

**Isolierung, Strukturaufklärung und Syntheseversuche von biologisch
aktiven Sekundärmetaboliten aus endophytischen Mikromyceten**

Vom Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Universität-Gesamthochschule-Paderborn
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

von
Karl-Heinz E. Drogies
aus Bad Driburg

Paderborn 1997

Referent: Prof. Dr. Karsten Krohn
Koreferent: Prof. Dr. Nikolaus Risch

Eingereicht am: 03. Oktober 1997
Tag der mündlichen Prüfung: 27. November 1997

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Februar 1997 bis zum Oktober 1997 im Fachbereich Chemie und Chemietechnik der Universität-GH-Paderborn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Karsten Krohn angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Karsten Krohn danke ich für die interessante Themenstellung und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Risch danke ich für die bereitwillige Übernahme des Koreferats.

Weiterhin gilt mein Dank all meinen Kunden für die finanzielle Unterstützung.

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit der BASF AG Ludwigshafen und finanzieller Unterstützung des BMBF (Bundesministerium für Bildung und Forschung) angefertigt.

Für den einsamsten Menschen der Welt, den Verkäufer.

Für die wunderbarsten „natural products“, Gabriele, Phillip und Lilly.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	1
1.1 Klassifizierung der Pilze.....	1
1.2 Sekundärstoffwechsel und Sekundärmetabolite	3
1.3 Antibiotika und Mykotoxine	5
2 Problemstellung.....	9
3 Hauptteil I.....	10
3.1 Stamm 1948	10
3.1.1 Pilzbeschreibung	10
3.1.2 Isolierung	10
3.1.3 Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe	11
3.1.3.1 Naturstoff 1948.I	11
3.1.3.2 Naturstoff 1948.II	13
3.1.4 Biologische Aktivität	14
3.1.5 Kurzbeschreibung der Pharma-Grundscreeningtests	15
3.2 Stamm 2049	17
3.2.1 Pilzbeschreibung	17
3.2.2 Isolierung	17
3.2.2.1 Naturstoff 2049.I	17
3.2.3 Strukturaufklärung und Charakteristik des Naturstoffes 2049.I	18
3.2.4 Biologische Aktivität	20
3.3 Substanz 2049.II	20
3.4 Stamm 1727	21
3.4.1 Pilzbeschreibung	21
3.4.2 Isolierung des Naturstoffes 1727.I und 1727.II	21
3.4.3 Strukturaufklärung des Naturstoffes 1727.I	22
3.4.4 Biologische Aktivität	24
3.4.5 Naturstoff 1727.II	25
3.5 Stamm 2072	27
3.5.1 Pilzbeschreibung	27
3.5.2 Isolierung	27
3.6 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.I	28
3.6.1 Ermittlung der relativen Konfiguration	35
3.6.2 Biosynthese des Naturstoffes 2072.I	36
3.6.3 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.II	37
3.6.3.1 Ermittlung der relativen Konfiguration	40

INHALTSVERZEICHNIS

3.6.4 Biologische Aktivität des Naturstoffes 2072.II	41
3.6.5 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.III	42
3.6.6 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.IV	44
3.6.7 Aufklärung der relativen Konfiguration des Naturstoffes 2072.IV	52
3.6.8 Stamm 3042	54
3.6.9 Pilzbeschreibung	54
3.6.10 Isolierung aus dem Stamm 3042	54
3.6.10.1 Naturstoffe 3042.I–3042.VI	54
3.6.11 Strukturaufklärung der Naturstoffe	55
3.6.11.1 Naturstoff 3042.I	55
3.6.11.2 Naturstoff 3042.II	57
3.6.11.3 Naturstoff 3042.III	58
3.6.11.4 Naturstoff 3042.IV	59
3.6.11.5 Naturstoff 3042.V	61
3.6.11.6 Naturstoff 3042.VI	62
3.6.12 Biosynthese der Colletorine und Ascochlorine	62
3.6.13 Biologische Aktivität	63
4 Hauptteil II.....	64
4.1 Retrosynthetische Überlegungen zur Partialsynthese	64
4.2 Durchführung.....	66
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	69
6 EXPERIMENTELLER TEIL	71
6.1 Allgemeine Methoden und Meßverfahren.....	71
6.2 Durchführung der Aktivitätstests	73
6.3 Experimenteller Teil der Naturstoffisolierung	74
6.3.1 Pilzstamm 1948	74
6.3.1.1 Isolierung	74
6.3.2 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften	75
6.3.2.1 Ergosta-4,7,22-trien-3-on (1948.I)	75
6.3.2.2 5,8-Epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol (1948.II)	76
6.3.3 Pilzstamm 2049	77
6.3.3.1 Isolierung	77
6.3.4 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften	78
6.3.4.1 1,2-Diacetyl-5,10-dihydroxy-3,7,8,12-tetramethoxy-1,2-dihydro-benzo[ghi]-perylen-4,11-dion (2049.I)	78
6.3.5 Stamm 1727	79

INHALTSVERZEICHNIS

6.3.5.1 Isolierung	79
6.3.6 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften	79
6.3.6.1 3,4,4a,5,6,7-Hexahydro-8-hydroxy-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-on (1727.I)	79
6.3.6.2 3-(2-Hydroxypropyl)-cyclohexan-1-on (1727.II)	80
6.3.7 Stamm 2072	81
6.3.7.1 Isolierung	81
6.3.8 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften	82
6.3.8.1 2-(1'-cis-3',5'-Dimethylhept-1'-enyl)-3,4-dihydroxy-7-methyl- 2,3,4,4a,7,7a-tetrahydrofuro[3,4-b]pyran-5-on (2072.I)	82
6.3.8.2 3,4-Dihydroxy-2-(1'-cis-5'-Hydroxy-3',5'-Dimethylhept-1'-enyl)-7- methyl-2,3,4,4a,7,7a-hexahydrofuro[3,4-b]pyran-5-on (2072.II)	83
6.3.8.3 3,4,8-Trihydroxy-3,4a,8a-tetrahydro-2H-naphtalin-1-on (2072.III)	85
6.3.8.4 [3R*- [3 α ,3a β ,4a α ,5 β ,6 β ,8a β ,9 α ,10S*(Ξ),11R*]-3a,4,4',5',8,8a,9,9a- Octahydro-5,9,11-trihydroxy-9a-methyl-10-(2-Methyl-1-oxobutyl)spiro[9,11- epoxy-3,4a-ethano-4aH-furo]3,2-g][2]benzopyran-6,2'(5'H,3'H)-furan]- 2(3H)on (2072.IV)	86
6.4 Stamm 3042	87
6.4.1.1 Isolierung	87
6.4.1.2 3-(3',7'-Dimethyl-2',6'-octadienyl)-2,4-dihydroxy-6- methylbenzaldehyd (3042.I)	87
6.4.1.3 5-Chlor-3-(3',7'-Dimethyl-2',6'-octadienyl)-2,4-dihydroxy-6- methylbenzaldehyd (3042.II)	88
6.4.1.4 2,4-Dihydroxy-6-methyl-3-(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl)- benzaldehyd (3042.III)	89
6.4.1.5 3-[5-(3-Acetyl-5-chlor-2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)-3-methylpent- 3-enyl]-2,3,4-trimethylcyclohexanon (3042.IV)	90
6.4.1.6 3-[5-(3-Acetyl-5-chlor-2,6-dihydroxy-4-methyl-phenyl)-3-methyl- penta-1,3-dienyl]-2,3,4-trimethyl-cyclohexanon (3042.V)	91
6.4.1.7 3-[5-(3-Acetyl-2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)-3-methylpent-3-enyl]- 2,3,4-trimethylcyclohexanon (3042.VI)	92
7 Literaturverzeichnis	93

1 EINLEITUNG

1.1 Klassifizierung der Pilze

In unserem Leben haben wir ständig Umgang mit Mikromyceten (Schimmel- oder Hefepilze). Es vergeht kein Tag an dem wir nicht Nutzen oder Schaden aus ihnen ziehen, jedoch kommt es dabei immer auf den Blickwinkel an, ob der Pilz als Schädling oder Nützling definiert wird. So enthalten die Sklerotien des Mutterkornpilzes *Claviceps purpurea* Toxine, die Vergiftungen verursachen, wenn die Mutterkörner in das Getreidemehl gelangen. Diese Toxine werden jedoch gezielt aus Fermenterkulturen von *Claviceps*-Myzel gewonnen, um in der Geburtshilfe eingesetzt zu werden (Mutterkornextrakte wurden schon vor 2000 Jahren in China angewendet, um Gebärmutterblutungen einzudämmen). Weitere Beispiele für nützliche Mikromyceten sind Pilzkulturen im Sauerteig zur Brotherstellung, im Wein, im Bier oder im Käse. Die Anzahl der Pilzarten wird z. Zt. mit 100 000 bis 120 000 beschriebenen Arten angegeben, jedoch schätzt man die tatsächliche Anzahl auf über 300 000 Arten, so daß die Anzahl der Pilzspecies diejenige der Samenpflanzen übersteigt.

Die Biologen^[1] definieren die Mikromyceten als Zellkerne enthaltende, Sporen tragende, chlorophyllfreie Organismen, die sich im sowohl geschlechtlich als auch ungeschlechtlich fortpflanzen. Die somatischen Strukturen sind typischerweise von Zellwänden umgeben, die Zellulose oder Chitin oder beides zugleich enthalten.

Nach der Lebensweise lassen sich Pilze (Fungi) in zwei Gruppen einteilen. Eine Gruppe stellen die saprophytischen Pilze dar, die notwendige Kohlenstoffverbindungen aus organischen Rückständen beziehen. Die andere Gruppe sind biotrophe Pilze, die als Symbionten oder Parasiten leben und Pflanzen, Bakterien, Tiere oder andere Pilze besiedeln. Durch ihre heterotrophe Lebensweise unterscheiden sich Pilze von Pflanzen und Algen, die mit Kohlendioxid als einziger Kohlenstoffquelle auskommen. Von den prokaryontischen Bakterien unterscheiden sie sich dadurch, daß sie echte Zellkerne besitzen.

Die Taxonomie von Pilzen ist aufgrund ihrer Ähnlichkeit sehr schwierig^[2]. Gleiche Pilze werden oft von verschiedenen Autoren mit unterschiedlichen Namen versehen. Die Gliederung in verschiedene Abteilungen erfolgt aufgrund ihrer geschlechtlichen Entwicklung in Zygomycota (Jochpilzartige), Ascomycota (Schlauchpilzartige) und Basidiomycota (Ständerpilzartige). Echte Pilze, die nur nach ihren asexuellen Zuständen beurteilt werden können, weil ihre geschlechtliche Entwicklung unvollständig oder unvollständig bekannt ist, gehören zur Formabteilung Fungi Imperfecti. Diese Pilze sind jedoch nicht geschlechtslos, sondern bei ihnen laufen zur Reproduktion gehörende Prozesse, wie die Verschmelzung der Protoplasten (Plasmogamie), die Ver-

schmelzung der Kerne (Karyogamie) und die Reduktionsteilung (Meiose) ebenfalls ab, jedoch nicht an bestimmten Stellen des Vegetationskörpers und in bestimmten Entwicklungszuständen.

Jede dieser Klassen (Endung -myceten) wird in eine Vielzahl von Ordnungen mit festgelegten Rangstufen unterteilt, die durch bestimmte Endungen kenntlich gemacht werden^[3]:

regnum (Organismusbereich)	Fungi
subregnum	
divisio (Abteilung)	-mycota
subdivisio (Unterabteilung)	-mycotina
classis (Klasse)	-mycetes
subklassis (Unterklasse)	-mycetidae
superordo (Überordnung)	-mycetanae
ordo (Ordnung)	-ales
subordo (Unterordnung)	-ineae
familia (Familie)	-aceae
subfamilia (Unterfamilie)	-oideae
tribus (Tribus)	-iae
subtribus (Subtribus)	-inae
genus (Gattung)	
species (Art)	
subspecies (Unterart)	
varietas (Varietät)	
form (Form)	

Von der Gattung eines Pilzes gibt es meistens mehrere Arten. So sind z. B. von der Pilzgattung *Aspergillus* u. a. die Arten *ochraceus*, *sulphureus*, *melleus*, *sclerotiorum*, *alliaceus* und *ostianus* bekannt. Handelt es sich um parasitäre Pilze, die keine Unterscheidungsmerkmale aufweisen, kann eine Art weiter in Unterarten, Varietäten, Formen und Rassen unterteilt werden.

1.2 Sekundärstoffwechsel und Sekundärmetabolite^[4]

In der Entwicklung der Mikromyceten sind zwei verschiedene Phasen zu unterscheiden. Die vegetative Entwicklungsphase (Trophophase), in der die Vertreter zahlreicher Pilzgruppen übereinstimmen, und die Iodophase. Während der Trophophase werden durch den Primärstoffwechsel Makromoleküle und Lipide synthetisiert sowie Energie und Grundbausteine für den Stoffumsatz geliefert. Dabei stehen die Nährstoffaufnahme und -verwertung im Gleichgewicht. Zu den Primärmetaboliten zählen unter anderem Aminosäuren, Vitamine und Nucleotide, sowie Zwischenprodukte des Intermediärstoffwechsels (z. B. die Säuren des Zitronensäurezyklus).

In der Iodophase, der Phase eines gestörten Gleichgewichtes durch Verarmung des Nährstoffangebotes oder Änderung der Umweltbedingungen, kann es zu einer Störung des Gleichgewichtes kommen. Die Gleichgewichtsstörung verursacht eine Umstellung von Primär- zum Sekundärstoffwechsel, so daß es zu einer Anreicherung von Primärmetaboliten kommt. Diese werden dann nicht mehr weiter umgesetzt, sondern induzieren und aktivieren durch diese Vermehrung Enzyme, die die Primärmetabolite dann in sekundäre Metabolite umwandeln können.

Die auf dieser Entwicklungsstufe aufgebauten zahlreichen Sekundärmetabolite werden in den Zellen angereichert oder in das umgebende Medium ausgeschieden beziehungsweise unter den sich kontinuierlich durch den Verbrauch der Nährstoffe variierenden Bedingungen im Nährsubstrat weiter metabolisiert.

Im Gegensatz zum Primärmetabolismus scheint der Sekundärmetabolismus für den Organismus nicht essentiell zu sein. So gibt es auch keine allgemeingültige Theorie, sondern nur Erklärungsansätze zur Aufgabe des Sekundärstoffwechsels, wie ungenügende Regulation primärer Stoffwechselprodukte, die Verwertung überschüssiger Stoffwechselprodukte, Entgiftungsreaktionen im Stoffwechsel, Abwehrwirkung nach außen durch Antibiotikahemmung von Konkurrenten oder Fraßverhinderung durch Mykotoxine.

Beispiele für den Zusammenhang zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel zeigt folgende Grafik (**Abb. 1**):

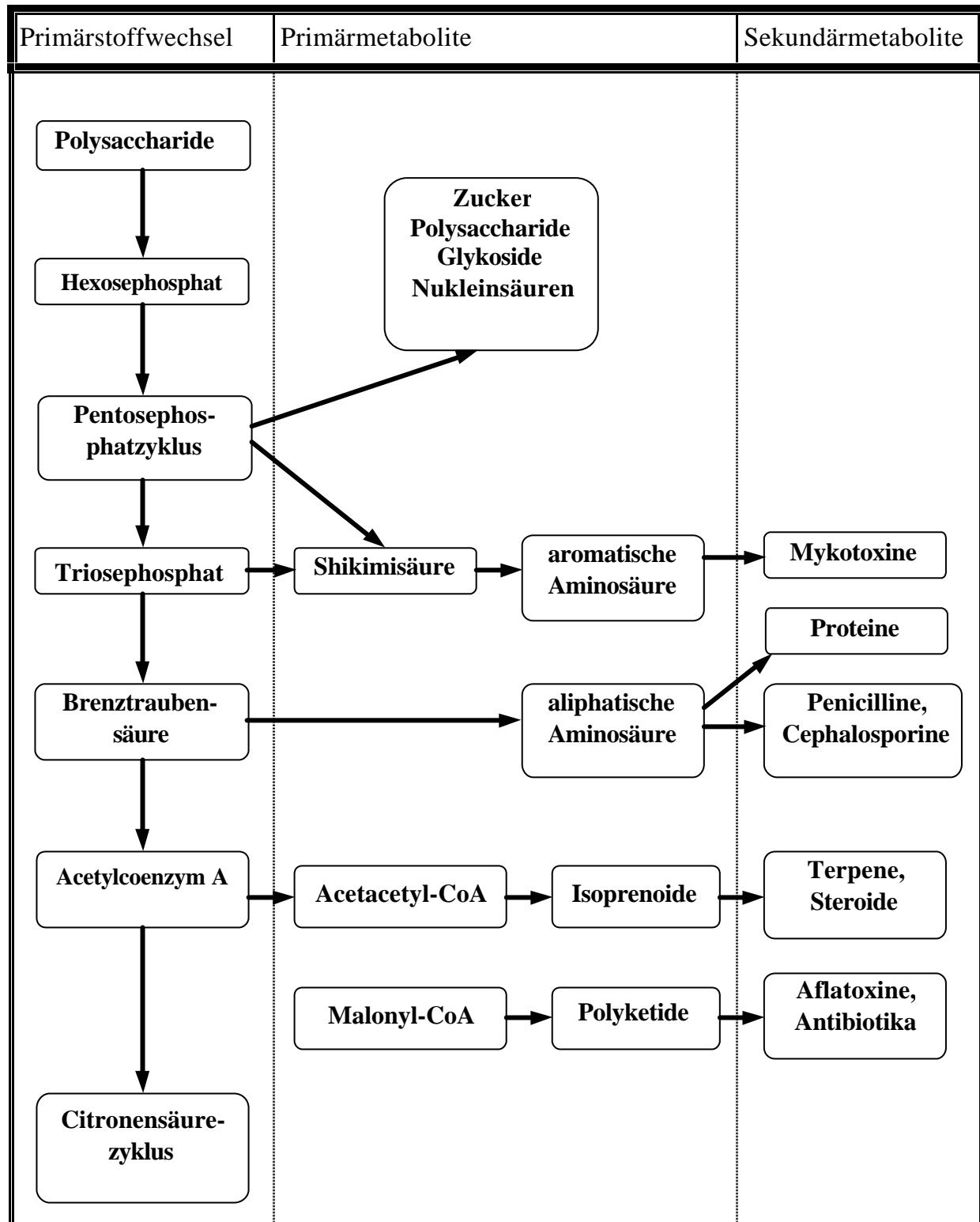


Abb. 1: Beispiele für den Zusammenhang zwischen Primär und Sekundärstoffwechsel^[5]

1.3 Antibiotika und Mykotoxine

Innerhalb der Sekundärmetabolite stellen die Antibiotika und die Mykotoxine zwei verschiedene Gruppen dar. Der Begriff der Mykotoxine wird dabei in der Literatur nicht einheitlich verwendet, aber meistens auf die Metabolite von Mikromyceten beschränkt, die unter dem Begriff Schimmelpilze zusammengefaßt werden. Von ihnen sind einige Hundert bekannt, die von ca. 120 Schimmelpilzen produziert werden. Die Hauptherkunftsgruppen einiger Mykotoxine^[6] aus den Zwischenprodukten des Primärstoffwechsels sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Polyketide	Terpene	Tricarbonsäurezyklus	
Acetat-Malonat	Mevalonat	Pyruvat-Acetat	Aminosäuren
Aflatoxine	Fumagallin	Byssochlaminsäure	Aspergillinsäure
Citirinnin	Roridin	Erythroskyrin	Cyclopenein
Citreoviridin	Trichothecen	Glauconsäure	Cyclopenol
Cytochalasin	Diacetoxyscirpenol	Rubratoxin	Cycopia-zonsäure
Emodin			Ergot-Alkaloide
Luteoskyrin			Calvin-Alkaloide
Maltoryzin			Fumitremorgen
Ochratoxin			Gliotoxin
Patulin			Islanditoxin
Penicillinsäure			Paspalin
Sterigmatocystin			Tryptoquivalin
Zearalenon			Penitrem
			Sporodesmin

Tabelle 1: Hauptherkunftsgruppen von Mykotoxinen aus den Zwischenprodukten des Primärstoffwechsels^[7]

Die bekanntesten Mykotoxine sind die Aflatoxine (**1**), mit ca. 20 verschiedenen Derivaten, deren Grundgerüst ein Difuran-Cumarinbaustein ist. Sie werden im menschlichen und tierischen Organismus durch oxidative Enzyme epoxidiert und wirken so cancerogen und mutagen.

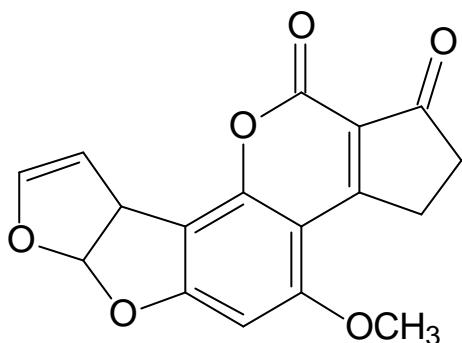
**1**

Abb. 2: Aus Mikromyceten isolierte Sekundärmetabolite: Aflatoxin B₁ (**1**)

Andere wichtige Metabolite sind das Patulin (**2**) als Hydroxypyrofuran und das Nierengift Citrinin (**3**), eine Benzopyrancarbonsäure.

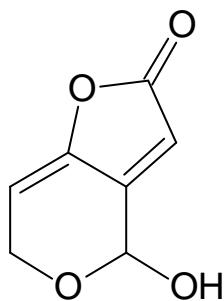
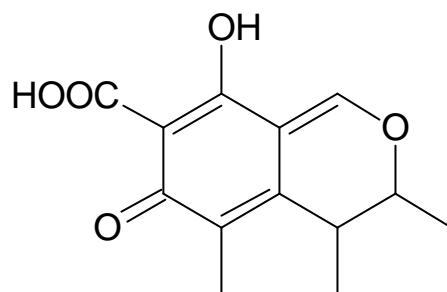
**2****3**

Abb. 3: Aus Mikromyceten isolierte Sekundärmetabolite: Patulin (**2**) und Citrinin (**3**)

Citrin wird von mehreren *Aspergillus* und *Penicillium*-Arten gebildet und wirkt auch antibiotisch, so daß eine eindeutige Unterscheidung zwischen Mykotoxinen und Antibiotika nicht immer möglich ist.

Von den etwa 5000 bekannten Antibiotika^[8] wird ungefähr ein Viertel von Pilzen gebildet, von denen weniger als 100 medizinisch verwendet werden. Die wichtigsten Vertreter sind die β -Lactame Penicillin (**4**), das Cephalosporin C (**5**) und die Tetracycline (**6**) sowie Griseofulvin (**7**) und Fusidinsäure (**8**).

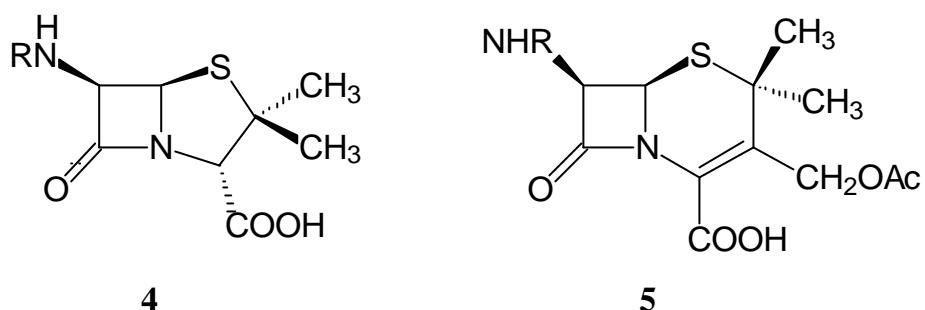


Abb. 4: Aus Mikromyceten isolierte β -Lactame: Penicillin (**4**) und Cephalosporin (**5**)

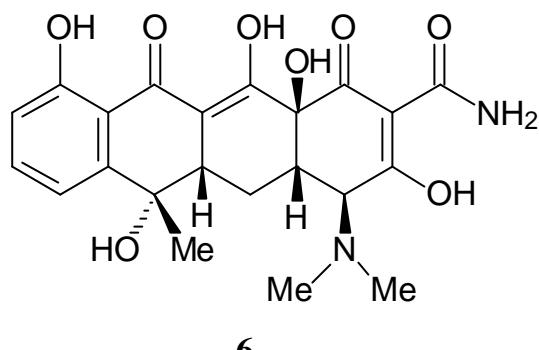


Abb. 5: Durch Fermentation von *Streptomyces*-Arten in Submerskulturen isolierbares Antibiotikum Tetracyclin (**6**)

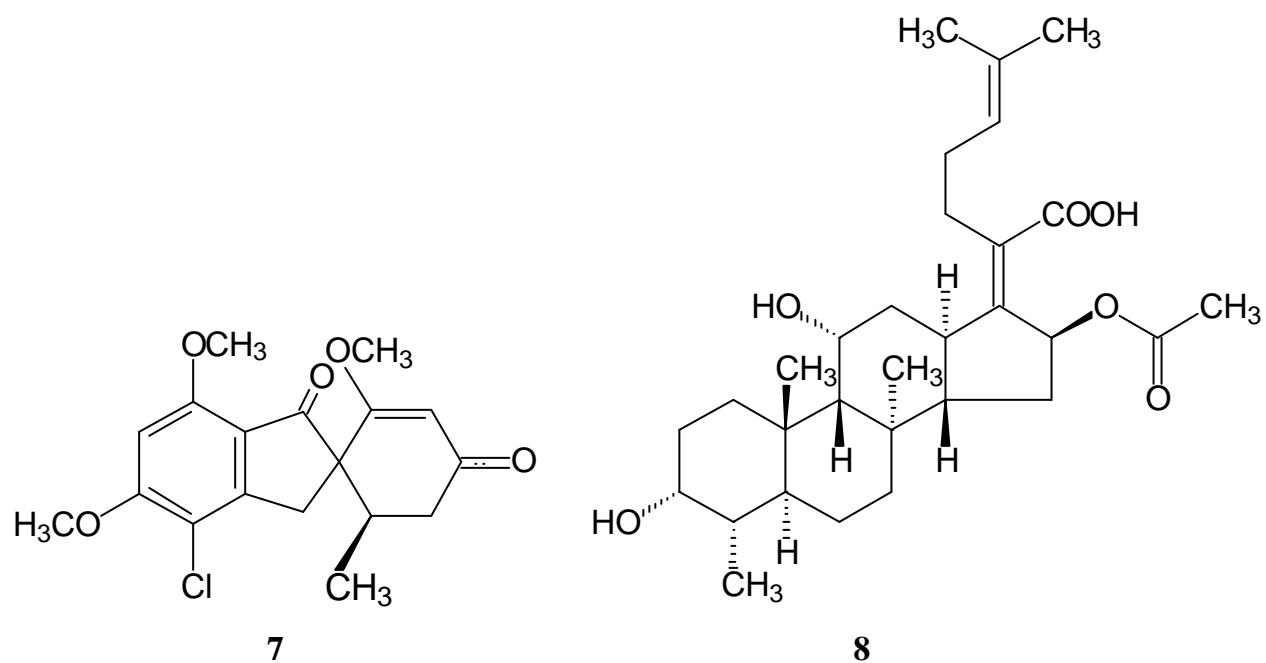


Abb. 6: Aus Mikromyceten isolierte Sekundärmetabolite: Griseofulvin (**7**) und Fusidinsäure (**8**)

Die zahlreichen anderen Antibiotika besitzen nur eine geringe Wirksamkeit, eine hohe Toxizität oder eine ungünstige Pharmakokinetik. Einen groben Überblick über antibiotische Metabolite gibt die folgende Tabelle:

Polyketide	Terpene	Tricarbonsäurezyklus
Acetat-Malonat	Mevalonat	Aminosäuren
Wirkung allgemein antibiotisch		
Albidin	Grifolin	Candidulin
Asperlin	Pleuromutilin	
Mycolphenolsäure	Viridin	
Canescin		
Palitantin		
Wirkung antibakteriell		
Atrovenetin	Fusidinsäure	Fusidinsäure
Fumagatin	Helvolinsäure	Cephalosporine
Geodin		Fusarinsäure
Herquein		Mycelialnamid
Javanacin		Penicilline
Nidulin		Viraducatin
Spinulosin		
Wirkung antimykotisch		
Griseofulvin	Frequentin	
Pullvorinsäure	Trichothecin	
Gladiolinsäure	Wortmannin	
Cyclopaldinsäure		
Terreinsäure		
Tardin		

Tabelle 2: Aufstellung biologisch aktiver Metabolite^[9]

2 PROBLEMSTELLUNG

Als Naturstoffe werden Kohlenstoffverbindungen bezeichnet, die mikroorganischen, pflanzlichen oder tierischen Ursprungs sind. Die Anzahl dieser strukturell aufgeklärten Naturstoffe hat bis heute stark zugenommen und wird in Zukunft noch stärker steigen, da das besondere Interesse^[10] ihrem Einsatz als biologisch aktive Substanzen im Bereich der Pflanzenschutzmittel, der Schädlingsbekämpfungsmittel und der Arzneimittel gilt. Historisch wurden diese Substanzen direkt aus Pflanzen, Invertebraten und Mikroorganismen isoliert. Heute hat die Naturstoffchemie durch die modernen kombinatorischen Techniken und die Biochemie starke Konkurrenz bekommen.

Ein Vorteil der Naturstoffe ist jedoch ihre extrem große molekulare Diversität, so daß die Wirkstoffe aus natürlichen Quellen eine Ergänzung zu den synthetischen Verbindungen darstellen. Schon macht das geflügelte Wort vom „grünen Gold“ die Runde. Immer mehr chemische und pharmazeutische Unternehmen forcieren die Naturstoffisolierung um neue Leitstrukturen zu finden. So macht es die Resistenzbildung vieler Unkräuter, Insekten oder Krankheitserreger gegen Pestizide oder Pharmaka notwendig, auf das weite Feld ungewöhnlicher Strukturen, Biosynthesewege und Wirkmechanismen zurückzugreifen, die durch die Evolution im Laufe von Jahrtausenden hervorgebracht wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Ziele verfolgt:

Die Isolierung, Strukturaufklärung und biologische Testung von Sekundärmetaboliten aus komplex zusammengesetzten Mikromycetenrohextrakten der Klassen Deuteromycetes und Ascomycetes (Hauptteil I).

Die Entwicklung einer konvergenten Synthese, eines antiviralen und anti-HIV wirksamen Naturstoffes, der Klasse der Hypocrelline (Hauptteil II).

Die Arbeit ist Teil eines vom BMBF geförderten Forschungsprojektes in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Aust (Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig) und der BASF AG Ludwigshafen. Auswahl, Aufzucht und Kultivierung der Mikromyceten erfolgte unter Aufsicht von Frau Dr. Barbara Schulz, die taxonomische Bestimmung führte Dr. Siegfried Dräger durch (beide Arbeitsgruppe Prof. Aust).

Die Aktivitätstests mit biologischen Targets wurde von Frau Dr. B. Schulz durchgeführt, die mit molekularen Targets bei der Knoll AG in Ludwigshafen.

3 HAUPTTEIL I

3.1 Stamm 1948

3.1.1 Pilzbeschreibung

Der Stamm 1948 gehört zur Gattung *Sirodithis* sp., einem Deuteromyceten, Anamorph des Teleomorphs *Tympanis* (Leotiaceae, Ascomycet). Er wurde als Endophyt aus einer Lärche isoliert.

3.1.2 Isolierung

Der Pilz wurde 87 Tage lang bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 6 in einem Biomalzmedium inkubiert. Das Kulturfiltrat zeigt Aktivität gegen die Testorganismen *Chlorella fusca*, *Ustilago violacea*, *Chladosporium* und *Eurotium repens*.

Um die unterschiedlich polaren Bestandteile des Filtrates zu extrahieren, wurde mehrmals mit Lösemitteln unterschiedlicher Polarität (Petrolether, Ethylacetat) ausgeschüttelt. Die so erhaltene Ethylacetatfraktion zeigte im Plättchentest gegenüber der Petroletherfraktion eine signifikant erhöhte biologische Aktivität, so daß weitere Auf trennungen mit der Ethylacetatfraktion erfolgten.

Nach mehrmaliger Säulenchromatographie mit verschiedenen Stufengradienten (PE/Ether 1:1, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1%, 2%, 3%, 5%, 8%), wurden zwei mittelpolare Fraktion erhalten. Aus der ersten Fraktion wurde durch préparative Schichtchromatographie (PSC) und anschließende Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Sephadex 1 mg des unpolaren Naturstoffes **1948.I** isoliert. Aus der zweiten Fraktion wurde durch PSC (dreifach entwickelt) 2 mg des mittelpolaren Naturstoffes **1948.II** isoliert.

3.1.3 Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe

3.1.3.1 Naturstoff 1948.I

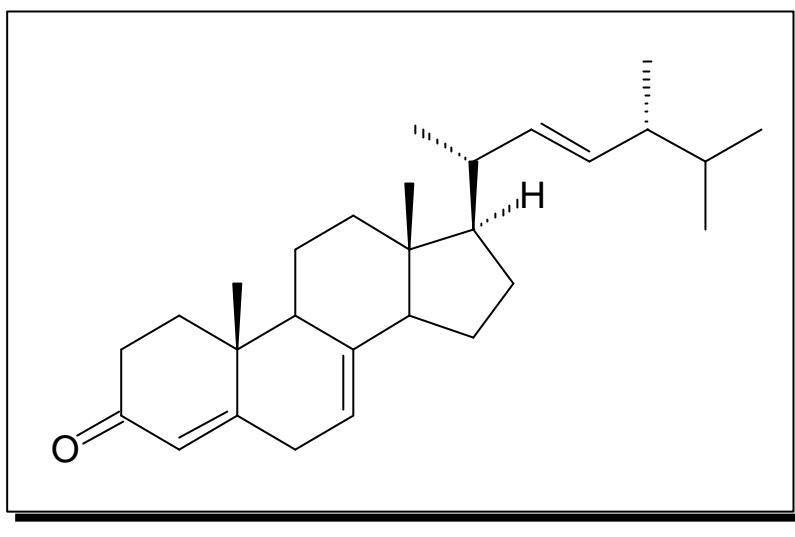


Abb. 7: Aus Pilzstamm 1948 isolierter Metabolit: **Ergosta-4,7,22-Trien-3-on (9)**

Der Naturstoff **1948.I** ist gelb, kristallin und hat einen Schmelzpunkt von 129 °C. Er ist auf dem DC im UV-Licht bei 254 sowie 312 nm nicht detektierbar und färbt beim Besprühen mit dem Anisaldehydreagenz grün an. Die Kristalle sind in Lösungsmitteln mittlerer Polarität (Chloroform, Methylenchlorid) gut löslich. Das IR-Spektrum zeigt eine für eine Carbonylgruppe charakteristische Bande bei $\tilde{\nu} = 1630 \text{ cm}^{-1}$.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum und die DEPT-135- und DEPT-90-Spektren, zeigen ein Carbonylsignal bei 200 ppm, vier quartäre C-Signale, sowie zehn CH-, sieben CH_2 - und sechs CH_3 -Signale. Davon sind zwei quartäre und vier tertiäre C-Signale sp^2 -hybridisiert. Bestätigt wird diese Zuordnung durch die DEPT-135- und DEPT-90-Spektren, die zwischen primären, sekundären, tertiären und quartären C-Atomen differenzieren und so eine eindeutige Zuordnung der jeweiligen Signale ermöglichen. Aus diesen Informationen ergibt sich eine Teilsummenformel ohne Heteroatome von $\text{C}_{28}\text{H}_{42}$, mit dem O-Atom der Carbonylgruppe eine von $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{O}$ und damit eine Teilmasse von 384. Das Massenspektrum zeigt einen Molpeak mit $m/z = 384$, die Teilmasse entspricht somit der Molekülmasse, so daß außer dem Sauerstoff der Carbonylgruppe keine weiteren Heteroatome im Molekül enthalten sind. Das ^1H -Spektrum zeigt Signale für sechs Methylgruppen, von denen zwei als Singulett und vier zum Dublett

aufgespalten sind. Das Aufspaltungsmuster des ^1H -Spektrums, sowie das ^{13}C - Muster weisen auf einen Naturstoff aus der Klasse der Steroide und Terpene hin. Eine Analyse der H,H- und C,H-COSY-Spektren zeigt Signale für zwei Methylengruppen mit diastereotopen Protonen, die sich aufgrund ihrer chemischen Verschiebung im ^1H -Spektrum in direkter Nachbarschaft zur Carbonylgruppe befinden. Das HMBC-Spektrum (*heteronuclear multi bond correlation*), in dem sich die Identität der heteronuklearen Weitbereichskopplungen direkt aus der Zuordnung der 2-D-Kreuzsignale ergibt ($^nJ_{C,H}$ mit $n = 2$ oder 3), zeigt eine α,β -ungesättigte Carbonylgruppe sowie eine weitere Doppelbindung, die wie die zur Carbonylgruppe konjugierte Doppelbindung aus einem quartären und einem tertiären C-Atom im Steroidgrundkörper besteht und die sich beide zwischen einer Methylengruppe befinden. Eine dritte Doppelbindung befindet sich in einer Seitenkette des Steroids. Mit diesen Informationen, der Summenformel, dem Drehwert und dem Schmelzpunkt kann die Substanz als Ergosta-4,7,22-trien-3-on, ein Steroid aus der Gruppe der α -Ergostane, identifiziert werden. Eine Datenbankrecherche in der Chemical-Concepts Massenspektrendatenbank bestätigt diese Zuordnung eindeutig.

Erstmals wurde die Substanz **9** 1976 isoliert^[11], aber schon 1959 als Derivat synthetisiert^[12]. Weitere bekannte Formen sind die $9\beta,22\text{E}$ -Form, die $10\alpha,22\text{E}$ -Form und das Lumista-4,7,22-trien-3-on ($9\beta,10\alpha,22\text{E}$ -Form).

Generell werden alle Verbindungen, die aus einem Perhydro-cyclopenta[*a*]phenanthrengrundkörper aufgebaut sind, als Steroide^[13] bezeichnet. Normalerweise sind die Cyclohexan-Ringe der Steroide in der thermodynamisch stabileren *trans*-Stellung miteinander verbunden, wodurch sie eine starre, flache Form annehmen (griech.: stereos = starr, fest und eides = gestaltet). Sie schließen den weiten Bereich der Naturstoffe ein, zu denen die Gallensäuren, die Sexualhormone, die D-Gruppe der Vitamine, Bufadienolide, Corticoide, Sapogenine und weitere kleine Gruppen gehören. Ihre Biosynthese verläuft über (zunächst) nach der Isopren-Regel gebildete Zwischenstufen. Insgesamt gibt es über 200 000 bekannte synthetische und natürliche Steroide, die spezifisch als Cardika, anabole Steroide, Pheromone, Antikontrazeptiva oder Antiphlogistika wirken^[14]. Sie sind auch heute noch Gegenstand intensiver Forschung, wie z. B. die Rolle des Cholesterins, einem Cholesterinderivat, bei der Entstehung von Arteriosklerose oder Coronarerkrankungen.

3.1.3.2 Naturstoff 1948.II

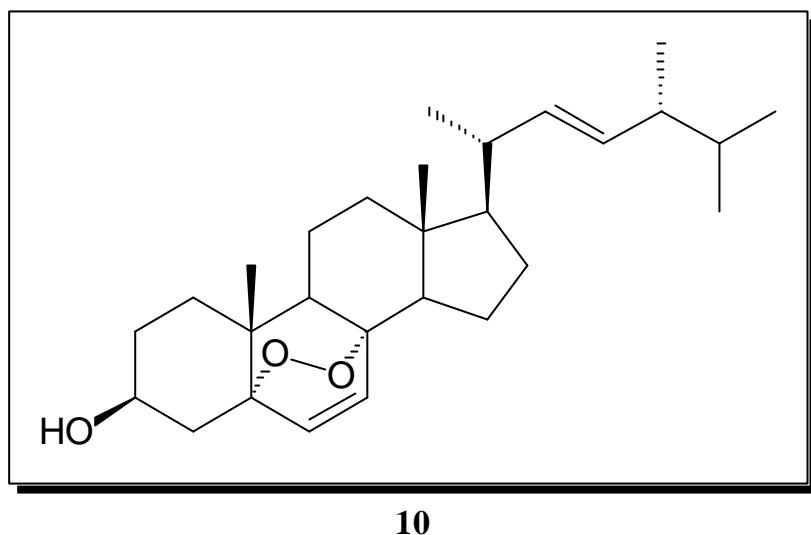


Abb. 8: Aus Pilzstamm 1948 isolierter Naturstoff: **Ergosterolperoxid (10)**

Die zweite, aus der mittelpolaren Fraktion isolierte Verbindung liegt ebenfalls kristallin vor. Die farblosen Kristalle haben einen Schmelzpunkt von 174 °C und sind in mittelpolaren bis polaren Lösemitteln gut löslich.

Im ^{13}C -Spektrum ist wieder das für ein Steroid typische Signalmuster zu erkennen. Es setzt sich aus Signalen für vier quartäre, elf sekundäre, sieben primäre und sechs tertiäre C-Atome zusammen. Die chemischen Verschiebungen der Signale zweier quartärer und eines tertiären C-Atoms weisen auf Substitution mit Heteroatomen hin. Vier der tertiären Atome sind olefinische C-Atome. Aus diesen Informationen ergibt sich eine Teilfragmentmasse von 374. Berücksichtigt man den im Massenspektrum registrierten Molpeak $[\text{M}^+] = 428$, so kann die Summenformel um die aus den chemischen Verschiebungen identifizierbaren drei Heteroatome ergänzt, zu $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ bestimmt werden.

Die Analyse des ^1H -Spektrums zeigt Signale für vier olefinische Protonen sowie ein Signal für ein durch Heteroatomeinfluß tieffeldverschobenes Proton. Von den sechs Methylgruppensignalen sind vier zum Dublett aufgespalten, zwei liegen als Singulett vor. Die Interpretation der H,H-COSY-, C,H-COSY- und der HMBC-Spektren ergibt, das der Substanz ebenfalls ein Ergostangrundgerüst zugrunde liegt. Das Grundgerüst ist in 3-Position mit einer Hydroxygruppe substituiert, die Atome fünf und acht des B-Ringes sind über eine Peroxidbrücke miteinander verknüpft. Ein Vergleich mit Literaturdaten (^1H -, ^{13}C -Daten) und die Datenbankrecherche (Chapman & Hall) über die

Summenformel und den Schmelzpunkt ergeben, daß es sich bei der Substanz **10** um 5,8-Epidioxy-5 α ,8 α -ergosta-6,22E-dien-3 β -ol handelt.

Die Substanz, mit dem Trivialnamen Ergosterolperoxid, wurde erstmals 1926 isoliert^[15] und ihre Struktur im Jahr 1947 durch Röntgenstrukturanalyse^{[16],[17]} aufgeklärt. Von ihr existieren noch das 24-Epimer und das 5,8-Diepimer. Sie kommt häufig in Pilzen und Flechten, sowie in *Ananas comosus*, im Schwamm *Axinella cannabina* und *Typha latifolia* vor.

3.1.4 Biologische Aktivität

Der Metabolit **1948.II** wurde, wie alle in ausreichender Substanzmenge isolierten Naturstoffe, in einem Pharmagrundscreeningtest auf seine pharmakologische Aktivität hin untersucht. Die Testergebnisse sind in den folgenden Tabellen dokumentiert. Die Testassays sind in **Abschnitt 3.1.5** erklärt.

Pharmakologische Aktivität				
Substanz	RF AMPA-Rezeptor	GA ACTIV. Fibrinogen	RB 5-Hat Serotonin	CDC25 Hemmung 329/9
1948.II	> 4.00e-06	> 5.00e-06	> 4.00e-06	> 1.00e-04
Pharmakologische Aktivität				
Substanz	ICE Hemmung 281/MS (Thiol)	Kinase (341) KDR6	Kinase (342) TEK	Kinase (344) KDR7
1948.II	> 5.00e-05	> 5.00e-05	> 5.00e-05	> 5.00e-05

Tabelle 3: Pharmakologische Aktivität von **1948.II** (Konzentration [mol/l] bezogen auf IC₅₀ %)

Die Substanz **1948.II** wurde neben dem pharmakologischen Screening, auch einem biologischen Screening, als potentielles Pestizid, mit verschiedenen Testorganismen unterzogen. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Agardiffusionstest (c = 1 [mg/ml])							
Hemmhofradien [mm]							
Substanz	Chl.	E. C.	B. m.	Ust.	Eur.	M. m.	Fus.
1948.II	0	3	5	0	7	0	1

Tabelle 4: Biologische Aktivität von **1948.II**

Bei einer Bewertung der Ergebnisse der pharmakologischen und biologischen Testergebnisse ist die Substanz als mäßig aktiv und somit nicht auffällig einzustufen.

3.1.5 Kurzbeschreibung der Pharma-Grundscreeningtests^[18]

Folgende Tests wurden im Pharma-Grundscreening durchgeführt:

- *Cdc25* (Test 329): Bei der Krebsentstehung sind sehr häufig Gene betroffen, die direkt oder indirekt den Zellzyklus regulieren. Substanzen, die selektiv den Zellzyklus hemmen, würden diesen Aspekt der Tumorzellenwachstumsregulation direkt angehen und sind daher als potentielle Zytostatika von besonderem Interesse. Dieser Test ist spezifisch für Inhibitoren einer neuen Protein-Tyrosin-Phosphatase-Klasse. Diese Phosphatasen kontrollieren den Zellzyklus durch Dephosphorylierung der cyclin/cdk-Komplexe^[19].
- *Elisa* (Phosphotyrosin-Anitkörper) *PTKs* (Test 31, 343): Identifizierung von Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren als Inhibitoren der T-Zellenaktivierung. Spezifische Inhibitoren der T-Zellenaktivierung würden eine neue Klasse von Immunsuppressiva beschreiben, die potentiell wirksamer und weniger toxisch sind. Sie könnten bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und zur Prophylaxe der Organabstoßung nach Transplantatioen eingesetzt werden.
- *Onkologie PTKs* (Test 342, 344): Der Test dient zur Identifizierung von Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren für eine neue Klasse von Wirkstoffen zur Krebsbehandlung. Es handelt sich hier um eine Assay vom Typ ELISA mit Phosphotyrosin-Antikörpern.
- *GA ACTIV. T3*: Durchgeführt wird ein zellulärer Assay zur Identifizierung niedermolekularer, oral verfügbarer Substanzen, die die T3-Wirkung im Herzen gewebsspezifisch antagonisieren. Es sollen Substanzen für die Indikation der ventrikulären und supraventrikulären Arrhythmien des Herzens entwickelt werden.
- *RF AMPA-Rezept.: Calpain Hemmung.*: Glutamat dient der chemischen Signalübertragung zwischen Nervenzellen. Darüber hinaus ist es aber an Mechanismen beteiligt, die die Stärke der Signalweiterleitung zwischen Neuronen regulieren. Bei einigen Erkrankungen trägt eine Dysregulation von Glutamat zum Entstehen dieser Krankheiten oder deren Symptome bei. Eine wirksame Therapie solcher Erkrankungen, denen ein Zuviel an Glutamat zugrunde liegt, sieht man in Antagonisten von Glutamatrezeptoren und Inhibitoren des Calpains. Wichtige Indikationsgebiete können Schlaganfall, Hirntrauma, Epilepsie und die Parkinson-Erkrankung sein.

- **RB 5-HT Serotonin:** Serotonin (5-Hydroxytryptamin) ist wie Dopamin ein Neuromodulator, der für die Regulation verschiedenster physiologischer Funktionen wie Blutdruck, Stimmung, Angst, Aggression u. a. eine wichtige Rolle spielt. Gegenwärtig werden Migräne, Depression und Anxiolyse als Hauptindikationsgebiete für Serotonin-Agonisten bzw. Antagonisten angesehen. Da auch funktionelle Verbindungen zwischen serotoninergen und dopaminergen Systemen bestehen, ist auch der Einfluß solcher Wirkstoffe auf physiologische Prozesse gegeben. Mehr als 10 Serotonin-Rezeptorsubtypen sind derzeit bekannt, deren funktionelle Einordnung jedoch z. T. noch sehr unsicher ist. Ziel ist es, Agonisten und Antagonisten mit möglichst selektiver Rezeptorsubtypspezifität zu charakterisieren, um in weiteren Untersuchungen deren indikationsbezogene Relevanz zu ermitteln und gleichzeitig Therapeutika mit geringeren Nebenwirkungen zu entwickeln.
- **ECE-Hemm:** Endothelin ist ein körpereigenes, vasokonstriktorisches Peptid. Es ist, im Zusammenspiel mit anderen konstriktorischen und relaxierenden Faktoren an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt und wirkt wahrscheinlich über den Endothelin-Rezeptor. Bei Krankheiten wie Herzinfarkt, akutem Nierenversagen, Vasospasmen und Lungenhochdruck spielen erhöhte Endothelinspiegel wahrscheinlich eine wichtige Rolle. Eine Möglichkeit zur Senkung des Endothelin-Spiegels ist die Hemmung des "endothelin-converting-enzyme" ECE, das die Freisetzung des aktiven Endothelins aus der inaktiven Vorstufe "big-Endothelin" bewirkt. Gute Wirkung liegt bei IC 50 % < 10⁻⁴ mol/l vor.
- **Fibrinogen:** Ein erhöhter Fibrinogenspiegel im Plasma, konnte als Risikofaktor für verschiedene Gefäßkrankheiten identifiziert werden. Es gibt Hinweise auf eine pathologische Bedeutung des Fibrinogens bei arteriosklerotischen bzw. thrombotischen Prozessen. Ziel des vorliegenden Testsystems ist die Identifizierung oral verfügbarer, niedermolekularer Substanzen, die eine Fibrinogensenkung im Rahmen einer Langzeittherapie ermöglichen. Eine Reduzierung des Risikofaktors Fibrinogen wäre von größter Bedeutung bei der Prävention des Myokardinfarktes.
- **Zytotox.:** Dieser Test an verschiedenen Zellgeweben dient zur Differenzierung zwischen spezifisch pharmakologischen und unspezifisch zytotoxischen Effekten. Stark toxische Substanzen sind außerdem in der Onkologie von Interesse. Gute Wirkung liegt bei IC 50 % ≤ 10⁻⁷ mol/l vor.

Bewertet man die Screeningergebnisse allgemein, so gilt, daß sie nur ungenaue Werte ergeben. Substanzen die nicht auffallen, können bei einer neu angepaßten Testpalette in einem neuen Test als aktiv auffallen.

3.2 **Stamm 2049**

3.2.1 **Pilzbeschreibung**

Pilzstamm 2049 wurde als nicht bestimmter Endophyt aus *Vaccinium vitis-idaea* isoliert.

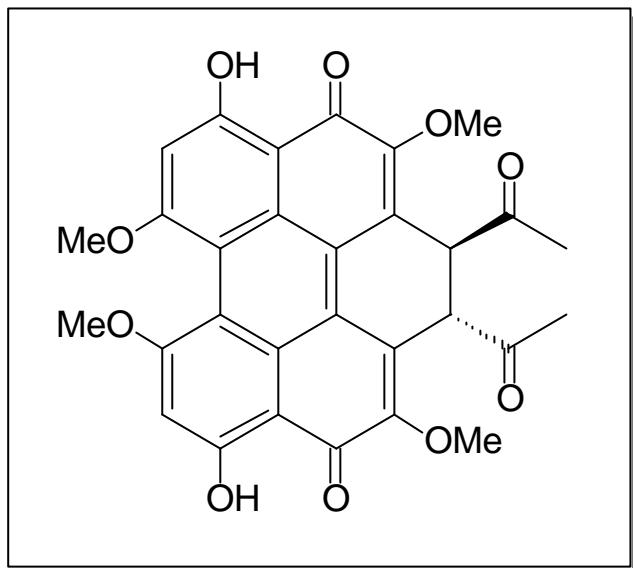
3.2.2 **Isolierung**

3.2.2.1 *Naturstoff 2049.I*

Der Pilzstamm 2049 wurde auf zwei Medien (Biomalz, M/S) und diese jeweils bei verschiedenen Temperaturen, 17 °C und 20 °C, 40 und 45 Tage lang kultiviert. Das Mycel und die Flüssigkultur wurden mit einem Warring-Blender homogenisiert. Durch einmalige Extraktion mit Petrolether und dreimalige Extraktion mit Ethylacetat wurden daraus 1.2 g Rohextrakt erhalten. Alle Extrakte zeigten gleich gute biologische Aktivität gegen Bakterien, Pilze und Keimlinge. Die DC-Analytik ergab, daß das Metabolitenspektrum gleich war, so daß sie vereinigt wurden.

Das Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel, mit einem Stufengradienten von 50% Petrolether (30 - 50)/50 % Dichlormethan über reines Dichlormethan bis zu Dichlormethan/Methanol 10 % (in 2% Schritten) aufgetrennt. Aus den Vorfraktionen konnte durch erneute Trennung mit dem Chromatotron und einem quarternären Lösemittelgemisch aus Methylenchlorid/n-Hexan/Aceton/Methanol (35 : 35 : 25 : 5) 8 mg des mittelpolaren Naturstoffes **2049.I** isoliert werden.

3.2.3 Strukturaufklärung und Charakteristik des Naturstoffes 2049.I



11

Abb. 9: Aus Pilzstamm 2049 isolierter Sekundärmetabolit: **Elsinochrom A (11)**

Der Naturstoff **2049.I** ist eine tiefrote, amorphe kristalline Substanz, mit einem Schmelzpunkt von 224 °C. Die Kristalle lösen sich sehr gut in den meisten Lösungsmitteln mittlerer Polarität wie Chloroform und Dichlormethan. Auf dem DC ist sie ohne Ansprühreagenz mit bloßem Auge als roter Substanzfleck zu erkennen.

Das ¹H-Spektrum zeigt keine Kopplungssysteme, sondern nur singuläre Resonanzen. Die Integration der einzelnen Signale ergibt eine Protonenresonanz (16.2 ppm), zwei tieffeldverschobene Protonensignale (7.0 ppm, 5.2 ppm) und drei Methylgruppensignale bei (4.3 ppm, 4.1 ppm, 2.0 ppm). Die auffällige Tieffeldverschiebung des Protonensignals bei 16.2 ppm weist auf eine extreme Entschirmung hin, die charakteristisch für intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen ist, wie sie z. B. in der Enol-Form des 2,3-Butandions vorkommt.

Die Strukturdaten aus den ¹³C-Spektren zeigen ein Carbonylsignal (205 ppm), neun quartäre Kohlenstoffsignale zwischen 180 und 112 ppm, die sp²-hybridisierten Kohlenstoffatomen zugeordnet werden können sowie ein tertiäres Signal eines sp²-hybridisierten C-Atoms (102 ppm). Der Aliphatenbereich enthält drei primäre und ein tertiäres C-Signal. Damit erhält man eine vorläufige Summenformel von C₁₅H₁₁O mit einer Molmasse von 207. Aus den charakteristischen Verschiebungen einiger Kohlenstoffatomsignale kann man ableiten, daß die dazugehörigen C-Atome mit Heteroa-

tomen substituiert sind. Es handelt sich dabei um zwei Methoxygruppen, zwei Carbonylgruppen sowie um ein OH-substituiertes aromatisches C-Atom. Daraus ergibt sich eine Summenformel von $C_{15}H_{12}O_5$ und eine Molmasse von 272.

Durch Auswertung der Konnektivitäten in den H,H-COSY und HMBC-Spektren lässt sich folgendes Molekül konstruieren, das an den gekennzeichneten Positionen (*) mit im ^{13}C -Spektrum nicht detektierbaren Heteroatomen substituiert sein könnte.

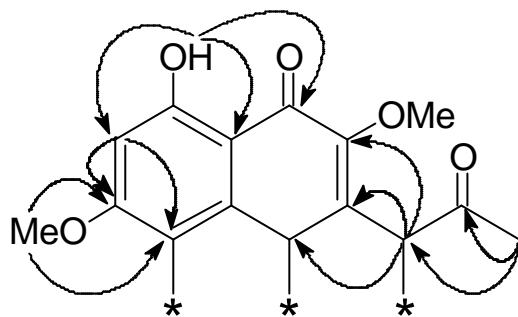


Abb. 10: Elsinochromteilfragment mit hetero-long-range Kopplungen

Den zur Strukturaufklärung entscheidenden Hinweis liefert das Massenspektrum. Es zeigt einen Molekülpeak von 544, also unter Berücksichtigung der Isotopenmasse der Kohlenstoffatome einen genau doppelt so großen Molekülpeak, wie er nach den NMR-Spektren zu erwarten gewesen wäre. Es kann sich somit bei der Substanz **2049.I** nur um ein Dimer des Teilfragmentes handeln. Eine Recherche mit der Gesamtstruktur in der Naturstoffdatenbank (Chapman & Hall) zeigt, dass es sich bei dem isolierten Naturstoff um das seit 1963 bekannte **Elsinochrom A (11)** handelt^[20], dessen physikalische Daten mit denen des isolierten Naturstoffes identisch sind.

Bisher wurde das Pigment nur aus den Pilzen *Elsinoe annonae* und *Sphaceloma randii* isoliert^[21]. Es gehört strukturell zur Gruppe der Hypocreline, von denen einige bekannte Vertreter, wie z. B. das Hypericin, in der photodynamischen Therapie^{[22],[23]}, zur Krebsbekämpfung eingesetzt werden. Dort führt die Bestrahlung von Hypericin zur Produktion von Singulett-Sauerstoff als primärem reaktivem Oxidans, auf dem die Wirksamkeit gegen Krebszellen beruht. Andere pharmakologische Eigenschaften sind die Aktivität gegen mehrere Virentypen, einschließlich des HIV-Virus, sowie die cytotoxische Wirkung gegen Tumorzellen^[24] und die Wirkung als Antidepressiva^[25].

Da bisher noch keine Totalsynthese vom **11** durchgeführt wurde, sollte in einer konvergenten Synthesestrategie eine Partialsynthese entwickelt werden (siehe **Hauptteil II, Kapitel 4**).

3.2.4 Biologische Aktivität

Die Metabolit **2049.I** wurde in einem Pharmagrundscreeningtest auf seine pharmakologische Aktivität hin untersucht. Die Testergebnisse sind in den Folgenden Tabellen dokumentiert.

Pharmakologische Aktivität				
Substanz	RF AMPA-Rezept.	GA ACTIV. Fibrinogen	RB 5-HT Serotonin	CDC25 Hemmung 329/9
2049.I	28.1, > 4.00e-06	350, > 5.00e-06	32.7, > 4.00e-06	1, > 1.00e-04
Pharmakologische Aktivität				
Substanz	ICE Hemmung 281/MS (Thiol)	Kinase (341) KDR6	Kinase (342) TEK	Kinase (344) KDR7
2049.I	1.3, > 5.00e-05	37.3, > 5.00e-05	7.8, > 5.00e-05	29.3, > 5.00e-05

Tabelle 5: Pharmakologische Aktivität von **2049.I (11)** (Konzentration [mol/l] bezogen auf IC₅₀ %)

Die Substanz **11** wurde neben dem pharmakologischen Screening, auch einem biologischen Screening, als potentielles Pestizid, mit verschiedenen Testorganismen unterzogen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6** aufgeführt:

Agardiffusionstest (c = 1 [mg/ml])							
Hemmhofradien [mm]							
Substanz	Chl.	E. C.	B. m.	Ust.	Eur.	M. m.	Fus.
2094.I	0	0	0	15	0	0	0

Tabelle 6: Biologische Aktivität von **2049.I**

Bei einer Bewertung der Ergebnisse der pharmakologischen und biologischen Testergebnisse ist die Substanz als gut einzustufen. Sie zeigt Aktivität als Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitor und besitzt demnach die Eigenschaften eines Wirkstoffes zur Krebsbehandlung. Im von den Mikrobiologen durchgeführten biologischen Screening zeigt **11** eine sehr gute Aktivität gegen den Pilz *Ustilago violacea*. Die antifungische Wirksamkeit war bisher noch nicht literaturbekannt und sollte Gegenstand weiterer biologischer sowie chemischer Untersuchungen sein.

3.3 Substanz **2049.II**

Bei Substanz **2049.II** handelt es sich um den schon aus Pilzstamm *1948* isolierten Sekundärmetaboliten **Ergosterolperoxid (10)** (siehe **Kapitel 3.1.3.2**)

3.4 **Stamm 1727**

3.4.1 **Pilzbeschreibung**

Der Stamm 1727, *Tuberculina petalotia*, wurde aus einer chinesischen Erdprobe (aus 3000 m Höhe) isoliert.

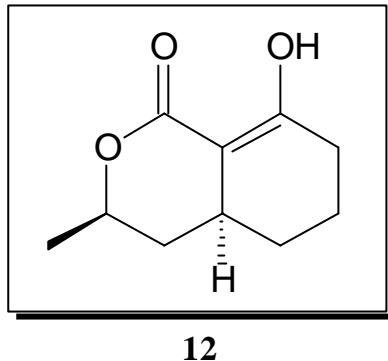
3.4.2 **Isolierung des Naturstoffes 1727.I und 1727.II**

Die Kultivierung des Pilzes erfolgte auf Biomalzweichagar, der pH-Wert der Nährlösung wurde auf pH=6 eingestellt. Nach 84 Tagen wurden das Mycel und der Weichagar homogenisiert und dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Der Extrakt wurde anschließend im Vakuum bei einer Badtemperatur von 40 °C bis zur Trockene eingeengt.

Die Plättchentests zeigten gute Wirkung gegen alle im biologischen Screening eingesetzten Testorganismen, besonders gegen *Eurotium repens*.

Nach mehrmaliger säulen- und plattenchromatographischer Trennung mit Gemischen wechselnder Zusammensetzung aus *n*-Hexan/Aceton, wurde eine unpolare kristalline Substanz (**1727.I**) und ein unpolares Öl (**1727.II**) erhalten, das etwas polarer war als der Naturstoff **1727.I**.

3.4.3 Strukturaufklärung des Naturstoffes 1727.I

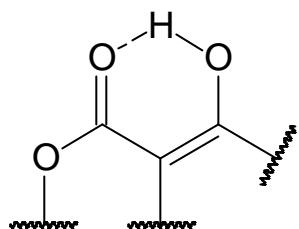


12

Abb. 11: Aus Pilzstamm 1727 isolierter Sekundärmetabolit: **Ramulosin**

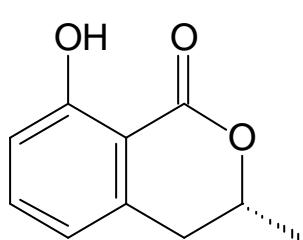
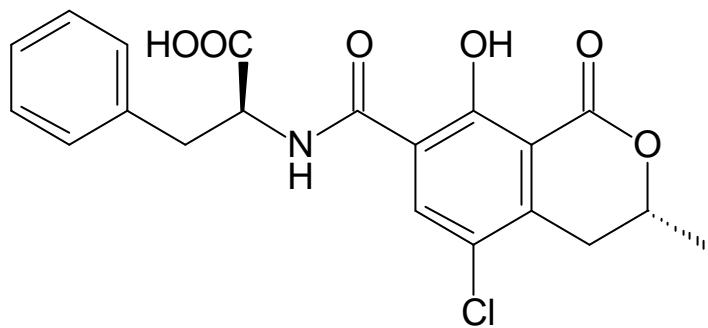
Der Naturstoff kristallisiert in farblosen Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 116 °C. Er ist UV-inaktiv und färbt mit dem DC-Universalsprühreagenz (Cer/Molybdän/Schwefelsäure) dunkelblau an. Der Drehwert wird zu $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ ($c = 5$ in CH₂Cl₂) bestimmt.

Im ¹³C-NMR-Spektrum erscheinen die Signale von zehn C-Atomen. Anhand der DEPT-Spektren können diese als drei quartäre, zwei tertiäre, vier sekundäre und ein primäres C-Atom identifiziert werden. Die Addition dieser Fragmente ergibt eine Teilsummenformel von C₁₀H₁₃ mit einer Teilmasse von 133. Unter Berücksichtigung der Masse von $m/z = 182$ und der ¹H- (OH-Gruppe) und ¹³C-Signale (Estercarbonylgruppe) enthält das Molekül noch drei Sauerstoffatome als Heteroatome, sowie das zusätzliche Proton der OH-Gruppe. Dieses Protonensignal ist im ¹H-NMR-Spektrum bei 13.0 ppm zu sehen, was darauf schließen lässt, daß es sich um ein mit einer Carbonylgruppe intramolekular chelatisiertes Hydroxyproton handelt. Aus der Gesamtsummenformel von C₁₀H₁₄O₃ errechnen sich vier Doppelbindungsäquivalente, von denen eines der im ¹³C-Spektrum auftretenden Estercarbonylgruppe zuzuordnen ist. Die beiden verbleibenden quartären ¹³C-Signale, können die C-Atome einer Doppelbindung sein oder einer weiteren Estercarbonylgruppe (173.3 ppm) und einem Halbketal (97 ppm) zugeordnet werden. Da aber nur noch ein weiteres Sauerstoffatom im Molekül vorhanden ist, kann es sich nur um eine oxygenierte Doppelbindung handeln, die in Konjugation zur Estercarbonylgruppe steht. Dieses Teilfragment enthält alle in dem Molekül vorhandenen Heteroatome, somit muß an die Doppelbindung eine Hydroxygruppe gebunden sein, deren Proton mit dem Carbonylsauerstoff chelatisiert.

**Fragment I:**

Die weitere Auswertung der ^1H - und HMBC-Spektren über die chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten und Kreuzsignale ergänzen das Teilfragment zur Naturstoffstruktur. Der Naturstoff kann als **Ramulosin** identifiziert werden, das erstmals 1964 aus *Pestalotia ramulosa* als Sekundärmetabolit isoliert^[26] und 1985 von Takano synthetisiert wurde^[27]. Ein Vergleich der gemessenen ^1H - und ^{13}C -Daten mit den Literaturdaten bestätigt die getroffene Zuordnung.

Weitere bisher isolierte Co-Metabolite^[28] sind das 3,4,4a,5,6,7,8,8a-Octahydro-8-hydroxy-3-methyl-1*H*-2-benzopyran-1-on (8,8a-Dihydroramulosin) aus dem Endophyten *Conoplea elegantula* das gegen Spulbandwurmlarven toxisch wirkt und 3,4,4a,5,6,7-Hexahydro-4,8-dihydroxy-3-methyl-1*H*-2-benzopyran-1-on (4-Hydroxyramulosin). Ramulosin ist ein Melleinderivat und gehört zu den Ochratoxinen^[29], einer Klasse von Mykotoxinen aus *Aspergillus ochraceus*.

**13****14****Abb. 12: Mellein (Ochracin) (13)****Ochratoxin A (14)**

3.4.4 Biologische Aktivität

Die Metabolit **1727.I** wurde in dem Pharmagrundscreeningtest auf seine pharmakologische Aktivität hin untersucht. Die Testergebnisse sind in den folgenden Tabellen dokumentiert.

Pharmakologische Aktivität (Hemmung in %)						
Substanz	RF AMPA-Rezept.	GA ACTIV. Fibrinogen	RB 5-HAT Serotonin	CDC25 Hemmung 329/9		
1727.I	>4.00 e-06 32.7	> 5.00e-06 27.9	> 4.00e-06 0.1	> 1.00e-04 8.6		
Pharmakologische Aktivität (Hemmung in %)						
Substanz	ICE Hemmung 281/MS (Thiol)	Kinase (341) KDR6	Kinase (342) TEK	Kinase (344) KDR7		
1727.I	> 5.00e-05 11.8	> 5.00e-05 11.0	> 5.00e-05 29.3	> 5.00e-05 10.2		

Tabelle 7: Pharmakologische Aktivität von **1727.I** (Konzentration [mol/l] bezogen auf IC₅₀ %)

Die Substanz **1727.I** wurde auch dem biologischen Screening unterzogen. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 8** aufgeführt:

Agardiffusionstest (c = 1 [mg/ml])							
Hemmhofradien [mm]							
Substanz	Chl.	E. C.	B. m.	Ust.	Eur.	M. m.	Fus.
1727.I	0	0	0	3	0	0	0

Tabelle 8: Biologische Aktivität von **1727.I**

Bei einer Bewertung der pharmakologischen Testung ist die Substanz als mäßig aktiv und somit nicht auffällig einzustufen, biologisch ist sie fast inaktiv.

3.4.5 Naturstoff 1727.II

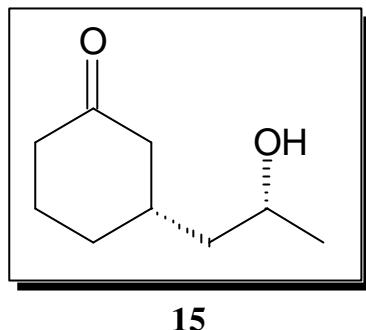


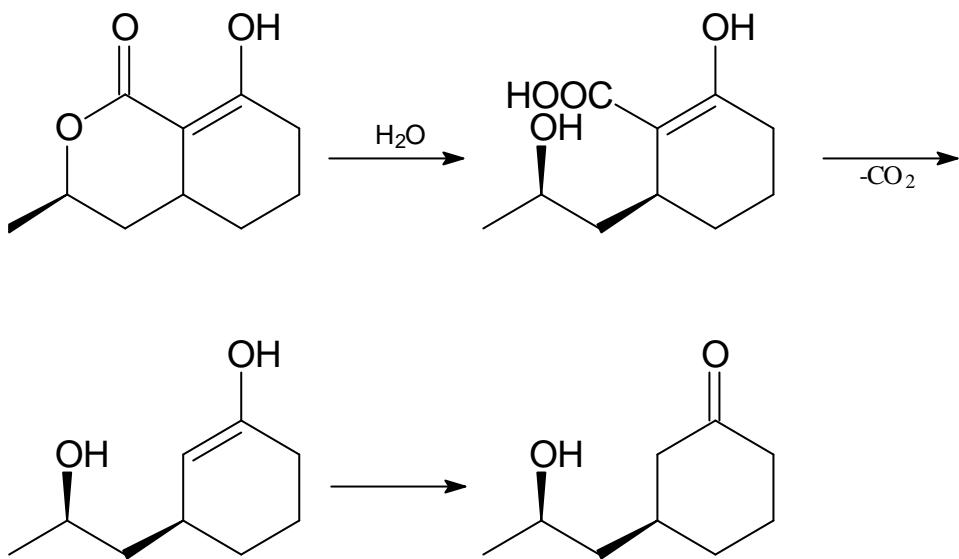
Abb. 13: Aus Pilzstamm 1727 isolierter Sekundärmetabolit: **1727.II**

Bei dem isolierten Naturstoff **1727.II** handelt es sich um ein farbloses Öl, mit einem Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +18$ ($c = 5$ in CH_2Cl_2). Er ist in den meisten Lösemitteln mittlerer Polarität löslich und UV-inaktiv. Auf dem DC färbt er mit dem Universalsprühreagenz hellblau an. Im Massenspektrum (EI) ist ein Molpeak von $m/z = 156$ und ein für Cyclohexanon charakteristisches Fragmentierungsmuster zu erkennen.

Das ^1H -Spektrum zeigt Signale für eine CH_3 -Gruppe, die als Dublett aufspaltet, sowie für eine tieffeldverschobene CH-Gruppe, die mit einem Heteroatom substituiert ist. Im H,H-COSY und C,H-COSY erkennt man im Aliphatenbereich Signale für drei Methylengruppen, deren Protonen geminale Kopplungen zeigen. Die geminalen Kopplungen sind typisch für diastereotope Methylenprotonen, die einem Stereozentrum benachbart sind.

Im ^{13}C -Spektrum sind ein charakteristisches Signal für ein Carbonylkohlenstoffatom und ein Signal für ein tertiäres Kohlenstoffatom zu erkennen, an das ein Sauerstoffatom fixiert ist. Es zeigt zudem noch fünf Signale für sekundäre, ein Signal für ein tertiäres und ein Signal für ein primäres C-Atom. Aus diesen Informationen ergibt sich die Summenformel zu $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_2$, die durch das Massenspektrum bestätigt wird. Das Molekül enthält demnach zwei Doppelbindungsäquivalente, von denen eines für die Carbonylgruppe abgezogen werden muß, so daß das Molekül ein Ringsystem enthalten muß. Die Analyse der H,H-COSY- und HMBC-Spektren bestätigt, daß der Naturstoff eine Cyclohexanonring enthält, der in 2-Position mit einer Propan-2-ol-1-yl Seitenkette substituiert ist.

Die Substanz war bisher als Naturstoff literaturunbekannt und dürfte ein aus Ramulosin entstandenes Biosyntheseprodukt sein. Hypothetisch könnte die Transformation nach folgendem Weg ablaufen:



Schema 1: Hypothetische Biosyntheseroute des Naturstoffes **1727.II** aus **Ramulosin**

Die hypothetische Biosyntheseroute kann über eine Lactonspaltung mit anschließender Decarboxylierung des β -Ketocarbonsäurerestes verlaufen. Im letzten Biosyntheseschritt entsteht dann durch Rückbildung der Carbonylgruppe aus der Enolform des Intermediates der neue Sekundärmetabolit. Der strukturabhängige Drehwert des optisch aktiven Co-Metaboliten zeigt wie beim Ramulosin ein positives Vorzeichen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß der Naturstoff die gleiche absolute Konfiguration besitzt.

3.5 Stamm 2072

3.5.1 Pilzbeschreibung

Der Stamm 2072, *Fusidium* sp, wurde als Endophyt aus *Mentha arvensis* von einer Feuchtwiese bei Hahausen isoliert.

Die Gattung *Fusidium* gehört zu den Deuteromyceten. Als teleomorphe Form ist die Gattung *Biostictus* bekannt.

3.5.2 Isolierung

Der Pilzstamm 2072 wurde auf Biomalzweichagar angesetzt und im Labor 91 Tage lang kultiviert. Alternativ wurde der Pilz auch in einer Flüssigkultur (Biomalz 50 g/l) angesetzt und 11 Tage angezogen.

Anschließend wurden die Kulturen mit Wasser in einem Warring-Blender homogenisiert und mit Ethylacetat extrahiert. Die biologische Aktivität des Rohextraktes wurde im Plättchentest bestimmt, die Ergebnisse sind in **Tabelle 9** aufgeführt:

Agardiffusionstest (c = 1 [mg/ml])							
Substanz	Hemmhofradien [mm]						
	Chl.	E. C.	B. m.	Ust.	Eur.	M. m.	Fus.
2072	10	2	2	0	7	0	5

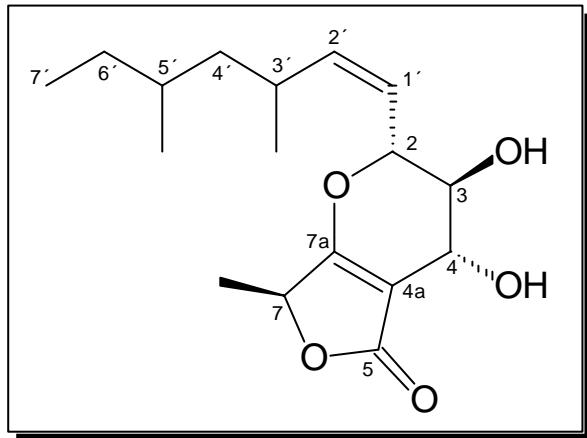
Tabelle 9: Biologische Aktivität von Pilzstamm 2072 (Rohextrakt)

Beim chemischen Screening zeigten sich auf dem Dünnschichtchromatogramm im UV (254/360 nm) mehrere Substanzbereiche. Nach dem Ansprühen mit dem Universal-Sprühreagenz "Cer/Molybdän" wurden zusätzlich noch einige UV-inaktive Substanzflecken sichtbar, die auf Metaboliten ohne chromophore Gruppen hinweisen.

An die Optimierung des Laufmittels zur Auf trennung des Rohextraktes schloß sich die präparative Auf trennung durch Flashchromatographie mit Petrolether (30–50)/Diethylether (2:1, 1:1) und Methylenchlorid/Methanol (93:3, 93:7) in fünf Hauptfraktionen (2072 a bis e) an. Die Hauptfraktionen wurden weiter durch Flashchromatographie, präparative Dickschichtchromatographie und HPLC aufgetrennt.

Durch präparative Schichtchromatographie (PSC) konnte dabei eine nicht UV-aktive Verbindung isoliert werden. Dazu wurde die Hauptfraktion 2072 *a* zuerst durch Flashchromatographie mit einem Gemisch aus Methylenchlorid/Methanol (94:6) aufgetrennt. Dadurch wurde die Fraktion 2072 *e2* erhalten. Anschließend wurde mit dem gleichen Laufmittel von Fraktion 2072 *e2* ein präparatives Dickschichtchromatogramm aufgenommen. Der Fraktionsbereich mit einem R_f -Wert von 0 bis 0.35 wurde von der Platte separiert und erneut mit einem Lösemittelgemisch aus Methylenchlorid/Methanol (94:6) aufgetrennt.

3.6 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.I



16

Abb. 14: Aus Pilzstamm 2072 isolierter Sekundärmetabolit: 2072.I (16)

Der Naturstoff liegt als gelbliches Öl vor, das sich in den meisten Lösemitteln mittlerer Polarität wie Methylenchlorid und Chloroform löst. In Kohlenwasserstoffen und Methanol ist er schlecht löslich. Die Substanz ist auf dem DC UV-aktiv und färbt sich beim chemischen Screening mit dem Universalsprühreagenz hellblau.

Die durch Massenspektrometrie (CI, *i*-Butan) bestimmte Masse liefert einen Molpeak $[M + H^+]$ von $m/z = 311$, die Feinmasse wird zu 311.1930 ± 3 ppm bestimmt.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum lassen sich die verschiedenen Signale anhand charakteristischer Verschiebungen zuordnen. Es zeigt Signale für vier primäre, zwei sekundäre, zwei tertiäre, vier heterosubstituierte tertiäre, zwei sp^2 -hybridisierte tertiäre, sowie drei sp^2 -hybridisierte quartäre Kohlenstoffatome.

Die Auswertung der Integralstufen im ^1H -NMR ergibt für den Bereich hoher ($\delta = 6.0 - 5.0$) und mittlerer ($\delta = 5.0 - 2.3$) Verschiebungen, daß die Intensität der Signale 6

Protonen entspricht. Die Auswertung der Integralstufen im Aliphatenbereich ergibt 18 Protonen.

Mit diesen Informationen ergibt sich eine Teilsummenformel ohne Heteroatome von $C_{17}H_{24}$ und ein Molekulargewicht von 228. Um auf ein Molekulargewicht von 310 zu kommen, müssen noch die fehlenden Heteroatome bestimmt werden.

Im IR-Spektrum sind eine für γ -Lactone typische Estercarbonylbande ($\tilde{\nu} = 1780 \text{ cm}^{-1}$), eine Bande für Hydroxyfunktionen ($\tilde{\nu} = 3427 \text{ cm}^{-1}$) und zwei charakteristische Alkyletherbanden ($\tilde{\nu} = 1068$ und 1020 cm^{-1}) zu erkennen. Die Signale der tieffeldverschobenen tertiären heterosubstituierten Kohlenstoffatome liegen in einem Verschiebungsbereich von 65 bis 80 ppm, der typisch für einfach O-substituierte C-Atome ist. Das quartäre C-Atom (C-1) mit dem Signal bei $\delta = 178 \text{ ppm}$ weist auf ein Estercarbonylkohlenstoffatom hin. Weitere Heteroatome sind wegen des Fehlens von spezifischen Isotopenmustern, bzw. Peaks im Massenspektrum und fehlender IR-Banden auszuschließen. Wird jetzt die an 310 fehlende Masse durch Kombination von Sauerstoff und Hydroxyprotonen ergänzt, ergibt sich als einzige sinnvolle Kombination H_2O_5 . Die Summenformel des Naturstoffes **2072.I** ergibt sich zu $C_{17}H_{26}O_5$, daraus können fünf Doppelbindungsäquivalente berechnet werden. Ein Äquivalent kann für die Carbonylgruppe und zwei für die nach Auswertung der ^{13}C - und ^1H -Spektren erhaltenen Doppelbindungen abgezogen werden, so daß das Molekül aus einem Zweiringssystem besteht.

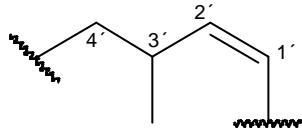
Das ^1H -Spektrum enthält im Bereich olefinischer Frequenzen zwei Signale, die ein AB-System bilden, ($\delta_{2'} = 5.63$: pt, ${}^3J = 11.0 \text{ Hz}$, $\delta_{1'} = 5.95 \text{ ppm}$: pt, ${}^3J = 10.5 \text{ Hz}$). Die Kopplungskonstante der 3J -Kopplung von 11.0 Hz zwischen den beiden olefinischen Protonen, ist typisch für eine *cis*-Anordnung der Doppelbindung. Die Tieffeldverschiebung der Signale für die Methinprotonen ($\delta_2 = 4.56 \text{ ppm}$, $\delta_7 = 4.17 \text{ ppm}$, $\delta_4 = 3.92 \text{ ppm}$, $\delta_3 = 3.34 \text{ ppm}$) sowie die δ -Werte der direkt daran gebundenen Kohlenstoffatome (C-2: $\delta = 79.9 \text{ ppm}$; C-7: $\delta = 76.0 \text{ ppm}$, C-4: $\delta = 68.8 \text{ ppm}$, C-3: $\delta = 74.0 \text{ ppm}$), sind ein sehr starkes Indiz dafür, daß jeweils ein Sauerstoffatom an diese Kohlenstoffatome gebunden ist.

Bei kleineren Frequenzen zeigt das ^1H -NMR-Spektrum zwei Dubletts (H-7-CH_3 : $\delta_{\text{CH}_3} = 1.43 \text{ ppm}$, $9'$: $\delta_{3'-\text{CH}_3} = 0.98 \text{ ppm}$), die in ihrer Intensität jeweils drei Protonen entsprechen. Hierbei handelt es sich in Übereinstimmung mit den DEPT-135- und DEPT-90-Spektren um zwei Methylgruppen, die beide jeweils direkt einem Methinproton benachbart sind und ein AB- (H-5'-CH_3 , H-5') sowie ein AX-System (H-3'-CH_3 , H-3') bilden.

Das Signal H-7' ($\delta_{7'} = 0.85 \text{ ppm}$) bildet ein Triplet (${}^3J = 7.3 \text{ Hz}$), das Signal H-5'-CH_3 ($\delta_{5'-\text{CH}_3} = 0.8 \text{ ppm}$) ein Dublett (${}^3J = 6.2 \text{ Hz}$), es sind zwei Methylgruppen, von denen eine mit einem Methinproton, die andere mit zwei Methylenprotonen koppelt.

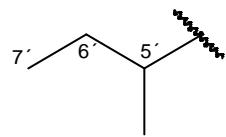
Um die weiteren Konnektivitäten der Atome zu bestimmen, wird von den Olefinprotonen bzw. der Doppelbindung ausgegangen. Diese nimmt eine zentrale Bezugsposition im Molekül ein, denn von ihr kann in dem H,H-COSY-Spektrum in zwei verschiedene Richtungen ausgegangen werden. Ausgehend von dem Olefinproton bei $\delta = 5.63$ ppm, sind nur Kreuzsignale zum Alphatenbereich hin erkennbar und vom benachbarten Proton nur Signale zum Bereich mittlerer und hoher Verschiebungen.

Das C,H-COSY-Spektrum zeigt im Bereich tiefer Frequenzen Signale für vier primäre, zwei sekundäre und zwei tertiäre Kohlenstoffatome, von denen sich alle Signale im Alphatenbereich des ^1H -Spektrums lokalisieren lassen. Ausnahme ist ein primäres Kohlenstoffatom, das im H,H-COSY-Spektrum eine Konnektivität zu einem Signal für ein heterosubstituierten C-Atom zeigt und somit nicht dem Bereich der aliphatischen Seitenkette zuzuordnen ist. Für den aliphatischen Bereich verbleibt somit ein Molekülfragment C_7H_{13} . Im H,H-COSY-Spektrum ist ein Krezpeak eines olefinischen Protonensignals zu einem Methinprotonensignal zu erkennen, das wiederum ein Signal zu einem Methylgruppensignal und zwei Signale zu einem Methylengruppensignal zeigt. Aus diesen Informationen lässt sich das **Fragment II** konstruieren.

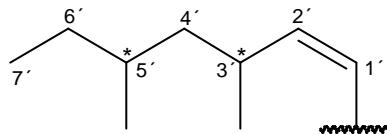


Fragment II:

Die Kopplungskonstanten des Methinprotonensignals, das zu einem Multiplett aufspaltet, lassen sich nicht bestimmen. Das Methylgruppensignal ist durch die Kopplung mit dem Methinprotonensignal H-3' zu einem Dublett ($^3J = 6.6$ Hz) aufgespalten. Die an dieses Stereozentrum gebundene Methylengruppe zeigt Signale für zwei geminal koppelnde, diastereotope Protonen. Im C,H-COSY-Spektrum spaltet das Kreuzsignal des C-Atoms der Methylengruppe zu beiden Protonen auf. Für den aliphatischen Rest bleiben nach dieser Zuordnung nur noch eine Methingruppe, eine Methylengruppe und zwei Methylgruppen übrig. Da eine Methyl- und eine Methylengruppe ein A_3X_2 -System bilden, sieht die einzige sinnvolle Anordnung dieser Fragmente wie folgt aus (**Fragment III**):

**Fragment III:**

Die entsprechenden Signale dieses Fragmentes finden sich im H,H-COSY-Spektrum, ein Kreuzpeak zwischen dem Methinprotonensignal und dem Signal der vicinalen Methylgruppe, die im ^1H -Spektrum zu einem Dublett aufspaltet, sowie ein Kreuzpeak für das Methinprotonensignal zum Methylengruppensignal und von dieser zum Signal der terminalen Methylgruppe, das zu einem Triplet aufspaltet. Das Gesamtfragment für die aliphatische Seitenkette hat demnach **Fragmentstruktur IV**, mit zwei Stereozentren.

**Fragment IV:**

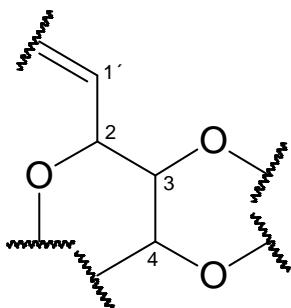
Die Struktur der Seitenkette wurde zusätzlich noch durch das Massenspektrum bestätigt. Es zeigt vier Peaks, die nach Abspaltung von H_2O , als Fragmentionen der Seitenkette zu interpretieren sind, und zwar $m/z = 221 [\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$, $m/z = 211 [\text{M}-\text{C}_7\text{H}_{15}]^+$, $m/z = 193 [\text{M}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_7\text{H}_{15}]^+$ sowie das unter Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen entstandene Fragmention $m/z = 172 [\text{M}-\text{CH}_3-\text{C}_9\text{H}_{15}]^+$.

Die für die Seitenkette mit literaturbekannten Inkrementregeln^[30] berechneten ^{13}C -Verschiebungen stimmen sehr gut mit den gemessenen Werten überein (**Tabelle 10**).

C-Atom	7'	6'	5'	5'-CH ₃	4'	3'	3'-CH ₃
$\delta_{\text{C}} \text{ (gem.)}$	11.7	30.1	30.9	19.4	44.8	32.4	22.2
$\delta_{\text{C}} \text{ (ber.)}$	11.5	30.4	31.8	20.2	44.0	32.7	21.5
$\Delta\delta_{\text{C}}$	0.2	0.3	0.9	0.8	0.8	0.3	0.7

Tabelle 10: Berechnete und gemessene ^{13}C -Verschiebungen der **Fragmentstruktur III**

Auf der anderen Seite der Doppelbindung des Moleküls kann man aus den Korrelationen des H,H-COSY-Spektrums **Fragment V** konstruieren:



Fragment V:

Die Anordnung der Atome wird durch eine genauere Analyse der Peakmuster und der Kopplungskonstanten bestätigt^[31]. Es zeigen sich folgende Aufspaltungsmuster und Kopplungskonstanten in **Fragment V**:

- Das Olefinprotonensignal für 1' ist in ein Dublett vom Dublett auf (dd, $^3J = 11.0$ Hz und 8.9 Hz) aufgespalten
- Das mit dem Signal des Olefinprotons koppelnde Signal H-2 ist ein Pseudotriplett (pt, $^3J = 9.0$ Hz)
- das Protonensignal für H-3 spaltet zu einem Pseudotriplett ($^3J = 9.2$ Hz) auf
- Zwischen den Protonensignalen von H-4 und H-7 ist im H,H-COSY-Spektrum ein intensives Kreuzsignal zu erkennen

Im ^1H -Spektrum spaltet das Signal für H-4 zu einem Doppeldublett (dd, $^3J = 6.0$ Hz und 1.6 Hz) und das Signal für H-7 zu einem Dublett vom Quartett (dq, $^3J = 1.3$ Hz und 6.9 Hz) auf. Die sehr kleine Kopplungskonstante ist entweder auf eine *syn*-Anordnung der vicinalen Protonen mit einem Interplanarwinkel um 90° zurückzuführen oder zeigt an, daß es sich hier um eine lange-range-Kopplung handelt.

Das ^1H -Signal von H-7 ist Bestandteil eines A_3X -Systems, mit der Teilstruktur $\text{O}-\text{CH}^{\text{X}}-\text{CH}_3^{\text{A}}$. Mit diesem Teilfragment sind alle protonentragenden Gerüstatome zugeordnet. Bei den noch fehlenden Molekülbausteinen handelt es sich um einen Carbonylkohlenstoff. Die Tieffeldverschiebung spricht dafür, daß ein Carbonsäurederivat vorliegt. Danach verbleiben nur noch die beiden quartären sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatome C-4a und C-7a, die zu einer Doppelbindung gehören. Deren Anordnung läßt sich ausschließlich durch eine genaue Analyse des HMBC-Spektrums klären. Auch bei welchen lt. Summenformel noch verbleibenden Sauerstoffatomen es sich um

die Ringatome für die zwei im Molekül enthaltenen Ringe handelt, kann über das HMBC-Spektrum geklärt werden. So erfüllt einzig die in **Abbildung 15** dargestellte Struktur alle Signalzuordnungen widerspruchsfrei.

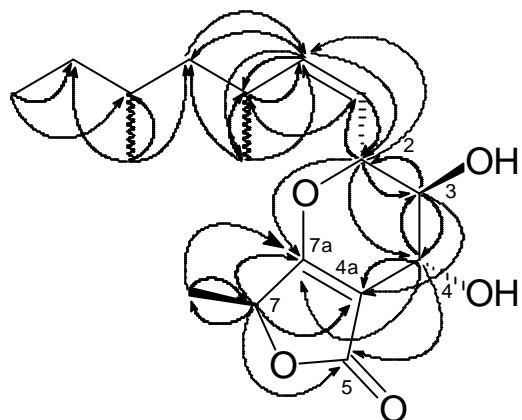


Abb. 15: Aus Pilzstamm 2072 isolierter Sekundärmetabolit **2072.I** (mit allen im HMBC-Spektrum sichtbaren long-range Kopplungen)

Die Zuordnung läßt sich wie im Folgenden erläutert, aus dem HMBC-Spektrum entwickeln. Welches Signal im ^{13}C -Spektrum zum Estercarbonylkohlenstoffatom oder zum sauerstoffsubstituierten C-Atom der Doppelbindung gehört, läßt sich nicht anhand der chemischen Verschiebung bestimmen, denn beide Signale zeigen eine ähnliche chemische Verschiebung (178.0 ppm, 172.3 ppm). Das hochfeldverschobene C-Atom der Doppelbindung C-4a muß aufgrund der 3J -long-range-Kopplung von Proton H-3 des Fragmentes VI, direkt mit dem C-Atom C-4 verknüpft sein. Der Ringschluß zum Pyranringfragment, erfolgt wegen einer schwachen 3J -Kopplung von H-2, über das Sauerstoffatom, zu C-7a der Doppelbindung. Mit C-7a kann das A_3X -System (H-7, H-7-CH₃) verknüpft werden, das 3J -Kopplungen von der Methylgruppe und 2J -Kopplungen vom Methinproton zu C-7a zeigt. Der Ringschluß zum γ -Lacton ergibt sich aus der 3J -Kopplung im C,H-COSY-Spektrum von H-7 zu C-5.

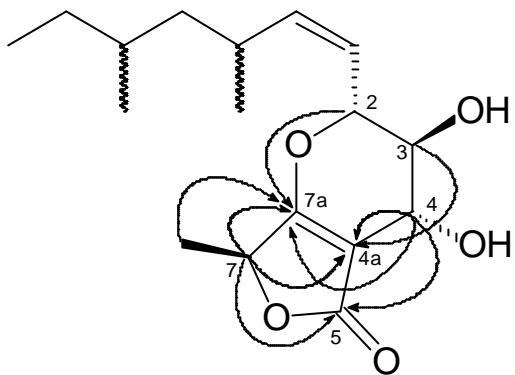


Abb. 16: Aus Pilzstamm 2072 isolierter Sekundärmetabolit **2072.I** (mit den für die Lokalisierung der Doppelbindung und der Ringschlüsse notwendigen Ion-range-Kopplungen)

Die Position der zwei freien OH-Gruppen (C-3-OH, C-4-OH) wird über einen H/D-Austausch im ^{13}C -Spektrum bestätigt. Dadurch wird die Elektronendichte der C-Atome, an die die OH-Gruppen gebunden sind, geringfügig aber meßbar verändert. Beim Vergleich der chemischen Verschiebungen zwischen dem ^{13}C -Spektrum in CDCl_3 und dem Spektrum in $\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$ zeigt sich, daß die chemischen Verschiebungen für alle Kohlenstoffsignale bis auf maximal 0.05 ppm Abweichung identisch sind. Ausnahme sind die zwei C-Atome C-3 und C-4. Bei diesen weicht die chemische Verschiebung um 0.21 ppm bzw. um 0.17 ppm voneinander ab. Werden die Verschiebungen statistisch aufbereitet, ergibt sich, daß die Verschiebungen signifikant unterschiedlich sind.

Eine abschließend durchgeführte Berechnung der chemischen Verschiebungen mit dem Programm Specinfo, zeigte für die Struktur eine recht gute Übereinstimmung mit den gemessenen chemischen Verschiebungen (**Tabelle 11**).

C-Atom	7a	3	4a	7	2	3	4	7-CH ₃
$\delta_{\text{C}}(\text{gem.})$	178.0	172.3	101.0	79.7	74.6	72.3	65.3	17.6
$\delta_{\text{C}}(\text{ber.})$	176.1	173.4	107.6	76.8	76.3	71.0	63.6	16.5
$\Delta\delta_{\text{C}}$	1.9	1.1	6.6	2.9	1.7	1.3	1.7	0.1

Tabelle 11: Berechnete ($\delta_{\text{C}}(\text{ber.})$) und gemessene ($\delta_{\text{C}}(\text{gem.})$) ^{13}C -Verschiebung des Naturstoffes **2072.I** in ppm

3.6.1 Ermittlung der relativen Konfiguration

Da die Kopplungskonstanten neben Substituenteneinflüssen wesentlich vom Molekülbau abhängen, können aus ihrer Größe Rückschlüsse auf die räumliche Anordnung gezogen werden. Die Kopplungskonstanten sind dabei von den Parametern Bindungsänge, Bindungswinkel und Torsionswinkel abhängig. Unter Berücksichtigung dieser Faktoren lässt sich die Konfiguration des Naturstoffes **2072.I** folgendermaßen diskutieren: Die Kopplungskonstante von 8.9 Hz zwischen den Protonensignalen von H-2 und H-3 spricht für eine *trans*-diaziale-Stellung (**Abb. 17**). Die Kopplungskonstante der Signale von H-3 und H-4 (8.9 Hz bzw. 9.2 Hz) entspricht der Größenordnung von $^3J_{aa}$ und deutet ebenfalls auf eine *trans*-diaziale-Anordnung hin. Zu berücksichtigen ist jedoch der Einfluß der elektronegativen Sauerstoffsubstituenten, ohne den die Kopplungskonstanten noch größer wären. Die durch Analyse der Kopplungskonstanten getroffene Zuordnung der räumlichen Stellung der Protonen wird durch NOE-Differenzspektren bestätigt.

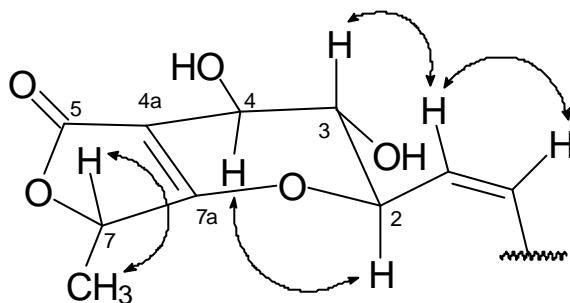


Abb. 17: Ermittlung der relativen Konfiguration des Naturstoffes **2072.I** anhand der NOE-Signale

Die relative Konfiguration des Sechsringssystems zu der des Fünfringssystems, lässt sich nicht über Kern-Overhauser-Effekte klären, da die räumliche Entfernung der Protonen aus dem Sechs- und dem Fünfring zu groß für einen NOE-Effekt ist. Man kann jedoch davon ausgehen, daß beide Naturstoffe aus einer Biosyntheseroute entstanden sind, der Naturstoff **2072.I** durch Dehydrierung aus **2072.II** oder **2072.II** durch Hydrierung aus **2072.I**. Die relative Konfiguration kann deshalb für beide Sekundärmetabolite als gleich angesehen werden. Somit kann für **16** die gleiche relative Konfiguration wie für den Naturstoff **2072.II** angenommen werden (**Abbildung 21**).

Die relative Konfiguration der Alkylseitenkette kann nicht aus den NOE-Spektren aufgeklärt werden, da hier keine starres Molekülgerüst mit fixierten Atomen, sondern eine Kette mit um ihre Bindungsachsen frei rotierenden Atomen vorliegt. Die relative Konfiguration kann jedoch über einen NMR-Spektrervergleich aufgeklärt werden. Bei

dem Vergleichsmolekül handelt es sich um die Seitenkette der Saragossasäure A^[32], deren Methylgruppen in der syn-Anordnung zueinander stehen.

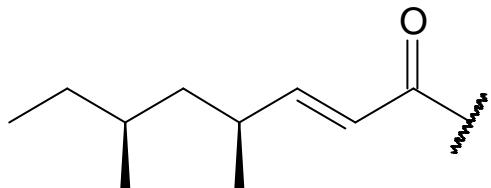


Abb. 18: Seitenkette der Saragossasäure A, mit syn-ständigen Methylgruppen

Da sowohl die ¹H-, als auch die ¹³C-Daten an den Positionen 3', 4', 5', 8' und 9' zwischen der Seitenkette des Naturstoffes **2072.I** und der der Saragossasäure stark voneinander abweichen und sie somit eine unterschiedliche Stereochemie besitzen, kann für die Seitenkette von **9** eine *anti*-Anordnung der Methylgruppen postuliert werden.

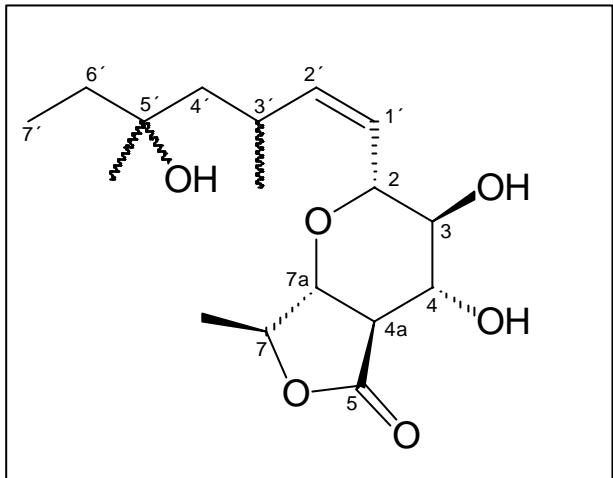
Um von den Naturstoffen **2072.I** und **2072.II** Einkristalle zu erhalten, wurden die Acetat- und *o*-Brombenzoate synthetisiert. Die so erhaltenen Kristalle waren aber bei der Röntgenstrukturanalyse zu reflexarm um verwertbare Röntgenstrukturen zu erhalten.

3.6.2 Biosynthese des Naturstoffes **2072.I**

Um die Biosynthese des Naturstoffes aufzuklären, müssen ¹³C-markierte Precursor, wie ¹³C-Acetat, -Malonat oder ähnliche an die Mikroorganismen verfüttert werden. Der Metabolit wird anschließend isoliert und die ¹³C-markierten Sequenzen der verfütterten Precursor ermöglichen Rückschlüsse auf die Biosynthese des Metaboliten.

Literaturbekannte Verbindungen, die ähnliche Teilstrukturen wie die des Naturstoffes enthalten, sind Substanzen, die nach dem Polyketidweg gebildet werden. Dies sind zum Beispiel die Avenaciolide^[33], die aus Acetat, Malonat und Succinyl-CoA als Grundbausteinen produziert werden.

3.6.3 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.II



17

Abb. 19: Aus Pilzstamm 2072 isolierter Sekundärmetabolit: **2072.II (17)**

Der Naturstoff **2072.II** wurde in geringer Menge (8 mg) aus dem Kulturansatz isoliert. Er schmilzt bei 156 °C und kristallisiert aus Aceton/*n*-Hexan in weißen Kristallnadeln. Er ist in polaren Lösemitteln wie Aceton und Methanol gut löslich und hat in einem Gemisch aus Methylenechlorid/Methanol (95:5) einen R_f -Wert von 0.3.

Eine IR-Bande bei $\tilde{\nu} = 1773 \text{ cm}^{-1}$ deutet auf eine γ -Lactoncarbonylfunktion hin. Weitere signifikante Banden sind bei $\tilde{\nu} = 3427 \text{ cm}^{-1}$ für eine OH-Funktion und bei $\tilde{\nu} = 1090 \text{ cm}^{-1}$ und 1011 cm^{-1} für eine Alkyletherfunktion zu erkennen.

Im Massenspektrum (CI- NH₃) ist der Molekülpeak bei $m/z = 328$ gleichzeitig der Basispeak. Spezifische Isotopenmuster sind nicht zu erkennen, so daß von Sauerstoff als einzigm Heteroatom ausgegangen werden kann. Daraus ergibt sich unter Berücksichtigung der NMR-Daten eine Summenformel von C₁₇H₂₈O₆.

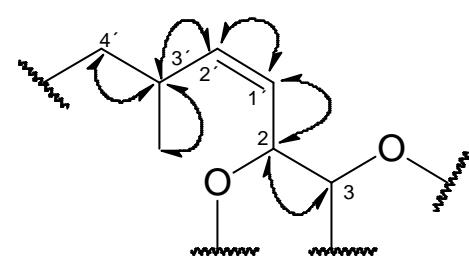
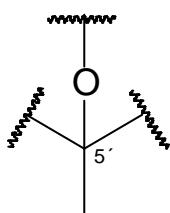
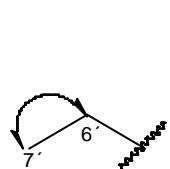
Das ¹³C-Spektrum enthält Signale für ein quartäres Estercarbonylkohlenstoffatom (177.7 ppm) und ein quartäres oxygeniertes C-Atom (73.9 ppm). Weitere Signale sind zwei sp²-hybridisierte tertiäre, sieben tertiäre, von denen fünf heterosubstituiert sind, zwei sekundäre und vier primäre Kohlenstoffatome. Danach ergibt sich eine Teilsummenformel von C₁₇H₂₅O₃. Ergänzt man die Teilsummenformel noch um die fehlenden Heteroatome, so fehlen an der durch die Masse bestimmten Summenformel drei Sauerstoff- und drei Wasserstoffatome. Demnach müssen zwei Hydroxy-, eine Etherfunktionen und eine Lactoncarbonylgruppe im Molekül vorhanden sein. Die Anzahl der Doppelbindungsäquivalente ergibt sich zu vier, von denen nach Abzug zweier

Äquivalente für die Carbonylgruppe und einer Doppelbindung noch zwei für ein Zweiringsystem verbleiben.

Im ^1H -Spektrum entsprechen für den Bereich hoher ($\delta = 6.0 - 5.0$) und mittlerer ($\delta = 5.0 - 2.5$) Frequenzen die Integralstufen der Signale jeweils einem Proton. Die beiden Signale im Bereich hoher Frequenzen ($\delta_{2\cdot} = 5.53 \text{ ppm}$, $\delta_{1\cdot} = 5.25 \text{ ppm}$) bilden ein AB-System (pt , ${}^3J = 11.0 \text{ Hz}$, dd, ${}^3J = 10.1$ und 9.0 Hz). Die Kopplungskonstante der 3J -Kopplung von 11.0 Hz zwischen den beiden olefinischen Protonen ist typisch für eine *cis*-Anordnung der Protonen. Weitere erkennbare signifikante Signalgruppen im Aliphatenbereich sind ein A_3X_2 -System (A_3 : 0.86 ppm , X_2 : 1.47 ppm), zwei jeweils zum Dublett aufgespaltene Methylgruppensignale (0.98 ppm , 1.36 ppm) sowie ein Methylgruppensinguletsignal (1.12 ppm).

Die Doppelbindung nimmt eine zentrale Position ein, von der aus das Molekül durch Analyse der H,H- und CH-COSY-Spektren sukzessive aufgebaut werden kann.

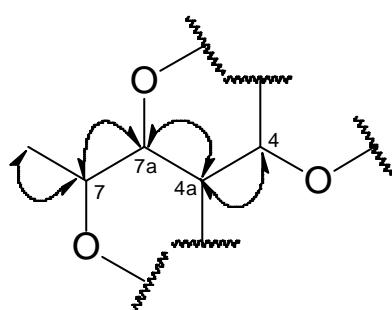
Dabei können aus den Kopplungskonstanten und Aufspaltungsmustern des ^1H -Spektrums sowie den Kreuzsignalen des H,H-COSY-Spektrums folgende Molekülfragmente konstruiert werden:



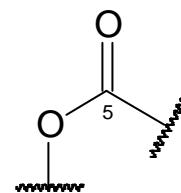
Fragment VI:

Fragment VII:

Fragment VIII:



Fragment IX:



Fragment X:

Versucht man diese Partialstrukturen über die Estercarbonylgruppe (**Fragment X**) und das heterosubstituierte quartäre C-Atom (**Fragment VII**) zum Gesamt molekül zu verknüpfen, so bleibt immer eine Verknüpfungsstelle über zwei C-Atome offen. Das bedeutet aber, dass die zwei Fragmente **VIII** und **IX** doch direkt miteinander verknüpft sein müssen. Ein Indiz liefert ein sehr schwaches Kreuzsignal im H,H-COSY zwischen den Protonensignalen von H-3 und H-4. Das Kopplungsmuster des Protonensignals von H-3 lässt sich jedoch nicht analysieren, da es ein Multiplett ohne erkennbare Feinstruktur ist. Die Lösung des Problems liefert das H/D-ausgetauschte Protonenspektrum. Hier spaltet das Signal H-3 zu einem Dublett vom Dublett mit den Kopplungskonstanten 6.75 Hz und 9.0 Hz auf, es koppelt demnach mit dem Pseudotriplett des Protons H-4 (9.0 Hz). Bestätigt wird diese Kopplung durch die Auswertung des HMBC-Spektrums, das auch die Verknüpfung der Ringsysteme über die Sauerstoffatome klärt.

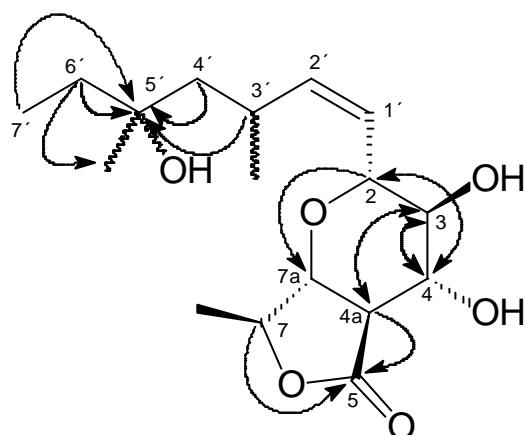


Abb. 20: Im HMBC-Spektrum sichtbare $^nJ_{\text{C},\text{H}}$ -Kopplungen ($n = 2 - 3$) des Naturstoffes **2072.II**

Der Naturstoff wurde erstmals von mir isoliert und beschrieben und lässt sich keiner bekannten Naturstoffklasse zuordnen. Seine biologischen und pharmazeutischen Eigenschaften sind noch nicht geklärt, er befindet sich aber gerade im Wirkstoffscreeing der BASF.

3.6.3.1 Ermittlung der relativen Konfiguration

Die relative Konfiguration des Naturstoffes **2072.II** lässt sich aus den Kopplungskonstanten, den Kopplungsmustern sowie aus NOE- und NOESY-Spektren herleiten.

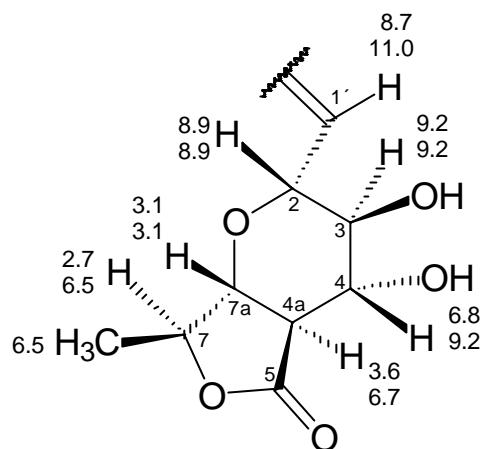


Abb. 21: Naturstoff **2072.II** mit seinen Kopplungskonstanten (Kopplungskonstanten in Hz)

Die Kopplungskonstante von 8.9 Hz spricht für eine bevorzugte *trans*-diaziale Stellung der Protonen H-1' und H-2 (Abb. 21). Die Kopplungskonstante der Protonen H-2 und H-3 von 8.9 Hz bzw. 9.2 Hz entspricht der Größenordnung von ${}^3J_{aa}$ für eine trans-bisaxiale Anordnung, genauso wie die Kopplungskonstante der Protonen H-3 und H-4 (${}^3J = 9.2$ Hz). Die Kopplung des Protons H-4 mit H-4a (${}^3J = 6.7$ Hz) liegt für eine normale ${}^3J_{aa}$ -Kopplungskonstante in einem sechsgliedrigen Ringsystem an der unteren Grenze. Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß das Proton H-4a an ein Brücken-C-Atom mit einem Sauerstoff gebunden ist. Deshalb spricht nichts gegen eine axiale Position der beiden Protonen. Die durch Analyse der Kopplungskonstanten getroffene Zuordnung der räumlichen Stellung der Protonen, wird durch NOE-Differenzspektren und NOESY-Experimente bestätigt.

Bei den Fünfringen sind die Beziehungen zwischen den Kopplungskonstanten und der Position der Protonen zueinander nicht so klar wie bei den Sechsringen. Die Interpretation der räumlichen Anordnung erfolgt hier ausschließlich über Kern-Overhauser-Effekte. Aus den entsprechenden Spektren ergibt sich, daß die Protonen H-3 und H-4a 1,3-diaxial zueinander stehen. Für die Protonen H-2 und H-3 ergibt sich daraus, wie über die Kopplungskonstanten schon bestätigt wurde, eine *trans*-diaziale Anordnung. Die Protonen H-2 und H-7a stehen ebenfalls 1,3-diaxial zueinander.

Die Stellung des Protons H-7 und der CH_3 -Gruppe H-7- CH_3 ist aus den NOE-Differenzspektren nicht zu entnehmen. Der große Unterschied zwischen den beiden Signalintensitäten lässt keine vernünftige Phasenkorrektur der NOE-Differenzspektren zu,

daher ist eine eindeutige Auswertung nicht möglich. Die Information über die Raumlage gibt in diesem Fall nur das NOESY-Spektrum. Es zeigt Kreuzpeaks von dem Methylgruppensignal H-7-CH₃ zu den Signalen der Protonen H-7 und H-7a, die ausschließlich bei einer äquatorialen Stellung der Methylgruppe möglich sind. Die Protonen H-7 und H-7a stehen folglich *trans* zueinander. Mit den Kopplungskonstanten und den Informationen aus den NOE-Spektren kann für den Naturstoff **2072.II** folgende Konformation (**Abb. 22**) vorgeschlagen werden. Danach ergibt sich für alle Substituenten die thermodynamisch günstigere äquatoriale Position.

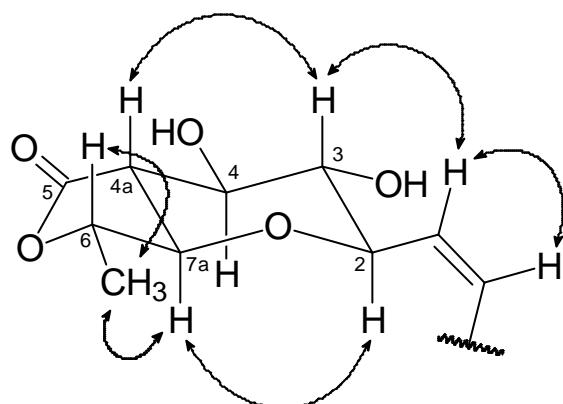


Abb. 22: Die relative Konfiguration des Naturstoffs **2072.II** (\leftrightarrow , gemessene Nuklear-Overhauser-Effekte)

3.6.4 Biologische Aktivität des Naturstoffs **2072.II**

Im biologischen Screening war der Naturstoff als unauffällig einzustufen. Die Hemmhofradien sind in **Tabelle 12** aufgeführt.

Agardiffusionstest (c = 1 [mg/ml])							
Hemmhofradien [mm]							
Substanz	Chl.	E. C.	B. m.	Ust.	Eur.	M. m.	Fus.
2072.II	3	2	2	0	6	0	4

Tabelle 12: Biologische Aktivität von **17**

3.6.5 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.III

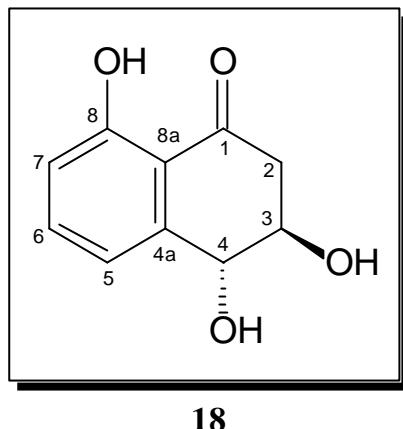
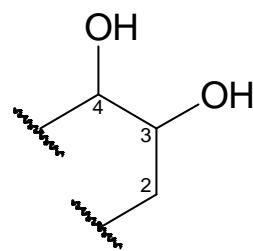
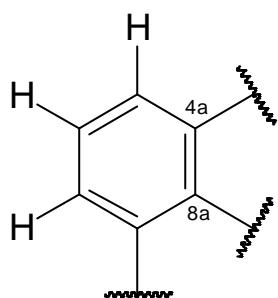


Abb. 23: Aus Pilzstamm 2072 isolierter Naturstoff 2072.III, Hydroxy-6-deoxyscytalton (18)

Der Naturstoff wurde in Form farbloser Kristallnadeln mit einem Schmelzpunkt von 82 °C aus der polaren Rohextraktfraktion isoliert. Auf dem DC färbt die bei 254 nm UV-detektierbare Substanz mit dem Universalsprühreagenz hellblau an. Das IR-Spektrum zeigt charakteristische Banden für Hydroxy- ($\tilde{\nu} = 3427 \text{ cm}^{-1}$) und Carbonylgruppen ($\tilde{\nu} = 1640 \text{ cm}^{-1}$), sowie für substituierte Aromaten.

Im Massenspektrum (EI) zeigt der Naturstoff einen Molpeak $[M^+]$ bei $m/z = 194$, für den sich in Übereinstimmung mit den NMR-Daten die Summenformel zu $C_{10}H_{10}O_4$ berechnet.

Die Auswertung des ^1H -Spektrums zeigt ein für chelatisierte Hydroxyprotonen typisches Signal ($\delta = 12.04 \text{ ppm}$), das durch CD_3OD austauschbar ist. Im Aromatenbereich ist das typische Aufspaltungsmuster für ein AMX-System mit den entsprechendem *ortho*- und *meta*-Kopplungen sichtbar. Der für heteroatomsubstituierte Signale charakteristische Verschiebungsbereich des ^1H -NMR-Spektrums weist zwei Methinprotonensignale auf, deren komplementäre ^{13}C -Signale (73.1 ppm, 71.8 ppm) vorliegen. Im Alphatenbereich findet sich nur ein Signal, das nach Auswertung der Protonenintegralstufen und des C,H-COSY-Spektrums einer CH_2 -Gruppe zugeordnet werden kann. Weitere signifikante Signale treten für eine Carbonylgruppe ($\delta = 206 \text{ ppm}$) und ein oxygeniertes aromatisches C-Atom auf ($\delta = 164.3 \text{ ppm}$). Aus diesen Informationen können mit Hilfe des H,H-COSY-Spektrums zwei Partialstrukturen ermittelt werden (**Fragment XI**, **Fragment XII**)



Die Konnektivitäten werden durch das HMBC-Spektrum ermittelt. Danach ergibt sich die Stellung der Carbonylgruppe direkt zwischen der Methylenegruppe H-2 und der Aromatenposition C-8a. Der Ringschluß zum laut Doppelbindungsäquivalenten vorliegenden Zweiringsystem erfolgt über die noch freie Stelle des aliphatischen Fragmentes an die Position 4a des Aromaten. Danach verbleibt für die noch nicht zugeordnete Hydroxyfunktion nur die Position 8a am Aromaten, von der aus die Hydroxyfunktion mit der Carbonylgruppe chelatisieren kann. Die Kopplungskonstante von 5.3 Hz zwischen den Protonen H-4 und H-3 ist typisch für eine *cis*-Anordnung.

Durch Vergleich mit den Literaturdaten, kann der Naturstoff als literaturbekanntes Tetralonderivat **cis-4-Hydroxy-6-deoxyscytalon** identifiziert werden, das neben Scytalon (**Abb. 24**), erstmals 1981 aus dem Pilz *Phialophora lagerbergii* isoliert wurde^[34].

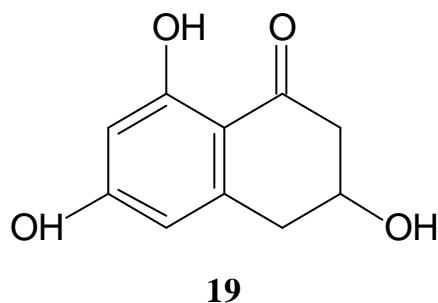


Abb. 24: Scytalon (**19**)

In einer Arbeit von Sankawa^[35] wurde durch Verfüttern von radioaktiv markiertem [2-¹³C, 2-²H₃]-Acetat an den Pilz der Biosyntheseweg des Metaboliten **18** aufgeklärt. Demnach ist der Naturstoff polyketider Herkunft und wird aus einem Hexaketid gebildet.

3.6.6 Strukturaufklärung des Naturstoffes 2072.IV

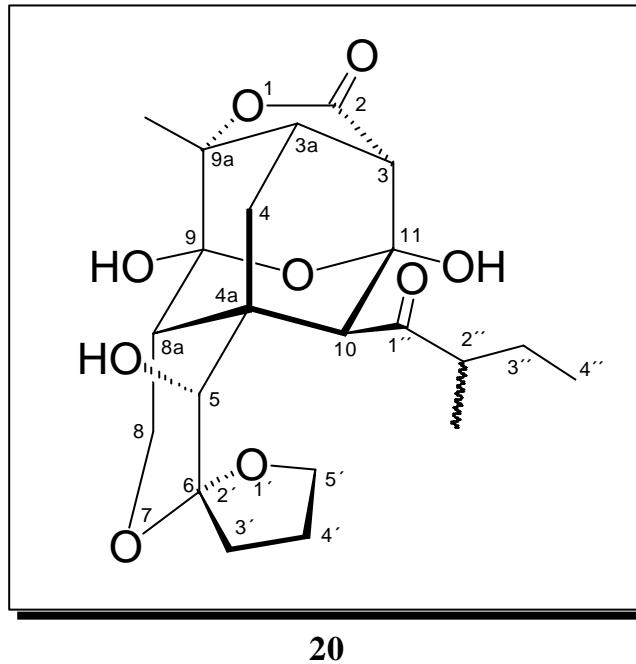


Abb. 25: Aus Pilzstamm 2072 isolierter Naturstoff: 2072.IV (20)

Von dem nur in polaren Lösemitteln wie z. B. Aceton oder Methanol löslichen Naturstoff wurden 2 mg isoliert. Durch chemische Ionisation (CI - MS; NH_4^+) wurde ein Spektrum mit einem Feinmassemolekülionenpeak $[\text{M} + \text{NH}_4^+]$ bei $m/z = 456.22391$ erhalten, daraus ergibt sich die Summenformel des Metaboliten zu $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_9$.

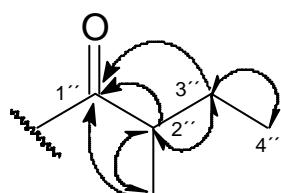
Im IR-Spektrum sind bei $\tilde{\nu} = 1775 \text{ cm}^{-1}$ eine charakteristische γ -Lactoncarbonylbande und bei $\tilde{\nu} = 1701 \text{ cm}^{-1}$ eine Carbonylbande zu erkennen. Weitere signifikante Banden sind bei $\tilde{\nu} = 3438 \text{ cm}^{-1}$ für eine OH-Funktion und bei $\tilde{\nu} = 1095 \text{ cm}^{-1}$ und 1081 cm^{-1} für eine Alkyletherfunktion zu erkennen.

Im ^1H -Spektrum liegen drei durch Deuterium austauschbare Protonensignale vor, zwei Singulets ($\delta_{9-\text{OH}} = 5.51 \text{ ppm}$, $\delta_{11-\text{OH}} = 5.45 \text{ ppm}$) und ein Dublett ($\delta_{5-\text{OH}} = 4.19 \text{ ppm}$). Im Bereich mittlerer Frequenzen zeigt das Spektrum ein Singulettignal, das einem Proton entspricht ($\delta_{10} = 4.28 \text{ ppm}$), ein Multiplettsignal ($\delta_{5',8} = 4.00 \text{ ppm}$), unter dem zwei Protonen liegen und ein Doppeldublettsignal, das einem Proton entspricht ($\delta_8 = 3.91 \text{ ppm}$). Im C,H-COSY-Spektrum zeigt das Signal des Kohlenstoffatoms C-8 ein Kreuzsignal zu dem Multiplett und dem Doppeldublett, es handelt sich hier demnach um die geminal koppelnden Protonen einer Methylengruppe. Weitere Signale, die jeweils einem Proton entsprechen, sind ein Dublett ($\delta_5 = 3.08 \text{ ppm}$), ein Multiplett ($\delta_{2''} =$

3.01 ppm) und ein weiteres Dublett ($\delta_3 = 2.81$ ppm). Im Aliphatenbereich sind Signale für drei Methylgruppen zu erkennen:

- ein Singulett ($\delta_{9\alpha\text{-CH}_3} = 1.46$ ppm)
- ein Dublett ($\delta_{2'\text{-CH}_3} = 1.10$ ppm)
- ein Triplet ($\delta_{4''} = 0.85$ ppm)

Zusätzlich zeigt das ^1H -Spektrum Signale für eine CH-Gruppe ($\delta_{8\alpha} = 2.15$ ppm), die zum Doppeldublett aufspaltet und Signale für drei CH_2 -Gruppen zwischen 2.4 und 1.2 ppm ($4', 3', 3''$) mit nichtäquivalenten Protonen die jeweils zum Multiplett aufspalten. Aus den ^1H - und dem H,H-COSY-Spektrum können über die Kopplungskonstanten und die Kreuzsignale mehrere Spinsysteme identifiziert werden. Das erste ist **Fragment XIII**, dessen Vierspinsystem eine Methylgruppe ($4''$) beinhaltet, die durch die direkt benachbarte Methylengruppe ($3''$) zu einem Triplet aufspaltet. Die Methylengruppe zeigt neben der Kopplung mit der Methylgruppe eine geminale Kopplung, die auch über Aufspaltung des C,H-COSY Signals belegt ist, sowie eine Kopplung mit einem Methinproton ($2''$), das weiter mit der zum Dublett aufgespaltenen Methylgruppe ($2''\text{-CH}_3$) koppelt. Die noch verbleibende freie Valenz des Kohlenstoffatoms, an das die Methylgruppe und das Methinproton gebunden sind, wird durch eine Carbonylgruppe ($\delta_{1''} = 216.9$ ppm) abgesättigt, zu der die Protonen $2''\text{-CH}_3$ und $\text{H}-3''$ im HMBC-Spektrum 3J -Kopplungen und $\text{H}-2''$ eine 2J -Kopplung zeigen.



Fragment XIII: Mit eingezeichneten H,H-COSY-(—) und HMBC-Kopplungen (\rightarrow)

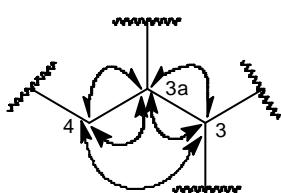
Eine weitere Partialstruktur (**XIV**) ist ein Dreispinsystem, das aus drei Methylengruppen besteht. Die Konnektivitäten ergeben sich direkt aus dem H,H-COSY-Spektrum. Alle drei Gruppen zeigen geminale Kopplungen, d. h. sie sind diastereotop. Die Tieffeldverschiebungen der Protonensignale für $\text{H}-5'_{\alpha,\beta}$ ($\delta_{\text{H}5'\alpha,\beta} = 4.1 - 4.0$ ppm) und des Kohlenstoffatomsignals $\text{C}-5'$ ($\delta_{\text{C}5'} = 71.36$ ppm) sprechen für einen Heterosubstituenten an dem C-Atom. Die Protonen am C-Atom $3'$ ($\text{H}-3'_{\alpha} : \delta_{\text{H}3'\alpha} = 2.2$ ppm, $\text{H}-3'_{\beta} : \delta_{\text{H}3'\beta} = 2.0$ ppm) zeigen, außer zu der CH_2 -Gruppe $\text{H}-4'_{\alpha,\beta}$ keine weiteren 3J -Kopp-

lungen, demnach muß an das C-Atom C-3' ein quartäres C-Atom gebunden sein. Welches quartäre C-Atom an diese CH₂-Gruppe gebunden ist, läßt sich nur anhand des HMBC-Spektrums ermitteln. Hier zeigen alle Methylenprotonen ²J- bzw. ³J-Kopplungen zum quartären C-Atom C-6. Die extreme Tieffeldverschiebung des Signals für das C-Atom bei $\delta_{C6} = 110.0$ ppm ist ein Indiz dafür, daß es sich um ein ketatisches C-Atom handelt. Die Kopplung der Methylenprotonen an C-5' könnte eine ⁴J-Kopplung sein, jedoch ist diese sehr ungewöhnlich, und es handelt sich hier mit größerer Wahrscheinlichkeit um eine ³J-Kopplung über das Sauerstoffatom hinweg, an das die Methylengruppe gebunden ist. Dieses Sauerstoffatom ist direkt mit dem quartären ketatischen C-Atom C-6 verbunden, so daß sich folgender Heterocyclus als Fragment ergibt:



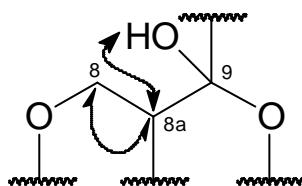
Fragment XVI: Mit eingezeichneten HMBC-(↔) und H,H-COSY-Kopplungen (→)

Das Dreispinsystem mit den Protonen H-3a (CH), H-3 (CH) und H-4 (CH₂), stellt ein weiteres Fragment dar (**Fragment XV**), dessen Aufbau sich direkt aus den Kopplungskonstanten des Protonenspektrums und den Kreuzsignalen des H,H-COSY-Spektrums ergibt. Alle freien Valenzen der durch das C,H-COSY bestimmten C-Atome an die jeweils H-3a, H-3 und H-4 gebunden sind, werden direkt durch quartäre C-Atome abgesättigt. Um welche C-Atome es sich handelt, kann aus den Kopplungs signalen des HMBC-Spektrums nicht eindeutig bestimmt werden, da sich zu viele Verknüpfungsmöglichkeiten ergeben. Es muß daher versucht werden, das Fragment später schlüssig in das rudimentäre Gesamt molekül einzupassen, was mit den bisher aufgeklärten Partialstrukturen an dieser Stelle noch nicht möglich ist.



Fragment XV: Mit eingezeichneten HMBC-(↔) und H,H-COSY-Kopplungen (→)

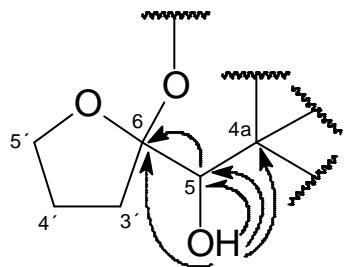
Aus den noch nicht zugeordneten Signalen des H,H-COSY-Spektrums erkennt man ein AB-Spinsystem, das aus einer direkt an ein Sauerstoffatom gebundenen CH₂-Gruppe (C-8) mit geminal koppelnden Protonen besteht und einer CH-Gruppe (C-8a), die direkt an zwei weitere quartäre C-Atome gebunden sein muß. Eines der quartären C-Atome ergibt sich aus dem HMBC-Spektrum zu C-9. Von diesem C-Atom mit Halbketalstruktur koppelt das Proton der Hydroxygruppe mit einer ²J-Kopplung zu C-9 und mit einer ³J-Kopplung zu C-8a. Die HMBC-Kopplungen sind nur bei nicht gegen Deuterium ausgetauschten OH-Protonen sichtbar, z. B. wenn das Spektrum in Deuteroaceton aufgenommen wird. Dann können die Hydroxyprotonen ²J-Kopplungen zu dem direkt an den Sauerstoff gebundenen C-Atom und ³J-Kopplungen zu den direkt benachbarten C-Atomen zeigen.



Fragment XVI: Mit eingezeichneten HMBC-(↔) und H,H-COSY-Kopplungen (—)

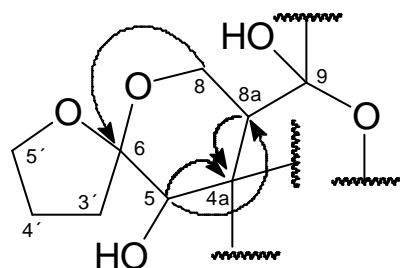
Mit diesem Strukturelement sind alle Spinsysteme des Moleküls vollständig aufgeklärt. Es verbleiben nur drei singuläre Protonenresonanzen, deren Konnektivitäten im Molekül noch nicht zugeordnet sind. Ein Singulettignal (C-9a–CH₃) gehört zu einer Methylgruppe, die im HMBC-Spektrum Signale zu den Kohlenstoffatomen C-3a, C-9a und C-9 zeigt. Da die Methylgruppe aber an ein quartäres C-Atom gebunden sein muß, kann die CH-Gruppe C-3a als Bindungspartner ausgeschlossen werden. Es verbleiben nur noch C-9 und C-9a als Bindungsstellen für die Methylgruppe.

Das zweite noch nicht zugeordnete Signal ist ein Dublett (H-5), das direkt an das hydroxysubstituierte C-Atom C-5 ($\delta_{C5} = 74.2$ ppm) gebunden ist. Das Proton koppelt mit der OH-Gruppe, entsprechende Kreuzsignale sind im H,H-COSY- und HMBC-Spektrum zu sehen. Das OH-Signal zeigt ³J-Heterokopplungen zu C-6 und C-4a, die demnach beide direkt an C-5 gebunden sind, entsprechende HMBC-Signale von H-5 bestätigen die getroffene Zuordnung. Das **Fragment XVI** kann aufgrund der Kopplungen um diese Konnektivitäten zu **Fragment XVII** erweitert werden.



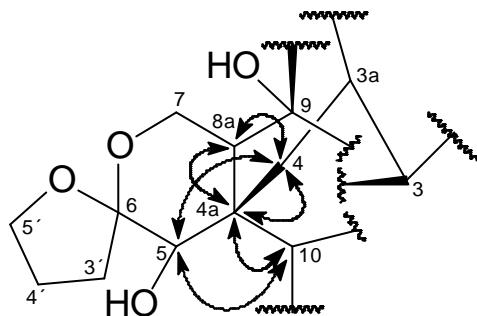
Fragment XVII: Mit eingezeichneten HMBC-(\longleftrightarrow) und H,H-COSY-Kopplungen (\rightarrow)

Die Knüpfung der Etherbrücke über das freie Ketalsauerstoffatom erfolgt mit der CH₂-Gruppe (C-8) des Teilfragmentes **XVI**, da die Methylenprotonen H-8 ein intensives Heterokopplungssignal zu C-6 zeigen. Außerdem müssen C-4a und C-8a miteinander verknüpft sein, da H-5 im HMBC-Spektrum ein intensives Kreuzsignal zu C-8a zeigt. Für die Vervollständigung der Molekülstruktur über das zentrale quartäre C-Atom C-4a sprechen zusätzlich die ²J_{C,H}-Kopplungen der Protonen H-5 und H-8a zu C-4a.



Fragment XVIII: Mit eingezeichneten HMBC-(\longleftrightarrow) und H,H-COSY-Kopplungen (\rightarrow)

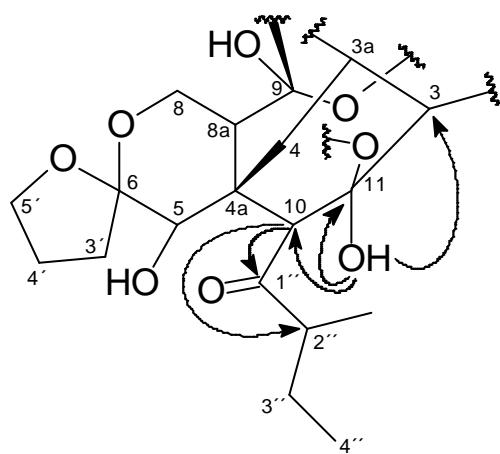
Alle weiteren über das **Fragment XVIII** hinausgehenden gemeinsamen Kopplungen der Protonen H-8a und H-5 müssen ³J-Kopplungen über C-4a sein. Im HMBC-Spektrum sind das die ³J-Kopplungen von H-8a und H-5 zu den C-Atomen C-4 und C-10, die somit beide direkt an C-4a gebunden sind. Ergänzt man die Partialstruktur um diese C-Atome mit ihren entsprechenden Spinsystemen, so ergibt sich folgendes Fragment:



Fragment XIX: Mit eingezeichneten HMBC-(\longleftrightarrow) und H,H-COSY-Kopplungen (\rightarrow)

Bestätigt wird diese Zuordnung durch die Kopplungen der ergänzten Spinsysteme zum bisher identifizierten Molekülgerüst.

Über das C-Atom C-10 läßt sich die Molekülstruktur weiter vervollständigen, denn dieses zeigt als einziges C,H-long-range-Kopplungen zum Carbonylkohlenstoff C-1'' und zum Kohlenstoffatom C-2'', so daß die Seitenkette an das Kohlenstoffatom C-10 gebunden sein muß. Da das Proton H-10 im ^1H -Spektrum ein Singulettignal zeigt, fehlt noch ein weiteres quartäres C-Atom an C-10, das als das zweite C-Atom mit Halbketalstruktur (C-11) identifiziert werden kann. Denn das Hydroxyproton des Halbacetals zeigt ein Kreuzsignal zu den C-Atomen C-10, C-11 und zu dem C-Atom C-3, das direkt an das C-Atom C-11 gebunden ist.



Fragment XX: Mit eingezeichneten HMBC-(\longleftrightarrow) und H,H-COSY-Kopplungen (\rightarrow)

Die bis jetzt noch nicht zugeordneten Atome sind eine Carbonylgruppe, das quartäre sauerstoffsubstituierte Kohlenstoffatom C-9a und die Methylgruppe C-9a-CH₃. Das einzige Kreuzsignal im HMBC-Spektrum, das zum C-Atom der Methylgruppe zeigt, geht vom Proton H-3a aus. Die Protonen der Methylgruppe zeigen Kreuzsignale zum

quartären C-Atom C-9a, zu C-3a und zu C-9, die jeweils mit einem quartären C-Atom verknüpft sein müssen. Demnach ist die einzige widerspruchsfreie Position des Kohlenstoffatoms C-9a diejenige als Ringatom zwischen den C-Atomen C-3a und C-9, mit der Methylgruppe C-9a-CH₃ als Substituenten. Die Verknüpfung der Estercarbonylgruppe erfolgt über das Sauerstoffatom an C-9a, die der beiden halbketalischen C-Atome C-9 und C-11 miteinander über eine Etherbrücke. Die verbleibende Estercarbonylgruppe (C'-2, 173.01 ppm) wird mit der noch letzten freien Position der Molekülstruktur an C-3 zum γ -Lacton verknüpft, dessen Carbonylschwingungsbande sich im IR-Spektrum bei $\tilde{\nu} = 1775 \text{ cm}^{-1}$ zeigt.

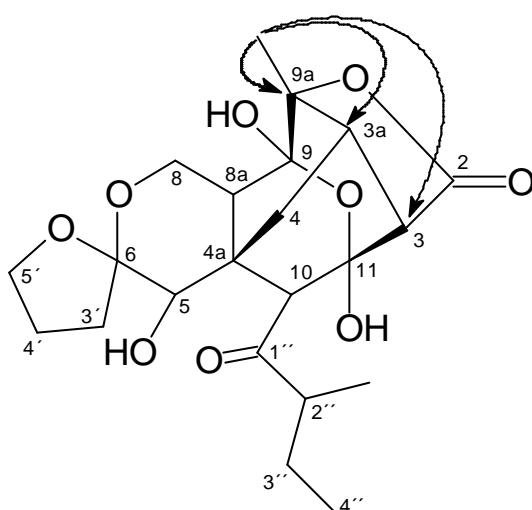
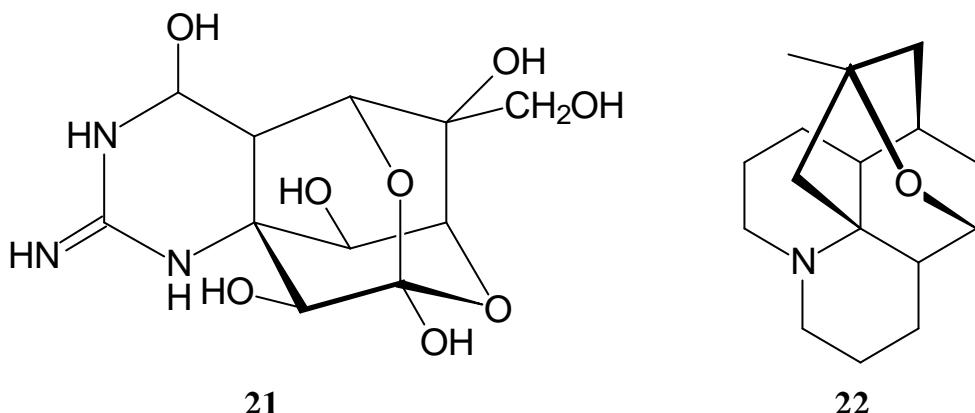


Abb. 26: Der Naturstoff 2072.IV mit eingezeichneten HMBC-Signalen

Eine genauere Analyse der Fernkopplungen des H,H-COSY-Spektrums bestätigt die Molekülstruktur und liefert über die W-Kopplungen Informationen über die relative Konfiguration des Moleküls, die durch das NOESY-Spektrum verifiziert werden.

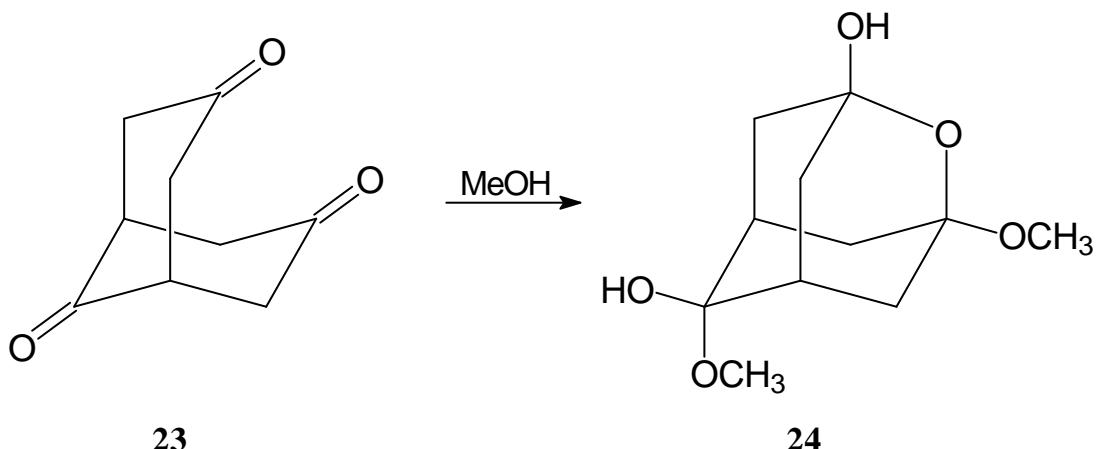
Der Sekundärmetabolit ist bisher literaturunbekannt und enthält einige ungewöhnliche Strukturelemente. Eine Recherche in der Chapman & Hall Naturstoffdatenbank ergab, daß nur ungefähr 2% aller Naturstoffe eine Spiroketalstruktur enthalten. Ebenso ungewöhnlich sind die beiden etherverbrückten Halbketale, die nur 35 Naturstoffe von ca. 120 000 bekannten aufweisen. Das ungewöhnlichste Strukturelement ist jedoch der Adamantangrundkörper mit einem Halbketalsauerstoffringatom. Dieses Oxaadamantanstrukturelement ist bisher bei Pilzmetaboliten völlig unbekannt gewesen. In Naturstoffen kommt ein Oxaadamantangrundkörper nur in dem Alkaloid 5,15-Oxidolycpodan^[36] vor (22), das 1990 aus der Pflanze *Lycopodium annotinum* isoliert wurde und als Dioxaadamantan im Tetrodotoxin^[37], dem Gift des japanischen Kugelfisches *Sphoeroides rubripes*.

**Abb. 27:**

Tetrodotoxin

5,15-Oxidolycpodan

Das synthetische Äquivalent in Form eines Halbketal-ketals ist ebenfalls bekannt, es handelt sich um das von Stetter et al.^[38] aus Bicyclo[3.3.1]nonan-3,7,9-trion synthetisierte 3,6-Dimethoxy-2-oxaadamantan-1,6-diol.



Schema 2: Darstellung von 3,6-Dimethoxy-2-oxaadamantan-1,6-diol aus Bicyclo[3.3.1]nonan-3,7,9-trion

3.6.7 Aufklärung der relativen Konfiguration des Naturstoffes 2072.IV

An dem Oxaadamantangrundkörper ist die relative Konfiguration des Naturstoffes an den Positionen 9a und 3 durch das γ -Lacton vorgegeben und nur an den Positionen 8a und 10 zu bestimmen. Die relative Konfiguration der Seitenkette an dem Stereozentrum 2'' kann nicht durch die NOE-Spektren aufgeklärt werden, da die Seitenkette frei rotieren kann.

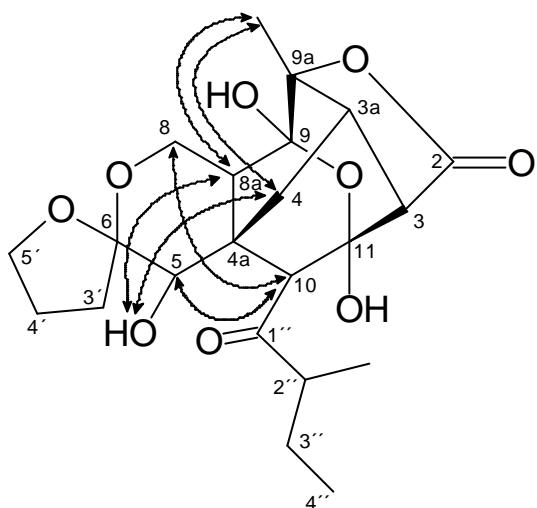


Abb. 28: Der Naturstoff mit eingezeichneten Signalen aus dem NOESY-Spektrum

Das Protonensignal für H-10 zeigt im H,H-COSY-Spektrum ein sehr intensives Kreuzsignal zu dem Protonensignal von H _{β} -4. Dieses Kreuzsignal ist durch eine W-Kopplung zu erklären, die aber so klein ist, dass sie im ¹H-Spektrum nicht zu erkennen ist. Demnach müßte das Proton eine axiale Position einnehmen um die W-Kopplung zu ermöglichen. Den entscheidenden Hinweis für diese Konfiguration liefert das NOESY-Spektrum. Es zeigt einen NOE-Effekt zwischen dem Protonensignal von H-10 und von H _{α} -8, der nur auftreten kann, wenn sich das Proton H-10 in der axialen Position und der Spiroacetal-Heterozyklus relativ zum O-Sechsring des Oxaadamantangrundkörpers in der *cis*-Konfiguration befindet. Zwischen den diastereotopen Protonen H _{α} -8 und H _{β} -8 kann differenziert werden, weil H _{α} -8 *trans*-dialixial und H _{β} -8 äquatorial zum Proton H-8a steht. Danach ergibt sich eine ungefähre Kopplungskonstante aus der Karplus-Conroy-Beziehung^[39] für H _{α} -8 zu H-8a von 11 Hz und für H _{β} -8 zu H-8a von 4.5 Hz. Mit der geminalen Kopplungskonstante von 11.6 Hz spaltet das Signal für das Proton H _{α} -8 zum Pseudotriplett und das Signal für das Proton H _{β} -8 zum Doppeldublett auf, beide Signalmuster treten im ¹H-Spektrum auf. Weitere NOE-

Signale, die diese Konfiguration des Naturstoffes bestätigen, zeigen die Protonen der Methylgruppe H-9a-CH₃ und das Methinproton H-8a zum Proton H_β-4.

Die relative Konfiguration des Protons H-5, kann durch ein schwaches NOE-Signal zu H-10 und durch NOE-Signale des Hydroxyprotons OH-5 zu H_β-4 und H-8a aufgeklärt werden. Es steht demnach äquatorial zu H_β-4.

Die relative Konfiguration des Fünfringspiroacetals ergibt sich durch ein Signal im NOE-Spektrum zwischen den Protonen H-5' des Fünfringspiroacetals und dem Proton H_α-8 des Sechsringsspiroacetals. Interpretiert man das Signal zwischen den Protonen H_α-8 und H-5' als NOE-Signal, ergibt sich für das Gesamt molekül die in **Abbildung 29** dargestellte Konfiguration, dessen Konformation Molekül-mechanisch mit der MM+-Methode optimiert wurde.

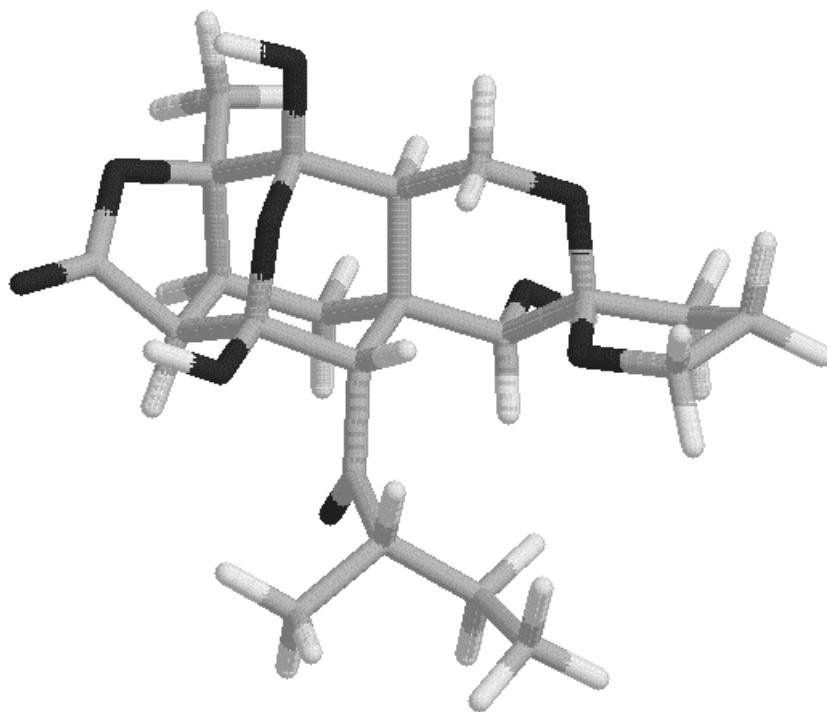


Abb. 29: Räumliche Darstellung der relativen Konfiguration des Naturstoffes **2072.IV** (die Konformation wurde mit dem Programm Hyperchem (MM^+) optimiert, die Sauerstoffatome sind schwarz dargestellt)

3.6.8 Stamm 3042

3.6.9 Pilzbeschreibung

Pilzstamm 3042 ist ein *Fusarium* sp., der aus einer chinesischen Bodenprobe (aus 4000 m Höhe) isoliert wurde.

3.6.10 Isolierung aus dem Stamm 3042

3.6.10.1 Naturstoffe 3042.I–3042.VI

Normalerweise wurden die von den Biologen in Braunschweig angesetzten Pilzkulturen visuell auf ihr Größenwachstum hin kontrolliert. War die Trophophase beendet, wurden die Agarplatten von uns aufgearbeitet. Bei dieser Kultur vom Pilzstamm 3042 wurde aber gezielt versucht, eine Umstellung vom Primärstoffwechsel zum Sekundärstoffwechsel zu erreichen. Da eine Verarmung des Nährstoffangebotes und Veränderung der Umweltbedingungen die Umstellung induzieren, wurde der Pilz auf den Weichagarplatten weiter wachsen gelassen bis die Platten ausgetrocknet und die Pilzkulturen abgestorben waren.

Danach wurden die Kulturen im Warring-Blender mit Ethylacetat homogenisiert und anschließend die mit Rohextrakt angereicherte Ethylacetatphase abfiltriert und bis zur Trockene eingeengt. Im Gegensatz zu den anderen konventionell kultivierten Pilzen konnten nicht wie üblich nur 1–2 g, sondern 8 g Rohextrakt isoliert werden. Der Rohextrakt wurde mit einer Kieselgelsäule und Dichlormethan als Lösungsmittel filtriert, um ihn für die MPLC- und HPLC-Auftrennung an Lobarsäulen vorzubereiten. Durch die sich anschließende chromatographische Auftrennung unter isokratischen Bedingungen mit Dichlormethan/Methanol (97:3) als Laufmittel, konnten sechs Naturstoffe (**3042.I–3042.VI**) isoliert werden, die nach Aufreinigung durch PSC als Reinstoffe erhalten wurden.

3.6.11 Strukturaufklärung der Naturstoffe

3.6.11.1 Naturstoff 3042.I

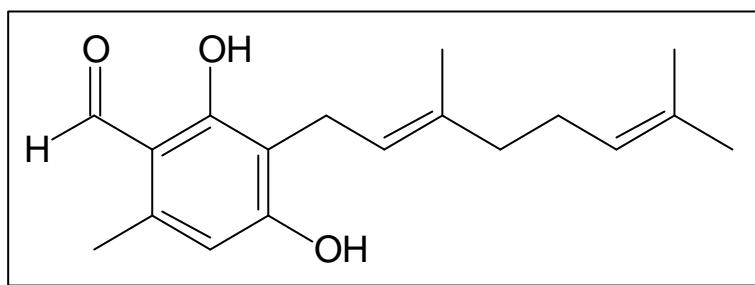


Abb. 30: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Sekundärmetabolit 3042.I (25): Colletorin B

Die Verbindung **3042.I** fällt in Form eines weißen Feststoffes mit einem Schmelzpunkt von 124–126 °C an. Sie ist optisch inaktiv und fällt aus einer konzentrierten Dichlormethanlösung in Form schwach gelber Prismen an. Sie besitzt einen R_f -Wert von 0.9 (Methylenchlorid) und ist auf dem DC im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm gut zu detektieren. Beim Besprühen des Chromatogramms mit einer 2,4-Diphenylhydrazinlösung färbt er orange an, so daß mindestens eine Carbonylfunktion im Naturstoff vorliegen muß. Das IR-Spektrum zeigt auch eine stark ausgeprägte Carbonylbande bei $\tilde{\nu} = 1640 \text{ cm}^{-1}$ und bestätigt das Vorliegen einer Carbonylfunktion. Eine IR-Bande bei $\tilde{\nu} = 3441 \text{ cm}^{-1}$ weist auf eine chelatisierte Hydroxyfunktion hin, im Fingerprintbereich wird ein Aromat angezeigt.

Das Massenspektrum zeigt einen Molpeak $[M^+]$ bei $m/z = 288$, der in Kombination mit den NMR-Daten auf eine Summenformel von $C_{18}H_{24}O_3$ schließen läßt.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum erkennt man drei Singulettsignale (12.75 ppm, 10.07 ppm, 6.20 ppm), die jeweils einem Proton entsprechen. Bei 12.75 ppm liegt ein Signal für eine chelatisierte Hydroxyfunktion vor, bei 10.07 ein Signal für ein Aldehyd- und bei 6.2 ppm ein Signal für ein Aromatenproton. Weitere Signale sind das Signal für ein Methinproton (5.04 ppm, $J = 7.2 \text{ Hz}$), das zum Triplet aufspaltet und das Signal für eine Methylengruppe (3.39 ppm, $J = 6.9 \text{ Hz}$), das zum Dublett aufgespalten ist. Im Aliphatenbereich zeigt das Spektrum Signale für drei Methylgruppen als Singulets und ein Multiplettsignal, das zwei Methylengruppen entspricht. Auffällig ist die Tieffeldverschiebung der Resonanzen des Aliphatenbereichs. Bei einem Deuteriumtausch mit CD_3OD verschwindet das Signal für das chelatisierte Hydroxyproton. Im

¹³C- und den DEPT-Spektren sind im Bereich zwischen 200 und 100 ppm Signale für einen tertiärer Aldehydkohlenstoff, drei weitere tertiäre sp²-hybridisierte Signale, sowie sieben quartäre sp²-hybridisierte Kohlenstoffatomsignale zu erkennen. Zwei der Signale für die quartären C-Atome weisen eine für sauerstoffsubstituierte aromatische C-Atome typische Tieffeldverschiebung (163.6 ppm, 162.7 ppm) auf. Die Gerüstschwingungen im IR-Spektrum weisen schon auf ein Aromatenfragment hin, das wegen fehlender aromatischer Protonen im ¹H-Spektrum mindestens fünffach substituiert sein muß. Im Aliphatenbereich des Spektrums befinden sich Signale für drei sekundäre und vier primäre Kohlenstoffatome, die alle auffallend tieffeldverschoben sind. Bei diesem Naturstoff trat die besondere Schwierigkeit auf, daß den ¹H-NMR-Spektren die für eine Gerüstanalyse relevanten Informationen der vicinalen Kopplungen fehlten. Die Substituenten treten alle durch schwache Fernkopplungen über den aromatischen Kern hinweg miteinander in Wechselwirkung. Die zur Gerüstanalyse des Naturstoffmoleküls notwendigen Informationen liefert allein das HMBC-Spektrum über die C,H-Fernkopplungen (ⁿJ_{C,H} mit n = 2–3), nach denen sich die Struktur des Naturstoffs wie folgt ergibt:

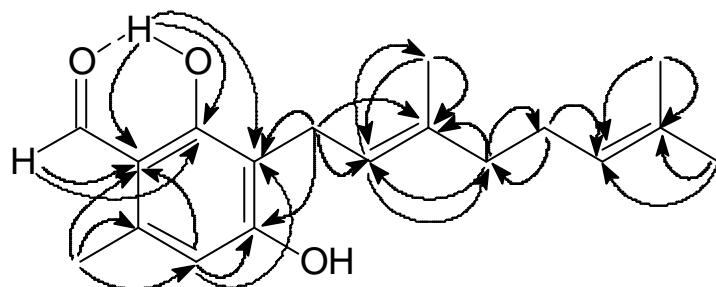
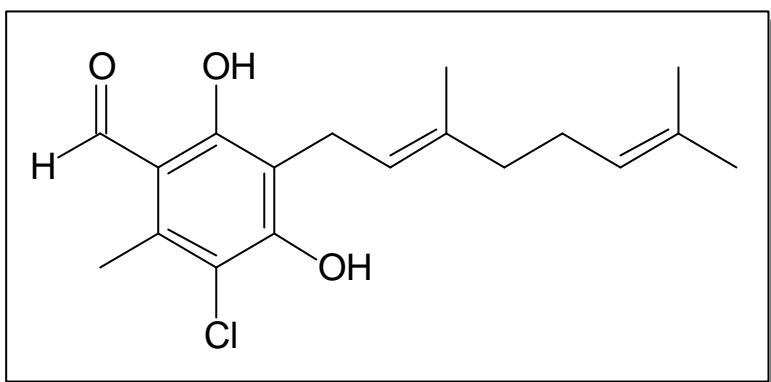


Abb. 31: Colletorin B, mit allen sichtbaren HMBC-Kopplungen

Die Literaturrecherche ergab, daß es sich bei dem Naturstoff um **Colletorin B**, einen erstmals 1974 aus *Cephalosporium diospyri* isolierten Sekundärmetaboliten handelt^[40].

3.6.11.2 Naturstoff 3042.II



26

Abb. 32: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Naturstoff 3042.II (26): **Colletochlorin B**

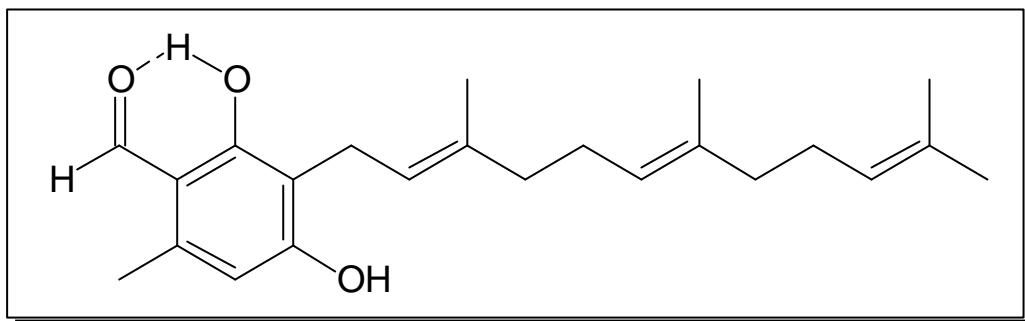
Der Naturstoff **3042.II** liegt in Form weißer amorpher Kristalle vor und hat in Methylenechlorid einen R_f -Wert von 0.6. Auf dem DC ist er im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm gut zu detektieren, mit dem Ansprühreagenz auf Aldehyde und Ketone reagiert er positiv. Er ist optisch inaktiv und hat einen Schmelzpunkt von 90 °C. Im IR-Spektrum sind wie beim Naturstoff **3042.I** eine ausgeprägte Carbonylbande zu erkennen und eine Bande, die auf eine chelatisierte OH-Funktion hinweist. Besonders auffällig ist das Massenspektrum, es zeigt einen Molpeak $[M^+]$ bei $m/z = 322$ und einen intensiven $[M^+ + 2]$ Peak, dessen Auftreten charakteristisch für monohalogensierte Chlorverbindungen ist.

Das 1H -Spektrum ist bis auf das fehlende Singulettignal für das aromatische Proton identisch mit dem des Naturstoffes **3042.I**. Das gleiche gilt für das ^{13}C -Spektrum im Aliphatenbereich mit drei sekundären und vier primären Signalen. Im Bereich zwischen 200–100 ppm fehlt das tertiäre C-Signal des Aromaten, stattdessen ist dort ein quartäres sp^2 -hybridisiertes C-Signal vorhanden.

Aus den Informationen des Massenspektrums und der NMR-Spektren kann auf eine Summenformel $C_{18}H_{23}ClO_3$ geschlossen werden. Die Vermutung liegt nahe, daß es sich um ein halogeniertes Derivat des **Colletorins B** handelt, bei dem anstelle des aromatischen Protons in 5-Position ein Chloratom zu finden ist. Die Auswertung der COSY- und HMBC-Spektren sowie einer Datenbankrecherche bestätigen diese Annahme. Es handelt sich um den Naturstoff **Colletochlorin B**, der erstmals 1974 aus *Colletotrichum nicotianae* isoliert^[41] und 1994 synthetisiert^[42] wurde. Bei den Naturstoffen **3042.I** und **3042.II** handelt es sich wahrscheinlich um zwei Folgeprodukte des

gleichen Biosyntheseweges. Sie sind hier erstmals aus einem Pilz isoliert worden und nicht wie bisher aus zwei verschiedenen Pilzarten.

3.6.11.3 Naturstoff 3042.III



27

Abb. 33: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Naturstoff 3042.III (27): LL-Z 1272b

Bei der dritten aus dem Rohextrakt isolierten Verbindung handelt es sich um ein gelbliches Öl mit einem R_f -Wert von 0.7 (Laufmittel: Methylchlorid). Die Substanz ist optisch inaktiv, läßt sich im UV-Licht bei 254 nm detektieren und färbt mit dem Phenylhydrazin-Sprühreagens gelb an, so daß im Naturstoff eine Carbonylfunktion vorliegen muß.

Im Massenspektrum erkennt man einen Molpeak bei $[M^+] = 342$, Isotopenpeaks sind nicht vorhanden.

Das ^1H -Spektrum zeigt die charakteristischen Protonensignale für ein chelatisiertes Hydroxyproton sowie ein Aldehydproton. Weitere Signale sind ein Aromatenprotonensignal sowie im Bereich olefinischer Protonen ein Singulettproton und zwei sich überlagernde Singulettprotonen. Im Aliphatenbereich zeigt das Spektrum drei CH_3 -Signale, die als Singulets vorliegen, außerdem ein Singulett, das aus zwei sich überlagernden Methylgruppen besteht. Zusätzlich sind noch zwei Multipletts zu erkennen, dessen Signalintensität vier Protonen entspricht und eine Methylengruppe, die zum Dublett aufspaltet.

Das ^{13}C -Spektrum zeigt im Bereich zwischen 200 ppm und 100 ppm ein Signal für einen Aldehydkohlenstoff, Signale für zwei tieffeldverschobene hydroxysubstituierte quartäre aromatische C-Atome sowie sechs weitere Signale für quartäre sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome. Im Aliphatenbereich kann mit Hilfe des DEPT-135-Experimentes zwischen vier Signalen für sekundäre und fünf Signalen für primäre C-Atome differenziert werden.

Eine genauere Analyse der Signale des ^{13}C -Spektrums zeigt, daß der Naturstoff das gleiche aromatische Fragment wie **Colletorin B** enthält. Der Unterschied zum **Colletorin B** besteht in der Seitenkette. Hier weist der Naturstoff **3042.III** zusätzlich eine Methylgruppe, eine Methylengruppe sowie zwei olefinische C-Atome und ein olefinisches Proton auf. Die Analyse des HMBC-Spektrums ermöglicht die genaue Zuordnung dieser Atome, so daß die Struktur des Naturstoffes wie folgt aufgeklärt werden kann:

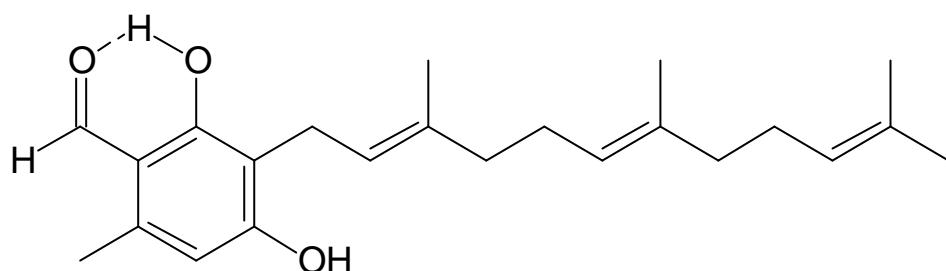


Abb. 34: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Naturstoff **3042.III** (27)

Der Naturstoff ist als Antibiotikum **LL-Z 1272b**^[43] literaturbekannt und wurde erstmals 1969 isoliert und seine Struktur durch Röntgenstrukturanalyse charakterisiert^[44]. Gegenüber dem literaturbekannten **Colletorin B**, ist die Seitenkette um eine Isopreneinheit verlängert. Ebenso wie beim **Colletorin B**, ist auch das in 5-Position mit Chlor substituierte Derivat als Antibiotikum Ilicicolin A bekannt^[45].

3.6.11.4 Naturstoff **3042.IV**

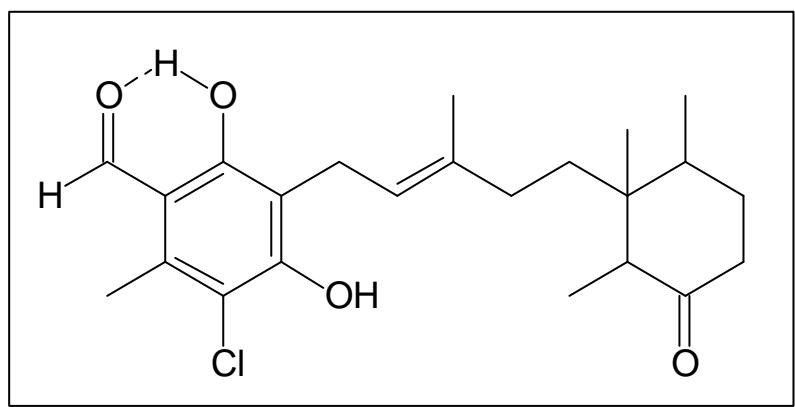


Abb. 35: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Sekundärmetabolit **3042.IV** (28): **4,5-Dihydroascocochlorin**

Der Naturstoff konnte in geringen Mengen isoliert werden und liegt als Öl vor. Das Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak bei $[M^+] = 406$, sowie den für die Halogene Brom oder Chlor typischen $[M^+ + 2]$ Peak.

Anhand der Intensität des $[M^+ + 2]$ Peaks und der chemischen Verschiebungswerte aus den 1-D- und den Konnektivitäten aus den 2-D-NMR-Spektren, kann der Metabolit als ein weiteres Colletochlorinderivat identifiziert werden. Bis auf die terminale, mit zwei Methylgruppen substituierte Doppelbindung enthält er das Colletochlorin B-Grundgerüst.

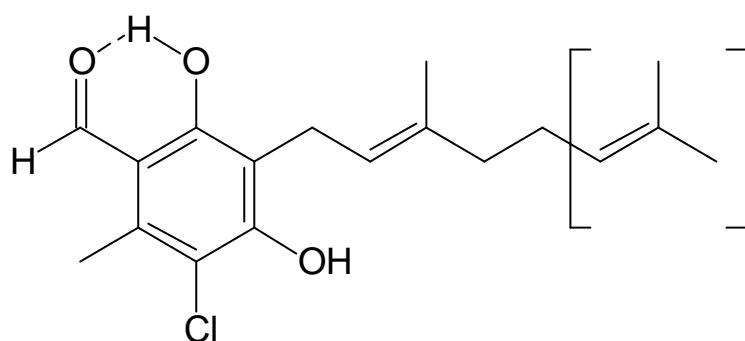
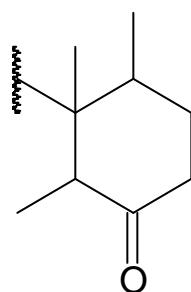


Abb. 36: Colletochlorin Grundkörper

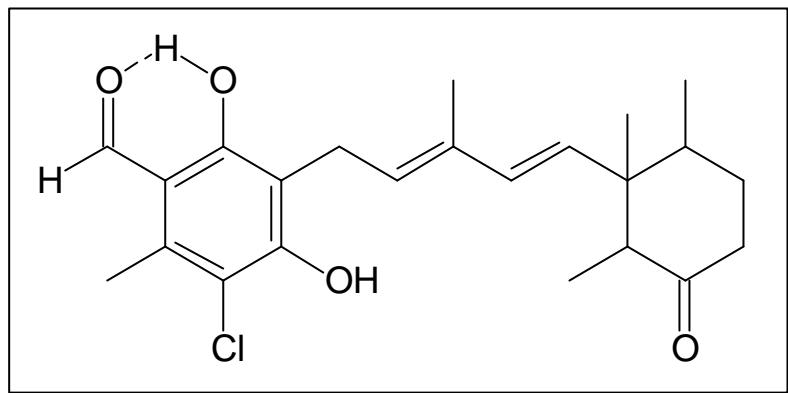
Durch Kombination der NMR- und massenspektrometrischen Daten erhält man als Summenformel für den Naturstoff $C_{23}H_{31}ClO_4$. Das fehlende Fragment hat demnach eine Teilsummenformel von $C_9H_{15}O$. Es besteht aus einer Carbonylgruppe, zwei Methylen- und zwei Methingruppen, drei Methylgruppen sowie einem quartären Kohlenstoffatom. Anhand der H,H-COSY- und HMBC-Spektren, kann das zweite Fragment als Cyclohexanongrundkörper identifiziert und um die Partialstruktur des **Colletorin B** zum Naturstoffmolekül ergänzt werden.



Fragment XXI:

Die Literaturrecherche ergab, daß es sich bei dem Naturstoff um **4,5-Dihydroascochlorin** handelt. Er wurde bisher aus *Nectria coccinea* und *Chephalosporium diospyri* isoliert und als Antibiotikum **LL-Z 1272dm** bezeichnet^[45].

3.6.11.5 Naturstoff 3042.V



29

Abb. 37: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Sekundärmetabolit **3042.V (29): Ascochlorin**

Der in großer Menge isolierte Naturstoff kristallisiert in Form kleiner Nadeln und kann anhand der NMR-Spektren den Ascochlorinen zugeordnet werden. Im Vergleich zu **4,5-Dihydroascochlorin** sind jedoch im ¹H-NMR-Spektrum zwei zusätzliche Signale für olefinische Protonen (6.0 ppm, 7.0 ppm) sowie im ¹³C-NMR-Spektrum Signale für die diese Protonen tragenden tertiären C-Atome vorhanden. Dafür fehlen im Protomenspektrum zwei Methylengruppen und die C-Resonanzen dieser Gruppen. Dem entspricht das Massenspektrum mit einem Molpeak [M⁺] von 404, dem charakteristischen [M⁺ + 2]-Peak und einer daraus abgeleiteten Summenformel von C₂₃H₂₉ClO₄. Die Auswertung des HMBC-Spektrums und die Literaturrecherche ergeben, daß es sich bei dem isolierten Naturstoff um **Ascochlorin** handelt^[45].

Der Metabolit wurde 1969 zusammen mit 4,5-Dihydroascochlorin isoliert. Er ist antibiotisch und antiviral wirksam, die LD₅₀ Dosis für Mäuse liegt bei 20 mg/kg^[45].

3.6.11.6 Naturstoff 3042.VI

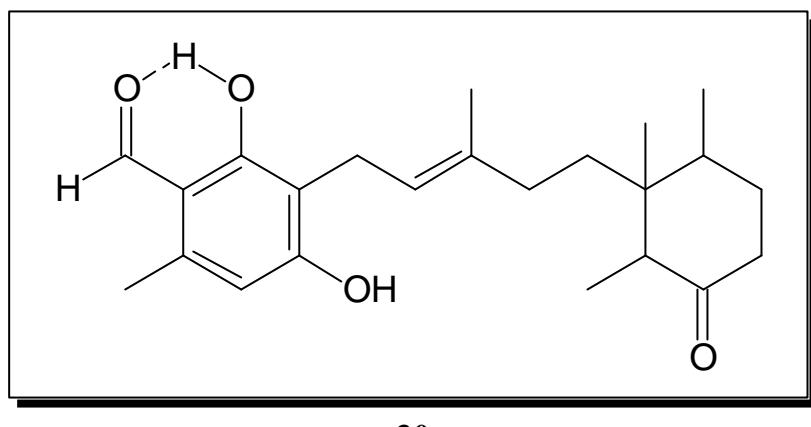


Abb. 38: Aus Pilzstamm 3042 isolierter Sekundärmetabolit **3042.VI (30): 4,5-Dihydrodechloroascochlorin**

Von dem Naturstoff wurden 17 mg in Form weißer Kristalle isoliert. Er färbt mit dem Phenylhydrazinsprühreagenz orange an und hat in Dichlormethan einen R_f -Wert von 0.5.

Die Informationen aus dem EI-Massenspektrum als auch aus dem IR-Spektrum legen die Struktur eines weiteren Ascochlorinderivates nahe. Jedoch fehlen im Massenspektrum die sonst für Halogene typischen Isotopenmuster, so daß es sich hier um ein nicht halogeniertes Derivat handelt. Ein Vergleich mit den NMR-Spektren der bisher isolierten Ascochlorine zeigt im ^1H -NMR-Spektrum die typischen Aufspaltungsmuster und eine zusätzliche Protonenresonanz im aromatischen Verschiebungsbereich. Im ^{13}C -NMR-Spektrum ist im Alphatenbereich das gleiche und im Aromatenbereich das typische Signalmuster für das **4,5-Dihydroascochlorin** zu erkennen, bis auf das quartäre Cl-substituierte C-Atom, an dessen Stelle ein tertiäres aromatisches C-Atom getreten ist. Die Analyse des HMBC-Spektrums ergänzt und bestätigt die Vermutung, daß es sich bei dem Naturstoff um **4,5-Dihydrodechloroascochlorin** handelt, der aus *Nectria coccinea* und *Fusarium* sp. isoliert wurde^[45].

3.6.12 Biosynthese der Colletorine und Ascochlorine

Erstmals konnten aus einem einzigen Pilz die Naturstoffe aus der Klasse der Colletorine und Ascochlorine isoliert werden und damit der Nachweis erbracht werden, daß

beide Substanzklassen auf einem gemeinsamen Biosyntheseweg produziert werden. Dieser Biosyntheseweg wurde für die Ascochlorine schon aufgeklärt. Eine strukturelle Verwandtschaft besteht zu den Ubichinonen, deren Seitenkette ebenfalls eine isoprenoide Struktur hat. Es handelt sich dabei um pChinone, die in den Zellen des Pflanzen und Tierreichs zu finden sind. Aufgrund ihrer Redoxfunktion in der Atmungskette sind sie als Hilfssubstrat für den Wasserstoffaustausch von Bedeutung.

3.6.13 Biologische Aktivität

Die Naturstoffe **3042.I–3042.VI** befinden sich zur Zeit im pharmakologischen Screening der BASF, aber wurden schon im biologischen Screening untersucht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Agardiffusionstest ($c = 1 \text{ [mg/ml]}$)							
Substanz	Hemmhofradien [mm]						
	Chl.	E. C.	B. m.	Ust.	Eur.	M. m.	Fus.
3042.I	4	0	5	6	0	0	6
3042.II	4	0	1	5	0	0	5
3042.III	0	0	1	4	0	0	5
3042.IV	0	0	10	1	0	0	0
3042.V	0	0	0	2	0	0	0
3042.VI	0	0	0	3	15	0	0

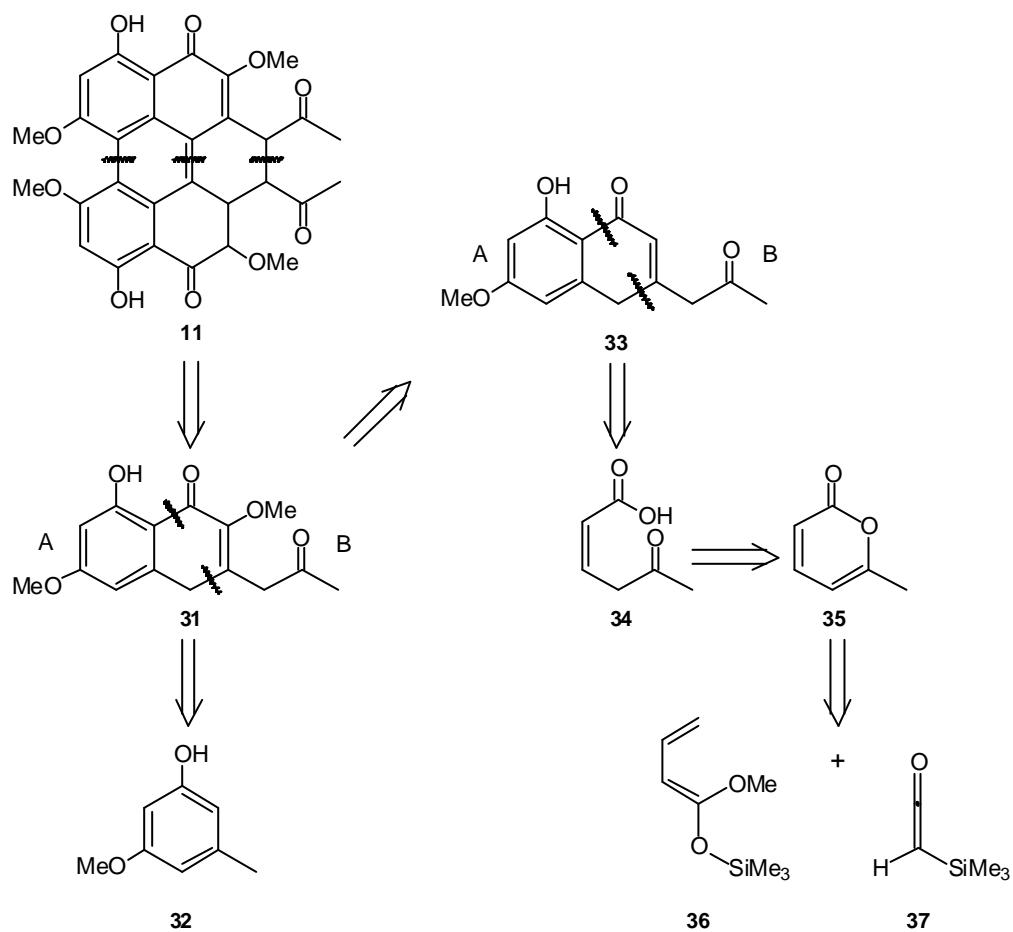
Tabelle 13: Biologische Aktivität der Naturstoffe **3042.I–3042.VI**

Alle Naturstoffe zeigen biologische Aktivitäten, von denen besonders die außerordentlich gute antifungische Wirksamkeit von **4,5-Dihydrodechloroaschochlorin** gegen den Ascomyceten *Eurotium repens* hervorzuheben ist.

4 HAUPTTEIL II

4.1 Retrosynthetische Überlegungen zur Partialsynthese

Aus einem nicht bestimmten Endophyt in *Vaccinium vitis idea* (Stamm 2049), wurde der Sekundärmetabolit **Elsinochrom A (11)** isoliert, der zur Klasse der natürlichen Perylenchinone gehört. Die ebenfalls zu dieser Klasse gehörenden und strukturell eng mit den Elsinochromen verwandten Hypocrelline zeigen sehr gute therapeutische antitumorale und antivirale (speziell gegen HIV-Viren) Wirkung und befinden sich wegen ihrer breiten Einsatzmöglichkeit zur Zeit im Zentrum der aktuellen Forschung. Da von den Elsinochromen bisher noch keine Totalsynthese existierte, sollte im Rahmen dieser Arbeit eine konvergente Partialsynthese ausgearbeitet werden, um einen Zugang zu dem physiologisch und chemisch interessanten Naturstoff zu ermöglichen. Ausgangsmolekül für diese Überlegungen war das Monomer des Elsinochromgrundkörpers, der sich nach bekannten Methoden dimerisieren lässt^{[46],[47]}.

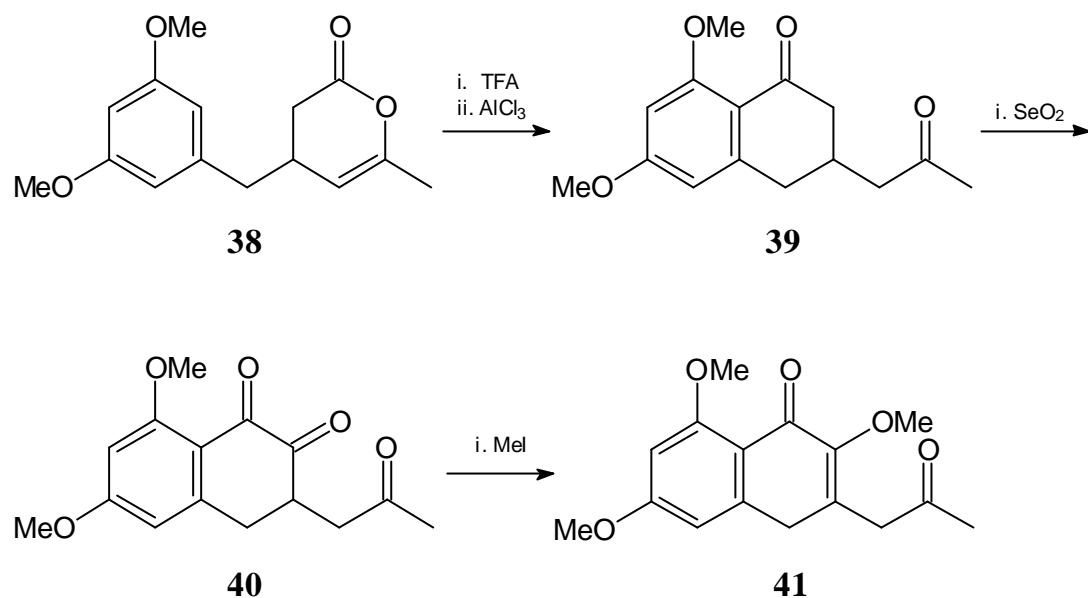


Schema 3: Retrosynthese des Naturstoffes **11**

Aus dem Retrosyntheseschema **3** geht hervor, daß sich der Grundkörper der Monomerenheit **31** formal in zwei Fragmente (**31 A**, **31 B**) zerlegen läßt. Das Fragment **31 A** soll über das Schlüsselintermediat **32** zugänglich gemacht werden. Durch formale Entfernung des Methyletherfunktion aus dem Teilfragment **31 B** gelangt man zum Fragment **33**. Über den formalen Bindungsbruch zwischen der C-C-Bindung C-1–C-8a sowie C-4–C-4a erhält man das Teilfragment **33 B**. Durch weitere Rücktransformation gelangt man von **33 B** über die Verbindung **34** zur Dihydropyranonverbindung **35**, die das zweite Schlüsselintermediat repräsentiert. Für die Verknüpfung der Schlüsselintermediate **32** und **35** wurde die Michael-Addition gewählt. **28** kann dabei als intermediär gebildetes Magnesiumcuprat als Nukleophil in einer 1,4-Addition reagieren. Für die Synthese des Magnesiumcuprates sollte als Edukt 3,5-Dimethoxybenzoësäure eingesetzt werden. Die 3,5-Dimethoxybenzoësäure wird durch Reduktion in den Alkohol und sich anschließende Bromierung und Umsetzung mit Magnesium in ein Grignardreagenz (**47**) überführt. Das Grignardreagenz kann man dann durch Zusatz katalytischer Mengen eines Kupfer(I)-Halogenides in das gewünschte Magnesiumcuprat überführen.

Der Michaelakzeptor (**35**) soll in einer zweiten Reaktionssequenz über die [4 + 2]-Cycloadditionsreaktion des Trimethylsilylketens **37** mit dem Vinylketenacetal **36** gebildet werden (**Schema 5**).

Die nach den oben angeführten Reaktionssequenzen erhaltenen Schlüsselintermediate **32** und **35** sollen dann weiter nach der in **Schema 7** abgebildeten Synthese über die Michael-Addition zum Addukt **38** umgesetzt werden. Im Anschluß an die Michael-Addition kann dann die Spaltung des Lactonrings von Verbindung **38**, mit darauf folgender Friedel-Crafts-Acylierung zu **39**, erfolgen. **39** würde schließlich durch Oxydation mit Selendioxid und Methylierung des Produktes **40** in das Monomer des Elsinochromgrundkörpers überführt werden.

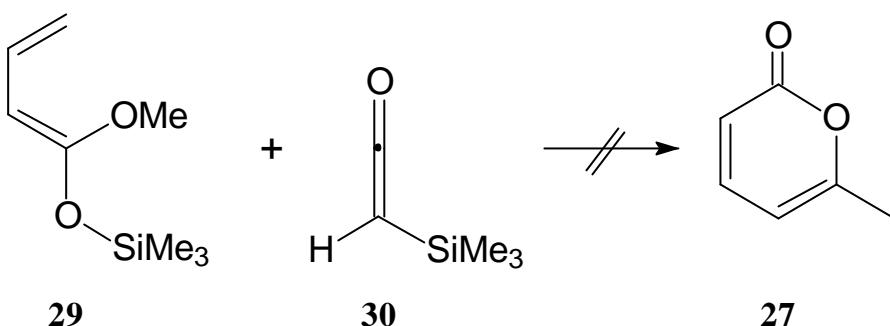


Schema 4: Syntheseplan zur Monomereneinheit des **Elsionchroms A**

4.2 Durchführung

Die theoretischen und praktischen Arbeiten über die hier angewendeten [4 + 2]-Cycloadditionsreaktionen wurden von T. Aoyama^[48] durchgeführt. Durch Umsetzung von Trimethylsilylketen als Heterodienophil mit variierenden Ketenacetalen als 1,3-Dienkomponente synthetisierte er unterschiedliche 2-Pyranonderivate.

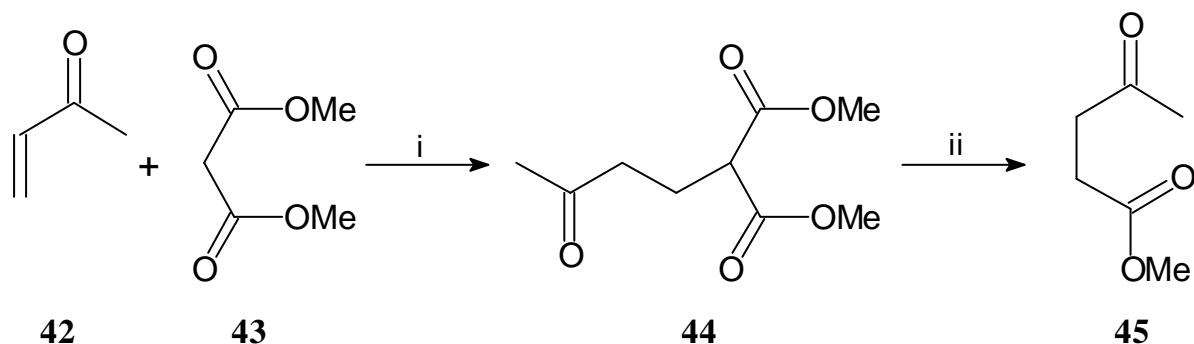
Für die Darstellung des 2-Methylpyranons (**35**) wurde 1,3-Dimethoxy-1-trimethylsiloxy-1,3-butadien (**36**) eingesetzt, das aus Crotonsäuremethylester^[49] zugänglich ist. Das Trimethylsilylketen wurde nach einer Vorschrift von M.A. Pericas^[50,51] in vier Stufen erhalten. Wurde das Ketenacetal (**36**) direkt aus dem Syntheseansatz ohne Aufreinigung mit dem Silylketen (**37**) umgesetzt, so erfolgte eine spontane Polymerisation des Ketens zu einem unlöslichen Polymer. Die Polymerisation wurde durch Verunreinigungen in dem Reaktionsgemisch des Pyranons initiiert. Deshalb wurde das Ketenacetal durch Destillation aufgereinigt und sofort eingesetzt. Dadurch wurde die Polymerisation von **37** unterbunden, aber eine Umsetzung zu **35** wurde trotzdem nicht beobachtet (**Schema 5**).

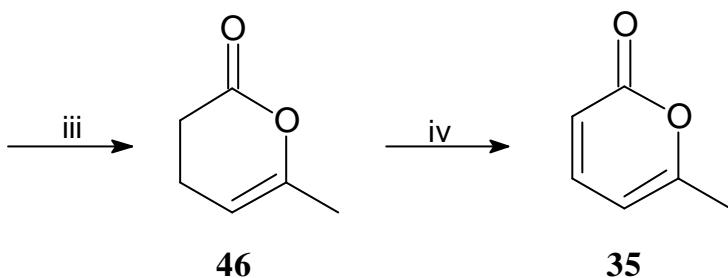


Schema 5: Umsetzung des Ketenacetals (**29**) mit dem Silylketen (**30**) in Benzol, 48 h Rückfluß

Die Berechnung der Elektronendichteverteilung des eingesetzten 1-Methoxy-1-trimethylsiloxy-1,3-butadiens (**36**) mit AM1 zeigte eine andere Elektronendichteverteilung im Vergleich zu den von Aoyama eingesetzten Systemen, die als Modellsystem genutzt wurden und auch in guten Ausbeuten reproduzierbar reagierten. Daraus wäre die mögliche Erklärung abzuleiten, daß das eingesetzte System wegen der anderen Elektronendichteverteilung nicht reagierte.

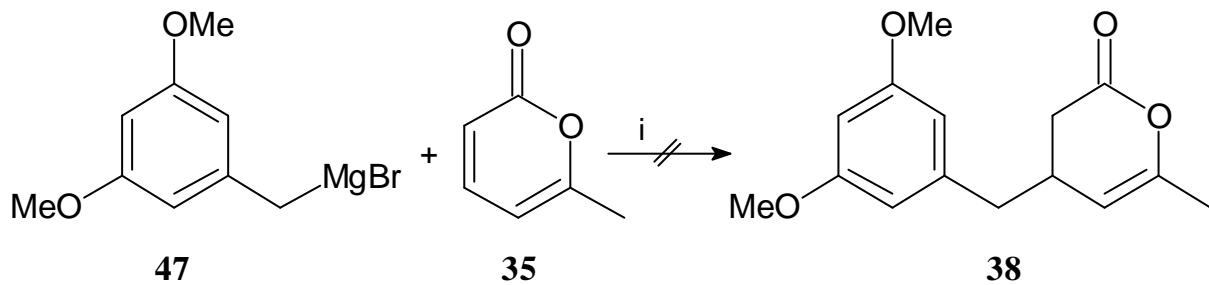
Da das Pyranon über diesen Syntheseweg nicht darstellbar war, wurde ein alternativer Syntheseweg gewählt (**Schema 6**). Dazu wurde Methylvinylketon (**42**) in einer Cu-katalysierten Michael-Addition mit Malonsäuredimethylester (**43**) umgesetzt. Anschließende Decarboxylierung des Michaeladduktes **44** durch Erhitzen in feuchtem DMSO/NaCl ergab den Ketoester **45**, der durch Verseifung und anschließende Lactonisierung des Hexensäure-enolates das Lacton **46** lieferte. Dieses konnte in guten Ausbeuten (71%) durch Dehydrierung mit Pd/C in p-Cymen als hochsiedendem Lösemittel zu **35** dehydriert werden.





Schema 6: i = CH_2Cl_2 , $\text{Ni}(\text{acac})_2$, 24 h Rückfluß; ii = 5% wäßrige Na_2CO_3 -Lsg., 4h 60°; iii = 2 eq. NaCl , DMSO, 0,5% H_2O , 8 h Rückfluß; iv = Essigsäureanhydrid, 0,1% Acetylchlorid, p-Toluolsulfonsäure, 4 h Rückfluß; p-Cymen_{abs.}, Pd/C 10%, 0,5 h Rückfluß.

In der sich anschließenden Reaktionssequenz wurde 3,5-Dimethoxybensoesäure mit LiAlH_4 in Dimethylether zum Alkohol reduziert und nachfolgend in CCl_4 mit PBr_3 zum 3,5-Dimethoxybenzylbromid bromiert. Der nächste Syntheseschritt bestand in der Michaeladdition der aus dem 3,5-Dimethoxybenzylbromid und Magnesium hergestellten Grignardverbindung (**47**) an **35** zu **38** (**Schema 7**).



Schema 7: a) i = THF; b) i = THF, CuBr ; c) i = THF, $\text{CuBr}^*\text{Me}_2\text{S}$, -5°C; d) i = Ether; e) i = Ether, CuBr ; f) i = Ether, $\text{CuBr}^*\text{Me}_2\text{S}$, - 0°C; g) i = Ether, $\text{CuBr}^*\text{Me}_2\text{S}$, RT; h) i = THF, CuI ; i) i = THF, $\text{CuI}^*\text{Me}_2\text{S}$, -5°C; j) i = Ether, CuI ; k) i = Ether, $\text{CuI}^*\text{Me}_2\text{S}$, - 0°C; l) i = Ether, $\text{CuI}^*\text{Me}_2\text{S}$, RT

Jedoch erfolgte hier keine Umsetzung, weder mit der metallorganischen Grignardverbindung, noch mit der Magnesiumcupratverbindung. Auch nach Variation der Reaktionstemperatur (- 5 °C, 0 °C, RT) und des Katalysators (CuBr , CuI , $\text{CuBr}^*\text{Me}_2\text{S}$, $\text{CuI}^*\text{Me}_2\text{S}$) sowie des Lösemittels (THF, Ether) konnte keine Umsetzung beobachtet werden und die Synthesestrategie wurde verworfen. Ähnliche Systeme, an denen die 1,4-Addition beobachtet werden konnte, waren in 4-Position zusätzlich durch einen weiteren Elektronenakzeptor (-S-R, -COOR) aktiviert, so das **35** in der 4-Position wahrscheinlich nicht elektrophil genug war, um mit den gewählten Reagenzien zu reagieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die Resistenzbildung vieler Unkräuter, Insekten oder Krankheitserreger gegen Pesticide oder Pharmaka macht es notwendig immer neue biologisch aktive Leitstrukturen zu finden, die als Pestizid oder Pharmazeutika eingesetzt werden können. Deshalb wurden im Rahmen des BMBF/BASF-Projektes "Naturstoffisolierung" fünf verschiedene Mikromycetenstämme als potentielle Produzenten von Sekundärmetaboliten mit großer molekularer Diversität untersucht. Dabei waren auch Metabolite von Interesse, die keine oder nur geringe biologische Aktivität zeigten.

Aus dem Pilzstamm **1947** wurden die Steroide Ergosta-4,7,22-trien-3-on (**9**) und Ergosterolperoxid (**10**) aus der Klasse der α -Ergostane isoliert und identifiziert. Die Sekundärmetabolite sind literaturbekannt und wurden 1926 (**10**), bzw. 1976 (**9**) isoliert. Im biologischen und pharmakologischen Test waren beide Steroide unauffällig.

Der Pilzstamm **2049**, ein nicht bestimmter Endophyt aus *Vaccinium vitis idea*, lieferte ebenfalls zwei Sekundärmetabolite. Der erste Metabolit war das schon aus Pilzstamm **1947** isolierte Ergosterolperoxid, bei dem zweiten Metaboliten handelte es sich um Elsinochrom A (**11**). **11** gehört zur Klasse der natürlichen Perylenchinone, von denen z. B. die Hypocrelline sehr gute antitumorale und antivirale (speziell gegen HIV-Viren) Wirkung zeigen. Der Naturstoff **11** zeigte im pharmakologischen Screening eine befriedigende Antitumorwirkung und ragte im biologischen Screening heraus. Hier zeigte er exzellente antifungische Eigenschaften im Test mit *Ustilago violacea*.

Von den beiden aus dem Pilzstamm **1727** isolierten Naturstoffen war das Ramulosin (**12**), schon literaturbekannt. Es wurde 1964 aus *Pestalotia ramulosa* isoliert. Der Co-Metabolit **1727.II** (**15**) war ein bisher literaturunbekanntes Ramulosinderivat. Beide Metabolite waren im biologischen und pharmakologischen Screening als mäßig aktiv einzustufen.

Die Metabolite **2072.I–2072.IV** (**16, 17, 18, 20**) wurden aus Pilzstamm **2072** isoliert, einem Endophyten aus *Mentha arvensis*. Von diesen Naturstoffen war bisher nur **18** literaturbekannt, er wurde 1981 erstmals aus dem Mikromycet *Phialophara lagerbergii* isoliert. Die drei weiteren Naturstoffe wurden bisher in der Literatur nicht beschrieben und konnten auch keiner bekannten Substanzklasse zugeordnet werden. Von ihnen war der Metabolit **2072.IV** (**20**) strukturell und chemisch besonders auffällig. Er zeigte drei sehr ungewöhnliche Strukturelemente, von denen eines, ein Oxaadamantangrundgerüst, bei Pilzmetaboliten bisher völlig unbekannt war. Der isolierte Naturstoff repräsentiert somit den ersten Vertreter dieser für Pilzmetabolite neuartigen Verbindungsklasse. Wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge konnte die biologische Aktivität von **20** nicht untersucht werden.

Aus dem Pilzstamm **3042** wurden sechs Antibiotika (**25–30**) aus den Substanzklassen der Colletorine und Ascochlorine isoliert. Hierdurch konnte erstmals wahrscheinlich

gemacht werden, daß die Vertreter der Colletorine und Ascochlorine biosynthetisch nicht zwei verschiedenen, sondern einer einzigen Substanzklasse angehören. Von den biologischen Eigenschaften ist die sehr gute bakterizide Wirkung des Naturstoffes 4,5-Dihydroascochlorin (**28**) im Test gegen *Bacillus megaterium* und herausragende fungizide Wirkung von 4,5-Dihydrodechloroascochlorin (**30**) gegen *Eurotium repens* erwähnenswert.

Durch die Versuche zur partialsynthetischen Darstellung der Monomereneinheit des Elsinochrom A (**11**) konnte gezeigt werden, daß der gewählte Syntheseweg, über eine Michael-Addition an einen in 4-Position nicht zusätzlich aktiviertes 6-Methylpyran-2-on, nicht durchführbar ist. Zu überprüfen bleibt die Möglichkeit, ob der Schlüsselschritt der Michael-Addition an einen in 4-Position aktivierte Pyrangrundgerüst, analog zu den in der Literatur beschriebenen Umsetzungen, realisierbar ist.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Allgemeine Methoden und Meßverfahren

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einer Gallenkamp Apparatur gemessen und sind unkorrigiert angegeben.

Elementaranalysen wurden von Herrn Karrasch mit einem Perkin-Elmer Elementaranalysator 240 bestimmt.

Die optische Drehung wurde an einem Polarimeter der Firma Perkin-Elmer, Modell 241, bei der D-Linie des Natriums und den jeweils angegebenen Temperaturen und Lösemitteln bestimmt.

UV-Spektren wurden mit einem Shimazu UV-2101 PC UV-VIS-Spektralphotometer gemessen. Die Wellenlängen sind in [nm] angegeben und die Logarithmen der mola ren Extinktionskoeffizienten in Klammern.

Die Massenspektren wurden von Herrn Dr. Kuck und Mitarbeitern aus Bielefeld an einem Fison MD 800 aufgenommen. Die relativen Intensitäten, bezogen auf den Basispeak sind hinter den Massen in Klammern angegeben.

Die IR-Spektren wurden mit einem Nicolet 510 P FT-IR Spektrometer aufgenommen. Die Probenmatrix wurde in Klammern angegeben, die Absorptionsbanden in Wellenzahlen.

Gaschromatographische Untersuchungen wurden auf einem Hewlett-Packard Gerät, Modell 5890 Serie II durchgeführt. Dabei wurde eine 25 m Kapillarsäule OV-1, Stickstoff als Trägergas und als Detektor ein FID verwendet.

Soweit nicht anders angegeben wurden die NMR-Spektren auf einem Bruker AMX-600 Spektrometer aufgenommen. ($^1\text{H-NMR}$: 600 MHz, $^{13}\text{C-NMR}$: 100 MHz). Die chemische Verschiebung δ , wurde relativ zum verwendeten Lösungsmittel angegeben. Die Signalmultiplizitäten der ^1H -Spektren wurden wie nachfolgend bezeichnet: s (Singulett), ps (Pseudosingulett), d (Dublett), t (Triplet), pt (Pseudotriplet), q (Quartett), m (Multiplett). Die Multiplizitäten der Kohlenstoffatome wurden den DEPT-Spektren entnommen. Für die Bezeichnung der Kohlenstoffmultiplizitäten wurden nachstehende Abkürzungen verwendet: q (quartäres Kohlenstoffatom), t (tertiäres Kohlenstoffatom), s (sekundäres Kohlenstoffatom).

Die NMR-Spektren wurden von Frau A. Cimburek und Herrn Prof. Dr. H. Marsmann an der Universität Paderborn sowie von Dr. V. Wray (COSY-, HMBC-, NOESY-Experimente) an der GBF Braunschweig gemessen.

Analytische und präparative Trennungen wurden an Kieselgel und Sephadex-LH-20 als stationäre Phase durchgeführt. Für die Säulen- und Flashchromatographie wurde Kieselgel 60 (230-400 mesh) der Firma Merck, Darmstadt verwendet. Für die präpa-

rative Schichtchromatographie (PSC) wurden Dünnsschichtplatten der Firma Schleicher & Schüll (20x20 cm), mit einer Schichtdicke von 0.5 und 1.0 mm eingesetzt. Platten mit einer Schichtdicke von 2 mm wurden im Labor hergestellt. Die Plattenpräparation erfolgte nach der Arbeitsvorschrift für die Beschichtung der Chromatotronplatten. Das Beschichtungsmaterial war Kieselgel 60 PF 254 plus Gips, der Firma Merck.

Für die Radialchromatographie wurde mit dem Chromatotron Modell 8924, der Firma Harrison Research in Palo Alto, der Pumpe Modell RH 00 (Fluid Metering Inc. Oyster Bay), einer Carmac UV-Lampe (254/366 nm) und dem Kieselgel 60 PF 254 plus Gips, der Firma Merck gearbeitet. Die Chromatotronplatten wurden gründlich gereinigt und von Fett befreit. Anschließend wurde eine auf 0 °C abgekühlte Suspension des Kieselgels PF 250 mit Gips aufgetragen. Die Platte wurde anschließend ca. 1h zum Setzen der Gipsschicht stehengelassen und anschließend ca. 18 h bei 60 °C im Trockenschrank ausgehärtet. Daran anschließend wurde die Platte auf die gewünschte Höhe geschliffen und unter Argonatmosphäre mit den angegebenen Elutionsmitteln zur Trennung eingesetzt.

LPLC und HPLC wurde mit Merck Lobar-Fertigsäulen der Größe B (310-25) LiChroprep Si 60 (40-63 µm) und einer Hibar-Fertigsäule (30-4) Lichrosorb Si 60 (5 µm) durchgeführt. Für die Gelchromatographie wurde eine préparative Säule mit Sephadex-LH 20 Gel gepackt. Für alle chromatographischen Verfahren wurden folgende Geräte der Firma Merck/Hitachi eingesetzt: Pumpe (L 6000), UV-Detektor (655 A), Steuereinheit (LC-Organizer 885-5931), Integrator (D-2000). Aufgabeventil war ein 6-Wege-Ventil der Firma Rheodyne.

Zur DC-Detektion beim chemischen Screening wurden folgende Sprühreagenzien verwendet^[52]:

- Cer-Molybdän/Schwefelsäure (Universalsprühreagenz): Ein Gemisch aus 60 ml konz. H₂SO₄ und 940 ml dest. H₂O wird mit 25 g Molybdatophosphorsäure und 10 g Cer(IV)sulfat versetzt. Nach Erhitzen bilden sich sofort blaue Flecken.
- Bromkresolgrün für Säuren: Eine 0.04 proz. Lösung in Isopropanol wird mit 2 N NaOH auf pH 7 eingestellt. Säuren bilden sofort gelbe Flecken auf blauem Grund.
- 2,4-Dinitrophenylhydrazin für Aldehyde und Ketone: Eine Lösung von 1 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1000 ml Ethanol wird mit 10 ml HCl versetzt. Nach dem Ansprühen bilden sich unter Erwärmen gelbe bis orange Flecken.
- Anisaldehydsprühreagenz für Zucker, Steroide und Terpenoide: Konzentrierte Schwefelsäure (8 ml) wird mit 0.5 ml Anisaldehyd versetzt und unter Eiskühlung und Rühren zu einem Gemisch aus 85 ml MeOH und 10 ml Eisessig gegeben.

Nach Ansprühen und Erhitzen bilden sich violette, blaue, grüne oder graue Flecken.

6.2 Durchführung der Aktivitätstests

Von den Mikrobiologen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Aust wurden die aktivsten Pilzstämme nach einem biologischen Vorscreening in Submerskultur angezogen. Entweder wurden sie dazu auf einem Biomalzweichagar- oder Malzextraktweichagar in Fernbachkolben kultiviert und bei definierten Temperaturen in Klimakammern inkubiert.

Die biologische Aktivität der isolierten Naturstoffe wurde durch ein Biodiagramm und den Agardiffusionstest geprüft. Im Biodiagramm-Verfahren werden von den Rohextrakten DC's angefertigt und mit einer Suspension von Bioindikatororganismen in 6 proz. Biomalzlösung besprüht. Die Testorganismen sind der gegenüber Fungiziden empfindliche Pilz *Cladosporium* und die Alge *Chlorella Fusca*. Nach dem Ansprühen wird für zwei bis drei Tage in einer Feuchtkammer inkubiert. Aktive Sekundärmetabolite sind daran zu erkennen, daß sich Wachstumshemmhöfe auf dem DC gebildet haben, die bei Bakterien und Pilzen nach zwei bis drei Tagen und bei *Chlorella* nach 4–7 Tagen ausgewertet werden.

Mit dem Agardiffusionstest wird auf die gesamte Palette biozider Wirksamkeit geprüft. Hierzu wurden in der Mikrobiologie in Braunschweig Filterplättchen mit dem zu untersuchenden Naturstoff getränkt und auf Agarplatten gelegt, die mit folgenden Testorganismen besprüht wurden:

Chl.	<i>Chlorella fusca</i>	Chlorophyt
E.c.	<i>Escherichia coli</i>	Gram-negatives Bakterium
B.m.	<i>Bacillus megaterium</i>	Gram-positives Bakterium
U.v.	<i>Ustilago violacea</i>	Ustomycet
E.r.	<i>Eurotium repens</i>	Ascomycet
M.m.	<i>Mycotypha microspora</i>	Zygomycet
F.o.	<i>Fusarium oxysporum</i>	Deuteromycet

Auch hier zeigte sich biozide Wirksamkeit in der Ausbildung von Wachstumshemmhöfen.

Zusätzlich wurden für einige Substanzen Keimlingstests durchgeführt. Dabei wurden 6.75 ml steriles Wasser und 0.75 ml der zu testenden Lösung in einer Petrischale mit Filterpapier bedeckt. Auf das Filterpapier wurden dann 14 Samenkörner von *Lepidium*

sativum (Kresse) zum Keimen gelegt. Das Längenwachstum sowie der Allgemeinzustand wird mit einer Kontrollgruppe verglichen und ausgewertet.

6.3 Experimenteller Teil der Naturstoffisolierung

6.3.1 Pilzstamm 1948

6.3.1.1 Isolierung

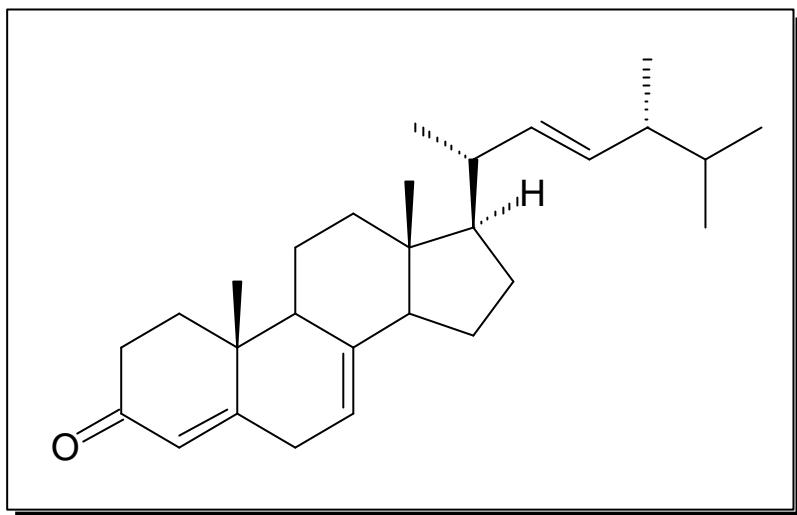
Der Pilz wurde 87 Tage lang bei Raumtemperatur und einem pH-Wert von 6 in einem Biomalzmedium inkubiert.

Um die unterschiedlich polaren Bestandteile des Filtrates zu extrahieren, wurde mehrmals mit Lösemitteln unterschiedlicher Polarität (Petrolether, Ethylacetat) extrahiert und die Extrakte jeweils getrennt im Vakuum bis zur Trockene eingeengt.

Nach mehrmaliger Säulenchromatographie mit verschiedenen Stufengradienten (PE/Ether 1:1, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1%, 2%, 3%, 5%, 8%), wurden zwei mittelpolare Fraktion erhalten. Aus der ersten Fraktion wurde durch präparative Schichtchromatographie (PSC) mit *n*-Hexan/AcOEt 20% (Zweifachentwicklung) und anschließende Aufreinigung durch Säulenchromatographie mit Sephadex LH 20 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3%) 1 mg des Naturstoffes **1948.I** isoliert. Aus der zweiten mittelpolaren Fraktion wurde durch PSC mit *n*-Hexan/AcOEt 35% 2 mg des Naturstoffes **1948.II** isoliert.

6.3.2 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften

6.3.2.1 Ergosta-4,7,22-trien-3-on (1948.I)



Summenformel: $C_{28}H_{42}O$. –

Schmelzpunkt: 129 °C (Lit.: 131 °C)^[11]. –

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -18.1^\circ$ ($c = 1.05 \text{ mg/ml}$, CH_2Cl_2) (Lit.: -16.3° (CH_2Cl_2))^[11]. –

R_f -Wert: 0.6 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3%). –

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 1720 \text{ cm}^{-1}$ (Carbonyl). –

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 6.50$ (d, $J_{7,6} = 8.6 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 6.23 (d, $J_{6,7} = 8.4 \text{ Hz}$, 1 H, 6-H), 5.23 (dd, $J_{20,22} = 8.0 \text{ Hz}$, $J_{22,23} = 15.0 \text{ Hz}$, 1 H, 22-H), 5.15 (dd, $J_{23,24} = 8.3 \text{ Hz}$, $J_{23,22} = 15.2 \text{ Hz}$, 1 H, 23-H), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 0.99 (d, $J_{20,21} = 6.6 \text{ Hz}$, 3 H, 21-H), 0.91 (d, $J_{24,28} = 6.7 \text{ Hz}$, 3 H, 28-H), 0.88 (s, 3 H, 19-H), 0.83 (d, $J_{25,27} = 6.7 \text{ Hz}$, 3 H, 27-H), 0.82 (s, 3 H, 18-H), 0.81 (d, $J_{25,26} = 6.5 \text{ Hz}$, 3 H, 26-H). –

$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 199.4$ (s, C-3), 169.01 (s, C-5), 139.6 (s, C-8), 135.5 (d, C-22), 132.3 (d, C-23), 122.7 (d, C-4), 115.6 (d, C-7), 55.9 (d, C-17), 55.0 (d, C-14), 45.9 (d, C-9), 43.5 (s, C-13), 42.9 (d, C-24), 40.1 (d, C-20), 39.1 (t, C-12), 37.0 (t, C-4), 38.1 (s, C-10), 34.2 (t, C-1), 33.2 (d, C-25), 32.2 (t, C-2) 28.1 (t, C-16), 22.9 (t, C-

15), 22.05 (q, C-21), 21.3 (t, C-11), 20.0 (q, C-27), 19.9 (q, C-26), 19.7 (q, C-19), 17.6 (q, C-28), 12.2 (q, C-18). –

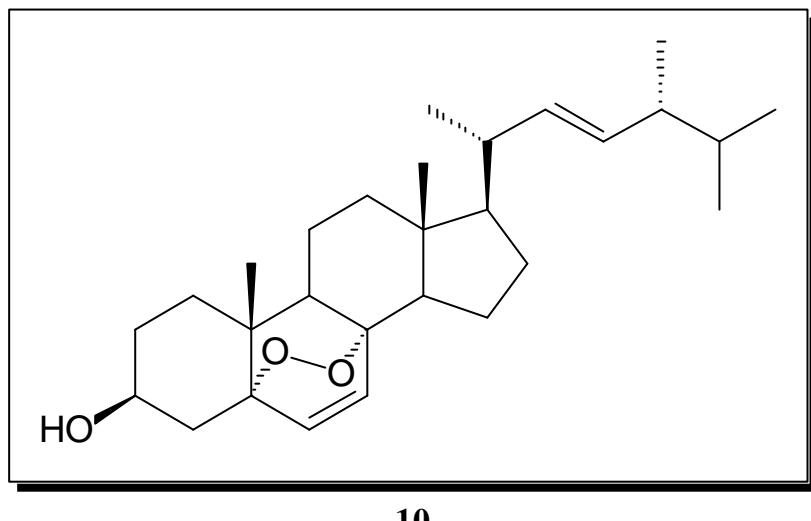
MS (EI / 230 °C): m/z (%) = 394 (100) [M^+], 350 (19), 296 (16), 267 (57). –

HRMS ($C_{28}H_{42}O$):

Ber.: 394.3235

Gef.: 394.3205 \pm 3 ppm

6.3.2.2 5,8-Epidioxy-5a,8a-ergosta-6,22E-dien-3b-ol (1948.II)



Summenformel: $C_{28}H_{44}O_3$. –

Schmelzpunkt: 179 °C (Lit.: 181.5 – 183 °C)^[15]. –

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -25^\circ$ ($c = 1.05$ mg/ml, CH_2Cl_2) (Lit.: -16.3° ($CHCl_3$))^[15]. –

R_f -Wert: 0.3 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 3%). –

1H -NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 6.50$ (d, $J_{7,6} = 8.6$ Hz, 1 H, 7-H), 6.23 (d, $J_{6,7} = 8.4$ Hz, 1 H, 6-H), 5.23 (dd, $J_{20,22} = 8.0$ Hz, $J_{22,23} = 15.0$ Hz, 1 H, 22-H), 5.15 (dd, $J_{23,24} = 8.3$ Hz, $J_{23,22} = 15.2$ Hz, 1 H, 23-H), 3.96 (m, 1 H, 3-H), 0.99 (d, $J_{20,21} = 6.6$ Hz, 3 H, 21-H), 0.91 (d, $J_{24,28} = 6.7$ Hz, 3 H, 28-H), 0.88 (s, 3 H, 19-H), 0.83 (d, $J_{25,27} = 6.7$ Hz, 3 H, 27-H), 0.82 (s, 3 H, 18-H), 0.81 (d, $J_{25,26} = 6.5$ Hz, 3 H, 26-H). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ = 135.4 (d, C-6), 135.2 (d, C-22), 132.3 (d, C-23), 130.7 (d, C-7), 82.2 (s, C-5), 79.5 (s, C-8), 66.5 (d, C-3), 56.2 (d, C-17), 51.7 (d, C-14), 51.1 (d, C-9), 44.6 (s, C-13), 42.8 (d, C-24), 39.7 (d, C-20), 39.3 (t, C-12), 37.0 (t, C-4), 36.9 (s, C-10), 34.7 (t, C-1), 33.1 (d, C-25), 30.1 (t, C-2) 28.7 (t, C-16), 23.4 (t, C-15), 20.9 (q, C-21), 20.7 (t, C-11), 20.0 (q, C-27), 19.7 (q, C-26), 18.2 (q, C-19), 17.6 (q, C-28), 12.9 (q, C-18). –

MS (EI / 230 °C): m/z (%) = 428 (20) [M^+], 410 (30), 396 (100), 363 (40). –

HRMS ($C_{28}H_{44}O_3$): Ber.: 428.329
Gef.: 428.36105 \pm 8 ppm

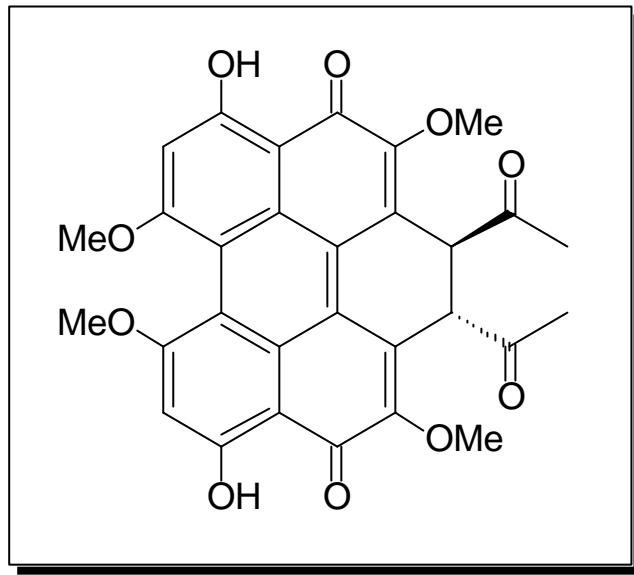
6.3.3 Pilzstamm 2049

6.3.3.1 Isolierung

Das Rohextrakt wurde durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten von 50% Petrolether (30-50)/50 % Dichlormethan über reines Dichlormethan bis zu Dichlormethan/Methanol 10 % (in 2% Schritten) aufgetrennt. Aus den Vorfraktionen konnte durch erneute Trennung mit dem Chromatotron und einem quarternärem Lösemittelgemisch aus Methylenchlorid/*n*-Hexan/Aceton/Methanol (35 : 35 : 25 : 5) 8 mg des Naturstoffes (**2049.I**) isoliert werden.

6.3.4 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften

6.3.4.1 1,2-Diacetyl-5,10-dihydroxy-3,7,8,12-tetramethoxy-1,2-dihydrobenzo[ghi]-perylene-4,11-dion (**2049.I**)



11

Summenformel: C₃₀H₂₄O₁₀. –

Schmelzpunkt: 224 °C (Lit.: 235 °C)^[20]. –

R_f-Wert: 0.3 (CH₂Cl₂/n-Hexan/Aceton/MeOH, 35:35:25:5). –

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ = 16.12 (s, 2 H, 10-H, 8-OH), 6.60 (s, 2 H, 9-H, 6-H), 5.19 (s, 2 H, 1-H, 2-H), 4.42 (s, 6 H, 12-H, 3-H), 4.08 (s, 6 H, 8-H, 7-H), 2.02 (s, 6 H, 15-H, 16-H). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ = 204.9 (s, C-13, C-16), 179.9 (s, C-11, C-4), 172.0 (s, C-19, C-18), 167.5 (d, C-12, 3), 150.1 (s, C-8, C-7), 130.3 (t, C-20, C-17), 122.8 (t, C-10, C-5), 121.6 (t, C-2a, C-12a), 118.7 (t, C-10a, 4a), 107.8 (q, C-8a, C-7a), 102.5 (q, C-6, C-9), 61.2 (q, C-23, C-24), 56.5 (q, C-21, C-22), 48.7 (d, C-1, C-2), 28.1 (q, C-14, C-15). –

HRMS (C₃₀H₂₄O₁₀):

Ber.: 544.1369

Gef.: 544.1344 ± 4 ppm

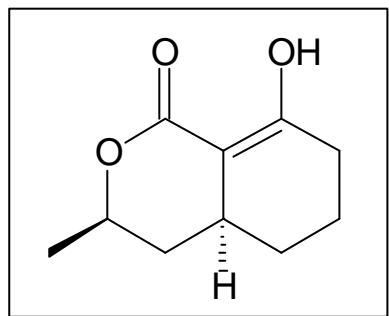
6.3.5 Stamm 1727

6.3.5.1 Isolierung

Nach mehrmaliger säulen- und plattenchromatographischer Trennung (1. Stufensäule, LM: *n*-Hexan/Aceton 5%, 15%, 35%; 2. Chromatotron, 2 mm, LM: Methylenchlorid/Methanol 0%, 3%, 5%, 15%; 3. SC (3x) 10 x 10 x 2, LM Methylenchlorid/Methanol 1%) wurde eine apolare kristalline Substanz (**1727.I**) und ein apolares Öl (**1727.II**) erhalten.

6.3.6 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften

6.3.6.1 3,4,4a,5,6,7-Hexahydro-8-hydroxy-3-methyl-1H-2-benzopyran-1-on (**1727.I**)



12

Summenformel: C₁₀H₁₄O₃. –

Schmelzpunkt: 116 °C (Lit.: 120 – 121 °C)^[26]. –

Drehwert: [α]_D²⁰ = + 13 ° (c = 3.65 mg/ml, CH₂Cl₂) (Lit.: + 18.0 ° (EtOH))^[27]. –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3523 cm⁻¹ (OH), 1742 (Carbonyl). –

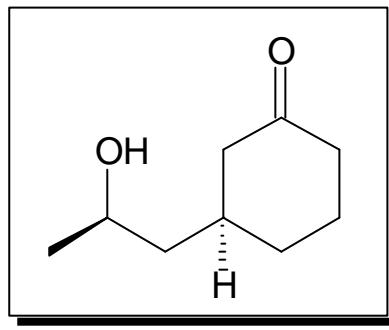
¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ = 13.23 (s, 1 H, 8-OH), 4.45 (m, 1 H, 3-H), 2.52 (t, J_{6,7} = 9.2 Hz, 2 H, 7-H_α), 2.42 (m, 1 H, 7-H_β), 2.42 (m, 1 H, 4a-H), 1.95 (m, 1 H, 4-H), 1.72 (m, 1 H, 6-H), 1.35 (d, J_{3,10} = 6.3 Hz, 3 H, 10-H), 1.24 (m, 1 H, 6-H_α), 1.72 (m, 1 H, 6-H_β). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ = 174.5 (s, C-8), 171.6 (s, C-1), 96.6 (s, C-8a), 76.3 (d, C-3), 37.2 (d, C-4a), 32.7 (t, C-4), 29.3 (t, C-7), 28.8 (t, C-5), 21.5 (t, C-6), 20.7 (q, C-9). –

MS (EI): m/z (%) = 182 (90) [M⁺], 154 (52), 123 (100). –

HRMS (C₁₀H₁₄O₃): Ber.: 182.0942
Gef.: 181.99205 ± 3 ppm

6.3.6.2 3-(2-Hydroxypropyl)-cyclohexan-1-on (**I727.II**)



15

Summenformel: C₉H₁₆O₂. –

Drehwert: [α]_D²⁰ = + 9.3 ° (c = 0.93 mg/ml, CH₂Cl₂). –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3512 cm⁻¹ (OH), 1701 (Carbonyl). –

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ = 3.96-3.89 (m, 1 H, 2'-H), 2.47-1.89 (m, 6 H, 2-H, 6-H, 1'-H), 1.56-1.16 (m, 7 H, 3-H, 4-H, 5-H, 3'-H), 1.21 (d, J_{2',3'} = 6.1 Hz, 3 H, 3'-H). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ = 211.4 (s, C-1), 65.2 (d, C-2'), 48.3 (t, C-2), 45.7 (t, C-6), 41.2 (t, C-4), 35.6 (d, C-3), 30.7 (t, C-1'), 24.9 (t, C-5), 24.1 (q, C-3'). –

MS (EI): m/z (%) = 156 (3) [M⁺], 38 [M⁺ - H₂O] (18), 123 (100). –

HRMS (C₁₀H₁₄O₃): Ber.: 182.0001
Gef.: 181.99205 ± 2 ppm

6.3.7 Stamm 2072

6.3.7.1 Isolierung

Die Kulturbrühe wurde mit einem Mixer homogenisiert und viermal mit Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und anschließend filtriert. Nach dem Einengen der getrockneten organischen Phase am Rotationsverdampfer wurden 1200 mg Rohextrakt erhalten.

Die präparative Auftrennung erfolgte durch Flashchromatographie an Kieselgel mit Petrolether (30–50)/Diethylether (2:1) und Petrolether/Diethylether (1:1) in 5 Hauptfraktionen (2072 a bis e). Die Hauptfraktionen wurden weiter durch Flashchromatographie, präparative Dickschichtchromatographie und HPLC aufgetrennt.

Metabolit **2072.I** wurde aus der ersten unpolarsten Fraktion (2072 a) isoliert, indem mit dem Eluenten Methylenchlorid/Methanol (94:2) ein präparatives Dickschichtchromatogramm aufgenommen wurde. Nach Mehrfachentwicklung wurde der Fraktionsbereich mit einem R_f -Wert von 0.5 bis 0.6 von der Platte separiert. Diese Kieselgelfraktionen wurden dreimal mit 4 ml eines Gemisches aus Methylenchlorid/Ether/Methanol (60:33:7) eluiert. Die Lösung wurde anschließend im Vakuum bis zur Trockene eingeengt und lieferte sechs Milligramm einer ölichen Substanz (**2072.I**).

Der Metabolit **2072.II** wurde aus der mittelpolaren Fraktion 2072.c isoliert, indem diese durch SC (30 cm x 2 cm, Si 60) mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (0–15%) als Elutionsmittel, in drei Unterfraktionen aufgetrennt wurde. In der zweiten Fraktion war eine Komponente stark angereichert, die durch nochmalige SC (10 cm x 20 cm, Si 60) mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5% weiter angereichert wurde. Durch mehrfache PSC (20 cm x 20 cm, 0.1 cm) mit *n*-Hexan/Aceton 30% wurde diese Hauptkomponente isoliert und durch SC (10 cm x 0.5 cm, Sephadex LH 20) mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5% so aufgereinigt, daß 6 mg des weißen Naturstoffes aus CH_2Cl_2 auskristallisierten.

Der Metabolit **2072.III** wurde aus der ersten Unterfraktion des Metaboliten **2072.II** isoliert, indem die Fraktion durch dreimalige PSC mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3%, aufgetrennt wurde. Anschließende Aufreinigung durch SC (10 cm x 0.5 cm, Sephadex LH 20) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 5% ergab 2 mg des kristallinen Naturstoffes.

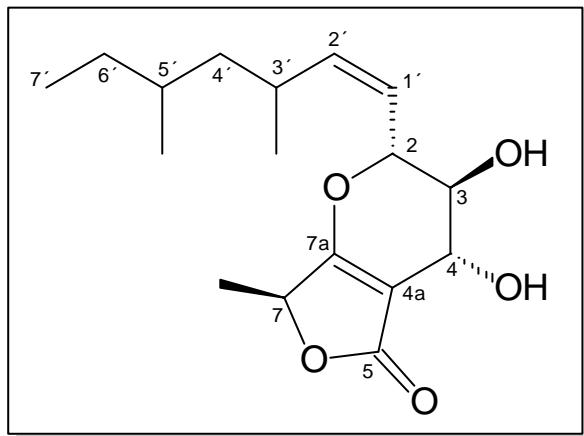
Der Metabolit **2072.IV** wurde aus der polarsten Vorfraktion 2072.e isoliert. Durch Auftrennung der Fraktion mittels Chromatotron (Si 60, 4 mm, CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1%, 4%, 8%) wurden drei Unterfraktionen erhalten. Die polarste Unterfraktion wurde durch SC mit einem Stufengradienten (*n*-Hexan/Aceton 20%, 35%, 50%) aufgetrennt. Dadurch wurde eine Fraktion erhalten, deren Hauptkomponente der Naturstoff war.

Durch PSC (1 mm, CH₂Cl₂/MeOH 3%) mit Mehrfachentwicklung, wurde der Naturstoff als Hauptkomponente isoliert. Eine weitere Aufreinigung des Naturstoffes erfolgte durch SC (10 cm x 0.5 cm, Sephadex LH 20) CH₂Cl₂/MeOH 5%, dabei wurden von den eingesetzten 8 mg des Natursstoffes, ein großer Teil irreversibel auf der Säule absorbiert und nur 2 mg des Metaboliten von der Säule eluiert.

Die Polarität der Naturstoffe nahm in der Reihenfolge der Numerierung der Naturstoffe zu. **2072.I** war der unpolarste (löslich in CH₂Cl₂) und **2072.IV** der polarste (löslich in Methanol) Naturstoff aus Pilzstamm 2072.

6.3.8 Strukturdaten und physikalische Eigenschaften

6.3.8.1 2-(1'-*cis*-3',5'-Dimethylhept-1'-enyl)-3,4-dihydroxy-7-methyl-2,3,4,4a,7,7a-tetrahydrofuro[3,4-*b*]pyran-5-on (**2072.I**)



16

Summenformel: C₁₇H₂₆O₅. –

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +8.2^\circ$ (c = 1.2 mg/ml, CH₂Cl₂). –

R_f-Wert: 0.6 (CH₂Cl₂/MeOH 3%). –

UV (Methanol): λ_{max} (lg ε) = 217 (3.122). –

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3428 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 2961, 2920, 1780 (Carbonyl, γ -Lacton), 1761, 1358, 1188 (Alkyl-O), 1115, 1068 (Alkyl-O). –

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 5.66$ (pt, $J_{1',2'} = J_{2',3'} = 10.5 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H), 5.52 (dd, $J_{1',2'} = 10.0 \text{ Hz}$, $J_{1',2} = 10.0 \text{ Hz}$, 1 H, 1'-H), 4.96 (pt, $J_{2,1'} = J_{2,3} = 8.9 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H), 4.84 (dq, $J_{8,7} = 7.0 \text{ Hz}$, $J_{7,4} = 1.8 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 4.58 (dd, $J_{3,4} = 6.0 \text{ Hz}$, $J_{4,7} = 1.7 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H), 3.78 (dd, $J_{2,3} = 8.4 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 7.8 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 2.52–2.70 (m, 1 H, 3'-H), 1.47 (d, $J_{7,8} = 6.9 \text{ Hz}$, 3 H, 8-H), 1.40–1.06 (m, 6 H, 3'-H, 4'-H, 5'-H, 6'-H), 1.01 (d, $J_{3',8'} = 6.8 \text{ Hz}$, 3 H, 8'-H), 0.86 (t, $J_{6',7'} = 6.9 \text{ Hz}$, 3 H, 7'-H), 0.80 (d, $J_{5',9'} = 6.1 \text{ Hz}$, 3 H, 9'-H). –

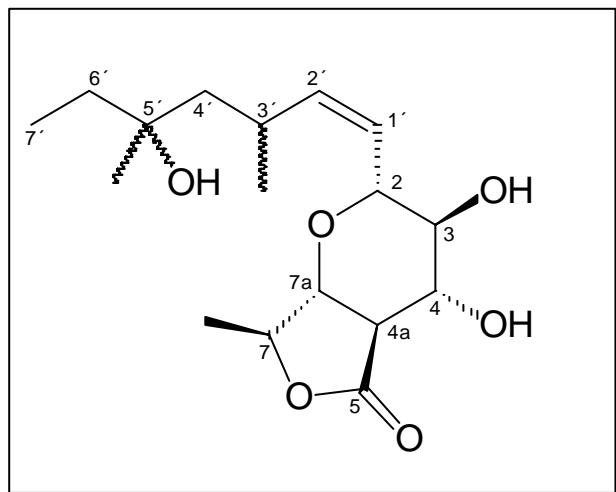
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 178.0$ (s, C-7a), 172.3 (s, C-5), 146.0 (d, C-2'), 121.7 (d, C-1'), 101.0 (s, C-4a), 79.7 (d, C-2), 74.6 (d, C-7), 72.3 (d, C-4), 65.3 (d, C-3), 44.7 (t, C-4'), 32.5 (d, C-3'), 30.8 (d, C-5'), 30.5 (t, C-5'), 22.2 (q, C-8'), 19.4 (q, C-9'), 17.6 (q, C-8), 11.7 (q, C-7'). –

MS (EI / 230 °C): m/z (%) = 311 (1) [$\text{M} + \text{H}^+$], 240 (1), 221 (21), 168 (31) [$\text{M}^+ + \text{H}^+ - \text{C}_5\text{H}_{11} - \text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$], 137 (18), 124 (22), 97 (100). –

MS (CI – *i*-Butan): m/z (%) = 311 (100) [$\text{M} + \text{H}^+$]. –

HRMS ($\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{O}_5$): Ber.: 311.193674 [$\text{M} + \text{H}^+$]
Gef.: 311.190552 ± 3 ppm [$\text{M} + \text{H}^+$]

6.3.8.2 3,4-Dihydroxy-2-(1'-*cis*-5'-Hydroxy-3',5'-Dimethylhept-1'-enyl)-7-methyl-2,3,4,4a,7,7a-hexahydrofuro[3,4-*b*]pyran-5-on (**2072.II**)



Summenformel: C₁₇H₂₈O₆. –

Schmelzpunkt: 156 °C. –

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +10.2^\circ$ (c = 2.1 mg/ml, CH₂Cl₂). –

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3428 \text{ cm}^{-1}$ (OH), 2961, 2920, 1780 (Carbonyl, γ -Lacton), 1761, 1358, 1188 (Alkyl-O), 1115, 1068 (Alkyl-O). –

UV (Methanol): $\lambda_{\max} (\lg \epsilon) = 208$ (2720). –

¹H-NMR (CD₂Cl₂): $\delta = 5.57$ (pt, $J_{1',2'} = J_{2',3'} = 10.6 \text{ Hz}$, 1 H, 2'-H), 5.28 (dd, $J_{1',2'} = 10.9 \text{ Hz}$, $J_{1',2} = 8.9$ 1 H, 1'-H), 4.71 (dq, $J_{7,7a} = 2.7 \text{ Hz}$, $J_{7,8} = 6.5 \text{ Hz}$, 1 H, 7-H), 4.40 (pt, $J = 3.1$, 1 H, 7a-H), 4.10 (pt, $J_{1',2} = J_{2,3} = 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, 2-H), 3.91 (dd, $J_{4,4a} = 6.8 \text{ Hz}$, $J_{3,4} = 9.0 \text{ Hz}$, 1 H, 4-H), 3.38 (dd, $J_{4a,7a} = 3.3 \text{ Hz}$, $J_{4a,4} = 6.5 \text{ Hz}$, 1 H, 4a-H), 3.20 (pt, $J_{2,3} = J_{3,4} = 9.1 \text{ Hz}$, 1 H, 3-H), 2.88–2.78 (m, 1 H, 3'-H), 1.50 (d, $J_{4',3'} = 5.8 \text{ Hz}$, 2 H, 4'-H), 1.46 (q, $J_{7',6'} = 7.4 \text{ Hz}$, 2 H, 6'-H), 1.35 (d, $J_{7,8} = 6.6 \text{ Hz}$, 3 H, 8-H), 1.12 (s, 3 H, 8'-H), 0.99 (d, $J_{3',9'} = 6.4 \text{ Hz}$, 3 H, 9'-H), 0.85 (t, $J_{6',7'} = 7.5 \text{ Hz}$, 3 H, 7'-H). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): $\delta = 177.9$ (s, C-5), 144.1 (d, C-2'), 125.3 (d, C-1'), 79.6 (d, C-7), 76.8 (d, C-7a), 75.1 (d, C-2), 74.6 (d, C-3), 72.7 (s, C-5'), 72.3 (d, C-4), 49.4 (t, C-4'), 47.7 (d, C-4a), 35.1 (t, C-6'), 29.3 (d, C-3'), 27.8 (q, C-9'), 23.5 (q, C-8'), 13.8 (q, C-8), 8.5 (q, C-7'). –

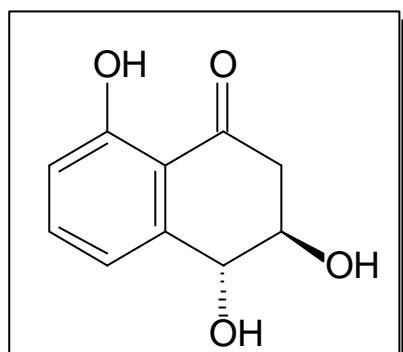
MS (EI / 230 °C): m/z (%) = 328 (8) [M⁺], 310 (24) [M⁺ – H₂O], 240 (19), 223 (25) [M⁺ – H₂O – C₅H₁₁], 213 (7) [M⁺ – C₇H₁₅], 195 (22) [M⁺ – H₂O – C₇H₁₅], 174 (19) [M⁺ – CH₃ – C₉H₁₅], 167 (60) [M⁺ – C₅H₁₁ – C₃H₄O₂], 137 (40), 89 (99), 97 (100). –

HRMS (C₁₇H₂₈O₆):

Ber.: 328.18855

Gef.: 328.19002 ± 3 ppm

6.3.8.3 3,4,8-Trihydroxy-3,4a,8a-tetrahydro-2H-naphthalin-1-on (2072.III)

**18**

Summenformel: C₁₀H₁₀O₄. –

Schmelzpunkt: 118 °C. –

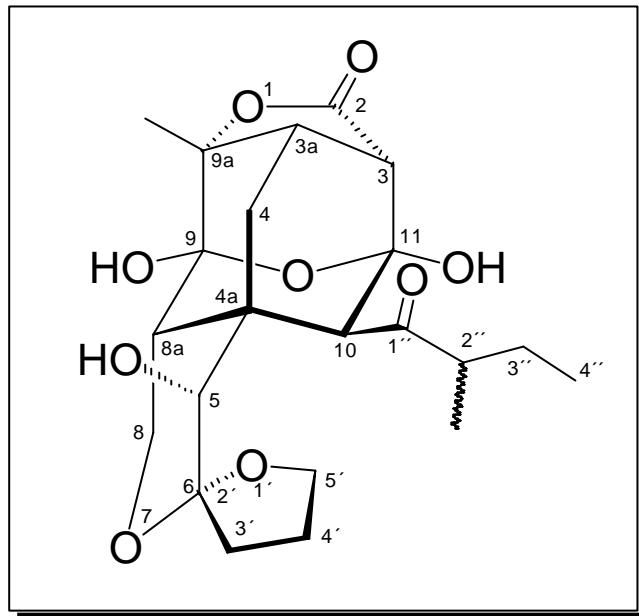
Drehwert: [α]_D²⁰ = + 6.7 ° (c = 0.51 mg/ml, CH₂Cl₂). –

R_f-Wert: 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH 5%). –

¹H-NMR (Aceton-d₆): δ = 12.40 (s, 1 H, 8-OH), 7.49 (pt, J_{7,6} = J_{6,5} = 9.0 Hz, 1 H, 6-H), 7.10 (dd, J_{6,5} = 2.3 Hz, J_{7,5} = 9.0 Hz, 1 H, 5-H), 6.80 (dd, J_{6,7} = 8.9 Hz, J_{5,7} = 2.0 Hz, 1 H, 7-H), 4.68 (d, J_{4,3} = 2.9 Hz, 4-H), 4.15-4.08 (m, 1 H, 3-H), 3.1-3.0 (m, 2 H, 2-H). –

¹³C-NMR (Aceton-d₆): δ = 206.5 (s, C-1), 164.3 (s, C-8), 147.6 (s, C-4a), 137.9 (s, C-5), 127.6 (s, 8a), 119.9 (d, C-7), 117.2 (d, C-6), 73.1 (d, C-3), 71.8 (d, C-4), 47.1 (t, C-2). –

6.3.8.4 [3*R*^{*}-[3a,3ab,4aa,5b,6b,8ab,9a,10S^{*}(X),11*R*^{*}]-3a,4,4',5',8,8a,9,9a-Oc-tahydro-5,9,11-trihydroxy-9a-methyl-10-(2-Methyl-1-oxobutyl)spiro[9,11-epoxy-3,4a-ethano-4aH-furo]3,2-g][2]benzopyran-6,2'(5'H,3'H)-furan]-2(3H)on (**2072.IV**)



20

Summenformel: C₂₂H₃₀O₉. –

Schmelzpunkt: 187 °C. –

Drehwert: [α]_D²⁰ = + 26.2° (c = 0.21 mg/ml, CH₂Cl₂). –

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3458 cm⁻¹ (OH), 2961, 2920, 1775 (Carbonyl, γ-Lacton), 1701 (Carbonyl), 1195 (Alkyl-O), 1062 (Alkyl-O). –

UV (Methanol): λ_{max} (lg ε) = 216 (2.463). –

¹H-NMR (Aceton-d₆): δ = 5.51 (s, 1 H, 9-OH), 5.45 (s, 1 H, 11-OH), 4.28 (s, 1 H, 10-H), 4.19 (d, *J*_{OH,5} = 8.2, 1 H, 5-OH), 4.01 (pt, *J*_{8α,8a} = *J*_{8α,8β} = 11.6 Hz, 1 H, 8-H_α) 4.07-3.93 (m, 2 H, 5'-H_α, 5'-H_β), 3.91 (dd, *J*_{8β,8α} = 11.7 Hz, *J*_{8β,8a} = 4.6 Hz, 1 H, 8-H_β), 3.08 (d, *J*_{5,5-OH} = 7.1 Hz, 1 H, 5-H), 3.05-2.96 (m, 1 H, 2''-H), 2.86 (d, *J*_{3a,3} = 5.2 Hz, 3-H), 2.75-2.70 (m, 1 H, 3a-H), 2.31 (dd, *J*_{4,4} = 14.3 Hz, *J*_{4,3a} = 3.5 Hz, 1 H, 4-H_α), 2.15 (dd, *J*_{8a,8α} = 4.7 Hz, *J*_{8β,8a} = 11.5 Hz, 1 H, 8a-H), 2.08-1.80 (m, 5 H, 3'-H_α, 3'-H_β, 4'-H_α, 4'-H_β), 1.74-1.61 (m, 1 H, 3''-H_α), 1.46 (s, 3 H, 9a-CH₃), 1.25–1.15 (m, 1 H, 3''-H_β), 1.10 (d, *J*_{2'',5''} = 6.9 Hz, 3 H, 2''-CH₃), 0.85 (t, *J*_{4'',3''} = 7.3 Hz, 3 H, 4''-H). –

¹³C-NMR (Aceton-d₆): δ = 216.7 (s, C-1''), 174.4 (s, C-2), 108.6 (s, C-6), 98.5 (s, C-9), 95.7 (s, C-11), 85.5 (s, C-9a), 70.8 (d, C-5), 68.8 (t, C-5'), 56.6 (t, C-8), 54.5 (d, C-

10), 53.5 (s, C-2''), 50.0 (s, C-3), 44.2 (d, C-3a), 43.2 (s, C-4a), 38.6 (d, C-8a), 37.3 (t, C-3'), 25.4 (t, C-4), 24.9 (t, C-3''), 22.9 (t, C-4''), 17.0 (q, 9a-CH₃), 15.7 (q, 2'-CH₃), 11.9 (q, C-4''). –

MS (CI - NH₄⁺): *m/z* (%) = 456 (100) [M + H⁺]. –

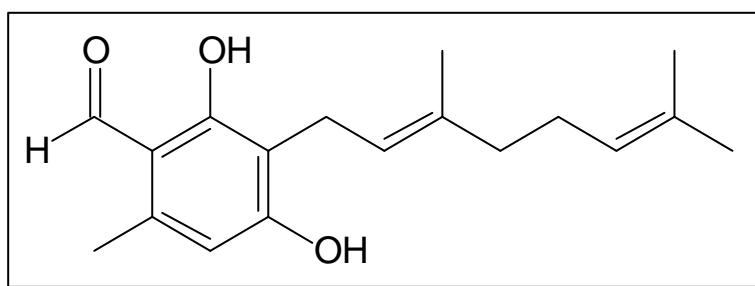
HRMS (C₂₂H₃₀O₉): Ber.: 438.18898
Gef.: 438.18805 ± 4 ppm

6.4 Stamm 3042

6.4.1.1 Isolierung

Die Kulturen auf den Agarplatten wurden im Warring-Blender mit Ethylacetat homogenisiert. Die mit Rohextrakt angereicherte Ethylacetatphase wurde abfiltriert und bis zur Trockene eingeengt. Das Rohextrakt wurde mit einer Kieselgelsäule (45 cm x 6 cm, Si 60) und Dichlormethan als Lösungsmittel filtriert, um ihn für die MPLC-Auf trennung an Lobarsäulen vorzubereiten. Durch die sich anschließende chromatographische Auftrennung unter isokratischen Bedingungen mit Dichlormethan/Methanol (97:3) als Laufmittel, konnten sechs Naturstoffe mit unterschiedlichen Retentionszeiten (**3042.I-3042.VI**) isoliert werden, die nach Aufreinigung durch PSC mit Dichlormethan/Methanol (97:3) als Reinstoffe erhalten wurden. Alle Naturstoffe waren relativ unpolar (löslich in Methylenechlorid). Eine Abstufung nach steigender Polarität ergab die Rangfolge: **3042.I, 3042.III, 3042.II, 3042.VI, 3042.V, 3042.IV**.

6.4.1.2 3-(3',7'-Dimethyl-2',6'-octadienyl)-2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyd (**3042.I**)



25

Summenformel: C₁₉H₂₆O₃. –

Schmelzpunkt: 124 °C (Lit.: 124-126 °C)^[40]. –

R_f -Wert: 0.8 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3%). –

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 12.75$ (s, 1 H, 2-OH), 10.07 (s, 1 H, 8-H), 6.20 (s, 1 H, 5-H), 5.25 (t, $J_{1',2'} = 7.1$ Hz, 1 H, 2'-H), 5.04 (t, $J_{5',6'} = 6.6$ Hz, 1 H, 6'-H), 3.39 (d, $J_{2',1'} = 7.2$ Hz, 2 H, 1'-H), 2.48 (s, 3 H, 7-H), 2.16-2.04 (m, 4 H, 4'-H, 5'-H), 1.80 (s, 3 H, 8'-H), 1.67 (s, 3 H, 9-H), 1.58 (s, 3 H, 10'-H). –

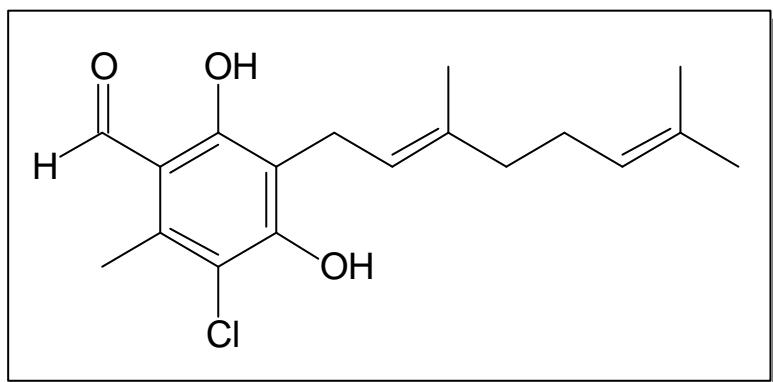
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 193.4$ (d, C-8), 164.0 (s, C-2), 163.1 (s, C-4), 142.4 (s, C-6), 139.9 (s, C-3'), 132.5 (s, C-7'), 124.1 (d, C-6'), 121.4 (d, C-2'), 113.9 (s, C-1), 112.1 (s, C-3), 111.3 (d, C-5), 40.0 (t, C-4'), 26.7 (t, C-5'), 26.1 (q, C-8'), 21.6 (t, C-1'), 18.4 (q, C-6), 18.1 (q, C-9'), 16.6 (q, C-10'). –

HRMS ($\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_3$):

Ber.: 302.18819

Gef.: 302.18854 \pm 3 ppm

6.4.1.3 5-Chlor-3-(3',7'-Dimethyl-2',6'-octadienyl)-2,4-dihydroxy-6-methylbenzaldehyd (3042.II)



26

Summenformel: $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Cl}$. –

Schmelzpunkt: 88 °C (Lit.: 90-96 °C)^[40]. –

R_f -Wert: 0.7 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%). –

$^1\text{H-NMR}$ (CD_2Cl_2): $\delta = 12.72$ (s, 1 H, 2-OH), 10.17 (s, 1 H, 8-H), 6.40 (s, 1 H, 4-OH), 5.25 (t, $J_{1',2'} = 7.3$ Hz, 1 H, 2'-H), 5.09 (m, 1 H, 6'-H), 3.43 (d, $J_{2',1'} = 7.3$ Hz, 2 H, 1'-

H), 2.63 (s, 3 H, 7-H), 2.16-1.94 (m, 4 H, 4'-H, 5'-H), 1.82 (s, 3 H, 8'-H), 1.68 (s, 3 H, 9-H), 1.60 (s, 3 H, 10'-H). –

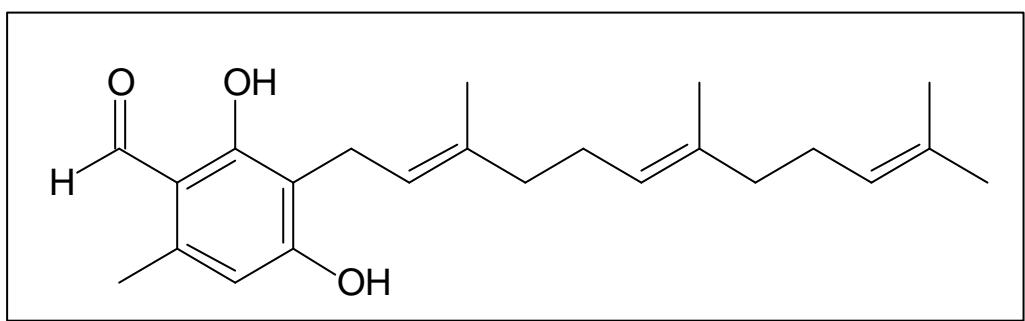
^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 193.6$ (d, C-8), 162.6 (s, C-2), 156.9 (s, C-4), 138.0 (s, C-6), 137.4 (s, C-3'), 131.9 (s, C-7'), 124.5 (d, C-6'), 121.1 (d, C-2'), 114.7 (s, C-1), 113.9 (s, C-3), 113.7 (d, C-5), 40.2 (t, C-4'), 27.0 (t, C-5'), 26.1 (q, C-8'), 22.4 (t, C-1'), 18.1 (q, C-6), 16.6.1 (q, C-9'), 14.9 (q, C-10'). –

HRMS ($\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{Cl}$):

Ber.: 322.1335

Gef.: 322.1329 ± 3 ppm

6.4.1.4 2,4-Dihydroxy-6-methyl-3-(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl)-benzaldehyd (3042.III)



27

Summenformel: $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$. –

Schmelzpunkt: 96 °C (Lit.: 98-100°C)^[43]. –

R_f-Wert: 0.7 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2%). –

^1H -NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 12.79$ (s, 1 H, 2-OH), 10.10 (s, 1 H, 8-H), 6.20 (s, 1 H, 5-H), 5.30 (t, $J_{1',2'} = 7.1$ Hz, 1 H, 2'-H), 5.10 (m, 2 H, 6'-H, 10'-H), 3.43 (d, $J_{2',1'} = 7.3$ Hz, 2 H, 1'-H), 2.52 (s, 3 H, 7-H), 2.16-2.04 (m, 6 H, 4'-H, 5'-H, 8'-H, 9'-H), 1.80 (s, 3 H, 15'-H), 1.67 (s, 3 H, 14'-H), 1.58 (s, 6 H, 13'-H, 12'-H). –

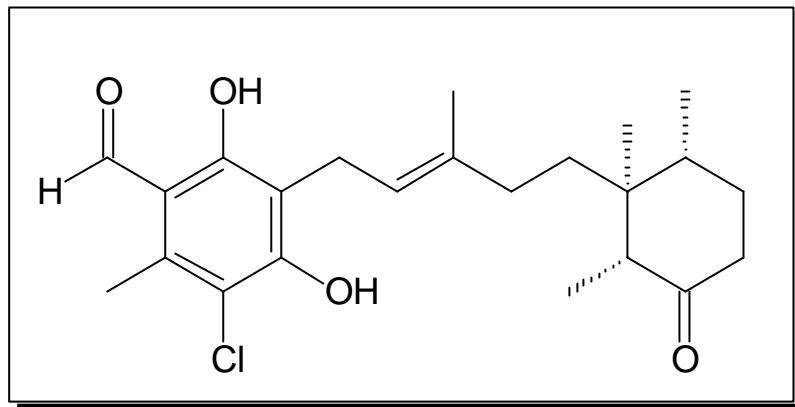
^{13}C -NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 193.4$ (d, C-8), 164.0 (s, C-2), 163.0 (s, C-4), 142.4 (s, C-6), 140.3 (s, C-3'), 136.1 (s, C-7'), 132.5 (s, C-10'), 124.7 (d, C-6'), 123.9 (d, C-9'), 121.4 (d, C-2'), 113.6 (s, C-1), 111.9 (s, C-3), 111.3 (d, C-5), 40.1 (t, C-1'), 26.7 (t, C-5'), 26.1 (q, C-8'), 21.6 (t, C-1'), 18.4 (q, C-6), 18.1 (q, C-9'), 16.6 (q, C-10'). –

HRMS ($C_{23}H_{32}O_3$):

Ber.: 356.2351

Gef.: 356.2347 ± 3 ppm

6.4.1.5 3-[5-(3-Acetyl-5-chloro-2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)-3-methylpent-3-enyl]-2,3,4-trimethylcyclohexanon (3042.IV)

**28**Summenformel: $C_{24}H_{35}O_4Cl$. –Schmelzpunkt: 130 °C (Lit.: 130-131 °C)^[43]. –Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +9^\circ$ ($c = 2.7$ mg/ml, CH_2Cl_2) (Lit.: $+6^\circ$ (MeOH))^[43]. – R_f -Wert: 0.7 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 2%). –

¹H-NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 12.60$ (s, 1 H, 2-OH), 10.07 (s, 1 H, 8-H), 6.40 (s, 1 H, 4-OH), 5.82 (t, $J_{1',2'} = 7.2$ Hz, 1 H, 2'-H), 3.32 (d, $J_{2',1'} = 7.2$ Hz, 2 H, 1'-H), 2.53 (s, 3 H, 7-H), 2.4-2.19 (m, 4 H, 9'-H, 10'-H), 2.03-1.74 (m, 4 H, 4'-H, 5'H), 1.74 (s, 3 H, 15'-H), 1.65-1.49 (m, 2 H, 11'-H, 7'-H), 0.83 (d, 3 H, $J_{7',14'} = 6.5$ Hz, 14'-H), 0.80 (d, 3 H, $J_{11',12'} = 6.8$ Hz, 12'-H), 0.49 (s, 3 H, 6-H). –

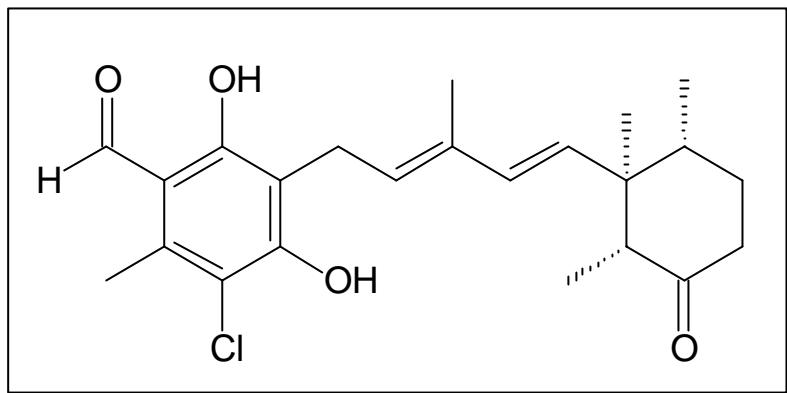
¹³C-NMR (CD_2Cl_2): $\delta = 215.1$ (s, 8'), 194.2 (d, C-8), 163.2 (s, C-2), 157.3 (s, C-4), 138.6 (s, C-6), 137.6 (d, C-2'), 121.9 (d, C-4'), 115.3 (s, C-1), 114.6 (s, C-3), 114.2 (d, C-5), 51.7 (d, C-4), 44.2 (t, C-5), 42.6 (d, C-4'), 37.0 (t, C-5'), 36.6 (t, C-8'), 23.1 (t, C-1'), 17.4 (q, C-6), 16.3 (q, C-9'), 16.1 (q, C-10') 15.5(q, C-14'), 8.57 (q, C-7). –

HRMS ($C_{24}H_{35}O_4Cl$):

Ber.: 422.22238

Gef.: 422.2223 ± 3 ppm

6.4.1.6 3-[5-(3-Acetyl-5-chlor-2,6-dihydroxy-4-methyl-phenyl)-3-methyl-penta-1,3-dienyl]-2,3,4-trimethyl-cyclohexanon (3042.V)



29

Summenformel: C₂₄H₃₃O₄Cl. –

Schmelzpunkt: 168 °C (Lit.: 172–173 °C)^[45]. –

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -24^\circ$ (c = 2.8 mg/ml, CH₂Cl₂) (Lit.: -31.0 ° (MeOH))^[45]. –

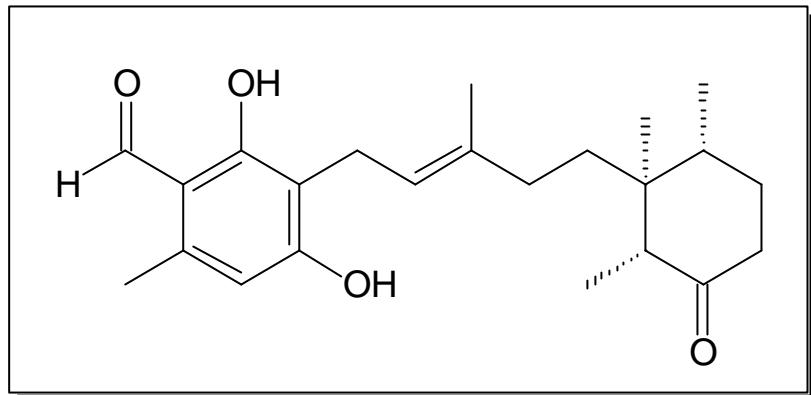
R_f-Wert: 0.6 (CH₂Cl₂/MeOH 3%). –

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ = 12.72 (s, 1 H, 2-OH), 10.14 (s, 1 H, 8-H), 6.47 (s, 1 H, 4-OH), 5.88 (d, 1 H, *J*_{4',5'} = 16 Hz, 4'-H), 5.46 (t, *J*_{1',2'} = 7.2 Hz, 1 H, 2'-H), 5.30 (d, *J*_{4',5'} = 16 Hz, 1 H, 5'-H), 3.47 (d, *J*_{2',1'} = 7.4 Hz, 2 H, 1'-H), 2.54 (s, 3 H, 7-H), 2.40-2.19 (m, 4 H, 9'-H, 10'-H), 1.82 (s, 3 H, 15'-H), 1.65-1.49 (m, 2 H, 11'-H, 7'-H), 0.77 (d, 3 H, *J*_{7',14'} = 6.9 Hz, 14'-H), 0.74 (d, 3 H, *J*_{11',12'} = 6.5 Hz, 12'-H), 0.63 (s, 3 H, 6-H). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ = 213.8 (s, 8'), 194.2 (d, C-8), 163.2 (s, C-2), 157.2 (s, C-4), 138.8 (s, C-6), 136.6 (d, C-5'), 135.1 (s, C-3'), 134.2 (d, C-2'), 128.5 (d, C-4'), 114.8 (s, C-1), 114.7 (s, C-3), 114.2 (d, C-5), 40.2 (t, C-4'), 27.0 (t, C-5'), 26.1 (q, C-8'), 22.4 (t, C-1'), 18.1 (q, C-6), 16.6.1 (q, C-9'), 14.9 (q, C-10') 8.4 (q, C-7). –

HRMS (C₂₄H₃₅O₄Cl): Ber.: 420.20673
Gef.: 420.2066 ± 3 ppm

6.4.1.7 3-[5-(3-Acetyl-2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)-3-methylpent-3-enyl]-2,3,4-trimethylcyclohexanon (3042.VI**)**

**30**

Summenformel: C₂₄H₃₆O₄. –

R_f-Wert: 0.7 (CH₂Cl₂/MeOH 2%). –

Schmelzpunkt: 171 °C (Lit.: 170–173 °C)^[26]. –

Drehwert: [α]_D²⁰ = - 121 ° (c = 2.2 mg/ml, CH₂Cl₂). –

¹H-NMR (CD₂Cl₂): δ = 12.74 (s, 1 H, 2-OH), 10.09 (s, 1 H, 8-H), 6.26 (s, 1 H, 5-H), 5.30 (t, *J*_{1',2'} = 7.2 Hz, 1 H, 2'-H), 3.39 (d, *J*_{2',1'} = 7.2 Hz, 2 H, 1'-H), 2.52 (s, 3 H, 7-H), 2.4-2.19 (m, 4 H, 9'-H, 10'-H), 2.03-1.74 (m, 4H, 4'-H, 5'H), 1.85 (s, 3 H, 15'-H), 1.65-1.49 (m, 2 H, 11'-H, 7'-H), 0.93 (d, 3 H, *J*_{7',14'} = 6.5 Hz, 14'-H), 0.91 (d, 3 H, *J*_{11',12'} = 6.3 Hz, 12'-H), 0.59 (s, 3 H, 6-H). –

¹³C-NMR (CD₂Cl₂): δ = 215.1 (s, 8'), 193.4 (d, C-8), 164.1 (s, C-2), 162.7 (s, C-4), 142.3 (s, C-6), 138.6 (d, C-2'), 121.8 (d, C-4'), 113.6 (s, C-1), 112.4 (s, C-3), 111.0 (d, C-5), 50.9 (d, C-4), 43.9 (t, C-5), 42.0 (d, C-4'), 36.5 (t, C-5'), 36.0 (t, C-8'), 21.6 (t, C-1'), 16.9 (q, C-6), 15.7 (q, C-9'), 15.5 (q, C-10') 15.4(q, C-14'), 8.0 (q, C-7). –

HRMS (C₂₄H₃₆O₄): Ber.: 388.26135
Gef.: 388.26137 ± 2 ppm

7 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. von Arx, *Pilzkunde*, Verlag von J.C. Cramer, **1969**.
- [2] H.G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1985/86**.
- [3] J. Weber, *Pilze, eine Einführung*, 1. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, **1983**.
- [4] E. Müller, W. Löffler, *Mykologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1982**, S. 107.
- [5] Luckner M., *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*, Fischer Verlag, Jena und Berlin, **1990**.
- [6] P.S. Steyn, *The Biosynthesis of Mykotoxins. A Study in Secondary Metabolism*, Jon Wiley and Sons, New York, **1980**.
- [7] H.O. Schwantes, *Biologie der Pilze*, UTB, Stuttgart, **1995**.
- [8] A. Neumann, *Antibiotika-Kompendium*, Pergamon Press, **1985**.
- [9] R.B. Herbert, *The biosynthesis of secondary Metabolites*, Chapman and Hall, London, Second edition **1989**.
- [10] B. Franck, *Angew. Chem.*, **1979**, 91, 453.
- [11] H.D. Munro, O.C. Musgrave, *J. Chem. Soc. C*, **1971**, 685.
- [12] J. Castells, E.R.H. Jones, G.D. Meakins, R.W. Williams, *J. Chem. Soc.*, **1959**, 1159.
- [13] R. Wiedert, *Angew. Chem.*, **82**, **1970**, 331-342.
- [14] R. Wiedert, *Angew. Chem.*, **89**, **1977**, 513-520.
- [15] A. Windaus, *Liebigs Ann. Chem.*, **1928**, 460, 225.
- [16] A. Windaus, *Z. Elektrochem. Angew. Phys. Chem.*, **1942**, 276, 280.
- [17] Y. Osabi, M. Nagase, S. Matsueda, *Chem. Ind.*, **1985**, 411.
- [18] BASF, *Interne Mitteilungen*.
- [19] K. Galaktionov, X. Chen, D. Beach, *Nature*, **1996**, 382, 511-517.
- [20] T.J. Batterham, *Proc. Chem. Soc., London*, **1963**, 89.
- [21] U. Weiss, G. Nasini, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, **1987**, 52, 1-72.
- [22] F. Sureau, P. Miskovsky, L. Chinsky, P.Y. Turpin, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 9484.
- [23] C. Thomas, R.S. MacGill, G.C. Miller, R.S. Pardini, *Photochem. Photobiol.*, **55**, **1992**, 47-53.
- [24] P. Jardon, N. Lazortchak, R. Gautron, *J. Chim. Phys.*, **85**, **1988**, 971-977.

- [25] S.N. Okpanyi, M.L. Weischer, *Arzneim. Forsch.*, 37, **1987**, 10-13.
- [26] F.H. Stodola, C. Cabot, C.R. Benjamin, *Biochem. J.*, **1964**, 93, 92.
- [27] S. Takano, Y. Shimazaki, K. Ogasawara, *Heterocycles*, 29, **1989**, 2101.
- [28] J.A. Findlay, S. Buthelezi, R. Lavoie, L. Pena-Rodriguez, *J. Nat. Prod.*, 58, **1995**, 11, 1759-1766.
- [29] Cole und Cox, *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, New York, Academic Press, **1981**, p. 129.
- [30] H. Duddeck, *Topics in Stereochemistry*, **1986**, Jon Wiley and Sons, New York, 16, 293.
- [31] T.R. Hoye, P.R. Hanson, J.R. Vyvyan, *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 4096-4103.
- [32] E.K. Wilson, R.M. Burk, *J Org. Chem.*, **1992**, 57, 7151-7158.
- [33] R.B. Herbert, *The biosynthesis of secondary Metabolites*, Chapman and Hall, London, **1989**, second edition, p. 56-57.
- [34] U. Sankawa, H. Shimada, T. Sato, T. Kinoshita, K. Yanasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, 29, 3536.
- [35] U. Sankawa, H. Shimada, T. Sato, T. Kinoshita, K. Yanasaki, *Tetrahedron. Lett.*, **1977**, 483.
- [36] W.A. Ayer, L.M. Browne, A.W. Elgersma, P. Singer, *Can. J. Chem.*, **1990**, 68, 1300.
- [37] A. Yokoo, *J. Chem. Soc.*, **1950**, 71, 590.
- [38] H. Stetter, J. Lennartz, *Liebigs Ann. Chem.*, **1977**, 1807-1816.
- [39] M. Hesse, H. Meier, B. Zee, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, **1991**, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Überarbeitete Auflage, S. 134.
- [40] Y. Kosuge, A. Suzuki, S. Hirata, S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.*, **1973**, 37, 455.
- [41] K. Mori, M. Ohki, M. Matsui, *Tetrahedron*, **1974**, 30, 715.
- [42] H. Saimoto, J. Veda, H. Sashiwa, Y. Shigemasa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1994**, 67, 1178-1185.
- [43] G.A. Ellestad, R.H. Evans jr., M.P. Kunstmann, *Tetrahedron*, Vol. 25, **1969**, 1323-1329.
- [44] Y. Nawata, K. Ando, G. Tamura, K. Arima, Y. Iitaka, *J. Antibiotics*, **1969**, 22, 511-512.
- [45] G.A. Ellestad, R.H. Evans jr., M.P. Kunstmann, *Tetrahedron*, Vol. 25, **1969**, 1330-1338.

- [46] Z. Diwu, J. W. Lown, *Tetrahedron*, Vol. 48, No. 1, **1992**, 45-54.
- [47] P. Baierweck, U. Simmross, K. Mullen, *Chem. Ber.*, **1988**, 121, 2195.
- [48] T. Aoyama, T. Ito, *Tetrahedron Letters*, Vol. 34, No. 41, **1993**, 6583-6586.
- [49] J. Savar, P. Brassard, *Tetrahedron*, Vol. 40. No. 18, **1984**, 3455-3464.
- [50] M. Pericas, F. Serratosa, E. Valenti, *Tetrahedron*, Vol. 43, No. 10, **1987**, 2311-2316.
- [51] M. Pericas, E. Valenti, *J.Org. Chem.*, Vol. 55, **1990**, 2311-2316.
- [52] H. Jonk, W. Frank, W. Fischer, H. Wimmer, *Dünnschichtchromatographie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1989**.

LEBENSLAUF

Angaben zur Person:

Name:	Karl-Heinz Emil Drogies
Geburtsdatum:	23.03.1962
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet, zwei Kinder

Schulbildung:

07/78–06/81	Missionshaus St. Xaver Bad Driburg, Abschluß: Abitur
-------------	---

Studium:

10/81–08/85	Universität Paderborn, Fachbereich Chemie und Chemietechnik Abschluß: Diplom-Chemieingenieur (Analytische Chemie) Entwicklung und Erprobung eines modifizierten Meßsystems für Quecksilber mit Hilfe der AAS
04/90–02/95	Universität Paderborn, Fachbereich Chemie und Chemietechnik Abschluß: Diplomchemiker
Diplomarbeit:	Untersuchung des Sekundär-Metaboliten-Spektrums aus endo- phytischen Pilzen der Klasse Fungi Imperfecti
Dissertation: 03/95–10/97	BASF/BMBF-Projekt: Isolierung, Strukturaufklärung und Syntheseversuche von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten aus endophytischen Mikromyceten

Beruflicher Werdegang:

10/85–03/88	Diplom-Chemieingenieur im BASF-Werk Hiltrup (Glasurit)
Seit 04/88	Selbstständig als Anlageberater Ehrenamtlich tätig als Leiter des Büros Ostwestfalen für den Bundesverband Finanzdienstleistungen Berlin e.V.
03/95–05/97	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Paderborn