.1341[M+H]^+$ detektiert werden, welches einer Summenformel von $C_{15}H_{20}NO_5$ entsprach. Als Doppelbindungsäquivalent ergab sich daraus 7. Mittels 1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie konnte die Ähnlichkeit zu den Desmethyltenellin Derivaten bestätigt werden. Die Struktur besitzt eine identische Polyketiduntereinheit, welche durch die chemischen Verschiebungen von Protonen und Kohlenstoffen sowie durch 1H , 1H -COSY-NMR Spektrum identifiziert wurde. Ein signifikanter Unterschied lag jedoch im tieffeldverschobenen Signal des Protons in α – Position zur Carbonylgruppe (δ_H 7.97 ppm). Zusätzlich zu den Protonen der polyketidischen Untereinheit wurden zwei weitere Protonensignale im 1H -NMR-Spektrum identifiziert (δ_H 4.02 ppm (3 H), δ_H 7.38 ppm (1 H)). Mithilfe des ^{13}C -NMR-Spektrums konnten sie als Methoxygruppe 16-OCH₃ und ungesättigte CH-Gruppe 6-H bestimmt werden. Im HMBC-NMR-Spektrum konnten zwischen dieser CH-Gruppe Kopplungen zu vier quartären Kohlenstoffen determiniert werden (δ_C 106.3 ppm, δ_C 131.3 ppm, δ_C 156.7 ppm, δ_C 171.5 ppm). Die vier quartären Kohlenstoffe korrelierten im HMBC-NMR ausschließlich zu der CH Gruppe an Position 6, jedoch nicht zu Atomen der Polyketiduntereinheit. Im 1H , 1H -TOCSY-NMR gab es keine Kopplungen zwischen dem Spin-System der Polyketideinheit und dem tieffeldverschobenen 6-H. Von der Methoxygruppe konnten keine Kopplungen im 1H , 1H -TOCSY-NMR, 1H , ^{13}C -HMBC-NMR und 1H , 1H -ROESY-NMR zu anderen Atomen beobachtet werden. Weiterhin konnte kein NH-Signal wie zuvor berichtet in den Tetramsäureuntereinheiten enthaltenen Strukturen beobachtet werden. Tabelle 11 fasst die Auswertung der NMR-Spektren zusammen.

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	J[Hz]	COSY	HMBC
2	156.7	C					6
3	106.3	C					6
4	171.5	C					6
5	131.3	C					6
6	123.7	CH	7.38	s			2, 4, 5, (3)
7	193.3	C					8, 9
8	125.2	CH	7.97	d	15.1	9	7, 10
9	148.5	CH	7.65	dd	15.1, 11.2	8, 10	7, 11
10	128.6	CH	6.38	dd	15.1, 11.2	9, 11	8, 9, 11, 12
11	154.6	CH	6.24	dd	15.1, 7.7	10, 12	9, 10, 12, 13, 15
12	39.3	CH	2.25	m		11, 13, 15	10, 11, 13, 14, 15
13	29.4	CH ₂	1.41	m		12, 14	11, 12, 14, 15
14	11.9	CH ₃	0.89	t	7.3	13	12, 13
15	19.5	CH ₃	1.06	d	6.7	11	11, 12, 13
16	64.8	CH ₃	4.02	s			

Tab. 11: Zusammenfassung der NMR-Daten von Naturstoff 4

Die Strukturaufklärung der Verbindung **4** erwies sich aufgrund der verhältnismäßig hohen Anzahl an quartären Kohlenstoffen mit mangelnden Kreuzpeaks zu anderen Atomen in den 2D-NMR-Spektren als schwierig. Als Strukturvorschlag erschien die Kopplung der Polyketiduntereinheit mit einem Pyridonring am wahrscheinlichsten (Abb. 39). Die Stereochemie der Methylgruppe wird in Anlehnung an das in dieser Arbeit isolierte Desmethylpretenellin A (**53**) ebenfalls in der D-Konfiguration dargestellt.

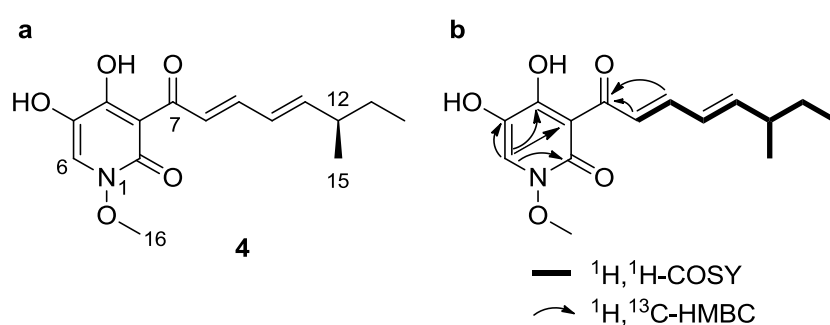


Abb. 39: a Pyridon 4. b COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Pyridon 4

Der Vergleich mit Literaturdaten ähnlicher Verbindungen untermauerte die Pyridonstruktur. Die Zuordnung der Methoxygruppe basierte auf dem ^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum sowie auf dem Vergleich mit Literaturdaten. Im ^1H , ^1H -ROESY-NMR konnten ausgehend vom Signal der Methoxygruppe keine Kreuzpeaks zu anderen Signalen detektiert werden. Wäre die Methoxygruppe an 4-OH lokalisiert, sollten

Kreuzpeaks zu Protonen der Polyketiduntereinheit existieren. Würde sie an 5-OH lokalisiert, wären Kreuzpeaks zu 6-H sichtbar. Ausgehend von diesen Beobachtungen handelt es sich wahrscheinlich um eine methylierte NOH Gruppe des Pyridonringes. Diese Methylierung besteht ebenso in einem strukturverwandten monomethylierten Tenellin-Derivat (**75**) aus *Beauvaria bassiana*.¹³⁹ Die chemischen Verschiebungen der Protonen bzw. Kohlenstoffe der Methylgruppe (DMSO, δ_H 3.98 ppm, δ_C 64.7 ppm) sind vergleichbar mit dem in dieser Arbeit isolierten Pyridon **4**. Die chemischen Verschiebungen der Methylgruppen an C-OH Gruppen an einem Pyridonring wurden in einigen Publikationen etwas weiter in das Hochfeld verschoben beschrieben. Im trimethylierten Tenellin-Derivat (**76**) aus *Beauvaria Bassiana* lagen diese bei der Lokalisierung der Methoxygruppe am C-4 bei δ_H 3.41 ppm und δ_C 60.5 ppm.¹³⁹ Bei der Pyridonstruktur Harzianopyridone (**77**), isoliert aus *Trichoderma harzianum*, wurden chemische Verschiebungen einer Methoxygruppe am C-5 von δ_H 3.79 ppm und δ_C 57.55 ppm beschrieben.¹⁴⁰ Der Vergleich der chemischen Verschiebungen der quartären Kohlenstoffe des Naturstoffes **4** mit denen der drei genannten Strukturen bestätigte ebenfalls die Annahme der Pyridonstruktur. Trotz der strukturellen Unterschiede, wie z. B. dem aromatischen Substituenten am C-5 der beiden Tenellin-Derivate **75** und **76** oder die zusätzliche Hydroxylierung am C-6 des Harzianopyridones (**77**), zeigten die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe signifikante Ähnlichkeiten zu denen von Naturstoff **4** (Abb 40)

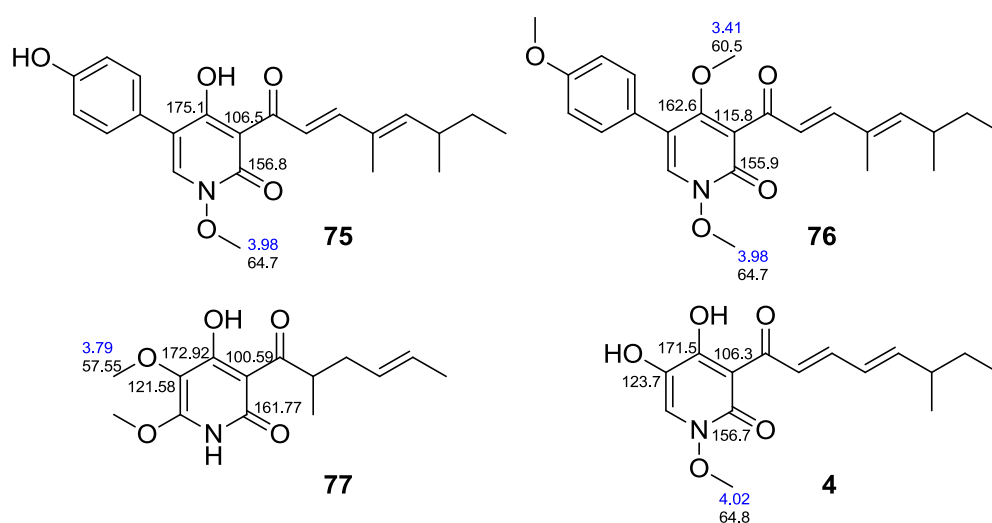


Abb. 40: Vergleich der chemischen Verschiebungen von Naturstoff **4** mit denen vom monomethylierten Tenellin (**75**), trimethylierten Tenellin (**76**) und Harzianopyridone (**77**). Blau: chemische Verschiebungen der Protonen [ppm], schwarz: chemische Verschiebungen der Kohlenstoffe [ppm].

2.4.4.2.5 Überlegungen zur Biosynthese von Naturstoff 4

Bisher wurden verschiedene Biosynthese-Routen für Pyridonalkaloide beschrieben. Vertreter dieser Strukturklasse mit einem Hydroxyphenylsubstituenten an Position C-5 oder einen aus diesem entstandenen Rest werden über ein Tetransäure-Intermediat gebildet. Die Synthese erfolgt über eine NR-PKS. Das Tetransäureintermediat entsteht durch die Kondensation von Tyrosin und einem Polyketidvorläufer. Anschließend erfolgen intramolekulare Umlagerungen und die Ringexpansion zu einem 2-Pyridon^{138,141}. Zusätzlich können die Hydroxylierung des Stickstoffs bzw. verschiedenen Methylierungen durch SAM erfolgen. Beispiele für auf diese Weise biosynthetisierte Verbindungen sind Vertreter aus den Klassen der Militarione (**78**) aus *Paecilomyces militaris*, Tenelline (**79**) aus *Beauvaria bassiana*, das Epipyridon (**80**) aus *Epicoccum* sp. und Aspyridon (**81**) aus *Aspergillus nidulans* (Abb. 41).^{142,139,143,144}

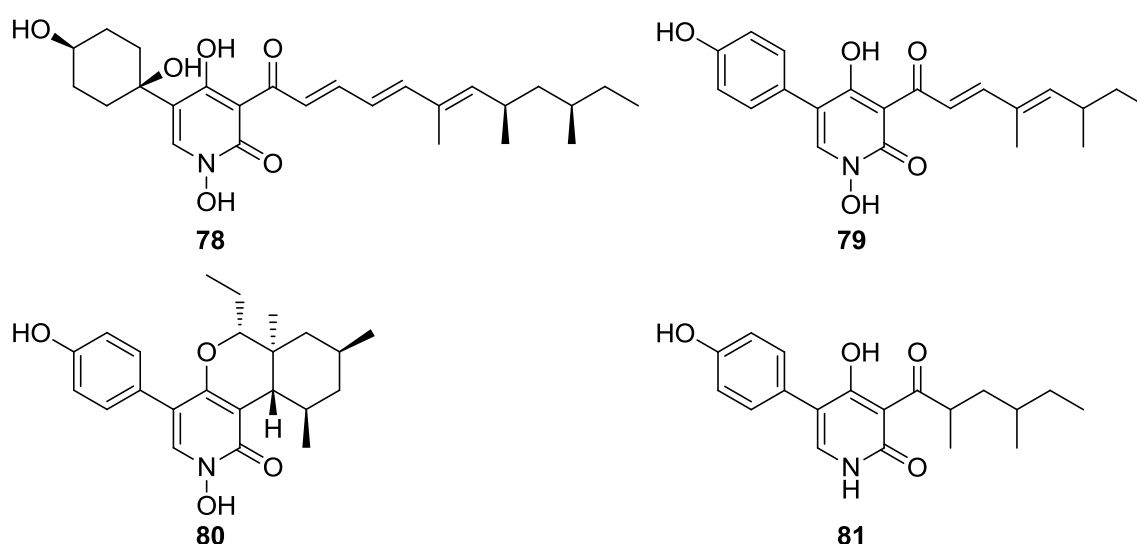


Abb. 41: Literaturbekannte Verbindungen mit einem Pyridonring als Struktureinheit. Militarion A (**78**), Tenellin (**79**), Epipyridon (**80**), Aspyridon (**81**).

Eine weitere Biosyntheseroute des Pyridonrings konnte durch die Isolierung des Genclusters des Kirromycins (**82**) (Abb. 42) aus *Streptomyces collinus* Tü365 aufgeklärt werden. Es handelt sich um ein Efamycin-Antibiotikum welches einen an C-5 und C-6 ungesättigten Pyridonring besitzt. Die Synthese wird ebenfalls mittels einer hybriden Polyketidsynthase (NR-PKS) realisiert. Allerdings erfolgt die Bildung des Pyridonrings über den Einbau von β -Alanin.¹⁴⁵ Die Abspaltung des Precursors von der Polyketidsynthase und Cyclisierung zum Pyridonring erfolgt wahrscheinlich über einen nucleophilen Angriff an C-4, ermöglicht durch Keto-Enol-Tautomerie.

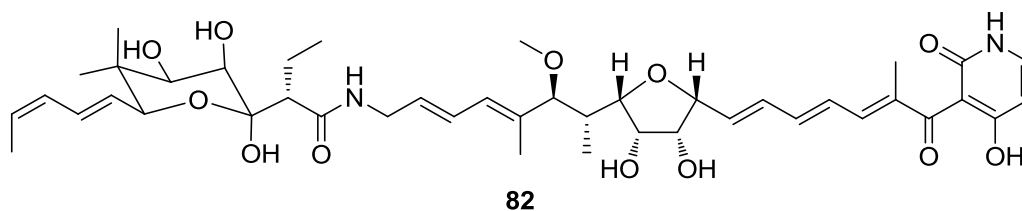


Abb. 42: Kirromycin (82)

Für das in dieser Arbeit isolierte Pyridon **4** erscheint die Biosynthese über ein Tetransäureintermediat wahrscheinlicher, da mit Desmethylpretenellin A (**53**) und Desmethylprototenellin D (**8**) zwei Sekundärmetabolite dieses Biosyntheseweges isoliert werden konnten und auf das Vorhandensein entsprechender Biosynthese-Gencluster schließen lassen. In Biosyntheseuntersuchungen des Naturstoffs Aspyridon (**81**) aus *Aspergillus nidulans* konnte ein Zusammenhang der Tetransäureintermediate und die Bildung von dephenylierten 2-Pyridonen geschlossen werden. Schlüsselenzym der Bildung des Pyridons ist ein Cytochrom P450 mit Ring-Expansions- und Dephenylierungs-Aktivität.¹⁴⁶ Biosynthetischer Ursprung ist eine durch PKS-NRPS gebildete Tetransäure mit Tyrosin als Aminosäurebaustein. Eine Hydroxylierung des phenylischen, quartären Kohlenstoffs führt mutmaßlich zu einer hydroxyquinoiden Zwischenstufe, welche durch Umlagerungen zur Ringexpansion und gekoppelter Dephenylierung führt. Die Biosynthese des isolierten Pyridons **4** wird auf Grundlage der Aspyridon-Biosynthese hypothetisch dargestellt. Abb. 43 zeigt schematisch die hypothetische Entstehung des Pyridons **4**.

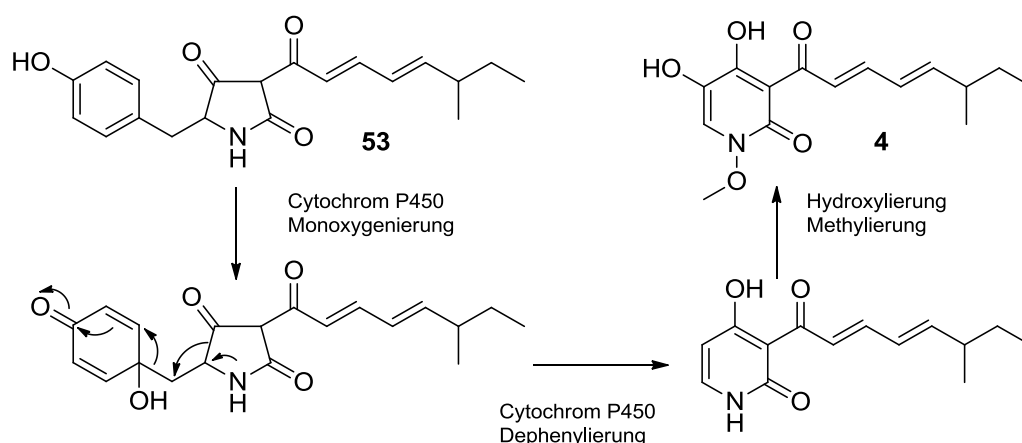


Abb. 43: Hypothetische Biosynthese des Pyridon **4** (Grafische Darstellung in Anlehnung an COX et al.)¹⁴⁶

Die Hydroxylierung an C-5 und am Stickstoff erfolgen vermutlich durch zusätzlich exprimierte Oxidasen. Eine derartige Methylierung des NOH wird durch eine O-Methyltransferase katalysiert.

Die Biosynthese des Pyridons **4**, des Desmethylpretenellin A (**53**) und des Desmethylprototenellin D (**8**) erfolgen dementsprechend über gemeinsame Biosyntheserouten. Die Kernstruktur der drei Sekundärmetabolite, das Desmethylpretenellin A (**53**), wird vermutlich durch eine PKS-NRPS und weitere bereits beschriebene Schritte synthetisiert. Anschließende enzymatische Reaktionen und Umlagerungen führen zum Desmethylprototenellin D (**8**) oder zum Pyridon **4**.

2.4.4.2.6 Untersuchungen zur Bioaktivität der PKS-NRPS-Synthase-Produkte

Die Tetransäuren Desmethylpretenellin A (**53**), Desmethylprototenellin D (**8**) und das Pyridon **4** wurden auf verschiedene Bioaktivitäten getestet. Desmethylpretenellin A (**53**) zeigte in Cytotoxizitätstest eine schwache Aktivität gegen L929 Mausfibroblasten. Der IC₅₀ betrug 37 µg/mL. Die drei Verbindungen wurden weiterhin auf Inhibierung der MAP4K4 untersucht. Keiner der Naturstoffe hemmte diese Kinase, sie kann daher als Target ausgeschlossen werden. Zusätzlich wurden Plattendiffusionstests zur Untersuchung der biologischen Aktivität der drei Naturstoffe gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Desmethylpretenellin A (**53**) besaß darin starke Aktivität gegen *Bacillus subtilis* und verursachte eine komplette Lysis der Zellen mit einem Hemmhof von 2.2 cm. Keine komplette Lysis, jedoch eine deutliche Hemmung des Wachstums zeigte Desmethylpretenellin A (**53**) gegen *Escherichia coli* K12 (Hemmhof 1.3 cm) und *Saccharomyces cerevisiae* (Hemmhof 1.4 cm). Desmethylprototenellin D (**8**) besaß in den durchgeführten Plattendiffusionstests ausschließlich biologische Aktivität gegen *Escherichia coli* K12. Es löste eine moderate Wachstumshemmung, aber keine Lysis der Zellen aus (Hemmhof 1.0 cm). Interessanterweise unterscheiden sich die Bioaktivitäten der beiden Tetransäuren signifikant. Während Desmethylpretenellin A (**53**) gegen alle drei getesteten Organismen Aktivität aufwies, konnte für Desmethylprototenellin D (**8**) nur gegen das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* hemmende Wirkung beobachtet werden. Pyridon **4** hemmte keinen der Mikroorganismen in den Plattendiffusionstests. Für die biologische Aktivität scheint daher die Tetransäureuntereinheit eine übergeordnete Rolle zu spielen. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei den strukturell mit Desmethylpretenellin A (**53**) und

Desmethylprototenellin D (**8**) verwandten Epicoccarinen A (**83**) und B (**84**) aus *Epicoccus* sp. getätigt werden (Abb. 44).

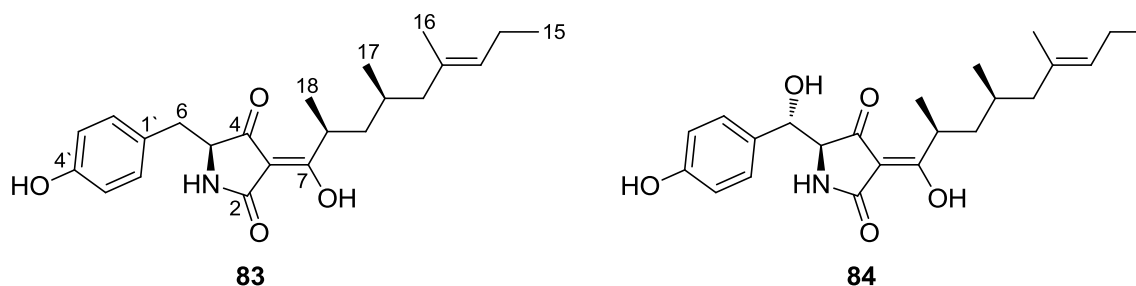


Abb. 44: Epicoccarin A (**83**) und Epicoccarin B (**84**)

Epicoccarin B (**84**) besitzt, im Vergleich zu Epicoccarin A (**83**), eine zusätzliche Hydroxylierung an Position 6. In Untersuchungen zur Bioaktivität konnte durch Epicoccarin A (**83**) eine starke Aktivität gegen das grampositive Bakterium *Mycobacterium vaccae* festgestellt werden. Epicoccarin B (**84**) hingegen löste eine sehr schwache Hemmung des Wachstums des grampositiven Bakteriums aus.¹⁴³ Unter Betrachtung dieser erzielten Ergebnisse ist der Einfluss der Hydroxylgruppe an der distinkten Position auf grampositive Bakterien offensichtlich.

2.4.4.3 Strukturaufklärung und Charakterisierung der Naturstoffe 5 - 7

2.4.4.3.1 Strukturaufklärung von Naturstoff 5

Naturstoff **5** wurde als farbloser Feststoff isoliert. Im HRESIMS Massenspektrum wurde das Natrium-Addukt 279.1570 $[M+Na]^+$ detektiert. Die sich daraus ergebene Summenformel lautete $C_{14}H_{24}NaO_4$ $[M+Na]^+$ und das aus der Summenformel von Naturstoff **5** ($C_{14}H_{24}O_4$) berechnete Doppelbindungsäquivalent ergab 3. Im UV/Vis-Spektrum konnte eine starke Absorption bei λ_{max} 231 nm beobachtet werden, welche auf das Vorhandensein eines konjugierten Diens hindeutete. Im ^{13}C -NMR-Spektrum konnten vier entsprechende Signale mit vinylichem Charakter identifiziert werden (δ_C 130.9 ppm - δ_C 136.0 ppm). Zusätzlich zeigte das ^{13}C -NMR-Spektrum sechs Signale von Methylenkohlenstoffen (δ_C 23.7 ppm - δ_C 43.2 ppm), ein Carbonylsignal (δ_C 177.1 ppm), zwei Signale von oxidierten sekundären Kohlenstoffen (δ_C 41.3 ppm, δ_C 43.2 ppm) und das Signal einer Methylgruppe (δ_C 14.4 ppm). Durch ein phasensensitives HSQC-NMR-Spektrum konnten den Kohlenstoffen die Protonen zugeordnet werden, sowie die Typen der Kohlenstoffe bestätigen. Die Identifikation und Zuordnung der Protonen im 1H -NMR-Spektrum wurde aufgrund der Unreinheit der Probe erschwert, zusätzlich gab es Überlagerungen verschiedener

Protonensignale. Die aliphatischen Protonen 11-H, 12-H, 13-H bildeten ein Multipllett bei δ_{H} 1.31 ppm. Weiterhin überlagerten sich die Protonen von 3-H und 9-H (δ_{H} 4.02 ppm), was die Bestimmung von Spinsystemen durch ^1H , ^1H -COSY-NMR bzw. TOCSY-NMR-Spektren erschwerte. Die Aufklärung der Konformation konnte jedoch mit einem HMBC-NMR-Spektrum bestätigt werden. Kopplungen, welche mithilfe von den 2D-NMR-Spektren ermittelt wurden ergaben einen, aus 14 Kohlenstoffen aufgebauten, linearen Naturstoff. Die chemischen Verschiebungen von 3-H (δ_{H} 4.02 ppm) und 9-H (δ_{H} 4.02 ppm), bzw. C-3 (δ_{C} 69.6 ppm) und C-9 (δ_{C} 73.3 ppm) deuteten unter Beachtung der Summenformel jeweils auf Hydroxylierungen. Des Weiteren konnte mittels COSY-NMR-Kopplungen ein Diensystem identifiziert werden. Terminiert wird die lineare Struktur durch eine Carboxylgruppe, welche im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht eindeutig determiniert werden konnte. Im HMBC-NMR gab es jedoch eine Korrelation zwischen 2-H und C-1. Bestätigung der Existenz und der chemischen Verschiebung der Carboxylgruppe erfolgte dementsprechend durch Kopplungen im HMBC-NMR. Die Intensitäten der Signale von 2-H und C-2 waren sehr gering. Ebenso konnten nur schwache Kopplungen dieser CH_2 -Gruppe in den 2D-NMR-Spektren ermittelt werden. Begründen lassen sich dieser Ergebnisse mit der Acidität der Wasserstoffatome an dieser Position. Die Geometrie der Doppelbindungen wurde durch Bestimmung der Kopplungskonstanten ermittelt. Zwischen 5-H und 6-H betrug die vicinale Kopplung 3J 14.8 Hz, zwischen 7-H und 8-H 3J 15.1 Hz. Die Konfigurationen beider Doppelbindungen konnten entsprechend als *trans* festgelegt werden. Abbildung 45 und Tabelle 12 fassen die Ergebnisse der NMR-Daten-Auswertung zusammen.

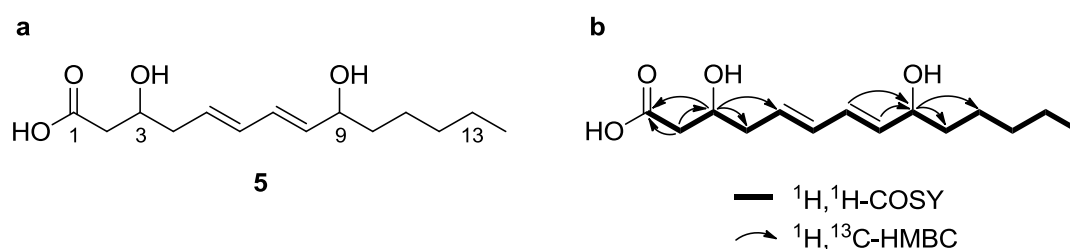


Abb. 45: a Naturstoff **5** b COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Naturstoff **5**

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	J[Hz]	COSY	HMBC
1	177.1	C					2
2	43.2	CH ₂	2.42	m		2, 3/9*	(2), 3, (4)
			2.34	m		2, 3/9*	2, 4
3	69.6	CH	4.02	m		2, 4	2, 4, 5
4	41.3	CH ₂	2.28	t	6.7	3/9*, 5	2, 3, 5, 6
5	130.9	CH	5.71	dd	14.8	4, 6	3, 4, 7
6	133.8	CH	6.11	dd	14.8, 10.5	5, 7	4, 5, 7, 8
7	131.4	CH	6.18	dd	15.1, 10.5	6, 8	5, 6, 9
8	136.0	CH	5.57	dd	15.1, 6.9	7, 3/9*	6, 9, 10
9	73.3	CH	4.02	m		8, 10	7, 8, 10, 11
10	38.4	CH ₂	1.52	m		3/9*, m*	8, 9, m*
			1.46	m		3/9*, m*	8, 9, m*
11	26.3	CH ₂	1.38	m		10, m*	9, 10, m*
			1.31	m		10, m*	9, 10, m*
12	33.0	CH ₂	1.31	m		m*	10, 14, m*
13	23.7	CH ₂	1.31	m		14, m*	11, 14, m*
14	14.4	CH ₃	0.91	t	7.1	m*	m*

Tab. 12: Auswertung der NMR-Daten von Naturstoff 5

2.4.4.3.2 Strukturaufklärung von Naturstoff 6

Der Naturstoff **6** wurde als farbloser Feststoff isoliert. Im hochaufgelösten Massenspektrum wurde ein Natrium-Addukt bei m/z 279.1573 $[M+Na]^+$ detektiert. Die für den Naturstoff berechnete Summenformel lautete $C_{14}H_{24}O_4$ und entsprach damit der Summenformel von Naturstoff **5**. Daraus folgend ergab sich ebenso ein Doppelbindungsäquivalent von 3. Auch das UV-Spektrum, mit einem Maximum von 233 nm zeigte Ähnlichkeit zu dem von Naturstoff **5** und deutete auf das Vorhandensein eines konjugierten Diensystems. In den 1D-NMR-Spektren konnten vier vinyliche Signale, 6-H bis 9-H, (δ_H 5.40 ppm – δ_H 6.54 ppm) und C-6 – C-9 (δ_C 125.9 ppm – δ_C 137.6 ppm) identifiziert werden, welche im 1H , 1H -COSY-NMR als Spinsystem und somit Diensystem bestätigt werden konnten. Die Konfigurationen der Doppelbindungen wurden mithilfe von, im 1H -NMR-Spektrum ermittelten, Kopplungskonstanten als *E* (*trans*) bzw *Z* (*cis*) bestimmt. Die vicinale Kopplung zwischen 6-H und 7-H entsprach mit J^3 15.1 Hz einer *E* Konfiguration, die Kopplungskonstante zwischen 8-H und 9-H betrug mit J^3 11.1 Hz und deutete auf die *Z* Konfiguration der zweiten Doppelbindung. Der aliphatische Rest wurde durch chemische Verschiebungen der hochfeldverschobenen CH₂-Gruppen 10-H – 13-H und 1H , 1H -COSY- bzw. TOCSY-NMR-Spektren aufgeklärt. Terminiert wird der aliphatische Rest durch eine Methylgruppe (δ_H 0.9 ppm, δ_C 14.4 ppm). Zusätzlich zu

den erwähnten Signalen existierten im ^1H -NMR-Spektrum Signale zwei er tieffeldverschobener CH-Gruppen bei δ_{H} 4.17 ppm und δ_{H} 4.37 ppm. Die, durch ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR zugeordneten Kohlenstoffe bei δ_{C} 67.0 ppm und δ_{C} 69.5 ppm untermauerten die Nachbarschaft von Heteroatomen, bei welchen es sich aufgrund der ermittelten Summenformel nur um Sauerstoff handeln konnte. 3-H und 5-H zeigten in den 2D-NMR-Spektren Kopplungen zu 4-H. Die Identifikation von 2-H wurde durch dessen aciden Charakter erschwert. Das ^1H -NMR-Spektrum zeigte ein entsprechendes Multiplett bei δ_{H} 2.33 ppm, im ^{13}C -NMR-Spektrum bzw. ^1H , ^{13}C HSQC-NMR konnte jedoch nur ein sehr schwaches Signal bei δ_{C} 45.0 ppm zugeordnet werden. Verunreinigungen der Probe, die nicht durch chromatographische Aufreinigungsschritte entfernt werden konnten behinderten zusätzlich die Identifikation der CH_2 -Gruppe. Die Existenz der CH_2 Gruppe konnte ausschließlich im ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum bestätigt werden. Sowohl im ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum als auch im ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum konnten keine Kopplungen beobachtet werden. Auch die Zuordnung des Signals der terminalen Carboxylgruppe konnte mit den durchgeführten NMR Messungen nicht erfolgen. Mit hoher Wahrscheinlichkeit war die Probenmenge zu gering, so dass kein deutliches Signal der Carboxylgruppe im ^{13}C -NMR gemessen werden konnte.

Die Bestätigung der vorgeschlagenen Konformation erfolgte durch das hochaufgelöste Massenspektrum und den Vergleich der analytischen Daten mit denen von Naturstoff **5** und **6**. UV-Spektren, R_{f} -Werte und Retentionszeiten zeigten signifikante Ähnlichkeiten. Weiterhin wurden die 1D-NMR-Spektren von Naturstoff **6** und Naturstoff **7** verglichen. Die Signale der Positionen 3 bis 14 waren jeweils nahezu identisch. Ausschließlich C-2 und 2-H lagen im ^{13}C -NMR-Spektrum bzw. im ^1H -NMR-Spektrum etwas hochfeldverschobener vor. Die markante Übereinstimmung der genannten chemischen Verschiebungen und die starken Ähnlichkeiten der analytischen Daten zu Naturstoff **7** ließen den Strukturvorschlag des isolierten Naturstoffes zu. Die Ergebnisse der NMR Messungen werden in Abb. 46 und Tab 13 zusammengefasst dargestellt.

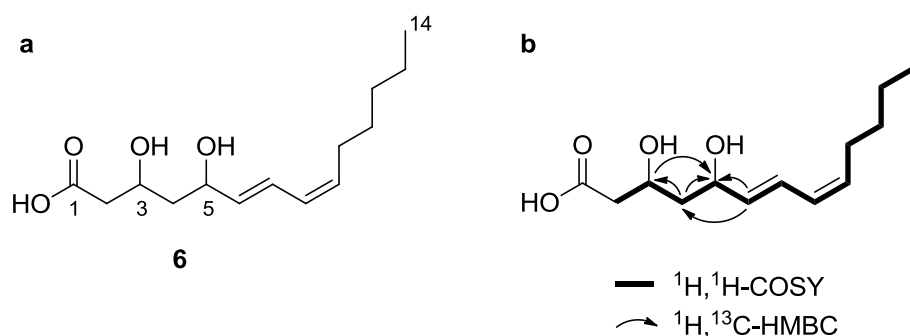


Abb. 46: a Naturstoff 6. b COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Naturstoff 6

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	$J[\text{Hz}]$	COSY	HMBC
1		C					
2	45.0	CH ₂	2.33	m		(3)	
3	67.0	CH	4.17	m		4, (2)	4, 5
4	45.3	CH ₂	1.62	m		3, 5	3, 5, (6)
5	69.5	CH	4.37	dt	6.0, 11.8	4, 6	3, 4, 6, 7, 8,
6	137.6	CH	5.68	dd	6.0, 15.1	5, 7	4, 5, 8
7	125.9	CH	6.54	dd	11.0, 15.1	6, 8	5, 8, 9, (10)
8	129.4	CH	5.97	t	11.0	7, 9	6, 7, 10, (4)
9	132.9	CH	5.40	dt	7.7, 11.0	8, 10	7, 10, 11
10	28.6	CH ₂	2.19	dq	7.7, 1.1	9, 11	8, 9, 11, 12
11	30.5	CH ₂	1.39	m		10, m*	9, 10, 12, 13
			1.32	m		10, m*	9, 10, 12, 13
12	32.6	CH ₂	1.32	m		m*	10, 11, 14, m*
13	23.6	CH ₂	1.32	m		m*	11, m*
14	14.4	CH ₃	0.90	t	7.1	m*	12, 13, m*

Tab. 13: Zusammenfassung der NMR-Daten von Naturstoff 6

2.4.4.3.3 Strukturaufklärung von Naturstoff 7

Der farblose Feststoff **7** besaß im UV/Vis-Spektrum ein Absorptionsmaximum bei 234 nm. Im hochaufgelösten HRESIMS-Spektrum wurde ein Natrium-Addukt von m/z 293.1723 mit einer Summenformel von $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NaO}_4$ detektiert. Aus der ermittelten Summenformel des Naturstoffs $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_4$ ergab sich ein Doppelbindungsäquivalent von 3. Die Summenformel, die Retentionszeit der HPLC-MS sowie das UV/Vis-Spektrum deuteten auf eine Verwandtschaft der Struktur zu Naturstoff **5** und **6**. Auch die 1D-NMR-Spektren bestätigten diese Annahme. Die Verbindung besitzt ebenfalls ein konjugiertes Diensystem, welches durch die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe C-6 – C-9 bei δ_c 126.1 ppm – δ_c 137.3 im ^{13}C -NMR-Spektrum

determiniert wurde. Die entsprechenden Protonen mit chemischen Verschiebungen von δ_{H} 5.42 ppm – δ_{H} 6.55 ppm und deren Kopplungen im ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum untereinander bekräftigten diese Struktureinheit. Des Weiteren wurde, analog zu Naturstoff **6**, ein aliphatischer Rest identifiziert. Dies geschah durch Signale hochfeldverschobener CH_2 -Gruppen und einer Methylgruppe (10-H – 14-H, C-10 – C-14), die im COSY-NMR-Spektrum als Spinsystem bekräftigt werden konnten. Zusätzlich konnten zwei hydroxylierte CH-Gruppen mit vergleichbaren Verschiebungen zu denen von Naturstoff **6** bestimmt werden (3-H δ_{H} 4.26 ppm, 5-H δ_{H} 4.36 ppm, C-3 δ_{C} 66.3 ppm, C-5 δ_{C} 70.1 ppm). Mittels verschiedener 2D-NMR-Spektren wurde, eine zu Naturstoff **6** identische, Struktureinheit zusammengesetzt. Es handelte sich ebenfalls um eine lineare Verbindung mit Hydroxylierungen an den Positionen 3 und 5, sowie einer Carbonylgruppe. Im ^1H -NMR-Spektrum bzw. ^{13}C -NMR-Spektrum fiel ein zusätzliches Signal bei δ_{H} 3.67 ppm bzw. δ_{C} 52.0 ppm auf. Das Integral im ^1H -NMR-Spektrum (2.7), die chemischen Verschiebungen und das phasensensitive ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR deuteten auf das Vorhandensein einer Methoxygruppe. Diese koppelte im ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum zur Carbonylgruppe C-1 (δ_{C} 173.8 ppm). Schlussgefolgert wurde, dass die lineare Verbindung, im Gegensatz zu Naturstoff **6**, eine Methylierung des Carboxyterminus besitzen musste. Die Konfigurationen der Doppelbindungen entsprachen denen von Naturstoff **6**. Vicinale Kopplungen zwischen 6-H und 7-H bzw. 8-H und 9-H betrugen J^3 15.3 Hz und J^3 10.8 Hz. Aus diesen ergaben sich für $\Delta^{6,7}$ die *E*-Konfiguration und für $\Delta^{8,9}$ die *Z*-Konfiguration. Tabelle 14 und Abb. 47 fassen die Auswertung der 1D- und 2D-NMR-Spektren zusammen.

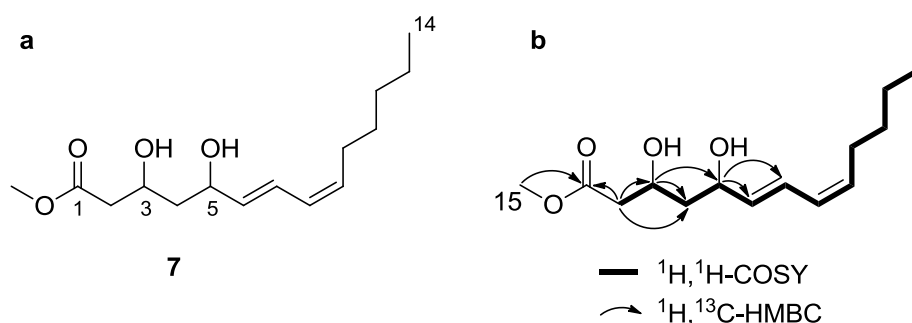


Abb. 47: a Naturstoff **6**. b COSY-Korrelationen und wichtige HMBC-Kopplungen für Naturstoff **6**

Atom	δ_c	Typ	δ_H	m	J[Hz]	COSY	HMBC
1	173.8	C					2, 15
2	43.7	CH ₂	a 2.52 b 2.45	dd dd	15.1, 8.4 15.1, 4.6	2b, 3 2a, 3	1, 3, 4 1, 3, 4
3	66.3	CH	4.26			2a, 2b, 4	2, 4, 5
4	45.3	CH ₂	1.61		6.7	3, 5	2, 3, 5, 6
5	70.1	CH	4.36	dd	15.3, 6.3	4, 6	3, 4, 6, 7
6	137.3	CH	5.67	dd	15.3, 6.3	5, 7	4, 5, 8
7	126.1	CH	6.55	ddt	15.3, 11.0, 1.2	6, 8	5, 8, 9
8	129.2	CH	5.98	t	10.8	7, 9	6, 7, 10
9	133.1	CH	5.42	dt	10.8, 7.6	8, 10	7, 10, 11
10	28.6	CH ₂	2.19	dq	7.6, 1.4	9, 11	8, 9, 11, 12
11	30.5	CH ₂	1.40 1.32	m m		10, m* 10, m*	9, 10, 12, 13 9, 10, 12, 13
12	32.6	CH ₂	1.32	m		m*	10, 11, 14, m*
13	23.6	CH ₂	1.32	m		14, m*	11, 14, m*
14	14.4	CH ₃	0.91	t	7.0	m*	12, 13
15	52.0	CH ₃	3.67	s			1

Tab. 14: Zusammenfassung der NMR-Daten von Naturstoff 7.

2.4.4.3.4 Untersuchungen zur Stereochemie der Naturstoffe 5 - 7

Die Konfigurationen der Hydroxylgruppen konnten aufgrund der geringen Konzentrationen der Reinsubstanzen in dieser Arbeit nicht experimentell durch beispielsweise die Mosher-Methode bestimmt werden. Die Auswertung der Kopplungskonstanten, der zur Konfiguration-Bestimmung notwendigen Protonen, im ¹H-NMR Spektrum führte zu keinen eindeutigen Aussagen. Die Analyse des ¹H, ¹H ROESY-Spektrums gab jedoch Anlass zu Vermutungen zur relativen Stereochemie. Im 2D-NMR-Spektrum von Naturstoff **7** konnte keine Kopplung zwischen 3-H und 5-H beobachtet werden. Es liegt nahe, dass die Hydroxylgruppen *anti* zueinander lokalisiert sind. Auch der Vergleich der NMR-Daten zu dem in der Literatur beschriebenen, strukturell verwandten, leodomycin A bestätigte diesen Verdacht. leodomycin A (**85**) (Abb. 48) wurde neben drei weiteren leodomycinen B - D aus einem marinen *Bacillus* Stamm isoliert.¹⁴⁷ Es besitzt ein, mit denen der Naturstoffe **6** und **7** vergleichbares, 3,5-Diol-System welches als (3*S*,5*R*)-Konfiguration beschrieben wurde. Die Hydroxylgruppen des leodomycin A (**85**) stehen demzufolge *anti* zueinander.

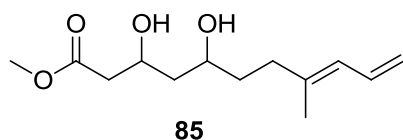


Abb. 48: Iedomycin (85)

2.4.4.3.5 Untersuchungen zur Bioaktivität der Naturstoffe 5 – 7

Die Naturstoffe **5**, **6** und **7** wurden in Plattendiffusionstests auf Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Gegen keinen der drei Mikroorganismen konnte biologische Aktivität durch die isolierten Naturstoffe ermittelt werden. Für das strukturell mit den Naturstoffen **5**, **6** und **7** verwandte Iedomycin A (**85**) konnte in Bioaktivitätstests gegen verschiedene Mikroorganismen biologische Aktivität dokumentiert werden. Gegen *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* wurden MIC-Werte von 32 und 64 µg/mL gemessen.¹⁴⁷ Beruhend auf der Ähnlichkeit der, in dieser Arbeit isolierten, Naturstoffe zum Iedomycin A (**85**) wäre eine ähnliche biologische Aktivität denkbar. Da es sich bei den ermittelten MIC-Werten des Iedomycin A (**85**) gegen die genannten Mikroorganismen um eher schwache biologische Aktivität handelt ist es nicht auszuschließen, dass diese auch von den Naturstoffen **5**, **6** und **7** ausgeht. In den Plattendiffusionstests war diese aufgrund der Methodik eventuell nicht feststellbar. Um genauere Aussagen zu tätigen müssen die Ermittlung von MIC-Werten der Naturstoffe **5**, **6** und **7** gegen verschiedene Mikroorganismen angeschlossen werden. Bisher konnten diese Tests nicht durchgeführt werden, da nicht ausreichend Probenmaterial isoliert werden konnte.

2.5 Aufreinigung von synthetischem Baceridin

2.5.1 Isolierung, Strukturaufklärung, Totalsynthese und biologische Aktivität des Baceridins

Baceridin (**33**) ist ein cyclisches Hexapeptid, welches 2011 am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, isoliert und charakterisiert wurde.⁵¹ Es zeigte in Untersuchungen zur biologischen Aktivität moderate cytotoxische Aktivität gegen L929 Maus-Fibroblasten (IC₅₀ 2 µg/mL) sowie schwache antimikrobielle Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* in Plattendiffusionstests. Durch weitere Experimente hinsichtlich der cytotoxischen Eigenschaften, wurde das Baceridin (**33**) von KALESSE und MALEK als ein Proteasom-Inhibitor identifiziert, welcher den

Zellzyklus in Tumorzellen blockiert und die Apoptose induziert. Es zeigte dabei inhibierende Wirkungen auf die Untereinheiten des Proteasoms in Tumorzellen und in zellfreien Proteasom-Assays. Bei Inkubation verschiedener Tumorzelllinien (HTC116 Kolon-Karzinom-Zellen, RKO Kolon-Karzinom-Zellen, HeLa Zervix-Karzinom-Zellen) mit 2 µg/mL Baceridin (**33**) konnten 40 – 60%ige Inhibitionen der proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms gemessen werden. Eine 60minütige Inkubation von zellfreiem Proteasom mit 1 µg/mL Baceridin (**33**) ergab ebenfalls eine signifikante Hemmung der Proteasomaktivität. Durch Disruptions-Experimente von p53-Genen mittels homologer Rekombination konnte festgestellt werden, dass die Blockierung des Zellzyklus sowie die Induktion der Apoptose durch Baceridin p53-unabhängig geschieht.

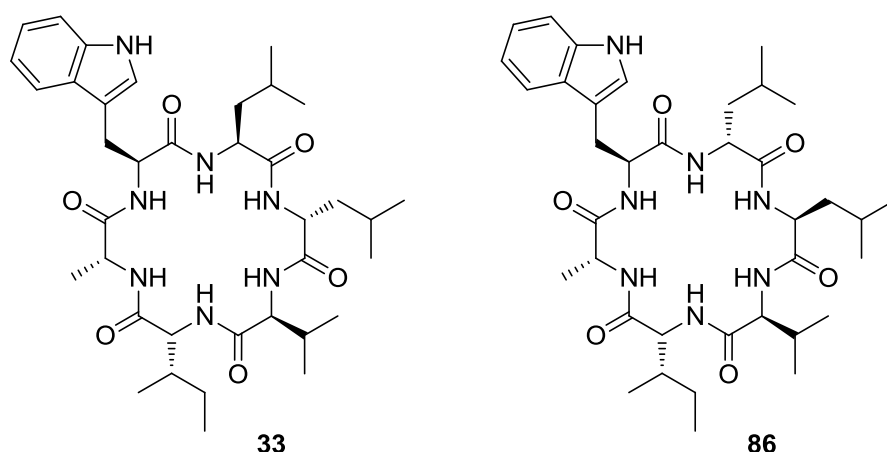


Abb. 49: Synthetisches/ authentisches Baceridin (**33**) und synthetisches Isobaceridin (**86**)

Baceridin (**33**) wurde aus einem epiphytischen *Bacillus*-Stamm isoliert, der von Kelchblättern der *Arabidopsis thaliana* stammte. Die Identifizierung des Stammes BL-4 erfolgte mittels 16S rDNA-Analyse und führte zur Einordnung des Mikroorganismus in die *Bacillus thuringensis*/ *Bacillus cereus*-Gruppe. Aus einer 3 L Fermentation des Bakteriums konnten 15.9 mg reines Baceridin (**33**) erhalten werden. Zur Adsorption der Sekundärmetabolite wurde dem Medium während der Fermentation Amberlite XAD-16 zugesetzt. Die Isolierung des Baceridins (**33**) erfolgte anschließend durch Elution des Amberlite XAD-16 mit Methanol und mehreren chromatographischen Schritten wie Säulenchromatographie und RP-HPLC. Zur Strukturaufklärung wurden 1D- bzw. 2D-NMR-Experimente und hochaufgelöste Massenspektrometrie angewandt. Aufgrund der charakteristischen Signale von Amidprotonen im ^1H -NMR-Spektrum (δ_{H} 7.25 ppm– 8.08 ppm) und sechs α -Amidkohlenstoffen (δ_{C} 48.7 ppm – 59.9 ppm) bzw. sechs

Carbonylkohlenstoffen (δ_c 170.6 ppm – 172.3 ppm) im ^{13}C -NMR-Spektrum konnte die Verbindung als Peptid identifiziert werden. Durch MS-MS-Fragmentierungen und intensiver Analyse von NMR-Spektren wurden die enthaltenen Aminosäuren bzw. deren Reihenfolge festgelegt. Die Konfigurationen der Aminosäuren (D-Alanin, L-Valin, D-Leucin, L-Leucin, D-*allo*-Isoleucin) konnten mittels milder Hydrolyse des Peptids und dem Vergleich der Abbauprodukte mit Standard-Aminosäuren durch GC-MS ermittelt werden. Die L-Konfiguration des Tryptophans wurde zusätzlich durch Marfey's Methode bestätigt.¹⁴⁸ Die Ermittlung der Reihenfolge der Leucin-Reste des Baceridins (**33**) war mit den vorliegenden Methoden jedoch nicht sicher möglich. Um die Sequenz eindeutig aufzuklären, musste diese durch die Totalsynthese des Hexapeptids bestätigt werden. Dafür wurden zwei Isomere des Baceridins, Baceridin (**33**) und Isobaceridin (**86**), die sich in den Konfigurationen der beiden Leucin-Einheiten unterschieden synthetisiert.^{149,150} Die Verknüpfungen der Aminosäuren zum jeweiligen linearen Hexapeptid erfolgten über Peptidkupplungen. Anschließend wurden die Isomere durch Makrozyklisierungen cyclisiert. Nach der Analyse von verschiedenen NMR-Spektren der synthetischen Isomere des Baceridins **33** und **86** wurde die Stereochemie entsprechend Verbindung **33** bestimmt. Allerdings lagen zwischen den analytischen Daten des synthetischen Baceridins (**33**) Unterschiede zu denen des authentischen Baceridins (**33**) vor. Die NMR-Spektren zeigten geringe Abweichungen, der Drehwert unterschied sich jedoch signifikant. Es wurde vermutet, dass die Unterschiede der analytischen Daten beider Verbindungen auf Salzeffekte aufgrund von unterschiedlichen Aufreinigungsmethoden zu erklären sind. Um diese Vermutung zu stützen, sollte im Zuge der vorliegenden Arbeit ein weiterer Aufreinigungsschritt durch präparative HPLC erfolgen. Im Anschluss sollten die NMR-Daten und der Drehwert des synthetischen Baceridins (**33**) erneut mit denen des authentischen Baceridins (**33**) verglichen werden. Ziel dieses Schrittes war die zweifelsfreie Bestätigung der korrekten Aminosäuresequenz.

2.5.2 Aufreinigung des synthetischen Baceridins

Da sich die analytischen Werte des synthetischen Baceridins (**33**) von denen des authentischen Baceridins (**33**) unterschieden wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt durch präparative HPLC durchgeführt. Im Isolierungsprozess des authentischen Baceridins (**33**) wurde als finaler Schritt eine präparative RP-HPLC durchgeführt. Für diese wurde ein Eluentensystem aus Acetonitril und 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5.5) genutzt. Während der Aufreinigung des synthetischen Baceridins durch

präparative HPLC wurde kein Ammoniumacetatpuffer verwendet. Die Vermutung lag nahe, dass die Unterschiede in der Analytik beider Verbindungen auf die verschiedenen Eluentensysteme der präparativen HPLC-Schritte zurückzuführen waren. Die Ursache dafür lag in eventuellen Salzeffekten die durch die Verwendung des Puffers auftraten. 11.2 mg des synthetischen Baceridins (**33**) wurden daher durch eine weitere präparative RP-HPLC getrennt. Es wurde ein isokratischer Gradient des Eluentensystems 65% Acetonitril/ 35% 50 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 5.5) gewählt. Die Löslichkeit des Baceridins war sehr schlecht, so dass die Probe in einem verhältnismäßig hohen Volumen von Methanol gelöst werden musste. Zur besseren Löslichkeit des synthetischen Baceridins (**33**) mussten zusätzlich einige Tropfen Dichlormethan zugefügt werden. Bei einem jeweiligen Injektionsvolumen von 500 μ L waren vier analoge Durchläufe der HPLC nötig, um die gesamte Probe zu reinigen. Die Retentionszeit des synthetischen Baceridins (**33**) betrug 14 min. Nach dem Einengen des Lösungsmittels unter Vakuum konnte eine Menge von 7.2 mg aufgereinigtem synthetischem Baceridin (**33**) gewonnen werden. Anschließend erfolgten die Aufnahme von NMR-Spektren und die Messung des Drehwertes. Diese analytischen Daten des synthetischen Baceridins (**33**) wurden erneut mit denen des authentischen Baceridins (**33**) verglichen. Die NMR-Daten beider Verbindungen unterschieden sich schon vor dem letzten Aufreinigungsschritt nur minimal. Nach der präparativen HPLC waren sie erneut nahezu identisch. Der Drehwert des synthetischen Baceridins vor diesem finalen Aufreinigungsschritt betrug $[\alpha]^{22}_D - 14.0$ ($c = 0,62$; CHCl_3). Nach der erneuten Aufreinigung mittels der beschriebenen Methode entsprach der Drehwert $[\alpha]^{22}_D + 42.0$ ($c = 0,1$; MeOH). Der ursprünglich ermittelte Drehwert des authentischen Baceridins (**33**) betrug $[\alpha]^{22}_D + 41.0$ ($c = 0,1$; MeOH). Die Vermutung, dass der große Unterschied zwischen den Drehwerten auf die unterschiedlichen Eluenten der präparativen HPLC-Schritte zurückzuführen war, wurde somit bestätigt. Als Kontrolle wurde ebenso das synthetisierte Isobaceridin (**86**) durch eine erneute präparative HPLC gereinigt. Die Bedingungen und die Durchführung der präparativen HPLC entsprachen denen des Baceridins (**33**). Die Drehwertmessung im Anschluss an die Aufreinigung des synthetischen Isobaceridins (**86**) ergab einen Drehwert von $[\alpha]^{20}_D = -35,0^\circ$ ($c = 0,1$; MeOH). Der zum Baceridin (**33**) entgegengesetzte Drehwert des Isobaceridins (**86**) untermauerte die korrekte Stereochemie des synthetischen Baceridins (**33**). Die Anordnung der Leucin-

Einheiten im Baceridin (**33**) konnte dementsprechend durch die Totalsynthese von Baceridin (**33**) und Isobaceridin (**86**) zweifelsfrei bestätigt werden.

2.6 „Molecular Networking“ als neue Methode zur Dereplikation bekannter Naturstoffe

2.6.1 Beschreibung der Methode „Molecular Networking“

Das „Molecular Networking“ ist eine Methode zur schnellen Dereplikation von hochkonzentrierten Extrakten biologischer Proben.¹⁵¹ Es handelt sich um eine kostengünstige und zeitsparende Anwendung, die daher sehr großes Potential im Bereich der Naturstoffisolierung besitzt. Übliche Methoden zur Dereplikation basieren auf MS-Daten, UV/Vis-Spektren, Retentionszeiten oder NMR-Spektren. Sie stellen zum Teil relativ zeitaufwendige und kostenintensive Methoden dar, die mittels „Molecular Networking“ größtenteils umgangen werden können. Benötigt werden ausschließlich MS und MS-MS Daten der Naturstoffe in den zu analysierenden Extrakten. MS-MS-Daten, also die Fragmentierungen der Naturstoffe, sind charakteristisch für diese und können daher als „fingerprint“ bezeichnet werden. Ähnliche Fragmentierungen verschiedener Strukturen deuten auf eine chemische Verwandtschaft hin. Ein weiterer Vorteil der Verwendung von MS-MS-Daten ist die hohe Sensitivität der Methode im Gegensatz zur NMR-Spektroskopie oder UV/Vis-Spektroskopie. Auch kleinste Mengen an Substanz können detektiert und fragmentiert werden. Die Dereplikation kann daher in frühen Stadien der Untersuchung von komplexen Extrakten vollzogen werden, ohne dass eine Aufkonzentration der Naturstoffe durch mehrere Aufreinigungsschritte vollzogen werden muss. Ziel der Methode ist die Generierung eines Networks zur Visualisierung der MS-MS-Daten, welches Aufschluss über Komponenten des Extraktes und deren Verwandtschaft gibt. Zur Erstellung des Networks sind drei Schritte erforderlich. (Abb. 50)

- Die Aufnahme von MS und MS-MS-Daten der Proben: Dies kann zum Beispiel mittels LC-MS geschehen. In dieser Arbeit wurden die MS und MS-MS-Daten an einer HPLC-MS gemessen.
- Die Generierung des „Molecular Networks“: Die MS- und MS-MS-Daten werden anhand von „cosine scores“ (Mathematische Operation zur Darstellung der Ähnlichkeit des Fragmentierungsmusters von Strukturen. (0 -

Ergebnisse und Diskussion

1, 0: keine Ähnlichkeiten im Fragmentierungsmuster, 1: identisches Fragmentierungsmuster) mathematisch geclustert, um Verwandtschaften der Spektren darzustellen. Anschließend erfolgt die Visualisierung mithilfe des Programmes *Cytoscape*.

- Die Analyse des „Molecular Networks“: Die einzelnen Naturstoffe werden jeweils durch eine „node“ repräsentiert. Die „nodes“ sind beschriftet mit den MS-Daten der Strukturen. Verbindungen zwischen den „nodes“ bedeuten strukturelle Ähnlichkeiten der Verbindungen. Die Dicke der Verbindungslinien entspricht dem Grad der Verwandtschaft. Je ähnlicher die Substanzen, desto ausgeprägter sind die Verbindungen zwischen den „nodes“. Verwandte Naturstoffe bilden einen Cluster im „Molecular Network“, der damit eine Stoffklasse repräsentiert.

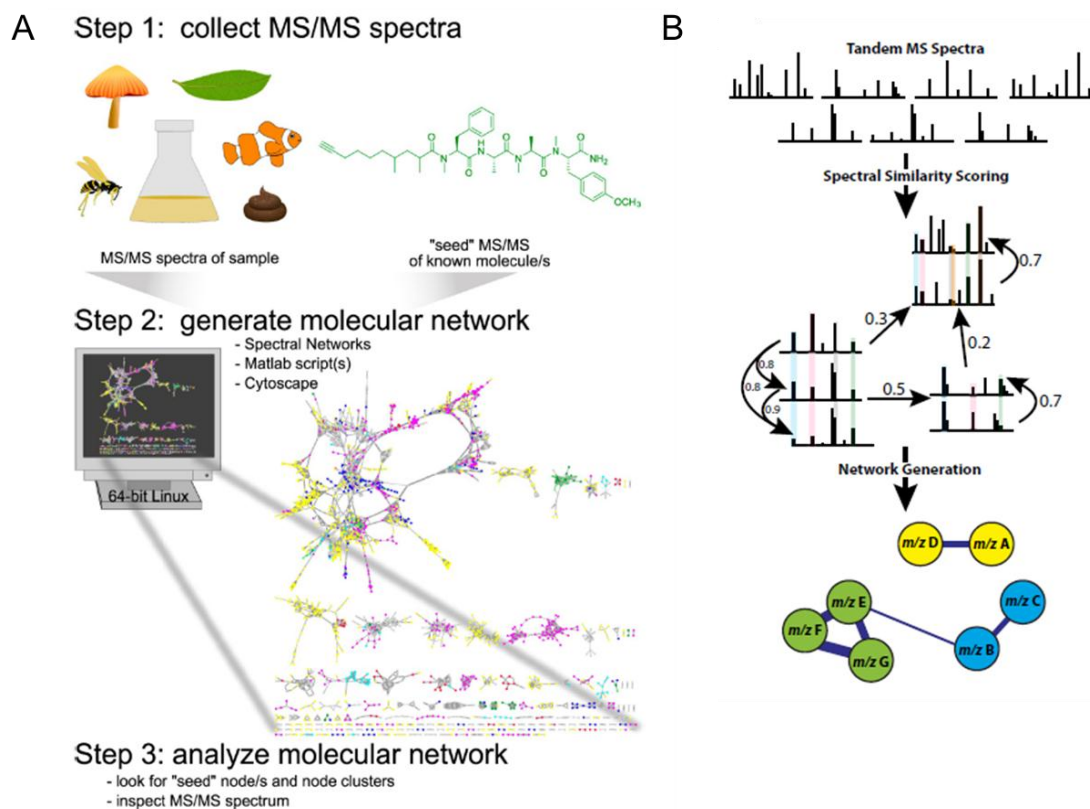


Abb. 50: A Schritte zum „Molecular Network“ für Dereplikationsprozesse. Schritt 1: Sammlung von MS- bzw. MS-MS Daten aus komplexen biologischen Extrakten. Schritt 2: Generierung des „Molecular Network“ mittels *Matlab* und *Cytoscape*. Schritt 3: Analyse des „Molecular Networks“/ der Cluster/ der „nodes“ mithilfe der MS, MS-MS-Daten. (Abb. übernommen aus Dorrestein *et al.*)¹⁵¹ B Generierung des „Molecular Networks“ Beruhend auf der Ähnlichkeit von MS-MS-Daten der Naturstoffe werden sie im Network geclustert. Ergebnis ist das „Molecular Network“, bestehend aus „nodes“ und Verbindungen zwischen den „nodes“. Je dicker die Verbindungslinien, desto größer die Ähnlichkeit der Fragmentierungen (MS-MS-Daten) der Naturstoffe. (Abb. übernommen aus Dorrestein *et al.*)¹⁵²

Zur Dereplikation von bekannten Naturstoffen können vorhandene LC-MS-MS-Daten von Standards bekannter Substanzen mit den Daten von zu analysierenden Extrakten geclustert werden. Ist der bekannte Naturstoff (Standard) ebenfalls im Extrakt vorhanden, kann durch die Visualisierung des Networks sofort ein „match“ detektiert werden. Eine „node“ entspricht in diesem Fall dem MS-MS-Spektrum eines bekannten Standards und dem einer Struktur aus dem Extrakt. Da beide Substanzen gleich fragmentieren und die gleiche Masse besitzen, werden sie als eine „node“ dargestellt. Bei der Analyse der in Cytoscape visualisierten Daten wird diese „node“ farblich hervorgehoben und kann als bekannter Naturstoff identifiziert werden. Zusätzlich zu der Dereplikation kann das „Molecular Networking“ zur Detektion von Derivaten bekannter Strukturen genutzt werden. Dafür ist die Identifikation einer oder mehrerer „nodes“ bekannter Naturstoffe notwendig. Anschließend können weitere mit dieser „node“ clusternden „nodes“ durch Analyse der MS-MS Daten analysiert werden. Die Massen und Fragmentierungen sowie Retentionszeiten und UV-Vis-Spektren werden dafür mit Datenbanken abgeglichen. Sollten diese Parameter keinen literaturbekannten Naturstoffen entsprechen, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um noch unbekannte Derivate der bekannten Verbindung.

Es ist anzumerken, dass diese Methode eine Hilfestellung im Prozess der Dereplikation oder der Analyse von komplexen Extrakten darstellt. Sie ersetzt nicht die Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten. Zur sicheren Strukturaufklärung, Charakterisierung und Einordnung der Verbindungen in Stoffklassen müssen die klassischen Methoden in der Naturstoffchemie angewandt werden.

2.6.2 Anwendung und Optimierung des „Molecular Networking“

Im folgenden Abschnitt werden Beispiele für dereplizierte Naturstoffe aus biologischen Extrakten dargestellt. Die Dereplikationsprozesse erfolgten im Rahmen der Methodenoptimierung des „Molecular Networking“ anhand von Extrakten eines Cyanobakteriums und einer Alge. Die entsprechenden MS-Daten befinden sich im Anhang.

Die Probe PAP-24/Mar/12-1 enthielt einen unbestimmten Stamm von roten filamentösen Cyanobakterien (Volumen 500 mL). Er wurde in Panamá während eines SCUBA-Tauchgangs gesammelt. Zu Beginn der Aufarbeitung der Probe

Ergebnisse und Diskussion

erfolgte die Extraktion mit einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und Methanol. Anschließend wurde der Extrakt mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln oder Lösungsmittelgemischen durch Unterdruck-Säulenchromatographie (VLC) an Kieselgel in neun Fraktionen getrennt (2122A – 2122I).

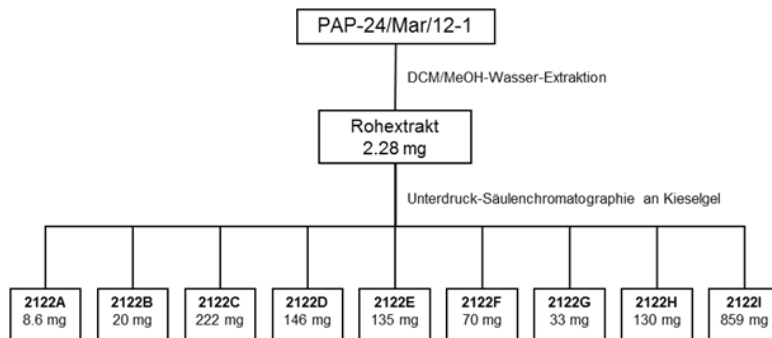


Abb. 51: Aufarbeitungsschema der Probe von roten filamentösen Cyanobakterien (PAP-24/Mar/12-1)

Alle Fraktionen wurden mittels LC-MS analysiert und auf Cytotoxizität gegen H460-Zellen getestet. Auffällig war die starke biologische Aktivität gegen H460-Zellen der Fraktionen 2122H und 2122I (Abb. 52).

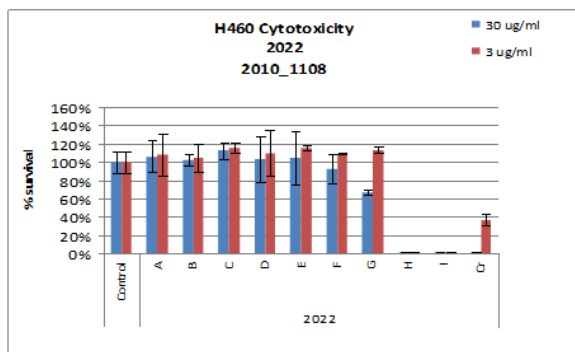


Abb. 52: Cytotoxizität der Fraktionen 2122A – 2122I sowie des Rohextraktes (Cr) gegen H460-Zellen. x-Achse: Fraktionen, y-Achse: Überlebensrate der H460-Zellen nach Inkubation mit den Fraktionen bzw. des Rohextraktes

Das „Molecular Network“ wurde aus den MS- und MS-MS Daten der Sekundärmetabolite aus den neun Fraktionen des Extraktes erstellt (Abb 53 **B**). Interessante „nodes“ wurden ausgewählt und die analytischen Daten der LC-MS-UV mit der Naturstoff-Datenbank MarinLit abgeglichen.¹⁵³

Ergebnisse und Diskussion

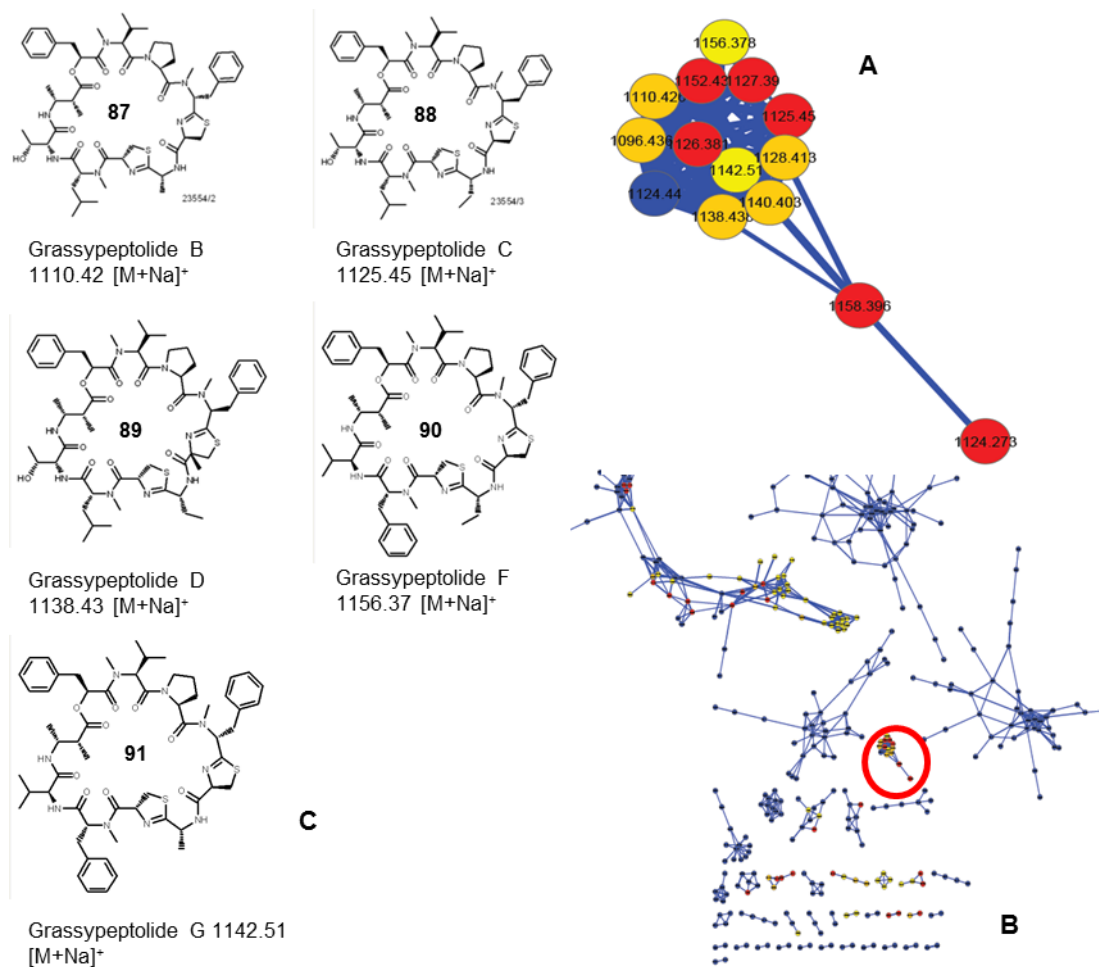


Abb. 53: **A** Grassypeptolid-Cluster aus dem „Molecular Network“ aus Fraktionen der Probe PAP-24/Mar/12-1 (farbliche Markierung der „nodes“: rot - Verbindungen aus Fraktion H, gelb - Verbindungen aus Fraktion I, orangefarben - Verbindungen aus Fraktion I und H, blau-Verbindungen aus Fraktionen ohne biologische Aktivität gegen H460) **B** Gesamtes „Molecular Network“ aller Fraktionen der Probe PAP-24/Mar/12-1. Rote Markierung: Grassypeptolid-Cluster. **C** Im Cluster identifizierte Grassypeptolide (B, C, D, F und G.)

In der Darstellung des Networks wurden die „nodes“ der Naturstoffe, die in den cytotoxischen Fraktionen detektiert werden konnten, farblich hervorgehoben (Fraktion 2122H: rot, Fraktion 2122I: gelb, Fraktion 2122H und 2122I: orange). Die blauen „nodes“ repräsentieren Verbindungen aus den inaktiven Fraktionen. Auffällig war ein Cluster der aus einer Vielzahl von roten, gelben oder orangen „nodes“ gebildet wurde (Abb. 53 **A**). Die MS-Daten entsprachen Werten zwischen m/z 1110 Da und m/z 1158 Da. Die Analyse der entsprechenden MS-MS-Fragmentierungen deutete auf einen peptidischen Charakter der Sekundärmetabolite. Der Cluster konnte als Grassypeptolide-Cluster identifiziert werden. Einzelnen „nodes“ konnten die Grassypeptolide B (**87**), C (**88**), D (**89**), F (**90**) und G (**91**) zugeordnet werden (Abb. 53 **C**). Zusätzlich gehörten auch verschiedene „nodes“ zum Cluster, die ähnliche Fragmentierungen zu den bekannten Grassypeptoliden aufwiesen. Mit hoher

Ergebnisse und Diskussion

Wahrscheinlichkeit enthielt der untersuchte Extrakt weitere Derivate der Grassypeptolide, deren Existenz durch das „Molecular Networking“ visualisiert wurde. Die Präsenz der Grassypeptolide in den Fraktionen 2122H und 2122I erklärte auch die biologische Aktivität der Fraktionen gegen H460-Zellen. Für Grassypeptolide wurden bereits cytotoxische Aktivitäten gegen Krebszelllinien beschrieben. In niedrigen Konzentrationen verursachen sie einen Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase, in höheren Konzentrationen rufen sie einen G2/M-Phasenarrest hervor.¹⁵⁴

In einem weiteren Cluster des „Molecular Networks“ der Probe PAP-24/Mar/12-1 konnte Barbamid (**92**) aufgrund charakteristischer Fragmentierungen identifiziert werden.

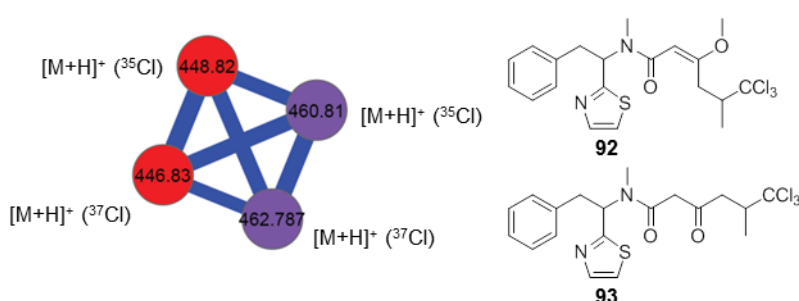


Abb. 54: Barbamid-/4-O-Demethylbarbamid-Cluster aus dem „Molecular Network“ der Probe PAP-24/Mar/12-1. (farbliche Markierung der „nodes“: violett – „match“, rot – Naturstoff aus Standard)

Barbamid (**92**) lag nur in sehr geringer Konzentration in den Fraktionen 2122H und 2122I vor, konnte aber mithilfe der Methode „Molecular Networking“ identifiziert werden. Zur Bestätigung der Vermutung wurden zusätzlich die LC-MS-Daten eines Barbamid-Standards, in welchem ebenfalls 4-O-Demethylbarbamid (**93**) enthalten war, mit den LC-MS-Daten der Fraktionen 2122H – 2122I geclustert (Abb. 54). Das Barbamid (**92**) aus dem untersuchten Extrakt bildete mit dem Barbamid-Standard wegen der identischen Fragmentierungen ein „match“ (violett). Aufgrund des Chlor-Isotopenmusters produzierte die Verbindung jeweils zwei „nodes“ (^{35}Cl , ^{37}Cl) im „Molecular Network“. Das gleiche galt für 4-O-Demethylbarbamid (**93**), welches ausschließlich im Standard enthalten war (rot). Barbamid (**92**) wurde ursprünglich aus dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* isoliert und charakterisiert. 4-O-Demethylbarbamid (**93**) wurde mithilfe von heterologen Expressionsversuchen identifiziert. Beide Sekundärmetabolite besaßen in Untersuchungen von biologischen Aktivitäten molluskizide Wirkungen gegen *Biomphalaria glabrata*.^{155,156}

Ergebnisse und Diskussion

Eine zweite untersuchte Probe (PAP-25/Jun/12-5) war eine nicht identifizierte rote Makroalge. Sie wurde ebenfalls in Panamá während eines SCUBA-Tauchgangs gesammelt. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte analog zu der Aufarbeitung von PAP-24/Mar/12-1. Es wurden neun Fraktionen 2118A – 2118I gewonnen die mittels LC-MS-UV und „Molecular Networking“ analysiert wurde.

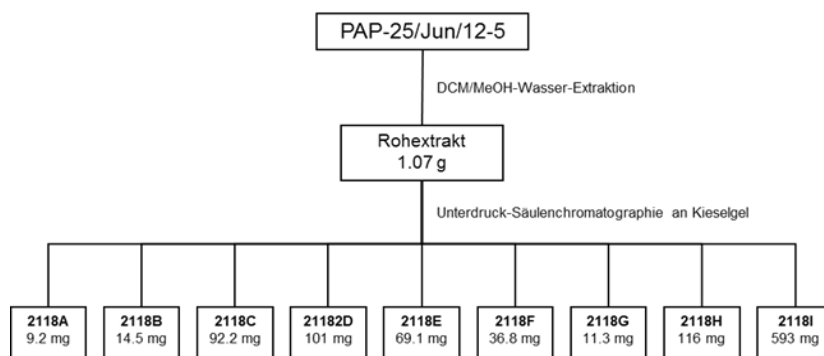


Abb. 55: Aufarbeitungsschema der Probe einer roten Makroalge (PAP-25/Jun/12-5)

Mithilfe des „Molecular Networking“ konnte Carmaphycin A (**94**) im Zuge des Dereplikationsprozesses in Fraktion 2118H identifiziert werden. Das „Molecular Network“ aller VLC-Fractionen wurde zusammen mit einem Standard von Carmaphycin A (**94**), welcher zusätzlich geringe Mengen von Carmaphycin B (**95**) enthielt, geclustert (Abb. 56 A).

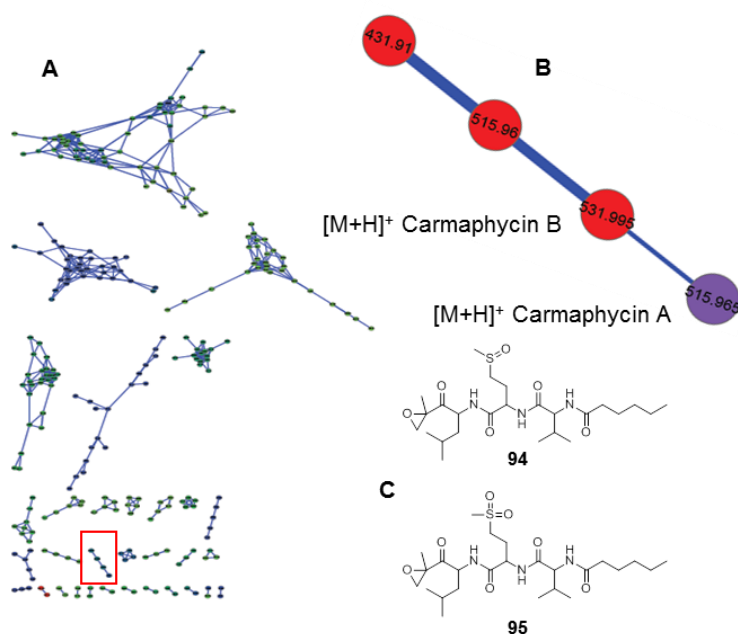


Abb. 56: A Gesamtes „Molecular Network“ aller Fraktionen der Probe PAP-25/Jun/12-5. Rote Markierung: Carmaphycin-Cluster. B Carmaphycin-Cluster des „Molecular Network“ aus Fraktionen der Probe PAP-24/Mar/12-1) (farbliche Markierung der „nodes“: violett – „match“, rot - Naturstoff aus Carmaphycin A/ Carmaphycin B-Standard. C Carmaphycin A (**94**), Carmaphycin B (**95**)

Ergebnisse und Diskussion

Carmaphycin A (**94**) mit einer Masse von m/z 515.96 $[M+H]^+$ clusterte mit dem im Standard enthaltenen Carmaphycin B (**95**) (m/z 531.99 $[M+H]^+$). Die „node“ des Carmaphycin A (**94**) (violett) wurde durch Carmaphycin A (**94**) gebildet, welches aus dem Extrakt und aus dem Standard stammte. Die „node“ des Carmaphycin B (**95**) (rot) entsprach ausschließlich einer Verbindung die im Standard enthalten war. Interessanterweise konnte Carmaphycin A (**94**) im Extrakt der Makroalge detektiert werden. Bisher ist die Biosynthese dieses Sekundärmetabolites nur in Cyanobakterien, jedoch nicht in Algen, bekannt. Es lag nur in geringsten Mengen im Extrakt vor. Eventuell wurde das Carmaphycin A (**94**) von einer, mit der Oberfläche der Alge assoziierten, Cyanobakterien-Spezies gebildet. Ursprünglich isoliert wurde es aus *Symploca* sp. Es besaß Cytotoxische Aktivitäten gegen Lungen- und Darmkrebszellen.¹⁵⁷

Ein weiteres Beispiel für die Dereplikation bekannter Naturstoffe durch das „Molecular Networking“ war die Identifizierung von Symplostatin 1 (**97**) in Fraktion 2118H. Das „Molecular Network“ wurde generiert, indem die LC-MS-Daten von Dolastatin 10 (**96**) mit den Fraktionen des Extraktes (2118A - 2118I) PAP-25/Jun/12-5 geclustert wurde (Abb. 57).

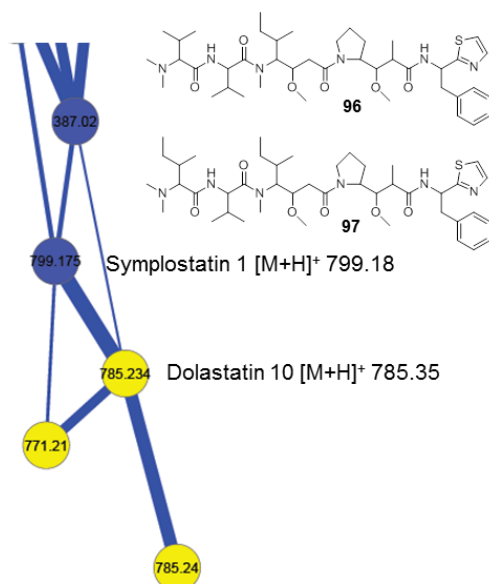


Abb. 57: Symplostatin 1/ Dolastatin 10-Cluster aus dem „Molecular Network“ der Probe PAP-25/Jun/12-5. (farbliche Markierung der „nodes“: blau – Naturstoff aus Extrakt, gelb – Verbindung aus Dolastatin 10-Standard)

Die „node“ des Molekularions von Dolastatin 10 (**96**) m/z 785.35 $[M+H]^+$ clusterte stark mit einer verbundenen „node“ die durch das Molekularion m/z 799.18 repräsentiert wurde. Der Sekundärmetabolit wurde mithilfe der MS-MS-Daten als

Ergebnisse und Diskussion

Symplostatin 1 (**97**) identifiziert. Die Verbindung beider Naturstoffe im „Molecular Network“ resultierte aus der großen Ähnlichkeit beider Sekundärmetabolite und die sich daraus ergebenden ähnlichen Fragmentierungen in MS-MS-Spektren. Der einzige Unterschied beider Sekundärmetabolite besteht in dem Austausch eines Isoleucins gegen Valin. Symplostatin 1 (**97**) Symplostatin 1 (**97**) konnte ursprünglich aus dem Cyanobakterium *Symploca hydroides* isoliert werden.¹⁵⁸ Es besitzt tumorselektive cytotoxische Aktivität und wirkt dabei antimitotisch.¹⁵⁹

3 Zusammenfassung und Ausblick

Das vorrangige Ziel der vorliegenden Dissertation lag in der Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus vier epiphytischen Mikroorganismen. Aus den Stämmen *Pseudomonas syringae* IBi56, *Sporobolomyces* sp. H16 und *Cladosporium herbarum* IPk15 konnten eine Vielzahl verschiedener Sekundärmetabolite identifiziert werden. Es handelte sich um bereits bekannte Naturstoffe, die unterschiedlichen Substanzklassen zugeordnet wurden. Aus einer Fermentation von *Pseudomonas syringae* IBi56 konnten ausschließlich Diketopiperazine als Hauptkomponenten isoliert werden. In Untersuchungen von biologischen Aktivitäten der cyclischen Dipeptide konnten nur bedingt Hemmungen anderer Mikroorganismen beobachtet werden. Als Schlussfolgerung ergab sich, dass die ermittelte Aktivität des Extraktes aus *Pseudomonas syringae* IBi56 mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Kombination der Diketopiperazine untereinander zustande kam. *Sporobolomyces* sp. produzierte unter den angewandten Fermentationsbedingungen nur eine geringe Anzahl von isolierbaren Sekundärmetaboliten. Es konnten Vertreter der Diketopiperazine und Tryptophan- bzw. ein Phenylalanin-Derivat identifiziert werden. Im Zuge der Untersuchung von *Cladosporium herbarum* IPk15 wurden einige Benzoessäure- und Phenylpropansäurederivate sowie Diketopiperazine und das Cladosporol C (**51**) isoliert. Die biologischen Aktivitäten des Stammes gegen *Bacillus subtilis* und *Venturia inaequalis* konnten durch diese Naturstoffe begründet werden. Da es sich bei den Sekundärmetaboliten der genannten epiphytischen Stämme um bekannte Naturstoffe handelte, wurde im Zuge der Dereplikation auf vollständige Charakterisierungen der Verbindungen verzichtet. Der epiphytische Stamm ISch31 wurde in dieser Arbeit als *Aureobasidium pullulans* identifiziert. Neben bekannten Diketopiperazinen, Tryptophan- und Phenylalanin-Derivaten konnten acht bisher unbekannte Naturstoffe (**1** - **8**) isoliert und charakterisiert werden. Naturstoff **1** besaß eine Furanon-Untereinheit die mit einem (3*E*,5*E*)-2-Oxoheptadiensystem verknüpft war. Das Furanon **1** zeigte geringe Aktivität gegen das Chaperon Hsp90, welches ein interessantes Target darstellt. Naturstoff **2** wurde als 2,4-Dihydroxybenzaldehyd identifiziert, das ebenfalls mit dem (3*E*,5*E*)-2-Oxoheptadiensystem substituiert war. Die Verbindung wies, außer in Methanol, schlechte Löslichkeiten in verschiedenen Lösungsmitteln auf. In Methanol tautomerisierte sie jedoch zum Halbacetal, sodass die Auswertungen von NMR-Spektren erschwert wurden. Naturstoff **2** besaß in

Cytotoxizitätstests moderate Aktivität gegen L929-Mausfibroblasten (IC_{50} 7 μ g/mL). Eine weitere identifizierte Verbindung (**3**) unterschied sich von Naturstoff **2** ausschließlich durch den Austausch der Aldehydgruppe gegen eine Carboxylgruppe. Folglich wurde die aromatische Untereinheit von Naturstoff **3** als substituierte 2,4-Dihydroxybenzoesäure bestimmt. Des Weiteren konnten Produkte einer hybriden PKS-NRPS isoliert werden. Die Bildung von Desmethylpretenellin A (**53**) wurde erstmals in einem WT-Stamm nachgewiesen, Desmethylprototenellin D (**8**) entspringt mit hoher Wahrscheinlichkeit aus demselben Biosyntheseweg und unterscheidet sich durch eine zusätzliche Hydroxylierung vom Desmethylpretenellin A (**53**). Beide Tetramsäuren besaßen biologische Aktivitäten gegen Mikroorganismen. Desmethylpretenellin A (**53**) zeigte starke Aktivität gegen *Bacillus subtilis* und moderate Hemmungen von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Weiterhin wirkte es schwach cytotoxisch gegen L929-Mausfibroblasten. Desmethylprototenellin D (**8**) besaß moderate biologische Aktivität gegen *Escherichia coli*. Die Struktur eines weiteren PKS-NRPS-Produktes wurde mit Pyridon **4** vorgeschlagen. Weiterhin konnten drei lineare dihydroxylierte Sekundärmetabolite (**5** – **7**) identifiziert und charakterisiert werden. Naturstoff **5** besaß ein Diensystem und einen aliphatischen Rest. Verbindung **5** wurde als (5*E*,7*E*)-3,9-Dihydroxytetradeca-5,7-diensäure identifiziert. Die Struktur von Naturstoff **6** wurde als (6*E*,8*Z*)-3,5-Dihydroxytetradeca-6,8-Diensäure festgelegt. Naturstoff **7** unterschied sich von Naturstoff **6** nur durch eine Methoxylierung am Carboxyterminus. Alle drei linearen Verbindungen besaßen in Plattendiffusionstests keine biologischen Aktivitäten gegen getestete Mikroorganismen.

In einem Nebenprojekt wurde synthetisches Baceridin (**33**) zum Vergleich der analytischen Daten mit denen des authentischen Baceridins (**33**) durch präparative HPLC aufgereinigt und charakterisiert. Die postulierten Konfigurationen der beiden Leucinreste konnten somit bestätigt werden.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Anwendung der neuen Methode „Molecular Networking“ zur Dereplikation von komplexen biologischen Extrakten beschrieben. Die Methode ist im Vergleich zu klassischen Dereplikationsverfahren kosten- und zeitsparend. Zudem gibt sie einen schnellen Überblick über die Anzahl von Sekundärmetaboliten und Stoffklassen in biologischen Extrakten. Anhand der

Zusammenfassung und Ausblick

Analyse von Extrakten aus einem Cyanobakterium und einer Alge wurde die eindeutige Identifikation von bekannten Naturstoffen beschrieben.

Als zukünftige Forschungsansätze sind weitere Untersuchungen der unbekannten Naturstoffe (**1 – 8**) möglich. Grundlage dafür wäre die Reisolierung dieser Sekundärmetabolite durch das Upscaling einer Fermentation von *Aureobasidium pullulans* ISch31. Weiterführende Untersuchungen zur biologischen Aktivität des Furanon **1** könnten auf andere Hitzeschockproteine ausgeweitet werden. Ebenso wäre die Ausweitung der Cytotoxizitätsuntersuchungen der aromatischen Polyketide sinnvoll. Basierend auf der Verwandtschaft zu Naturstoff **2** ist die biologische Aktivität von Naturstoff **3** gegen L929-Mausfibroblasten sehr wahrscheinlich. Weiterhin könnten Tests von biologischen Aktivitäten der Naturstoffe **2** und **3** auf andere Zelllinien angeschlossen werden. Zwei hoffnungsvolle Forschungsobjekte sind ebenso das Demethylpretenellin A (**53**) und das Desmethylprototenellin D (**8**). Die ermittelten Bioaktivitäten geben Anlass zu Tests an weiteren, pathogenen Mikroorganismen. Die Ermittlung des Targets der beiden Tetransäuren wäre ein interessanter Forschungsansatz. Zur Bestätigung des Strukturvorschlags für Pyridon **4** sowie zur Ermittlung der Konfigurationen der Hydroxylgruppen der Naturstoffe **5 – 7** wären synthetische Ansätze denkbar. Die Konfigurationen der Hydroxylgruppen der Naturstoffe **5 – 7** könnten mithilfe der Mosher-Methode bestimmt werden. Die Struktur des Pyridon **4** könnte durch eine Totalsynthese erfolgen.

4 Experimenteller Teil

4.1 Instrumentelle Analytik und chromatographische Methoden

Massenspektren (HPLC-HRESIMS, HPLC-EIMS)

HPLC-ESMS Spektren wurden an einem Amazon Ion-Trap Massenspektrometer der Firma Bruker, kombiniert mit einem HPLC-UV (Agilent 1200 series) System, gemessen. Säule: 2.1 + 50 mm, 1.7 μm , C₁₈ Acquity UPLC BEH (Waters), Lösungsmittel A: H₂O + 0.1% Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure, Gradient: 0 min – 0.5 min: 5% B, 19.5 min 100% B, 24.5 min: 100% B, Fluss: 0.6 mL/min, UV-Detektion 200 – 600 nm)

HPLC-HRESIMS Spektren wurden an einem time-of-flight Massenspektrometer (ESI-TOF-MS Maxis) der Firma Bruker, kombiniert mit einem HPLC-UV (Agilent 1200 series) System, gemessen. Säule: 2.1 + 50 mm, 1.7 μm , C₁₈ Acquity UPLC BEH (Waters), Lösungsmittel A: H₂O + 0.1% Ameisensäure, Lösungsmittel B: Acetonitril + 0.1% Ameisensäure, Gradient: 0 min – 0.5 min: 5% B, 19.5 min 100% B, 24.5 min: 100% B, Fluss: 0.6 mL/min, UV-Detektion 200 – 600 nm)

Optische Drehung

Zur Ermittlung von Drehwerten wurde das Polarimeter 241 MC der Firma Perkin-Elmer genutzt.

UV/Vis Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden an einem „Shimadzu UV-vis UV-2450 Spectrophotometer „ aufgenommen. Die Wellenlänge λ wird in [nm] angegeben, der jeweilige Extinktionskoeffizient ϵ der Absorptionsmaxima wird in [$\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] angegeben. Grundlage der Berechnung des Extinktionskoeffizienten ist das Lambert-Beersche-Gesetz mit der entsprechenden Formel: $\epsilon = E / c \cdot d$

E = Extinktion, c = Konzentration [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$], d = Schichtdicke [cm]

Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Die NMR-Spektren wurden auf den Geräten Ascend 700 (¹H 700 MHz, ¹³C 175 MHz), ADVANCE DMX 600 (¹H 600 MHz, ¹³C 150 MHz), AMX 500 (¹H 500 MHz,

Experimenteller Teil

^{13}C 125 MHz), ARX 400 (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz) oder DPX 300 (^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz) der Firma Bruker aufgenommen. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur und mit deuterierten Lösungsmitteln. Chemische Verschiebungen δ_{H} und δ_{C} sind in ppm und relativ zum Lösungsmittel als internen Standard angegeben. Kopplungskonstanten (J) sind in Hz angegeben. Signalmultiplizitäten werden folgend abgekürzt:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, quin = Quintett, sept. = Septett, m = Multipllett, dd = Doppeltdublett, dt = Doppeltriplett, dq = Doppelquartett, ddd = doppeltes Doppeltdublett.

Die Auswertung der NMR-Spektren wurde mit dem Programm ACD Spectrus Processor der Firma ACD/Labs durchgeführt (Version 12.0).

Dünnschichtchromatographie (DC)

Dünnschichtchromatographien wurden mit DC-Fertgplatten Kieselgel 60 F 254 der Firma Fluka (Schichtdicke 0.2 mm) angefertigt. Entsprechend der aufzutragenden Proben wurden die Platten zurechtgeschnitten. Optimale Laufmittel oder Laufmittelgemische wurden individuell entwickelt. Detektion der Banden erfolgte bei Wellenlängen von 254 nm und 366 nm, sowie durch die Tauchreagenzien KMnO_4 oder Cer-Reagent. Verwendet wurde die DC zur Ermittlung von R_f -Werten.

Präparative RP-HPLC (präp. RP-HPLC)

Es wurden zwei verschiedene Systeme von präp. RP-HPLC-Anlagen genutzt.

Präp RP-HPLC-System 1: UV-Detektor (TECHLAB), einer Doppelkolbenpumpe (KRONLAB 2-400), einem manuellen single mode Injektor und einem Schreiber (Pharmacia). Das System ermöglichte präparatives Trennen von Stoffgemischen im isokratischen Modus bzw. unter manuellem Lösungsmittelwechsel.

Präp RP-HPLC System 2: Smartline System (Knauer): Pumpen: Pump 1050, UV Detektor 2500, Fraktionssammler: FC 3050 Sammlung der Peaks in Abhängigkeit des Anstiegs und der Regression des Peaks, slope 1/1)

Säule 1: Nucleodur C_{18} , 5 μm , VP 250/21

Säule 2: Luna 10 u C_{18} (2), 100A, 250 x 10.00 mm, 10 μm (Phenomenex)

Experimenteller Teil

Als Eluenten wurden, wenn nicht anders erwähnt, folgende Lösungsmittel verwendet::

Eluent A: 95% CH₃CN + 1% Ameisensäure

Eluent B: 100% CH₃CN

Die Eluenten wurden vor der Benutzung filtriert und entgast. Als Wasser wurde stets Milli-Q-Wasser genutzt. Alle, für die präparative HPLC eingesetzten, Lösungsmittel wurden in der Qualität „HPLC Gradient Grade“ verwendet.

Säulenchromatographie an Kieselgel

Säulenchromatographien wurden entweder entsprechend des Flash-Chromatographie-Verfahrens unter leichtem Überdruck durchgeführt oder unter leichtem Unterdruck, indem mittels einer Membranpumpe Unterdruck erzeugt wurde (VLC-Vakuum liquid chromatography). Als stationäre Phase wurde Kieselgel der Firma Merck (Korngröße 40 – 60 µm, 60 Å) verwendet. Säulenhöhe und Säulendicke wurde je nach Auftragsmenge variiert.

4.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma
[D ₆] DMSO	Deutero GmbH (Reinheit 99.8%)
Aceton	J. T. Baker
Acetonitril	J. T. Baker
Amberlite XAD-16	Rohm und Haas
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	Roth
Chloroform-d ₁	Deutero GmbH (Reinheit 99.8%)
Dichlormethan	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Roth
Ethanol	J. T. Baker
Ethylacetat	J. T. Baker
Kieselgel	Machery Nagel
Methanol	J. T. Baker
Methanol-d ₄	Deutero GmbH (Reinheit 99.8%)
Milli-Q-Wasser	Millipore
<i>n</i> -Butanol	J. T. Baker
<i>n</i> -Heptan	Roth

4.3 Isolierung von Naturstoffen aus epiphytischen Mikroorganismen

4.3.1 Test zur Untersuchung von biologischen Aktivitäten

Plattendiffusionstests

In den Plattendiffusionstests zur Ermittlung von Bioaktivitäten der isolierten Naturstoffe bzw. von Rohextrakten oder fraktionierten Rohextrakten wurde gegen das grampositive Bakterium *Bacillus subtilis*, das gramnegative Bakterium *Escherichia coli* K12 und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* getestet. Die Plattendiffusionstests wurden in Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Leibniz Universität Hannover von Inge Reupke durchgeführt. Für diese wurden Agarplatten mit den Testorganismen angeimpft. Zur weiteren Vorbereitung wurden

Experimenteller Teil

Filterplättchen mit je in 10 µL Methanol gelöster Probe getränkt ($c = 1 \text{ mg/mL}$). Die Filterplättchen wurden steril getrocknet und auf die angeimpften Agarplatten gelegt. Es folgte die Inkubation der Agarplatten (24 h, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12: 37 °C, *Saccharomyces cerevisiae*: RT) und die Auswertung durch Messung von Hemmhöfen. Zur Negativkontrolle wurden angeimpfte Agarplatten mit in Wasser bzw. Methanol getränkten Filterplättchen inkubiert.

Für die Plattendiffusionstests verwendete Medien waren, je nach Mikroorganismus, NB-Medium (Nutrient Broth, 8 g/L NB + 5 g/L NaCl, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12) oder HA-Medium (4 g/L Hefeextrakt + 10 g/L Malzextrakt + 4 g/L Glucose, *Saccharomyces cerevisiae*). Die Befüllung der Agarplatten erfolgte mit je einer Ober- und Unterschicht Nährmedium. Die Unterschicht bestand aus entsprechendem Medium + Agar (15 g/L), die Oberschicht enthielt entsprechendes Medium + Agar (15 g/L) + Testorganismus. Die Testorganismen *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* wurden für die Assays in Übernachtskulturen fermentiert (NB- bzw. HA-Medium). Anschließend folgten die Einstellungen der OD der Mikroorganismen für die Oberschichten (*Escherichia coli* K12 OD = 1, *Saccharomyces cerevisiae* OD = 5). Für die Oberschicht der Plattendiffusionstests gegen *Bacillus subtilis* wurden bei -20 °C gelagerte Sporen aufgetaut und in das Medium der Oberschicht gegeben. Das Gießen der Schichten erfolgte mittels Kippautomaten.

Zytotoxizitätstests

Cytotoxische Aktivitäten der Naturstoffe wurden gegen L929-Mausfibroblasten ermittelt. Die Durchführung und Auswertung der Assays erfolgte durch die Arbeitsgruppe Chemische Biologie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig. Die L929-Mausfibroblasten (DSMZ ACC2) wurden in DMEM-Medium (Lonza) mit 10% FBS (Gibco) kultiviert (37 °C, 10% CO₂-Sättigung). Die Messung der Wachstumsinhibition erfolgte in 96-Well Mikrotiterplatten. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt und jeweils 60 µL der Testsubstanz zu 120 µL Aliquoten der suspendierten Zellen ($50\,000 \text{ mL}^{-1}$) in jedes Well pipettiert. Nach fünf Tagen wurde die Inhibierung der Zellen über einen MTT-Test bestimmt.¹⁶⁰

4.3.2 Isolierung von Naturstoffen aus *Pseudomonas syringae* IBI56

Kultivierung und Gewinnung des Rohextraktes

Der bei -20 °C gelagerte Stamm (Glycerinkultur) wurde auf TSA (Trypton-Soja-Agar) ausplattiert (2 d, 30 °C). Anschließend erfolgte die kurzzeitige Lagerung bei 4 °C. Zur Anzucht des Stammes folgten 6 x 100 mL Vorkultivierung in TSB (Trypticase-Soja-Bouillon, 30 g/L) in 500 mL Erlenmeyerkolben (4 d, 27 °C, 150 upm). Die Zellen wurden geerntet und in die Hauptkultur umgesetzt. Die Hauptkultur wurde in TSB (60 g/L) + 2% Amberlite XAD-16, aufgeteilt in 2 x 3 L Erlenmeyerkolben (3 d, 27 °C, 150 upm), fermentiert. Das, der Hauptkultur zugeführte, Amberlite XAD-16 wurde vor Zugabe autoklaviert. Gegen die Schaumbildung wurden der Hauptkultur 15 µL BAYFIT (1:2 verdünnt in Ethanol, sterilfiltriert) beigelegt. Im Anschluss an die Hauptkultivierung wurde das Amberlite XAD-16 mit einem Metallsieb vom Medium separiert und mehrfach mit Wasser gewaschen.

Das gewonnene Amberlite XAD-16 wurde mit je 3 x 200 mL Methanol und 3 x 200 mL Aceton eluiert. Der erhaltene Extrakt wurde bis zur wässrigen Phase eingengt. Im Anschluss folgte eine dreifache Extraktion der erhaltenen wässrigen Phase mit je 200 mL Ethylacetat. Die organische Phase wurde unter Vakuum eingengt und ergab 785 mg Rohextrakt. Die nachfolgenden Schritte wurden unter minimalem Lichteinfluss durchgeführt. Alle erhaltenen Fraktionen wurden in lichtundurchlässigen Kolben gesammelt und gelagert.

Aufarbeitung des Rohextraktes und Isolierung von Naturstoffen

Zur Auftrennung der im Rohextrakt enthaltenen Naturstoffe wurde eine Kieselgel-Säulenchromatographie nach dem Flash-Verfahren durchgeführt. Die Höhe der Säule betrug 15 cm, der Durchmesser entsprach 3 cm. Das Säulenmaterial wurde mit dem Starteluenten gepackt und mehrfach zur Equilibrierung gespült. Der Rohextrakt wurde in 200 µL Methanol gelöst und auf die Säule aufgetragen. Je 250 mL der folgenden Lösungsmittel wurden als Eluenten eingesetzt: Eluent 1: 15% Dichlormethan/ 1% Ethanol, Eluent 2: 13% Dichlormethan/ 1% Ethanol, Eluent 3: 10% Dichlormethan/ 1% Ethanol, Eluent 4: 5% Dichlormethan, 1% Ethanol, Eluent 5: 100% Ethanol. Die Fraktionsgröße entsprach 7 mL, die Sammlung der Fraktionen erfolgte manuell. Alle erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Basierend auf den R_f -Werten wurden die

Experimenteller Teil

Fraktionen vereinigt. Es konnten elf Hauptfraktionen (AWA2A – K) erhalten werden. Die Ausbeuten der näher untersuchten Fraktionen entsprachen: AWA2A 4.2 mg, AWA2D 106.1 mg, AWA2E 40.3 mg, AWA2F 81.4 mg, AWA2G 34.4 mg, AWH2H 61.6 mg, AWA2I 46.7 mg) Die Fraktionen wurden durch analytische HPLC-UV analysiert und anschließend mittels weiterer chromatographischer Schritte gereinigt. Zusätzlich wurden Plattendiffusionstests zur Ermittlung der Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt.

Fraktion AWA2A wurde durch eine präparative RP-HPLC aufgereinigt (präp. HPLC-System 1, Säule 1). Die Probe wurde in 200 µL Methanol gelöst und vollständig injiziert. Die Trennung erfolgte isokratisch mit dem Eluentensystem: 20% CH₃CN/ 80% Wasser. Der Fluss entsprach 8 mL/min, die Detektion erfolgte bei 210 nm. Als Hauptkomponente der Fraktion wurden 1.2 mg *trans*-Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) (*t_R* 22 min) isoliert.

Fraktion AWA2D wurde in 200 µL Methanol gelöst und durch eine präparative RP-HPLC gesäubert (präp. HPLC-System 1, Säule 1). Es wurden drei, jeweils isokratische, Eluentensysteme genutzt: 0 – 20 min 5% CH₃CN/ 95% Wasser, 20 – 45 min 19% CH₃CN/ 90% Wasser, 45 – 70 min 20% CH₃CN/ 80% Wasser. Die Detektion erfolgte bei 210 nm, der Fluss entsprach 8 mL/min. Die Hauptkomponente Cyclo-Isoleucyl-Prolyl (**35**) konnte mit einer Ausbeute von 2.3 mg bei einer *t_R* von 55 min erhalten werden.

Fraktion AWA2E war stellte ein Gemisch zwei Naturstoffen dar. Zur Trennung der Substanzen wurde eine präparative RP-HPLC (präp. HPLC-System 1, Säule 1) durchgeführt. 10 mg der Probe wurden über Watte filtriert und in 50 µL des Eluenten gelöst. Die Elution erfolgte isokratisch mit dem Lösungsmittelgemisch 25% CH₃CN/ 75% Wasser. Der Fluss entsprach 1.4 mL/min bei einer Detektion von 230 nm. Mit der *t_R* 13 min wurden 2.1 mg Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**) erhalten Die zweite Struktur, Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**) besaß eine *t_R* von 18 min und konnte mit einer Ausbeute von 3.6 mg in reiner Form gewonnen werden.

35.4 mg der Fraktion AWA2F wurden in 300 µL Methanol gelöst und mittels einer präparativen RP-HPLC getrennt (präp. HPLC-System 1, Säule 1). Die Elution erfolgte mit zwei verschiedenen, jeweils isokratischen, Eluentensystemen: 0 – 30 min 5% CH₃CN/ 95% Wasser, 30 – 60 min 10% CH₃CH/ 90% Wasser. Als Fluss wurden 7

Experimenteller Teil

mL/min gewählt, die Detektion erfolgte bei 210 nm. Neben Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**) (t_R 2.4 min) konnten 2.2 mg Cyclo-Prolyl-Prolyl (**37**) mit einer t_R von 56 min isoliert werden.

15 mg der Fraktion AWA2G wurden in 200 μ L Methanol gelöst und durch eine präparative RP-HPLC getrennt (präp. HPLC-System 1, Säule 1). Es wurden zwei, jeweils isokratische, Eluentensysteme eingesetzt: 0 – 25 min 10% CH₃CN/ 90% Wasser, 25 – 55 min 60% CH₃CN/ 40% Wasser. Die Strukturen wurden bei 210 nm detektiert, der Fluss betrug 6.6 mL/min. Mit einer t_R von 38.5 min wurden 1.7 mg Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) erhalten.

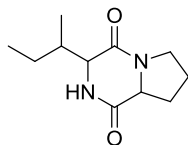
AWA2H wurde mittels einer präparativen RP-HPLC aufgereinigt (präp. HPLC-System 1, Säule 1). Für diese wurden 24 mg der Fraktion in 200 μ L Methanol gelöst und injiziert. Als Eluentensysteme wurden, jeweils isokratisch, 5% CH₃CN/ 95% Wasser (0 – 32 min) und 20% CH₃CN/ 80% Wasser (32 – 60 min) bei einem Fluss von 8 mL/min und einer Detektion bei 210 nm gewählt. Es konnten 11.5 mg Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) (t_R 40 min) und 0.8 mg Cyclo-Methionyl-Valyl (**39**) (t_R 54 min) isoliert werden.

Aus der Fraktion AWH2I konnten durch eine präparative RP—HPLC (präp. HPLC-System 1, Säule 1) 4 weitere Naturstoffe in reiner Form gewonnen werden. Die Fraktion wurde in 300 μ L Methanol gelöst, komplett injiziert und mit drei isokratischen Eluentensystemen aufgereinigt: 5% CH₃CN/ 95% Wasser (0 – 50 min), 10% CH₃CN/ 90% Wasser (50 – 90 min), 40% CH₃CN/ 60% Wasser (90 – 100 min). Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 210 nm, der Fluss entsprach 8 mL/min. Mit einer Retentionszeit von 15 min und der Ausbeute von 0.9 mg wurde Cyclo-Alanyl-Prolyl (**40**) isoliert. Eine weitere Hauptkomponente war Cyclo-Alanyl-Isoleucyl (**41**), welches mit einer Ausbeute von 1 mg und der t_R von 65 min erhalten wurde. Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) besaß als weitere Hauptkomponente eine t_R von 88 min und wurde mit der Ausbeute von 1.7 mg erhalten. Als vierte Struktur der Fraktion wurden 5.1 mg Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**) (t_R 95 min) isoliert.

Alle Reinsubstanzen wurden in Plattendiffusionstests auf Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* untersucht.

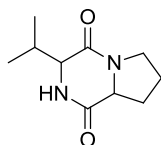
Analytische Daten der dereplizierten Naturstoffe aus *Pseudomonas syringae*
IBi56

Cyclo-Isoleucyl-Prolyl (**35**)



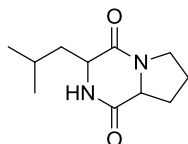
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CHLOROFORM-*d*): δ ppm 5.79 (br. s., 1 H), 4.07 (m, 1 H), 3.97 (s, 1 H), 3.65 (m, 1 H), 3.53 (m, 1 H), 2.34 (tdd, $J = 10.8, 6.4, 4.3$ Hz, 2 H), 2.05 (m, 2 H), 1.90 (m, 1 H), 1.43 (m, 1 H), 1.20 (m, 1 H), 1.05 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), 0.93 (t, $J = 7.4$ Hz, 3 H), **UV/Vis** (UV-HPLC) $\lambda_{\text{max}} = 200$ nm, **HRESIMS** m/z 211.1433 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2$, 211.1447), **t_R** (HRESIMS-HPLC): 4.63 min

Cyclo-Valyl-Prolyl (**22**)



$[\alpha]^{22}_D$ – 150 ($c = 0.8$, CHCl_3), **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 5.70 (br. s., 1H), 4.08 (t, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 3.94 (s, 1 H), 3.64 (dt, $J = 11.9$ Hz, 8.1 Hz, 1 H), 3.54 (ddd, $J = 12.0$ Hz, 8.9 Hz, 3.1 Hz, 1 H), 2.64 (septd, $J = 7.0$ Hz, 2.5 Hz, 1 H), 2.38 (m, 1 H), 2.08 (m, 2 H), 1.90 (m, 1 H), 1.90 (m, 1 H), 1.07 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 0.92 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), **UV/Vis** (HPLC-UV) $\lambda_{\text{max}} 210$ nm, **HRESIMS** m/z 197.1281 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ 197.1290, **R_F -Wert** 0.4 (Dichlormethan/Methanol 15:1)

Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**)

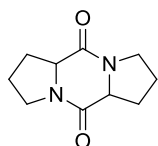


$[\alpha]^{22}_D$ + 118 ($c = 0.2$, EtOH), **$^1\text{H-NMR}$** (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 6.23 (br. s., 1 H), 4.08 (dd, $J = 9.4$ Hz, 6.9 Hz, 1 H), 3.93 (quin, $J = 4.8$ Hz, 1 H), 3.65 (m, 1 H), 2.52 (dq, $J = 9.0$ Hz, 2.6 Hz, 1 H), 2.39 (m, 1 H), 2.02 (m, 2 H), 1.89 (m, 1 H), 1.90

Experimenteller Teil

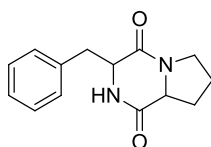
(m, 1 H), 1.78 (m, 1 H), 1.65 (m, 2 H), 0.99 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 0.95 (d, $J = 6.1$ Hz, 3 H) **UV/Vis** (HPLC-UV) $\lambda_{\max}$ 210 nm, HRESIMS m/z 211.1447 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{11}H_{19}N_2O_2$, 211.1447, t_R (HRESIMS-HPLC): 5.10 min, **R_f -Wert** 0.3 (Dichlormethan/Methanol 15:1),

Cyclo-Prolyl-Prolyl (**37**)



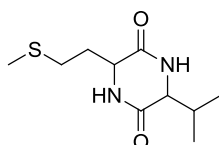
1H -NMR (400 MHz, CHLOROFORM- d): δ ppm 6.31 (br. s., 2 H), 4.09 (dt, $J = 8.6, 4.3$ Hz, 2 H), 3.67 (m, 1 H), 3.45 (m, 1 H), 2.41 (dt, $J = 10.4, 6.7$ Hz, 1 H), 2.15 (m, 3 H), 2.05 (m, 3 H), 1.89 (m, 1 H)

Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**)



1H -NMR (300 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 7.00 (m, 3 H), 7.21 (m, 2 H), 6.10 (br. s, 1 H), 4.20 (dt, $J = 8.0$ Hz, 4.0 Hz, 1 H), 3.62 (m, 1 H), 3.42 (qd, $J = 9.0$ Hz, 3.0 Hz, 1 H), 3.13 (dd, $J = 13.7$ Hz, 6.6 Hz, 1 H), 3.09 (dd, $J = 13.9$ Hz, 4.7 Hz, 1 H), 3.01 (dd, $J = 10.3$ Hz, 6.5 Hz, 1 H), 2.19 (m, 1 H), 1.94 (m, 1 H), 1.79 (m, 1 H), 1.68 (m, 1 H), ^{13}C -NMR (CHLOROFORM- d , 75 MHz) δ ppm 169.2, 164.9, 135.4, 130.0, 129.0, 127.7, 57.9, 45.7, 40.7, 29.1, 21.8, **UV/Vis** (HPLC-UV) $\lambda_{\max}$ 234 nm, 288 nm, **HRESIMS** m/z 245.1283 $[M+H]^+$, berechnet für $C_{14}H_{17}N_2O_2$, 245.1290, t_R (HRESIMS-HPLC): 6.80 min, **R_f -Wert** 0.4 (Dichlormethan/Methanol 15:1)

Cyclo-Methionyl-Valyl (**39**)

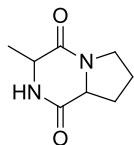


1H -NMR (CHLOROFORM- d , 400 MHz): δ ppm 6.37 (br. s., 1 H), 5.94 (br. s., 1 H), 4.20 (sept, $J = 2.0$ Hz, 1 H), 3.92 (m, 1 H), 2.69 (m, 2 H), 2.45 (dq, $J = 7.12$ Hz,

Experimenteller Teil

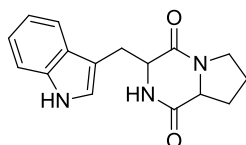
3.6 Hz, 1 H), 2.35 (dquin, $J = 7.1$ Hz, 4.1 Hz, 1 H), 2.13 (s, 3 H), 2.01 (dsept, $J = 8.1$ Hz, 6.6 Hz, 1 H), 1.05 (d, $J = 7.1$ Hz, 3 H), 0.96 (d, $J = 6.6$ Hz)

Cyclo-Alanyl-Prolyl (**40**)



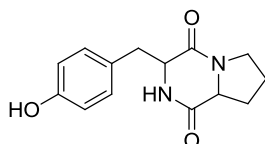
$^1\text{H-NMR}$ (CHLOROFORM- d , 400 MHz): δ ppm 4.12 (m, 1 H), 4.03 (m, 1 H), 3.66 (m, 1 H), 3.54 (m, 1 H), 2.43 (m, 1 H), 2.06 (m, 2 H), 1.92 (m, 1 H), 1.51 (m, 3 H)

Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**)



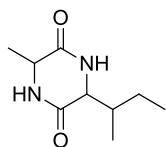
$^1\text{H-NMR}$ (METHANOL- d_4 , 300 MHz): δ ppm 7.50 (d, $J = 8.1$ Hz 1 H), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz 1 H), 7.1 (m, 1 H), 7.04 (s, 1 H), 7.01 (m, 1H), 4.19 (m, 1 H), 4.05 (m, 1 H), 3.44 (m, 12H), 3.1 (d, $J = 14.5$ Hz, 4.7 Hz, 1 H), 2.99 (m, 1 H), 2.21 (m, 1 H), 1.86 (m, 1 H), 1.74 (m, 1 H), 1.54 (m, 1 H), **UV/Vis** (HPLC-UV) λ_{max} 219 nm, 280 nm, **HRESIMS** m/z 284.1390 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$, 284.1399, t_{R} (HRESIMS-HPLC): 6.20 min

Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**)



$^1\text{H-NMR}$ (METHANOL- d_4 , 600 MHz): δ ppm 6.99 (d, $J = 8.4$ Hz 2 H), 6.71 (d, $J = 8.8$ Hz 2 H), 4.23 (m, 1 H), 3.66 (ddd, $J = 9.9$ Hz, 4.4 Hz, 1.1 Hz 1 H), 3.20 (m, 1 H), 2.83 (dd, $J = 13.9$, 4.8 Hz, 1 H), 1.64 (m, 2 H), 1.44 (m, 1 H), 0.90 (ddd, $J = 13.7$, 9.4, 4.4 Hz, 1 H), 0.75 (dd, $J = 11.0$, 6.6 Hz, 6 H), **$^{13}\text{C-NMR}$** (CHLOROFORM- d , 100 MHz) δ ppm 169.8, 165.4, 155.8, 130.5, 127.0, 116.3, 59.3, 56.4, 45.6, 36.1, 28.5, 22.6, **UV/Vis** (HPLC-UV) λ_{max} 200 nm, 220 nm, 280 nm, **HRESIMS** m/z 261.1231 $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$, 261.1239, t_{R} (HRESIMS-HPLC): 2.20 min

Cyclo-Alanyl-Isoleucyl (**41**)



¹H-NMR (CHLOROFORM-*d*, 300 MHz): δ ppm 6.11 (br. s., 1 H), 5.97 (br. s., 1 H), 4.12 (dt, $J = 7.0, 1.7$ Hz, 1 H), 3.97 (m, 1 H), 2.13 (m, 1 H), 1.65 (m, 2 H), 1.04 (d, $J = 7.0$ Hz, 3 H), 0.94 t, $J = 7.4$ Hz, 6 H)

4.3.3 Isolierung von Naturstoffen aus *Sporobolomyces* sp. H16

Kultivierung und Gewinnung des Rohextraktes

Zur Anzucht der Hefe wurde diese in zwei Vorkulturen und einer Hauptkultur fermentiert. Als Fermentationsmedium wurde für alle drei Kulturen HA-Medium verwendet (4 g/ L Hefeextrakt, 10 g/ L Malzextrakt, 4 g/ L Glucose). Für die erste Vorkultivierung wurden 3 x 20 mL HA-Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben mit einer Impföse angeimpft und 3 Tage inkubiert (27 °C, 150 upm). Im Anschluss wurden für die zweite Vorkultur je 15 mL der drei Anzuchten der ersten Vorkultur in je 100 mL HA-Medium (in 500 mL Erlenmeyerkolben) umgesetzt und inkubiert (3 x 100 mL, 4 d, 27 °C, 150 upm). Die Hauptkultivierung erfolgte im 3 x 1 L Maßstab. Dazu wurden jeweils 100 mL der Anzuchten der zweiten Vorkultur in 1 L Hauptkultur (3 L Erlenmeyerkolben) umgesetzt und inkubiert (4 d, 27 °C, 150 upm). Dem HA-Medium der Hauptkultur wurden 2% autoklaviertes Amberlite XAD-16 zugesetzt. Im Anschluss an die Fermentation wurde das Amberlite XAD-16 vom Medium durch ein Metallsieb separiert und mehrfach mit Wasser gewaschen.

Bis zur Weiterverarbeitung des Amberlite XAD-16 wurde dieses unter Lichtabschluss bei 4 °C gelagert. Zur Gewinnung der adsorbierten Sekundärmetabolite wurde das Amberlite XAD-16 in eine Fritte überführt und mehrfach mit Methanol und Aceton eluiert (3 x 400 mL Methanol, 2 x 200 mL Aceton). Der, durch die Elution des Amberlite XAD-16, erhaltene Extrakt wurde bis zur wässrigen Phase eingeeengt. Im Anschluss folgte die vierfache Extraktion der wässrigen Phase mit je 200 mL Ethylacetat. Die gewonnene organische Phase wurde unter Vakuum abdestilliert und führte zu 166 mg Rohextrakt. Der Rohextrakt wurde in Plattendiffusionstests gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* getestet.

Aufarbeitung des Rohextraktes und Isolierung von Naturstoffen

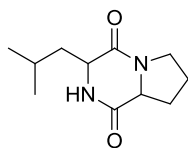
Der gesamte, durch die Amberlite XAD-16-Elution gewonnene, Rohextrakt wurde durch eine Säulenchromatographie an Kieselgel (Höhe 13 cm, Durchmesser 2 cm) entsprechend des Flash-Verfahrens aufgearbeitet. Das Kieselgel wurde mit dem Starteluenten (19% Dichlormethan/ 1% Methanol) gepackt und mehrfach bis zur Equilibrierung gespült. Der Rohextrakt wurde vollständig in 0.5 mL des Starteluenten gelöst und auf die Säule aufgetragen. Je 200 mL folgender Eluenten mit zunehmender Polarität wurden verwendet: Eluent 1: 19% Dichlormethan/1% Methanol, Eluent 2: 14% Dichlormethan/ 1% Methanol, Eluent 3: 9% Dichlormethan/ 1% Methanol, Eluent 4: 4% Dichlormethan/ 1% Methanol. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte manuell, die Fraktionsgrößen entsprachen etwa 10 mL. Insgesamt wurden 85 Fraktionen erhalten. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels DC analysiert, entsprechend den R_f -Werten der enthaltenden Hauptkomponenten vereint und unter Vakuum abdestilliert. Anschließend wurden ausgewählte, vereinigte Fraktionen durch verschiedene chromatographische Schritte weiter aufgereinigt. Folgende Fraktionen mit entsprechenden Ausbeuten wurden durch Vereinen der Fraktionen nach Flash-Chromatographie erhalten und weiter untersucht: AWD2A (Fraktion 4, 24.2 mg), AWD2B (Fraktion 5, 12.0 mg), AWD2C (Fraktionen 6 – 8, 24.1 mg), AWD2D (Fraktionen 9 – 50, 38.6 mg), AWD2E (Fraktionen 50 – 69, 21.1 mg), AWD2F (Fraktionen 70 – 83, 45.3 mg).

Fraktion AWD2A (R_f -Werte der Hauptkomponenten: 0.6 und 0.2 (Dichlormethan/Methanol 15:1) wurde in 50 μ L Methanol gelöst und durch eine präparative RP-HPLC (präp. HPLC-System 2, Säule 1) getrennt (Programm: 0 min: 5 % B (Fluss 6 mL/min), 10 min: 10 % B (Fluss 6 mL/min), 15 min: 20 % B (Fluss 7 mL/min), 35 min: 40% B (Fluss 8 mL/min), 50 min: 100% B (Fluss 10 mL/min) λ 210 nm). Die beiden Hauptkomponenten der Fraktion, Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**) (t_R 22.3 min, Ausbeute 1.8 mg) und N-Acetylphenethylamin (**44**) (t_R 32.8 min, Ausbeute 0.8 mg) konnten isoliert werden.

Fraktion AWD2B wurde ebenfalls in 50 μ L Methanol gelöst und durch eine analoge präparative HPLC zu AWD2A getrennt (präp. HPLC-System 2, Säule 1). Neben der Hauptkomponente N-Acetyltryptamin (**43**) (t_R 36.8 min, Ausbeute 0.6 mg) konnten zwei Nebenkomponten isoliert werden. Es handelte sich um 0.6 mg Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**) (t_R 32.2 min) und 0.5 mg Tryptophol (**45**) (t_R 38.1 min).

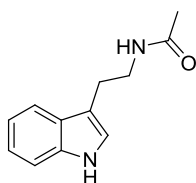
Analytische Daten der dereplizierten Naturstoffe aus *Sporobolomyces* sp. H16

Cyclo-Leucyl-Prolyl (**36**)



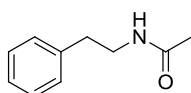
¹H-NMR (600 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 4.26 (dt, $J = 7.3$ Hz, 1.5 Hz 1 H), 4.13 (m, 1 H), 3.51 (m, 2 H), 2.30 (m, 1 H), 2.03 (m, 2 H), 1.91 (m, 3 H), 1.52 (m, 1 H), 0.96 (dd, $J = 6.4, 3.5$ Hz, 6 H)

N-Acetyltryptamin (**43**)



¹H-NMR (600 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.55 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H), 7.32 (d, $J = 8.1$ Hz, 1 H), 7.08 (m, 2 H), 6.99 (m, 1 H), 3.47 (m, 2 H), 2.94 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H), 1.91 (s, 3 H), **HRESIMS** m/z 203.1180 $[M+H]^+$ (berechnet für C₁₂H₁₅N₂O 203.1184), t_R (HPLC-HRESIMS): 8.03 min

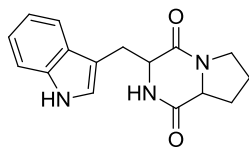
N-Acetylphenethylamin (**44**)



¹H-NMR (600 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.27 (m, 2 H), 7.19 (m, 3 H), 3.38 (t, $J = 7.5$ Hz, 3 H), 2.78 (t, $J = 7.3$ Hz, 2 H), 1.90 (s, 3 H), **HRESIMS** m/z 164.1071 $[M+H]^+$ (berechnet für C₁₀H₁₄NO 164.1075, t_R (HPLC-HRESIMS): 7.23 min

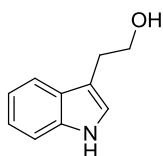
Experimenteller Teil

Cyclo-Tryptophyl-Prolyl (**42**)



¹H-NMR (600 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.58 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.33 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.09 (m, 2 H), 7.01 (m, 1 H), 4.41 (td, *J* = 5.1 Hz, 1.8 Hz, 1 H), 4.01 (ddd, *J* = 10.8, 6.4, 1.8 Hz, 1 H), 3.48 (td, *J* = 11.7 Hz, 8.2 Hz, 1 H), 3.28 (m, 1 H), 1.98 (m, 2 H), 1.70 (m, 2 H), 1.51 (m, 1 H)

Tryptophol (**45**)



¹H-NMR (600 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1 H), 7.07 (m, 2 H), 6.99 (m, 1 H), 3.81 (m, 2 H), 2.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H),
HRESIMS *m/z* 162.0921 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₀H₁₂NO) 162.0919

4.3.4 Isolierung von Naturstoffen aus *Cladosporium herbarum* IPk15

Kultivierung und Gewinnung des Rohextraktes

Die Anzucht von *Cladosporium hebarum* IPK15 erfolgte in zwei Vorkulturen und einer Hauptkultur. Der bei – 20 °C gelagerte Stamm wurde mit einer Impföse auf PDA (Potato Dextrose Agar, 39 g/ L + 5 g Agar) ausgestrichen und 7 d bei RT inkubiert. Für die erste Vorkultur wurde mit einer Impföse Zellmaterial der PDA-Agarplatte in 3 x 20 mL PDB (Potato Dextrose Broth, 26.7 g/ L) in jeweils 100 mL Erlenmeyerkolben überführt und inkubiert (4 d, 18 °C, 150 upm). Im Anschluss wurden je 15 mL der drei Anzuchten in 100 mL PDB umgesetzt und inkubiert (10 d, 18 °C, 150 upm). Die 3 x 100 mL der zweiten Vorkultivierungen wurden für die Hauptkultivierung jeweils in 1 L PDB + 2% autoklaviertes Amberlite XAD-16 umgesetzt und 4 d inkubiert (18 °C, 150 upm). Anschließend wurde das Amberlite XAD-16 mit einem Metallsieb vom Medium separiert und mehrfach mit Wasser gewaschen. Das Amberlite XAD-16 wurde in eine Fritte überführt und mit 3 x 500 mL Methanol und 2 x 300 mL Aceton eluiert. Der gewonnene Extrakt wurde unter Vakuum bis zu wässrigen Phase eingeeengt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit Ethylacetat extrahiert (5 x 300 mL). Die

gewonnene organische Phase wurde unter Vakuum abdestilliert. Es wurden 192 mg Rohextrakt erhalten. Die verbleibende wässrige Phase der Ethylacetat-Extraktion wurde nochmals mit 3 x 150 mL *n*-Butanol extrahiert. Nach dem Abdestillieren der organischen Phase konnten 583.4 mg *n*-Butanol-Extrakt erhalten werden.

Aufarbeitung des Rohextraktes und Isolierung von Naturstoffen

Zur Auftrennung des Rohextraktes wurde eine Unterdruck-Säulenchromatographie an Kieselgel durchgeführt (Höhe 8 cm, Durchmesser 7 cm). Das Säulenmaterial wurde mit dem Starteluenten (50% Ethylacetat/ 50% Heptan) gepackt und mehrfach zur Equilibrierung gespült. Der Rohextrakt wurde in etwa 2 mL des Starteluenten gelöst und auf die Säule aufgetragen. Folgende Eluenten und Eluentengemische wurden zur Fraktionengewinnung mit entsprechenden Ausbeuten verwendet: 50% Ethylacetat/ 50% Heptan (AWF2A, 57.6 mg), 100% Ethylacetat (AWF2B, 38.8 mg), 75% Ethylacetat/ 25% Methanol (AWF2C, 61.2 mg), 25% Ethylacetat/ 75% Methanol (AWF2D, 17.3 mg), 100% Methanol (AWF2E, 8.9 mg).

Die, durch die Säulenchromatographie erhaltenen, Fraktionen sowie der Rohextrakt und der *n*-Butanol-Extrakt wurden auf Bioaktivität gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* K12 und *Saccharomyces cerevisiae* in Plattendiffusionstests untersucht.

Reinsubstanzen wurden durch verschiedene weitere chromatographische Aufreinigungen ausgewählter Fraktionen erhalten. Fraktion AWF2A wurde mittels einer präparativen RP-HPLC (präp. HPLC-System 2, Säule 1) getrennt. Die Probe wurde in 800 µL Methanol + 3 Tropfen Dichlormethan gelöst und in vier Durchläufen mit folgendem Programm: 0 min: 45 % B (Fluss 8 mL/min), 5 min: 45 % B (Fluss 8 mL/min), 15 min: 69 % B (Fluss 8.7 mL/min) λ 230 nm gereinigt. Es konnten 1.2 mg Benzoesäure (**49**) (t_R 11.8 min) und 0.9 mg Zimtsäure (**50**) (t_R 13.8 min) isoliert werden.

Aus Fraktion AWF2B konnten weitere Reinsubstanzen durch präparative RP-HPLC erhalten werden (präp. HPLC-System 2, Säule 1). Dafür wurde die Probe in 1.5 mL Methanol gelöst und in acht Durchläufen einer präparativen HPLC mit folgendem Programm getrennt: 0 min: 5 % B (Fluss 6 mL/min), 5 min: 5 % B (Fluss 6 mL/min), 36 min: 79% B (Fluss 9.1 mL/min), λ 220 nm. Es konnten 2.7 mg 3,4-Dihydroxybenzoesäure (**46**) (t_R 20.1 min), 6.1 mg *p*-Hydroxybenzoesäure (**48**) (t_R

Experimenteller Teil

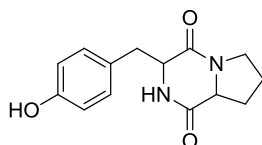
22.9 min) und 4.4 mg *p*-Coumarsäure (**47**) (t_R 25.5 min) isoliert werden. Eine Fraktion (AWF2B9, t_R 33.5 min, 2.2 mg) zeigte starke Verunreinigungen, welche durch eine weitere präp. HPLC abgetrennt wurden (präp. HPLC-System 2, Säule 1). Die Probe wurde in 160 μ L Methanol gelöst und in zwei Durchläufen gereinigt. Als Methode wurde folgendes optimiertes Programm angewandt: 0 min: 70% B (Fluss 8 mL/min), 5 min: 70% B (Fluss 8 mL/min), 15 min: 80% B (Fluss 9 mL/min), λ 255 nm. Mit der Retentionszeit t_R 8.5 min konnten 0.6 mg reines Cladosporol C (**51**) erhalten werden.

Aus Fraktion AWF3 konnten zwei weitere Reinsubstanzen isoliert werden. Dazu wurde eine präparative RP-HPLC durchgeführt (präp. HPLC-System 2, Säule 1). Die Probe wurde in 1.5 mL Methanol gelöst und in zehn Durchläufen mit folgendem Programm aufgetrennt: 0 min: 5% B (Fluss 6 mL/min), 5 min: 5% B (Fluss 6 mL/min), 40 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), 50 min: 100%B (Fluss 10 mL/min) λ 220 nm. Es wurden 3.8 mg der Hauptkomponente Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) (t_R 19.2 min) und 2.5 mg der Nebenkompente Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) (t_R 29.4 min) gewonnen.

Analytische Daten der dereplizierten Naturstoffe aus *Cladosporium herbarum*

IPk15

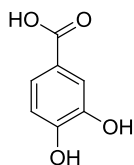
Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 2 H), 6.70 (d, J = 8.5 Hz 2 H), 4.36 (td, J = 4.8, 1.9 Hz, 1 H), 4.05 (ddd, J = 10.9, 6.3, 1.8 Hz, 1 H), 3.56 (td, J = 11.9 Hz, 8.4 Hz, 1 H), 3.36 (m, 1 H), 3.09 (dd, J = 14.2, 5.2, 1 H), 3.03 (dd, J = 14.2, 4.7, 1 H), 2.10 (dtd, J = 11.5, 6.0, 6.0, 4.3 Hz, 1 H), 1.81 (m, 2 H), 1.23 (m, 1 H), **UV/Vis** (HPLC-UV) λ_{max} 216 nm, 278 nm, **EIMS** m/z 261.87 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R (HPLC-EIMS) 6.5 min

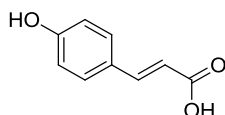
Experimenteller Teil

3,4-Dihydroxybenzoesäure (**46**)



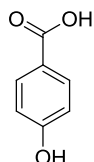
¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.43 (s, 1 H), 7.42 (m, 1 H), 6.79 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), **¹³C-NMR** (176 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 170.4, 151.5, 146.1, 123.8, 123.3, 117.7, 115.7, **UV/Vis** (HPLC-UV) $\lambda_{\max}$ 200 nm, **EIMS** *m/z* 155.04 [M+H]⁺, *t_R* (HPLC-ESIMS) 3.6 min

p-Coumarsäure (**47**)



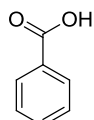
¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.59 (d, *J* = 15.7 Hz 1 H), 7.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 6.80 (d, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 6.28 (d, *J* = 15.9 Hz, 1 H), **UV/Vis** (HPLC-UV) $\lambda_{\max}$ 218 nm, **EIMS** *m/z* 164.94 [M+H]⁺, *t_R* (HPLC-ESIMS) 4.9 min

p-Hydroxybenzoesäure (**48**)



¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.88 (d, *J* = 8.6 Hz, 2 H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2 H)

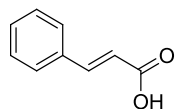
Benzoessäure (**49**)



¹H-NMR (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 8.11 (d, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 7.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 1 H), 7.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 2 H)

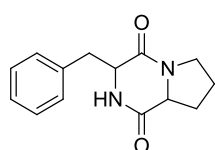
Experimenteller Teil

Zimtsäure (**50**)



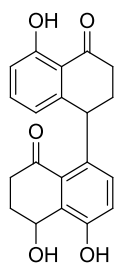
¹H-NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 7.77 (d, J = 16.0 Hz, 1 H), 7.56 (m, 2 H), 7.41 (m, 3 H), 6.46 (d, J = 16.0 Hz, 1 H), **EIMS** m/z 148.92 $[M+H]^+$, t_R (HPLC-ESIMS) 13.5 min

Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**)



¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.29 (m, 2 H), 7.23 (m, 3 H), 4.45 (dq, J = 5.0 Hz, 1.9 Hz, 1 H), 4.07 (ddd, J = 10.8, 6.4, 1.9 Hz, 1 H), 3.54 (dt, J = 12.0, 8.4 Hz, 1 H), 3.37 (ddd, J = 12.2, 7.7, 5.1 Hz, 1 H), 3.19 (dd, J = 14.2 Hz, 5.2 Hz, 1 H), 3.15 (dd, J = 14.2 Hz, 4.7 Hz, 1 H), 2.09 (m, 1 H), 1.81 (m, 2 H), 1.22 (m, 1 H), **EIMS** m/z 245.09 $[M+H]^+$, t_R (HPLC-ESIMS) 4.8 min

Cladosporol C (**51**)



¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.32 (t, J = 8.0 Hz, 1 H), 6.95 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 6.81 (d, J = 8.4 Hz, 1 H), 6.76 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 6.36 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 5.49 (m, 1 H), 5.38 (t, J = 3.9 Hz, 1 H), 3.04 (m, 1 H), 2.65 (m, 2 H), 2.56 (d, J = 16.8 Hz, 1 H), 2.31 (m, 1 H), 2.26 (m, 2 H), 2.21 (m, 1 H), **¹³C-NMR** (175 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 207.0, 202.9, 163.8, 155.4, 150.6, 137.5, 137.2, 133.0, 132.6, 132.1, 121.2, 121.0, 118.7, 116.2, 63.1, 41.6, 37.9, 36.4, 31.8, 31.1, **EIMS** m/z 338.95 $[M+H]^+$, t_R (HPLC-EIMS) 4.7 min

4.3.5 Isolierung von Naturstoffen aus *Aureobasidium pullulans* ISch31

Identifikation des Stammes

Die Identifikation des Stammes *Aureobasidium pullulans* erfolgte in Kooperation mit dem Arbeitskreis Mikrobielle Wirkstoffe am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig.

Die DNA-Isolierung erfolgte aus, auf Potato Dextrose Broth gewachsener Kultur des Stammes. Es wurden etwa 60 mg Biomaterial in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß, gepackt mit Precellys® Ceramic Beads (1.4 mm) überführt. Die DNA-Extraktion wurde mit dem BIO BASIC INC. EZ-10 Spin column genomic DNA minipreps KIT entsprechend der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Precellys® 24 Homogenizer bei einer Geschwindigkeit von 6.0 m/s für 2 x 40 s. Die ITS-Regionen (ITS1, 5.8S und ITS2 rRNA) wurden unter der Verwendung der Primer ITS4¹⁶¹ und ITS1F¹⁶² amplifiziert. Der PCR-Reaktionsmix enthielt 2 µL template DNA, je 0.5 µL forward und reversed Primer (10 pmol), 12.5 µL Jump Start Ready Mix (JSR) und 9.5 µL destilliertes Wasser. Die Amplifikation wurde mit einem flexlid Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt. Folgendes Amplifikations-Programm wurde angewandt: Initiale Denaturierung bei 94 °C (2 min), 34 Zyklen: Denaturierung bei 94 °C für je 30 s, Annealing bei 52 °C (30 s), Elongation 72 °C (1 min), Elongation bei 72 °C (10 min). Die Amplifikation der SSU-Gene (Small Subunit rRNA) erfolgte mit folgendem Programm: Initiale Denaturierung bei 96 °C (2 min), 34 Cyclen: Denaturierung bei 96 °C für je 20 s, Annealing bei 50 °C (20 s), Elongation 72 °C (1 min), Elongation bei 72 °C (5 min). Als Primer wurden die universellen eukaryotischen Primer NS1 und NS8 eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden bei 10 °C gelagert und anschließend mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt (0.8 % Agarose in TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA Puffer) für 30 min bei 100 V). Die Detektion der Banden erfolgte durch Midori Green und einer Geldokumentationskammer. Entsprechend der Vorschrift des Herstellers wurde das BIO BASIC INC. EZ-10 spin column PCR Produkt Purification Kit zur Aufreinigung der amplifizierten DNA genutzt. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zur Sanger-Sequenzierung an den Sequenzierservice des DSMZ gegeben. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software Geneious (Biomatters) analysiert und mit dem BLAST-Algorithmus der Online Datenbank des NCBI verglichen

Kultivierung und Gewinnung der Rohextrakte

Das Screening von *Aureobasidium pullulans* ISch31 erfolgte mittels einem Präscreening und zwei Fermentationsansätzen.

Die Fermentation der verschiedenen Screeningansätze erfolgte bei vergleichbaren Bedingungen. Als Anzuchtmedium wurde Potato Dextrose Broth (26.5 g/L) genutzt. Für die 3 L Kulturen des Präscreenings und des ersten Fermentationsansatzes wurden je eine 20 mL einer ersten Vorkultur in PDB angesetzt (3d, 18 °C, 150 rpm). Die zweite Vorkultur erfolgte im 3 x 100 mL Maßstab in Potato Dextrose Broth. Dafür wurde jeweils 1 mL Zellsuspension der 1. Vorkultur in die Ansätze der zweiten Vorkultur transferiert und inkubiert (3d, 18 °C, 150 rpm). Für die Hauptkultivierung wurden je 100 mL Zellsuspension der zweiten Vorkultur in 3 x 1L Potato Dextrose Broth mit Zusatz von 2% Amberlite XAD 16 transferiert. Die Ansätze der Hauptkultivierung wurden 4 d bei 18 °C und 150 upm inkubiert. Anschließend wurde das Amberlite XAD-16 durch ein Metallsieb vom Medium separiert und 3 x mit Wasser gewaschen. Die Lagerung des Amberlite XAD-16 erfolgte bis zur Aufarbeitung bei 4 °C.

Für den zweiten Fermentationsansatz erfolgte ein Upscaling der Fermentation auf 6 L Hauptkultivierung. Dauer und Durchführung erfolgten analog, die Angaben von Volumina und Mengen wurden verdoppelt

Das, der Hauptkultur zugesetzte Amberlite XAD 16, wurde vor der Zugabe autoklaviert. Während der Fermentationen gab es jeweils Sterilkontrollen um Kontaminationen auszuschließen.

Zur Gewinnung des Rohextraktes wurde das Amberlite XAD-16 bis zur Entfärbung mit Dichlormethan, Methanol und Aceton eluiert. Die verschiedenen Eluate wurden vereint und bis zur wässrigen Phase abdestilliert. Die wässrige Phase wurde dann mit adäquaten Volumina Ethylacetat bis zur Farblosigkeit des organischen Lösungsmittels extrahiert. Das Lösungsmittel der organischen Phase wurde anschließend unter Vakuum eingengt. Die weiteren chromatographischen Trennungen zur Aufreinigung der Strukturen wurden individuell gewählt.

Prä-Screening *Aureobasidium pullulans* Isch31

Der Rohextrakt (806 mg) wurde durch eine Unterdruck-Säulenchromatographie an Kieselgel in neun Fraktionen getrennt (Höhe 8 cm, Durchmesser 7 cm). Das Kieselgel wurde mit dem Starteluenten gepackt und mehrfach zur Equilibrierung gespült. Folgende Eluenten und Eluentengemische mit zunehmender Polarität wurden zur Gewinnung der Fraktionen mit entsprechenden Ausbeuten verwendet: 100 % Heptan (AWE2A, 11.2 mg), 20 % Ethylacetat/ 80 % Heptan (AWE2B, 10.4 mg), 50 % Ethylacetat/ 80 % Heptan (AWE2C, 25.9 mg), 80 % Ethylacetat/ 20 % Heptan (AWE2D, 55.1 mg), 100% Ethylacetat (AWE2E, 25.3 mg), 25 % Methanol/ 75 % Ethylacetat (AWE2F, 348 mg), 50 % Methanol/ 50 % Ethylacetat (AWE2G, 70.8 mg), 75 % Methanol/ 25 % Ethylacetat (AWE2H, 62.1 mg), 100 % Methanol (AWE2I, 11.2 mg). Die Fraktionen AWE2B und AWE2C enthielten als Hauptkomponente nahezu reines 2-Phenylethanol (**52**). Fraktion AWE2E enthielt aufgereinigtes Tryptophol (**45**). Alle Fraktionen wurden Bioaktivitätstests unterzogen. Als Methode wurde der Plattendiffusionstest angewendet.

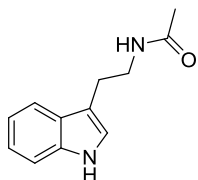
Zur weiteren Aufreinigung einzelner Metabolite wurden weitere chromatographische Methoden angewendet. AWE2F wurde durch eine RP-SPE an einer vorgepackten (500 mg) 8 ml Strata C18-U Säule (55µm, 70 Å, 500 mg) aufgereinigt. Die Fraktion wurde in fünf analogen Durchläufen getrennt. Zur Equilibrierung des Packungsmaterials wurde mit fünf Säulenvolumina Starteluenten (20 % Acetonitril/ 80 % Wasser) gespült. Die Probe wurde in Methanol gelöst und in jeweils gleichen Volumina (etwa 200 µl) je SPE auf die Säule aufgetragen. Der Extrakt wurde mit dem Starteluenten, bestehend aus 20 % Acetonitril/ 80 % Wasser, eluiert. Die erhaltene Fraktion AWE2F1 ergab 81 mg. Der zweite Eluent bestand aus dem Gemisch 40 % Acetonitril/ 60 % Wasser und ergab 114 mg Fraktion AWE2F2. AWE2F1 wurde mittels einer präparativen RP-HPLC (präp. HPLC-System 2, Säule 1, Eluentensystem 1) mit dem Programm: 0 min: 100 % A (Fluss 6 ml / min), 15 min: 40 % B (Fluss 8 ml / min), 30 min: 70 % B (Fluss 8 ml / min), λ 287 nm weiter aufgetrennt. Die Probe wurde in 800 µl Methanol gelöst und in vier Läufen getrennt. Drei Fraktionen konnten separiert werden. Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**) ergab 6.1 mg, von N-Acetyl-Tryptamin wurden 0.9 mg und von Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**) 0.6 mg erhalten. Die Fraktion AWE2F2 wurde mithilfe einer präparativen RP-HPLC (Säule 1, Eluentensystem 1) mit dem Programm 0 min: 100 % A (Fluss 6 ml / min), 15 min: 40 % B (Fluss 8 ml / min),

Experimenteller Teil

35 min: 70 % B (Fluss 8 ml / min), 45 min: 100 % B (Fluss 10 ml / min), λ 350 nm aufgereinigt. Die Probe wurde dafür in 600 μ l Methanol gelöst und in drei Läufen getrennt. Es wurden 4.3 mg Fraktion AWE2F2D (t_R 42.8 min) erhalten. Diese wurde in einer weiteren präparativen RP-HPLC und dem Programm 0 min: 60 % B (Fluss 8 ml/ min), 10 min: 70 % B (Fluss 8 ml/ min), 30 min: 100 % B (Fluss 10 ml/ min), λ 350 nm aufgereinigt. Die Probe wurde in 200 μ l Methanol gelöst und in einem Lauf getrennt. Die erhaltene Fraktion entsprach aufgereinigtem Desmethylpretenellin A (**53**) und ergab 1.4 mg (t_R 20.0 min).

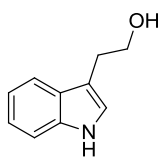
Charakterisierung der im Präscreening von *Aureobasidium pullulans* ISch31 identifizierten Strukturen

N-Acetyltryptamin (**43**)



$^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 8.02 (br. s., NH), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 1 H), 7.22 (m, 1 H), 7.14 (m, 1 H), 7.06 (d, J = 1.9 Hz, 1 H), 5.49 (br. s., NH), 3.61 (q, J = 6.5 Hz, 2 H), 2.99 (t, J = 6.7 Hz, 2 H), 1.93 (s, 3 H),
EIMS m/z 203.98 [$M+H$] $^+$, t_R (HPLC-EIMS) 6.0 min

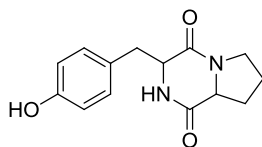
Tryptophol (**45**)



$^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 8.06 (br. s., 1 H), 7.63 (dd, J = 8.0, 0.7 Hz, 1 H), 7.39 (d, J = 8.1 Hz, 1 H), 7.22 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1 H), 7.13 (td, J = 7.5, 1.1 Hz, 1 H), 7.11 (d, J = 2.4, 1 H), 3.92 (t, J = 6.3 Hz, 2 H), 3.05 (td, J = 6.3, 0.7 Hz, 2 H),

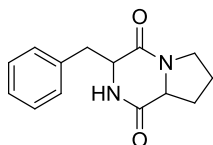
Experimenteller Teil

Cyclo-Tyrosyl-Prolyl (**38**)



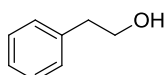
¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.04 (d, *J* = 8.5, 2 H), 6.67 (d, *J* = 8.5, 2 H), 4.36 (td, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 1 H), 4.05 (ddd, *J* = 10.9, 6.3, 1.8 Hz, 1 H), 3.55 (dt, *J* = 11.9, 8.3 Hz, 1 H), 3.35 (m, 1 H), 3.09 (dd, *J* = 14.2, 5.2 Hz, 1 H), 3.02 (dd, *J* = 14.2, 4.6 Hz, 1 H), 2.10 (ddd, *J* = 11.4, 6.1, 1.6 Hz, 1 H), 1.81 (m, 2 H), 1.24 (m, 1 H), **¹³C-NMR** (125 MHz, METHANOL-*d*₄) δ = 170.8, 166.9, 157.7, 132.1, 127.6, 116.2, 60.1, 57.9, 45.9, 37.7, 29.4, 22.7, **UV/Vis** (HPLC-UV) λ_{max} 200 nm, 222 nm, 275 nm, **EIMS** *m/z* 261.04 [M+H]⁺, *t_R* (HPLC-EIMS) 1.7 min

Cyclo-Phenylalanyl-Prolyl (**34**)



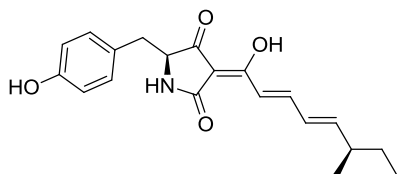
ESIMS *m/z* 245.04 [M+H]⁺, *t_R* (HPLC-ESIMS) 4.8 min

2-Phenylethanol (**52**)



¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₄): δ ppm 7.24 (m, 5H), 3.74 (t, *J* = 7.1, 2 H), 2.81 (t, *J* = 7.1, 2 H)

Desmethylpretenellin A (**53**)



$[\alpha]_D^{22} + 34$ ($c = 0.1$, CHCl_3), $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 7.49 (dd, $J = 15.3, 11.2$ Hz, 1 H), 7.13 (d, $J = 15.3$ Hz, 1 H), 7.07 (d, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 6.79 (d, $J = 7.6$ Hz, 2 H), 6.35 (dd, $J = 15.3, 11.2$ Hz, 1 H), 6.20 (dd, $J = 15.1, 7.7$ Hz, 1 H), 5.75 (br. s., 1 H), 3.97 (dd, $J = 9.9, 3.4$ Hz, 1 H), 3.22 (dd, $J = 14.0, 3.4$ Hz, 1 H), 2.60 (dd, $J = 14.0, 10.1$ Hz, 1 H), 2.25 (m, 1 H), 1.41 (m, 2 H), 1.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 0.89 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 194.2, 175.4, 175.4, 154.9, 154.1, 146.4, 130.4, 128.6, 128.2, 119.6, 115.9, 99.8, 63.6, 39.3, 37.7, 29.4, 19.5, 11.9, **UV/Vis** (Methanol) λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 208 nm (4.73), 251 nm (3.76), 284 nm (3.83), 337 nm (3.79), **HRESIMS** m/z 342.1705 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_4$, 342.1705), **UV/Vis** (HPLC-UV) λ_{max} 220 nm, 358 nm, **EIMS** m/z 342.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$, t_R (HPLC-ESIMS) 11.8 min, R_f -Wert: 0.3 (90% Dichlormethan/10% Methanol)

Aufreinigung von Reinsubstanzen der ersten Fermentation des Stammes *Aureobasidium pullulans* ISch31

Der Rohextrakt (859 mg) wurde durch eine Unterdruck-Säulenchromatographie an Kieselgel (Höhe: 9 cm, Breite: 5cm) in fünf Fraktionen getrennt. Das Kieselgel wurde mit dem Starteluenten gepackt und mehrfach zur Equilibrierung gespült. Je 200 mL folgender Eluenten und Eluentengemische mit zunehmender Polarität wurden zur Gewinnung der Fraktionen mit entsprechenden Ausbeuten verwendet: 50% Ethylacetat/50 %Heptan (AWG2A, 21.1 mg), 100% Ethylacetat (AWG2B, 258 mg), 75% Ethylacetat/ 25% Methanol (AW2C, 435 mg), 25% Ethylacetat/ 75% Methanol (AWG2D, 34.8 mg), 100% Methanol (AWG2E, 11.8 mg).

Zur Isolierung von Reinsubstanzen wurden anschließend verschiedene chromatographische Schritte durchgeführt. 20 mg der Fraktion AWG2A wurden in 150 μL Methanol + 30 μL Dichlormethan gelöst und mittels eines Laufes einer präparativen RP-HPLC getrennt (präp. HPLC-System 2). Verwendet wurde Säule 1 mit folgendem Programm: 0 min: 10% B (Fluss 6.25 mL/ min), 8 min: 10% B (Fluss

Experimenteller Teil

6.25 ml/min), 25 min: 100% B (Fluss 10 ml/min), 45 min: 100% B (Fluss 10 ml/min), λ 270 nm. Zwei Reinsubstanzen konnten erhalten werden. Von Naturstoff **1**, mit einer Retentionszeit von 25.0 min, konnten 0.4 mg, von Naturstoff **2** (t_R 29.9 min) konnten 0.8 mg isoliert werden.

Fraktion AWG2B wurde ebenfalls mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt (präp. HPLC-System 2, Säule 1). 230 mg der Fraktion wurden dafür in 2100 μ L Methanol gelöst und in sieben Läufen mit je 300 μ L Injektionsvolumen aufgetrennt (Programm: 0 min: 20% B (Fluss 8 mL/min), 15 min: 20% B (Fluss 8 mL/min), 35 min: 100% B (Fluss 10 ml/min), 45 min: 100 % B (Fluss 10 ml/min), λ 300 nm). Es konnten 2.6 mg der Fraktion AWG2B1 (t_R 26.2 min) erhalten werden. Die Fraktion enthielt Verunreinigungen und wurde weiter aufgereinigt. Fraktion AWG2B1 wurde durch eine weitere präparative RP-HPLC (präp. HPLC-System 2, Säule 1) aufgetrennt. Die Probe wurde in 100 μ L Methanol gelöst und in zwei Läufen getrennt (Programm: 0 min: 40% B (Fluss 8 mL/min), 8 min: 40% B (Fluss 8 mL/min), 20 min: 60% B (Fluss 8.5 ml/min), λ 370 nm). Das Chromatogramm enthielt vier Peaks von Reinsubstanzen mit ähnlichen Retentionszeiten. Das Sammeln der Fraktionen erfolgte daher manuell. Eine Reinsubstanz mit den UV-Maxima der DAD-Spur von 200 nm und 280 nm konnte separiert werden. Fraktion Naturstoff **3** (t_R 11.1 min) wurde mit einer Ausbeute von 0.6 mg erhalten.

Aufarbeitung der 2. Fermentation des Stammes *Aureobasidium pullulans* **ISch31**

Die Fermentation des Stammes erfolgte im 2 x 3 L Maßstab, so dass insgesamt 6 L der Fermentation Verfügung standen. Die Aufarbeitung des Amberlite XAD-16 zur Gewinnung des Rohextraktes und die nachfolgend erläuterte Säulenchromatographie wurden für beide Fermentationen getrennt voneinander durchgeführt. Dabei wurden gleiche Bedingungen der Aufarbeitung eingehalten. Die Ausbeute der Rohextrakte entsprach 716 mg und 534 mg. Es folgten jeweils Unterdruck-Säulenchromatographien an Kieselgel (Höhe 8 cm, Breite 5 cm). Das Säulenmaterial wurde mit dem Starteluenten 50% Heptan/ 50% Ethylacetat gepackt und mehrfach gespült. Die schrittweise Elution erfolgte durch fünf unterschiedliche Eluenten mit zunehmender Polarität. Zur Elution wurden jeweils 250 ml Eluent eingesetzt. Die jeweiligen Fraktionen der beiden getrennt voneinander durchgeführten Unterdruck-Säulenchromatographien wurden anschließend vereinigt und das Lösungsmittel

Experimenteller Teil

unter Vakuum abdestilliert. Folgende Eluenten wurden verwendet und führten zur Ausbeute entsprechender Fraktionen: 50% Heptan/ 50% Ethylacetat (AWH2A, 114 mg), 100% Ethylacetat (AWH2B, 245 mg), 75% Ethylacetat/ 25% Methanol (AWH2C, 631 mg), 75% Methanol/ 25% Ethylacetat (AWH2D, 158 mg), 100% Methanol (AWH2E, 233 mg). Zur weiteren Aufreinigung der Fraktionen und zu der Gewinnung von Reinsubstanzen wurden verschiedene chromatographische Trennungen durchgeführt.

Die Fraktion AWH2B wurde durch eine präparative RP-HPLC weiter aufgereinigt (präp. HPLC System 2, Säule 1). Die gesamte Menge der Probe (245 mg) wurde in 600 μ L Methanol gelöst und in drei analogen Läufen getrennt (Injektion pro Lauf: 200 μ L). Folgendes optimiertes Programm wurde genutzt: 0 min: 20% B (Fluss 8 mL/min), 15 min: 20% B (Fluss 8 mL/min), 35 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), 45 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), λ 300 nm. 1.4 mg der Fraktion AWH2B6 konnte isoliert werden (t_R 35.4 min). Diese wurde durch eine weitere präparative RP-HPLC (präp. RP-HPLC, Säule 2) getrennt. Dazu wurde die gesamte Probe in 50 μ L Methanol gelöst und vollständig injiziert. Folgendes Programm wurde angewendet: 0 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 10 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 20 min: 55% B (Fluss 8.5 mL/min), λ 350 nm. 0.5 mg des reinen Pyridons **4** mit einer t_R von 6.8 min wurden isoliert.

Für die Isolierung weiterer Naturstoffe wurde das aufgefangene Eluat der präparativen RP-HPLC der Fraktion AWH2B unter Vakuum abdestilliert und erneut durch eine präparative RP-HPLC (präp HPLC-System 2, Säule 1) aufgereinigt. Folgendes Programm wurde genutzt: 0 min: 20% B (Fluss 8 mL/min), 15 min: 20% B (Fluss 8 mL/min), 35 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), 45 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), λ 230 nm. Es wurden drei Fraktionen erhalten: AWH2BR1(t_R 29.5 min, 4.2 mg), AWH2BR2 (t_R 31.2 min, 2.8 mg), AWH2BR3 (t_R 35.0 min, 2.5 mg).

Fraktion AWH2BR1 wurde durch eine präparative RP-HPLC (präp. HPLC-System 2, Säule 1) getrennt. Die Probe wurde in 40 μ L Methanol gelöst und komplett injiziert. Folgendes Programm wurde verwendet: 0 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 10 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 20 min: 45% B (Fluss 8.5 mL/min), 30 min: 55% B (Fluss 8.5 mL/min), λ 230 nm. Ein Peak konnte isoliert werden (AWH2BR1A, t_R 22.8 min, 1.2 mg). Fraktion AWH2BR1A wurde zunächst zur Bestimmung der Konfiguration der 3,5-Dihydroxybenzoat-Gruppen der Exophiline und Liamocine genauer mittels NMR-

Experimenteller Teil

Spektroskopie und Massenspektrometrie analysiert. Anschließend folgte eine weitere präparative RP-HPLC (HPLC-System 2, Säule 2). Die Probe wurde in 50 μ L Methanol gelöst und mit folgendem Programm in einem Durchlauf getrennt: 0 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 5 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 25 min: 45% B (Fluss 8.5 mL/min), 40 min: 55% B (Fluss 8.5 mL/min), λ 230 nm. Es konnten 0.5 mg des reinen Naturstoffs **5** erhalten werden (t_R 6.0 min).

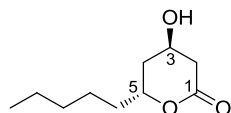
Fraktion AWH2BR2 wurde in 50 μ L Methanol gelöst und in einem Durchlauf einer präparativen RP-HPLC getrennt (präp. HPLC-System 2, Säule 2). Folgendes Programm wurde angewandt: 0 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 5 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 20 min: 45% B (Fluss 8.5 mL/min), 30 min: 55% B (Fluss 8.5 mL/min), λ 230 nm. Es konnten 0.5 mg des Naturstoffs **6** mit der t_R 11.0 min isoliert werden.

Fraktion AWH2BR3A wurde analog zur Fraktion AWH2BR2 durch eine präparative RP-HPLC gereinigt (präp. HPLC-System 2, Säule 2). Programm: 0 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 5 min: 35% B (Fluss 8 mL/min), 20 min: 45% B (Fluss 8.5 mL/min), 30 min: 55% B (Fluss 8.5 mL/min), λ 230 nm. Es wurden 0.4 mg des reinen Naturstoffs **7** mit der t_R 20.0 min erhalten.

Eine zweite Fraktion, des Extraktes der zweiten Fermentation, AWH2C wurde durch eine präparative RP-HPLC aufgereinigt (präp. HPLC System 2, Säule 1). Etwa 500 mg der Fraktion wurden in 1 mL Methanol gelöst und in fünf Durchläufen getrennt (Injektion je Lauf: 200 μ L). Folgendes Programm wurde angewandt: 0 min: 5% B (Fluss 6 mL/min), 10 min: 5% B (Fluss 6 mL/min), 30 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), 40 min: 100% B (Fluss 10 mL/min), λ 350 nm. Es konnten 2.3 mg stark verunreinigtes Desmethylprototenellin D (**8**) (t_R 30.7 min) isoliert werden. Weiterhin konnten 12.9 mg aufgereinigtes Desmethylpretenellin A (**53**) (t_R 30.9 min) erhalten werden. Zur Aufreinigung des Desmethylprototenellin D (**8**) wurde eine weitere präparative RP-HPLC der Fraktion AWH2C1 durchgeführt (präp. HPLC-System 2, Säule 2). Die Substanz wurde in 200 μ L gelöst und in vier analogen Durchläufen getrennt (Injektionsvolumen je Lauf: 50 μ L). Das optimierte Programm entsprach: 0 min: 30% B (Fluss 8 mL/min), 5 min: 30% B (Fluss 8 mL/min), 15 min: 40% B (Fluss 8.5 mL/min), 25 min: 50% B (Fluss 8.5 mL/min), λ 350 nm. 0.7 mg reines Desmethylprototenellin D (**8**) mit der t_R 20.7 min wurden isoliert.

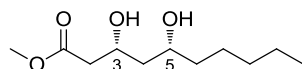
Analytische Daten der Strukturen zur Aufklärung der Konfigurationen der 3,5-Dihydroxydecansäuren

(3*R*,5*R*)-3-Hydroxy-5-Decanolid (62**)**



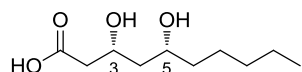
¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 4.68 (dddd, $J = 11.3$ Hz, 7.9 Hz, 4.8 Hz, 3.2 Hz, 1 H), 4.25 (ddd, $J = 6.9$ Hz, 4.1 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 2.71 (dd, $J = 17.5$ Hz, 6.9 Hz, 1 H), 2.54 (ddd, $J = 17.5$ Hz, 3.5 Hz, 1.8 Hz, 1 H), 1.94 (dddd, $J = 14.3$ Hz, 4.1 Hz, 3.2 Hz, 1.8 Hz, 1 H), 1.75 (ddd, $J = 14.3$ Hz, 11.3 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 1.69 (m, 1 H), 1.62 (m, 1 H), 1.45 (m, 2 H), 1.35 (m, 2 H), 1.34 (m, 2 H), 0.91 (m, 3 H), **¹³C-NMR** (125 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 173.7, 77.8, 63.3, 39.1, 36.7, 36.4, 32.7, 25.7, 23.6, 14.4, **HRESIMS** m/z 187.1342 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₀H₁₉O₃, 187.1334), **t_R** (HRESIMS-HPLC): 15.5 min

Methyl-(3*R*,5*R*)-3,5-Dihydroxydecansäure (64**)**



¹H-NMR (500 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 4.20 (m, 1 H), 3.73 (m, 1 H), 3.68 (s, 3 H), 2.54 (dd, $J = 15.1$ Hz, 4.6 Hz, 1 H), 2.43 (dd, $J = 15.1$ Hz, 8.3 Hz, 1 H), 1.62 (m, 2H), 1.52 (m, 2 H), 1.34 (m, 6 H), 0.91 (m, 3 H), **¹³C-NMR** (125 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 173.8, 70.1, 68.2, 52.0, 44.6, 42.9, 38.6, 33.1, 26.2, 23.3, 14.3), **HRESIMS** m/z 219.1598 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₁H₂₀O₄, 219.1596), **t_R** (HRESIMS-HPLC): 15.8 min

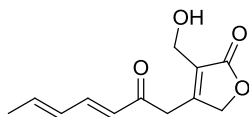
(3*R*,5*R*)-Dihydroxydecansäure (63**)**



HRESIMS m/z 205.11443 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₀H₂₁O₄, 205.1440), **t_R** (HRESIMS-HPLC): 14.0 min

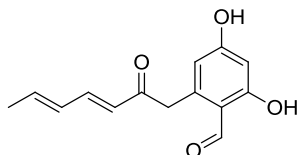
Charakterisierung der isolierten neuen Naturstoffe aus *Aureobasidium pullulans* ISch31

Naturstoff 1



Gelblicher Feststoff, **¹H-NMR** (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.33 (dd, *J* = 15.5, 9.9 Hz, 1 H), 6.28 - 6.36 (m, 2 H), 6.16 (d, *J* = 15.5 Hz, 1 H), 4.93 (s, 2 H), 4.51 (s, 2 H), 3.66 (br. s., 1 H), 1.89 (d, *J* = 5.8 Hz, 3 H), **¹³C-NMR** (175 MHz, METHANOL- *d*₄) δ ppm 197.8, 176.8, 166.5, 146.3, 142.8, 131.5, 127.8, 121.1, 72.5, 58.5, 30.8, 18.9 (NMR-Auswertung siehe Tab. 6), **UV/Vis** (Methanol) λ_{max} (lg ϵ) = 204 nm (4.21), 280 nm (3.98), **HRESIMS** *m/z* 223.0969 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₂H₁₅O₄, 223.0970), *m/z* 245.0787 [M+Na]⁺ (berechnet für C₁₂H₁₄NaO₄, 245.0790), **t_R** (HRESIMS-HPLC): 5.96 min, **R_f-Wert**: 0.3 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

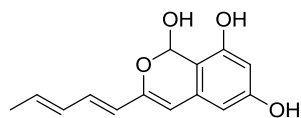
Naturstoff 2



¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 9.86 (s, 1H), 7.35 (m, 1 H), 6.33 (m, 2 H), 6.24 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 6.22 (d, *J* = 15.3 Hz, 1 H), 6.20 (d, *J* = 2.4 Hz, 1 H), 4.19 (s, 2 H), 1.88 (d, *J* = 5.8 Hz, 3 H), **¹³C-NMR** (175 MHz, METHANOL- *d*₄) δ ppm 199.3, 194.4, 167.4, 166.8, 146.0, 142.9, 142.8, 131.5, 127.6, 114.2, 112.9, 102.5, 44.8, 18.9 (NMR-Auswertung siehe Tab. 7)

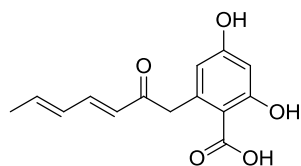
Experimenteller Teil

Tautomerisierungsprodukt von Naturstoff **2** (**2***)



¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 6.76 (dd, J = 15.1 Hz, 11.0 Hz, 1 H), 6.19 (m, 1 H), 6.18 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 6.16 (s, 1 H), 6.06 (d, J = 2.4 Hz, 1 H), 6.01 (d, J = 15.1 Hz, 1 H), 5.87 (dq, J = 13.8 Hz, 6.8 Hz, 1 H), 5.83 (s, 1H), 1.81 (dd, J = 6.8 Hz, 1.3 Hz), **¹³C-NMR** (175 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 160.1, 156.2, 150.6, 134.1.8, 132.7, 132.5, 131.2, 125.4, 107.9, 106.1, 103.2, 102.1, 96.8, 18.5 (NMR-Auswertung siehe Tab. 8), **UV/Vis** (Methanol) $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) 201 nm (4.12), 282 nm (3.93), 329 nm (3.76), **HRESIMS** m/z 229.0950 [M+H-H₂O]⁺ (calc. for C₁₄H₁₂O₃ 229.0818), **t_R** (HRESIMS-HPLC) 8.5 min, 12.2 min, **R_f-Wert** (Gemisch aus beiden Strukturen) 0.3/ 0.4 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

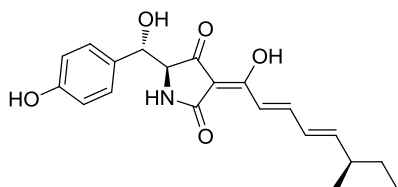
Naturstoff **3**



¹H-NMR (700 MHz, METHANOL-*d*₄) δ ppm 7.09 (dd, J = 15.3, 10.8 Hz, 1 H), 6.54 (d, J = 15.3 Hz, 1 H), 6.31 (dd, J = 14.8 Hz, 10.8 Hz, 1 H), 6.28 (d, J = 1.9 Hz, 1 H), 6.26 (d, J = 1.9 Hz, 1 H), 6.21 (m, 1 H), 3.53 (s, 2 H), 1.86 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), **¹³C-NMR** (175 MHz, METHANOL- *d*₄) δ ppm 198.5, 175.3, 161.6, 159.8, 145.7, 141.5, 137.6, 131.9, 131.0, 120.4, 111.4, 102.6, 40.6, 18.9, (NMR-Auswertung siehe Tab. 9), **UV/Vis** (Methanol) $\lambda_{\max}$ (lg ϵ) = 204 nm (4.14), 280 nm (3.75), **HRESIMS** m/z 263.0912 [M+H]⁺ (berechnet für C₁₄H₁₅O₅, 263.0919), **t_R** (HRESIMS-HPLC): 6.19 min, **R_f-Wert**: 0.4 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

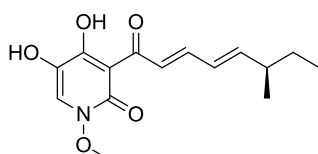
Experimenteller Teil

Desmethylprototenellin D (**8**)



$[\alpha]_D^{22} - 115$ ($c = 0.1$, CHCl_3), $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 7.52 (dd, $J = 15.3, 11.0$ Hz, 1 H), 7.23 (s*verdeckt von Chloroform), 2 H), 7.07 (d, $J = 15.3$ Hz, 1 H), 6.80 (d, $J = 7.5$ Hz 2 H), 6.34 (dd, $J = 15.1, 11.0$ Hz, 1 H), 6.23 (dd, $J = 15.1, 7.6$ Hz, 1 H), 5.66 (br. s., 1 H), 4.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 3.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1 H), 2.25 (m, 1 H), 1.42 (m, 2 H), 1.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 0.89 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 195.2, 176.3, 175.6, 156.4, 155.0, 147.3, 130.8, 128.5, 128.1, 119.4, 115.8, 99.5, 74.5, 65.5, 39.4, 29.4, 19.5, 11.9, (NMR-Auswertung siehe Tab. 10), **UV/Vis** (Methanol) λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 206 nm (4.66), 255 nm (3.55), 283 nm (3.64), 337 nm (3.70), **UV/Vis** (HPLC-UV) λ_{max} 220 nm, 360 nm, **EIMS** m/z 340.07 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, t_R (HPLC-EIMS) 10.4 min, **HRESIMS** m/z 358.1648 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{NO}_5$, 358.1654) t_R (HRESIMS-HPLC): 10.85 min, R_f -Wert: 0.2 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

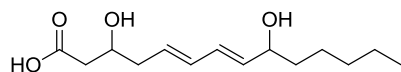
Naturstoff **4**



$^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 7.97 (d, $J = 15.1$ Hz, 1 H), 7.65 (dd, $J = 15.1, 11.2$ Hz, 1 H), 7.38 (s, 1 H), 6.38 (dd, $J = 15.1, 11.2$ Hz, 1 H), 6.24 (dd, $J = 15.1, 7.7$ Hz, 1 H), 4.02 (s, 3 H), 2.25 (m, 1 H), 1.41 (m, 2 H), 1.06 (d, $J = 6.7$ Hz, 3 H), 0.89 (d, $J = 7.3$ Hz, 3 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 193.3, 171.5, 156.7, 154.6, 148.5, 131.3, 128.6, 125.2, 123.7, 106.3, 64.8, 39.3, 29.4, 19.5, 11.9 (NMR-Auswertung siehe Tab. 11), **UV/Vis** (Methanol) λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 211 nm (4.69), 333 nm (3.83), **HRESIMS** m/z 294.1341 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ 294.1336), t_R (HRESIMS-HPLC): 11.99 min

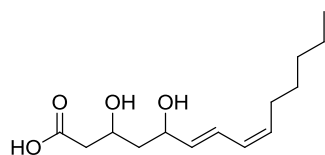
Experimenteller Teil

Naturstoff 5



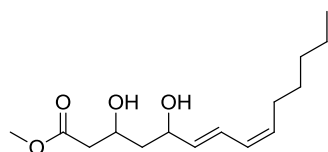
$[\alpha]^{22}_D + 13$ ($c = 0.1$, MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 6.18 (dd, $J = 15.1, 10.5$ Hz, 1 H), 6.11 (dd, $J = 14.8, 10.5$ Hz, 1 H), 5.71 (dd, $J = 14.8, 7.3$ Hz, 1 H), 5.57 (dd, $J = 15.1, 6.9$ Hz, 1 H), 4.02 (m, 2 H), 2.42 (m, 1 H), 2.34 (m, 1 H), 2.28 (t, $J = 6.7$ Hz, 2 H), 1.53 (m, 1 H), 1.46 (m, 1 H), 1.38 (m, 1 H), 1.31 (m, 5 H), 0.91 (t, $J = 7.1$ Hz, 3 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (175 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 177.1, 136.0, 133.8, 131.4, 130.9, 73.3, 69.6, 43.3, 41.2, 38.4, 33.0, 26.3, 23.7, 14.4 (NMR-Auswertung siehe Tab. 12), **UV/Vis** (Methanol) $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 231 nm (4.11), **HRESIMS** m/z 279.1568 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NaO}_4$, 279.1572), t_R (HRESIMS-HPLC): 8.49 min, **R_F -Wert**: 0.27 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

Naturstoff 6



$[\alpha]^{22}_D + 18$ ($c = 0.05$, MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 6.54 (dd, $J = 15.1, 11.0$ Hz, 1 H), 5.97 (t, $J = 11.0$ Hz, 1 H), 5.68 (dd, $J = 15.1, 6.0$ Hz, 1 H), 5.40 (dt, $J = 11.0, 7.7$ Hz, 1 H), 4.37 (dt, $J = 11.8, 6.0$, 1 H), 4.17 (m, 1 H), 2.37 (m, 1 H), 2.31 (m, 1 H), 2.19 (dq, $J = 7.7, 1.1$ Hz, 2 H), 1.62 (m, 2 H), 1.39 (dt, $J = 14.5, 7.3$ Hz, 1 H), 1.32 (m, 5 H), 0.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 4 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 137.6, 132.9, 129.4, 125.9, 69.9, 67.0, 45.3, 45.0, 32.6, 30.5, 28.4, 23.6, 14.4 (NMR-Auswertung siehe Tab. 13), **UV/Vis** (Methanol) $\lambda_{\max}$ ($\lg \epsilon$) = 233 nm (4.03), **HRESIMS** m/z 279.1573 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NaO}_4$, 279.1572), t_R (HRESIMS-HPLC): 10.08 min, **R_F -Wert**: 0.33 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

Naturstoff 7



$[\alpha]^{22}_D + 37$ ($c = 0.04$, MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 6.55 (ddt, $J = 15.2, 11.0, 1.2, 1.2$ Hz, 1 H), 5.98 (t, $J = 11.0$ Hz, 1 H), 5.67 (dd, $J = 15.2, 6.3$ Hz, 1 H), 5.42 (dt, $J = 10.8, 7.6$ Hz, 1 H), 4.36 (dt, $J = 12.7, 6.3$ Hz, 1 H), 4.26 (m, 1 H), 3.67 (s, 3 H), 2.52 (dd, $J = 15.1, 4.6$ Hz, 1 H), 2.45 (dd, $J = 15.1, 8.4$ Hz, 1 H), 2.19 (qd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 2 H), 1.61 (ddd, $J = 8.5, 4.3, 3.9$ Hz, 2 H), 1.40 (m, 1 H), 1.32 (m, 5 H), 0.91 (t, $J = 7.0$ Hz, 3 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, METHANOL- d_4) δ ppm 173.8, 137.3, 133.1, 129.2, 126.1, 70.1, 66.3, 52.0, 45.3, 43.7, 32.6, 30.5, 28.6, 23.6, 14.4 (NMR-Auswertung siehe Tab. 14), **UV/Vis** (Methanol) λ_{max} (lg ϵ) = 234 nm (3.97), **HRESIMS** m/z 293.1724 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (berechnet für $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{NaO}_4$, 293.1729 t_R (HRESIMS-HPLC): 10.94 min, **R_f -Wert:** 0.35 (90% Dichlormethan/ 10% Methanol)

Erstellung des „Molecular Networks“ aus dem Extrakt von *Aureobasidium pullulans* ISch31

Zur Erstellung des „Molecular Networks“ wurden die durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen mittels HPLC-EIMS analysiert. Die EIMS Daten wurden mit einer Ionenfallen MS (Amazon, Bruker), kombiniert mit einem Agilent 1200 series HPLC-UV System, gemessen (Säule: 2.1 x 50 mm, 1.7 μm , C_{18} Acquity UPLC BEH (Waters), Lösungsmittel A H_2O + 0.1% Ameisensäure, Lösungsmittel B CH_3CN + 0.1% Ameisensäure, Gradient: 0 min: 5% B, 0.5 min 5% B, 19.5 min: 100% B, 21.5 min: 100% B, Flussrate: 0.6 mL/min, UV-Detektion 200 - 600 nm). Die Proben wurden in Methanol gelöst, die Konzentration betrug 1 mg/ml. Zur Ermittlung der Daten erfolgten drei Scan-Events. Positive MS-Daten, anschließend zwei MS-Scan abhängige MS-MS-Scans der beiden intensivsten Ionen.

Die erhaltenen Daten wurden mithilfe des ProteoWizard Pakets in das textbasierte mzXML Format konvertiert. Anschließend erfolgten das MS-Clustering und die Erstellung von Text-Dateien mittels Matlab.¹⁵¹ Als Schwellenwert des „cosines“ wurde 0.6 genutzt. Zur Eliminierung von Hintergrundionen bzw. Lösungsmittelsignalen wurde analog zur HPLC-MS der Fraktionen eine Negativkontrolle, bestehend aus

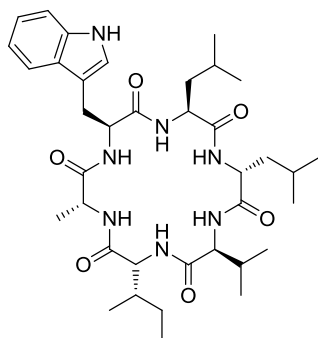
Methanol, analysiert. Sie wurde im Zuge des MS-Clusterings von den zu untersuchenden Fraktionen subtrahiert. Die vollständigen Daten wurden zur Visualisierung in Cytoscape 2.3.8 geladen und als Network von „nodes“ und „edges“ (Verbindungslinien) dargestellt.¹⁶³

4.3.6 Aufreinigung von synthetischem Baceridin und Isobaceridin

Die gesamte Probe des synthetisch hergestellten Baceridins (**33**) (11.2 mg) wurde in etwa 2 mL MeOH (+ einige Tropfen DCM) gelöst und mittels einer präp. RP-HPLC aufgereinigt (präp. HPLC-System 1, Säule 1). Die Auftrennung der Probe erfolgte isokratisch in vier Läufen mit je 500 mL Injektionsvolumen (Programm: 0 min: 65% B (Fluss 10 mL/min), 20 min: 65 % B (Fluss 10 mL/min), Eluentensystem: A: 50 mM NH₄OAc, pH 5,5, B: 100% CH₃CN, λ 225 nm). Die Retentionszeit des Baceridins betrug 14 min. Anschließend wurden die gewonnenen Fraktionen vereinigt und das CH₃CN unter Vakuum abdestilliert. Die verbleibende wässrige Phase wurde mit Dichlormethan extrahiert (3 x 15 mL). Die organische Phase wurde vereinigt, über MgSO₄ getrocknet und unter Vakuum abdestilliert. Die Ausbeute des aufgereinigten Baceridins (**33**) betrug 7.2 mg. Isobaceridin (**86**) (1.5 mg) wurde in 1.5 mL Methanol gelöst und in einem Durchlauf einer präparativen RP-HPLC gereinigt (analoges Programm, Eluentensystem, präp HPLC-System und analoge Säule zur Baceridinaufreinigung). Die Aufreinigung der gesammelten Isobaceridin-Fraktion (t_R 13 min) erfolgte ebenso analog zur Aufreinigung des Baceridins. Es konnte eine Ausbeute von 0.7 mg reinem Isobaceridin (**86**) erhalten werden.

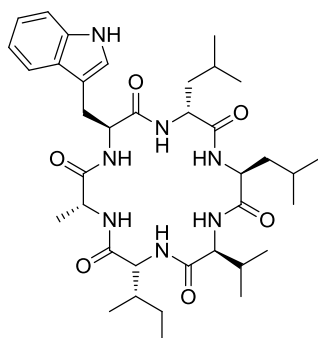
HPLC-DAD: Säule: 125 x 2 mm Pyramid 5 μ C-18 (Machery-Nagel), Eluent A: H₂O/CH₃CN 95:5, 5 mM NH₄OAc, pH 5,5, Eluent B: CH₃CN/H₂O 95:5, 5 mM NH₄OAc, pH 5,5, Gradient: 10% B zu 100% B in 30 min, Fluss: 0,3 ml/min, UV-Detektion bei 230 nm

Analytische Daten des aufgereinigten Baceridins (**33**)



$[\alpha]^{20}_D = +42,0^\circ$ ($c = 0.1$; MeOH), $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, 333 K, DMSO- d_6) δ ppm 0.77 - 0.93 (m, 21 H), 1.08 (d, $J = 6.6$ Hz, 3 H), 1.19 - 1.29 (m, 3 H), 1.40 - 1.55 (m, 5 H), 1.65 (dt, $J = 8.9, 4.5$ Hz, 1 H), 1.81 - 1.93 (m, 1 H), 1.94 - 2.02 (m, 1 H), 2.95 (dd, $J = 14.9, 9.6$ Hz, 1 H), 3.16 - 3.24 (m, 1 H), 4.07 (dd, $J = 8.5, 7.7$ Hz, 1 H), 4.19 - 4.31 (m, 3 H), 4.32 - 4.45 (m, 2 H), 6.98 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 7.06 (t, $J = 7.4$ Hz, 1 H), 7.21 (d, $J = 2.1$ Hz, 1 H), 7.25 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 7.33 (d, $J = 7.7$ Hz, 1 H), 7.41 (d, $J = 6.0$ Hz, 1 H), 7.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1 H), 7.75 (d, $J = 8.5$ Hz, 1 H), 8.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 1 H), 8.07 (d, $J = 6.2$ Hz, 1 H), 8.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 1 H), 10.71 (br. s., 1 H), $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, 333 K, DMSO- d_6) δ ppm 172.2, 171.6, 171.1, 171.0, 170.7, 170.6, 136.0, 126.8, 123.3, 120, 118.0, 117.7, 111.1, 109.8, 59.1, 55.8, 55.5, 50.7, 50.5, 48.7, 35.6, 28.5, 26.8, 25.6, 24.0, 22.7, 22.3, 22.3, 21.1, 18.8, 18.6, 18.3, 14.1, 11.2, **R_f -Wert:** 0,37 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5), **t_R :** 18,4 min (HPLC-DAD)

Analytische Daten des Isobaceridins (**86**)



$[\alpha]^{20}_D = -35,0^\circ$ ($c = 0.1$; MeOH), **R_f -Wert:** 0,35 (CH₂Cl₂/MeOH 95:5), **t_R :** 17,9 min (HPLC-DAD)

4.4 Entwicklung der Methode des „Molecular Networking“ anhand komplexer Extrakte aus einem Cyanobakterium und einer Alge

Aufarbeitung der Extrakte

Die Probe PAP-24/Mar/12-1 (rotes, filamentöses Cyanobakterium, Volumen: 500 ml) wurde in einer Tiefe von 2 m – 4 m in Tres Hermanas, Portobelo, Panamá gesammelt und bis zur Weiterverarbeitung in einem Gemisch aus Isopropanol und Seewasser (1:1) bei -20 °C gelagert. Die mehrfache Extraktion der Probe, bis zur Entfärbung der organischen Phase, mit Dichlormethan/Methanol 2:1 ergab 2.28 g Rohextrakt. Anschließend wurde eine Unterdruck-Säulenchromatographie (VLC) an Kieselgel durchgeführt, um die Naturstoffe entsprechend ihrer Polaritäten zu trennen. Folgende Eluenten (je 300 mL) führten zu entsprechenden Fraktionsausbeuten: 100 % Heptan (2122A, 8,6 mg), 10% Ethylacetat/ 90% Heptan (2122B, 20.3 mg), 20% Ethylacetat/ 80% Heptan (2122C, 222 mg), 40% Ethylacetat/ 60% Heptan (2122D, 146 mg), 60% Ethylacetat/ 40% Heptan /2122E, 135 mg), 80% Ethylacetat/ 20% Heptan (2122F, 70 mg), 100% Ethylacetat (2122G, 33.6 mg), 25% Methanol/ 75% Ethylacetat (2122H, 130 mg), 100% Methanol (2122I, 859 mg). Alle Fraktionen wurden in Methanol gelöst (1 mg/mL), filtriert und mittels LC-MS-UV analysiert. Zusätzlich wurden die die Fraktionen auf Bioaktivität gegen H460-Zellen untersucht. Die Sammlung der Daten zur Erstellung des „Molecular Networks“ durch LC-MS bzw. LC-MS/MS erfolgte an einem automatisierten LC-MS-UV-System (Thermo Finnigan Surveyor Autosampler-Plus, LC-Pump-Plus, PDA-Plus System, gekoppelt mit einem Thermo Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometer. Säule: Phenomenex Kinetex C₁₈ 100 Å 100 x 4.60 mm, Flussrate 700 µL/min, linearer Gradient: 0 min: 40% B, 20 min 100% B (A: 0.1% Ameisensäure in Wasser, B: CH₃CN). ESI-Bedingungen: Kapillar-Temperatur: 325 °C, Spannung 5 kV, Schutzgasfluss: 69 L/min. Es wurden drei Scan-Events durchgeführt (positive MS *m/z* 300 – 2000, anschließend zwei Daten-abhängige MS/MS Scans des erst- und zweit-intensivsten Ion des ersten Scan-Events. Die erhaltenen Daten wurden mithilfe des ProteoWizard Pakets in das textbasierte mzXML Format konvertiert. Anschließend erfolgten das MS-Clustering und die Erstellung von Text-Dateien mittels Matlab.¹⁵¹ Als Schwellenwert des „cosines“ wurde 0.6 gewählt. Zur Eliminierung von Hintergrundionen bzw. Lösungsmittelsignalen wurde analog zur HPLC-MS der Fraktionen eine Negativkontrolle, bestehend aus Methanol, analysiert. Sie wurde im Zuge des MS-Clusterings von den zu untersuchenden Fraktionen subtrahiert. Die

Experimenteller Teil

vollständigen Daten wurden zur Visualisierung in Cytoscape 2.3.8 geladen und als Network von „nodes“ und „edges“ dargestellt.¹⁶³

Die zweite Probe PAP-25/Jun/12-5 (rote Makroalge, Volumen: 1000 mL) wurde ebenfalls in Tres Hermanas, Portobelo, Panamá gesammelt und analog zur Probe PAP-24/Mar/12-1 gelagert und aufgearbeitet. Die Unterdruck-Säulenchromatographie führte zu folgenden Ausbeuten der Fraktionen: 100 % Heptan (2118A, 9.2 mg), 10% Ethylacetat/ 90% Heptan (2118B, 14.5 mg), 20% Ethylacetat/ 80% Heptan (21182C, 92.2 mg), 40% Ethylacetat/ 60% Heptan (2118D, 101 mg), 60% Ethylacetat/ 40% Heptan /2118E, 69.1 mg), 80% Ethylacetat/ 20% Heptan (21182F, 36.8 mg), 100% Ethylacetat (2118G, 11.3 mg), 25% Methanol/ 75% Ethylacetat (2118H, 116 mg), 100% Methanol (2118I, 593 mg). Anschließende Analysen und Erstellung des „Molecular Network“ wurden wie bereits für Probe PAP-24/Mar/12-1 beschrieben durchgeführt.

Literaturverzeichnis

- (1) Joachim, H. (Übers. . *Papyros Ebers. Das älteste Buch über Heilkunde*; Berlin, 1890.
- (2) Verpoorte, R. *Drug Discov. Today* **1998**, 3, 232–238.
- (3) Kuhnert, N. *ChiuZ* **1999**, 33, 213–220.
- (4) Fleming, A. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, 10, 226–236.
- (5) Bérdy, J. *J. Antibiot.* **2005**, 58, 1–26.
- (6) Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 703.723.
- (7) Alberts, A. W. *Am. J. Cardiol.* **1988**, 62, 10–15.
- (8) Wenger, R. M. *Helv. Chim. Acta* **1984**, 67, 502–525.
- (9) Thompson, G. D.; Dutton, R.; Sparks, T. C. *Pest Manag. Sci.* **2000**, 56, 696–702.
- (10) Bartlett, D. W.; Clough, J. M.; Godwin, J. R.; Hall, A. a; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. *Pest Manag. Sci.* **2002**, 58, 649–662.
- (11) Newman, D. J.; Cragg, G. M. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461–477.
- (12) Lindow, S. E.; Leveau, J. H. . *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 238–243.
- (13) Lindow, S. E.; Brandl, M. T. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, 69, 1875–1883.
- (14) Raven, H. P.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. *Biologie der Pflanzen*; 4th ed.; De Gruyter, 2005; p. 861.
- (15) Wensing, A.; Braun, S. D.; Büttner, P.; Expert, D.; Völksch, B.; Ullrich, M. S.; Weingart, H. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 2704–2711.
- (16) Abou-Zeid, A. .; Altalhi, A. D.; El-Fattah, R. R. *Mycopath* **2009**, 7, 11–20.
- (17) Leben, C. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1965**, 3, 209–230.
- (18) Duggeli, M. *Zentr. Bakteriол. Parasitenk.* **1904**, 13, 198–207.
- (19) Smith, E. F. *Bacteria in Relation to Plant Diseases.*; Carnegie institution of Washington: Washington D. C., 1905.
- (20) Last, F. T.; Deighton, F. C. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* **1965**, 48, 43–99.
- (21) Ruinen, J. *Plant Soil* **1961**, 15, 81–109.

- (22) Duncan, C. L. *Appl. Microbiol.* **1964**, 12, 173–177.
- (23) Simmonds, P. M. *Sci. Agric.* **1947**, 27, 625.
- (24) Wright, J. M. *Ann. Appl. Biol.* **1956**, 44, 461–466.
- (25) Andrews, J. H.; Harris, R. F. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2000**, 38, 145–180.
- (26) Hirano, S. S.; Upper, C. D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 624–653.
- (27) Singh, S.; Köhler, B.; Fett, F. W. *Curr. Microbiol.* **1992**, 25, 335–339.
- (28) Kiraly, Z.; El-Zehaby, H. M.; Klement, Z. *J. Phytopathol.* **1997**, 145, 59–68.
- (29) Bunster, L.; Fokkema, H. J.; Schippers, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, 55, 1340–1345.
- (30) Fry, S. C. *Physiol. Plant.* **1989**, 75, 532–536.
- (31) Dayan, F. E.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 17, 4022–4034.
- (32) Ojiambo, P. S.; Scherm, H. *Phytopathology* **2006**, 96, 1168–1174.
- (33) Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Staub, T. *Eur. J. Plant Pathol.* **2001**, 107, 19–28.
- (34) Hashidoko, Y. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2005**, 69, 1427–1441.
- (35) Hashidoko, Y.; Itoh, E.; Yokota, T.; Tahara, S. *Biosci. Biotech. Biochem.* **2002**, 662, 2474–2478.
- (36) Ding, L.; Qin, S.; Li, F.; Chi, X.; Laatsch, H. *Curr. Microbiol.* **2008**, 56, 229–235.
- (37) Boyd, K. G.; Adams, D. R.; Burgess, J. G. *Biofouling* **1999**, 14, 227–236.
- (38) Isnansetyo, A.; Horikawa, M.; Kamei, Y. *J. Antimicrob. Chemother.* **2001**, 47, 724–725.
- (39) Wang, F.; Fang, Y.; Zhu, T.; Zhang, M.; Lin, A.; Gu, Q.; Zhu, W. *Tetrahedron* **2008**, 64, 7986–7991.
- (40) Maruna, M.; Sturdikova, M.; Liptaj, T.; Godany, A.; Muckova, M.; Cerik, M.; Pronayova, N.; Proksa, B. *J. Basic Microbiol.* **2010**, 50, 135–142.
- (41) Stromberg, K. D.; Kinkel, L. L.; Leonard, K. J. *Biol. Control* **2000**, 17, 61–72.
- (42) Braun-Kiewnick, A.; Jacobsen, B. J.; Sands, D. C. *Phytopathology* **2000**, 90, 369–375.
- (43) Montesinos, E. *Int. Microbiol.* **2003**, 6, 245–252.

- (44) Wright, S. A.; Zumoff, C. H.; Schneider, L.; Beer, S. V. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 284–292.
- (45) Brady, S. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 11912–11913.
- (46) Clardy, J.; Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. *Nat. Biotechnol.* **2006**, 24, 1541–1550.
- (47) Fredenhagen, A.; Tamura, S. Y.; Kenny, P. T. M.; Komura, H.; Naya, Y.; Nakanishi, K.; Nishiyama, K.; Sugiura, M.; Kita, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 4409–4411.
- (48) Jin, M.; Fischbach, M. A.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10660–10661.
- (49) Sammer, U. F.; Vo, B.; Mo, U.; Schmidtke, M.; Spiteller, P.; Spiteller, M.; Spiteller, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, 75, 7710–7717.
- (50) Lee, H. B.; Oh, H. *Bull. Korean. Chem. Soc.* **2006**, 27, 779–782.
- (51) Niggemann, J.; Bozko, P.; Bruns, N.; Wodtke, A.; Gieseler, M. T.; Thomas, K.; Jahns, C.; Nimtz, M.; Reupke, I.; Brüser, T.; Auling, G.; Malek, N.; Kalesse, M. *Chembiochem* **2014**, 15, 1021–1029.
- (52) Redmond, J. C.; Marois, J. J.; MacDonald, J. D. *Plant Dis.* **1987**, 71, 799–802.
- (53) Balint-Kurti, P.; Simmons, S. J.; Blum, J. E.; Ballaré, C. L.; Stapleton, A. E. *Mol. Plant Microbe Interact* **2010**, 23, 473–484.
- (54) Kucheryava, N.; Fiss, M.; Auling, G.; Kroppenstedt, R. M. *Syst. Appl. Microbiol.* **1999**, 22, 472–483.
- (55) Schmoock, S.; Kürkcüoglu, S.; Gau, A. E. In *Ecofruit-13th International Conference on Cultivation Technique and Phytopathological Problems in Organic Fruit-Growing*; Boos, M., Ed.; Weinsberg, Germany, 2008; pp. 306–309.
- (56) Fiss, M. *Evaluierung von epiphytischen Antagonisten zur biologischen Kontrolle des Apfelschorferregers Venturia inaequalis*; 1st ed.; Cuvillier: Göttingen, 2001.
- (57) Hirano, S. S.; Upper, C. D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, 64, 624–653.
- (58) Feil, H.; Feil, W. S.; Chain, P.; Larimer, F.; DiBartolo, G.; Copeland, A.; Lykidis, A.; Trong, S.; Nolan, M.; Goltsman, E.; Thiel, J.; Malfatti, S.; Loper, J. E.; Lapidus, A.; Detter, J. C.; Land, M.; Richardson, P. M.; C, K. N.; Ivanova, N.; Lindow, S. E. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, 102, 11064–11069.
- (59) Amrein, H.; Makart, S.; Granado, J.; Shakya, R.; Schneider-Pokorny, J.; Dudler, R. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2004**, 17, 90–97.

- (60) Bellezza, I.; Peirce, M. J.; Minelli, A. *Trends Mol Med* **2014**, 20, 551–558.
- (61) Frenkel, J.; Wess, C.; Vyverman, W.; Pohnert, G. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, 1, 951–952.
- (62) Stark, T.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7222–7231.
- (63) Rhee, K.-H. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2004**, 24, 423–427.
- (64) Sajeli Begum, A.; Basha, S. A.; Raghavendra, G.; Kumar, M. V.; Singh, Y.; Patil, J. V.; Fujimoto, Y. *Chem Biodivers.* **2014**, 11, 92–100.
- (65) Kumar, S. N.; Nambisan, B. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 172, 741–754.
- (66) Mollica, A.; Costante, R.; Fiorito, S.; Genovese, S.; Stefanucci, A.; Methieu, V.; Kiss, R.; Epifano, F. *Fitoterapia* **2014**, 98, 91–97.
- (67) Mehdi, R. B. A.; Sioud, S.; Fguira, L. F. Ben; Bejar, S.; Mellouli, L. *Process Biochem.* **2006**, 41, 1506–1513.
- (68) Brack, C.; Mikolasch, A.; Schauer, F. *Mar. Biotechnol.* **2014**, 16, 385–395.
- (69) Yan, P.; Song, Y.; Sakuno, E.; Nakajima, H.; Nakagawa, H.; Yabe, K. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, 70, 7466–7473.
- (70) Kilian, G.; Tshanga, S. S.; Oidu, B.; Milne, P. J. *Pharmazie* **2011**, 66, 421–423.
- (71) Graz, M.; Huntz, A.; Jamie, H.; Grant, G.; Milne, P. *Pharmazie* **1999**, 54, 772–775.
- (72) Milne, P. J.; Hunt, A. L.; Rostoll, K.; Van Der Walt, J. J.; Graz, C. J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 50, 1331–1337.
- (73) Van der Valt, J. P.; Yarrow, D. *The Yeasts: a Taxonomic study*; Kreger-van Rij, N. J. W., Ed.; 3rd ed.; Elsevier Science Publishers B. V.: Amsterdam, 1984.
- (74) Zou, X.; Liu, S.; Zheng, Z.; Chen, X.; Liu, X.; Li, E. *Chem Biodivers.* **2011**, 10, 1914–1920.
- (75) Maskey, R. P.; Asolkar, R. N.; Kapaun, E.; Wagner-Döbler, I.; Laatsch, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2002**, 55, 643–649.
- (76) Uhlig, S.; Petersen, D. *Toxicon* **2008**, 52, 175–185.
- (77) Barroso, N.; Rodriguez, M. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, 297, 195–203.
- (78) Kozlovsky, A. G.; Zhelifonova, V. P.; Antipova, T. V. *Microbiology* **2009**, 78, 618–623.

- (79) Oleinikova, G. K.; Ivchuk, O. I.; Denisenko, V. A.; Chaikina, E. L.; Menzorova, N. I.; Nedashkovskaya, O. I.; Kuznetsova, T. A. *Chem. Nat. Compd.* **2006**, 42, 581–584.
- (80) Wuster, A.; Babu, M. M. *Mol. Biosyst.* **2010**, 6, 134–141.
- (81) Lingappa, B. T.; Prasad, M.; Lingappa, Y.; Biemann, K. *Science* **1969**, 163, 192–194.
- (82) Schubert, K.; Groenewald, J. Z.; Braun, U.; Dijksterhuis, J.; Starink, M.; Hill, C. F.; Zalar, P.; de Hoog, G. S.; Crous, P. W. *Stud. Mycol.* **2007**, 58, 105–156.
- (83) Samson, R. A.; Houbroken, J.; Summerbell, R. C.; B, F.; Miller, J. D. In *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*; Flannigan, B.; Samson, R. A.; Miller, J. D., Eds.; CRC Press, 2002; pp. 285–473.
- (84) Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. *Compendium of soil fungi. Vols 1 & 2*; Acad. Press: London, 1980.
- (85) Sieber, T.; Riesen, T. K.; Müller, E.; Fried, P. M. *J. Phytopathol.* **1988**, 122, 289–306.
- (86) Heuchert, B.; Braun, U.; Schubert, K. *Schlechtendalia* **2005**, 13, 1–78.
- (87) Amborabé, B.-E.; Fleurat-Lessard, P.; Chollet, J.-F.; Roblin, G. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, 40, 1051–1060.
- (88) Yadav, M.; Yadav, A.; Yadav, J. P. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, 4, 648–653.
- (89) Qi, S.-H.; Xu, Y.; Xiong, H.-R.; Quin, P.-Y.; Zhang, S. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 25, 399–406.
- (90) Ribeiro, B.; Valentão, P.; Baptista, P.; Seabra, R. M.; Andrade, P. B. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, 45, 180518–13.
- (91) Threlfall, D. R.; Law, A.; Whistance, G. R. *Biochem J.* **1970**, 118, 55p.
- (92) Goodell, B.; Jellison, J.; Liu, J.; Daniel, G.; Paszczynski, A.; Fekete, F. *J. Biotechnol.* **1997**, 53, 133–162.
- (93) Lou, J.; Fu, L.; Peng, Y.; Zhou, L. *Molecules* **2013**, 18, 5891–5935.
- (94) Krohn, K.; Sohrab, H.; Aust, H.-J.; Draeger, S.; Schulz, B. *Nat. Prod. Res.* **2004**, 18, 277–285.
- (95) Tan, R. X.; Zou, W. X. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 448–459.
- (96) Bugg, T. D.; Ahmad, M.; Hardiman, E. M.; Rahmanpour, R. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, 28, 1883–1896.

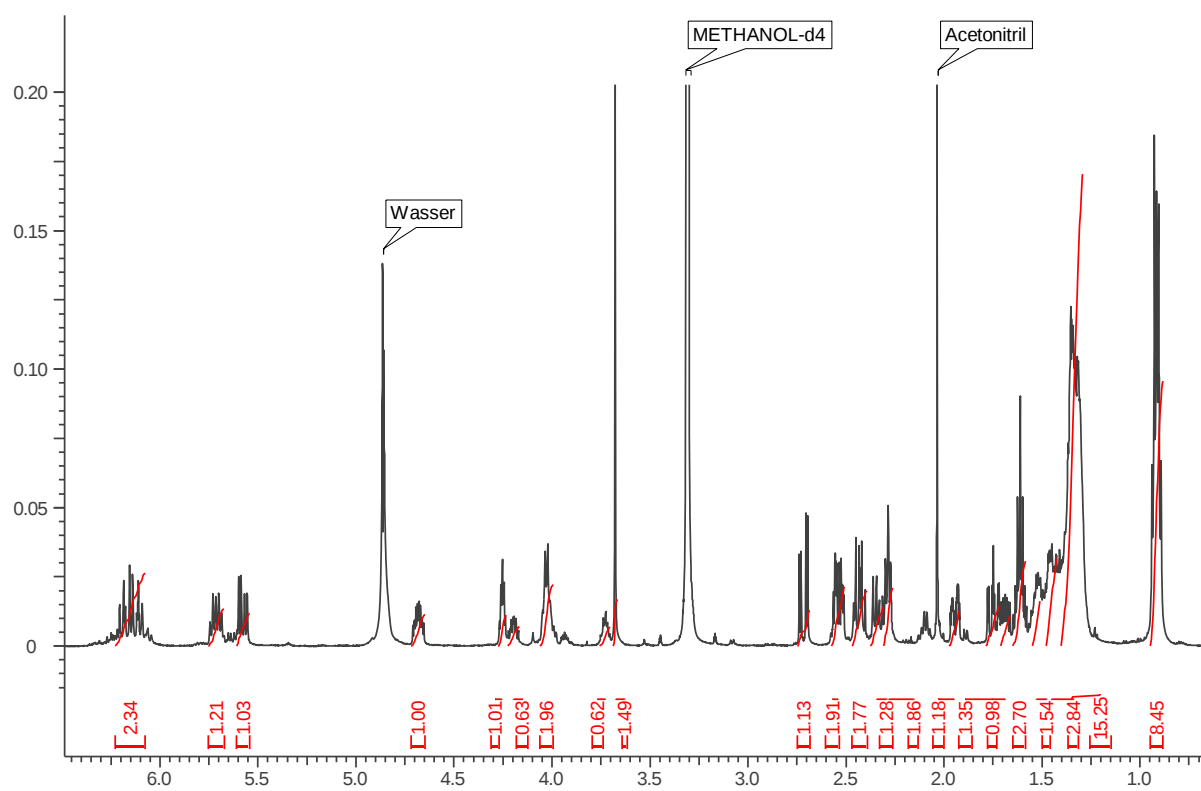
- (97) Jin, R.; Liao, H.; Liu, X.; Zheng, M.; Xiong, X.; Zhang, L.; Zhu, Y. *African J. Microbiol. Res.* **2012**, 6, 6545–6550.
- (98) Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itävaara, M. *Bioresour. Technol.* **2000**, 72, 169–183.
- (99) Nasini, G.; Arnone, A.; Assante, G.; Bava, A.; Moricca, S.; Ragazzi, A. *Phytochemistry* **2004**, 65, 2107–2111.
- (100) Zurlo, D.; Leone, C.; Assante, G.; Salzano, S.; Renzone, G.; Scaloni, A.; Foresta, C.; Colantuoni, V.; Lupo, A. *Mol. Carcinog.* **2013**, 52, 1–17.
- (101) De Bary, A. *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen, und Bakterien*; Engelmann: Leipzig, 1884.
- (102) Deshpande, M. S.; Rale, V. B.; Lynch, J. M. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, 14, 514–527.
- (103) Schoch, C. L.; Shoemaker, R. a.; Seifert, K. a.; Hambleton, S.; Spatafora, J. W.; Crous, P. W. *Mycologia* **2007**, 98, 1041–1052.
- (104) Zalar, P.; Gostincar, C.; de Hoog, G. S.; Ursic, V.; Sudhaddham, M.; Gunde-Cimerman, N. *Stud. Mycol.* **2008**, 61, 21–38.
- (105) Rekha, M. R.; Sharma, C. P. *Trends Biomater. Artif. Organs* **2007**, 20, 116–121.
- (106) Chi, Z.; Liu, Z.; Gao, L.; Gong, F.; Ma, C.; Wang, X.; Li, H. *J. Ocean Univ. China* **2006**, 5, 251–256.
- (107) Wang, L.; Chi, Z.; Wang, X.; Liu, Z.; Li, J. *Ann. Microbiol.* **2007**, 57, 495–501.
- (108) Ikai, K.; Takesako, K.; Shiomi, K.; Moriguchi, M.; Umeda, Y.; Yamamoto, J.; Kato, I. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1991**, 44, 925–933.
- (109) Shigemori, H.; Tenma, M.; Shimazaki, K.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 696–698.
- (110) Tan, R. X.; Zou, W. X. *Nat.. Prod. Rep..* **2001**, 18, 448–459.
- (111) Kurosawa, T.; Sakai, K.; Nakahara, T.; Oshima, Y.; Tabuchi, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, 58, 2057–2060.
- (112) Ehrlich, F. *Berichte der Dtsch. Chem. Gemeinschaft* **1912**, 45, 883–889.
- (113) Feldstein, A.; Chang, F. H.; Kucharski, J. M. *Life Sci.* **1970**, 9, 323–329.
- (114) Berrah, G.; Konetzka, W. *J. Bacteriol.* **1962**, 83, 738–744.

- (115) Halo, L. M.; Marshall, J. W.; Yakasai, A. a; Song, Z.; Butts, C. P.; Crump, M. P.; Heneghan, M.; Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Lazarus, C. M.; Cox, R. J. *Chembiochem* **2008**, 9, 585–594.
- (116) MCINNES, A. G.; SMITH, D. G.; WAT, C.-K.; VINING, L. C.; WRIGHT, J. L. C. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, 281–282.
- (117) Fisch, K. M.; Bakeer, W.; Yakasai, A. a; Song, Z.; Pedrick, J.; Wasil, Z.; Bailey, A. M.; Lazarus, C. M.; Simpson, T. J.; Cox, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 16635–16641.
- (118) Price, N. P. J.; Manitchotpisit, P.; Vermillion, K. E.; Bowman, M. J.; Leathers, T. D. *Carbohydr. Res.* **2013**, 370, 24–32.
- (119) Doshida, J.; Hasegawa, H.; Onuki, H. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1996**, 49, 1105–1109.
- (120) Manitchotpisit, P.; Watanapoksin, R.; Price, N. P. J.; Bischoff, K. M.; Tayeh, M.; Teeraworawit, S.; Kriwong, S.; Leathers, T. D. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, 30, 2199–2204.
- (121) Vesonder, R. F.; Stodola, F. H.; Rohwedder, W. K. *Can. J. Biochem.* **1972**, 50, 363–365.
- (122) Yvonne, R.; Keller, M.; Kluge, H.; Grabley, S.; Hammann, P. *Tetrahedron* **1991**, 47, 3335–3346.
- (123) Abdel-Lateff, A.; Elkhayat, E. S.; Fouad, M. A.; Okino, T. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, 4, 389–394.
- (124) Stierle, A. a; Stierle, D. B.; Girtsman, T. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 344–350.
- (125) Bandichhor, R.; Nosse, B.; Reiser, O. *Nat. Prod. Synth. 1* **2005**, 243, 43–72.
- (126) Anderson, J. R.; Edwards, R.L., Whalley, J. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, 1481–1485.
- (127) Liu, H.; Liu, S.; Guo, L.; Zhang, Y.; Cui, L.; Ding, G. *Molecules* **2012**, 17, 14015–14021.
- (128) Zhang, H.; Deng, Z.; Guo, Z.; Tu, X.; Wang, J.; Zou, K. *Molecules* **2014**, 19, 819–825.
- (129) Ahuja, M.; Chiang, Y.-M.; Chang, S.-L., Praseuth, M. B.; Entwistle, R.; Sanchez, J. F.; Lo, H.-C.; Yeh, H.-H.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 8212–8221.
- (130) Rubin-Pitel, S. B.; Zhang, H.; Vu, T.; Brunzelle, J. S.; Zhao, H.; Nair, S. K. *Chem. Biol.* **2008**, 15, 1079–1090.

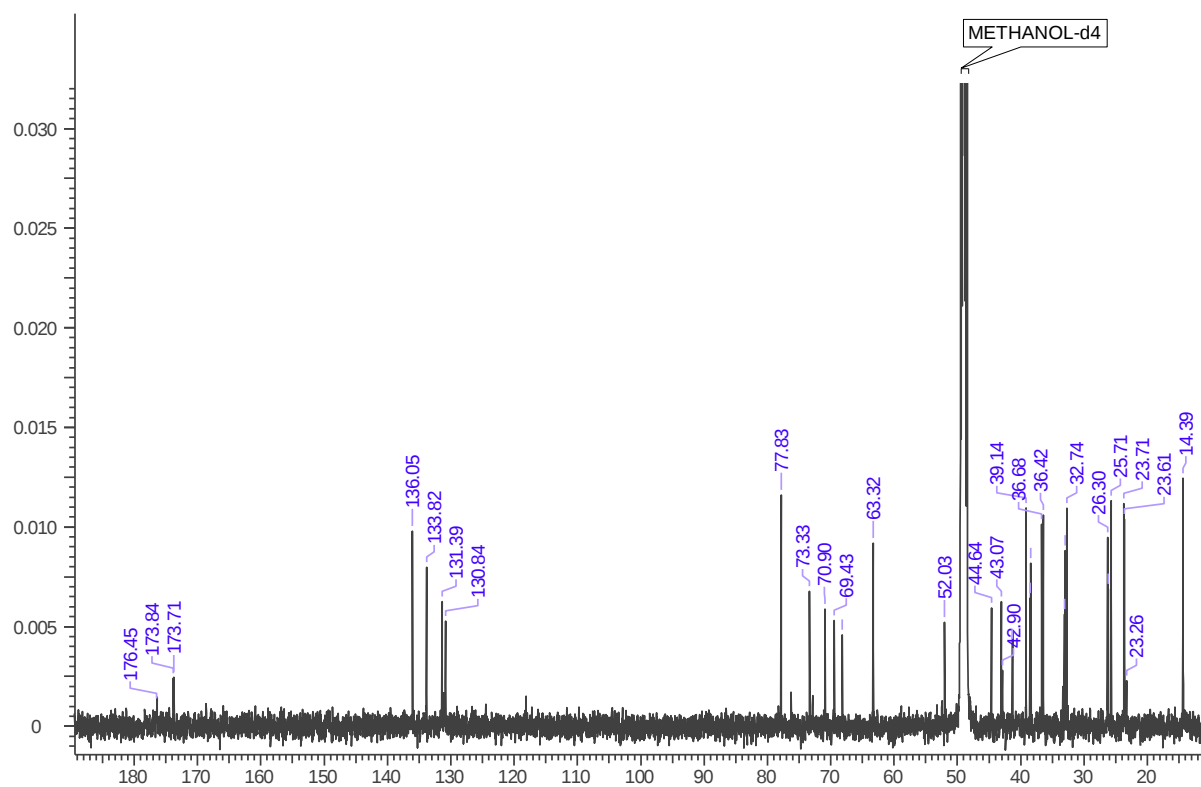
- (131) Fisch, K. M.; Skellam, E.; Ivison, D.; Cox, R. J.; Bailey, A. M.; Lazarus, C. M.; Simpson, T. J. *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, 46, 5331–5333.
- (132) Hertweck, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 4688–4716.
- (133) Schax, E.; Walter, J. G.; Märzhäuser, H.; Stahl, F.; Scheper, T.; Agard, D. A.; Eichner, S.; Kirschning, A.; Zeilinger, C. *J. Biotechnol.* **2014**, 180, 1–9.
- (134) Yakasai, A. a; Davison, J.; Wasil, Z.; Halo, L. M.; Butts, C. P.; Lazarus, C. M.; Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Cox, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10990–10998.
- (135) Matsumori, N.; Kaneno, D.; Murata, M.; Nakamura, H.; Tachibana, K. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 866–876.
- (136) Moore, M. C.; Cox, R. J.; Duffin, G. R.; David, O. *Tetrahedron* **1998**, 54, 9195–9206.
- (137) Eley, K. L.; Halo, L. M.; Song, Z.; Powles, H.; Cox, R. J.; Bailey, A. M.; Lazarus, C. M.; Simpson, T. J. *Chembiochem* **2007**, 8, 289–297.
- (138) Halo, L. M.; Heneghan, M. N.; Yakasai, A. a; Song, Z.; Williams, K.; Bailey, A. M.; Cox, R. J.; Lazarus, C. M.; Simpson, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 17988–17996.
- (139) Wat, C.; MCINNES, A. G.; SMITH, D. G.; WRIGHT, J. L. C.; VINING, L. C. *Can. J. Chem.* **1977**, 55, 4090–4098.
- (140) Dickinson, J. M.; Hanson, J. R.; Hitchcock, P. B.; Claydon, N. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1989**, 1, 1885–1887.
- (141) Schmidt, K.; Günther, W.; Stoyanova, S.; Schubert, B.; Li, Z.; Hamburger, M. *Org. Lett.* **2002**, 4, 197–199.
- (142) Schmidt, K.; Riese, U.; Li, Z.; Hamburger, M. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 378–383.
- (143) Kemami Wangun, H. V; Hertweck, C. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 1702–1705.
- (144) Bergmann, S.; Schümann, J.; Scherlach, K.; Lange, C.; Brakhage, A. a; Hertweck, C. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, 3, 213–217.
- (145) Weber, T.; Laiple, K. J.; Pross, E. K.; Textor, A.; Grond, S.; Welzel, K.; Pelzer, S.; Vente, A.; Wohlleben, W. *Chem. Biol.* **2008**, 15, 175–188.
- (146) Wasil, Z.; Pahirulzaman, K. a. K.; Butts, C.; Simpson, T. J.; Lazarus, C. M.; Cox, R. J. *Chem. Sci.* **2013**, 4, 3845–3856.
- (147) Mondol, M. A. M.; Kim, J. H.; Lee, M.; Tareq, F. S.; Lee, H.; Lee, Y.; Shin, H. J. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1606–1612.
- (148) Marfey, P. *Carlsb. Res. Commun.* **1984**, 49, 591–596.

- (149) Jahns, C. *Totalsynthese von Pellasoren A und Baceridin und Studien zur Totalsynthese der Aetheramide A und B*; Technische Informationsbibliothek und Universitätsbibliothek Hannover (TIB): Hannover, 2013.
- (150) Gieseler, M. T. *Totalsynthesen von Angiolam A und Baceridin und Studien zur enantioselektiven vinylogen Mukaiyama-Aldolreaktion*; Technische Informationsbibliothek und Universitätsbibliothek Hannover (TIB): Hannover, 2013.
- (151) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; Wong, W. R.; Linington, R. G.; Zhang, L.; Debonsi, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 1686–1699.
- (152) Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Health, B. S.; Yang, J. Y.; Kersten, R. D.; Van der Voort, M.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J. M.; Moore, B. S.; Laskin, J.; Dorrestein, P. C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, 109, E1743–1752.
- (153) MarinLit <http://www.chem.canterbury.ac.nz/marinlit/marinlit.shtml>.
- (154) Kwan, J. C.; Ratnayake, R.; Abboud, K. A.; Paul, V. J.; Luesch, H. J. *Org. Chem.* **2010**, 75, 8012–8023.
- (155) Orjala, J.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **1996**, 59, 427–430.
- (156) Kim, E. J.; Lee, J. H.; Choi, H.; Pereira, A. R.; Ban, Y. H.; Yoo, Y. J.; Kim, E.; Park, J. W.; Sherman, D. H.; Gerwick, W. H.; Yoon, Y. J. *Org. Lett.* **2012**, 14, 5824–5827.
- (157) Pereira, A. R.; Kale, A. J.; Fenley, A. T.; Byrum, T.; Debonsi, H. M.; Gilson, M. K.; Valeriote, F. A.; Moore, B. S.; Gerwick, W. H. *Chembiochem* **2012**, 13, 810–817.
- (158) Harrigan, G. G.; Luesch, H.; Yoshida, W. Y.; Moore, R. E.; Nagle, D. G.; Paul, V. P.; Mooberry, S. L.; Corbett, T. H.; Valeriote, F. A. *J. Nat. Prod.* **1998**, 61, 1075–1077.
- (159) Mooberry, S. L.; Leal, R. M.; Tinley, T. L.; Luesch, H.; Moore, R. E.; Corbett, T. H. *Int. J. Cancer* **2003**, 104, 512–521.
- (160) Mosmann, T. J. *Immunol. Methods* **1983**, 16, 55–63.
- (161) White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. *Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics*; 1990; pp. 315–322.
- (162) Gardes, M.; Bruns, T. D. *Mol. Ecol.* **1993**, 2, 113–118.
- (163) Smoot, M. E.; Ono, K.; Ruscheinski, J.; Wang, P.-L.; Ideker, T. *Bioinformatics* **2011**, 27, 431–432.

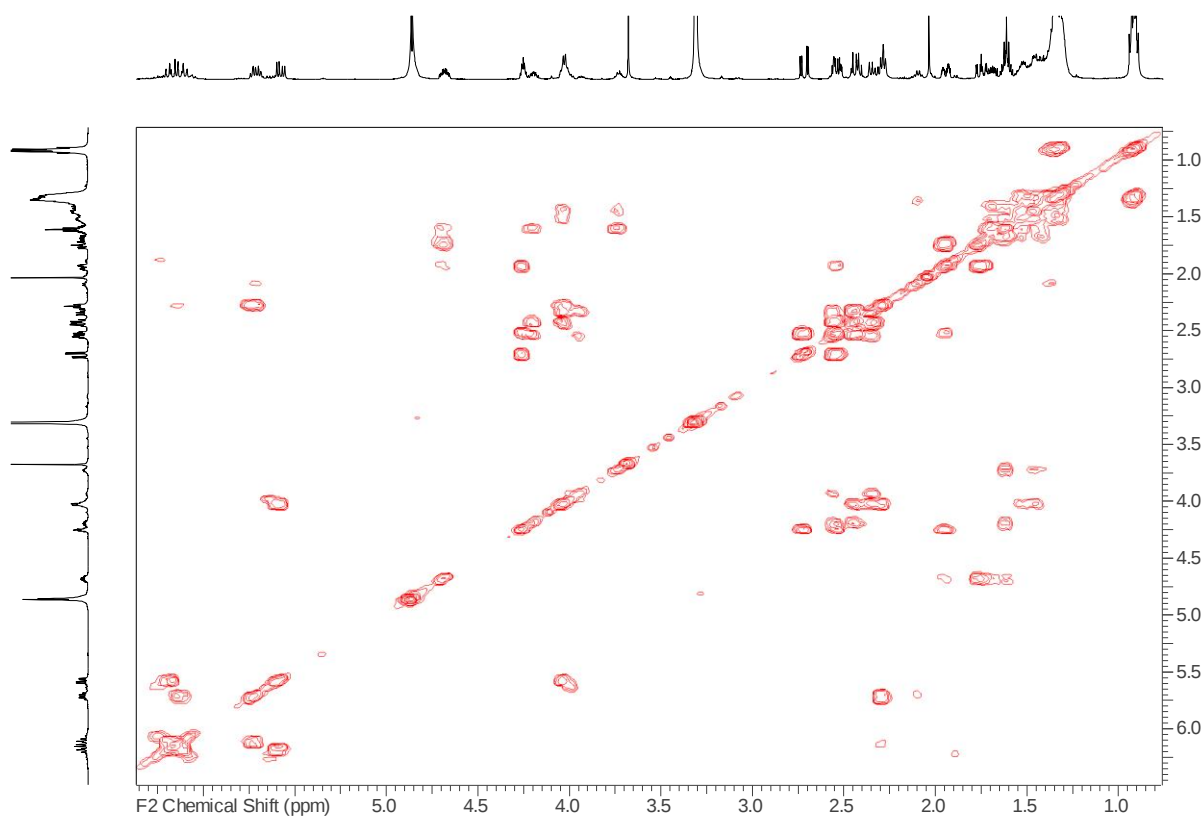
Spektrenanhang



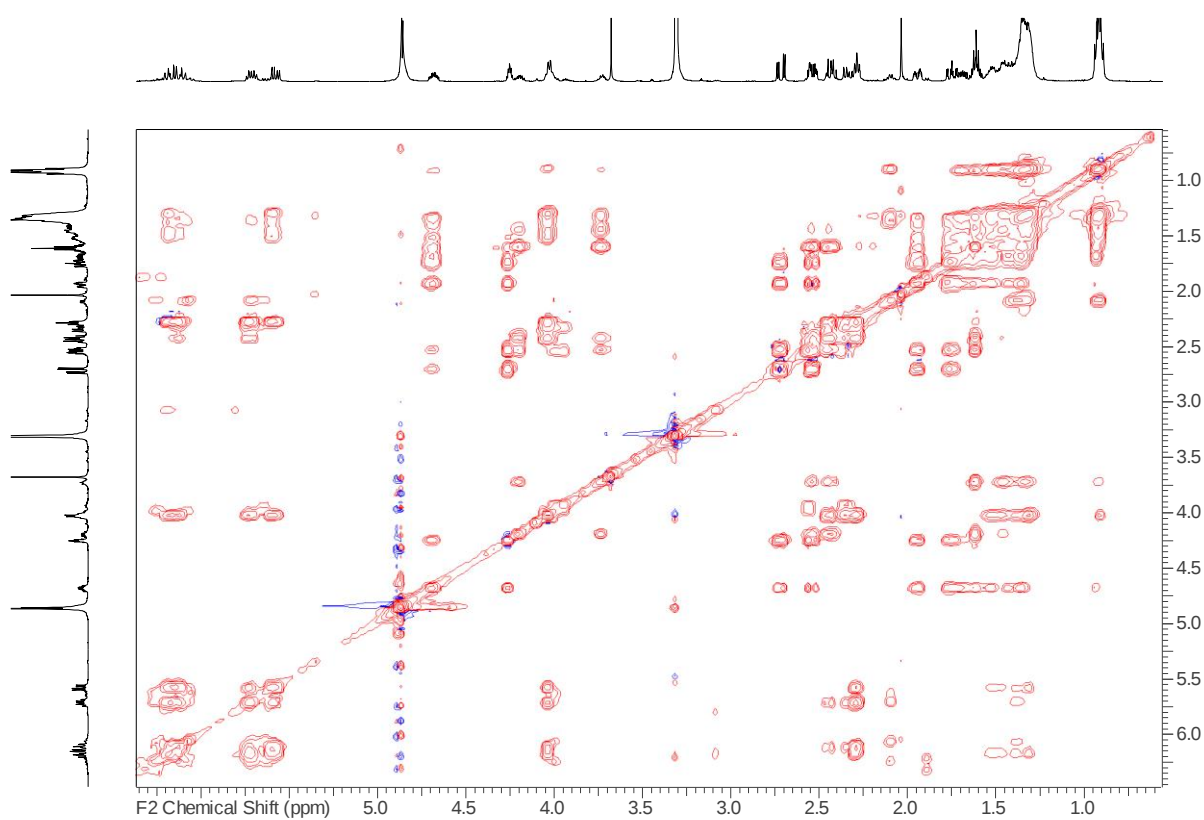
Spektrum 1: ^1H -NMR-Spektrum der Fraktion AWH2B1 (MeOD, 500 MHz) (siehe Abschnitt 2.4.3.1)



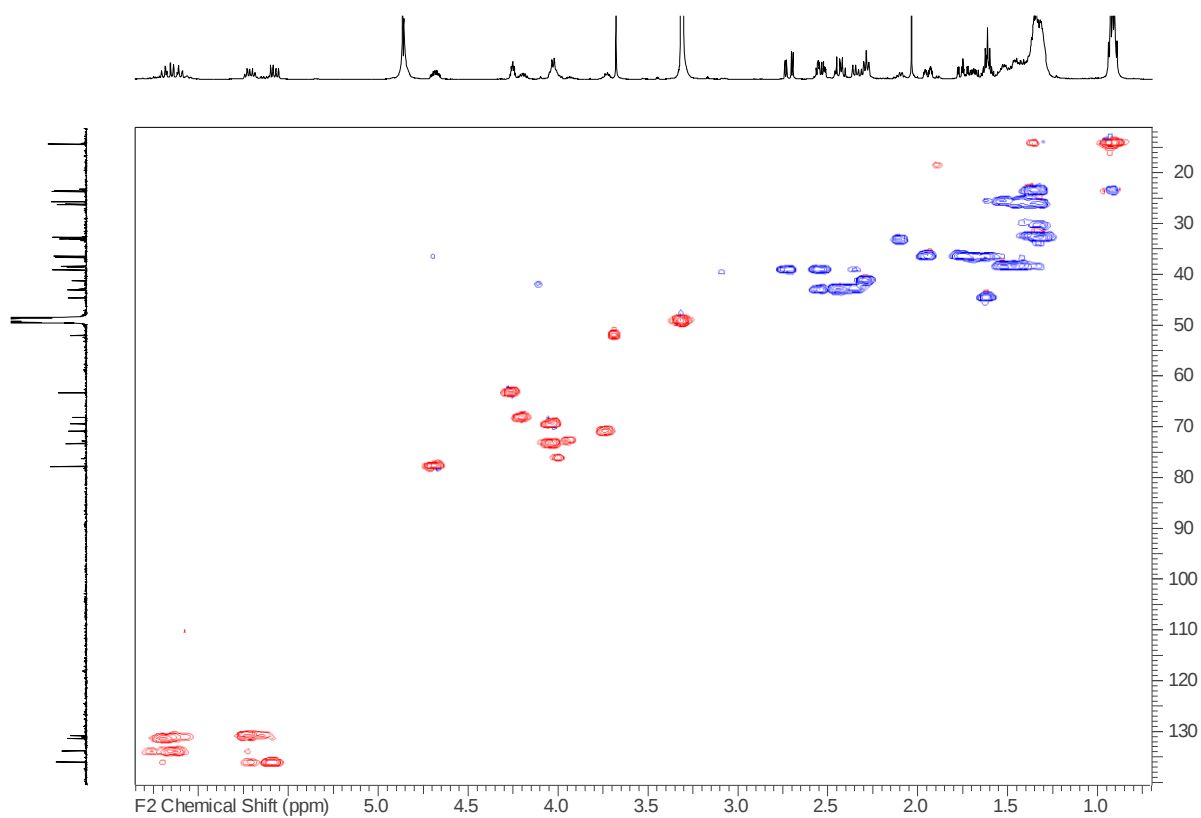
Spektrum 2: ^{13}C -NMR-Spektrum der Fraktion AWH2BR1 (MeOD, 125 MHz) (siehe Abschnitt 2.4.3.1)



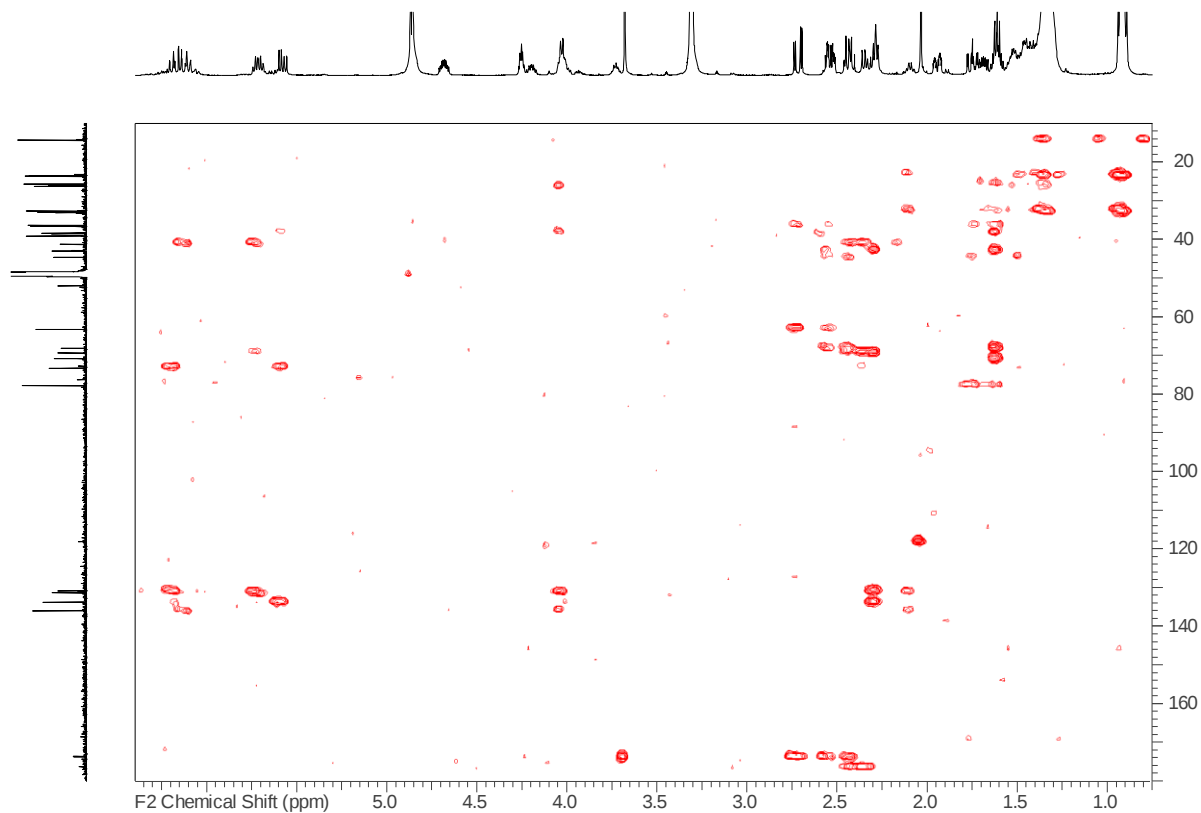
Spektrum 3: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum der Fraktion AWH2BR1 (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz) (siehe Abschnitt 2.4.3.1)



Spektrum 4: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR Spektrum der Fraktion AWH2BR1 (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz) (siehe Abschnitt 2.4.3.1)



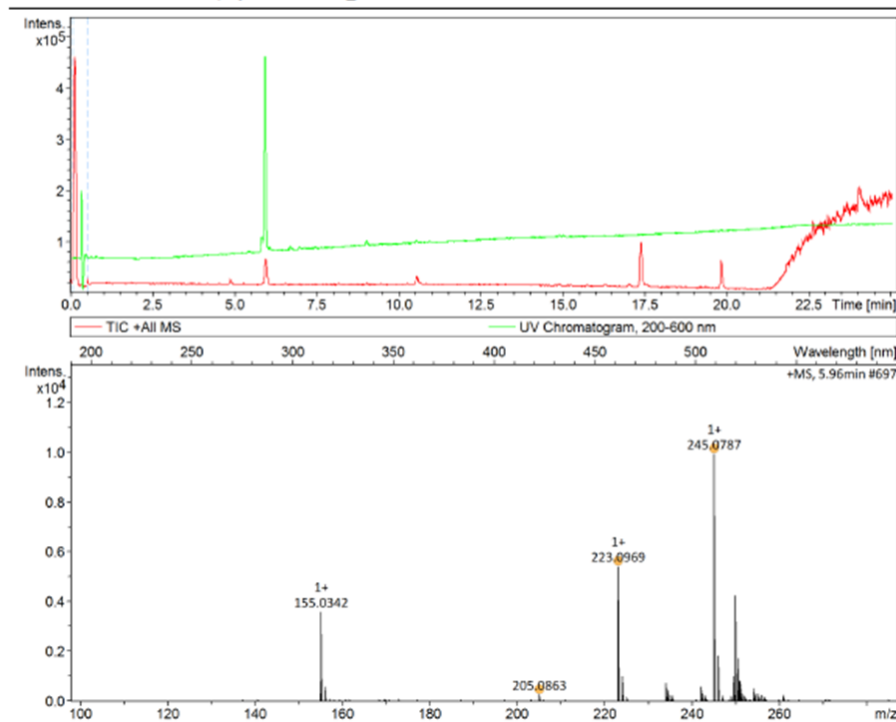
Spektrum 5: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum der Fraktion AWH2BR1 (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz, ^{13}C -NMR 125 MHz) (siehe Abschnitt 2.4.3.1)



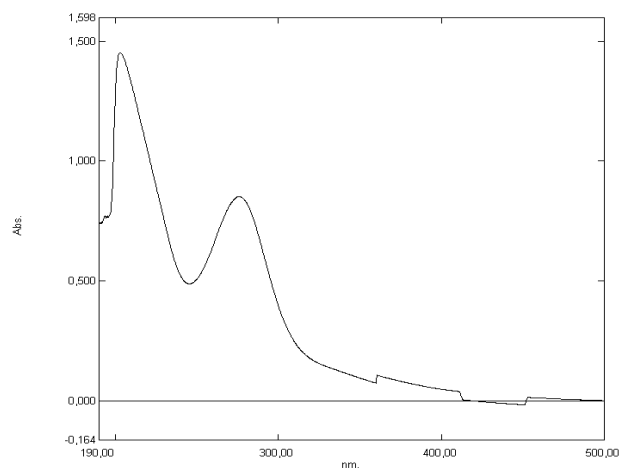
Spektrum 6: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum der Fraktion AWH2BR1 (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz, ^{13}C -NMR 125 MHz) (siehe Abschnitt 2.4.3.1)

Analysis Info

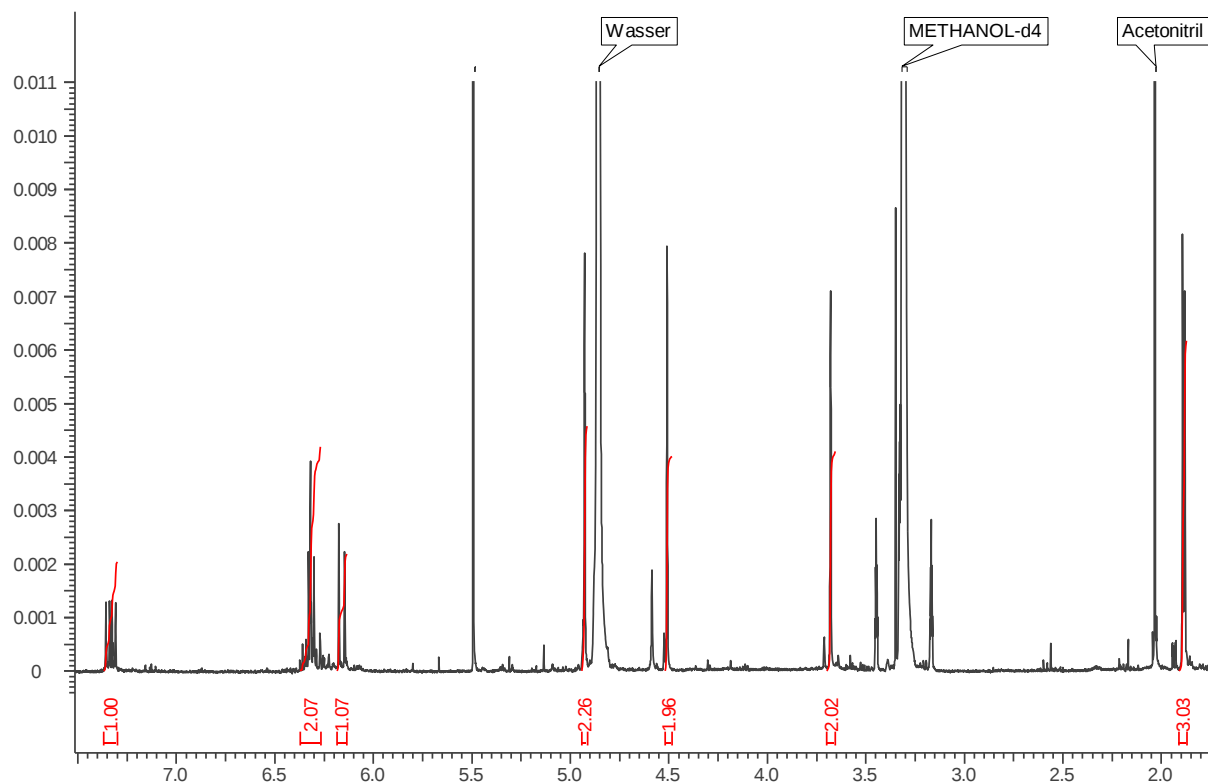
Analysis Name	\neon\IMCHCOM\MAXIS-MS\IMCH\2013\13_12_ANW11\Maxis\AWG1A2_1mg-mL_3_01_12317.d		
Method	pos_screening_ms_100_2500_saeure_onlyms.m	Operator	ate08
Sample Name	AWG1A2_1mg-mL	Instrument	maXis
Comment	Screening01 Waters Acquity UPLC BEH C ₁₈ 1,7µm 2.1x50mm		



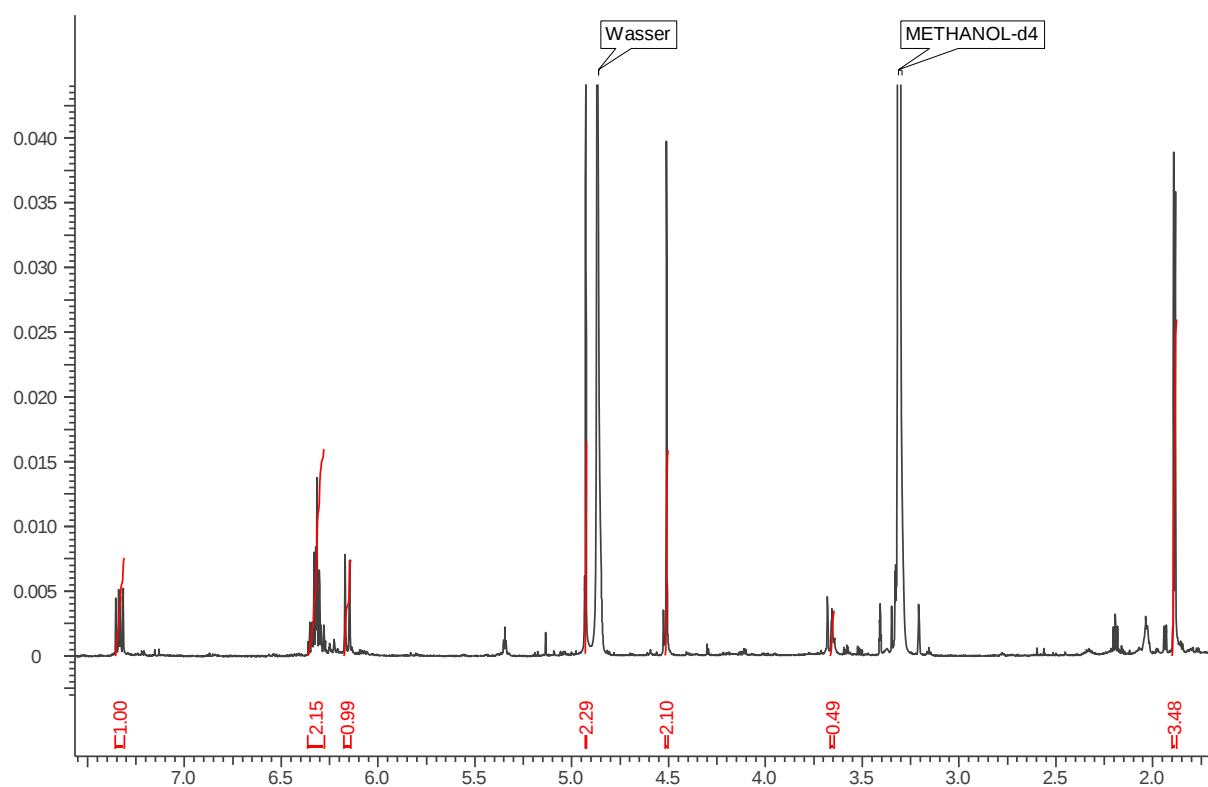
Spektrum 7: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff **1**



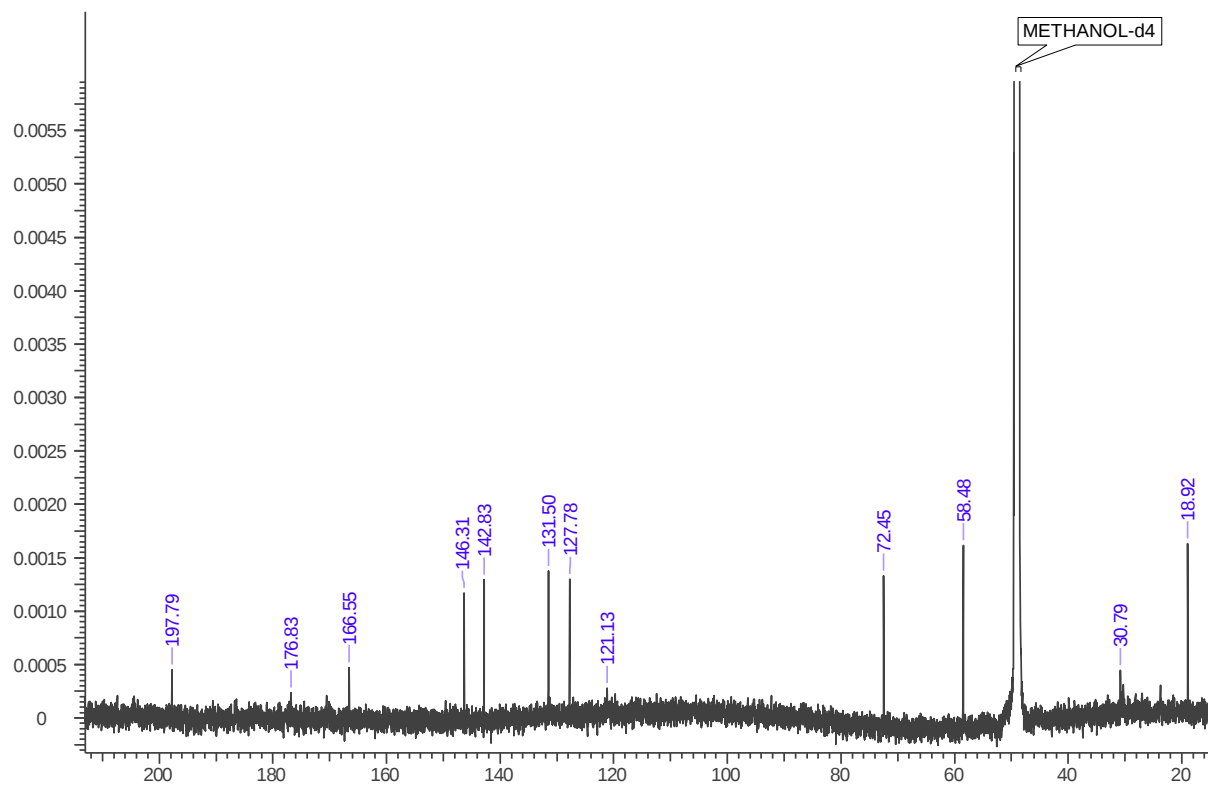
Spektrum 8: UV/Vis-Spektrum von Naturstoff **1**



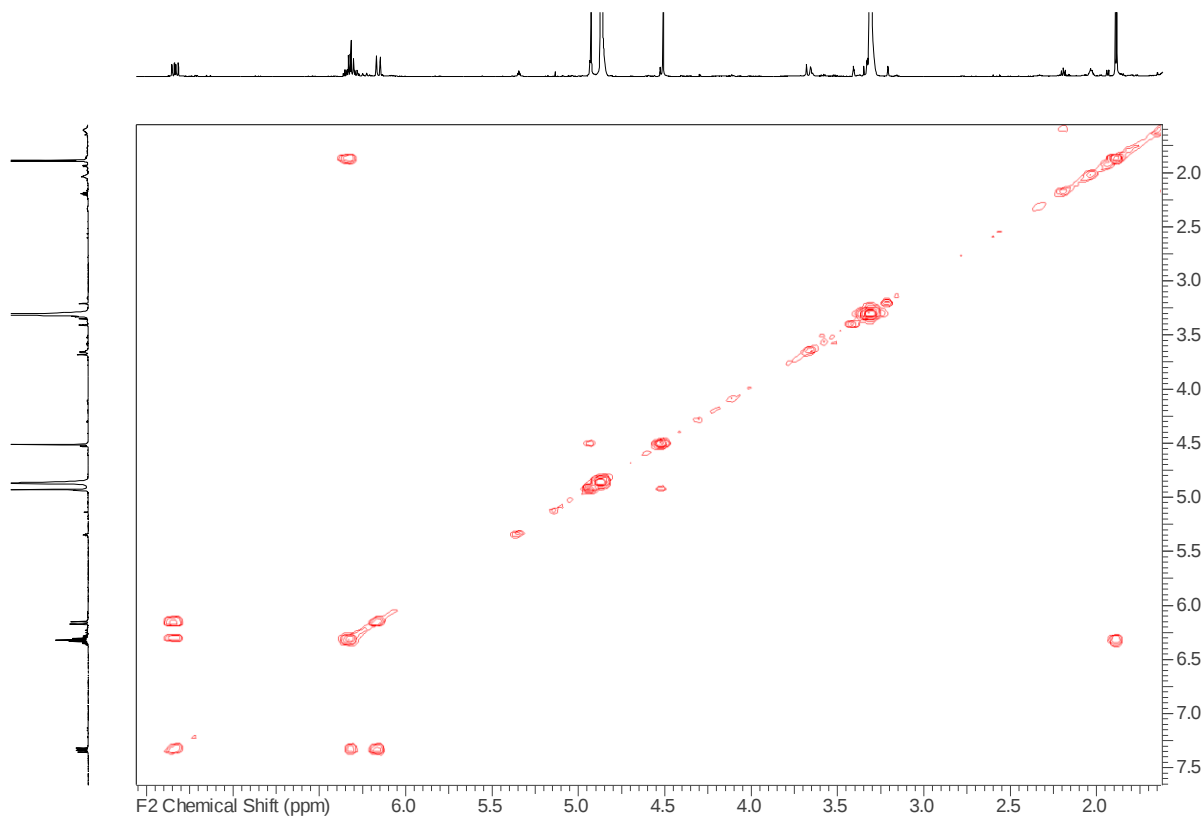
Spektrum 9: ¹H-NMR-Spektrum von Naturstoff **1** (direkte Messung nach Isolierung, acide Protonen an C-5 noch nicht gegen Deuterium ausgetauscht) (MeOD, 700 MHz)



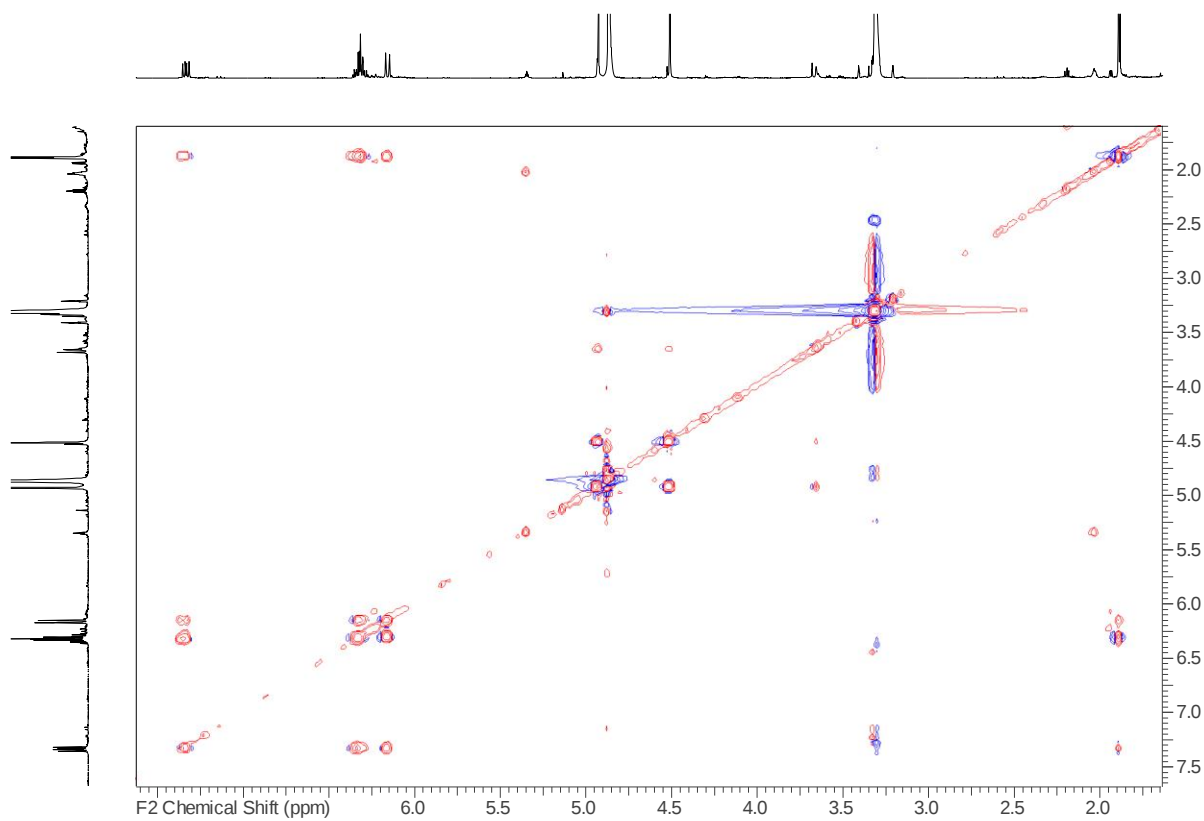
Spektrum 10: ¹H-NMR-Spektrum von Naturstoff **1** (MeOD, 700 MHz)



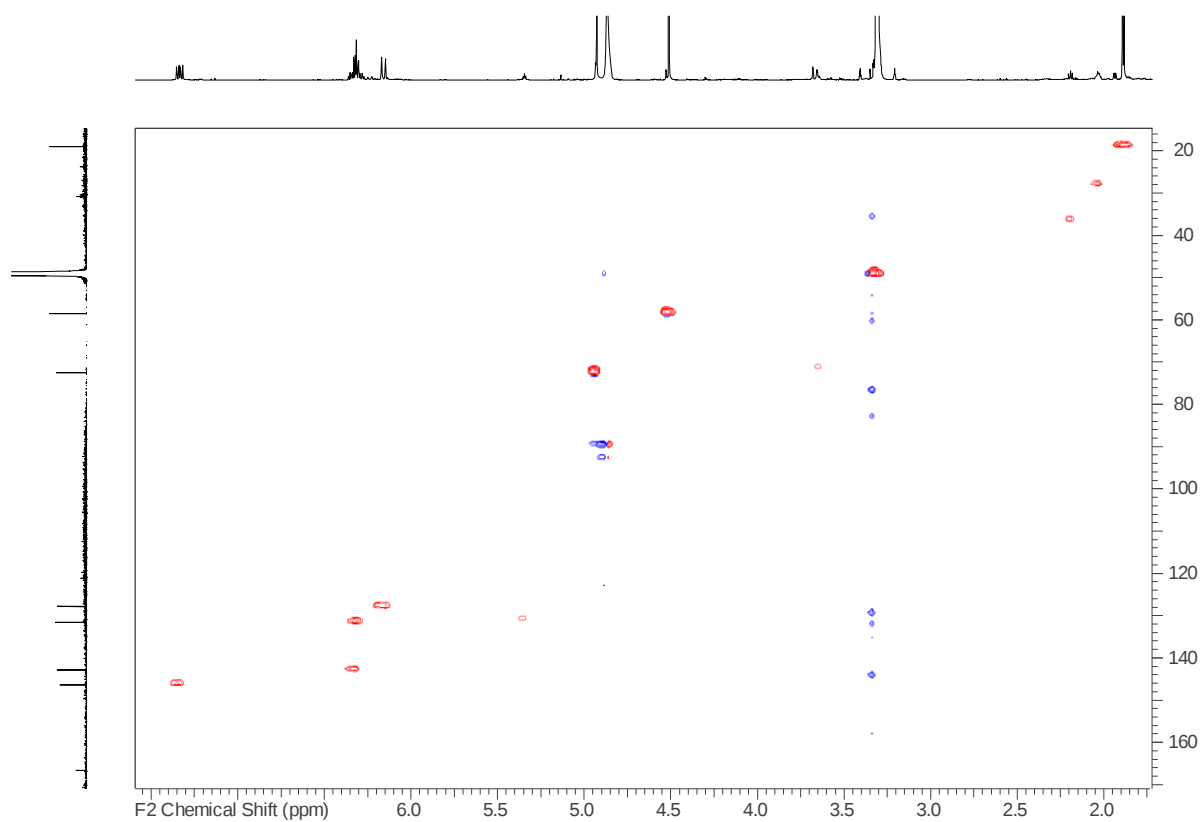
Spektrum 11: ^{13}C -NMR von Naturstoff **1** (MeOD, 175 MHz)



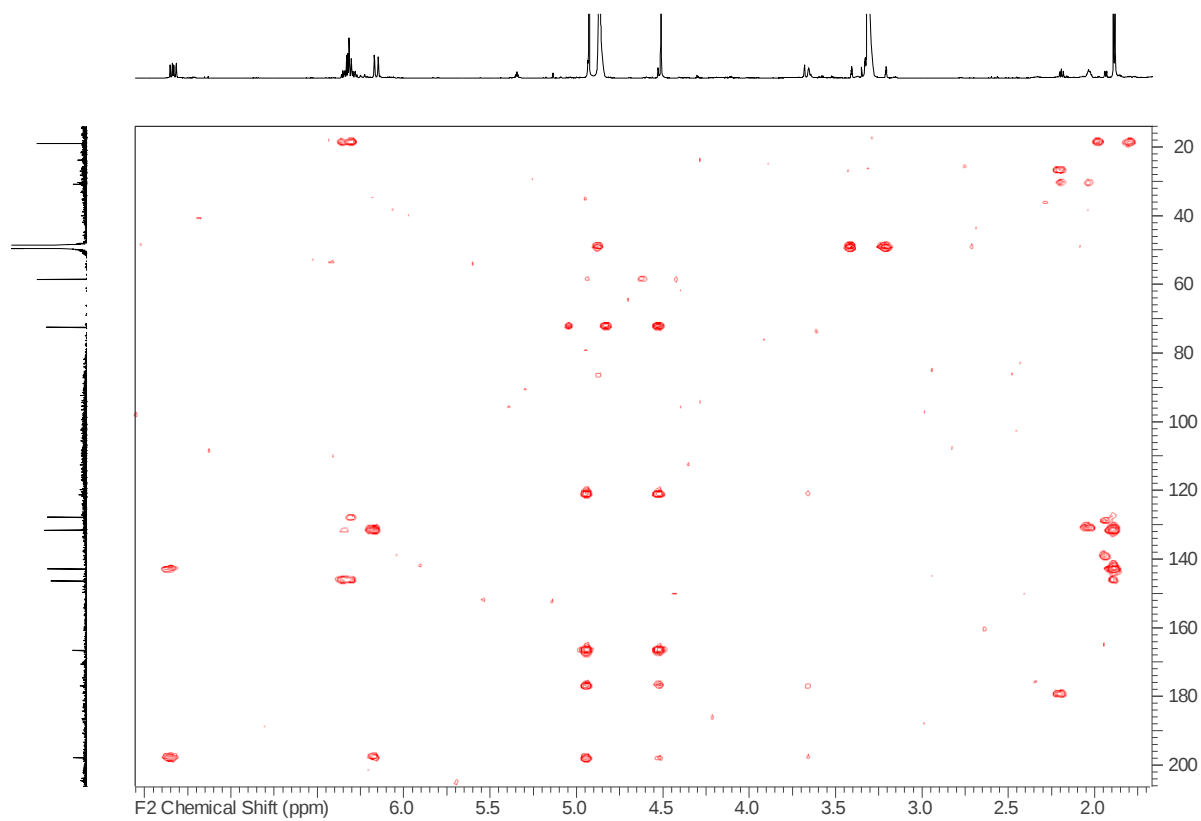
Spektrum 12: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **2** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



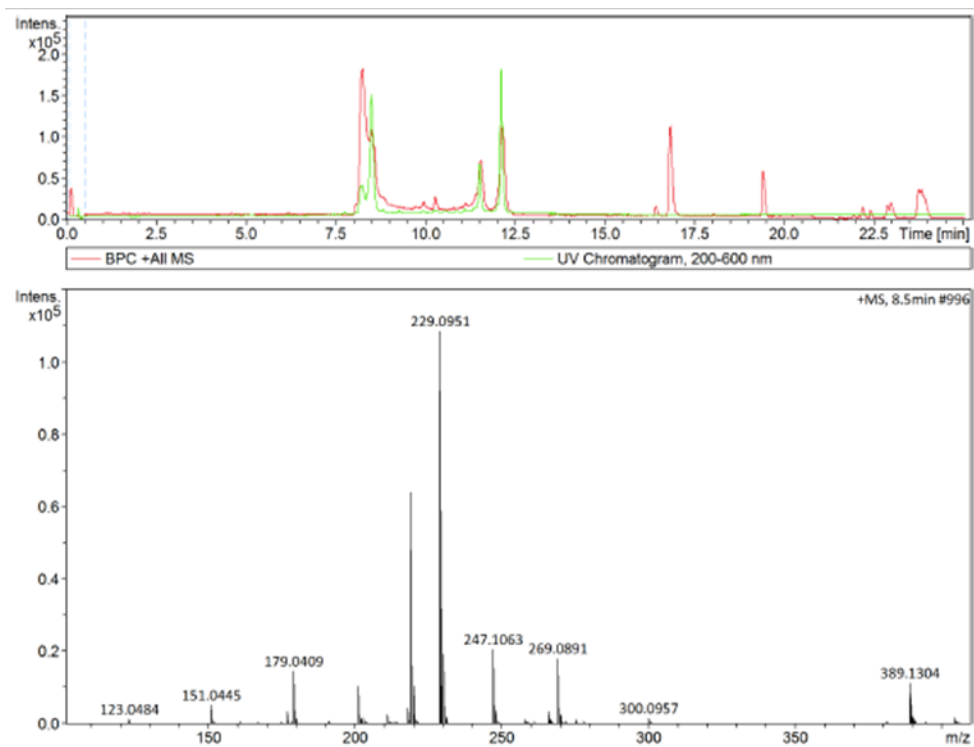
Spektrum 13: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **1** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



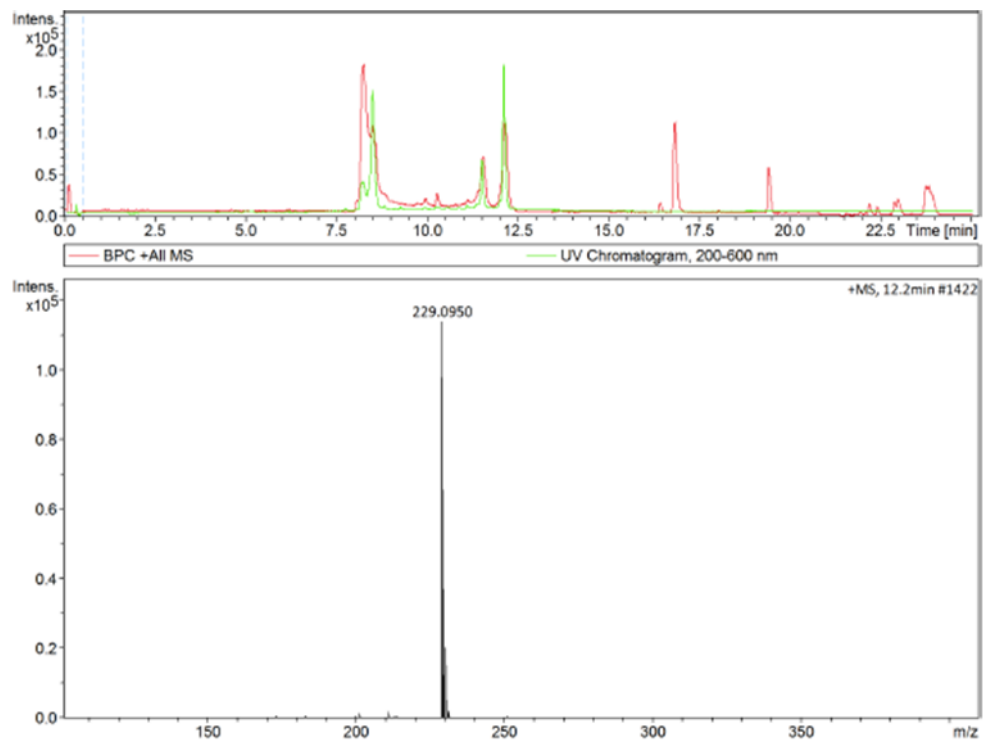
Spektrum 14: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Naturstoff **1** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



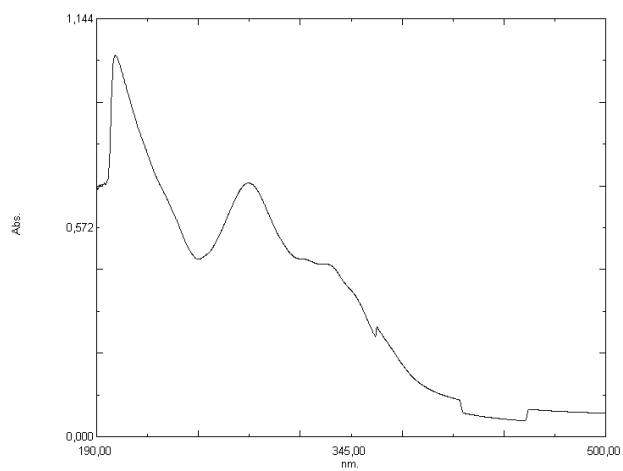
Spektrum 15: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von Naturstoff **1** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



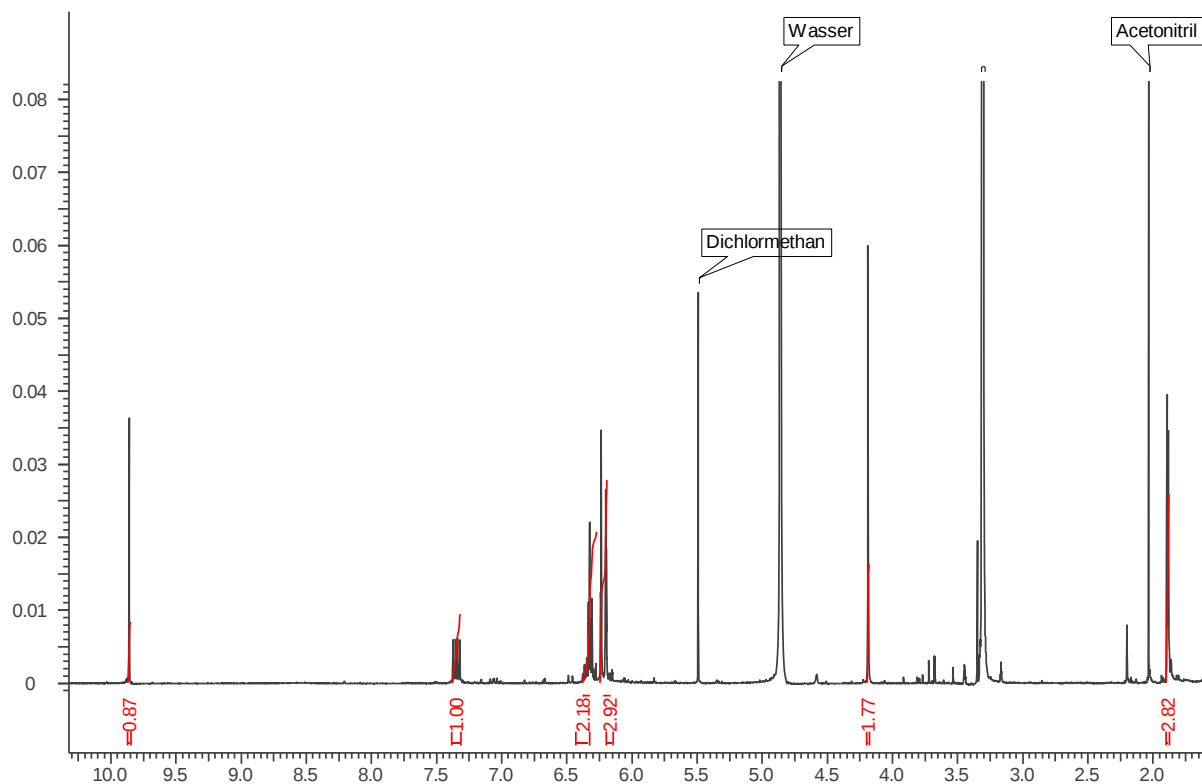
Spektrum 16: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff **2** (Retentionszeit 8.5 min)



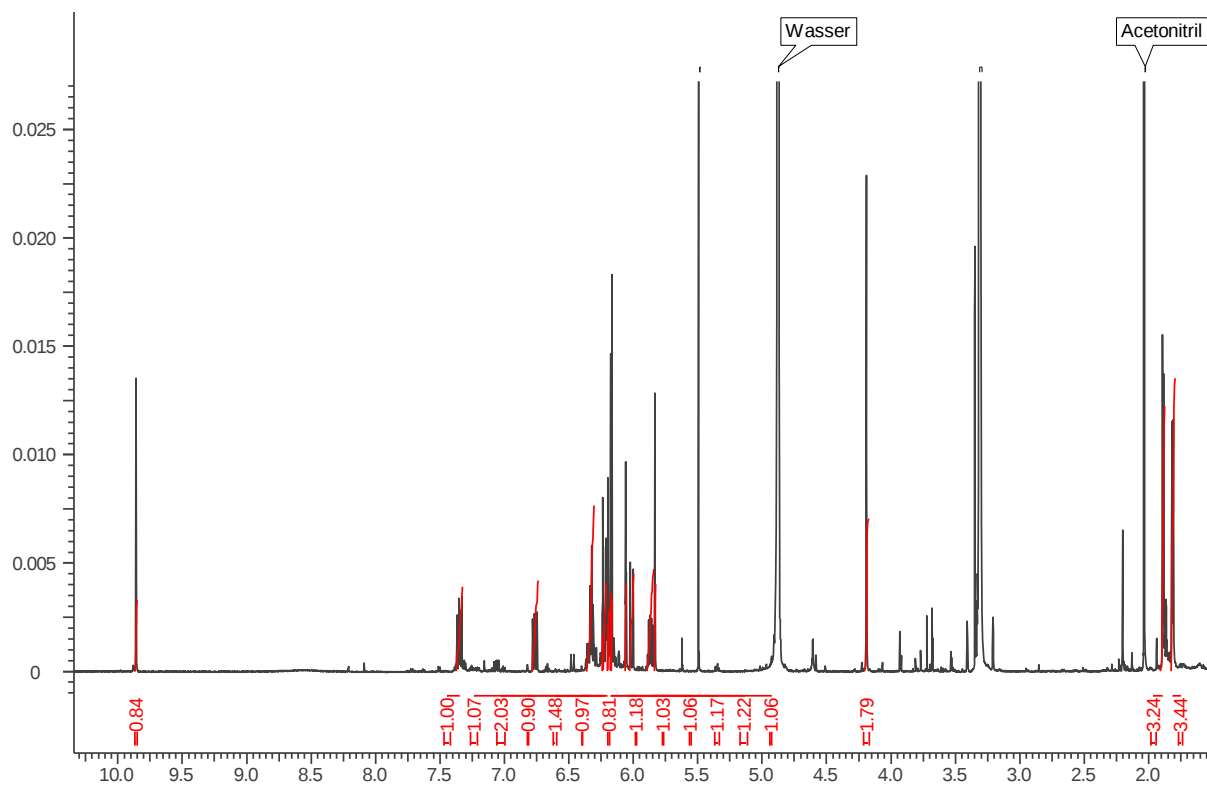
Spektrum 17: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff **2** (Retentionszeit 12.2 min)



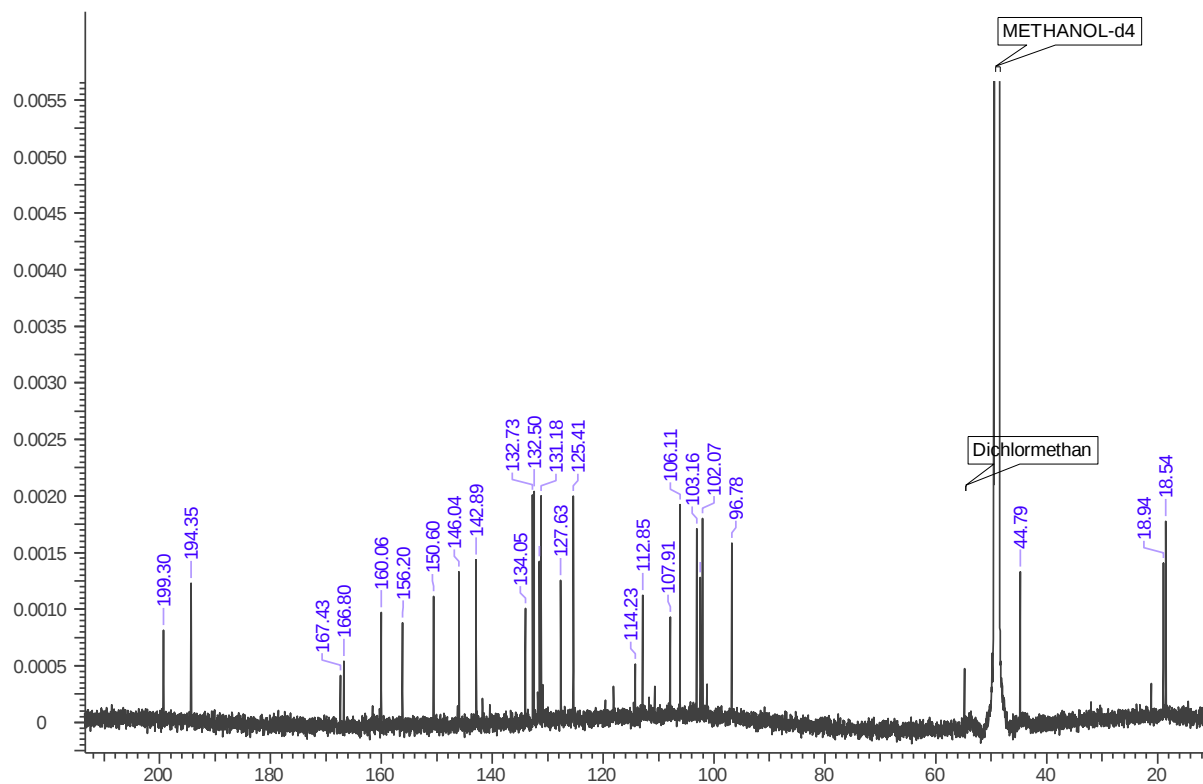
Spektrum 18: UV/Vis-Spektrum von Naturstoff **2**



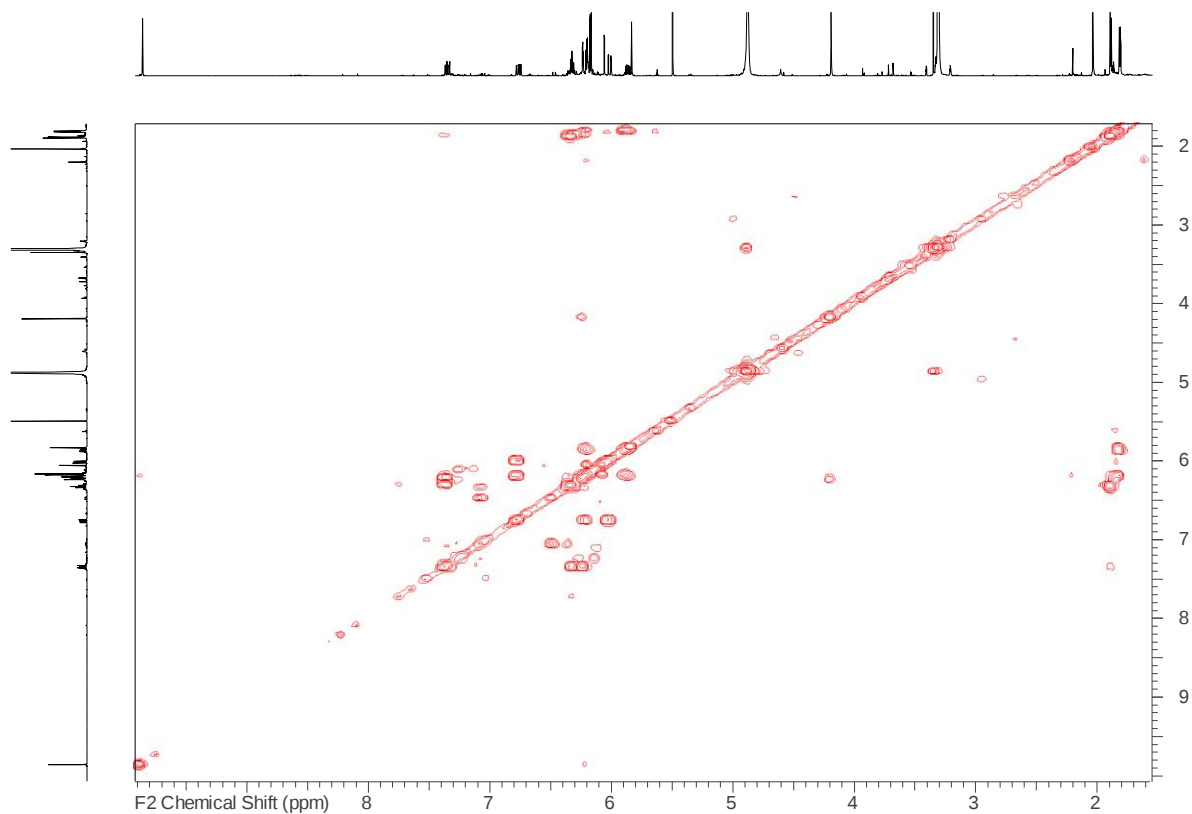
Spektrum 19: ^1H -NMR-Spektrum von Naturstoff **2** (direkte Messung nach Isolierung, noch keine Tautomerisierung erkennbar) (MeOD, 500 MHz)



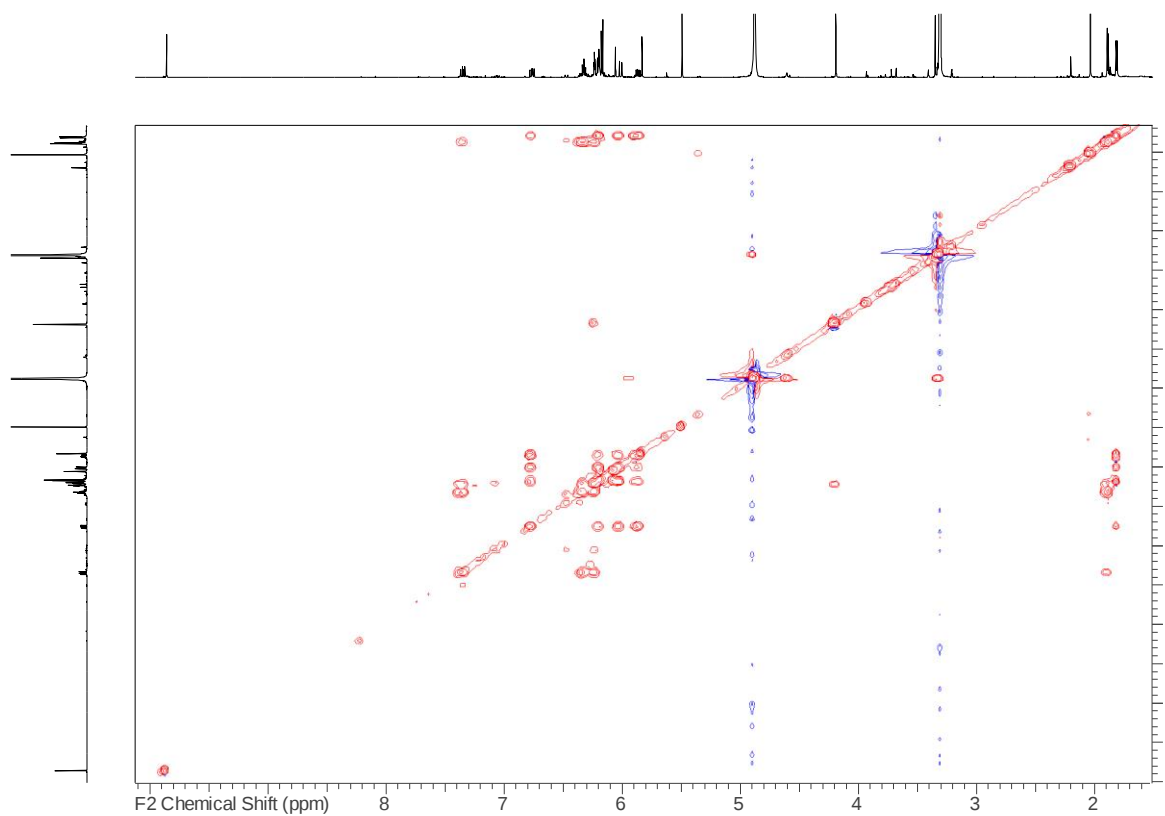
Spektrum 20: ^1H -NMR-Spektrum von Naturstoff **2** + Tautomerisierungsprodukt **2*** (MeOD, 700 MHz)



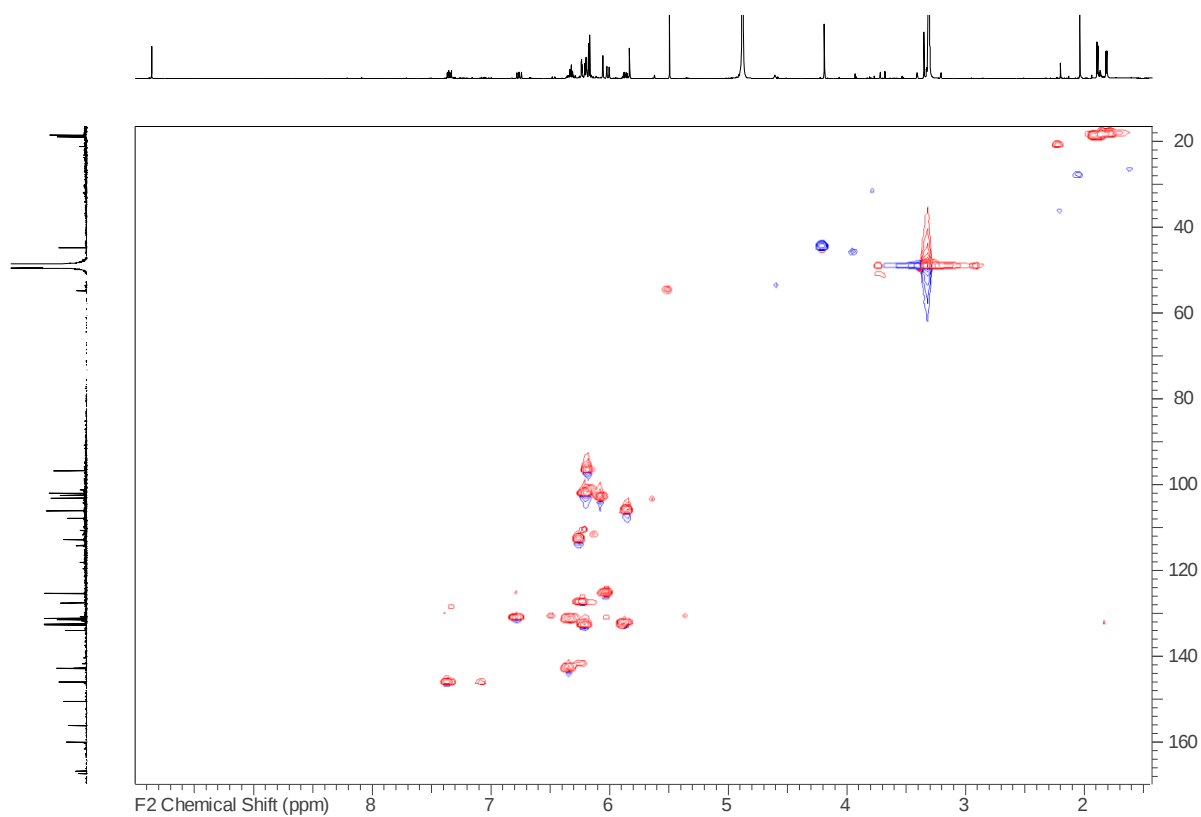
Spektrum 21: ^{13}C -NMR-Spektrum von Naturstoff **2** + Tautomerisierungsprodukt **2*** (MeOD, 175 MHz)



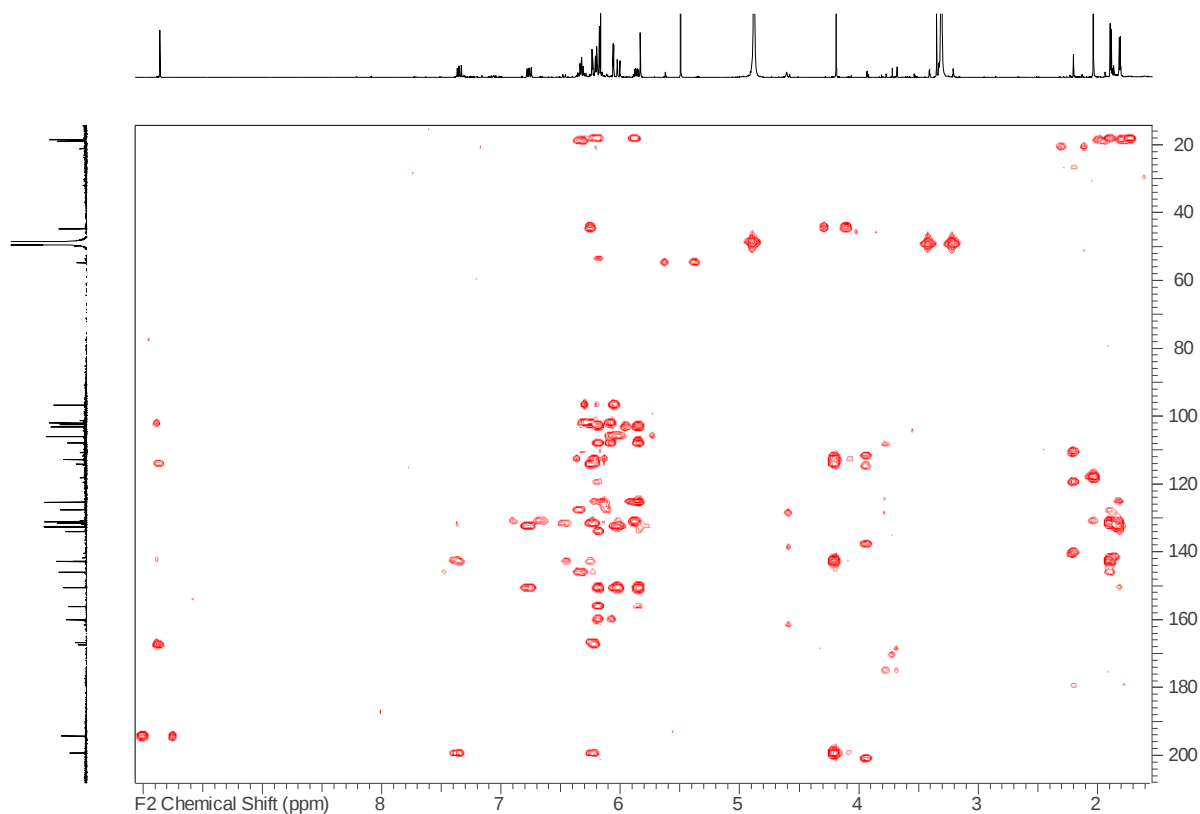
Spektrum 22: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **2** + Tautomerisierungsprodukt **2*** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



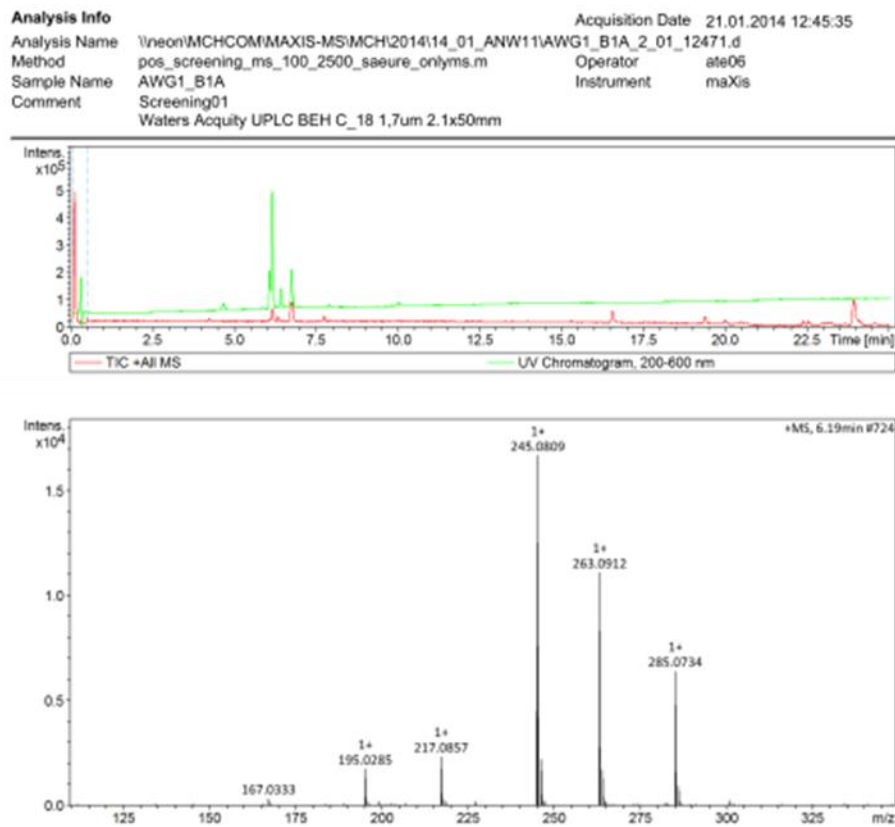
Spektrum 23: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR Spektrum von Naturstoff **2** + Tautomerisierungsprodukt **2*** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



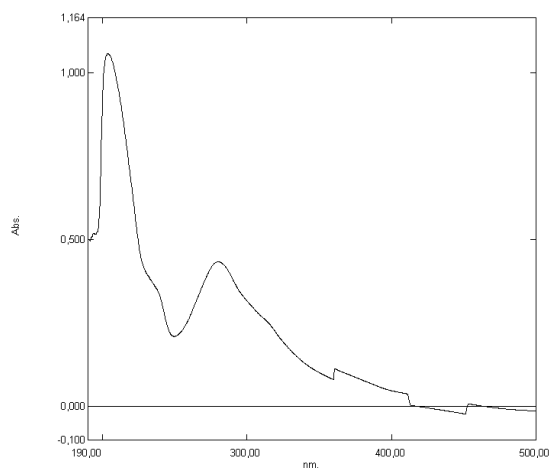
Spektrum 24: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Naturstoff **2** + Tautomerisierungsprodukt **2*** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



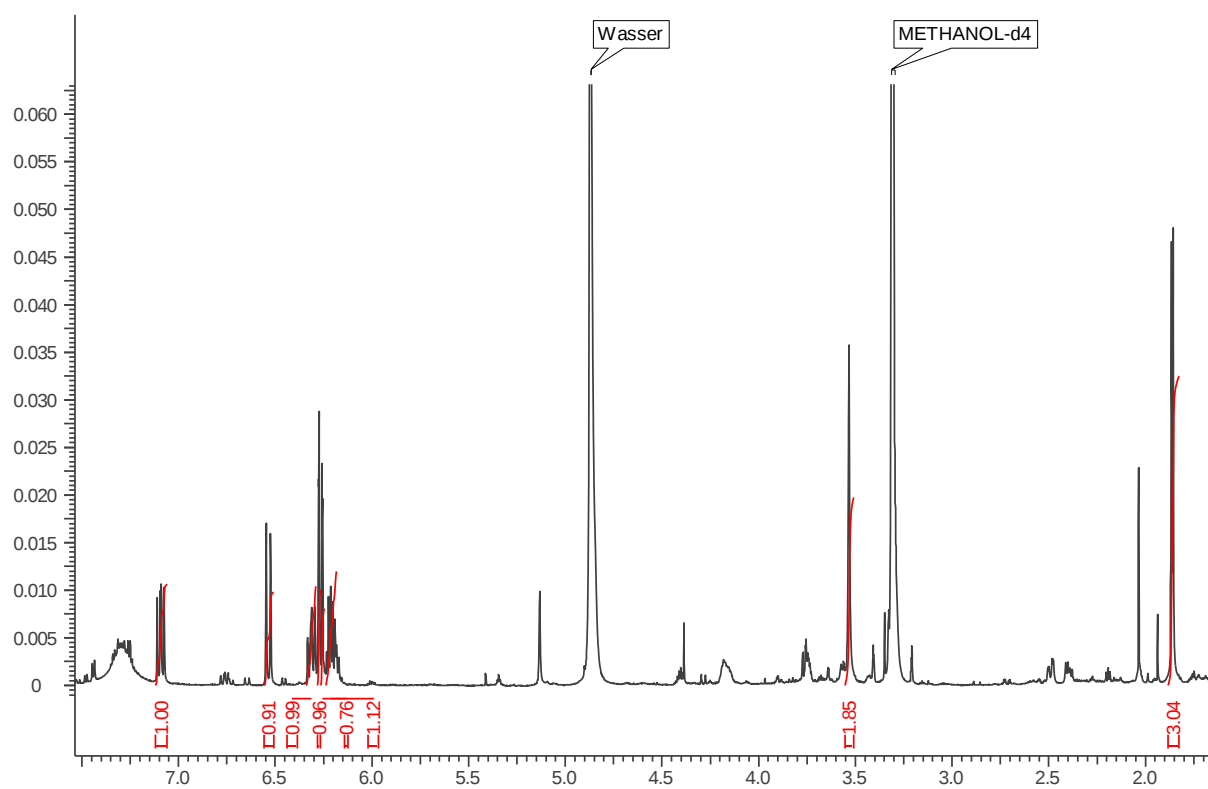
Spektrum 25: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von Naturstoff **2** + Tautomerisierungsprodukt **2*** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



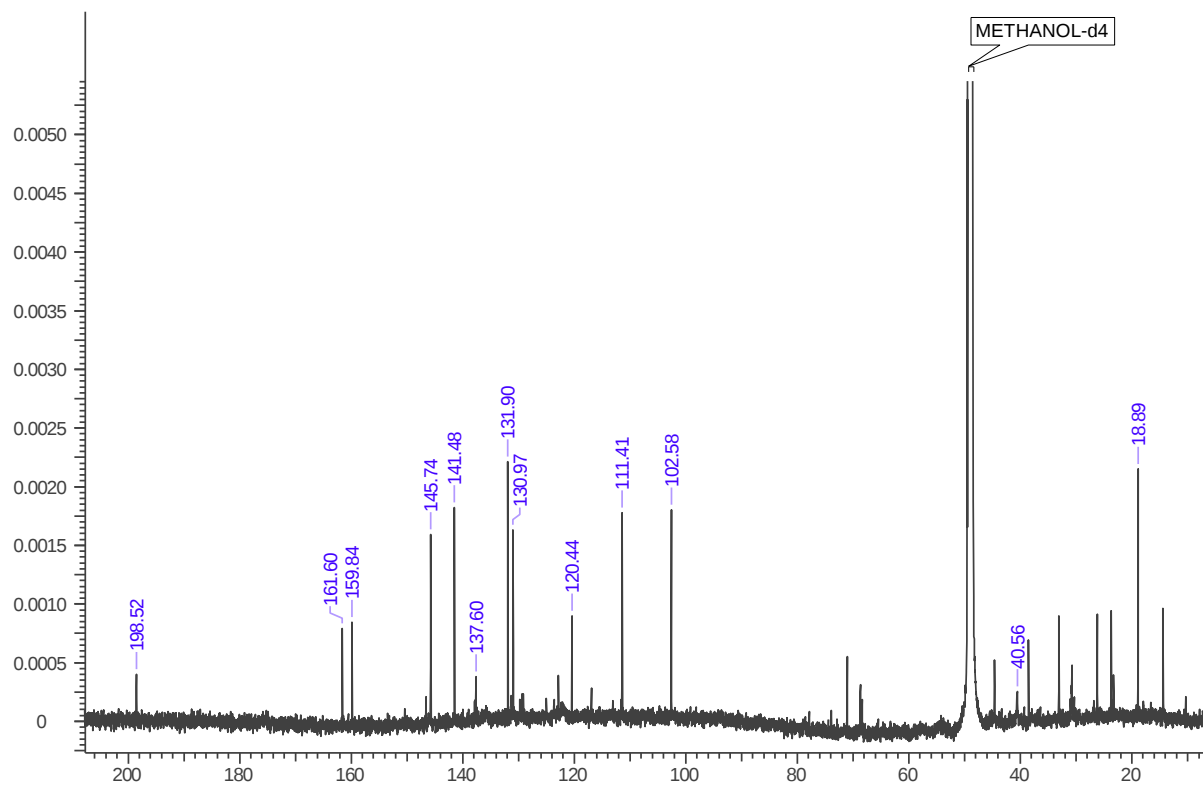
Spektrum 26: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff **3**



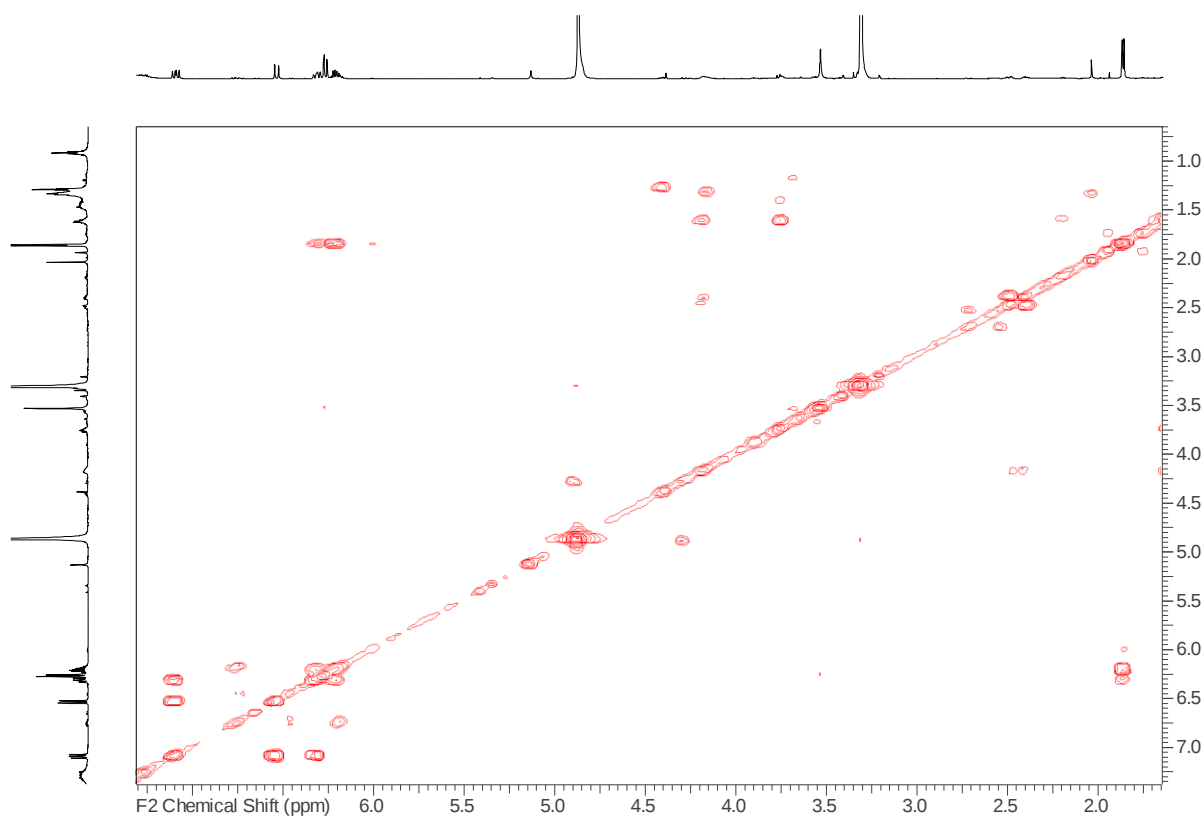
Spektrum 27: UV/Vis-Spektrum von Naturstoff **3**



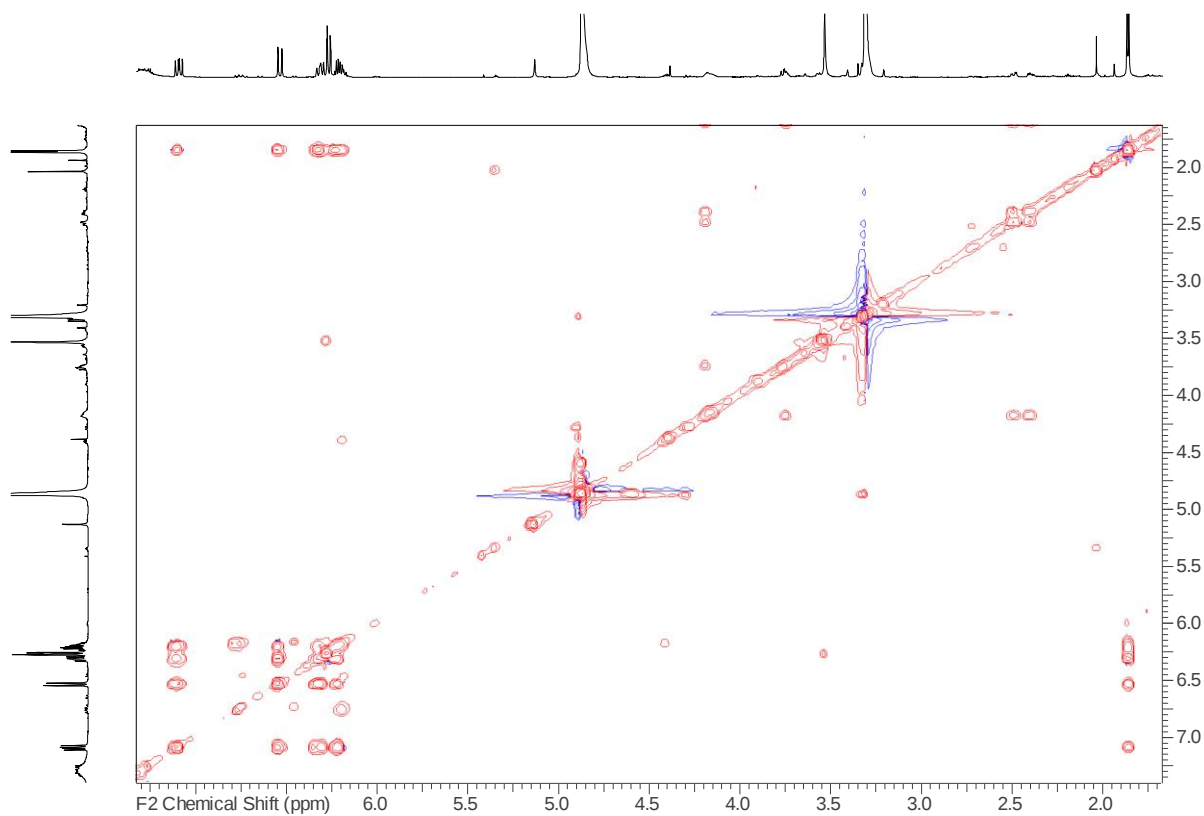
Spektrum 28: ¹H-NMR-Spektrum von Naturstoff **3** (MeOD, 700 MHz)



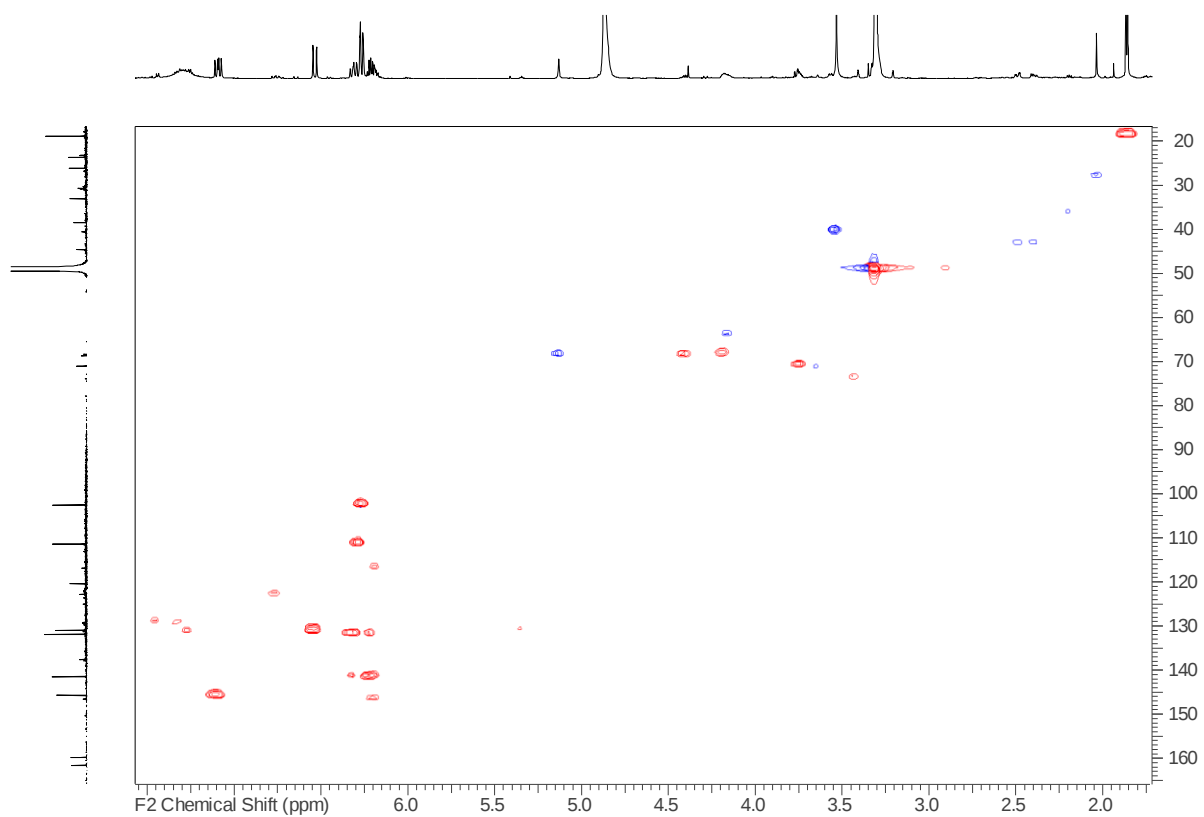
Spektrum 29: ¹³C-NMR-Spektrum von Naturstoff **3** (MeOD, 175 MHz)



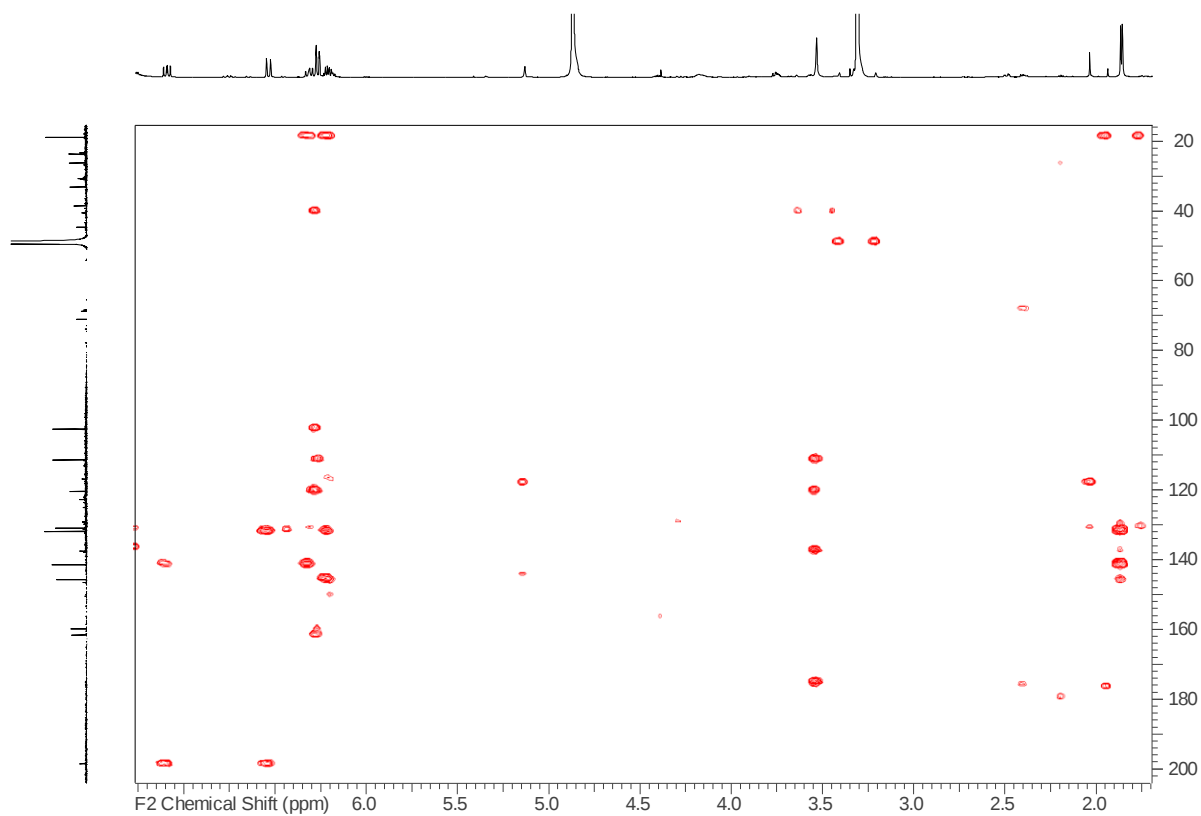
Spektrum 30: ¹H, ¹H-COSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **3** (MeOD, ¹H-NMR 700 MHz)



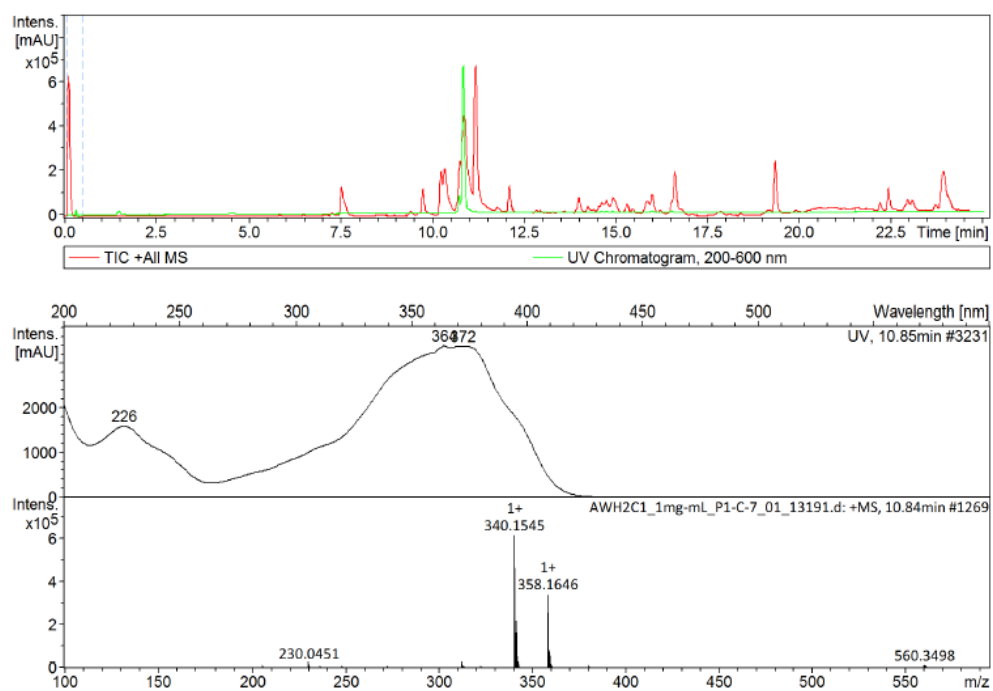
Spektrum 31: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR Spektrum von Naturstoff **3** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



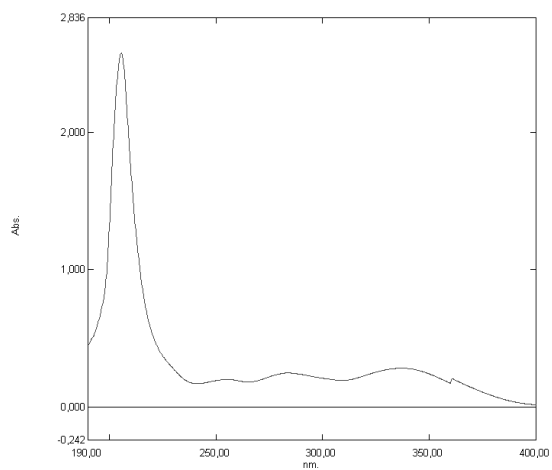
Spektrum 32: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Naturstoff **3** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



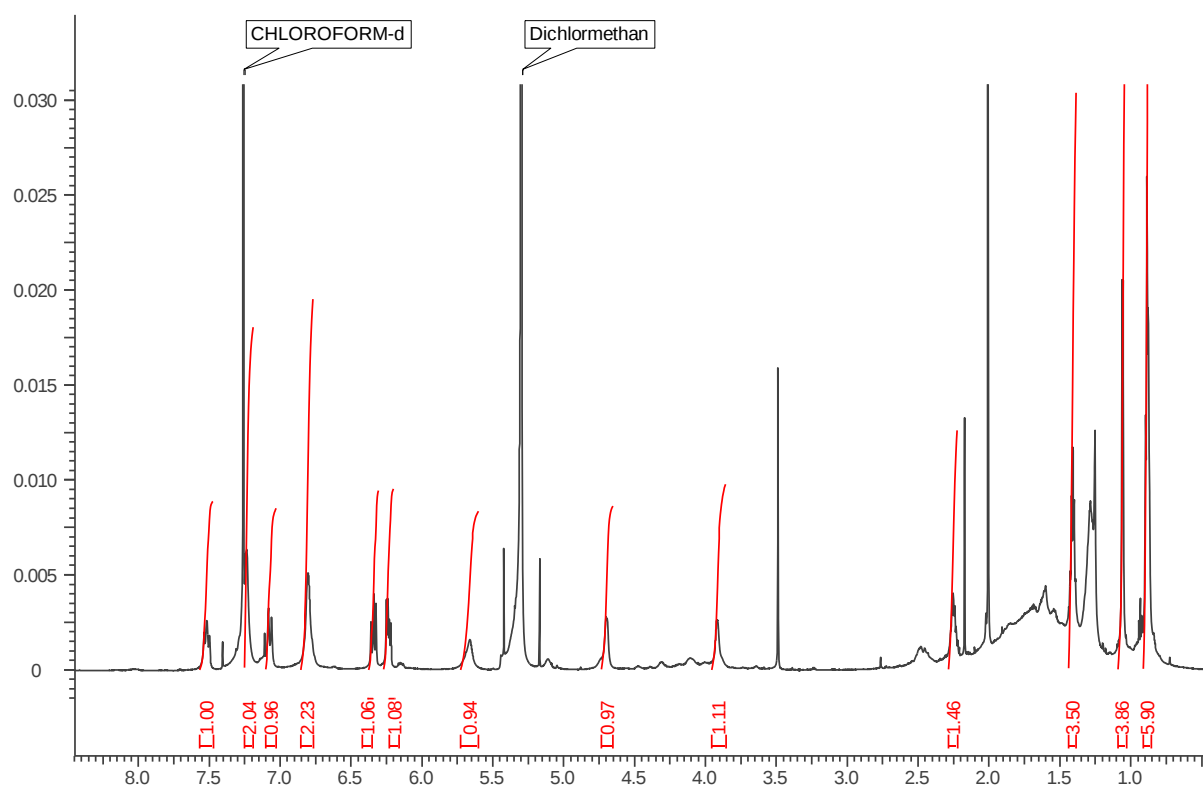
Spektrum 33: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von Naturstoff **3** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C NMR 175 MHz)



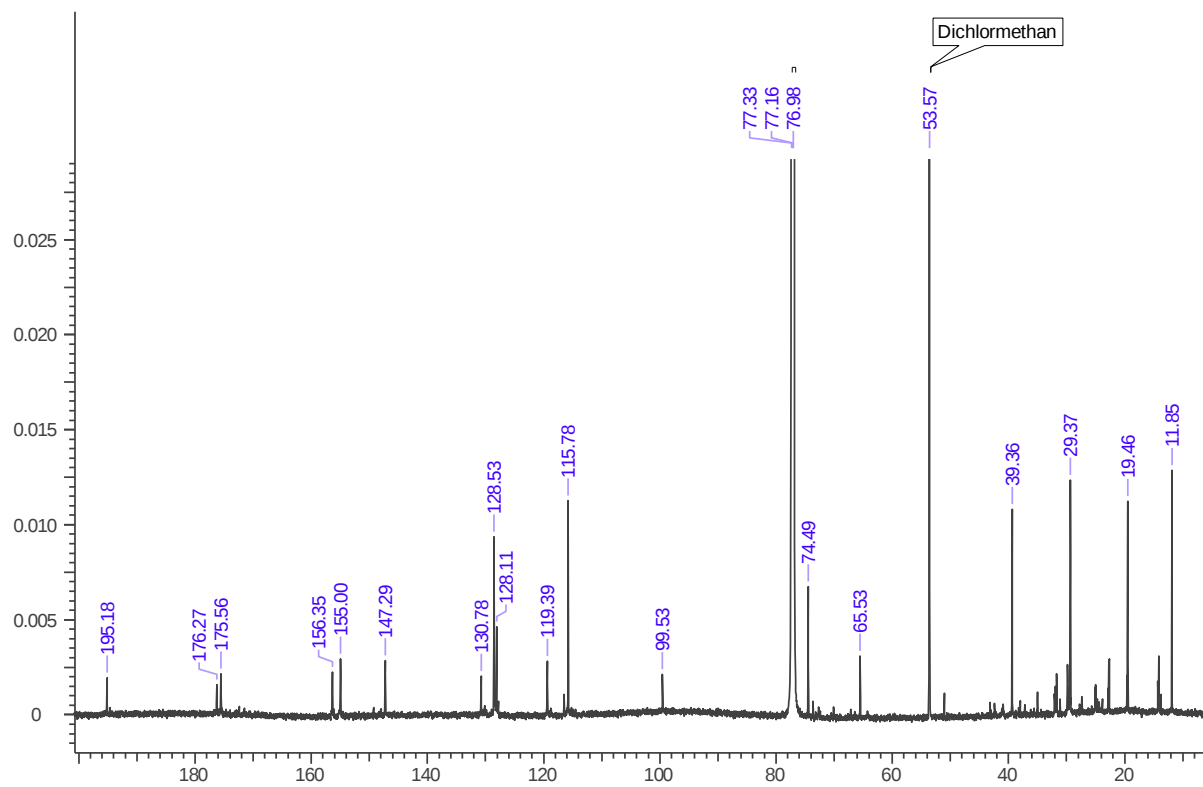
Spektrum 34: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**)



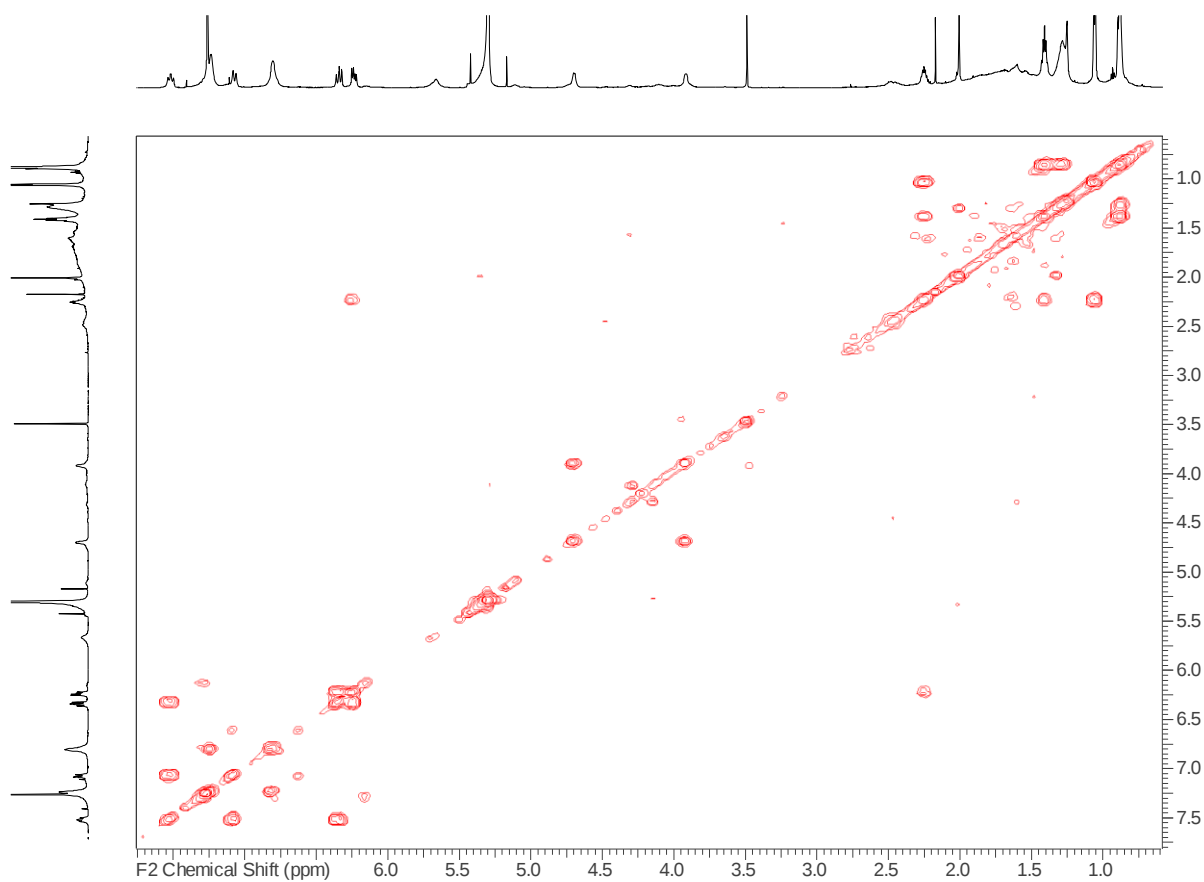
Spektrum 35: UV/Vis-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**)



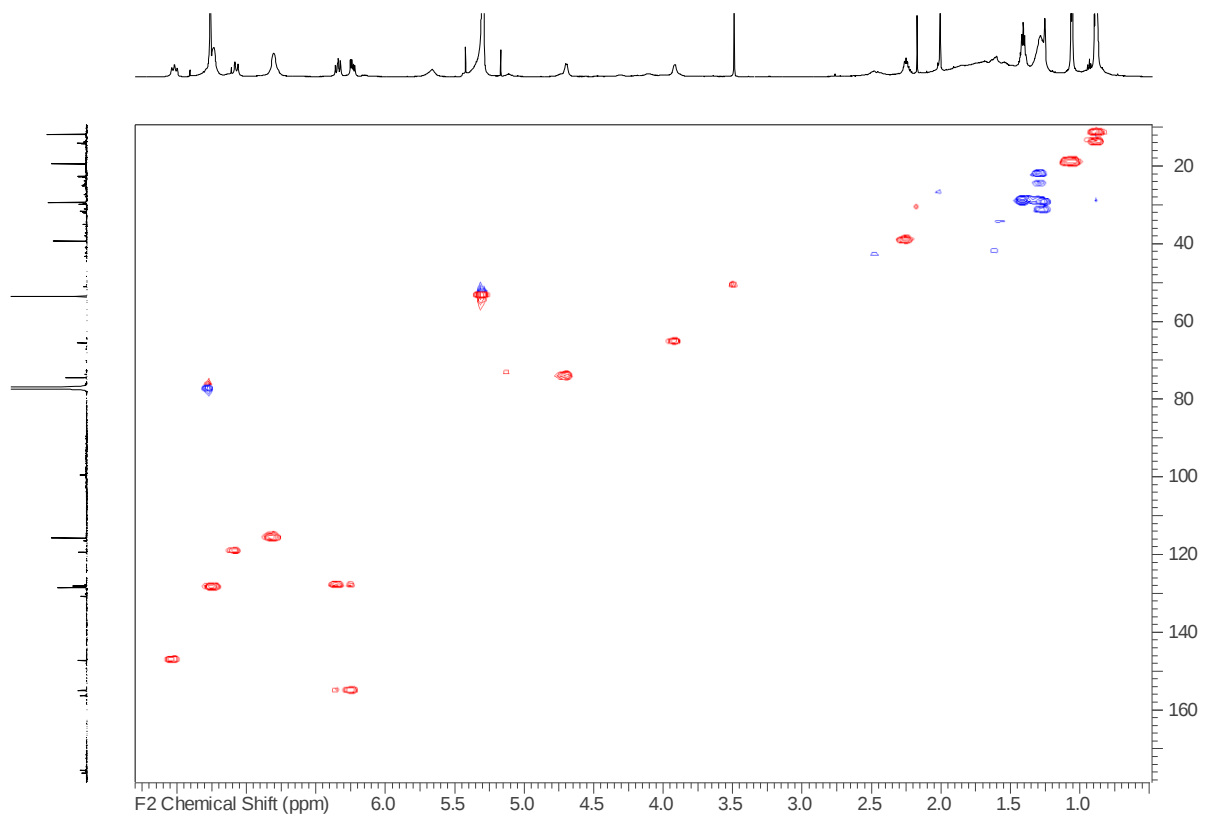
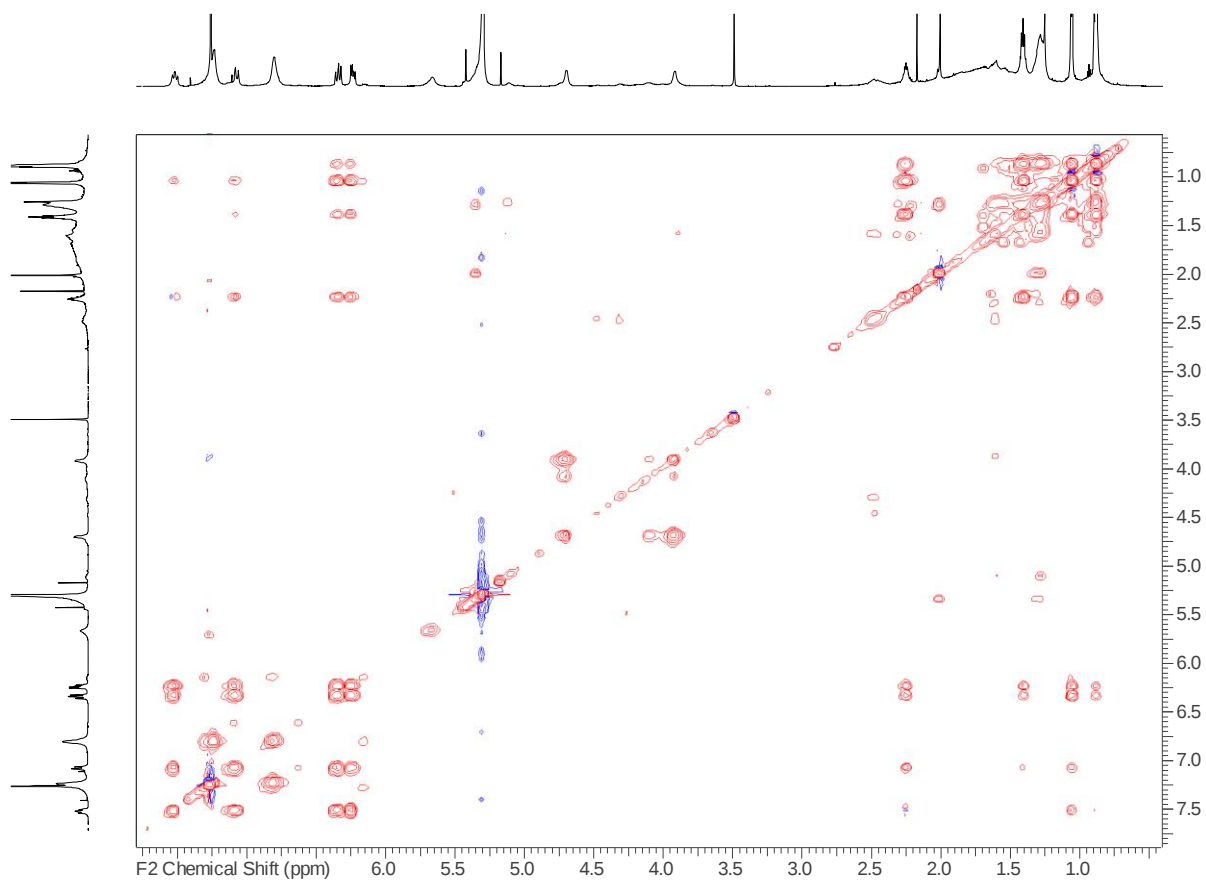
Spektrum 36: ¹H-NMR-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**) (CDCl₃, 700 MHz)

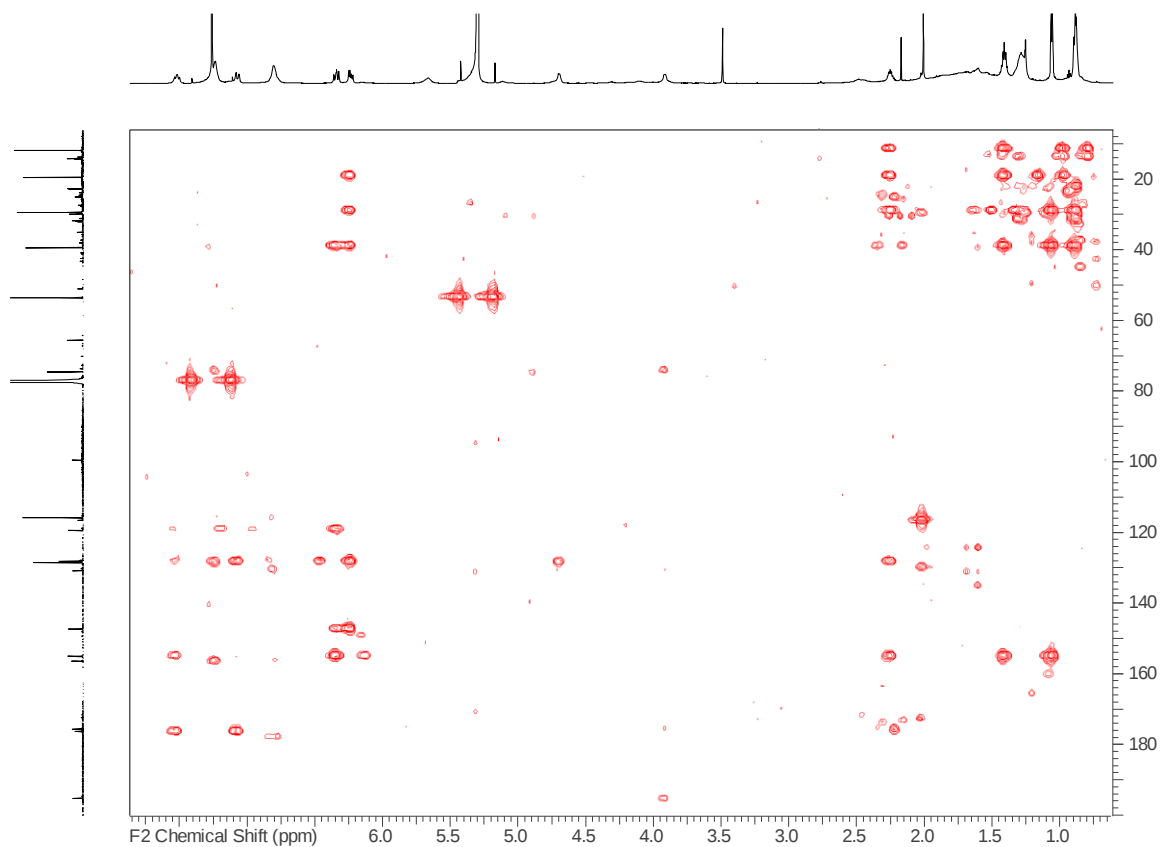


Spektrum 37: ^{13}C -NMR-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**) (CDCl_3 , 175 MHz)

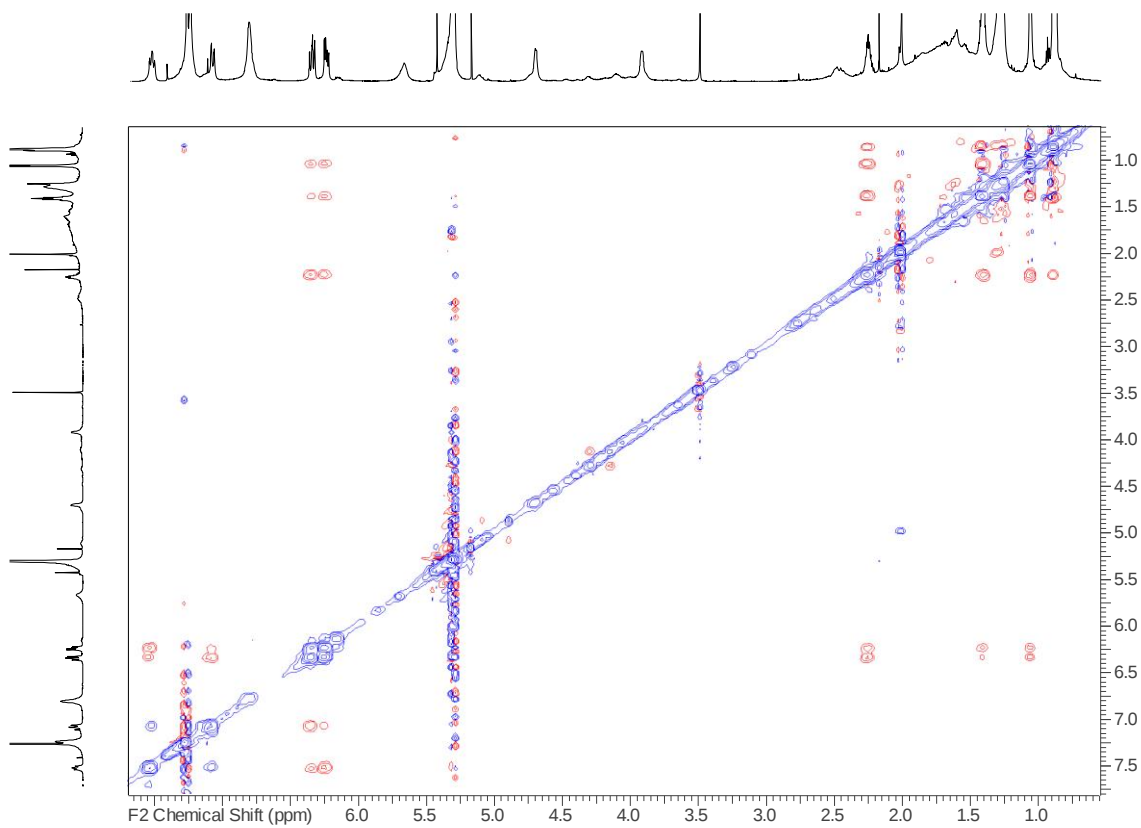


Spektrum 38: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**) (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz)

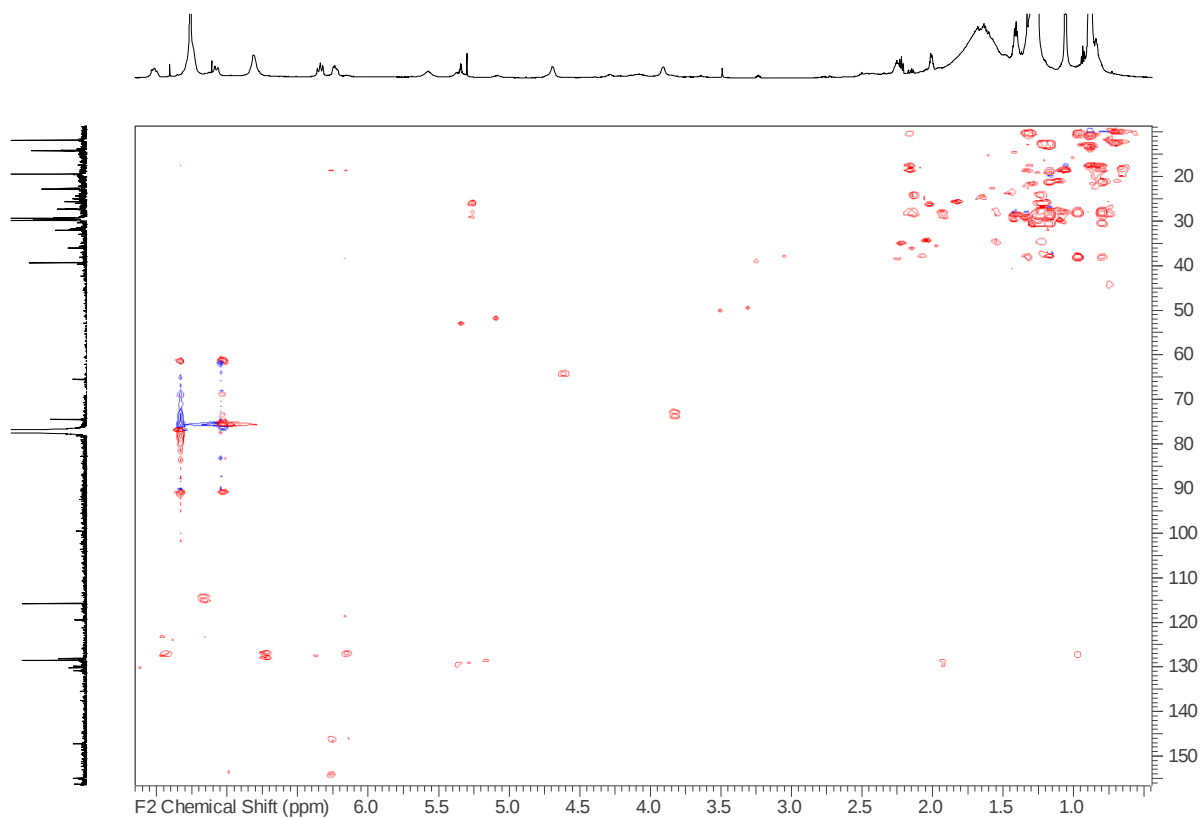




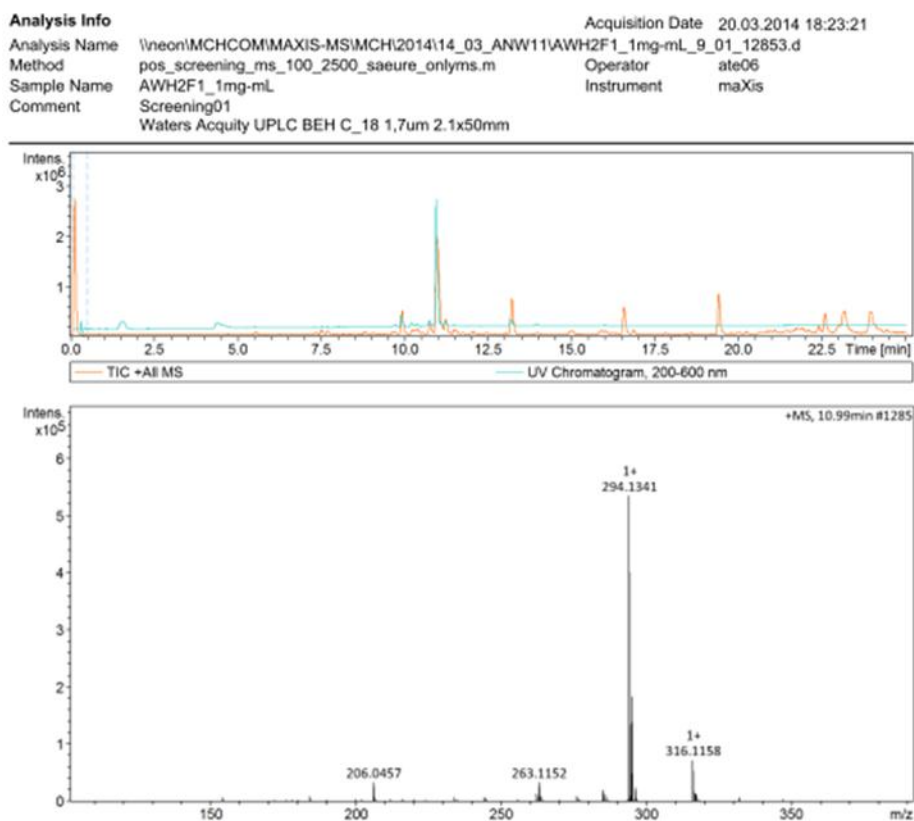
Spektrum 41: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**) (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



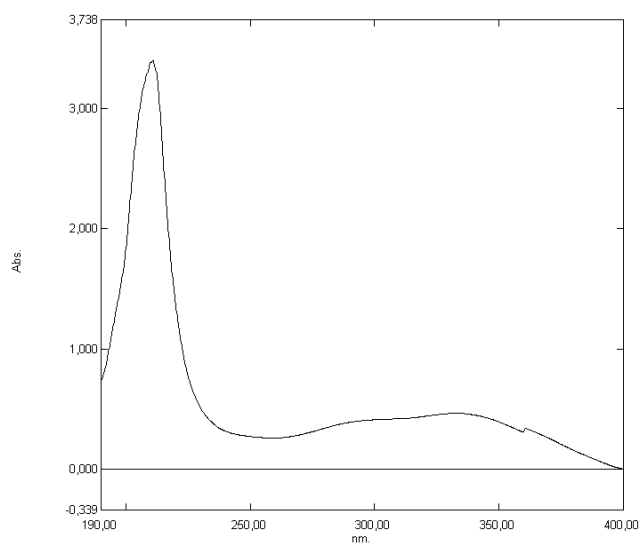
Spektrum 42: ^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**) (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz)



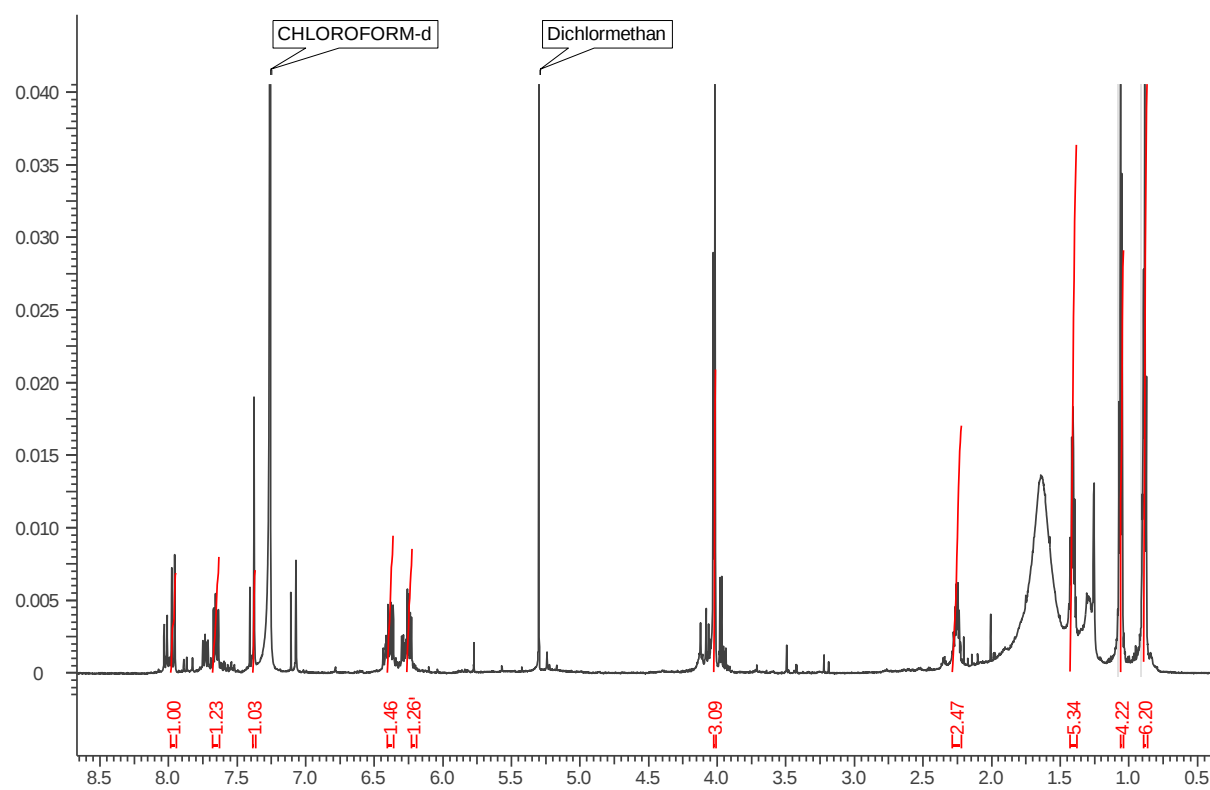
Spektrum 43: HETLOC-NMR-Spektrum von Desmethylprototenellin D (**8**) zur Anwendung der Murata-Methode (CDCl₃)



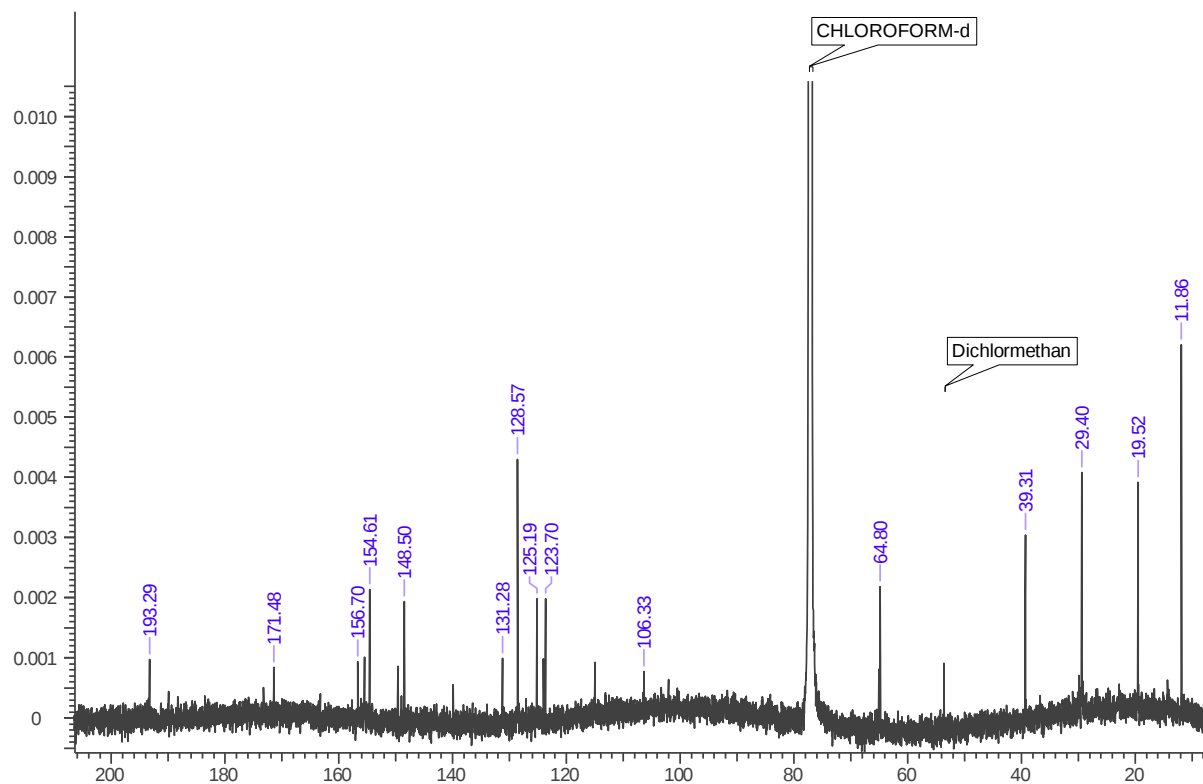
Spektrum 44: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Pyridon 4



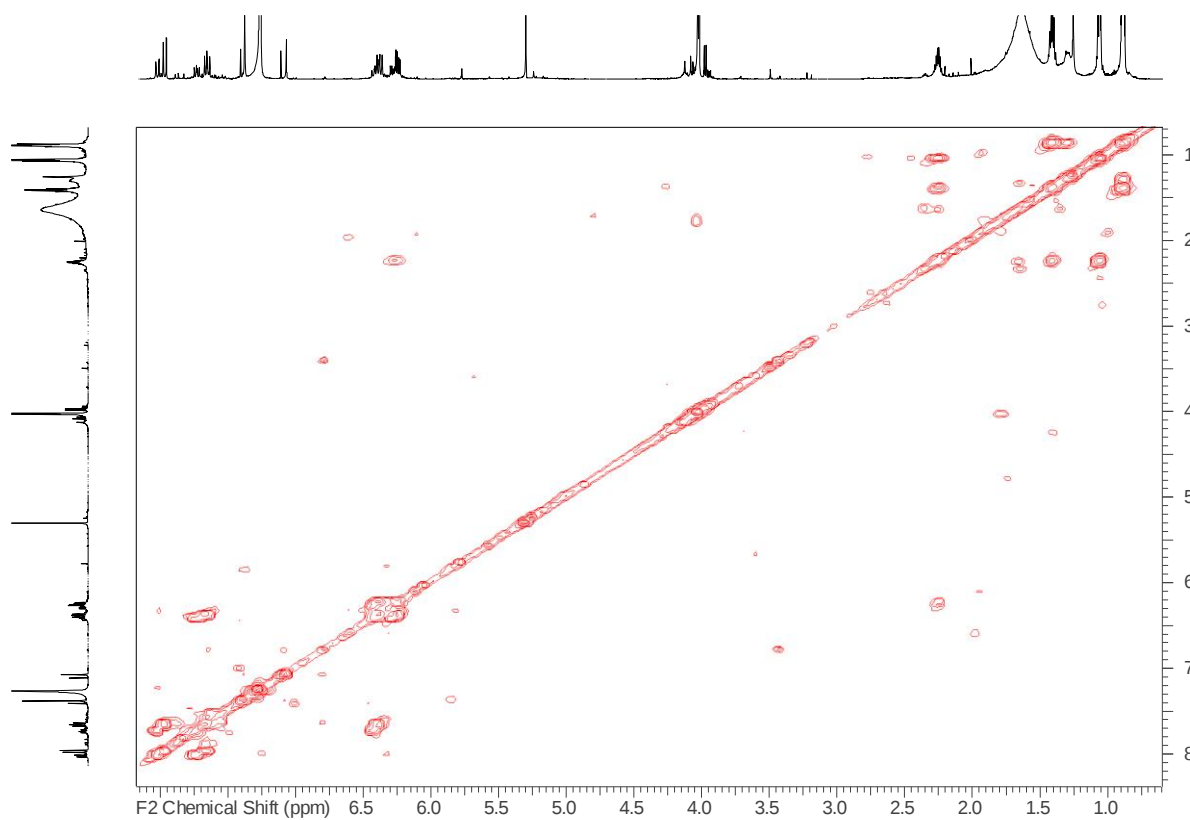
Spektrum 45: UV/Vis-Spektrum von Pyridon **4**



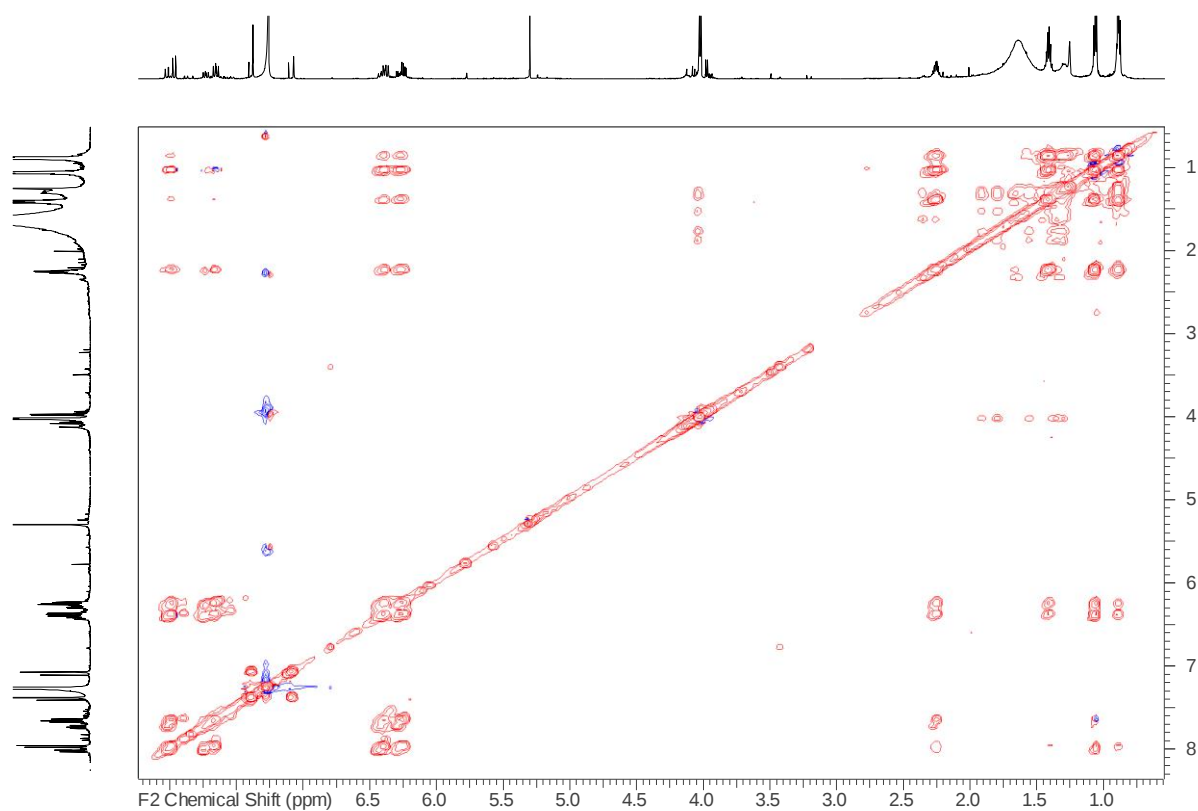
Spektrum 46: ¹H-NMR-Spektrum von Pyridon **4** (CDCl₃, 700 MHz)



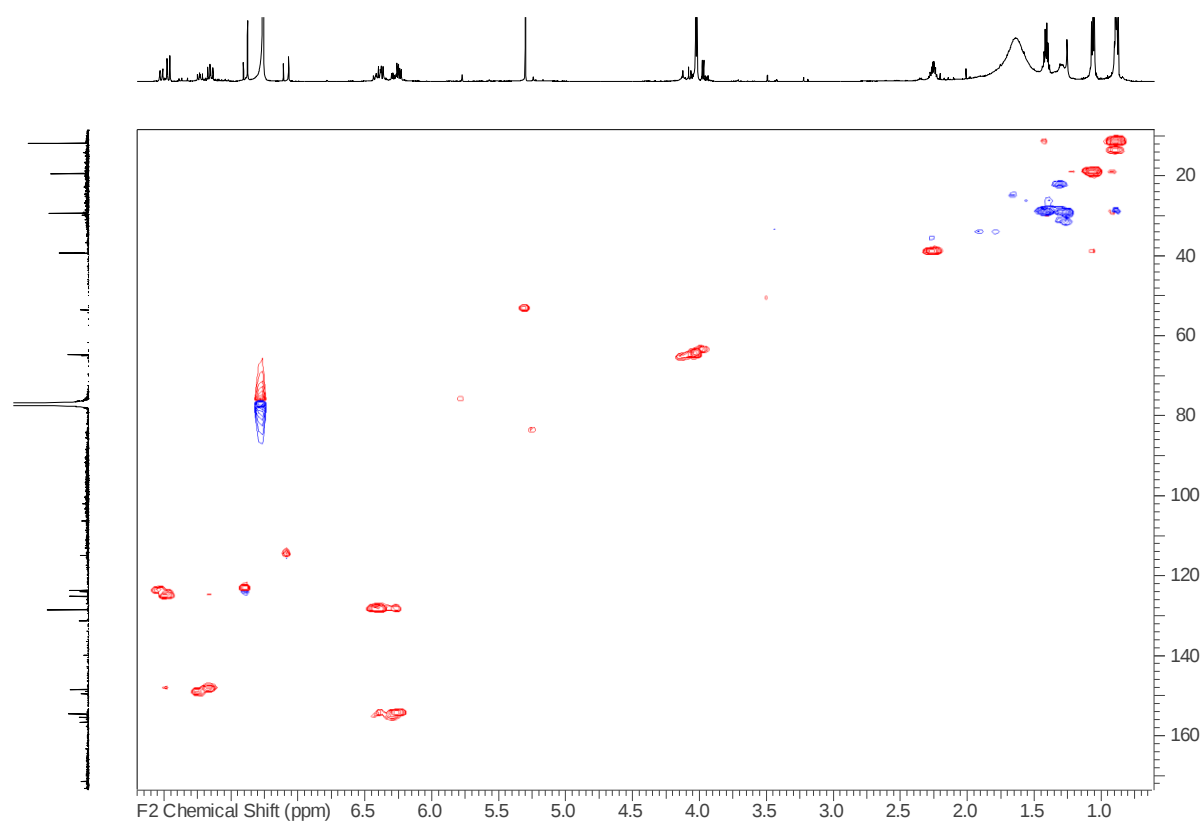
Spektrum 47: ¹³C-NMR-Spektrum von Pyridon 4 (CDCl₃, 175 MHz)



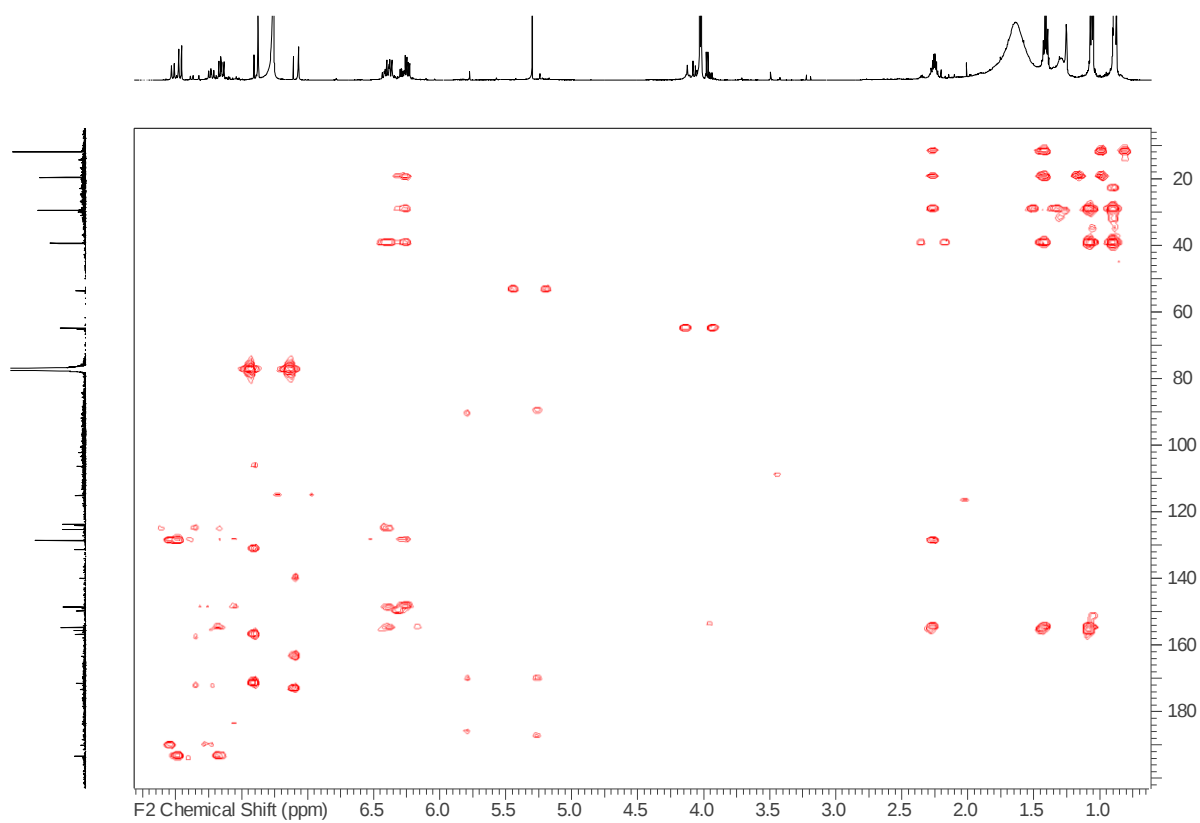
Spektrum 48: ¹H, ¹H-COSY-NMR-Spektrum von Pyridon 4 (CDCl₃, ¹H-NMR 700 MHz)



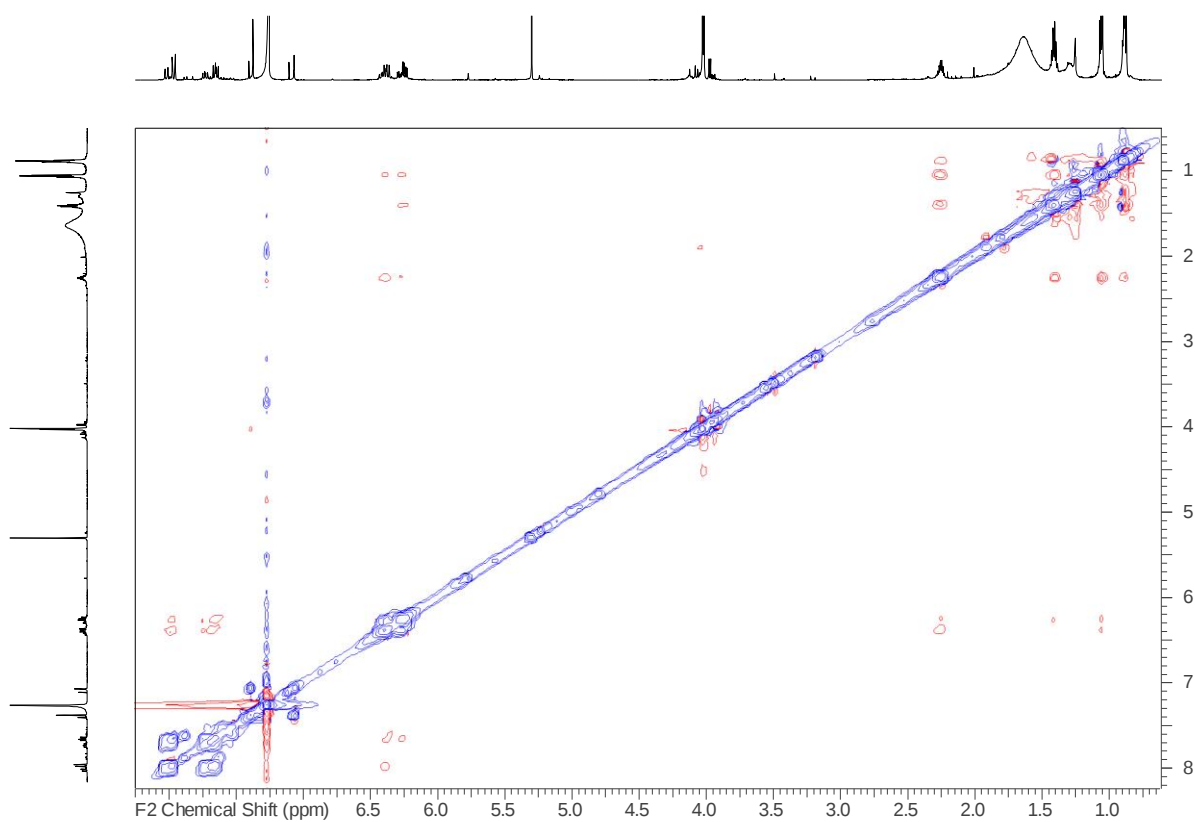
Spektrum 49: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum von Pyridon 4 (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz)



Spektrum 50: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Pyridon 4 (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



Spektrum 51: ^1H , ^{13}C HMBC-NMR-Spektrum von Pyridon **4** (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



Spektrum 52: ^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum von Pyridon **4** (CDCl_3 , ^1H -NMR 700 MHz)

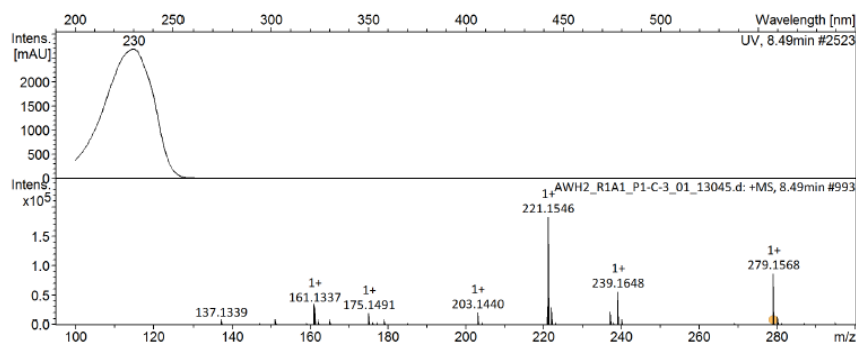
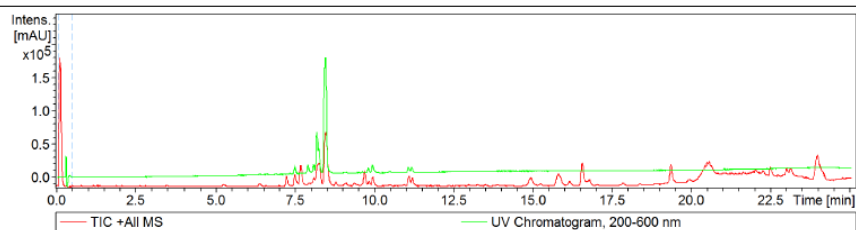
Analysis Info

Analysis Name: \neon\MCHCOMMAXIS-MS\MCH2014\14_03_ANW11\AWH2_R1A1_P1-C-3_01_13045.d
 Method: pos_screening_ms_100_2500_saeure_onlyms.m
 Sample Name: AWH2_R1A1
 Comment: Screening01
 Waters Acquity UPLC BEH C_18 1,7um 2.1x50mm

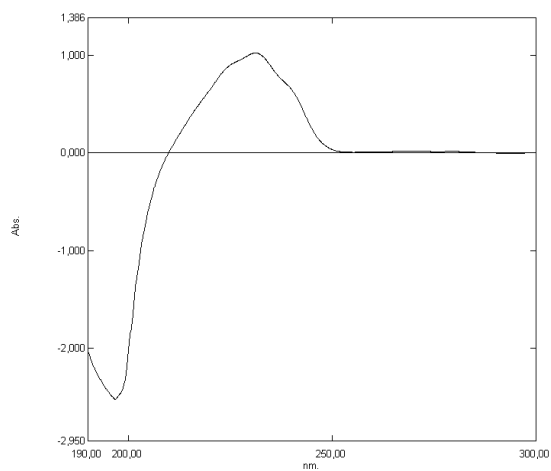
Acquisition Date: 15.04.2014 12:26:58

Operator: ate06

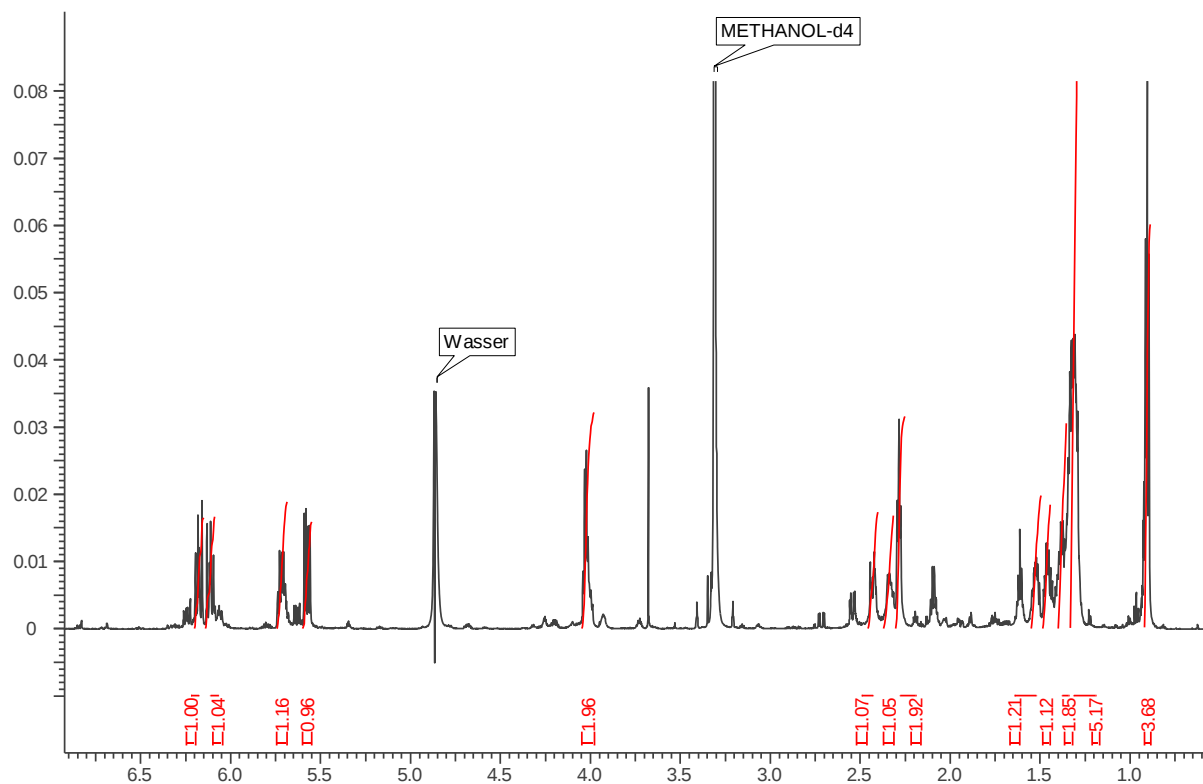
Instrument: maXis



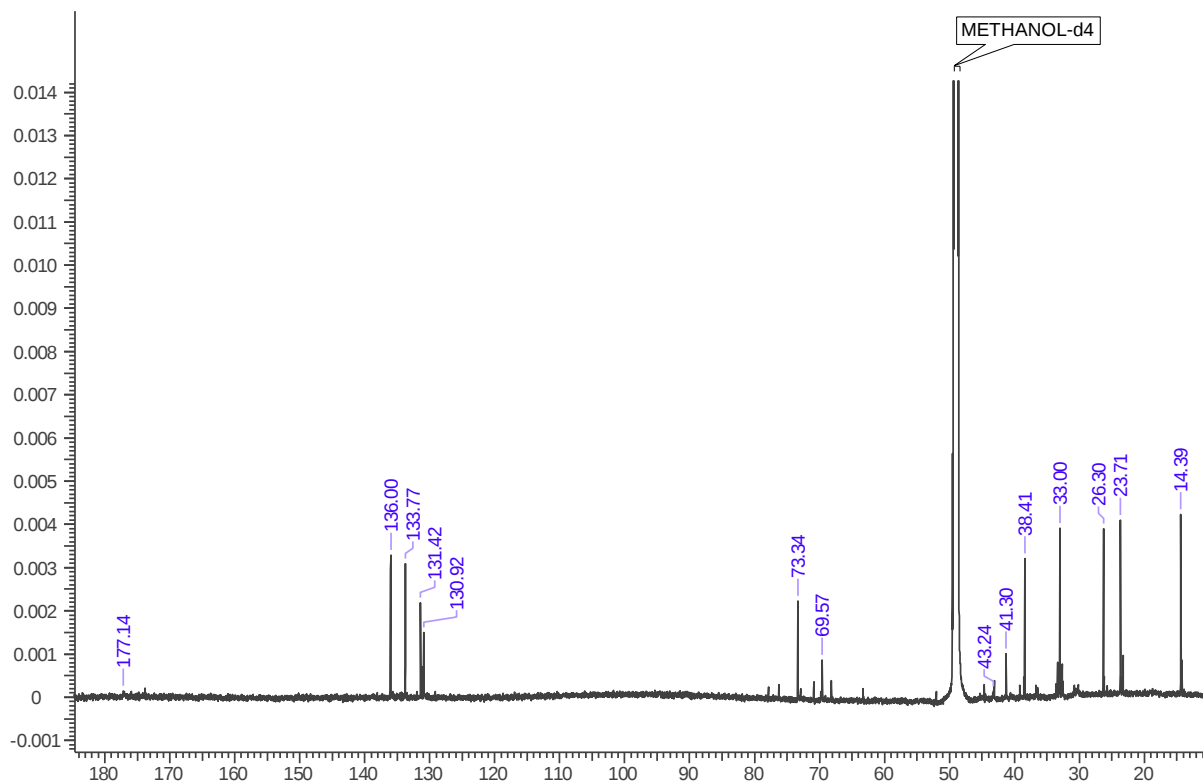
Spektrum 53: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff 5



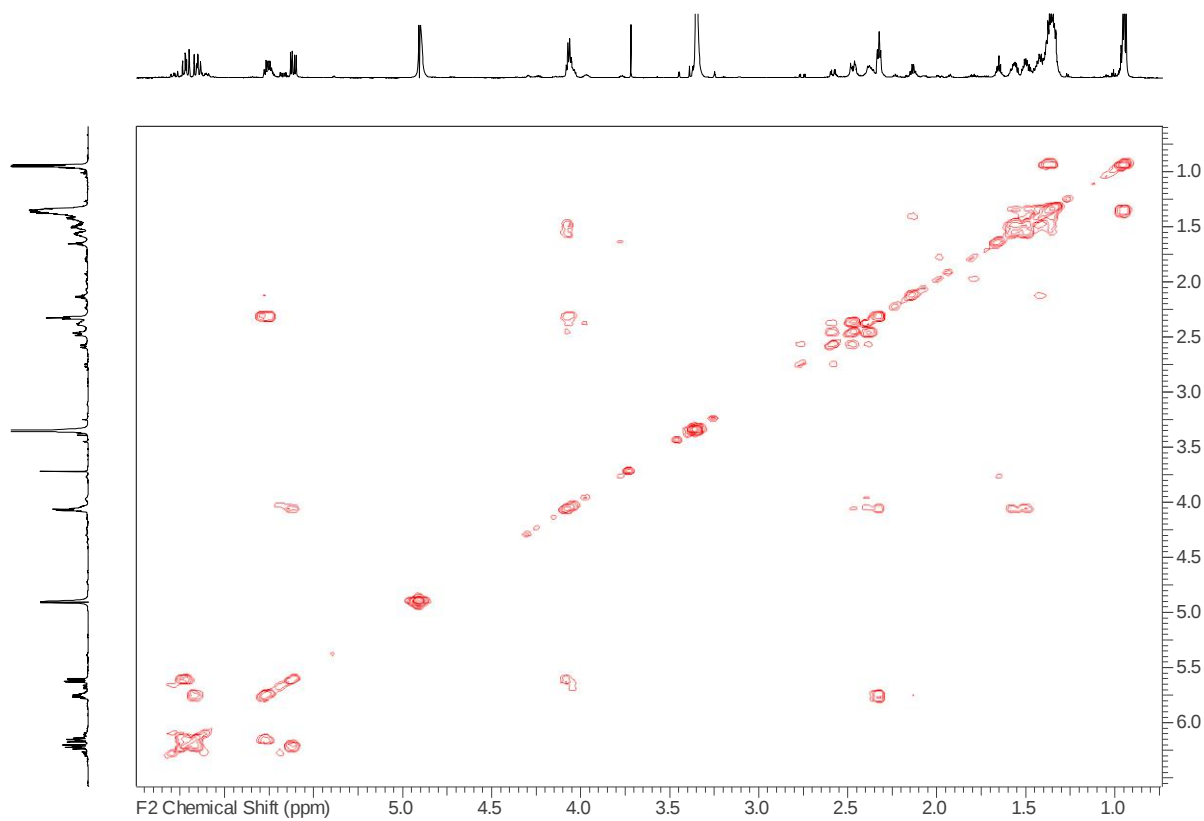
Spektrum 54: UV/Vis-Spektrum von Naturstoff 5



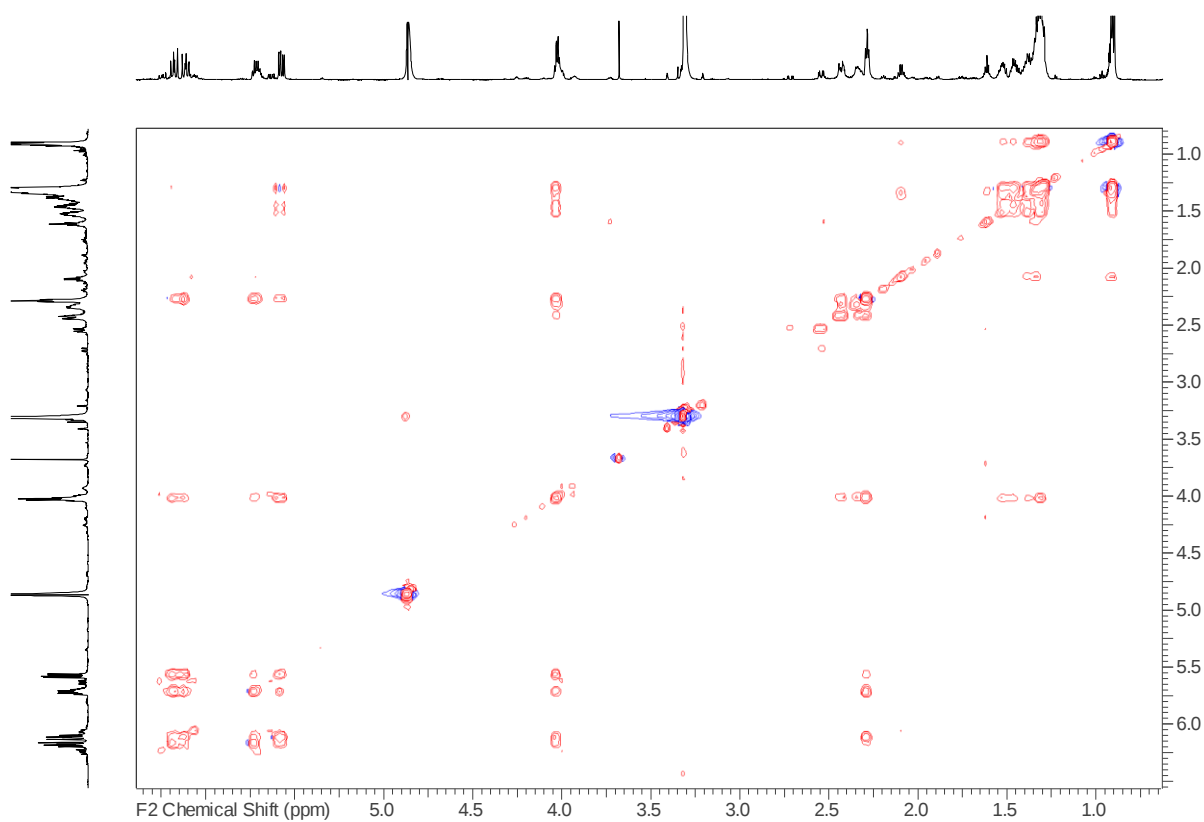
Spektrum 55: ^1H -NMR-Spektrum von Naturstoff **5** (MeOD, 700 MHz)



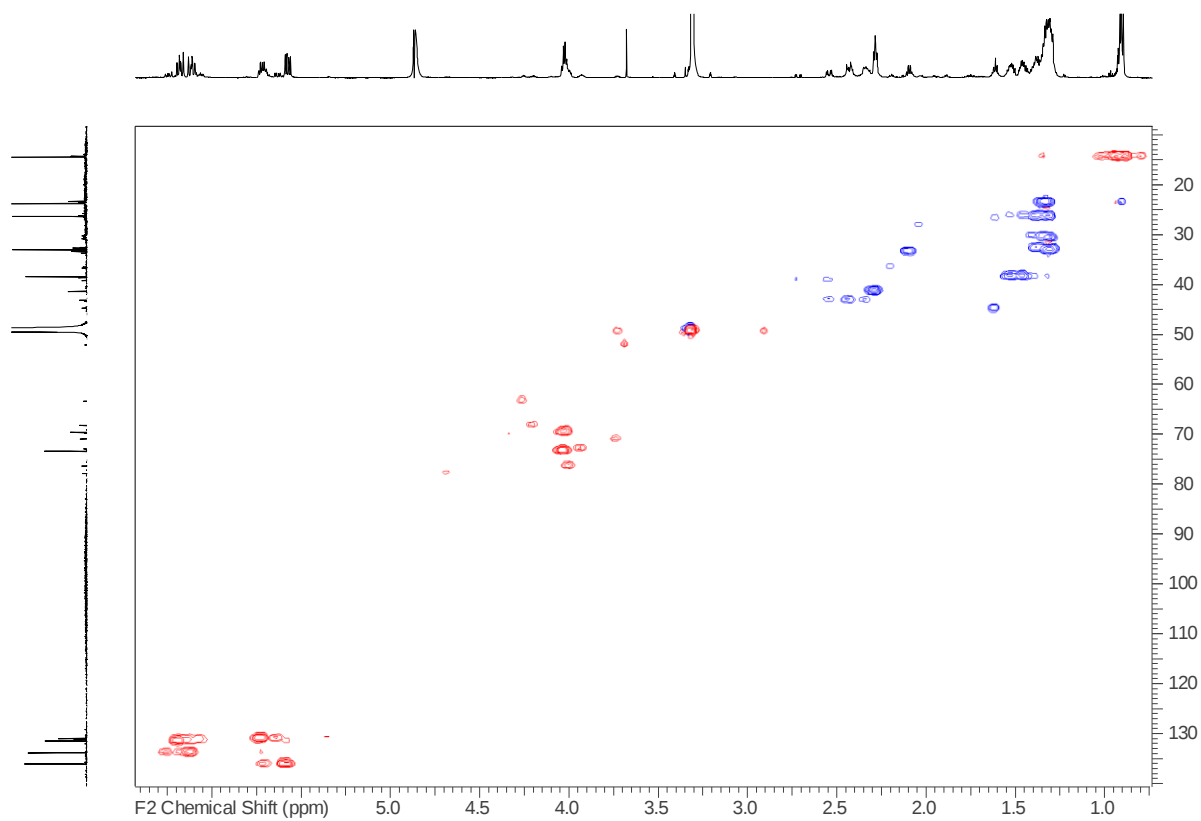
Spektrum 56: ^{13}C -NMR-Spektrum von Naturstoff **5** (MeOD, 175 MHz)



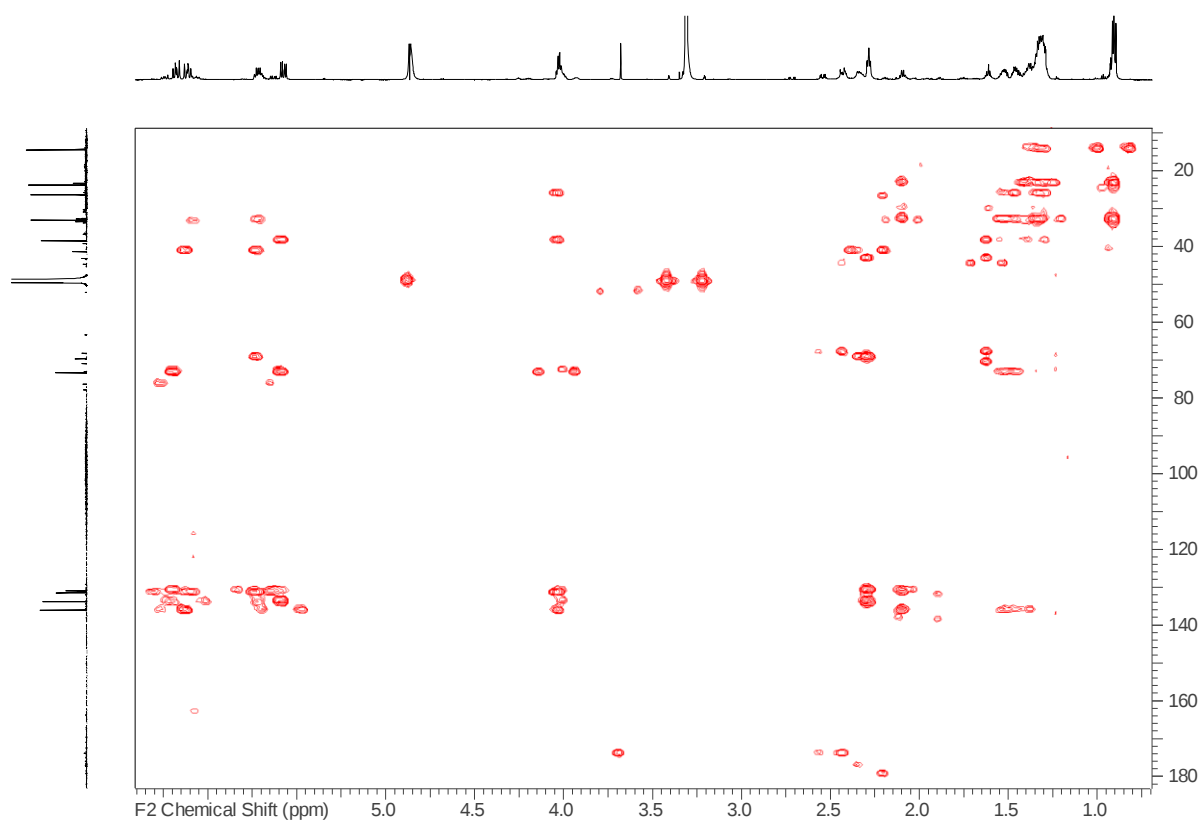
Spektrum 57: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **5** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



Spektrum 58: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **5** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



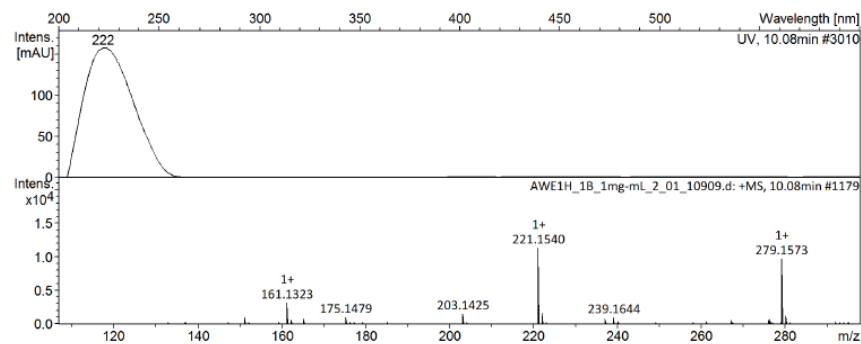
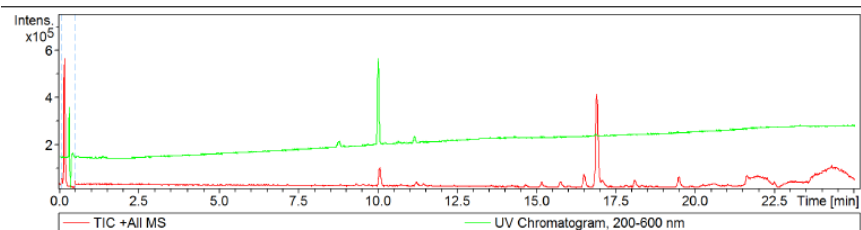
Spektrum 59: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum Naturstoff **5** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



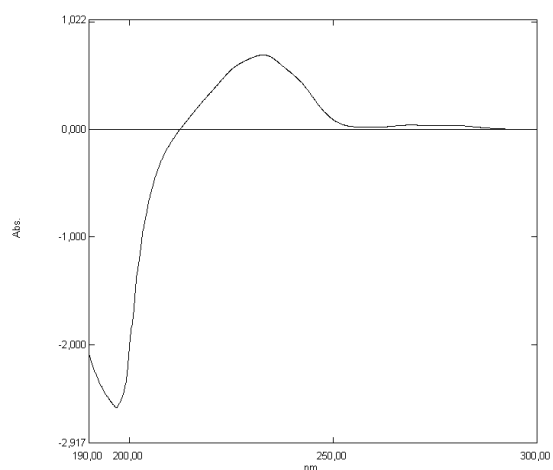
Spektrum 60: ^1H , ^{13}C -HMBC NMR-Spektrum von Naturstoff **5** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)

Analysis Info

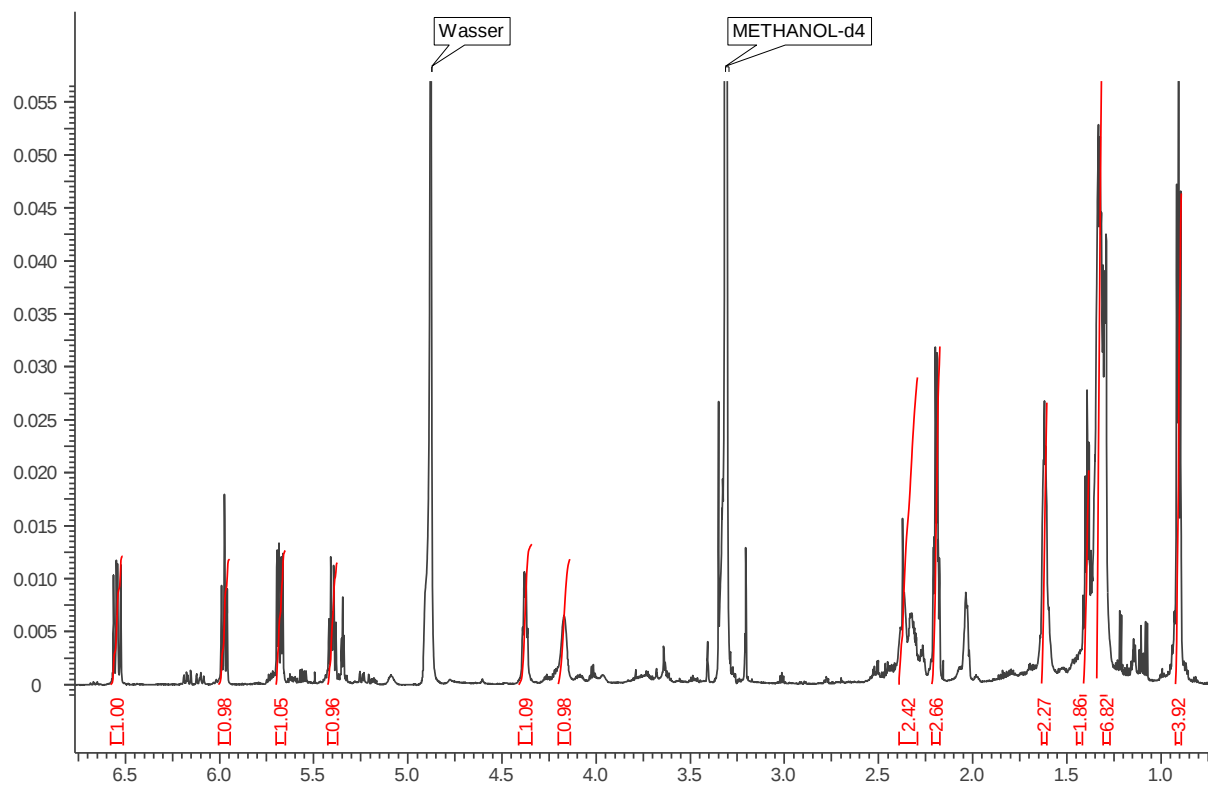
Analysis Name	\\neon\IMCHCOMMAXIS-MS\IMCH2013\13_06_ANWAWE1H_1B_1mg-mL_2_01_10909.d	Acquisition Date	18.06.2013 13:51:07
Method	pos_screening_ms_100_2500_saeure_only.ms	Operator	ate06
Sample Name	AWE1H_1B_1mg-mL	Instrument	maXis
Comment	Screening01 Waters Acquity UPLC BEH C ₁₈ 1,7µm 2.1x50mm		



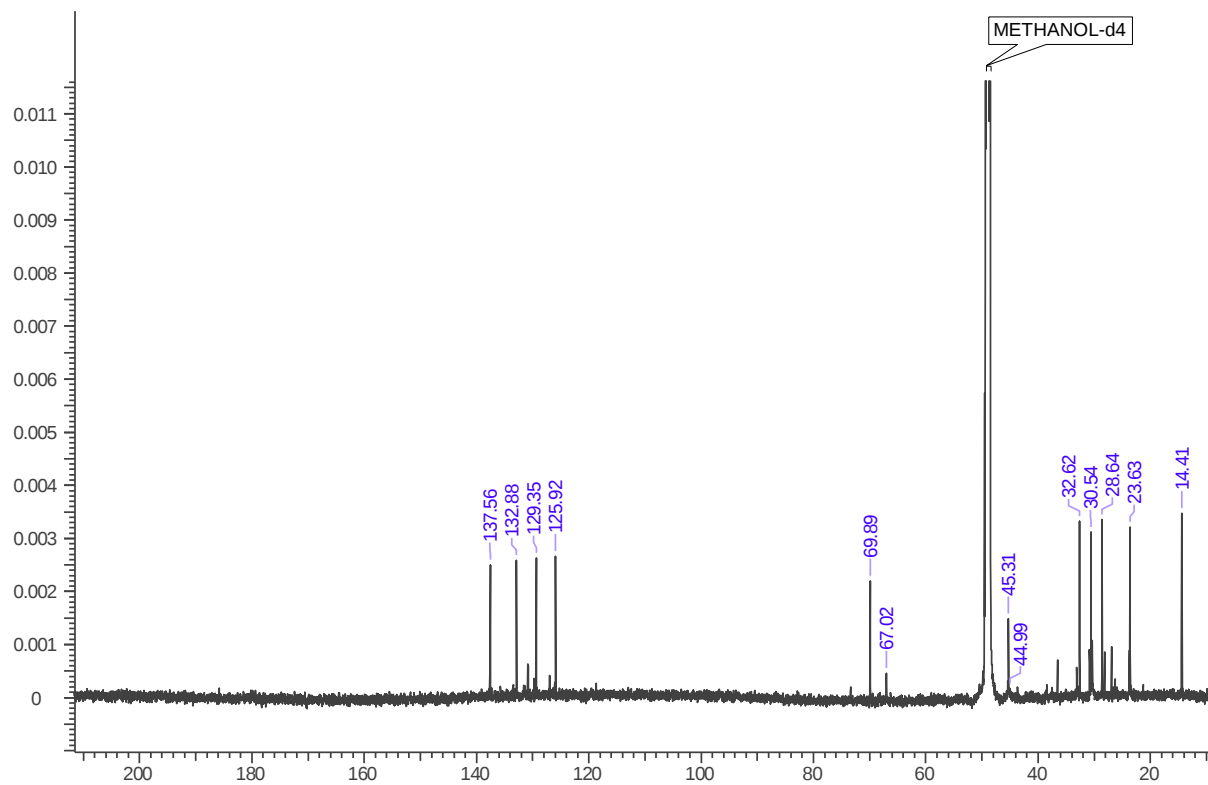
Spektrum 61: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff **6**



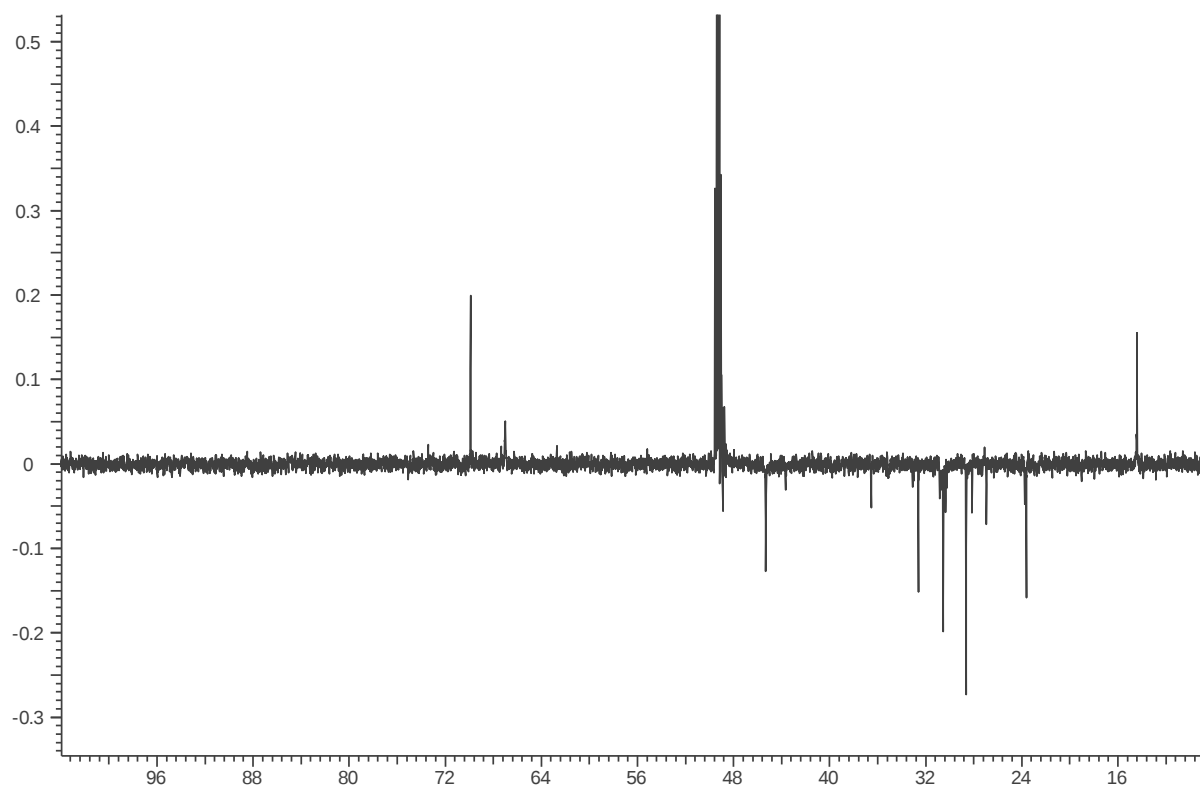
Spektrum 62: UV/Vis-Spektrum von Naturstoff **6**



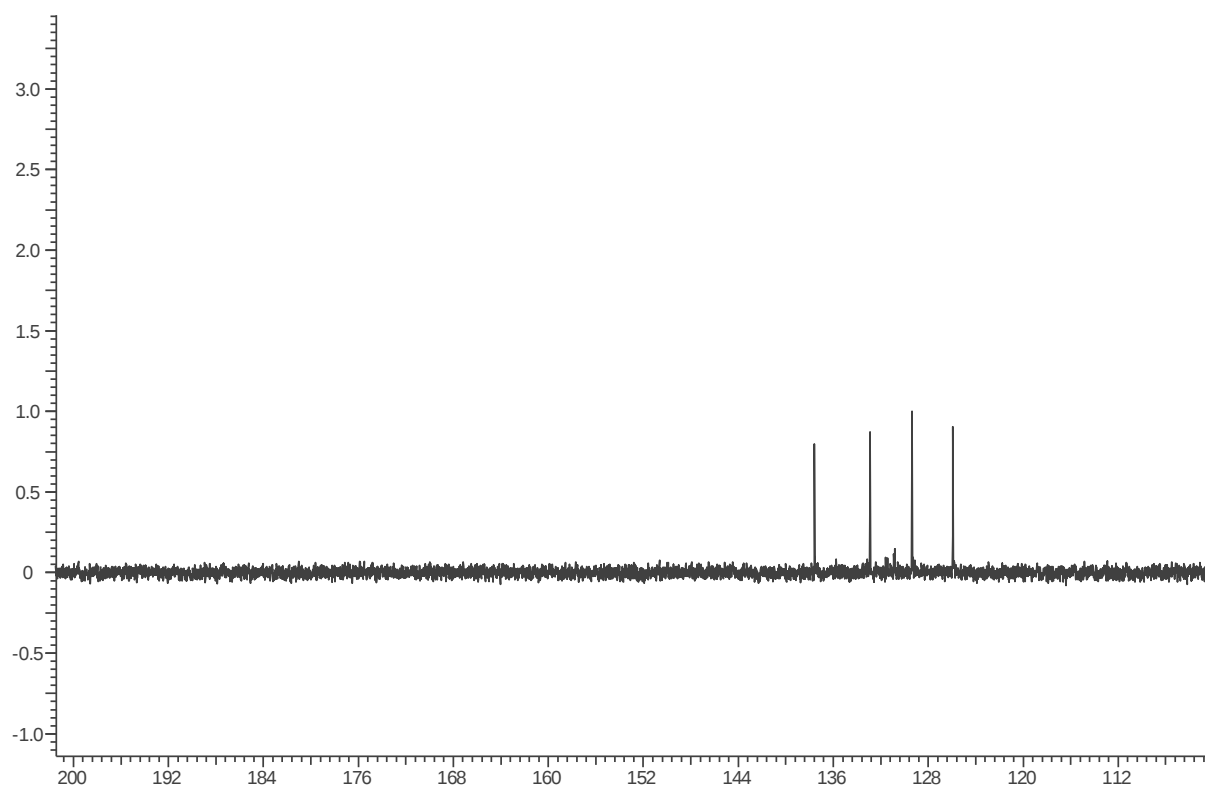
Spektrum 63: ^1H -NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, 700 MHz)



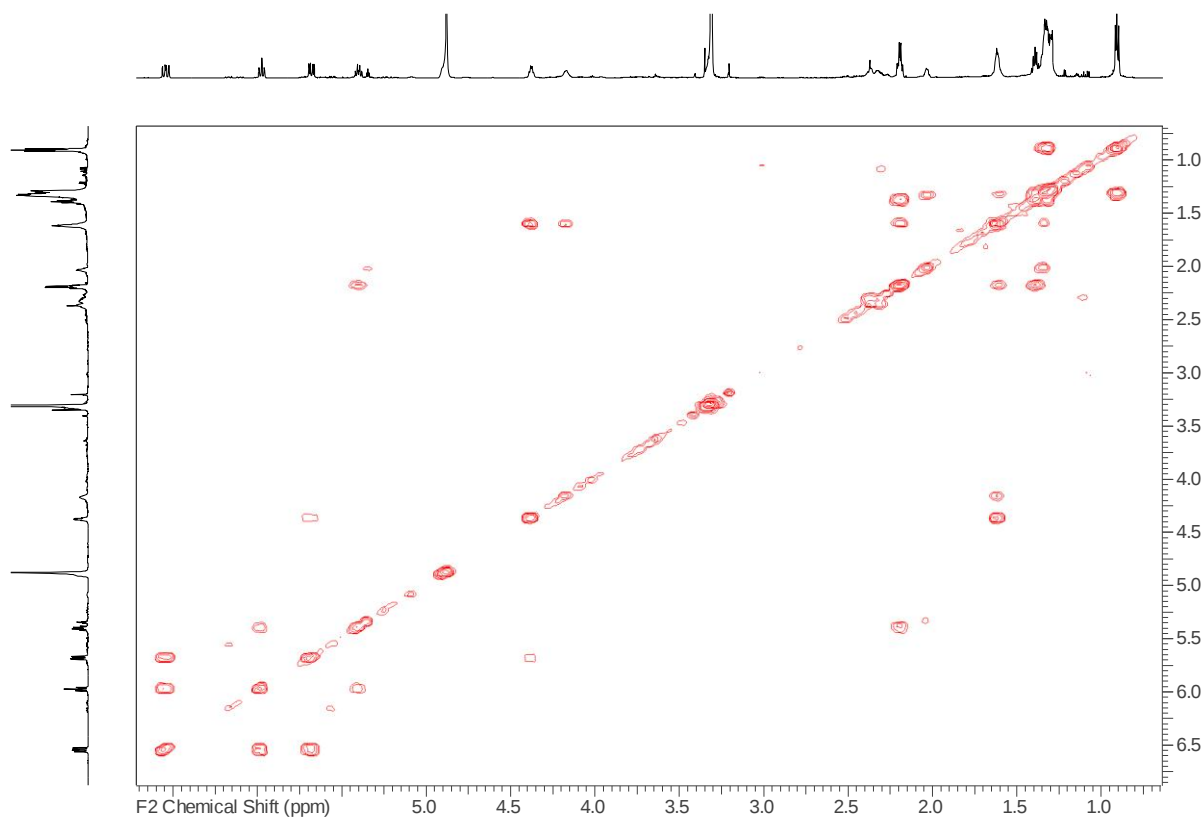
Spektrum 64: ^{13}C -NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, 175 MHz)



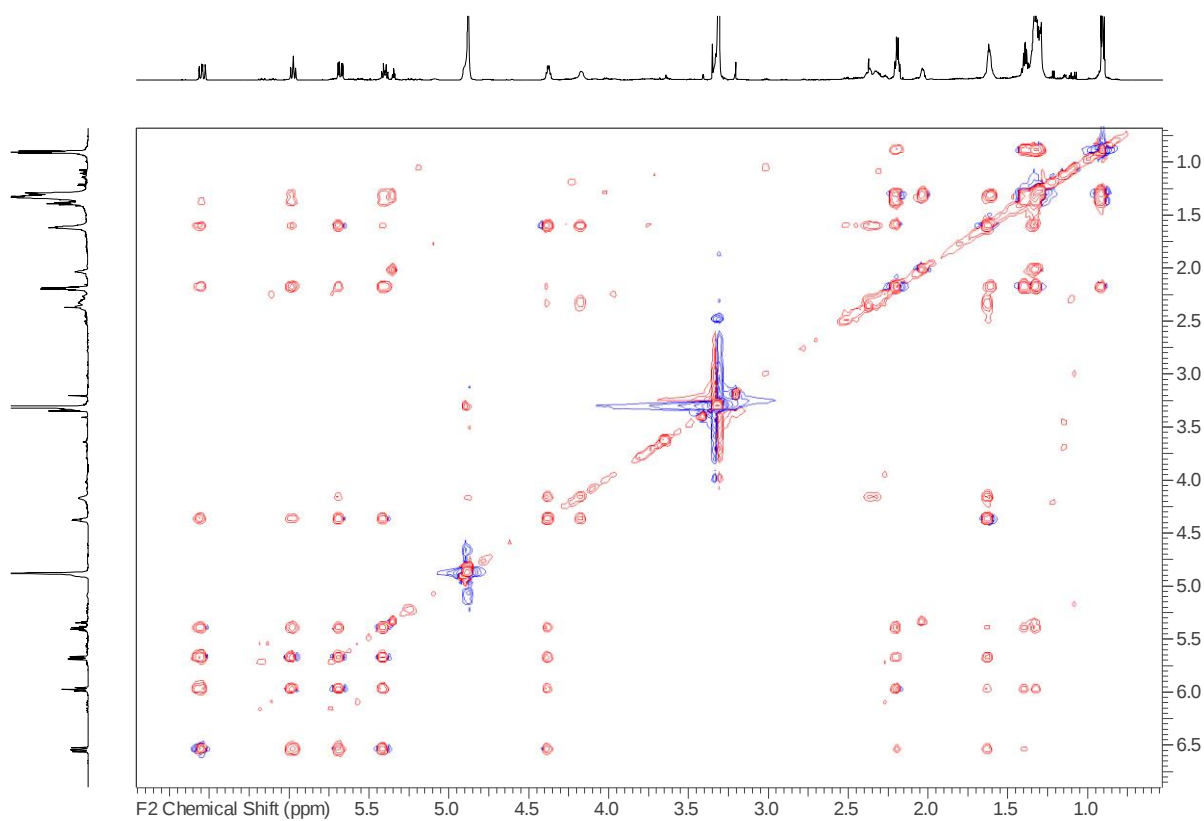
Spektrum 65: ^{13}C -DEP- NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, 175 MHz)



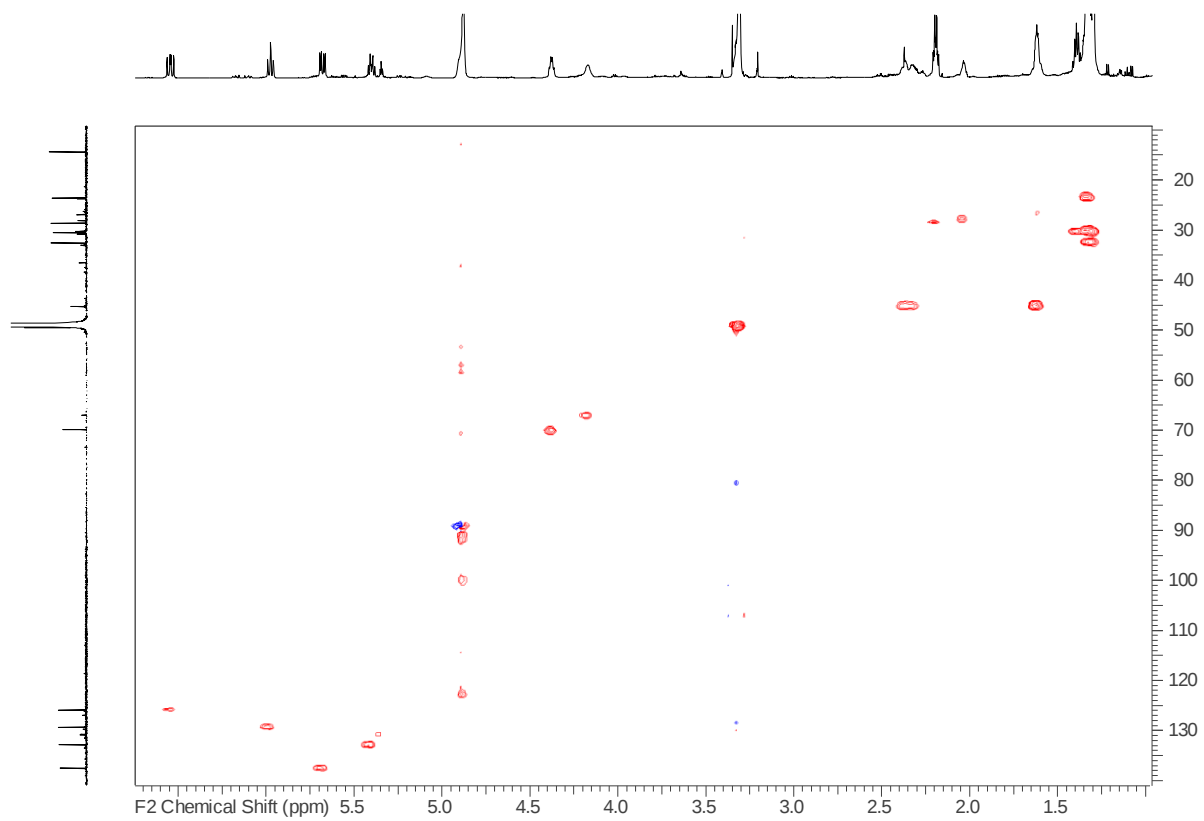
Spektrum 66: ^{13}C -DEPT-NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, 175 MHz)



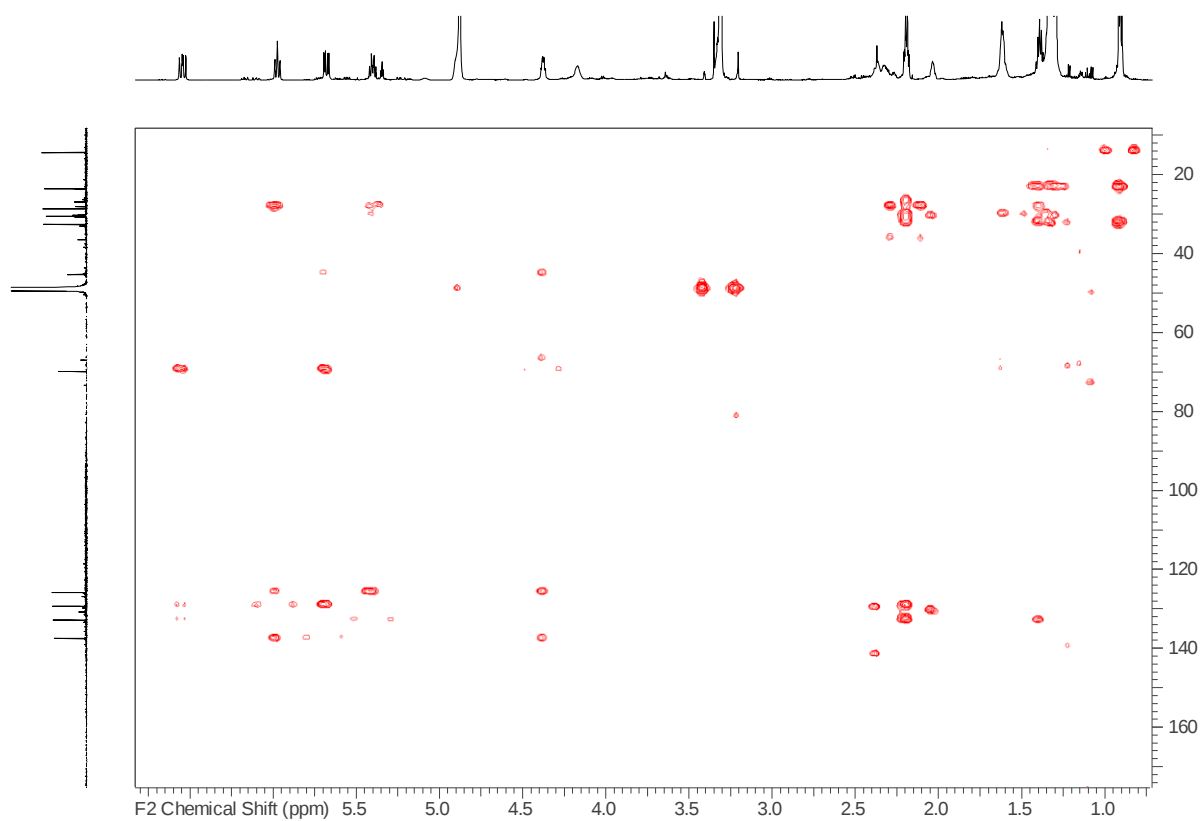
Spektrum 67: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



Spektrum 68: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz)



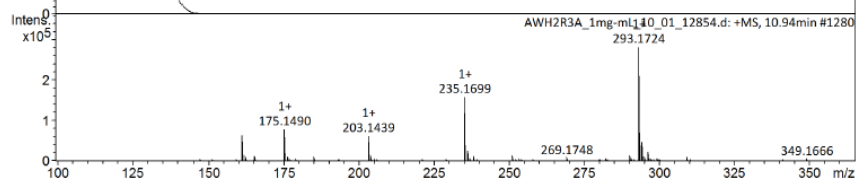
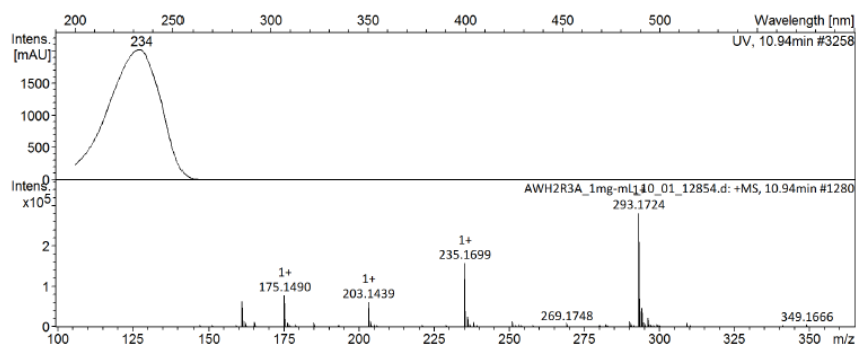
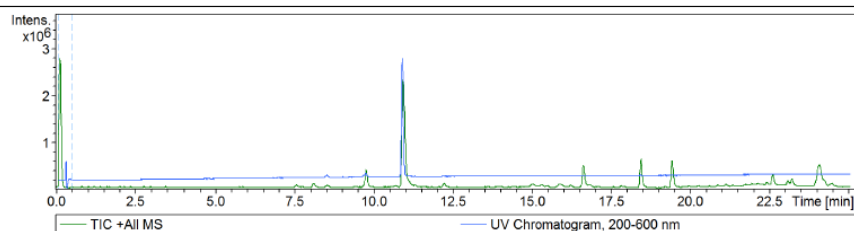
Spektrum 69: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)



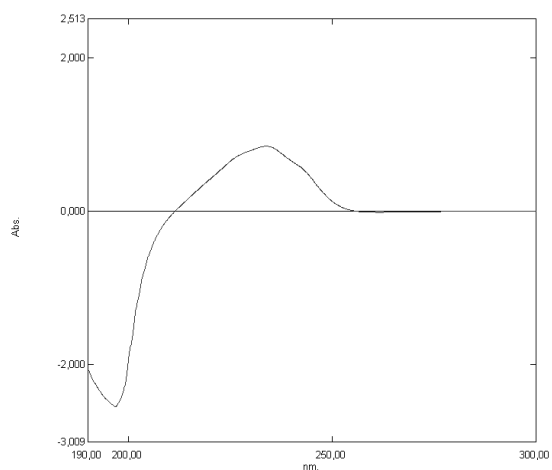
Spektrum 70: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von Naturstoff **6** (MeOD, ^1H -NMR 700 MHz, ^{13}C -NMR 175 MHz)

Analysis Info

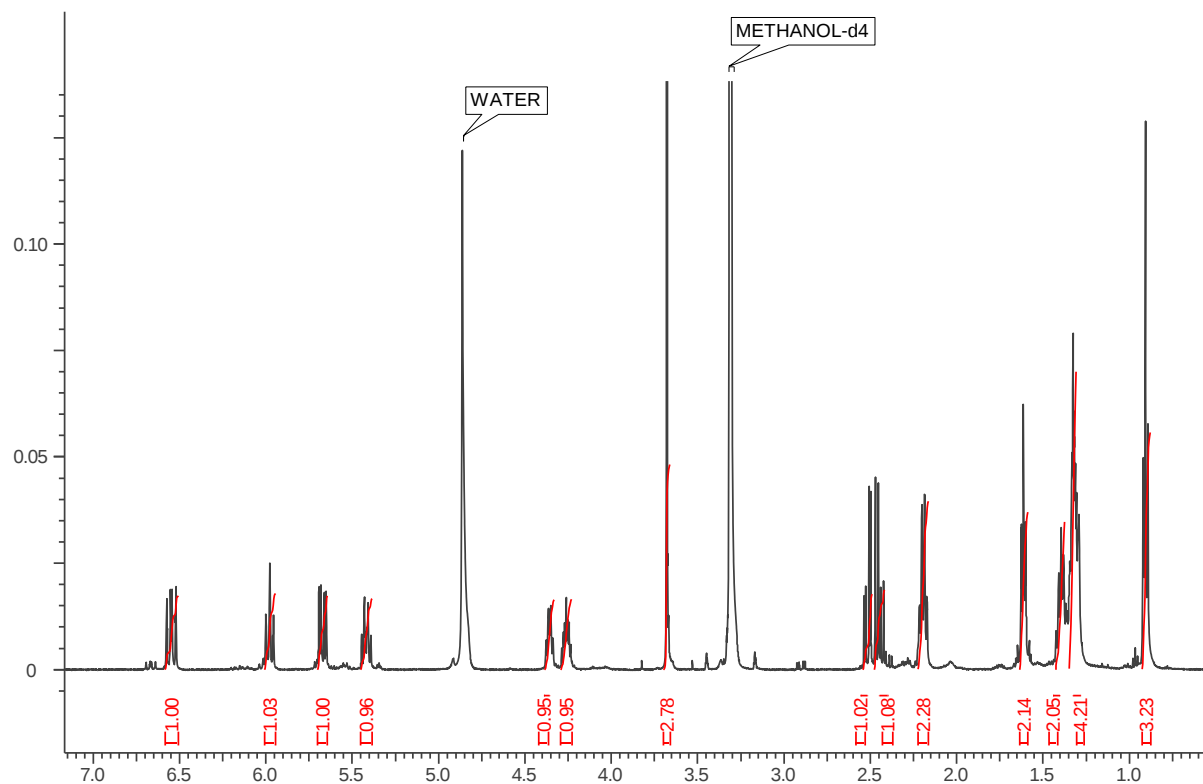
Acquisition Date 20.03.2014 18:54:13
 Analysis Name \\neon\LMCHCOM\MAXIS-MS\LMCH12014\14_03_ANW11\AWH2R3A_1mg-mL_10_01_12854.d
 Method pos_screening_ms_100_2500_saeure_only.ms.m Operator ate06
 Sample Name AWH2R3A_1mg-mL Instrument maXis
 Comment Screening01
 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 1,7µm 2.1x50mm



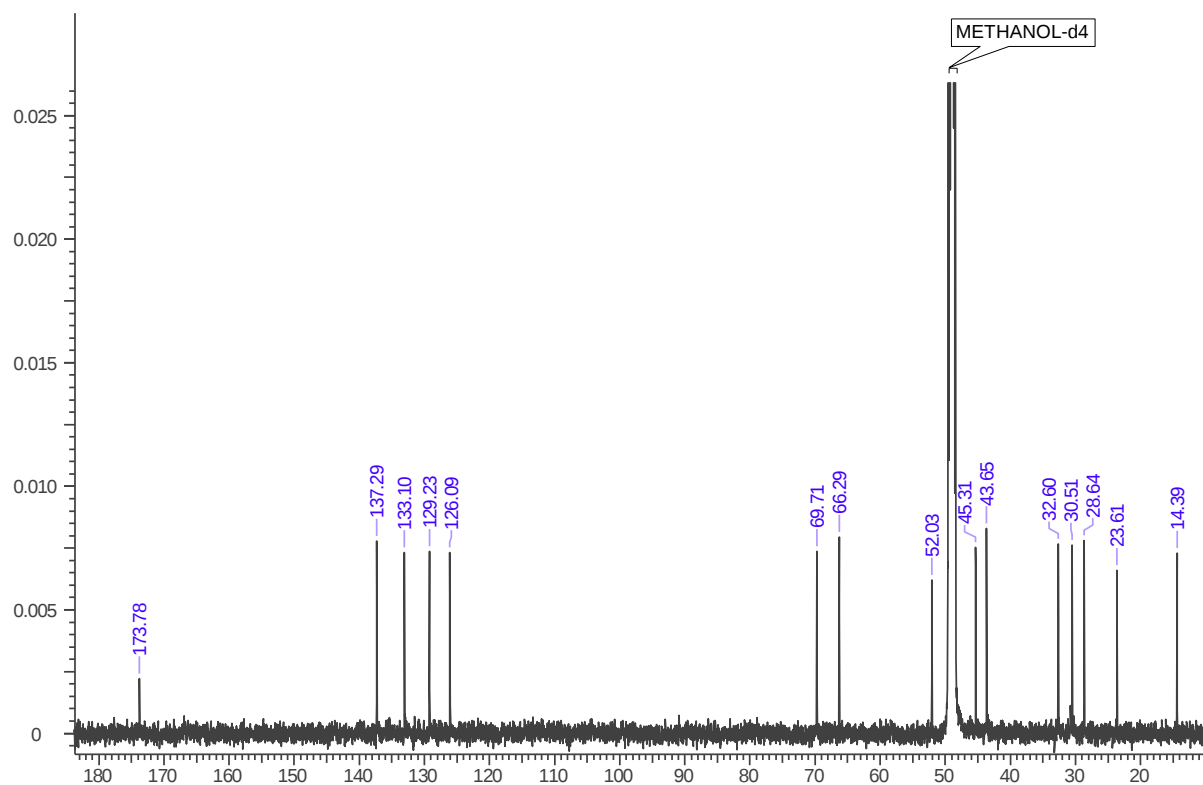
Spektrum 71: HRESIMS-HPLC-UV-Spektrum von Naturstoff 7



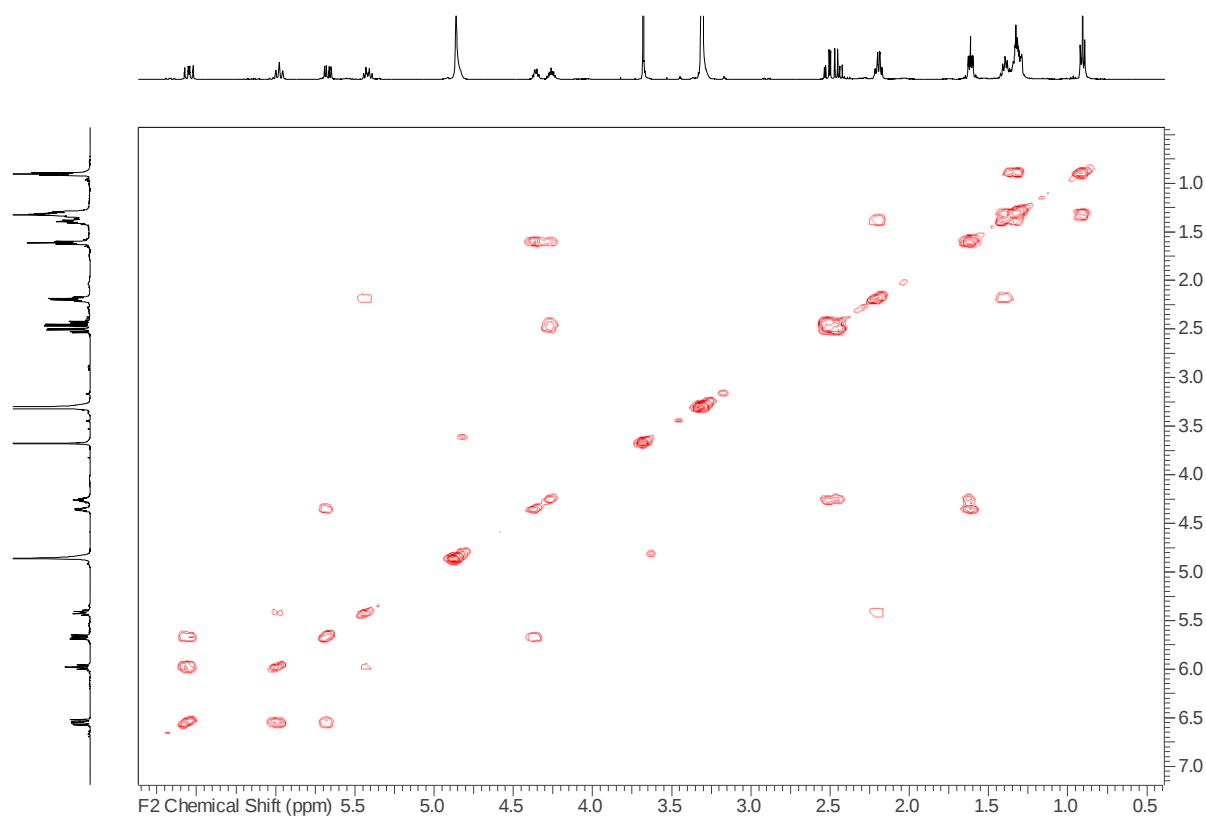
Spektrum 72: UV/Vis-Spektrum von Naturstoff 7



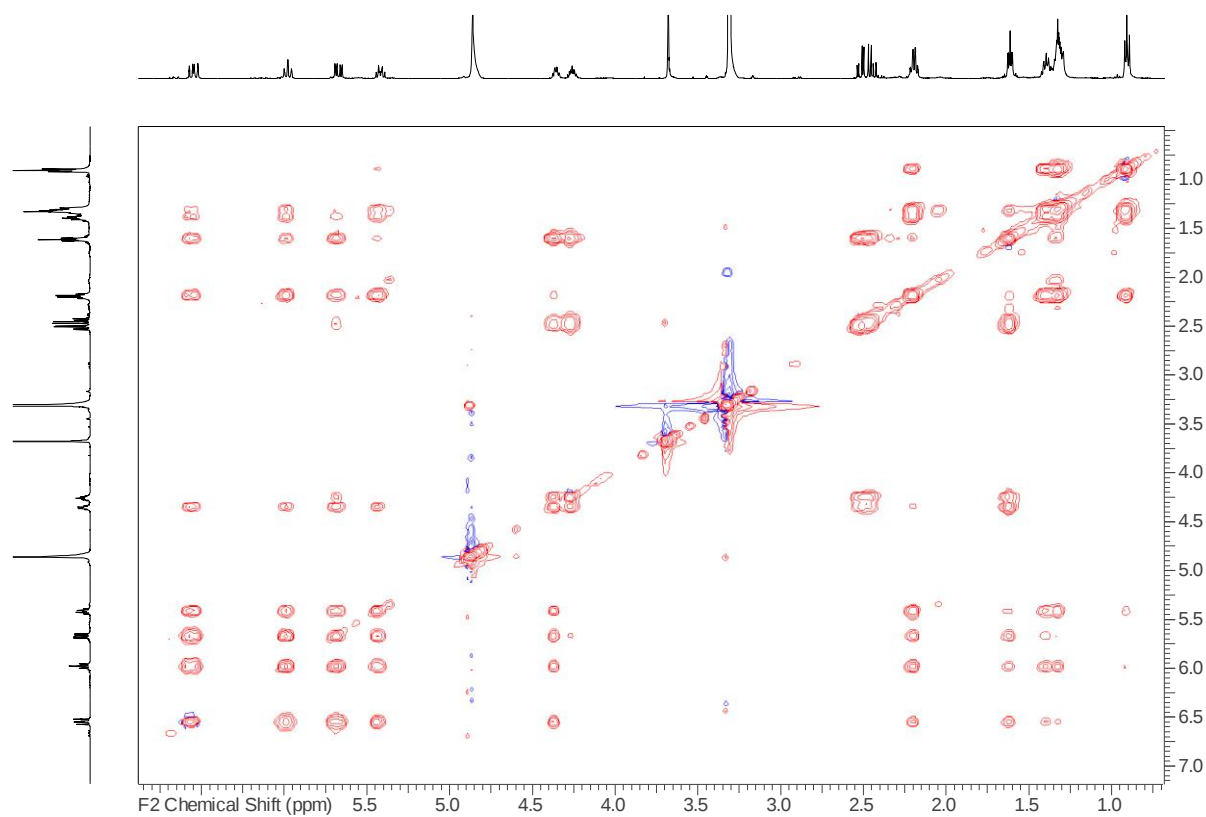
Spektrum 73: ^1H -NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, 500 MHz)



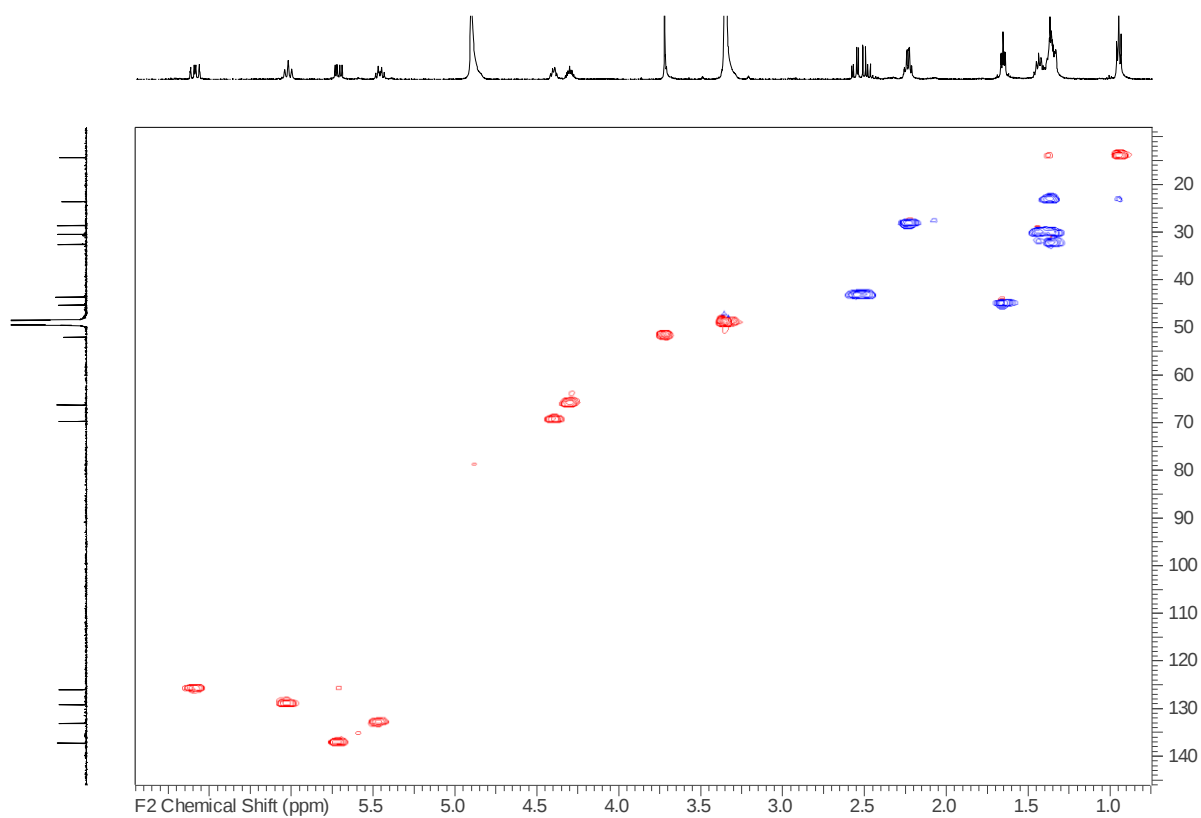
Spektrum 74: ^{13}C -NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, 125 MHz)



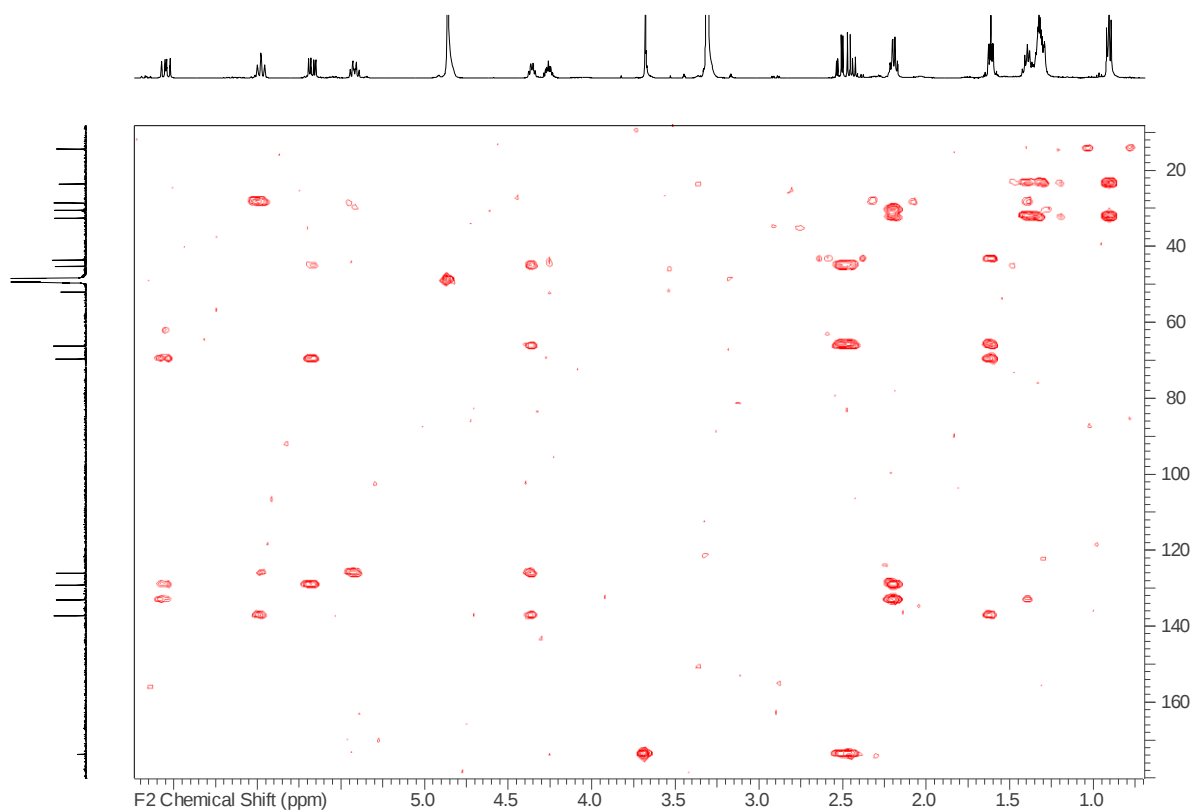
Spektrum 75: ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz)



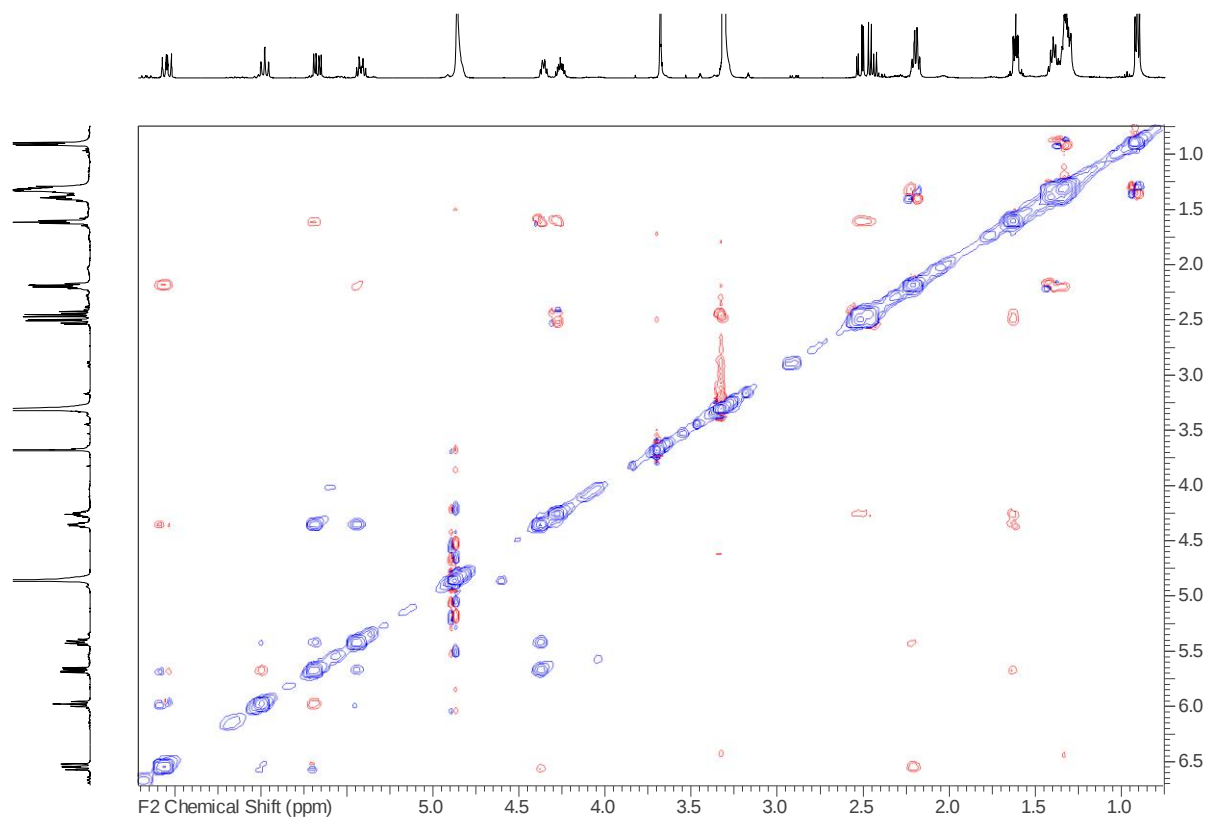
Spektrum 76: ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz)



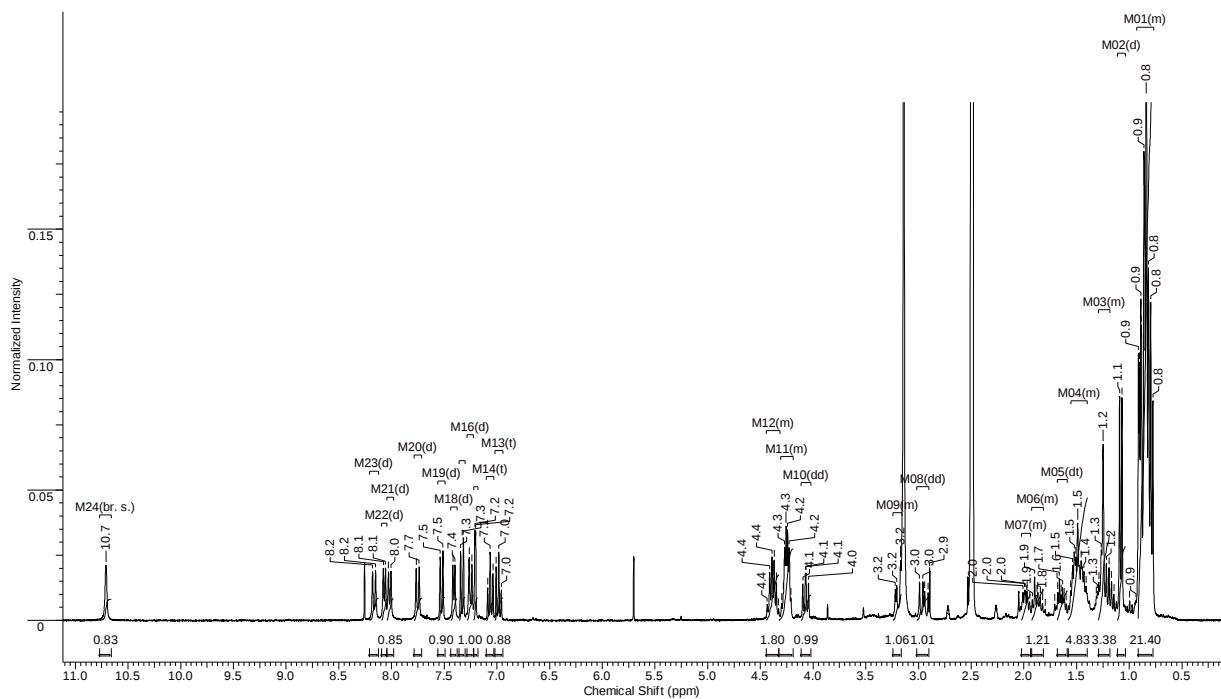
Spektrum 77: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz, ^{13}C -NMR 125 MHz)



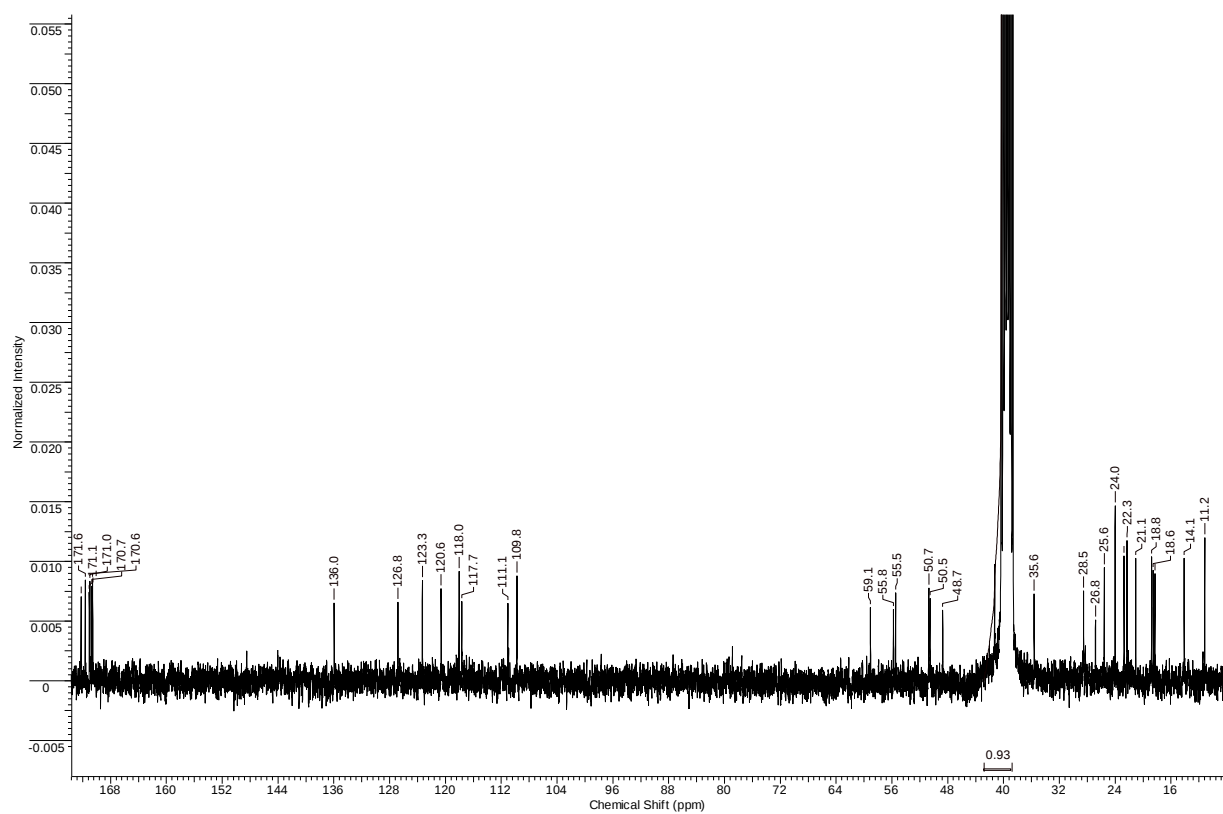
Spektrum 78: ^1H , ^{13}C -HMBC-NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz, ^{13}C -NMR 125 MHz)



Spektrum 79: ^1H , ^1H -ROESY-NMR-Spektrum von Naturstoff **7** (MeOD, ^1H -NMR 500 MHz)

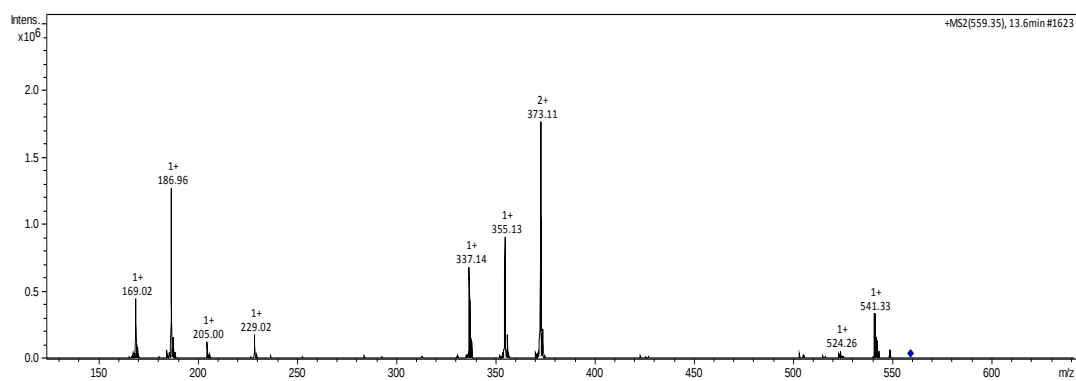


Spektrum 80: ^1H -NMR Spektrum von synthetischem Baceridin (**33**) (300 MHz, 333 K, $\text{DMSO}-d_6$)

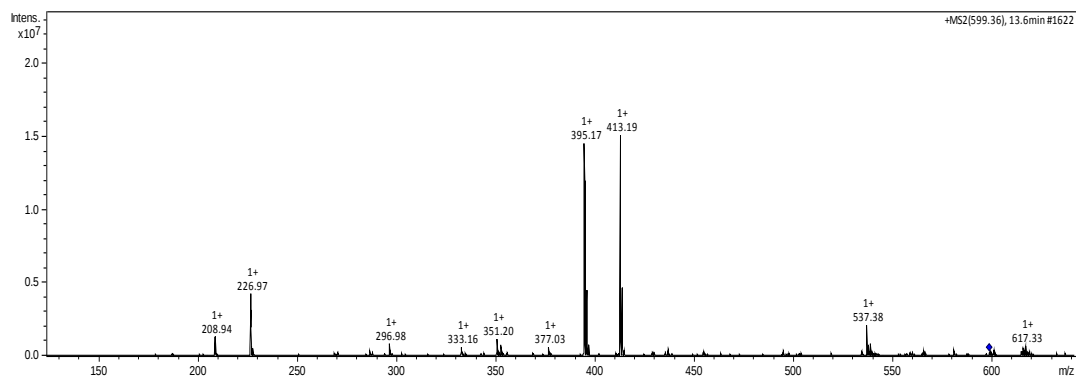


Spektrum 8113C-NMR-Spektrum von synthetischem Baceridin (**33**) (75 MHz, 333 K, DMSO- d_6)

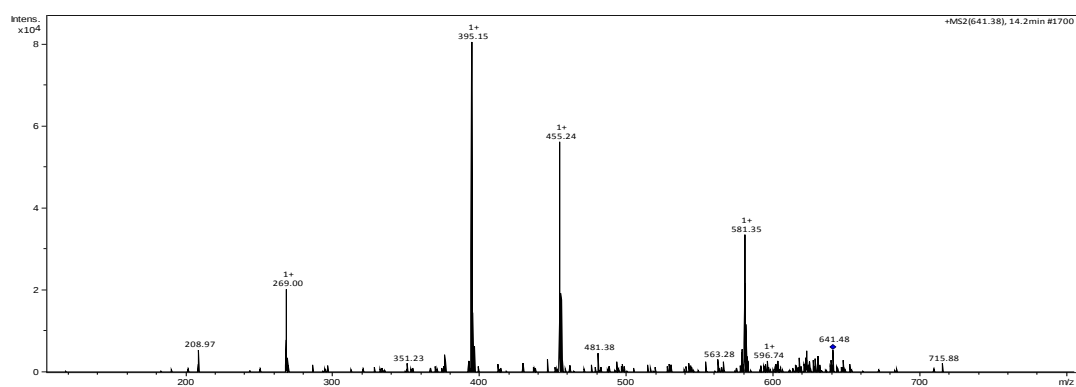
MS-MS-Daten von Liamocinen und Exophilinen aus *Aureobasidium pullulans* ISch31



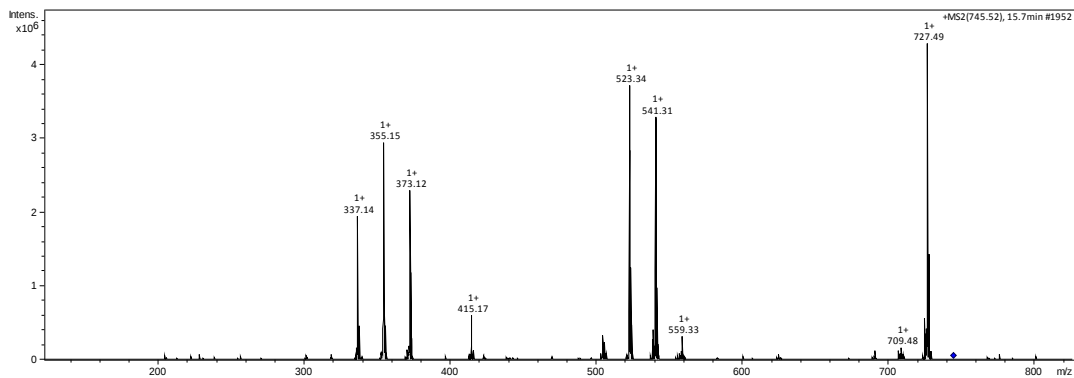
Spektrum 82: MS-MS-Daten von Exophilin A1 m/z 559 $[M-H_2O+H]^+$



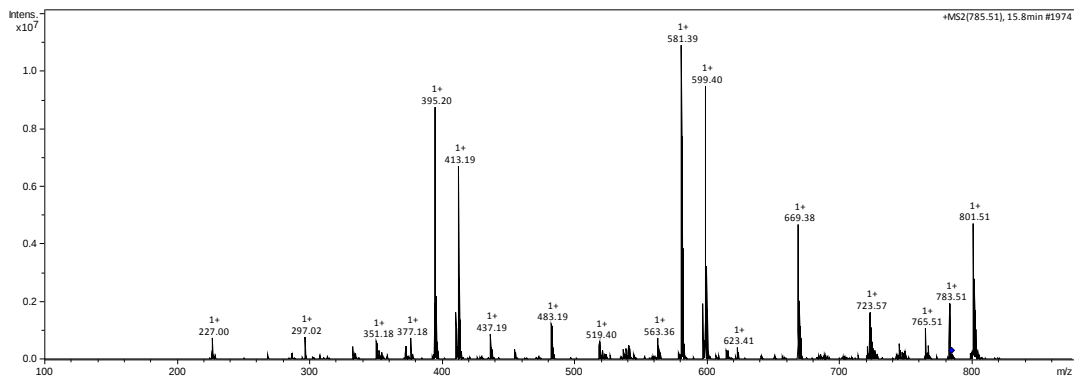
Spektrum 83: MS-MS-Daten von Exophilin A1 m/z 599 $[M+Na]^+$



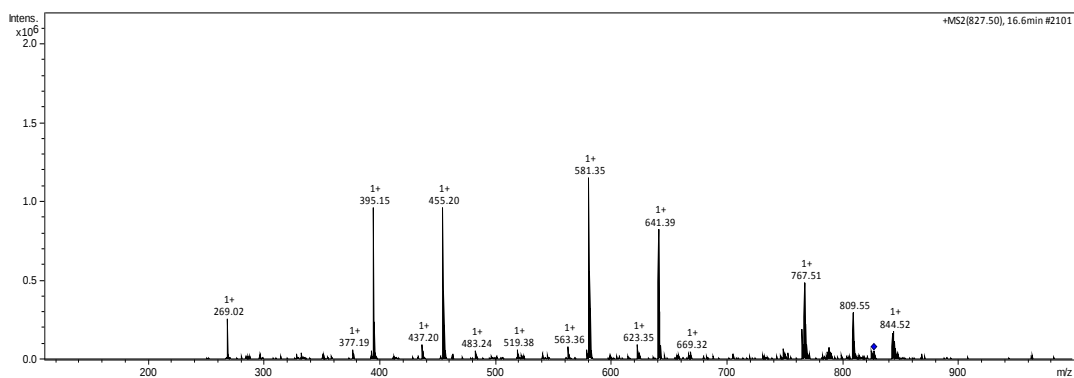
Spektrum 84: MS-MS-Daten von Exophilin A2 m/z 641 $[M+Na]^+$



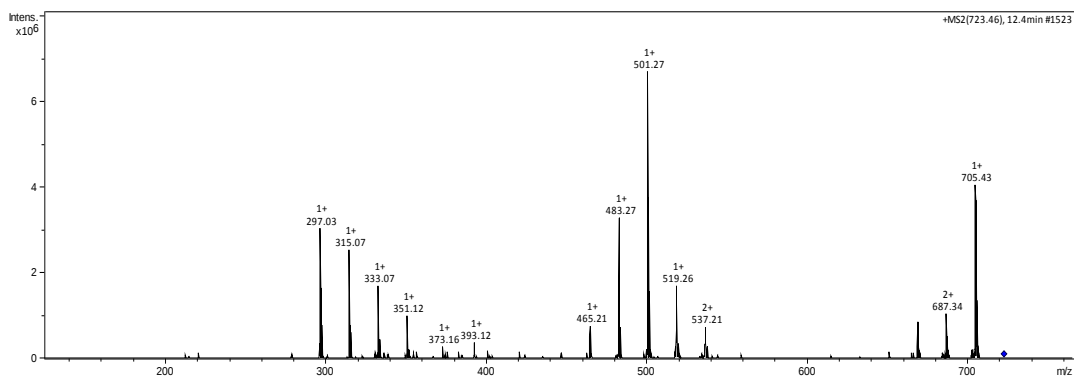
Spektrum 85: MS-MS-Daten von Exophilin B1 m/z 745 $[M-H_2O+H]^+$



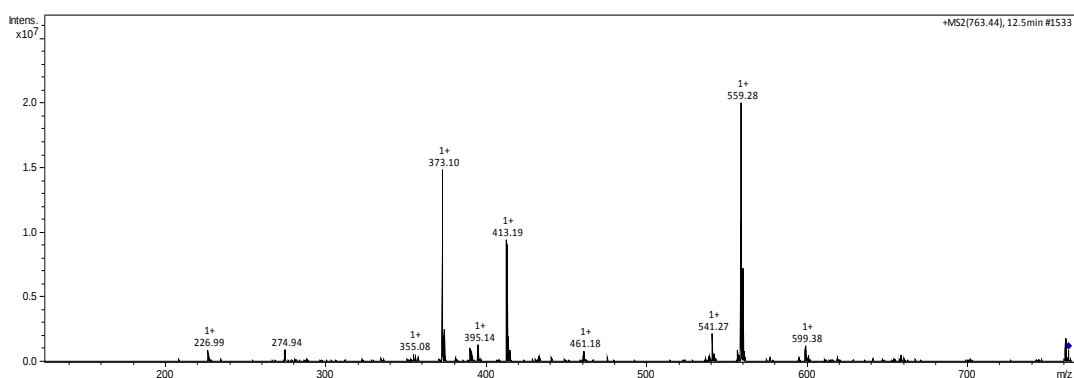
Spektrum 86: MS-MS-Daten von Exophilin B1 m/z 785 $[M+Na]^+$



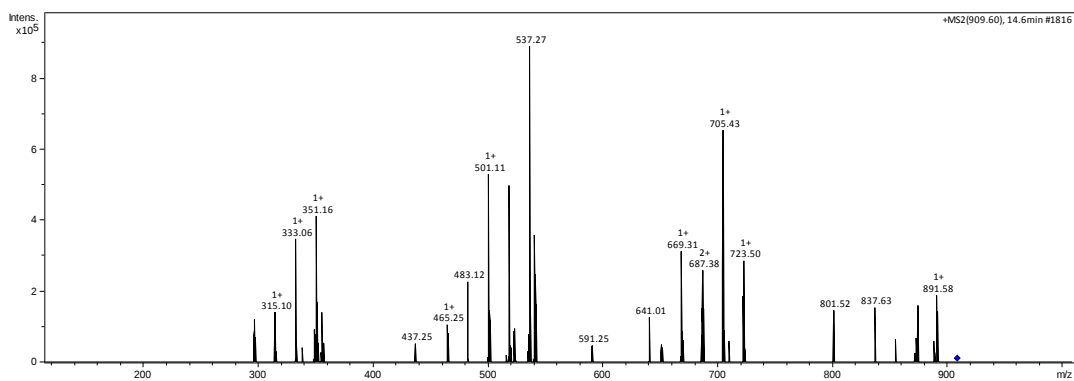
Spektrum 87: MS-MS-Daten von Exophilin B2 m/z 827 $[M+Na]^+$



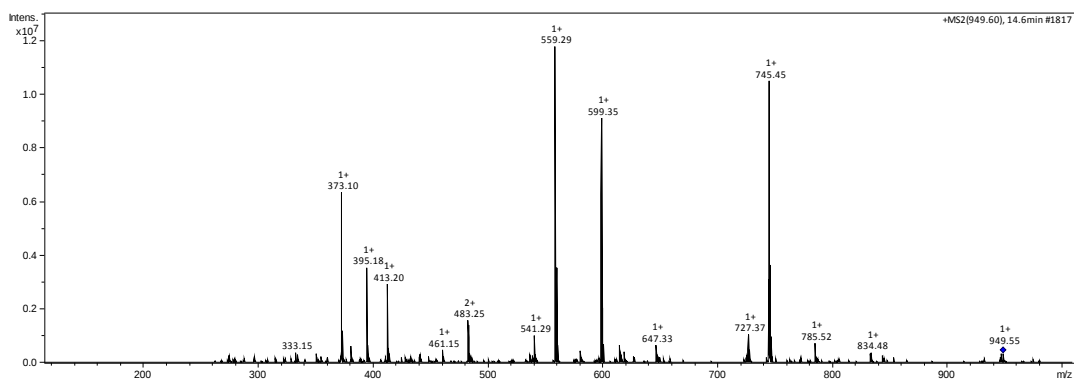
Spektrum 88: MS-MS-Daten von Liamocin A1 m/z 723 $[M-H_2O+H]^+$



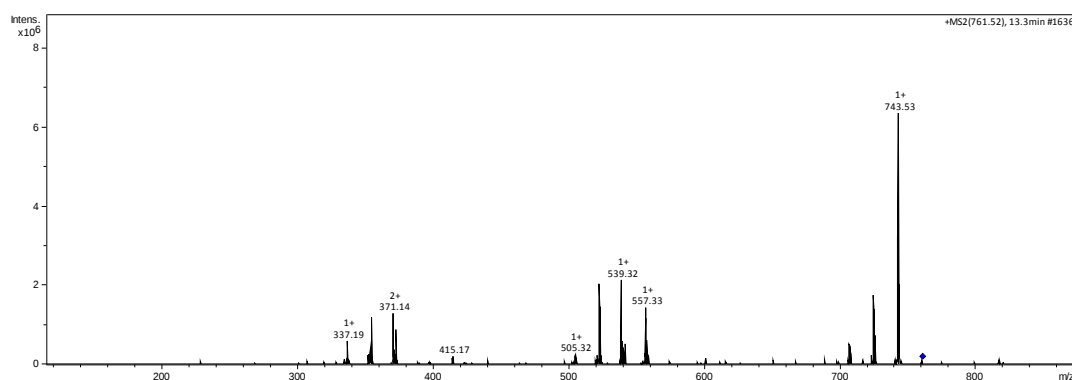
Spektrum 89: MS-MS-Daten von Liamocin A1 m/z 763 $[M+Na]^+$



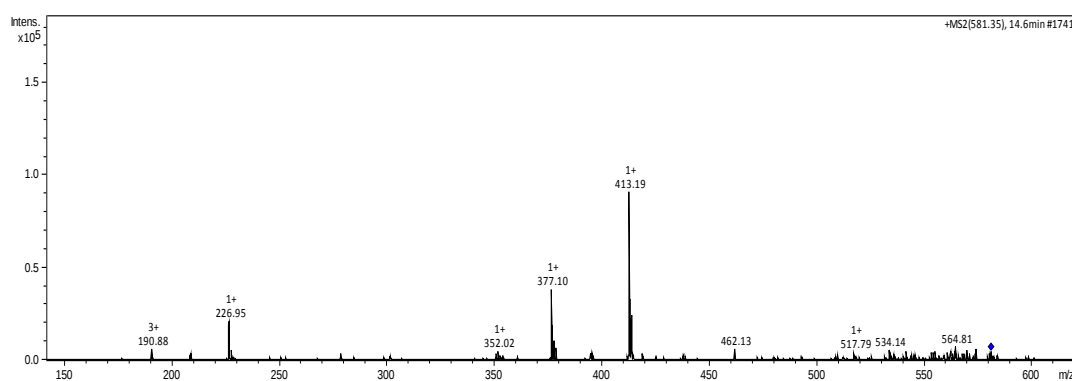
Spektrum 90: MS-MS-Daten von Liamocin B1 m/z 909 $[M-H_2O+H]^+$



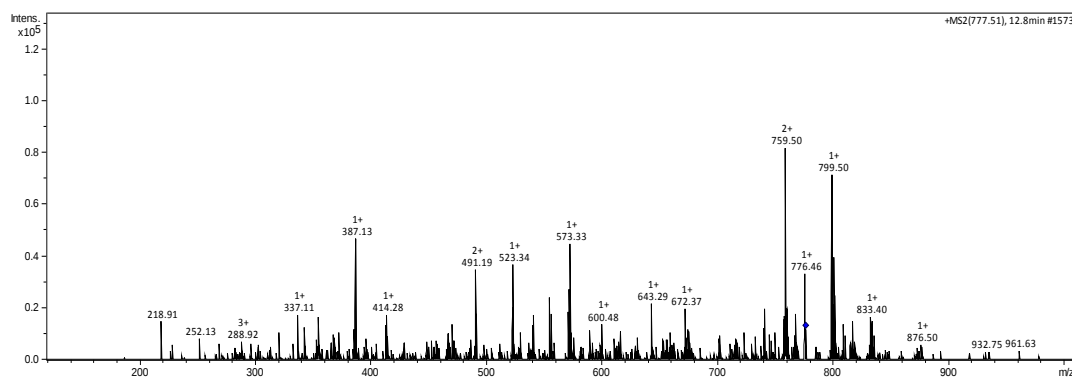
Spektrum 91: MS-MS-Daten von Liamocin B1 m/z 949 $[M+Na]^+$



Spektrum 92: MS-MS-Daten eines Exophilin/Liamocin-Derivates mit m/z 761 $[M-H_2O+H]^+$

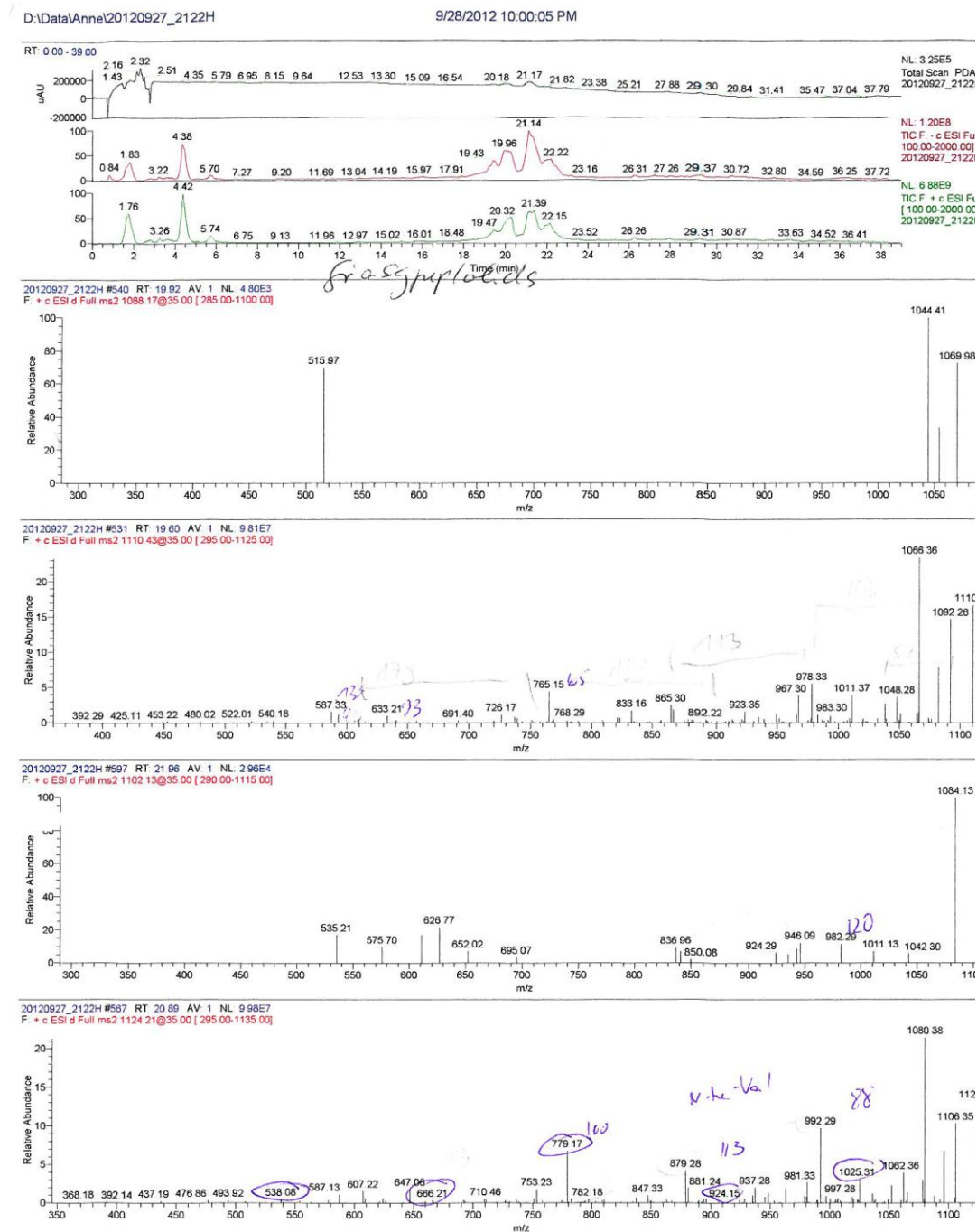


Spektrum 93: MS-MS-Daten eines Exophilin/Liamocin-Derivates mit m/z 581 $[M-H_2O+H]^+$



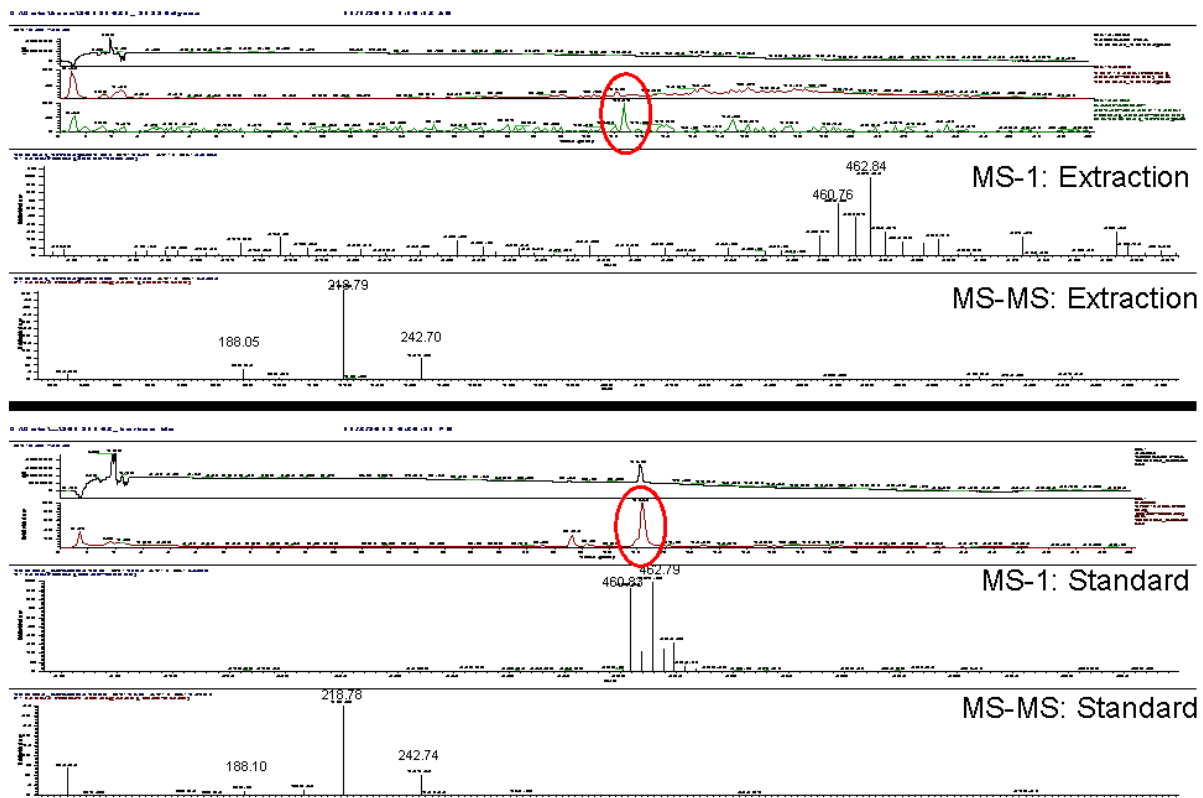
Spektrum 94: MS-MS-Daten eines Exophilin/Liamocin-Derivates mit m/z 777 $[M-H_2O+H]^+$

MS-MS-Daten von Naturstoffen aus einem Cyanobakterium und einer Alge



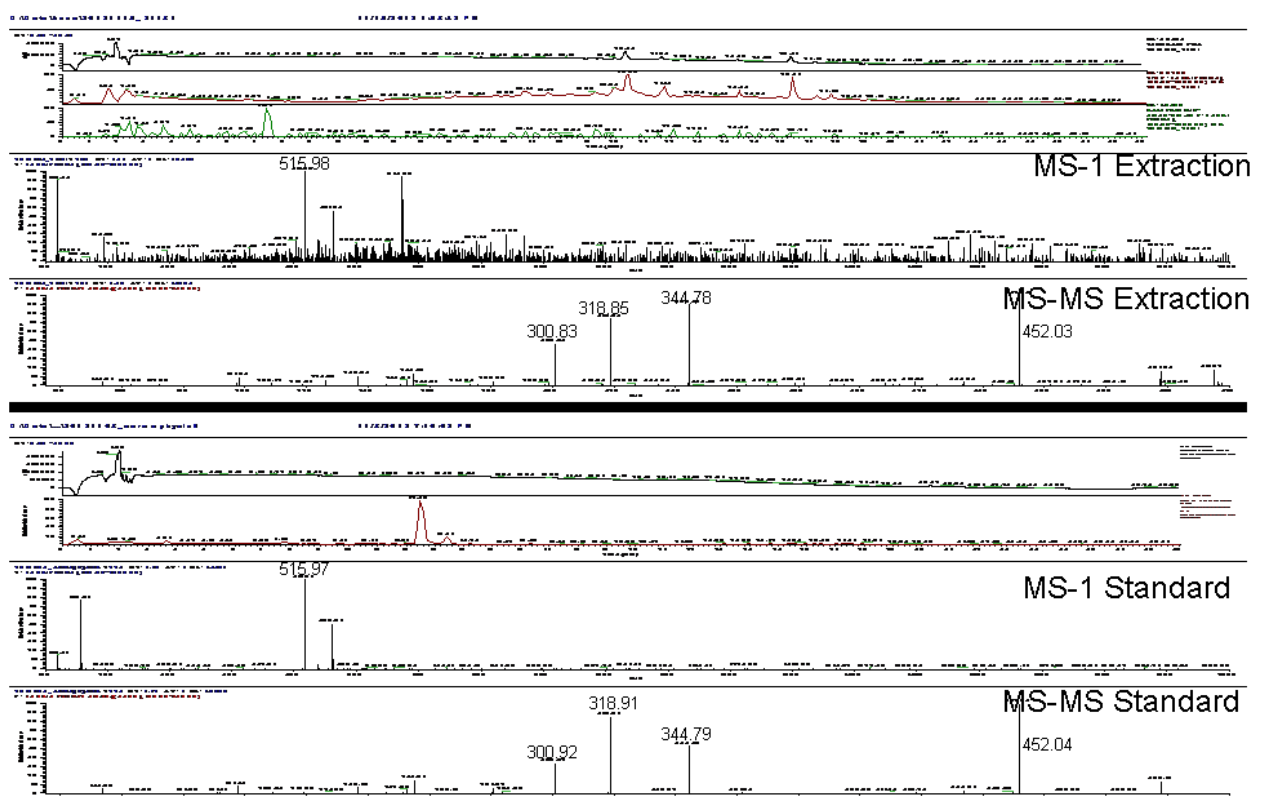
Spektrum 95: MS-MS-Daten der Grassypeptide

barbamide

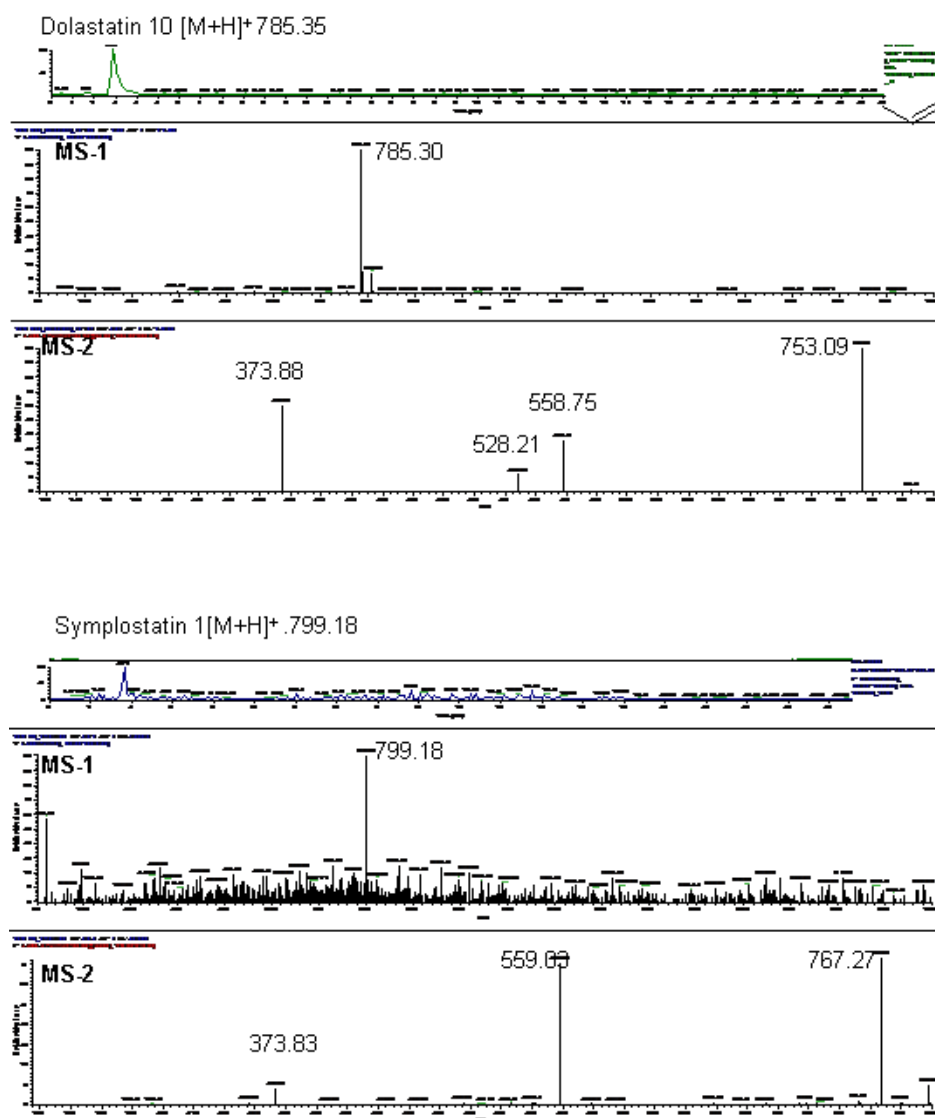


Spektrum 96: MS-MS-Daten von Barbamid

Carmaphycin A



Spektrum 97: MS-MS-Daten von Carmaphycin A



Spektrum 98: MS-MS-Daten von Symplostatin 1 und Dolastatin 10

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. Dr. Markus Kalesse für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken und dass ich die Möglichkeit bekommen habe diese Dissertation anzufertigen. Vor allem danke ich für die Betreuung und Unterstützung bei chemischen Fragestellungen sowie der Ermöglichung eines Auslandsaufenthaltes am Scripps Institution of Oceanography in San Diego.

Prof. Dr. Marc Stadler möchte ich herzlich für die permanente Hilfsbereitschaft bei Problemen und biologischen Fragestellungen danken. Ich danke auch für die Übernahme des Korreferats und die zahlreichen Einblicke in die Pilz- und Naturstoffwelt.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Mark Brönstrup für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Mein Dank gilt William und Lena Gerwick für die erhaltene Möglichkeit der Forschung in ihrer Arbeitsgruppe und die schöne Zeit inner- und außerhalb des Labors in San Diego.

Ein großer Dank für die Zusammenarbeit geht an die Arbeitsgruppenmitglieder der Abteilung Medizinische Chemie: Evgeny, Christina, Hao, Wufeng, Nicole, Jan und Johanna. Vor allem Christina, Nicole, Jan und Johanna danke ich für die Unterstützung bei theoretischen und praktischen Problemen, die für eine Biologin anfangs ohne Hilfe unlösbar schienen.

Ich danke Inge Reupke für die Durchführungen der Fermentationen und Plattendiffusionstests. Christel Kakoschke danke ich ganz herzlich für die Messung der (häufig sehr „dünnen“) NMR-Proben. Bei Aileen Teichmann bedanke ich mich für die schnellen Messungen der Massen.

Dr. Jutta Niggemann danke ich für die Unterstützung beim Einstieg in das Thema der Dissertation sowie die nette Zusammenarbeit im Labor. Vielen Dank auch an Christian Richter für die molekularbiologische Bestimmung meines *Aureobasidium*!

Für die zahlreichen lustigen Mittagspausen, Gespräche und privaten Aktivitäten danke ich Nicole, Johanna, Jan, Wufi, Vladi, Eric, Sandra, Lucile, Kathrin, Christiane, Christian und Christina. Mit einigen der Leute sind über die drei Jahre tolle Freundschaften entstanden!

Danke auch an meine Freunde für die Telefonate, Gespräche, Wochenendurlaube und Ablenkungen in stressigen Zeiten.

Der größte Dank gilt meiner Familie. Danke an meine Mutter, meinen Vater und meinen Bruder. Ohne Euren bedingungslosen Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Gunnar. Ich danke für die uneingeschränkte Unterstützung, das Zureden in scheinbar ausweglosen Situationen, die tolle Zeit und dafür, dass ich in sein Leben poltern durfte und für immer bleiben darf.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Anne Pietzner, geb. Wodtke
Geburtsdatum: 11.10.1984
Geburtsort: Rostock
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademischer Werdegang

seit 09/2011 Promotionsstudium am Institut für Organische Chemie, Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover, Betreuung durch Prof. Dr. Markus Kalesse.
Thema: Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus epiphytischen Mikroorganismen.

04/2010-12/2010 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Betreuung durch Prof. Dr. Rüdiger Bode
Thema: Untersuchungen zum Abbau von Protocatechusäure durch *Arxula adenivorans*.

10/2004-12/2010 Studium der Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Abschluss: Diplom-Biologin
Hauptfach: Biochemie
1. Nebenfach: Genetik
2. Nebenfach: Pharmazeutische Biologie

08/1997-06/2004 Abitur am Alexander-von-Humboldt-Gymnasium Greifswald

Veröffentlichungen

Yang, J. Y., Sanchez, L. M., Rath, C. M., Xueting, L., Boudreau, P. D., Bruns, N., Glukhov, E., Wodtke, A., Felicio, R., Fenner, A., Wong, W. R., Linington, R. G., Zhang, L., Debonis, H. M., Gerwick, W. H., Dorrestein, P. C. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.*, **2013**, 76(9), 1686-1699

Niggemann, J., Przemyslaw, B., Bruns, N., Wodtke, A., Gieseler, M. T., Thomas, K., Jahns, C., Nimtz, M., Reupke, I., Brüser, T., Auling, G., Malek, N., Kalesse, M. Baceridin a Cyclic Hexapeptide from an Epiphytic *Bacillus* Strain, Inhibits the Proteasome. *ChemBioChem*, **2014**, 15, 1021-1029