

**Isolierung, Strukturaufklärung und Untersuchungen zur Synthese
biologisch aktiver Sekundärmetabolite aus Pilzen und Pflanzen**

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

von
Markus John
aus Anröchte

Paderborn 1998

Referent: Prof. Dr. K. Krohn

Korreferent: Prof. Dr. N. Risch

Eingereicht am: 29. April 1998

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Mai 1998

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis April 1998 im Fach Organische Chemie des Fachbereichs Chemie und Chemietechnik der Universität-Gesamthochschule Paderborn angefertigt.

Herrn Prof. K. Krohn danke ich für die interessante Themenstellung sowie die gewährte Freizügigkeit bei der Bearbeitung der Thematik. Desweiteren haben seine Diskussionsbereitschaft und seine Anregungen viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. N. Risch danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Anke und meiner Familie für ihre Unterstützung.

Weiterhin danke ich den Herren S. Bernhard, J. Küpke, K. Steingröver, H.-J. Vetter und G. Zimmermann für die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen heiteren Stunden im Labor. Den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern aller Arbeitskreise der Organischen Chemie danke ich für das kollegiale und sehr angenehme Arbeitsklima.

Für Anke

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	<u>Klassifizierung der Pilze</u>	1
1.2.	<u>Sekundärmetabolite</u>	4
1.3.	<u>Biogenese der Sekundärmetabolite</u>	5
1.3.1.	Isoprenoide Verbindungen	5
1.3.2.	Aromatische Verbindungen	10
1.3.2.1.	Shikimisäure-Weg	10
1.3.2.2.	Polyketid-Weg	12
1.3.3.	Alkaloide Verbindungen	15
1.3.3.1.	Die echten Alkaloide	15
1.3.3.2.	Pseudoalkaloide	16
1.3.3.3.	Peptidalkaloide	17
1.3.3.4.	Protoalkaloide	18
2.	<u>Aufgabenstellung und Zielsetzung</u>	19
3.	<u>Hauptteil</u>	20
3.1.	<u>Stamm 3037</u>	20
3.1.1.	Pilzbeschreibung	20
3.1.2.	Isolierung der Naturstoffe 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7	20
3.1.3.	Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe	21
3.1.3.1.	Naturstoff 1	21
3.1.3.2.	Naturstoff 2	26
3.1.3.3.	Naturstoff 3	28
3.1.3.4.	Naturstoff 4	30
3.1.3.5.	Naturstoff 5	33
3.1.3.6.	Naturstoff 6	37
3.1.3.7.	Naturstoff 7	41
3.1.3.7.1.	Biosynthese des Cladosporins (7)	43
3.1.4.	Biologische Aktivität	45
3.1.4.1.	Erläuterung und Bewertung der Bioaktivitätsmessungen	45
3.1.4.1.1.	Pflanzenschutztestung der Mikrobiologie in Braunschweig	45
3.1.4.1.2.	Kurzbeschreibung der Pharma-Grundscreening-Tests der BASF	47
3.1.4.2.	Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3037	50
3.1.4.2.1.	Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig	50

3.1.4.2.2.	Pharmakologische Aktivität.....	53
3.2.	<u>Stamm 2225</u>	53
3.2.1.	Pilzbeschreibung	53
3.2.2.	Isolierung der Naturstoffe 8 und 9	54
3.2.3.	Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 8 und 9	55
3.2.3.1.	Naturstoff 8.....	55
3.2.3.2.	Naturstoff 9.....	57
3.2.4.	Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 2225	59
3.2.4.1.	Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig.....	59
3.3.	<u>Stamm 3184</u>	61
3.3.1.	Pilzbeschreibung	61
3.3.2.	Isolierung der Naturstoffe 10, 11 und 12	61
3.3.3.	Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 10, 11 und 12	62
3.3.3.1.	Naturstoff 10.....	62
3.3.3.1.1.	Biosynthese des Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3on.....	64
3.3.3.2.	Naturstoff 11	65
3.3.3.3.	Naturstoff 12.....	68
3.3.3.3.1.	Biosynthese der Naturstoffe 11 und 12.....	73
3.3.4.	Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3184	74
3.3.4.1.	Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig.....	74
3.3.4.2.	Pharmakologische Aktivität.....	76
3.4.	<u>Stamm 3004</u>	77
3.4.1.	Pilzbeschreibung	77
3.4.2.	Isolierung der Naturstoffe 13, 14, 15 und 16	77
3.4.3.	Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 13- 16	78
3.4.3.1.	Naturstoff 13.....	78
3.4.3.2.	Naturstoff 14.....	80
3.4.3.3.	Naturstoff 15.....	83
3.4.3.4.	Naturstoff 16.....	85
3.4.4.	Biosynthese der Naturstoffe 13, 15 und 16	86
3.4.5.	Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3004	88
3.4.5.1.	Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig.....	88
3.5.	<u>Stamm 3304</u>	90
3.5.1.	Pilzbeschreibung	90

3.5.2.	Isolierung der Naturstoffe 17, 18 und 19	90
3.5.3.	Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 17, 18 und 19	90
3.5.3.1.	Naturstoff 17	90
3.5.3.2.	Naturstoff 18	94
3.5.3.3.	Naturstoff 19	96
3.5.4.	Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3304	101
3.5.4.1.	Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig	101
3.6.	<u>Naturstoff aus der Pflanze <i>Usnea dasypoga</i> Rohi</u>	103
3.6.1.	Isolierung des Naturstoffs 20	103
3.6.2.	Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffs 20	103
4.	<u>Synthese</u>	110
4.1.	<u>Planung und Durchführung erster Syntheseschritte zur Darstellung des Naturstoffs Stemphyperylenol (11)</u>	110
4.1.1.	Motivation	110
4.1.2.	Syntheseplanung	110
4.1.3.	Durchführung	112
5.	<u>Zusammenfassung und Ausblick</u>	116
6.	<u>Experimenteller Teil</u>	119
6.1.	<u>Allgemein verwendete Analysen- und Meßmethoden</u>	119
6.2.	<u>Mikrobiologische Arbeitsmethoden</u>	121
6.2.1.	Anreicherung der Pilze in Submerskultur	121
6.3.	<u>Experimenteller Teil zur Naturstoffisolierung</u>	121
6.3.1.	Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 1- 7	122
6.3.2.	Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 8 und 9	130
6.3.3.	Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 10- 13	132
6.3.4.	Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 13- 16	135
6.3.5.	Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 17- 19	140
6.3.6.	Strukturdaten und Substanzcharakteristika des Naturstoffs 20 und dessen Triacetats	143
6.4.	<u>Experimenteller Teil zur Naturstoffsynthese des Stemphyperylenols (11)</u>	145
7.	<u>Abkürzungen</u>	152
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	152

1. Einleitung

1.1. Klassifizierung der Pilze

Als Pilze (lat. Fungi, griech. Myces) bezeichnet man im weiteren Sinn eine polyphyletische Gruppe chlorophyll-freier, heterotropher, eukaryotischer Organismen. Als Eukaryonten verfügen sie wie Tiere und Pflanzen über einen echten Zellkern sowie die typischen Zellorganellen im Protoplasma.^[1] Nach der Lebensweise lassen sich zwei Gruppen von Pilzen unterscheiden. Saprobische Organismen beziehen die notwendigen Kohlenstoffverbindungen aus dem oxidativen Abbau von organischen Rückständen, während biotrophe Pilze, als Symbionten oder Parasiten Pflanzen, Tiere, Algen, Protozoen, Bakterien oder andere Pilze benötigen. Zu dieser chemoorganoheterotrophen Ernährung sind Pilze durch eine Vielzahl von Enzymen (neben Oxidasen, z. B. Amylasen, Lipasen, Trehalasen, Peptidasen) befähigt. Obwohl die Pilze durch morphologische und ökologische Charakteristika von anderen Lebewesen abgegrenzt werden können, handelt es sich bei ihnen keineswegs um eine homogene Verwandtschaftsgruppe. Zur Klassifizierung der Pilze werden diese in die in Abbildung 1 und 2 dargestellten Kategorien eingeteilt.^[2] Dabei muß angemerkt werden, daß bei der Zuordnung unterschiedliche Auffassungen existieren. Besonders die Definition des Reiches ist nicht klar abgegrenzt.^[2–5]

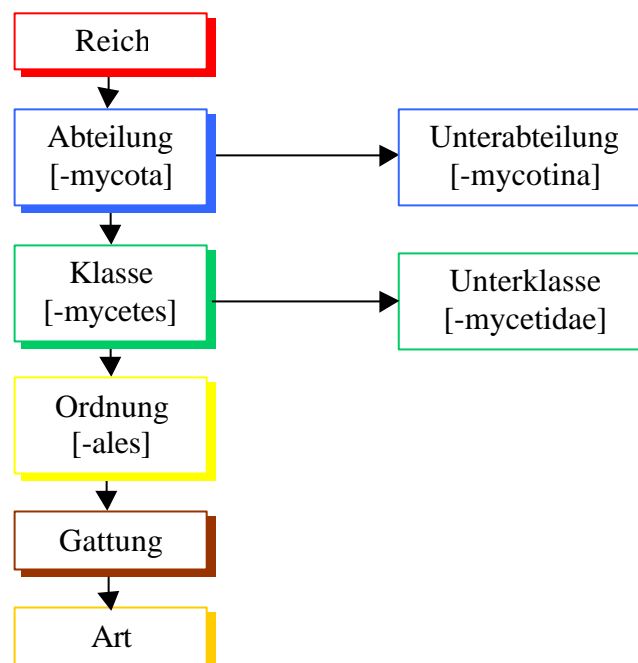


Abb. 1: Klassifizierung der Pilze. In Klammern sind die systematischen Namensendungen angegeben.^[6]

Das Reich „Fungi“ (echte Pilze) setzt sich als wahrscheinliche Abstammungsgemeinschaft aus den früheren Eumycota (Eumycotina, Eumycophytina, höhere Pilze) und den Zygomycota (Jochpilze, früher eine Abteilung der niederen Pilze) zusammen, während die pilzähnlichen Protisten die übrigen, phylogenetisch vermutlich voneinander weitgehend unabhängigen Abteilungen der niederen Pilze und der Schleimpilze (Myxomycota, Myxomycotina, Myxomycophytina, Mycetozoa, Pilztierchen) umfassen.

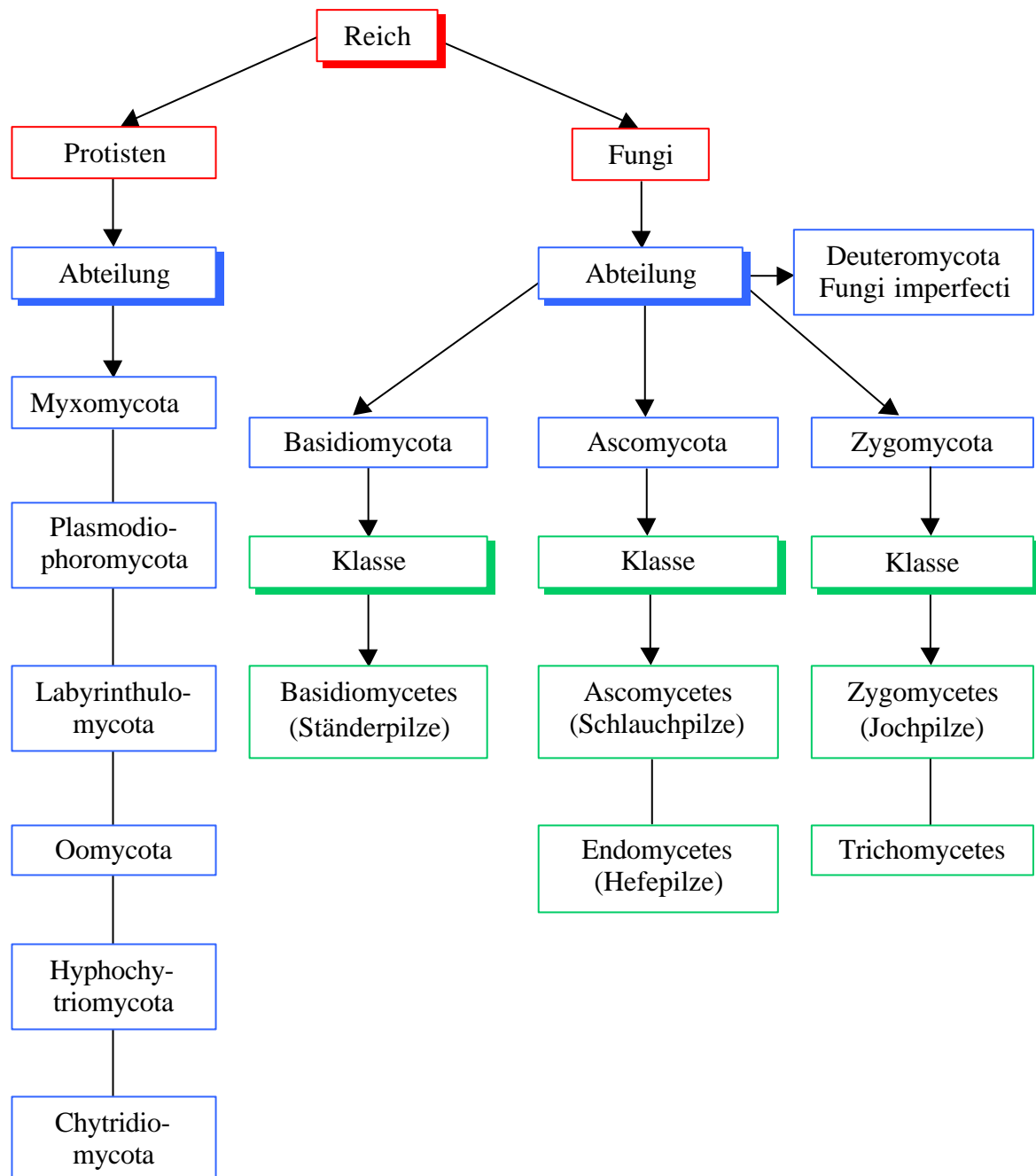


Abb. 2: Klassifizierung der „Fungi“ (echte Pilze) und der Protisten.

Das Reich Fungi besteht aus annähernd 125.000 in der Literatur beschriebenen Pilzarten, deren Keime keinerlei Einrichtung zur Eigenbewegung besitzen. Aufgrund der wichtigsten Merkmale ihrer geschlechtlichen Entwicklung werden die Fungi in die drei Abteilungen Zygomycota (Jochpilzartige), Ascomycota (Schlauchpilzartige) und Basidiomycota (Ständerpilzartige) gegliedert. Echte Pilze, die nur nach ihren asexuellen Zuständen (Anamorphen) beurteilt werden, deren Entwicklung aber unvollständig oder unvollständig bekannt ist, gehören zur Formabteilung der Deuteromycota oder *fungi imperfecti*.

Als pilzähnliche Protisten werden die sechs phylogenetisch voneinander unabhängigen Abteilungen Myxomycota, Plasmodiophoromycota, Labyrinthulomycota, Oomycota, Hyphochytriomycota und Chytridiomycota zusammengefaßt. In jeder Abteilung kommen aktiv bewegliche Keime vor, am häufigsten Zoosporen, manchmal amöboide Zellen oder beides. Teile der meisten Abteilungen haben sich, wie die echten Pilze als Ganzes, zu Festlandbewohnern entwickelt. Das gesamte Agglomerat der pilzähnlichen Protisten macht mit etwa 2.000 bekannten Arten nur etwa 2 % der Pilze aus, umspannt aber eine beachtenswerte Vielfalt an Lebensformen.^[2]

Die Vermehrung der Pilze verläuft wie bei allen Eukaryonten durch Mitose oder Meiose und durch die Bildung geschlechtlicher oder ungeschlechtlicher Sporen oder auch durch Sprossung.

Viele Pilze und pilzähnliche Organismen leben als Parasiten und sind in dieser Eigenschaft häufig pathogen. Man kennt human- und tierpathogene Pilze, die als krankheitserregende Hygieneschädlinge Ursachen von Lebensmittelvergiftungen und von Mykosen sind.^[7]

Nicht weniger zahlreich sind phytopathogene Pilze, die als Erreger von Pflanzenkrankheiten wie Brand, Rost (z. B. an Getreide und Kaffee), Mehltau, Fäule usw. großen Schaden verursachen, mitunter auch regelrechte Epidemien hervorrufen, wie z. B. die Ulmenkrankheit. Einen interessanten Aspekt bieten die Pilze als Bio-Pestizide („Fungi-Herbizide“, „Fungi-Insektizide“ und „Fungi-Fungizide“).

Viele Bodenpilze leben in Symbiose mit den Wurzeln von Bäumen und Pflanzen, sie bilden eine sogenannte Mykorrhiza, eine Stoffwechselgemeinschaft, die für manche der betreffenden Pflanzen (z. B. Orchideen) obligatorisch ist. Eine Dauersymbiose zwischen Pilzen (Mykobionten) und Algen und/oder den als Blaualgen bekannten Cyanobakterien (Photobionten) ist in Flechten (Lichenes) entstanden. Eine Ektosymbiose stellen die von Blattschneiderameisen und Termiten angelegten Pilzkulturen dar.

1.2 Sekundärmetabolite

Ähnlich den Pflanzen produzieren die Pilze in ihrem Stoffwechsel oftmals Substanzen, die nicht dem Primärstoffwechsel zuzuordnen sind. Häufig haben diese als Sekundärmetabolite bezeichneten Stoffe im Gegensatz zum essentiellen Primärstoffwechsel für den sie produzierenden Pilz eine geringe oder keine unmittelbar erkennbare Bedeutung, wie z. B. Antibiotika oder Mykotoxine. Ein weiterer Unterschied zwischen Primär- und Sekundärstoffwechsel liegt in der Spezifität. Während der Sekundärmetabolismus für den Stamm, die Art, die Gattung oder seltener eine Familie charakteristisch ist, verläuft der Primärstoffwechsel bei allen Organismen im wesentlichen gleich.^[8–16] Eine scharfe Trennung zwischen beiden Stoffwechselsystemen ist jedoch nicht möglich, da die Synthese der Sekundärmetabolite vielfach von Primärmetaboliten ausgeht.^[17]

Die Produktion von Sekundärmetaboliten erfolgt im Allgemeinen nur in Zellen, die sich nicht mehr teilen oder sich durch limitierte Wachstumsraten auszeichnen.^[15] Man unterscheidet daher zwischen einer Wachstumsphase (Trophophase), in der der Primärstoffwechsel dominiert, und einer Produktionsphase (Idiophase). Unter den zahlreichen Sekundärstoffen finden sich nicht nur Mykotoxine, d. h. Gifte, sondern auch nützliche Verbindungen wie organische Säuren oder medizinisch-pharmazeutisch wichtige Produkte (Antibiotika, Ergot-Alkaloide, Cytochalasane, Siderochrome). Die Sekundärmetabolite können für den Organismus vielfältige vorteilhafte Funktionen übernehmen und damit bei der Evolution von Bedeutung sein.^[2,18–21]

Hierzu sind zu zählen:

- Abwehrreaktion nach außen (Fraßverhinderung durch Mykotoxine, Hemmung von Konkurrenten durch Antibiotika)
- Angriffreaktion nach außen (Schwächung des Wirtes zur besseren Infiltration in diesen)
- Kommunikation (Lockstoff, z. B. Antherdiol als Sexuallockstoff bei Oomycetes und Trisporsäure bei Zygomycetes, Sirenin als Lockstoff für Gameten bei Allomyces und Chytridiomycetes)
- zufällige Entstehung neuer Enzyme (akzidentelle Synthese)
- Verwertung überschüssiger Zwischenprodukte mit Hilfe von Enzymen
- im Rahmen der Phylogenese unabgeschlossener Selektionsvorgang

1.3. Biogenese der Sekundärmetabolite

Interessanterweise ist die Biosynthese der Sekundärmetaboliten im wesentlichen von einer begrenzten Anzahl an Primärmetaboliten wie α -Aminosäuren, Acetyl-Coenzym A, Mevalonsäure und Intermediaten der Shikimisäure abzuleiten. Zur Klassifizierung der Sekundärmetabolite bzw. deren Strukturfragmente werden diese daher unter Berücksichtigung ihrer Ausgangskomponenten in die Kategorien der isoprenoiden, aromatischen und alkaloiden Verbindungen eingeteilt.

1.3.1. Isoprenoide Verbindungen (Terpene und Steroide)

Beide Naturstoffklassen, die Terpene und Steroide^[22], zeigen große Ähnlichkeit in ihrem strukturellen Aufbau. Bereits im Jahre 1922 sprach Ruzicka die Vermutung aus, daß sich die verschiedenen Terpene aus Isoprenmolekülen (Abb. 3) aufbauen. Diese Isoprenregel wurde später in dem Sinne erweitert, daß primär nicht nur Additionen von Isoprenmolekülen erfolgen, sondern sekundär auch Umwandlungen bzw. Umlagerungen eintreten können. Heute weiß man, daß beim Aufbau der Terpene und Steroide im Pflanzen- und Tierreich als „Isoprenbaustein“ die (*R*)-Mevalonsäure fungiert. Diese biogenetischen Zusammenhänge geben Veranlassung, beide Stoffklassen allgemein als Isoprenoide zu bezeichnen.

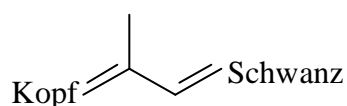


Abb. 3: Isoprenmolekül.

Nach der Anzahl der Isoprenreste (C_5 -Einheiten) lassen sich die Terpene in Mono-, Sesqui-, Di-, Sester-, Tri-, Tetra- und Polyterpene^[23] unterteilen (Abb. 4). Die Steroide leiten sich von einer Gruppe von Triterpenen, dem Methylsterol ab. Isoprenoide Bausteine werden auch als Bestandteile anderer Naturstoffe wie der Alkaloide, Chinone oder der Chlorophylle gefunden.

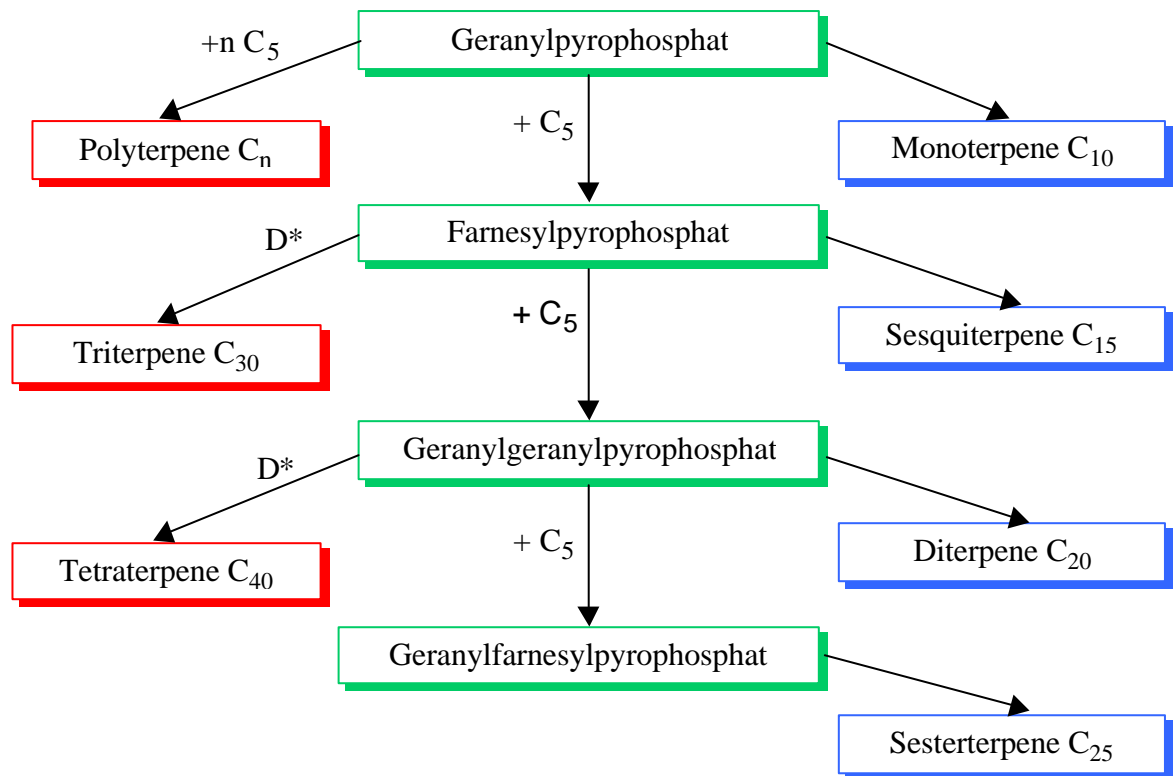


Abb. 4: Schematische Darstellung der Biosynthese der isoprenoiden Verbindungen.
D*: Schwanz-Schwanz-Kondensation.

Ruzicka^[24] konnte 1953 seine biogenetische Isopren-Regel formulieren, nach der sich die natürlichen isoprenoiden Verbindungen von acyclischen Vorstufen – Geraniol (C₁₀), Farnesol (C₁₅), Geranylgeraniol (C₂₀) und oder Squalen (C₃₀) – ableiten. Ausgangspunkte der Biosynthese ist die Mevalonsäure, die aus 3 Mol Acetyl-Coenzym A („aktivierte Essigsäure“) gebildet wird (Abb. 5). Durch Decarboxylierung und Eliminierung von Wasser entsteht aus dem Mevalonsäurepyrophosphat Isopent-3-enylpyrophosphat („aktiviertes Isopren“), das durch eine Isomerase in das stabilere 3,3-Dimethylallylpyrophosphat umgelagert wird (Abb. 5). Die Entdeckung des Allylpyrophosphats geht auf Lynen^[25] zurück.

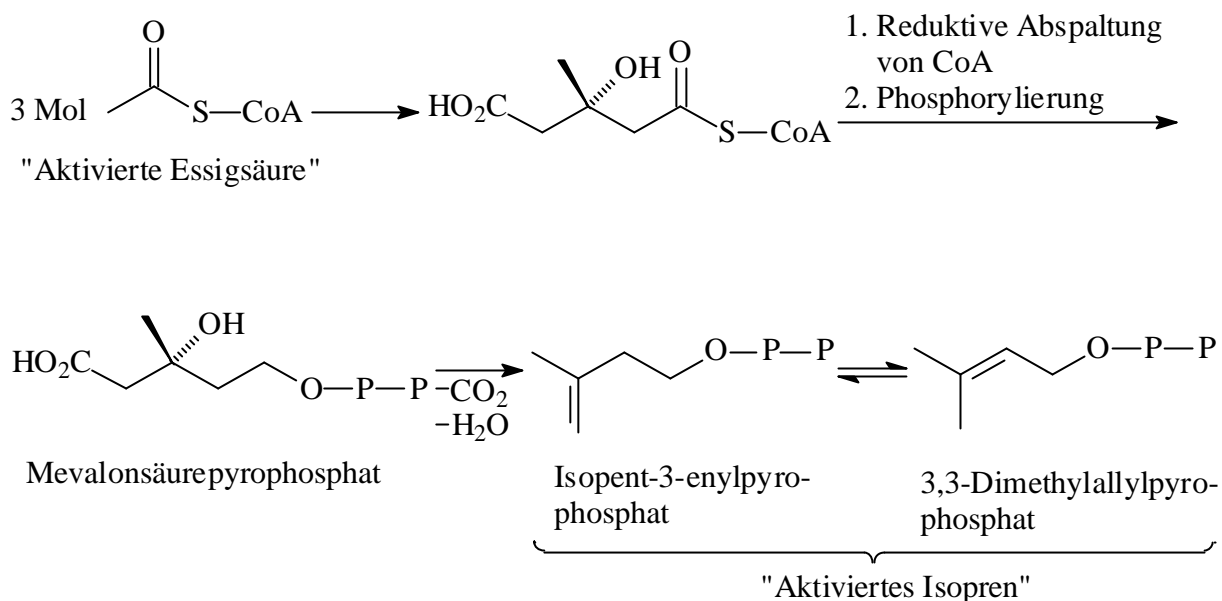


Abb. 5: Biosynthese des Mevalonsäure- bzw. Isopent-3-enylpyrophosphats.

Das 3,3-Dimethylallylpyrophosphat (DAPP) wirkt als stark elektrophiles Reagenz und greift unter Addition an der als Nucleophil wirkenden Doppelbindung von Isopentenylpyrophosphat (IPP) an (Kopf-Schwanz-Kondensation). Durch diesen kombinierten Substitutions-Eliminierungsmechanismus wird Geranylpyrophosphat gebildet, das wiederum als Allylderivat elektrophil an einem weiteren Isopentenylpyrophosphat (IPP) angreifen kann. Auf diese Weise entstehen die acyclischen Vorstufen der natürlichen isoprenoiden Verbindungen (Abb. 6). Die Doppelbindungen sind dabei *trans*-ständig angeordnet.

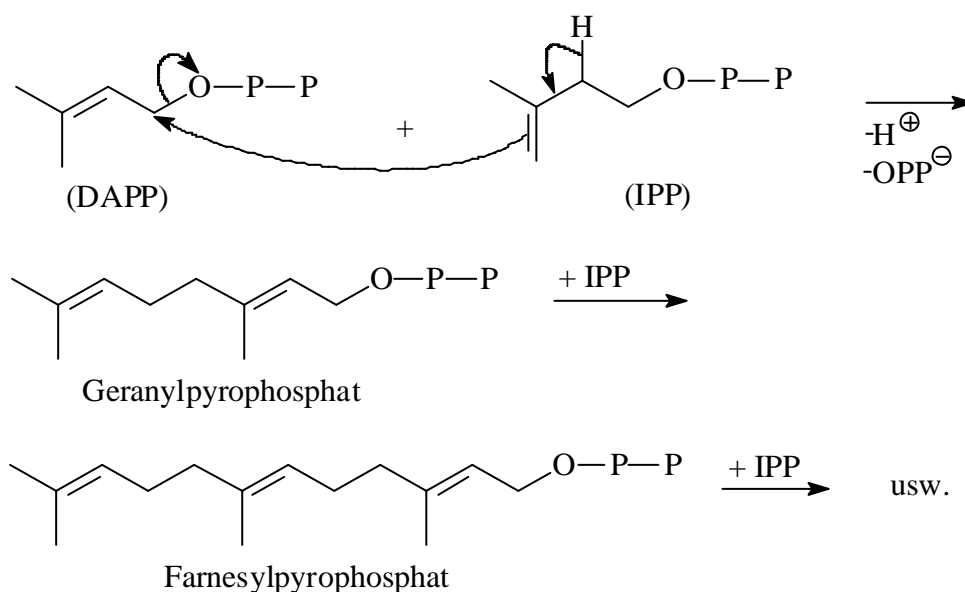


Abb. 6: Biosynthese acyclischer Terpene.

Neben dieser Kopf-Schwanz-Kondensation kann noch eine Schwanz-Schwanz-Kondensation erfolgen, die zu einer Dimerisierung führt (Abb. 4).

Der geschilderte Substitutions-Eliminierungsmechanismus, der zur Bildung acyclischer Verbindungen führt, kann sich auch innerhalb eines Moleküls abspielen. Die zahlreichen Möglichkeiten dieser intramolekularen Cycloaddition bedingen die Vielfalt der cyclischen Strukturen innerhalb der isoprenoiden Verbindungen. Bei den intramolekularen Cycloadditionen können im wesentlichen zwei Typen unterschieden werden. Bei den Terpenen mit geringer Anzahl von C-Atomen (Mono-, Sesquiterpene) greift eine Doppelbindung nucleophil an dem C-Atom an, das den Pyrophosphatrest trägt. Aus sterischen Gründen muß davon ausgegangen werden, daß als Vorstufen für die als Beispiel herangezogenen Sesquiterpene (Abb. 7) sowohl 2-*cis*-5-*trans*- (**a**) als auch 2-*trans*-6-*trans*-Farnesylpyrophosphat (**b**) fungieren können. Durch die Abspaltung des Pyrophosphats entstehen zunächst vielgliedrige nichtklassische Carbokationen (**c**, **d**, **e**), die nach Cyclisieren zu den Carbokationen **f**, **g**, **h**, **i** und **j** durch 1,2- und 1,3-Hydridverschiebungen, „Markownikoff“- und „Anti-Markownikoff“-Cyclisierungen, Wagner-Meerwein-Umlagerungen und 1,2-Methylverschiebungen die verschiedenen Sesquiterpen-Grundkörper bilden (Abb. 7).

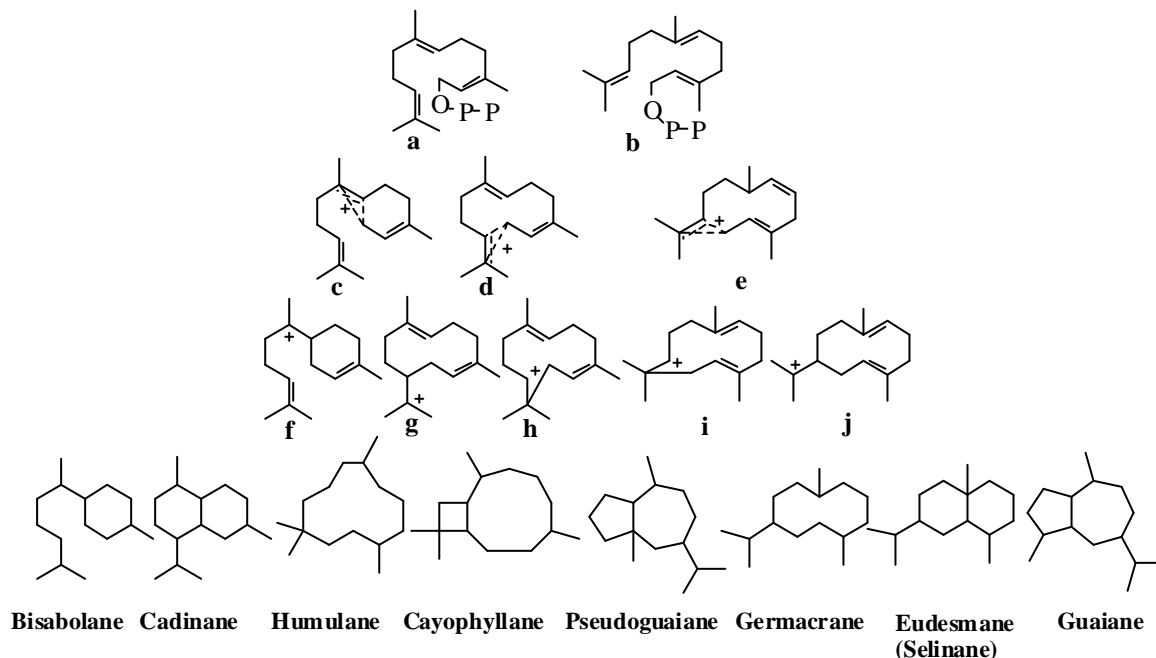


Abb. 7: Angenommene Bildungsmöglichkeiten einiger Sesquiterpengrundgerüste.^[26]

Bei den Diterpenen und den Terpenen mit einer größeren Anzahl von Kohlenstoffatomen überwiegt dagegen eine andere Art der Cyclisierung, bei der die terminale, nicht phosphorylierte Isopropyliden-Einheit als kationisches Zentrum die Reaktion einleitet. Diese Art der

Cyclisierung wurde zuerst zur Erklärung der Cyclisierung des Triterpen-Kohlenwasserstoffs Squalen im Verlaufe der Biosynthese tetracyclischer Triterpene angenommen. Die biosynthetische Reaktionskette wird eingeleitet durch die Bildung des Squalenoxids (Abb. 8).

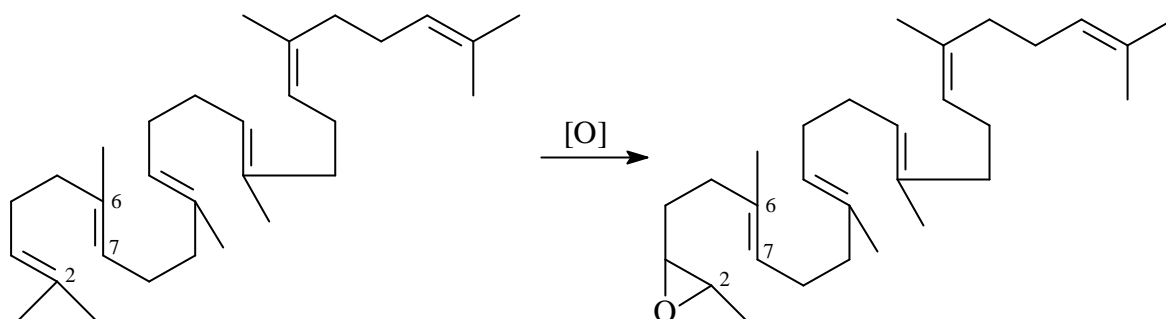


Abb. 8: Bildung des Squalenoxids.

Es wird angenommen, daß dann durch Protonierung des Sauerstoffatoms dieser Epoxidgruppierung am C-2-Atom ein kationisches Zentrum entsteht, welches durch die Doppelbindung in 6,7-Stellung angegriffen wird. Die weitere Cyclisierung kann man dann als Sequenz erneuter elektrophiler Additionen an den sich bildenden kationischen Zentren auffassen. Bei *trans*-ständigen Doppelbindungen ist eine *trans*-Verknüpfung der Ringe, bei *cis*-ständigen Doppelbindungen eine *cis*-Verknüpfung zu erwarten. Das bei der Cyclisierung von Squalen anfallende Ringsystem besitzt also eine *trans*-anti-*trans*-anti-*trans*-Geometrie (*trans*-ständige Verknüpfung der Ringe und anti-ständige Substituenten an den Positionen 9, 10 und 8, 14) (Abb. 9).

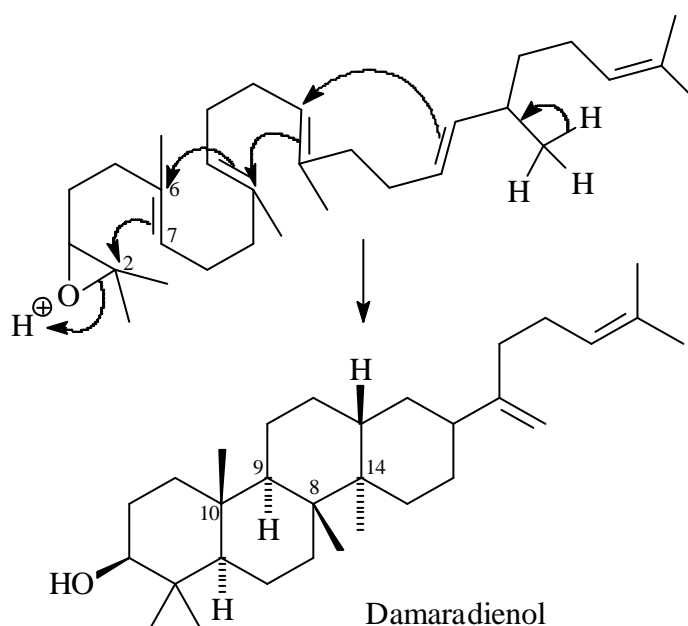


Abb. 9: Biosynthese tetracyclischer Terpene.

1.3.2. Aromatische Verbindungen

Carbocyclische aromatische Verbindungen sind in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren weit verbreitet. Die Biosynthese dieser Verbindungen erfolgt überwiegend auf zwei Wegen. Der erste Weg geht aus vom Kohlenhydratstoffwechsel und verläuft über die Shikimisäure (Shikimisäure-Weg). Dieser Weg wird vor allem von der höheren Pflanze beschritten.

Der zweite Weg schließt sich dagegen an die Fettsäuresynthese an. Im Unterschied zur Fettsäuresynthese werden jedoch die durch aufeinanderfolgende Anknüpfung von C₂-Einheiten (Acetat) entstehenden Ketocarbonsäure-Derivate nicht reduziert, sondern als Polyketo-Verbindungen zu mono- bis polycyclischen aromatischen Verbindungen cyclisiert (Polyketid-Weg). Der Polyketid-Weg wird vorzugsweise von Mikroorganismen beschritten.

1.3.2.1. Shikimisäure-Weg

Eine Verbindung von unerwarteter Wichtigkeit wurde 1885 aus der Frucht *Illicium refigosum* isoliert. Dieser wurde der Name Shikimisäure gegeben, abgeleitet von dem japanischen Namen „Shikimi-no-ki“ für diese Pflanze. Spätere Untersuchungen ergaben, daß die Shikimisäure unter anderem ein Schlüsselintermediat in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan in Pflanzen und Mikroorganismen darstellt.

Die Biosynthese der Shikimisäure geht aus von Erythrose-4-phosphat, aus dem durch Reaktion mit Phosphoenolpyruvat die Heptose 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonsäure-7-phosphat (Abb. 10) gebildet wird. Deren Cyclisierung führt zur 5-Dehydrochinasäure, aus der die Shikimisäure, aber auch die in Pflanzen weit verbreitete Chinasäure entsteht.

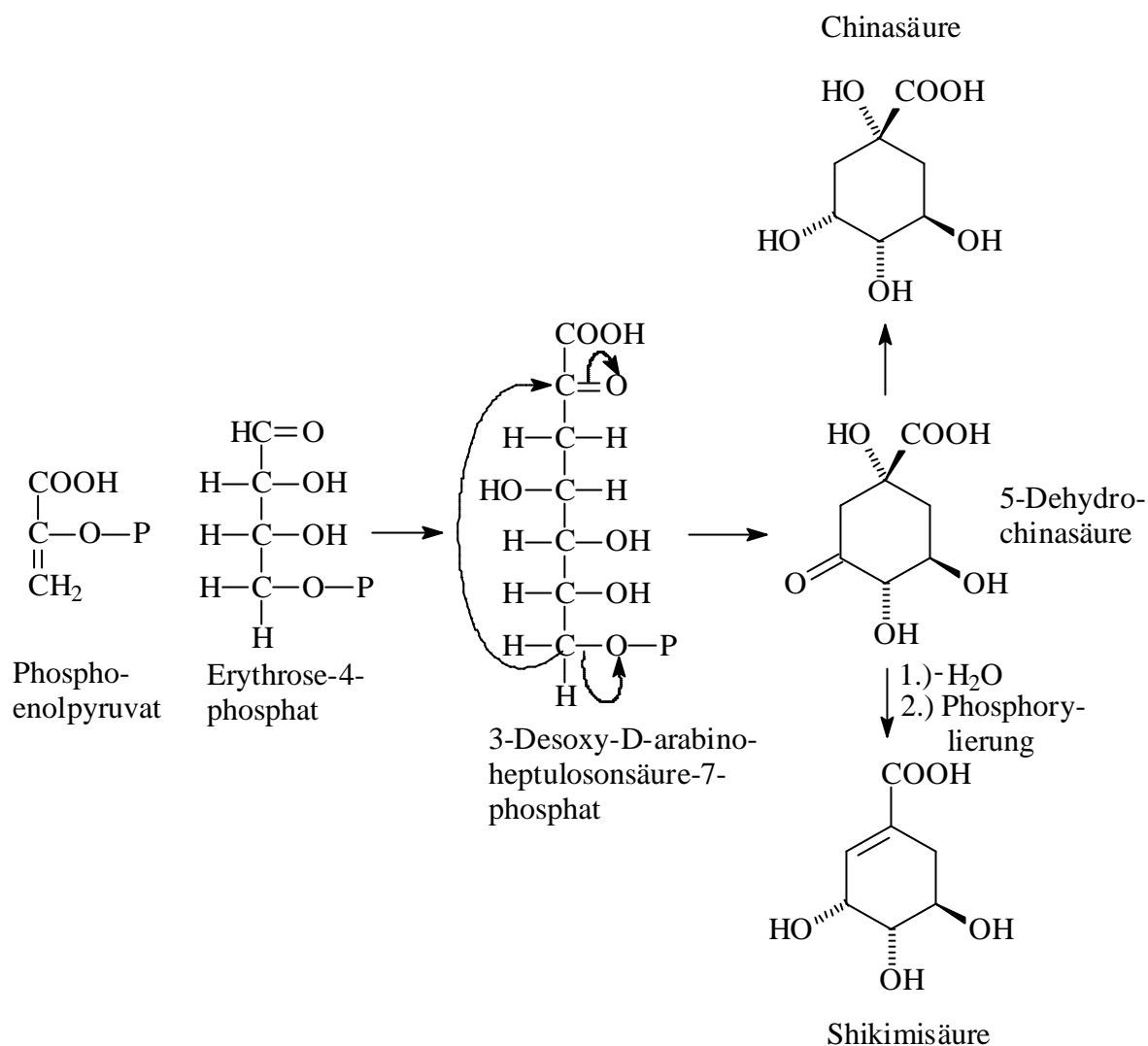


Abb. 10: Biosynthese der Shikimisäure.

Von der Shikimisäure leiten sich zahlreiche in Pflanzen vorkommende Aromaten ab, so die Protocatechusäure. Vom Shikimisäure-Weg zweigt auch die Biosynthese der Gallussäure ab, die Bestandteil der hydrolysierbaren Gerbstoffe ist.^[27] Nach Phosphorylierung wird aus der Shikimisäure die Chorisminsäure gebildet, aus der durch eine enzymkatalysierte pericyclische Claisen-Umlagerung die chinoide Prephensäure bzw. über die Anthranilsäure die essentielle Aminosäure Tryptophan entstehen (Abb. 11). Von der Prephensäure ausgehend, wird durch reduktive Aminierung und anschließender Aromatisierung das Phenylalanin bzw. Tyrosin gebildet. Die direkte Aromatisierung führt zur Phenylbrenztraubensäure, die als Ausgangspunkt für Cumarine, Flavonoide, Lignin und Lignane dienen kann.

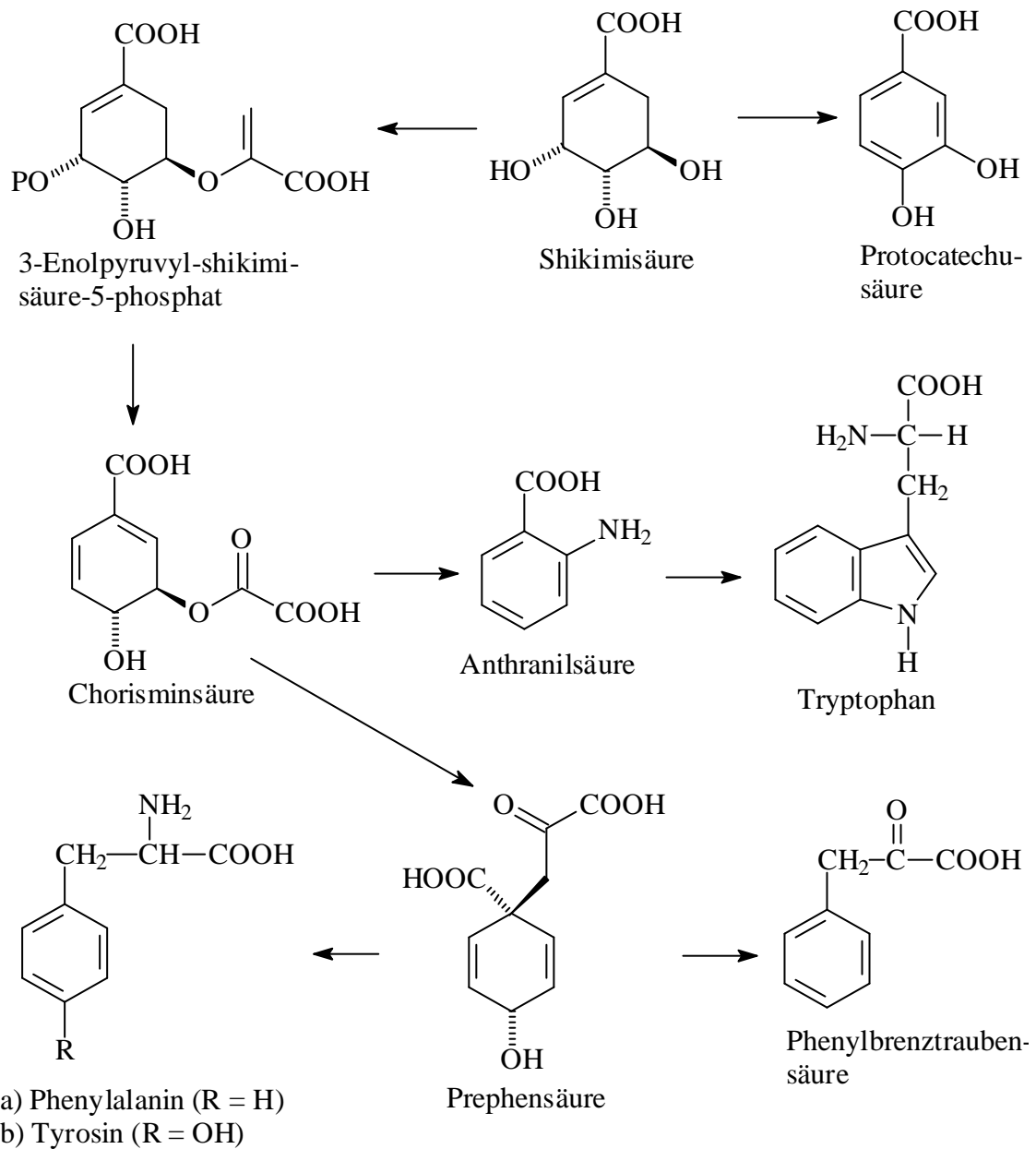


Abb. 11: Shikimisäure-Weg zur Biosynthese von Aromaten.

1.3.2.2. Polyketid-Weg

Unter Polyketiden werden aromatische Naturstoffe verstanden, die über Polyketosäuren als Intermediate gebildet werden. Da β -Ketosäurederivate auch als Intermediate bei der Fettsäuresynthese gebildet werden, bestehen enge Beziehungen zwischen der Biosynthese der Fettsäuren und dieser aromatischen Verbindungen. Dieser Weg der Biosynthese aromatischer Verbindungen findet nur in Mikroorganismen und höheren Pflanzen statt. Durch Versuche mit radioaktiven Precursoren konnte gesichert werden, daß die Bildung derartiger linearer β -Polyketosäuren durch wiederholte Reaktion eines Start-Moleküls mit Malonyl-CoA er-

folgen muß. Als Start-Molekül dient meist Acetyl-CoA, aber auch Propionyl-(Anthracycline), Malony-(Cycloheximid), Malonamido-(Tetracycline), Caproyl-(Cannabinoide) oder Cinnamoyl-CoA (Flavanoide)^[28,29] (Abb. 12).

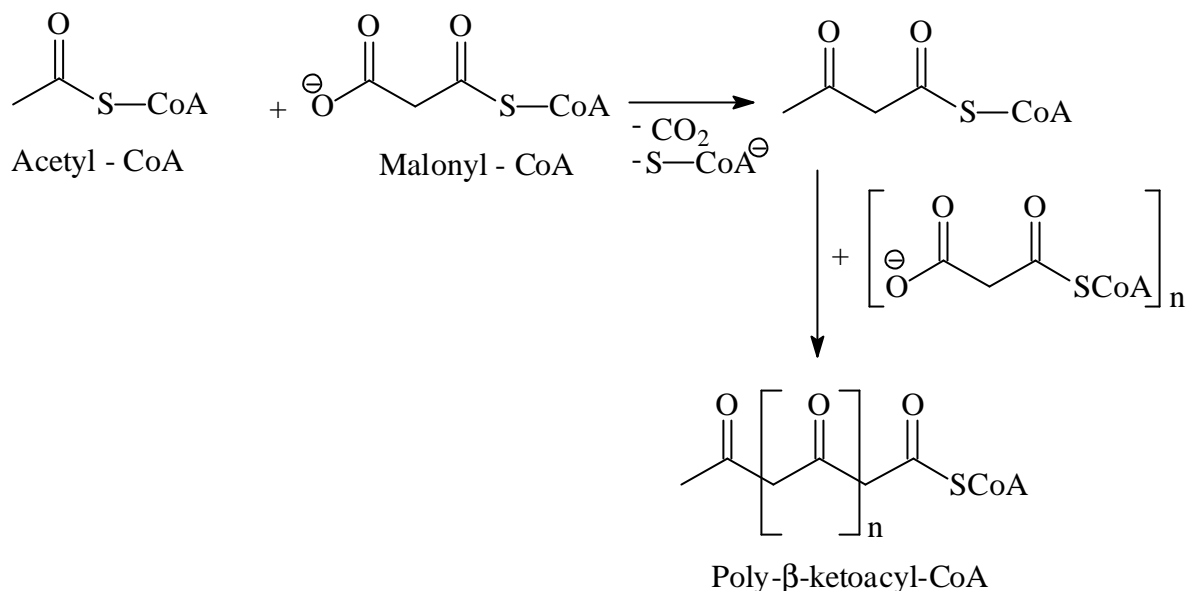


Abb. 12: Bildung linearer β -Polyketosäuren.

Die als Intermediate angenommenen Polyketosäure-Derivate $\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-(\text{CH}_2-\text{CO})_n-\text{CH}_2-\text{COOH}$ konnten allerdings – wahrscheinlich aufgrund ihrer Labilität – noch nicht isoliert werden. Im Verlaufe der Fettsäuresynthese werden die β -Ketosäure-Derivate durch Reduktion in Fettsäurereste übergeführt. Wenn einige Schritte der Reduktion der Ketogruppen zur Methylengruppe ausgelassen werden entstehen Hydroxy-Carbonsäuren, die durch Lactonisierung Makrolide bilden können. Bei der Synthese der Polyketide dagegen werden Polyketosäuren durch intramolekulare Kondensationen unter Aromatisierung cyclisiert.

Ein derartiger Polyacetat-Weg zur Synthese von Aromaten wurde 1907 zuerst von Collie^[30] vermutet. Eine wesentliche Rolle bei der Aufklärung dieses Bildungsweges haben dann vor allem die Arbeiten von Birch und Robinson^[31–33] gespielt. Als Cyclisierungsreaktionen werden insbesondere die Aldolreaktion und die Claisen-Kondensation diskutiert. Die Abbildung 13 zeigt einige von einem Tetraketid ausgehende Bildungsmöglichkeiten für benzoide Aromaten.

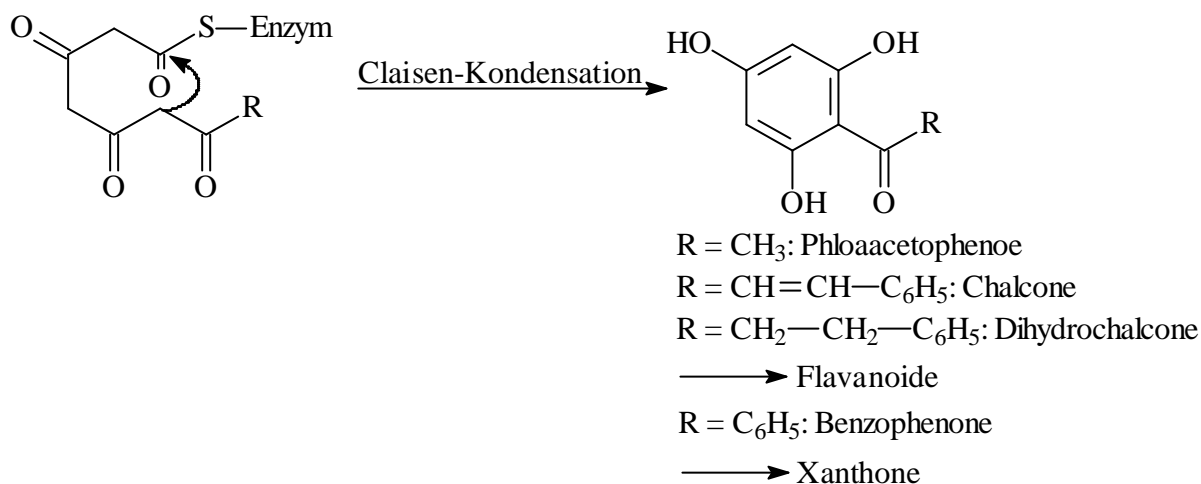
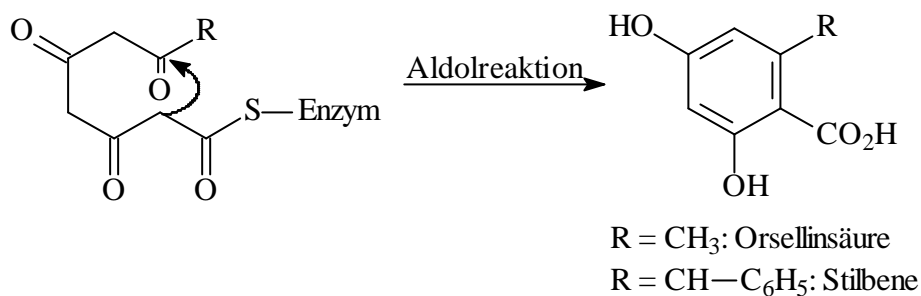


Abb. 13: Angenommene Biosynthese-Wege ausgehend von β -Triketo-Verbindungen.^[34]

Wertvolle Erkenntnisse zum Polyketid-Weg konnten aus biomimetischen Synthesen gewonnen werden. Wegen der extremen Instabilität der Polyketo-Verbindungen wird für derartige Synthesen von geschützten Verbindungen ausgegangen. Als geschützte Ketone werden Pyrone oder Ketale eingesetzt. Ein Beispiel einer biomimetischen Synthese eines Aromaten ist die Synthese des Emodins (Emodine kommen in Pilzen und Flechten vor), wobei das als instabiles Zwischenprodukt auftretende Polyketon aus Oxoglutarsäureester und dem Dienolat des Acetylacetons gebildet wird. Das nicht isolierbare Polyketid cyclisiert zum Naphthalinderivat, aus dem durch weitere Reaktionen Emodin entsteht (Abb. 14).

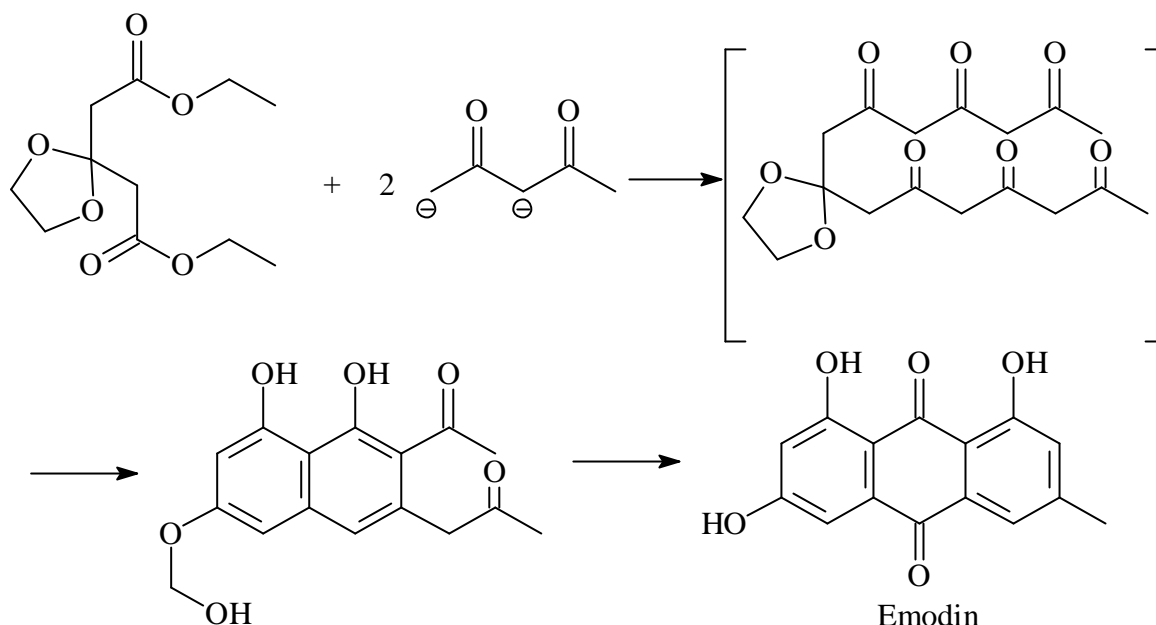


Abb. 14: Biomimetische Synthese des Emodins.

1.3.3. Alkaloide Verbindungen

Ein Alkaloid ist nach der Definition von Pelletier^[35] eine cyclische organische Verbindung, die Stickstoff in negativer Oxidationsstufe enthält und unter Organismen nur begrenzt verbreitet ist. Sie bilden eine große Gruppe mit unterschiedlichsten Strukturen.^[36,37] Die Alkaloide sind nach ihrer Biosynthese in vier Gruppen zu unterteilen.

1.3.3.1. Die „echten“ Alkaloide

Die Hauptgruppe läßt sich von proteinogenen Aminosäuren oder einigen ihnen biochemisch nahestehenden stickstoffhaltigen Säuren herleiten. Der Stickstoff geht mit einigen Kohlenstoffatomen in die Synthese ein. Das Carbonylkohlenstoffatom der Aminogruppe geht meist verloren. Die Vorstufen dieser Alkaloide sind bevorzugt die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan und die zweibasigen Aminosäuren Ornithin und Lysin, daneben noch Derivate der Anthranilsäure und der Nikotinsäure. In den einfachsten Fällen ist überhaupt nur eine Aminosäure mit einem oder mehreren Molekülen an der Bildung eines heterocyclischen Systems beteiligt. Als einfaches Beispiel wurde die Biosynthese des Lupinins und des Sparteins aufgeführt. Lysin kann durch oxidative Desaminierung und Decarboxylierung über Cadaverin in einen Aminoaldehyd verwandelt werden, der leicht im Sinne der Bildung einer Schiffchen Base cyclisiert und damit den Tetrahydropyridin-Ring ergibt. Solche Reaktionen können auch mit mehreren Lysinmolekülen ablaufen. So entstehen die

typischen Lupinen-Alkaloide. Aus zwei Lysin-Molekülen entsteht das Lupinin, aus drei Lysin-Molekülen das Spartein (Abb. 15).

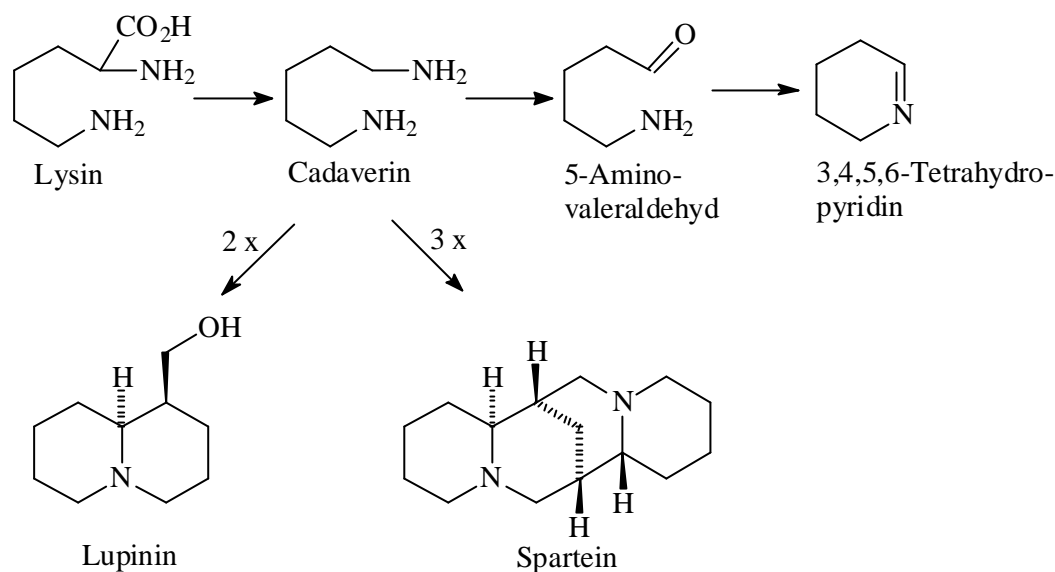


Abb. 15: Biosynthese des Lupinin und des Spartein.

Dieses Beispiel stellt nur einen sehr einfachen Fall dar. Die große Mannigfaltigkeit, in der die verschiedenen Alkaloid-Typen in Erscheinung treten, werden im wesentlichen noch durch folgende Faktoren verursacht:

- Hydrierung und Dehydrierung
- durch Anlagerung von Sauerstoff unter Mitwirkung von mischfunktionellen Oxidasen
- durch Methylierungen am Stickstoff, am Sauerstoff oder auch am Kohlenstoff unter Mitwirkung von transmethylierenden Enzymsystemen, bei denen entweder aktiviertes Methionin, Tetrahydrofolsäure oder Cholin die CH_2 -Spender sind.

1.3.3.2 Pseudoalkaloide

Als Pseudoalkaloide bezeichnet man Verbindungen, deren Kohlenstoffgrundgerüst nicht von Aminosäuren herrührt. Das C-Gerüst der Pseudoalkaloide wird vor allem von isoprenoiden Verbindungen (Steroid-Alkaloide) oder Polyketiden gebildet. Der Stickstoff (in Form von NH_3) wird bei den Pseudoalkaloiden meist erst in einer späteren Phase der Biosynthese eingebaut. Als Beispiel soll die Biosynthese des Pseudoalkaloids Coniin angeführt werden, die ausgehend von vier Molekülen Acetat, über das in Abb. 16 dargestellte hypothetische Polyketid erfolgt. Coniin und das zunächst gebildete γ -Conicein sind leicht ineinander

überführbar. Isoprenoide Verbindungen und Polyketide können aber auch neben Aminosäuren als Bausteine von Alkaloiden dienen.

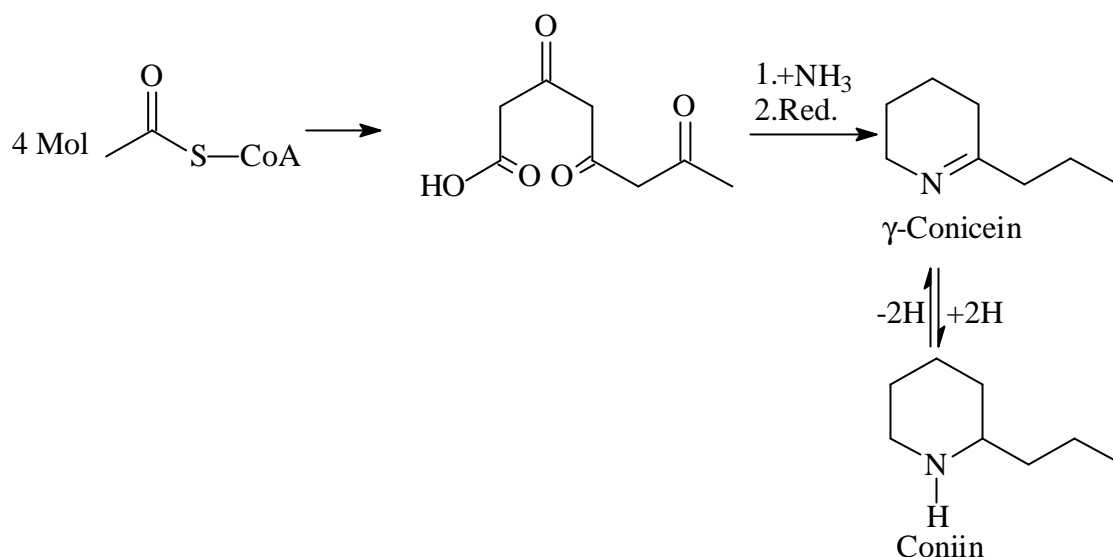


Abb. 16: Biosynthese des γ -Coniceins bzw. Coniins.

1.3.3.3. Peptidalkaloide

Eine dritte Gruppe wird als Peptidalkaloide klassifiziert. Es handelt sich meist um cyclische Oligopeptide von 2–20 Aminosäuren, die sich gehäuft in Rhamnaceen und Celastraceen finden. Bei diesem Typ bleibt die Carboxylgruppe der Aminosäuren erhalten, ihr C-Atom geht in die Ringbildung mit ein. Es entsteht so ein heterocyclisches System, das zudem oft basischen Charakter hat (Abb. 17).

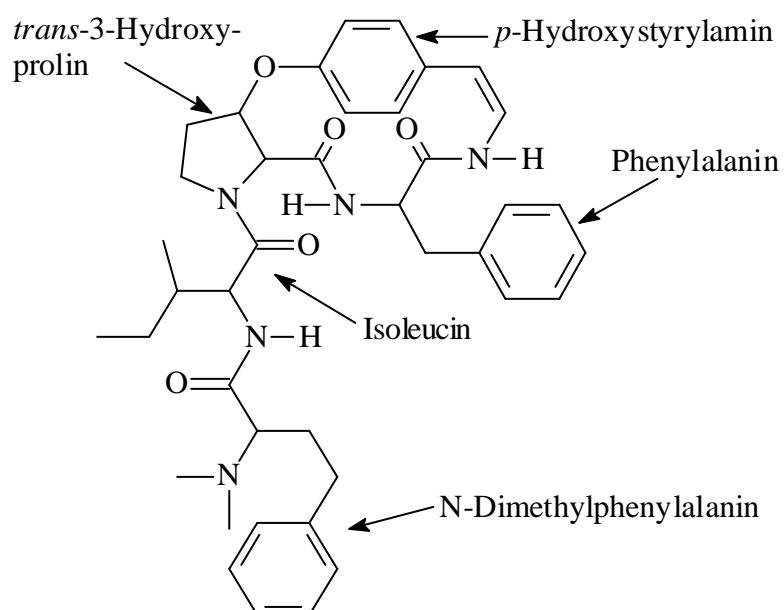


Abb. 17: Das Peptidalkaloid Amphibin-B.

1.3.3.4. Protoalkaloide

Als Protoalkaloide bezeichnet man die Decarboxylierungsprodukte von Aminosäuren (biogene Amine) (Abb. 18) und deren Substitutionsprodukte (Alkyl- und Hydroxyderivate) sowie Aminosäurederivate, bei denen das Stickstoffatom noch acyclisch vorliegt.

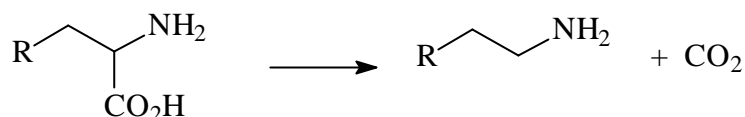


Abb. 18: Bildung der Protoalkaloide durch Decarboxylierung von Aminosäuren.

Die Protoalkaloide sind in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren frei oder gebunden relativ weit verbreitet. Einige sind Bestandteile von Lipiden (Colamin, Cholin) oder Coenzymen (Cysteamin, β -Alanin, Propanolamin). In Tieren dienen Derivate der Protoalkaloide als Neurotransmitter (Acetylcholin, Catecholamine, Tryptamin, Serotonin, Histamin). Die Diamine Putrescin und Cadaverin sind Fäulnisprodukte. Von Putrescin leiten sich die Polyamine Spermidin [Mono-(γ -aminopropyl)putrescin] und Spermin [Di-(γ -aminopropyl)putrescin] ab, die DNS-Assoziante bilden.

Die bedeutendsten Gruppen von Protoalkaloiden stellen die Phenylethylamine (Mescaline, Ephedrin, etc.) und die Indolylalkylamine (Tryptamin, Serotonin, Gramin, etc.) dar, von denen sich die Isochinolin- bzw. Indolalkaloide ableiten.^[38, 39]

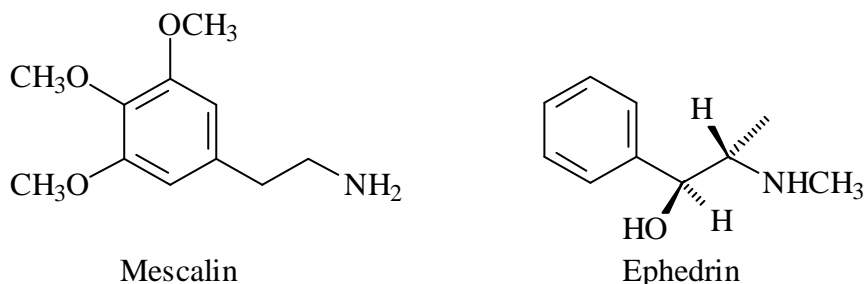


Abb. 19: Die Phenylethylamine Mescaline und Ephedrine.

2. Aufgabenstellung und Zielsetzung

Trotz aller Fortschritte auf den Gebieten der Wirkstoffentwicklung im Pflanzenschutz und in der Pharmaforschung besteht nach wie vor ein großer Bedarf an neuen innovativen Leitstrukturen und Wirkstoffen. Dies bezieht sich in der Agrochemie insbesondere auf Verbindungen, die optimal ökologisch verträglich, in kleineren Mengen selektiv wirksam und dennoch kostengünstiger als bereits am Markt etablierte Produkte sind. In der Pharmaforschung besteht ein großes Interesse an Wirkstoffen gegen nahezu alle Stoffwechselerkrankungen, immunologische Krankheitsformen, die verschiedenen Krebserkrankungen sowie auch neuro-degenerative Erkrankungen und parasitäre, virale und bakterielle Infektionen.

Eine wichtige Plattform bei der Suche nach neuen Wirkstoffen bildet die Auswahl origineller Naturstoffquellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, aus der bisher wenig untersuchten Pilzgruppe der endophytischen Pilze und aus Pilzen, die extreme Standorte bevorzugen, pflanzenschutz- und pharmawirksame Sekundärmetabolite zu isolieren, zu charakterisieren und gegebenenfalls zu synthetisieren.

Die Durchführung erfolgte im Rahmen eines vom BMBF geförderten Forschungsprojekts für „Molekulare Naturstoffforschung“ in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Technischen Universität Braunschweig und der BASF AG Ludwigshafen.

Die Auswahl, Aufzucht und Kultivierung der Pilze sowie erste Pflanzenschutztests der Rohextrakte und der Naturstoffe wurden im Arbeitskreis von Herrn Prof. Aust unter Leitung von Frau Dr. Schulz im Institut für Mikrobiologie in Braunschweig durchgeführt. Für das pharmakologische Screening mittels molekularer Testsysteme sowie die weiterführende Testung bei einigen vielversprechenden Substanzen im Pflanzenschutz war die BASF AG verantwortlich.

3. Hauptteil I

3.1 Stamm 3037

3.1.1. Pilzbeschreibung

Der Pilz 3037 wurde aus einer Erdprobe von der Spitze des Enlang-Berges (China, 4000 m) isoliert. Taxonomisch wurde dieser der Art *Oidiodendron truncata* Barron zugeordnet. *Oidiodendron* gehört zur Abteilung Deuteromycota und ist eine anamorphe Gattung der teleomorphen Gattung *Myxotrichum* und *Byssosascus*. Bekannt ist, daß Pilze der Gattung *Oidiodendron* häufig Symbiosen (Mykorrhiza) mit der Pflanzengruppe *Ericaceae* (Moosbeeren, Heidekraut usw.) eingehen.^[40] So wurden die Arten *Oidiodendron echinulatum* und *truncatum* aus Koniferen-Sümpfen in Wisconsin isoliert, aber auch aus offenen Mooren, Mischwäldern und aus der Rhizosphäre von Weizenpflanzen.^[41]

3.1.2. Isolierung der Naturstoffe 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7

Der Pilz wurde sowohl auf einem Biomalz-Flüssigmedium als auch auf einem Biomalz-Weichagarmedium 27 bzw. 70 Tage kultiviert. Anschließend wurde die Kulturbrühe mit Eiswasser verdünnt und mit einem Waring-Blender homogenisiert. Danach wurde einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der so erhaltene Rückstand abschließend in Methanol/Aceton 1:1 aufgenommen.

Während das Petrolether- und Ethylacetat-Extrakt der Biomalz-Flüssigkultur starke Wirkung gegen *Ustilago violacea* und *Chlorella fusca* zeigte, war diese Wirkung in der Biomalz-Weichagarkultur nur im Ethylacetat-Extrakt zu beobachten.

Die Vorfraktionierung des Ethylacetat-Rohextraktes (ca. 2.1 bzw. 2.6 g) erfolgte mittels Säulenchromatographie. Als Elutionsmittel diente eine Dichlormethan/Methanol-Mischung mit einem Methanolgehalt von 0–5 %. Die mit Abstand größte und unpolarste Fraktion (ca. 1.6 bzw. 2.2 g) bestand aus einem symmetrischen Triglycerid, welches aus zwei Linol- und einem Ölsäurerest aufgebaut ist. Die weitere Fraktionierung gelang durch mehrmalige präparative Schichtchromatographie (PSC). Dabei wurden neben Linolsäure 8 mg eines Gemisches der Naturstoffe **1** und **2** isoliert. Deren Trennung gelang durch PSC mit einer 1:4-Mischung Ethylacetat/Hexan.

Die Naturstoffe **3**, **4**, **5** und **6** konnten neben einer großen Fraktion des Naturstoffs **1** aus einer weiteren Biomalz-Flüssigkulturcharge isoliert werden. Diese wurde 27 Tage bei 17 °C kultiviert. Die 2.3 g des Ethylacetat-Extraktes wurden analog zu den bereits untersuchten Extrakten vorgetrennt. In der Fraktion des Naturstoffs **1** konnte der Sekundärmetabolit **3** (10 mg) (R_f -Wert = 0.77 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98:2) durch PSC isoliert werden. Ebenso gelang die Isolierung der Naturstoffe **4** (15 mg), **5** (13 mg) und **6** (3 mg) aus einer polareren Fraktion. Die abschließende Reinigung der Naturstoffe **1**, **3** und insbesondere die der polaren Naturstoffe **4**, **5** und **6** erfolgte mittels Kristallisation in Dichlormethan/Cyclohexan bzw. Methanol. Angemerkt sei desweiteren, daß die gewählte Nummerierung der Sekundärmetabolite **1–6** mit der zunehmenden Polarität der Substanzen korreliert. Der Naturstoff **7** (10 mg) wurde aus dem Petroletherextrakt (200 mg) dieser Charge durch PSC und Kristallisation aus einem Dichlormethan/Cyclohexan-Gemisch gewonnen.

3.1.3. Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe

3.1.3.1. Naturstoff **1**

Der Naturstoff **1** kristallisiert in Form farbloser Prismen, die bei 231 °C schmelzen. Die Kristalle lösen sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität, wie Chloroform und Dichlormethan. Die Verbindung besitzt einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = + 91^\circ$ ($c = 0.98$, MeOH) und ist durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar. Die scharfen Absorptionsbanden bei 1773 cm^{-1} und 1717 cm^{-1} im IR-Spektrum sind ein Indiz für die Anwesenheit zweier Carbonylgruppen. Die Bande bei $\nu = 1773\text{ cm}^{-1}$ ist aufgrund ihrer relativ großen Verschiebung nach höheren Frequenzen sogar ein bemerkenswert zuverlässiger Hinweis auf ein γ -Lacton. Dem ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektrum und dem DEPT 135-Experiment ist zu entnehmen, daß die Substanz jeweils drei Methyl- und Methylengruppen sowie fünf Methingruppen und sechs quartäre Kohlenstoffatome besitzt (Tabelle 1).

C	Naturstoff 1	
	¹³ C-NMR (δ/ppm)	¹ H-NMR (δ/ppm)
1	29.9 (t)	1.44-1.80 (m)
2	17.9 (t)	1.44-1.80 (m)
3	28.7 (t)	1.44-1.80, 2.15-2.28 (m)
4	42.3 (s)	–
5	44.1 (d)	1.90 (d)
6	72.3 (d)	4.95 (dd)
7	53.4 (d)	4.02 (d)
8	56.6 (s)	–
9	157.5 (s)	–
10	36.3 (s)	–
11	118.8 (d)	6.04 (s)
12	162.6 (s)	–
13	99.9 (d)	5.46 (s)
14	25.6 (q)	1.29 (s)
15	180.6 (s)	–
16	24.5 (q)	1.14 (s)
17	58.1 (q)	3.67 (s)

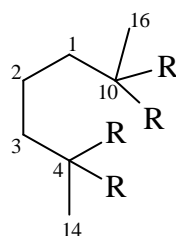
Tabelle 1: ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des Naturstoffs 1.

Die Summenformel ohne Heteroatomanteil lautet demnach C₁₇H₂₀ und entspricht einer vorläufigen Molmasse von 224. Die massenspektroskopischen Untersuchungen (CI) ergeben, daß die Molmasse der Substanz 320 beträgt. Die Massendifferenz von 96 und die chemischen Verschiebungen im ¹H- und ¹³C-NMR-Spektrum lassen vermuten, daß die korrekte Summenformel C₁₇H₂₀O₆ lautet. Durch die Bestimmung der Präzisionsmasse des [M–H][–]-Peaks zu 319.118 ± 2 ppm konnte dies verifiziert werden.

Die konstitutionelle Strukturaufklärung erfolgt mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie. Das Protonenspektrum zeigt zwei Singulets bei 1.14 und 1.29 ppm, die aufgrund ihrer Integrale zwei Methylgruppen zuzuordnen sind (Tab. 1). Ein weiteres Drei-Protonen-Singulett bei 3.67 ppm weist auf eine Methoxygruppe hin. Die Protonensignale 7-H und 6-H sowie die im H,C-COSY korrelierenden ¹³C-Peaks bei 53.4 und 72.3 ppm zeigen, daß diese Kohlenstoffatome einfach oxygeniert sind. Das Methinprotonensignal 13-H korreliert im H,C-COSY mit dem ¹³C-NMR-Signal bei 99.9 ppm, das charakteristisch für einen zweifach oxygeniertes Kohlenstoffatom ist. Das Singulett bei 6.04 ppm im Protonenspektrum ist einer olefinischen CH-Gruppe zuzuordnen, deren ¹³C-Verschiebung bei 118.8 ppm liegt. Die quartären ¹³C-NMR-Signale bei 180.6 ppm und 162.6 ppm sind typisch

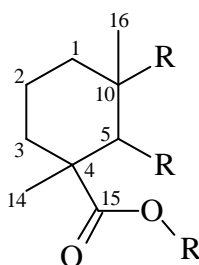
für Ester- oder Lactoncarbonylgruppen bzw. α,β -ungesättigte Ester oder Lactone (Eine Carbonsäurefunktion kommt aufgrund des unpolaren Charakters der Verbindung nicht in Frage).

Zum Aufbau des Strukturgerüsts wird die zweidimensionale NMR-Technik genutzt. Das H,H-COSY zeigt, daß die drei Methylengruppen 1-H, 2-H und 3-H nur untereinander koppeln. Desweiteren sind im HMBC-Spektrum 2J - bzw. 3J -Konnektivitäten zwischen beiden quartären Kohlenstoffatomen C-10 und C-4 und den Methylenprotonen zu beobachten. Die Singulettssignale der Methylgruppen bei 1.14 und 1.29 ppm zeigen im HMBC-Spektrum ihrerseits fast erwartungsgemäß 2J -Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen C-10 und C-4, so daß die Teilstruktur I konstruiert werden kann.



Teilstruktur I

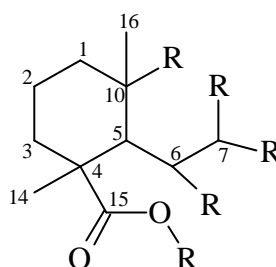
Dem HMBC-Spektrum ist weiter zu entnehmen, daß sowohl die beiden quartären Kohlenstoffatome C-10 und C-4, als auch die beiden Methylgruppen und die Methylengruppe C-3 mit einer Methingruppe mit der Protonenresonanz $\delta = 1.90$ ppm koppelt. Diese Methingruppe (C-5) zeigt ihrerseits, wie die Methylgruppe bei $\delta = 1.29$ ppm und die Methylengruppe C-3, eine 3J -Kopplung zum ^{13}C -NMR-Signal bei 180.6 ppm, welches einem Lacton oder Ester zuzuordnen ist (Teilstruktur II).



Teilstruktur II

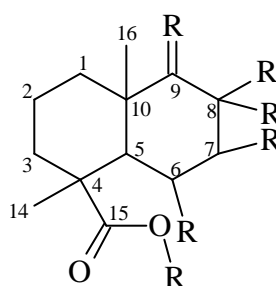
Für das Duplett der Methingruppe C-5 wird ebenso wie für das Doppelduplett der Methingruppe C-6 eine Kopplungskonstante von $J = 4.4$ Hz registriert. Das H,H-COSY-Spektrum liefert ebenfalls einen Beleg für die Kopplung der beiden Protonen. Das Doppelduplett 6-H

koppelt desweiteren im H,H-COSY mit einer Methingruppe mit der chemischen Verschiebung von $\delta = 4.02$ ppm (Teilstruktur III).



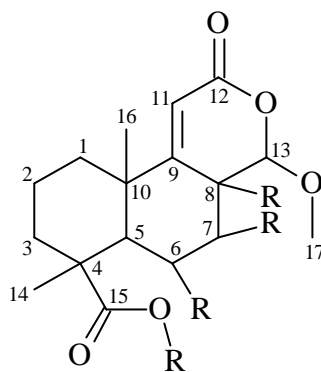
Teilstruktur III

Im HMBC-Spektrum ist, ausgehend vom Protonensignal 6-H, ein Kreuzsignal zum quartären Kohlenstoffatom C-8 zu beobachten. Ferner ist auch von der Methylgruppe C-16 eine 3J -Konnektivität zu dem Kohlenstoffatom C-9 detektierbar, so daß Teilstruktur IV konstruiert werden kann.



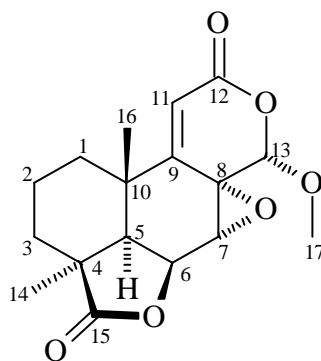
Teilstruktur IV

Die quartären Kohlenstoffatome C-10 und C-8 zeigen beide eine vicinale Kopplung zu dem Proton der olefinischen CH-Gruppe C-11, für welches seinerseits eine 2J -Kopplung zum Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung $\delta = 162.6$ ppm registriert wird. Im HMBC-Spektrum ist, ausgehend vom Kohlenstoffatom C-8, eine Kopplung zum Protonensignal $\delta = 5.46$ ppm (13-H) detektierbar. Vom entsprechenden ^{13}C -Signal bei $\delta = 99.9$ ppm ist im HMBC-Spektrum ein deutliches Kreuzsignal zur Methoxygruppe vorhanden. Die Tieffeldverschiebung der Methingruppe C-13 ist, wie vermutet, auf eine Zweifach-Oxygenierung zurückzuführen, so daß, wie in Teilstruktur V ersichtlich, ein α,β -ungesättigtes Lacton formuliert werden kann.



Teilstruktur V

Ein weiteres Indiz für die Richtigkeit der Struktur sind die typischen ^{13}C -NMR-Verschiebungen für olefinische Kohlenstoffatome, die α - bzw. β -ständig zu einer Carbonylgruppe stehen. Durch die Knüpfung des Sauerstoffs an die Methingruppe C-6 erhält man das anhand des IR-Spektrums prognostizierte γ -Lacton. Die chemischen Verschiebungen der Methingruppe C-7 und des Kohlenstoffatoms C-8 sowie die anhand der Präzisionsmasse bestimmte Summenformel zeigen, daß zur Vervollständigung der Struktur nur noch ein Sauerstoffatom zur Bildung des Epoxids eingefügt werden muß. Der Naturstoff **1** besitzt demnach die in Abbildung 1 dargestellte Struktur.

Abb. 20: Absolute Konfiguration des Naturstoffs **1**.

Die Literaturrecherche ergibt, daß dieses Terpenoidlacton mit der Bezeichnung Antibiotic PR 1388 erstmals 1984 von Andersen^[42] ebenfalls aus *Oidiodendron truncatum* isoliert und charakterisiert wurde. Der Schmelzpunkt wird mit 232–233 °C und der Drehwert mit $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +84^\circ$ ($c = 0.3$; MeOH) angegeben. Auf die absolute Konfiguration des Naturstoffs **1** wurde von Anderson anhand von strukturell ähnlichen Terpenoiden geschlossen,

deren absolute Konfiguration bereits bekannt ist und die ebenfalls bei der Biosynthese dieses Pilzes gebildet werden.

3.1.3.2. Naturstoff 2

Der in farblosen Nadeln kristallisierende Naturstoff **2** zeigt einen Schmelzpunkt von 223–224 °C. Dünnschichtchromatographisch ist er mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar. Der spezifische Drehwert beträgt $[\alpha]_D^{20} = -13.2^\circ$ ($c = 0.24$; CH_2Cl_2). Die Löslichkeit des Sekundärmetaboliten **2** in Lösungsmitteln mittlerer Polarität (Dichlormethan, Chloroform) ist gut. Die charakteristischen Absorptionsbanden im IR-Spektrum sind bei 1778 cm^{-1} und 1716 cm^{-1} zu finden. Dies deutet in Analogie zum Naturstoff **1** auf die Anwesenheit eines γ -Lactons und eines α,β -ungesättigten Lactons hin. Ein Vergleich der ^1H und ^{13}C -NMR-Spektren der Naturstoffe **1** und **2** zeigt, daß beide Verbindungen fast identische bzw. identische Signale aufweisen (siehe Tab. 2).

C	Naturstoff 1		Naturstoff 2	
	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	29.9 (t)	1.44-1.80 (m)	28.4 (t)	1.40-1.76 (m)
2	17.9 (t)	1.44-1.80 (m)	17.5 (t)	1.40-1.76 (m)
3	28.7 (t)	1.44-1.80, 2.15-2.28 (m)	29.6 (t)	1.40-1.76, 2.15-2.28 (m)
4	42.3 (s)	–	41.9 (s)	–
5	44.1 (d)	1.90 (d)	43.8 (d)	1.90 (d)
6	72.3 (d)	4.95 (dd)	72.2 (d)	4.98 (dd)
7	53.4 (d)	4.02 (d)	53.2 (d)	3.90 (d)
8	56.6 (s)	–	55.5 (s)	–
9	157.5 (s)	–	157.6 (s)	–
10	36.3 (s)	–	35.9 (s)	–
11	118.8 (d)	6.04 (s)	118.4 (d)	6.04 (s)
12	162.6 (s)	–	162.5 (s)	–
13	99.9 (d)	5.46 (s)	71.9 (t)	4.13 (d), 4.71 (d)
14	25.6 (q)	1.29 (s)	25.3 (q)	1.30 (s)
15	180.6 (s)	–	180.2 (s)	–
16	24.5 (q)	1.14 (s)	24.0 (q)	1.15 (s)
17	58.1 (q)	3.67 (s)		

Tabelle 2: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **1** und **2**.

Auffällig ist, daß im Protonenspektrum des Naturstoffs **2** das Signal für die Methoxygruppe fehlt. Ein weiterer signifikanter Unterschied läßt sich am Kohlenstoffatom C-13 erkennen.

Während das C-13-Signal im ^{13}C -NMR-Spektrum des Naturstoffs **1** einer durch den Sauerstoff des Lactons und der Methoxygruppe zweifach-oxygenierten Methingruppe zuzuordnen ist, ist im ^{13}C -NMR-Spektrum des Naturstoffs **2** eine Methylengruppe, die eine chemische Verschiebung von $\delta = 71.9$ ppm aufweist, zu finden. Die entsprechenden Protonensignale bei 4.13 und 4.71 ppm bilden ein AB-Spinsystem mit einem schwach ausgeprägtem Dacheffekt und einer geminalen Kopplungskonstanten von 12.4 Hz. Der Naturstoff **2** sollte demnach im Gegensatz zu Naturstoff **1** die in Abb. 2 dargestellte Struktur besitzen. Verifiziert wurde die Struktur des literaturunbekannten Sekundärmetaboliten **2** durch die ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Die Methylengruppe in Position C-13 zeigt im HMBC-Spektrum ebenso wie die Methingruppe in Verbindung **1** 2J - und 3J -Kopplungen zu den Kohlenstoffatomen C-8, C-9 und C-12. Desweiteren ist im Massenspektrum (CI) ein Molpeak bei $m/z = 290$ detektierbar, welcher der angenommenen Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$ entspricht. Durch die HRMS, die eine Präzisionsmasse von 290.115 ± 2 ppm liefert, wird die Summenformel der Verbindung bestätigt. Aufgrund der gleichen Kopplungskonstanten des AMX-Systems 5-H, 6-H und 7-H, der fast identischen chemischen Verschiebung in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren und des wohl gleichen Biosyntheseweges ist davon auszugehen, daß das Diterpenoid **2** die gleiche Konfiguration wie Verbindung **1** besitzt.

Der literaturunbekannte Naturstoff **2** ist nach unserem Kenntnisstand der einzige Vertreter dieser Terpenoid-Lactone, der am Kohlenstoffatom C-13 keinen Substituenten trägt. Selbst unter den strukturell sehr ähnlichen Nagilactonen, Inumakilactonen oder Podolactonen ist keine derartiger Verbindung bekannt (Chapman-Hall- und Beilstein-Datenbank-Recherche).

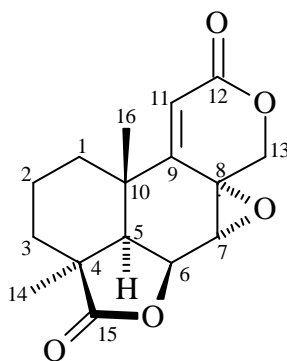


Abb. 21: Der literaturunbekannte Naturstoff **2**.

3.1.3.3. Naturstoff 3

Der in farblosen Prismen kristallisierende Feststoff besitzt einen Schmelzpunkt von 222 °C. Der spezifische Drehwert beträgt $[\alpha]_D^{20} = -206^\circ$ ($c = 0.45$, MeOH). Dünnschichtchromatographisch ist der Naturstoff bei 254 nm gut detektierbar. Das IR-Spektrum zeigt bei 1765 cm^{-1} , 1735 cm^{-1} und 1720 cm^{-1} wiederum Absorptionsbanden, die auf ein γ -Lacton-Strukturfragment und ein α,β -ungesättigtes Lacton hindeuten. Die ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß die Substanz ebenso wie Naturstoff **1** 17 Kohlenstoffatome besitzt. Ein Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (Tab. 3) mit denen des Terpenoids **1** deuten wiederum darauf hin, daß die Verbindungen hohe strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen.

C	Naturstoff 1		Naturstoff 3	
	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	29.9 (t)	1.44-1.80 (m)	28.1 (t)	1.51-1.90 (m)
2	17.9 (t)	1.44-1.80 (m)	17.8 (t)	1.51-1.90 (m)
3	28.7 (t)	1.44-1.80, 2.15-2.28 (m)	30.3 (t)	1.51-1.90, 2.27-2.42 (m)
4	42.3 (s)	–	43.2 (s)	–
5	44.1 (d)	1.90 (d)	48.4 (d)	1.96 (d)
6	72.3 (d)	4.95 (dd)	71.7 (d)	5.06 (dd)
7	53.4 (d)	4.02 (d)	124.4 (d)	6.60 (d)
8	56.6 (s)	–	133.3 (s)	–
9	157.5 (s)	–	157.9 (s)	–
10	36.3 (s)	–	35.4 (s)	–
11	118.8 (d)	6.04 (s)	112.2 (d)	5.80 (s)
12	162.6 (s)	–	163.1 (s)	–
13	99.9 (d)	5.46 (s)	101.6 (t)	5.78 (s)
14	25.6 (q)	1.29 (s)	25.1 (q)	1.30 (s)
15	180.6 (s)	–	181.2 (s)	–
16	24.5 (q)	1.14 (s)	24.2 (q)	1.21 (s)
17	58.1 (q)	3.67 (s)	57.9 (q)	3.76 (s)

Tabelle 3: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **1** und **3**.

Im Protonenspektrum des Sekundärmetaboliten **3** fehlt das Signal bei 4.02 ppm für das Proton 7-H. Statt dessen wird ein neues Signal bei 6.60 ppm mit einer Kopplungskonstanten von $J = 4.6\text{ Hz}$ registriert. Das Protonensignal des Protons 6-H ist im Vergleich zum Naturstoff **1** um 0.11 ppm tieffeldverschoben. Das dem 13-H entsprechende Ein-Proton-Singulett ist sogar

um 0.32 ppm zu tiefem Feld verschoben. Im ^{13}C -Spektrum werden statt der für Epoxide typischen ^{13}C -Signale bei $\delta = 53.4$ ppm und $\delta = 56.6$ ppm zwei neue Signale bei $\delta = 124.4$ ppm und $\delta = 133.3$ ppm beobachtet. Naturstoff **3** besitzt offensichtlich anstelle der Epoxidstruktur eine konjugierte Doppelbindung γ,δ -ständig zum Sechsringlacton (Abb. 22).

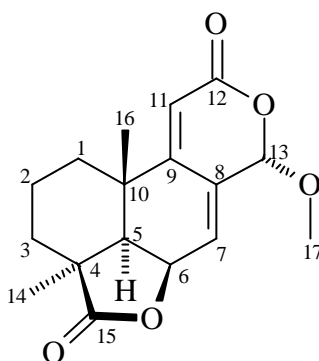


Abb. 22: Naturstoff **3**.

Die von Herrn Dr. U. Flörke angefertigte Röntgenstrukturanalyse (Abb. 23) bestätigt die Strukturaufklärung des Naturstoffs **3** und verifiziert gleichzeitig die relativen Konfigurationen der Naturstoffe **1** und **2**.

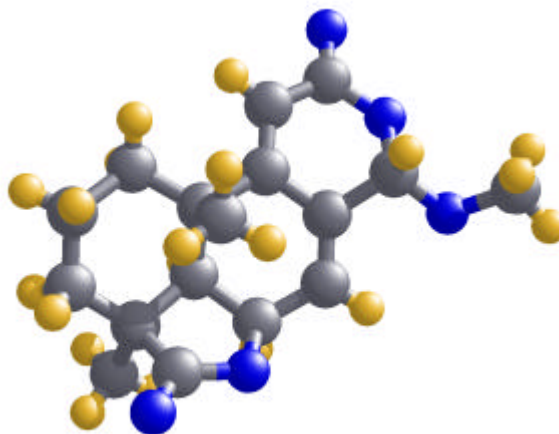


Abb. 23: Der Naturstoff **3** im Kristall.

Erstmals isoliert wurde das Diterpenoid (**3**), das als Antibiotic LL-Z 1271 α oder Antibiotic PR1387 bezeichnet wird, von G.A. Ellestad^[43] aus einer *Acrostalagmus* Spezies. Andersen et al.^[42] isolierte diese Verbindung aus einem Pilz der Art *Oidiodendron truncatum*. Weiterhin wurde der Naturstoff 1988 von Van Eijk et al.^[44] in einem Ascomyceten namens *Holwaya mucida* gefunden. Experimente von Kakisawa^[45] zur Aufklärung der Biosynthese zeigten,

daß diese offenbar über ein Diterpen wie Labdadienol^[46] verläuft, das zwischen C-12 und C-13 oxidativ gespalten wird. Literatur über die Synthese des Sekundärmetaboliten **3** findet sich bei Adinolfi^[47,48] und bei Welch et al.^[49].

3.1.3.4. Naturstoff **4**

Der Naturstoff **4** kristallisiert in Form farbloser Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 241 °C. Er löst sich gut in Methanol, dagegen schlecht in Dichlormethan und Chloroform. Der spezifische Drehwert der Substanz beträgt $[\alpha]_D^{20} = -34.1^\circ$ ($c = 0.23$, MeOH). Im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm ist der Naturstoff **4** mit einem R_f -Wert von 0.62 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4%) registrierbar. Das IR-Spektrum zeigt wiederum die für ein γ -Lacton charakteristische Absorptionsbande bei 1788 cm^{-1} . Eine weitere intensive Bande ist bei 1696 cm^{-1} zu beobachten. Die relativ breite Bande bei 3336 cm^{-1} hingegen ist typisch für eine OH-Valenzschwingung.

C	Naturstoff 1		Naturstoff 4	
	¹³ C-NMR (δ/ppm)	¹ H-NMR (δ/ppm)	¹³ C-NMR (δ/ppm)	¹ H-NMR (δ/ppm)
1	29.9 (t)	1.44-1.80 (m)	30.0 (t)	1.39-1.74 (m)
2	17.9 (t)	1.44-1.80 (m)	18.0 (t)	1.39-1.74 (m)
3	28.7 (t)	1.44-1.80, 2.15-2.28 (m)	28.8 (t)	1.39-1.74, 2.10-2.20 (m)
4	42.3 (s)	–	42.3 (s)	–
5	44.1 (d)	1.90 (d)	44.4 (d)	1.80 (d)
6	72.3 (d)	4.95 (dd)	72.4 (d)	4.90 (dd)
7	53.4 (d)	4.02 (d)	54.1 (d)	3.92 (d)
8	56.6 (s)	–	57.4 (s)	–
9	157.5 (s)	–	156.5 (s)	–
10	36.3 (s)	–	36.1 (s)	–
11	118.8 (d)	6.04 (s)	117.6 (d)	5.99 (s)
12	162.6 (s)	–	163.0 (s)	–
13	99.9 (d)	5.46 (s)	–	5.54 (s, breit)
14	25.6 (q)	1.29 (s)	24.5 (q)	1.23 (s)
15	180.6 (s)	–	180.6 (s)	–
16	24.5 (q)	1.14 (s)	24.5 (q)	1.07 (s)
17	58.1 (q)	3.67 (s)	–	–

Tabelle 4: ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der Naturstoffe **1** und **4**.

Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren des Sekundärmetaboliten **4** weisen wiederum ähnliche chemische Verschiebungen wie Naturstoff **1** auf, so daß offensichtlich auch hier eine strukturell enge Verwandtschaft zwischen den Verbindungen vorliegen wird (Tab.4).

Bemerkenswert ist im Protonenspektrum der Substanz **4** das Ein-Proton-Signal bei 5.54 ppm, das aufgrund seiner unscharfen Gestalt einem raschen intermolekularen Protonenaustausch unterliegen könnte. Dieses Verhalten zeigen im allgemeinen Protonen, die an ein Heteroatom (OH, NH, SH) gebunden sind. Das Austauschexperiment mit D_2O zeigt jedoch, daß die Signalverbreiterung nicht auf eine rasche Austauschbarkeit dieses Protons zurückzuführen ist. Das ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung **4** unterscheidet sich von dem des Naturstoffs **1** signifikant durch das Fehlen der Signale für die Methingruppe C-13 und der Methoxygruppe C-17 (Tab. 4). Auffällig ist auch das außerordentlich breite und daher schwer detektierbare ^{13}C -NMR-Signal für die Methingruppe C-11. Anhand dieser Information kann in Analogie zum Naturstoff **1** die in Abb. 24 dargestellte Teilstruktur formuliert werden.

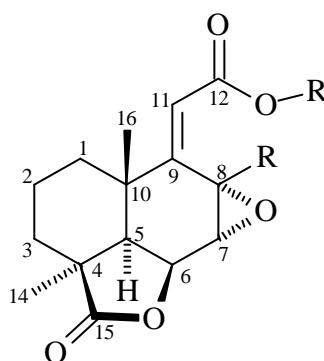


Abb. 24: Teilstruktur des Naturstoffs **4**.

Die Verifizierung erfolgt ebenfalls durch die 2D-NMR-Technik (H,H-COSY , H,C-COSY und HMBC). Die in Abb. 24 gezeigte Teilstruktur besitzt demnach die Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_5$ und eine Masse von 276. Dem Massenspektrum (CI) ist aber zu entnehmen, daß die Verbindung die Molmasse 306 besitzt. Berücksichtigt man das offensichtliche Fehlen der Methoxygruppe in den Protonen- und ^{13}C -NMR-Spektren der Verbindung **4**, die ausgeprägte OH-Valenzbande im IR-Spektrum sowie die Massendifferenz von 14 zum Naturstoff **1**, so kann für den Naturstoff **4** die in Abb. 25 gezeigte Struktur postuliert werden.

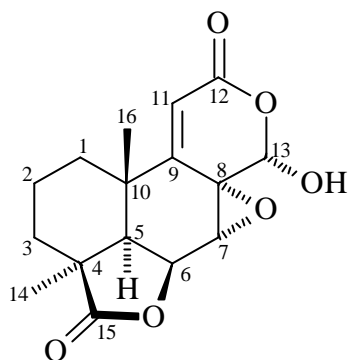


Abb. 6: Hypothetische Struktur des Naturstoffs **4**.

Sollte der Sekundärmetabolit **4** tatsächlich die in Abb. 25 dargestellte Struktur besitzen, so müßte im ^{13}C -NMR-Spektrum ein für ein zweifach oxygeniertes Kohlenstoffatom typisches Signal bei ca. 100 ppm registrierbar sein, das vermutlich aufgrund der in Abb. 26 illustrierten Äquilibration^[50] nicht beobachtbar ist.

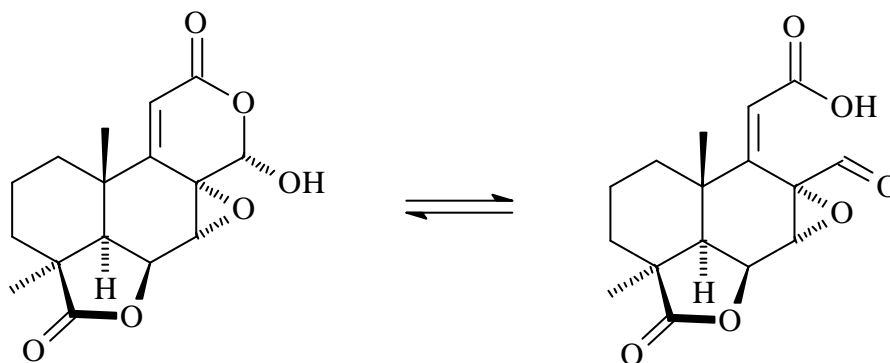


Abb. 26 : Äquilibration des Naturstoffs **4**.

Zur Detektion des Signals wird die inverse zweidimensionale NMR-Spektroskopie genutzt, da aufgrund der Schwerlöslichkeit der Verbindung die NMR-Tieftemperaturmessungen scheiterten. Im invers aufgenommenen H,C-COSY -Spektrum ist, ausgehend von dem breiten Protonensignal bei 5.54 ppm, ein Signal beobachtbar, das mit einem nicht sichtbaren ^{13}C -NMR-Signal bei 97.2 ppm korreliert. Die zweifach-oxygenierte CH-Gruppe zeigt also im Protonenspektrum eine chemische Verschiebung von 5.54 ppm und im ^{13}C -Spektrum von 97.2 ppm. Ein weiterer Hinweis für die Richtigkeit der aufgestellten Hypothesen liefert die genaue Auswertung des Protonenspektrums, in dem anhand eines kleinen Signals für ein Aldehyd-Proton auf einen ca. 1–3 % großen Anteil an Aldehyd geschlossen werden kann. Die abschließend angefertigte Röntgenstrukturanalyse dieser Verbindung (Abb. 27) belegt die

Strukturaufklärung. Im Gegensatz zum Naturstoff **1** weist Naturstoff **4** aber interessanterweise *R*- statt *S*-Konfiguration an C-13 auf, was vermutlich mit oben beschriebener Äquilibration zu erklären ist.

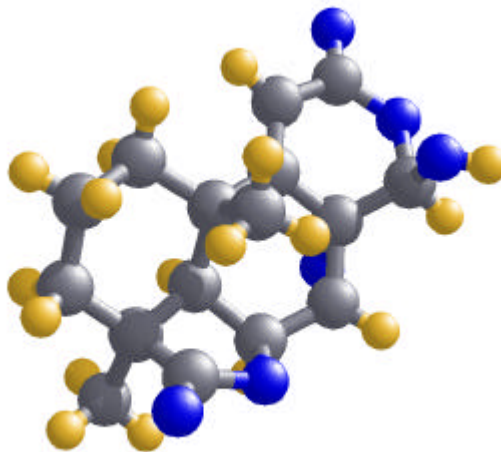


Abb. 27: Der literaturunbekannte Naturstoff **4** im Kristall.

Um sicherzustellen, daß der literaturunbekannte Sekundärmetabolit **4** nicht bei der Extraktion des Pilzmycels mit Ethylacetat durch „Demethoxylierung“ von Naturstoff **1** entsteht, wurde dieser mit einem Essigsäure/Ethylacetat-Gemisch (1:1) versetzt und vierzehn Tage aufbewahrt, ohne daß eine Umsetzung beobachtet wurde.

3.1.3.5. Naturstoff **5**

Der aus Methanol in farblosen Prismen auskristallisierende Naturstoff **5** besitzt einen Schmelzpunkt von 237 °C. Der spezifische Drehwert der Substanz beträgt $[\alpha]_D^{20} = -38.5^\circ$ ($c = 0.21$, MeOH). Dünnschichtchromatographisch ist er weder bei 254 nm noch bei 366 nm detektierbar. Durch Besprühen des DC's mit Bromkresol-Grün verfärbt sich der Substanzfleck gelb, so daß auf das Vorhandensein einer Carbonsäurefunktion geschlossen werden kann. Der R_f -Wert von 0.31 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) und der langgezogene Substanzfleck auf dem DC sind weitere Hinweise, auf eine Carbonsäure. Das IR-Spektrum zeigt bei 1719 cm^{-1} und 1692 cm^{-1} zwei intensive Signale, die für Carbonylgruppen charakteristisch sind. Ferner ist eine OH-Valenzschwingung bei 3400 cm^{-1} zu beobachten. Dem ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ist zu entnehmen, daß der Naturstoff **5** zwei Methyl-, fünf Methylen-, je zwei aliphatische und olefinische Methingruppen und vier quartäre Kohlenstoffatome besitzt, wobei von letzteren das Signal bei $\delta = 176.4\text{ ppm}$ einer Ester- oder Säurefunktion zuzuordnen

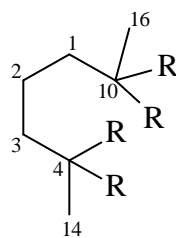
ist. Das HMBC-Spektrum zeigt das bemerkenswerte Phänomen, daß die Protonensignale 5-H, 14-H und 3-H mit einer ^{13}C -NMR-Verschiebung von ca. 178 ppm korrelieren, obwohl dort im ^{13}C -Spektrum kein Signal beobachtbar ist. Zur Detektion des Signals wird eine ^{13}C -NMR-Tieftemperatur-Messung ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) durchgeführt, die bei 177.9 ppm eindeutig ein Signal registrierbar macht, das aufgrund der chemischen Verschiebung einer zweiten Ester- oder Carbonsäurefunktion entspricht.

Der Vergleich der ^1H - und ^{13}C -Spektren der Naturstoffe **1** und **5** zeigt, daß beide Verbindungen neben unterschiedlichen chemischen Verschiebungen auffällig gleiche Verschiebungen und Kopplungsmuster aufweisen (Tab.5).

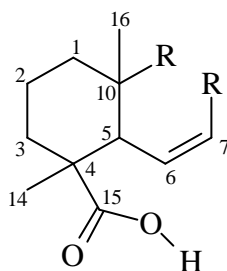
C	Naturstoff 1		Naturstoff 5	
	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	29.9 (t)	1.44-1.80 (m)	37.7 (t)	1.05-1.22 (m)
2	17.9 (t)	1.44-1.80 (m)	19.2 (t)	1.45-1.49, 1.54-1.57 (m)
3	28.7 (t)	1.44-1.80, 2.15-2.28 (m)	37.5 (t)	2.18, 1.81-1.88 (m)
4	42.3 (s)	—	42.9 (s)	—
5	44.1 (d)	1.90 (d)	51.7 (d)	2.04 (pt)
6	72.3 (d)	4.95 (dd)	134.4 (d)	6.65 (dd)
7	53.4 (d)	4.02 (d)	122.7 (d)	5.73 (dd)
8	56.6 (s)	—	84.2 (s)	—
9	157.5 (s)	—	49.7 (d)	2.29 (pd)
10	36.3 (s)	—	36.5 (s)	—
11	118.8 (d)	6.04 (s)	31.7 (t)	2.95 (dd) u. 2.35 (pd)
12	162.6 (s)	—	176.4 (s)	—
13	99.9 (d)	5.46 (s)	69.0 (t)	3.46 (d) u. 3.66 (d)
14	25.6 (q)	1.29 (s)	28.0 (q)	1.30 (s)
15	180.6 (s)	—	177.9 (s)	—
16	24.5 (q)	1.14 (s)	12.1 (q)	0.76 (s)
17	58.1 (q)	3.67 (s)	—	—

Tabelle 5: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **1** und **5**.

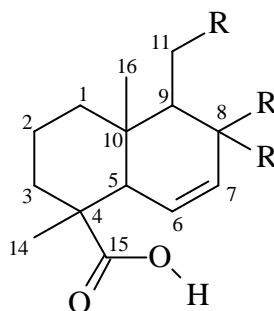
Die größte Übereinstimmung der chemischen Verschiebung ist im A-Ring beobachtbar. In Analogie zum Naturstoff **1** ist dem H,H-COSY-Spektrum der Substanz **5** zu entnehmen, daß die drei CH_2 -Gruppen nur untereinander koppeln. Ferner sind im HMBC-Spektrum Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen C-4 und C-10 und zu den Methylgruppen C-14 und C-16 registrierbar, so daß wiederum die dargestellte Teilstruktur I formuliert werden kann.

**Teilstruktur I**

Aus dem HMBC-Spektrum ist weiterhin ersichtlich, daß die beiden Methylgruppen und quartären Kohlenstoffatome mit der Methingruppe bei $\delta = 51.7$ ppm koppeln. Das Proton 5-H zeigt seinerseits eine 3J - und eine allylische 4J -Kopplung zu den olefinischen Protonen. Desweiteren sind von den quartären Kohlenstoffatomen C-4 und C-10 im HMBC-Spektrum vicinale Kopplungen zu dem olefinischen Protonensignal bei $\delta = 6.65$ ppm beobachtbar. Unter Berücksichtigung der oben bereits erwähnten vicinalen Kopplungen zwischen 3-H, 5-H und 14-H und der vermutlichen Carbonsäurefunktion bei $\delta = 177.9$ ppm kann Teilfragment II konstruiert werden.

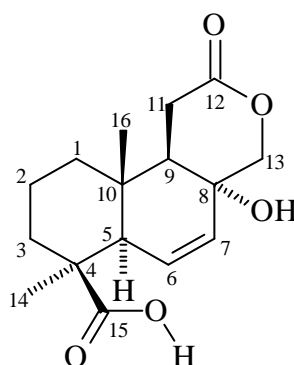
**Teilstruktur II**

Die weitere Analyse des HMBC-Spektrums ergibt, daß C-10 und C-7 mit der Methingruppe C-9 koppelt, dessen Proton wiederum im H,H-COSY-Spektrum ein Kreuzsignal zu den beiden Protonen der Methylengruppe 11-H zeigen. Die Protonen 11-H korrelieren im HMBC-Spektrum ihrerseits mit den quartären Kohlenstoffatomen C-10 und C-8, wobei zwischen C-8 und C-6 eine weitere 3J -Kopplung detektierbar ist (s. Teilstruktur III).



Teilstruktur III

Ebenso wie die Methylengruppe C-11 zeigt auch C-9 im HMBC-Spektrum ein Kreuzsignal zur Carbonylgruppe mit der chemischen Verschiebung $\delta = 176.4$ ppm. Eine vicinale Kopplung ist, ausgehend von C-9, zu der Methylengruppe C-13 beobachtbar, die eine weitere 3J -Kopplung zu C-7 zeigt. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C-8 und C-13 sind charakteristisch für einfach oxygenierte Kohlenstoffatome, so daß die in Abb. 28 dargestellte Struktur dem Naturstoff **5** entspricht.

Abb. 28: Der literaturunbekannte Naturstoff **5**.

Die Aufklärung der relativen Konfiguration der literaturunbekannten Verbindung erfolgt anhand der chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten und der NOE-Spektroskopie. Sättigt man das Protonensignal der Methylgruppe C-14, so wird die Intensität des 6-H Protons um 6 % und die des 5-H Protons um 3.5 % erhöht, während die von 16-H unbeeinflusst bleibt. A- und B-Ring der Verbindung **5** sind demnach, wie in den Naturstoffen **1–4**, *trans*-verknüpft. Strahlt man ebenfalls auf die Methylgruppe C-16 ein, so ist nur für das äquatorial angeordnete Proton 11-H ein Kern-Overhauser-Effekt von 3.3 % detektierbar. Die Ringe B und C müssen also wie in Abb. 29 dargestellt *cis*-verknüpft sein. Für die pseudo-axiale Anordnung der OH-Gruppe spricht zum einen die starke 1,3-diaxiale Wechselwirkung der OH-Gruppe und des axial angeordneten Protons 11-H, welches dadurch eine relativ starke

Tieffeldverschiebung erfährt, und zum anderen die ähnlichen chemischen Verschiebungen der ^{13}C -H Protonen, sowie der Hochfeldshift der Methylgruppe C-16. Die relative Konfiguration des literaturunbekannten Sekundärmetaboliten **5** entspricht somit der der bereits isolierten Lacton-Diterpene **1–4**. Eine große strukturelle Ähnlichkeit ist ebenfalls zwischen dem Naturstoff **5** und den Labdenen bzw. Labdadienen vorhanden, die vermutlich eine Vorstufe der Naturstoffe **1–5** darstellen. Die meisten dieser Verbindungen weisen die gleiche relative Konfiguration auf. Desweiteren besitzen einige dieser Labdene, analog zum Naturstoff **5**, am A-Ring in gleicher Position ebenfalls eine freie Carbonsäurefunktion.

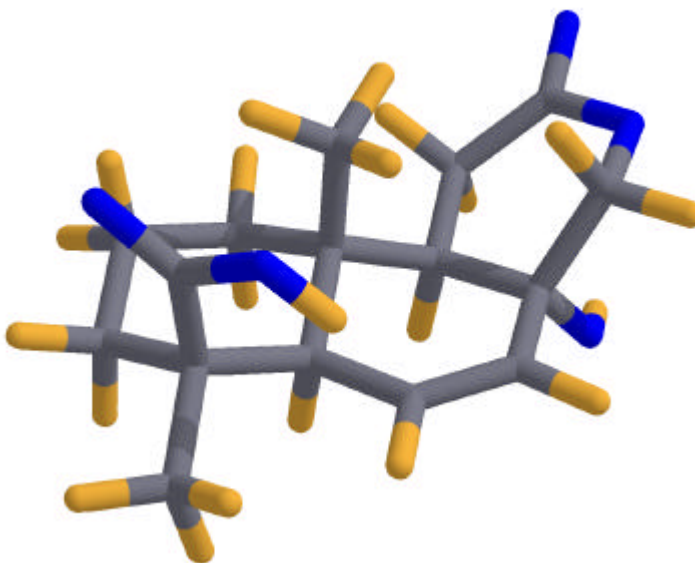


Abb. 29: Dreidimensionale Darstellung des Naturstoffs **5**.

3.1.3.6. Naturstoff **6**

Der Naturstoff **6** kristallisiert in Form farbloser Prismen. Er besitzt einen Schmelzpunkt von $226\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22.5\text{ }^{\circ}$. In Lösungsmitteln mittlerer Polarität ist er kaum löslich. Auf dem DC ist die Substanz durch Besprühen mit einer $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung (8 %) und nachfolgendem Brennen mit einem R_{F} -Wert von 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) detektierbar. Durch Besprühen des Dünnschichtchromatogramms mit Bromkresol-Grün verfärbt sich der Substanzfleck gelb, so daß davon auszugehen ist, daß der Sekundärmetabolit **6** eine Carbonsäurefunktion besitzt.

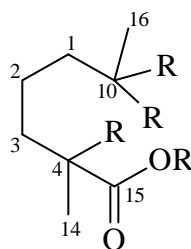
Im IR-Spektrum sind zwei Carbonylabsorptionsbanden bei 1728 und 1701 cm^{-1} zu beobachten. Die breiten Banden bei 3503 und 3152 cm^{-1} sind OH-Valenzschwingungen zuzuordnen.

Den ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektren und dem DEPT-135-Experiment ist zu entnehmen, daß der Naturstoff **6** zwei Methyl-, sechs Methylen-, eine aliphatische und olefinische Methingruppe und sechs quartäre Kohlenstoffatome besitzt (Tab.6).

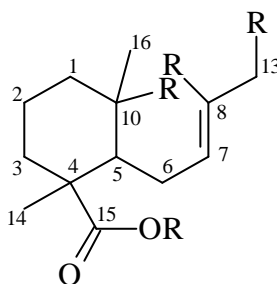
C	Naturstoff 5		Naturstoff 6	
	^{13}C -NMR (δ /ppm)	^1H -NMR (δ /ppm)	^{13}C -NMR (δ /ppm)	^1H -NMR (δ /ppm)
1	37.7 (t)	1.05-1.22 (m)	30.1 (t)	1.33-1.44, 1.80-1.97 (m)
2	19.2 (t)	1.45-1.49, 1.54-1.57 (m)	19.4 (t)	1.55-1.63, 1.87-2.04 (m)
3	37.5 (t)	2.18, 1.81-1.88 (m)	38.3 (t)	1.01-1.20, 2.14-2.24 (m)
4	42.9 (s)	—	43.9 (s)	—
5	51.7 (d)	2.04 (pt)	43.2 (d)	2.13 (dd)
6	134.4 (d)	6.65 (dd)	24.6 (t)	2.33-2.49, 2.88-2.96 (m)
7	122.7 (d)	5.73 (dd)	126.2 (d)	5.89 (m)
8	84.2 (s)	—	130.9 (s)	—
9	49.7 (d)	2.29 (pd)	72.9 (s)	—
10	36.5 (s)	—	40.3 (s)	—
11	31.7 (t)	2.95 (dd) u. 2.35 (pd)	37.3 (t)	2.64 (d) u. 2.80 (d)
12	176.4 (s)	—	174.7 (s)	—
13	69.0 (t)	3.46 (d) u. 3.66 (d)	69.8 (t)	4.79 (m) u. 4.90 (m)
14	28.0 (q)	1.30 (s)	28.2 (q)	1.28 (s)
15	177.9 (s)	—	180.2 (s)	—
16	12.1 (q)	0.76 (s)	15.1 (q)	0.84 (s)
17	—	—	—	—

Tabelle 6: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **5** und **6**.

Beim Vergleich der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren der Naturstoffe **5** und **6** fällt auf, daß beide Verbindungen jeweils drei Methylenprotonen besitzen, die im H,H-COSY -Spektrum nur untereinander koppeln. Im HMBC-Spektrum zeigen die CH_2 -Gruppen mit den ^{13}C -NMR-Verschiebungen von 38.3 bzw. 30.1 ppm 3J -Kopplungen zu den Methylgruppen bei 28.3 bzw. 15.1 ppm. Ebenfalls im HMBC-Spektrum sind, ausgehend von diesen Methylgruppen, geminale Konnektivitäten zu den quartären Kohlenstoffatomen C-4 und C-10 und jeweils eine vicinale Kopplung zur Methingruppe mit der chemischen Verschiebung von 43.2 ppm registrierbar. Die Methingruppe und die Methylgruppe C-14 koppeln desweiteren mit dem quartären Kohlenstoffatom C-15, das aufgrund seiner chemischen Verschiebung einer Carbonsäure- bzw. Carbonsäureesterfunktion zugeordnet werden kann (Teilstruktur I).

**Teilstruktur I**

Im Protonenspektrum ist für das Methinproton C-5 ein Doppelduplett beobachtbar, das Kopplungskonstanten von 5.9 bzw. 11.3 Hz aufweist. Im H,H-COSY-Spektrum koppelt die Signalgruppe mit den Multipletts bei 2.33–2.49 und 2.88–2.96 ppm, die laut HMQC-Spektrum der Methylengruppe mit der chemischen Verschiebung von 24.6 ppm (C-6) zuzurechnen sind. Im H,H-COSY-Spektrum zeigen beide Multipletts Kreuzkopplungen zu der olefinischen Methingruppe (7-H) bei 5.89 ppm und den Methylenprotonensignalen bei 4.79 und 4.90 ppm (13-H), die jeweils ein ABMX-Spinsystem mit einem ausgeprägten Dacheffekt, einer großen geminalen Kopplungskonstanten von 12.6 Hz, einer allylischen 4J -Kopplung und einer homoallylischen 5J -Kopplung bilden. Die Kopplungskonstanten der long-range-Kopplungen sind aufgrund der begrenzten spektralen Auflösung des NMR-Gerätes nicht genau zu bestimmen, sie bewegen sich aber zwischen 1 und 3 Hz (Teilstruktur II).

**Teilstruktur II**

Die Protonenverschiebungen bei 4.79 und 4.90 ppm korrelieren im HMQC-Spektrum mit einer ^{13}C -NMR-Verschiebung von 69.8 ppm, die typisch für monooxygenierte Kohlenstoffatome ist. Im HMBC-Spektrum zeigen die Protonensignale der Methylengruppe C-13 eine Kreuzkopplung zu dem quartären Kohlenstoffatom bei 72.9 ppm (C-9), der aufgrund seiner chemischen Verschiebung ebenfalls monooxygeniert sein muß. Das quartäre Kohlenstoffatom C-9 koppelt desweiteren mit der Methylgruppe C-16 und der Methylengruppe mit den Protonenresonanzen von 2.64 bzw. 2.80 ppm (11-H). Beide Protonensignale bilden ein AB-Spinsystem mit einer geminalen Kopplung von 15.2 Hz. Im HMBC-Spektrum

zeigen diese eine 2J -Kopplung zum quartären Kohlenstoffatom bei 174.7 ppm, so daß die in Abbildung 30 dargestellte Struktur konstruiert werden kann.

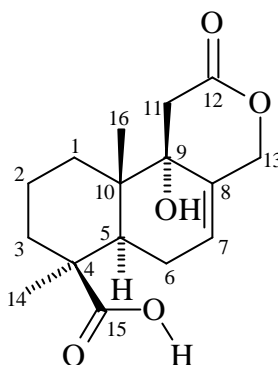


Abb. 30: Die Struktur des literaturunbekannten Naturstoffs **6**.

Der Naturstoff **6** besitzt wie Naturstoff **5** die Summenformel $C_{16}H_{22}O_5$. Das Massenspektrum (DCI) sowie die Präzisionsmasse des $[M-H]^-$ -Peaks von 293.13826 bestätigen die Struktur. Die Aufklärung der relativen Konfiguration erfolgt durch die Messung von Kern-Overhauser-Effekten und der Auswertung der Kopplungskonstanten. Sättigt man das Drei-Protonen-Singulett der Methylgruppe C-14, so beobachtet man eine Intensitätssteigerung für die Protonen 6-H (2.39–2.49 ppm, 6.5 %) und 5-H (2.13 ppm, 7.6 %), während das Signal für die Methylgruppe C-16 unbeeinflusst bleibt. Die Kopplungskonstante von 11.3 Hz für das Proton 5-H und das axial angeordnete Proton der Methylengruppe C-6 belegt, daß das Proton 5-H ebenfalls axial angeordnet ist. Die Ringe A und B sind demnach wie in den Naturstoffen **1–5** *trans*-verknüpft. Wird auf die Methylgruppe C-16 eingestrahlt, so erfährt nur das Duplett bei 2.80 ppm (11-H) eine Intensitätssteigerung von 7.2 %, woraus gefolgert werden kann, daß die Ringe B und C, wie in Abb. 31 dargestellt, miteinander verknüpft sind. Für die *trans*-axiale Anordnung der Methylgruppe C-16 zur OH-Gruppe spricht zum einen die Hochfeldverschiebung von C-16 und zum anderen die relativ ähnlichen Verschiebungen der Protonen der Methylengruppe C-11. Die relative Konfiguration des ebenfalls literaturunbekannten Terpenoids **6** entspricht demzufolge der des bereits isolierten Naturstoffs **5**. Strukturell könnte es sich bei Naturstoff **6** um eine Vorstufe des Naturstoffs **2** handeln, denn durch Lactonisierung, Epoxidierung und Dehydratisierung gelangt man ausgehend vom Naturstoff **6** zum Sekundärmetaboliten **2** (siehe Seite 27).

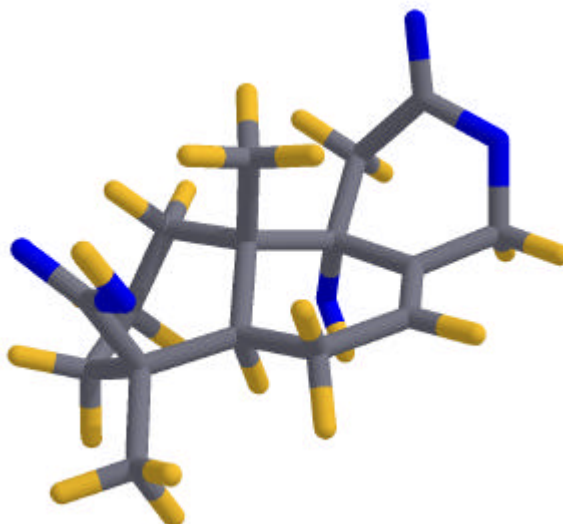
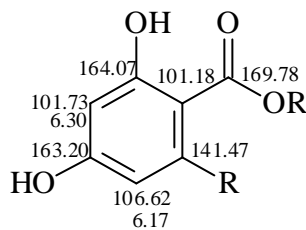


Abb. 31: Dreidimensionale Struktur des literaturunbekannten Naturstoffs **6**.

3.1.3.7. Naturstoff **7**

Die Reinsubstanz kristallisiert in Form farbloser prismenförmiger Kristalle, die bei 187–188 °C schmelzen. Der spezifische Drehwert der Substanz beträgt $[\alpha]_D^{20} = -22.8^\circ$ ($c = 0.18$, EtOH). Im IR-Spektrum ist neben einer OH-Valenzschwingung bei 3410 cm^{-1} eine Carbonylschwingung bei 1734 cm^{-1} zu beobachten. Das ^{13}C - und ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung weist eine Methyl-, fünf Methylen-, drei monooxygenierte Methingruppen (bei 66.29, 68.09 und 76.08 ppm), sowie zwei olefinische oder aromatische Methingruppen und fünf quartäre Kohlenstoffatome auf. Das Signal bei $\delta = 169.79$ ppm deutet auf eine Carbonsäure-, Ester- oder Lactonfunktion hin. Markant sind ebenfalls die Signale bei 163.20 und 164.07 ppm, die unter Berücksichtigung der weiteren quartären ^{13}C -NMR-Signale bei 101.18 und 141.47 ppm und der beiden Methinkohlenstoffatome bei 101.73 und 106.62 ppm auf ein aromatisches System mit zwei Sauerstoffs substituenten hinweisen. Weitere Bestätigung erhält die Hypothese durch die Betrachtung des Protonenspektrums, das zwei Dupletts mit einer typischen *meta*-Kopplungskonstanten von 1.9 Hz und einer chemischen Verschiebung von 6.17 und 6.30 ppm zeigt. Auffallend ist auch die extreme Differenz der chemischen Verschiebung der quartären Kohlenstoffatome bei 101.18 und 141.47 ppm, die charakteristisch für Kohlenstoffatome sind, die α - bzw. β -ständig zu einer Carbonylgruppe stehen. Gestützt wird diese Vermutung durch das für chelierte OH-Proton signifikante Signal bei $\delta = 11.07$ ppm. Unter Berücksichtigung dieser chemischen Verschiebungen sowie der Kopplungskonstanten läßt sich das folgende Fragment konstruieren:



Mit den vorliegenden eindimensionalen NMR-Spektren kann aufgrund der sich partiell überlagernden und daher relativ schlecht aufgelösten Protonensignale keine weitere Aussage über die Konstitution des Moleküls gemacht werden. Deshalb wurden die geeigneten Kristalle dieser Substanz zur Anfertigung einer Röntgenstrukturanalyse genutzt. Das Ergebnis zeigt, daß es sich bei Naturstoff **7** um Cladosporin^[51–55] handelt (Abb. 32).

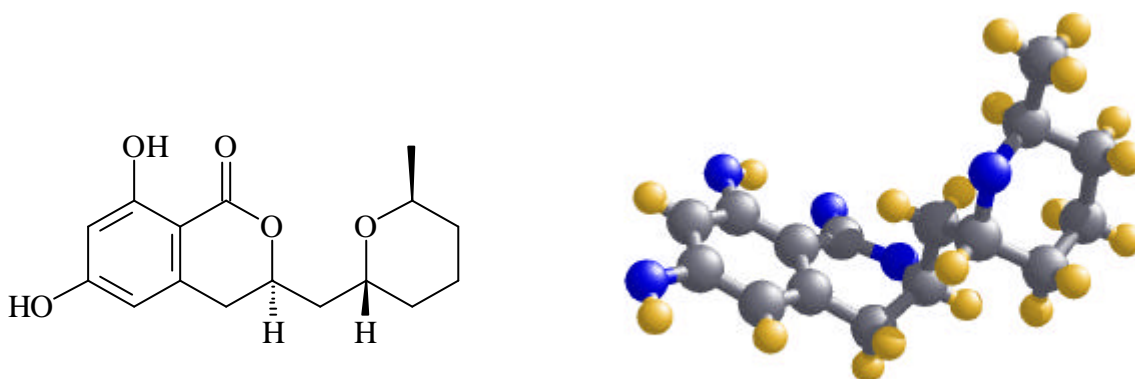


Abb. 32: Der Naturstoff **7** im Kristall.

Cladosporin (**7**) ist ein Sekundärmetabolit von *Aspergillus flavus* bzw. *Aspergillus repens*. Er wurde zuerst von Scott^[51] aus dem erstgenannten Pilz isoliert. Ebenfalls aus *Aspergillus flavus* wurde Cladosporin (**7**) von Grove^[52] isoliert. Der Naturstoff **7** zeigt antimikrobielle, insektizide und phytotoxische Eigenschaften.^[56]

Mitarbeitern der Firma Merck gelang mittels Röntgenstrukturanalyse die Aufklärung der relativen Konfiguration. Die absolute Konfiguration wurde durch den Vergleich der CD-Spektren des Cladosporins (**7**) und des (*R*)-(-)-Melleins (**22**) (Abb. 33) bestimmt. Die gute Übereinstimmung des spezifischen Drehwertes des von uns isolierten Metaboliten **7** mit dem in der Literatur angegebenen Wert von $[\alpha]_D^{20} = -24.8$ ($c = 0.96$, EtOH) zeigt, daß beide die gleiche absolute Konfiguration besitzen.

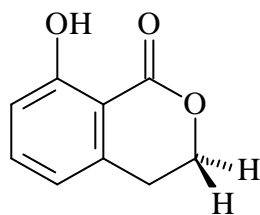


Abb. 33: Die Struktur des (*R*)-(-)-Melleins (22).

3.1.3.7.1. Biosynthese des Cladosporins (7)

Durch den Einbau von Natrium-[1- ^{13}C]-, [2- $^{13}\text{C}_2$]-, [1,2- $^{13}\text{C}_2$]-, [1- ^{13}C , $^{18}\text{O}_2$]-, [1- ^{13}C , $^2\text{H}_3$]- und [2- ^{13}C , $^2\text{H}_2$]-Acetaten in Cladosporin, gefolgt von ^{13}C -NMR-Untersuchungen am Diacetat der Verbindung, konnte der Biogeneseweg der Verbindung aufgeklärt werden.^[57] Die postulierten Strukturen der Enzymintermediate sind in Abb. 34 dargestellt.

Die acht Acetateinheiten im Cladosporin zeigen dabei die für die Polyketid-Biogenese typische Kopf/Schwanz-Verknüpfung. Die Tetrahydropyran-Cyclisierung erfolgt direkt nach der Addition einer C_2 -Einheit an das C_8 -Gerüst. Die Knüpfung weiterer C_2 -Bausteine durch die Polyketid-Synthase führt schließlich zu einem C_{16} -Baustein, der vermutlich in einen β -Keto- γ,δ -ungesättigten-Thioester umgewandelt wird, der seinerseits dann intramolekular aldolartig cyclisiert.

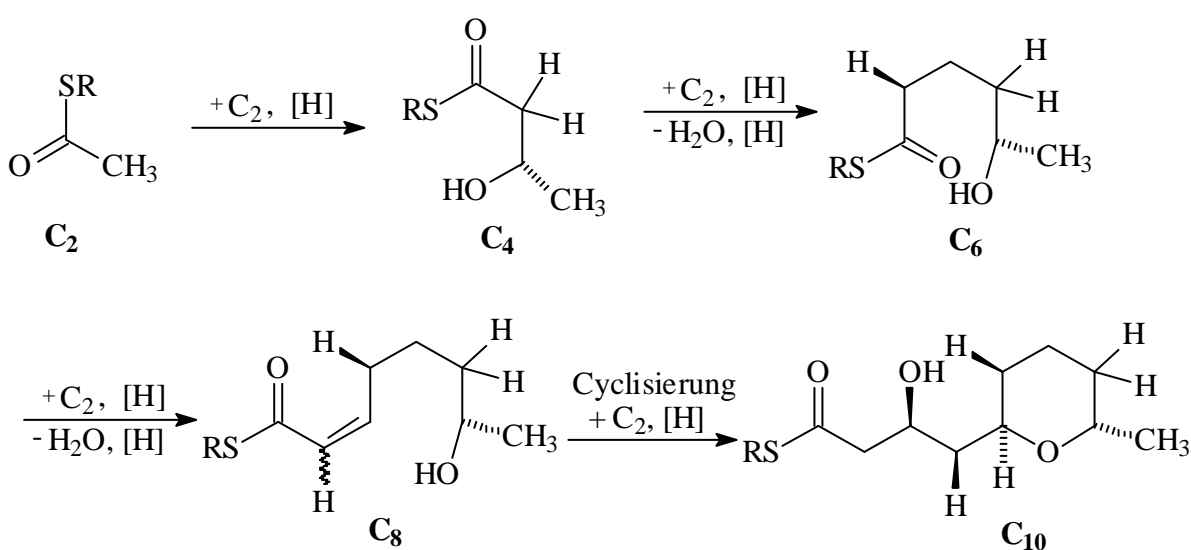
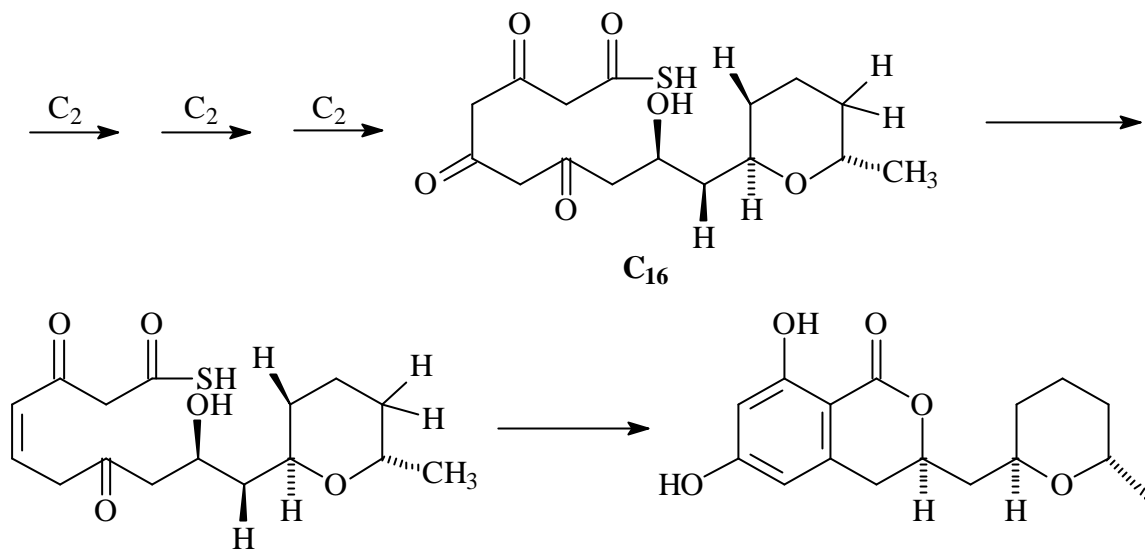


Abb. 34: Fortsetzung nächste Seite.



R = Enzym

Abb. 34: Biosyntheseweg des Cladosporins (7).

3.1.4. Biologische Aktivität

3.1.4.1. Erläuterung und Bewertung der Bioaktivitätsmessung

3.1.4.1.1. Pflanzenschutztestung der Mikrobiologie in Braunschweig

Zur Bestimmung der biologischen Aktivität der Rohextrakte und der Reinsubstanzen werden im wesentlichen fünf sich ergänzende Methoden angewandt:

1. Das Biodiagramm
2. Der Agardiffusionstest
3. Der Keimlingstest
4. Der Lemnatest
5. Die Photosyntheseaktivitäts-Messung

Nachfolgend werden die einzelnen Verfahren kurz beschrieben und bewertet:

1. Das Biodiagramm

Diese Methode wird hauptsächlich zur Lokalisierung von aktiven Verbindungen aus dem Rohextrakt genutzt. Dabei werden vom Rohextrakt Dünnschichtchromatogramme angefertigt und mit einer Suspension eines Testorganismus' besprüht. Als Testorganismus wird *Cladosporium cucumerinum*, ein gegenüber Fungiziden sehr sensibler Organismus, in 6 %iger Biomalzlösung verwendet. Nach gleichmäßigem Besprühen der Dünnschichten wird in einer Feuchtkammer inkubiert. Die Auswertung erfolgt nach zwei bis drei Tagen. Die dabei entstehenden Hemmhöfe spiegeln in günstigen Fällen R_f -Werte der aktiven Substanzen wider.

2. Der Agardiffusionstest

Beim Agardiffusionstest, der auch als Plättchentest bezeichnet wird, werden vom Rohextrakt bzw. den isolierten Reinsubstanzen Lösungen in Aceton oder Methanol angesetzt. Die Konzentration der Probenlösungen beträgt gewöhnlich 10 mg/ml. Zur Untersuchung auf fungizide, bakteriozide und algizide Aktivität werden Filterplättchen mit der jeweiligen Lösung getränkt und auf die Oberfläche von Hartagarplatten gelegt. Diese werden dann mit den folgenden Testorganismen besprüht:

Chl.	<i>Chlorella fusca</i>	Chlorophyt
E.C.	<i>Escherichia coli</i>	gram-negatives Bakterium
B.m.	<i>Bacillus megaterium</i>	gram-positives Bakterium
Ust.	<i>Ustilago violacea</i>	Ustomycet
Eur.	<i>Eurotium repens</i>	Ascomycet
M.m.	<i>Mycothypha microspora</i>	Zygomycet
Fus.	<i>Fusarium oxysporum</i>	Deuteromycet

Bei den Bakterien und Pilzen werden nach zwei bis drei Tagen, bei *Chlorella* nach vier bis sieben Tagen die entsprechenden Hemmhöfe ausgewertet. Dabei ist neben der Größe der Hemmhöfe auch die Vollständigkeit der Hemmung in den Höfen von Bedeutung.

3. Der Keimlingstest

Für den Keimlingstest werden 6.75 ml steriles Wasser und 0.75 ml der zu testenden Lösung (10 mg Substanz in 1 ml Aceton oder Methanol) in eine Petrischale pipetiert und mit Filterpapier bedeckt. Darauf werden vierzehn Samen der entsprechenden Keimlinge zum Keimen ausgelegt. Als Testorganismen dienen *Lepidum sativum* (Kresse) und *Medicago sativa* (Alfalfa). Die Auswertung des Tests erfolgt über die Messung der Länge und die Beurteilung des allgemeinen Zustandes der Keime im Vergleich zu einem parallel angesetzten Referenztest.

4. Der Lemnatest

Für den Lemnatest werden 6.75 ml steriles Wasser und 0.75 ml der zu testenden Lösung (10 mg Substanz in 1 ml Aceton oder Methanol) in eine Petrischale pipetiert und mit Filterpapier bedeckt. Darauf werden einige Lemna-Pflänzchen (Wasserlinse) ausgelegt. Die Auswertung des Tests erfolgt über die Beurteilung des Wachstums der Pflänzchen und des allgemeinen Zustandes der Blätter im Vergleich zu einem parallel angesetzten Referenztest.

5. Der Photosyntheseaktivitäts-Test

Zur Vorbereitung einer Photosyntheseaktivitäts-Messung wird eine Probenkammer mit 5 ml einer Algensuspension (*Chlorella fusca*) gefüllt und mit dem Elektrodenschalter verschlossen.

Zuvor wird die Zellkonzentration der Algensuspension auf 2×10^7 Zellen/ml [Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer] (15 % 0.1 mol/l Na_2CO_3 -Lösung, 85 % 0.1 mol/l NaHCO_3 -Lösung) eingestellt. Bei einer Meßtemperatur von 25 °C wird die Suspension abgedunkelt durchmischt, bis der Sauerstoffgehalt durch die Atmung der Algen auf 0 % abgesunken ist. Ab diesem Zeitpunkt wird die Verdunkelung entfernt und zur Erhöhung der photosynthetischen Sauerstoffproduktion eine Kaltlichtlampe zugeschaltet. Auf einem Schreiber kann die Veränderung des Sauerstoffgehaltes der Suspension beobachtet werden. Ab einer Konzentration von ca. 50 % O_2 werden 100 µl der in Methanol/Aceton gelösten Substanz mit einer Injektionsnadel in die Probenkammer gegeben. Als Kontrolle wird die Reaktion der Alge auf Methanol/Aceton überprüft. Die Abweichung der Photosyntheseaktivität der Zellkultur vor und nach Applikation der Probe wird quantitativ erfaßt.

3.1.4.1.2. Kurzbeschreibung der Pharma-Grundscreening-Tests der BASF

1. PAI-1

Die Bildung (Koagulation) und der Aufbau (Fibrinolyse) von Blutgerinnseln werden durch eine Vielzahl von körpereigenen Faktoren geregelt. PAI-1, der physiologische Inhibitor von tPA (tPA aktiviert Plasminogen → Plasmin → Fibrinolyse), ist eine wichtige Komponente in diesem Regelwerk. Erhöhte PAI-1-Spiegel im Blut, die bei verschiedenen Erkrankungen gemessen wurden (u.a. Herzinfarkt, Sepsis, Hyperlipoproteinämie), stehen offensichtlich im Zusammenhang mit einer reduzierten fibrinolytischen Aktivität und könnten daher zur Bildung von Thrombose führen.

PAI-1-Inhibitoren sollen das fibrinolytische Gleichgewicht normalisieren und damit Thrombosen vorbeugen bzw. deren Lyse erleichtern. Im PAI-1-Inhibitor-Assay werden Substanzen gesucht, die die Bildung von PAI-1 an tPA inhibieren und damit die Hemmwirkung von PAI-1 neutralisieren.

2. Fibrinogen

Auf der Basis epidemiologischer Studien konnte eine Erhöhung des Fibrinogenspiegels im Plasma als Risikofaktor in der Etiologie folgender Krankheitsbilder identifiziert werden:

- Ischämie des Herzens (IHD)
- Myokardinfarkt
- periphere, arterielle Verschußkrankheit (PAOD)
- Reokklusion
- venöser Bypässe
- Sepsis.

Dies weist auf eine pathologische Bedeutung des Fibrinogens bei artherosklerotischen bzw. thrombotischen Prozessen hin. 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.

3. Serotonin-Rezeptoren

Serotonin (5-Hydroxytryptamin) ist wie Dopamin ein Neurotransmitter, 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 ein Einfluß solcher Wirkstoffe auf psychotische 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.

4. ICE-Inhibition

Interleukin-1 β gehört zur Klasse der Cytokine, die als Signalstoffe eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Zell- und Gewebefunktionen spielen. Erhöhte Interleukin-1 β -Spiegel wurden bei akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen beobachtet. Zur Senkung des Interleukin-1 β -Spiegels werden Inhibitoren des ICE (interleukin converting enzyme) gesucht. ICE katalysiert die Freisetzung des aktiven Interleukin-1 β aus der inaktiven Vorstufe Pre-Interleukin-1 β .

5. SH2

Dieser Test dient der Suche nach niedermolekularen Substanzen, die die Aktivierung der T-Lymphozyten inhibieren. Diese Inhibitoren sollen als Immunsuppressiva zur Therapie von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Transplantatabstoßung eingesetzt werden. Bei der Aktivierung der T-Lymphozyten spielen Interaktionen zwischen SH2-Domänen und spezifischen Targetproteinen eine wichtige Rolle (Signaltransduktions-Kaskade). Durch den Aufbau eines in-vitro-Bindungsassays können bei diesem Test Substanzen identifiziert werden, die die Bindung einer bestimmten SH2-Domäne an ihr Targetprotein hemmen.

Diese Substanzen werden in weiterführenden zellulären Assays auf ihr Potential geprüft, die Aktivierung von T-Lymphozyten zu inhibieren.

6. cdc25

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 Tumorzellwachstumsregulation direkt angehen und sind daher als potentielle Zytostatika von besonderem Interesse. Solche Substanzen wären eventuell auch bei Hyperproliferationskrankheiten, wie Restenose und Entzündung, einsetzbar.

Das Screening sucht nach Inhibitoren einer neuen Protein-Tyrosin-Phosphatase-Klasse, die den Zellzyklus regulieren. Diese Phosphatasen, die cdc25-Familie, kontrollieren den Zellzyklus durch Dephosphorylierung der cyclin/ckd Komplexe.

7. Immunologie PTKs

Ziel des Tests ist die 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, Psoriasis und zur Prophylaxe der Organabstoßung nach Transplantationen eingesetzt werden.

8. Onkologie PTKs

Identifizierung von Protein-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren für eine neue Klasse von Wirkstoffen zur Krebsbehandlung.

Die Bewertungen der Screening-Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Dabei sei angemerkt, daß das Massenscreening nur ungefähre Werte liefert, die in Nachtests bestätigt werden müssen.

	Massenscreening Konzentration (mol/l)	Schwellwert Max. Wirkung	Gute Wirkung
PAI-1-Inhibition	$\approx e-04$	$> 80\%$	$IC_{50} < e-04$
Fibrinogen	$\approx e-06$	$> 50\%$	$IC_{50} \leq e-06$
Serotonin-Rezeptor	$\approx 4.00e-06$	$> 80\%$	$IC_{50} \leq e-08$
ICE-Inhibition	$\approx e-04$	$> 80\%$	$IC_{50} < e-04$
SH2-Inhibition	$\approx e-04$	$> 50\%$	
cdc-25-Inhibition	$\approx e-04$	$> 80\%$	$IC_{50} < 3.00e-05$
PTKs	$\approx 5.00e-05$	$> 50\%$	$IC_{50} < 3.00e-05$

Tabelle 8: Bewertungen der Screening-Ergebnisse.

3.1.4.2. Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3037

3.1.4.2.1. Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig

Im Diagramm 1 sind die Ergebnisse des Agardiffusionstests der Rohextrakte aufgeführt. Außergewöhnlich ist die sehr starke Wirkung sowohl gegen *Ustilago violacea* als auch gegen *Chlorella fusca*. Zur richtigen Einordnung der Ergebnisse sei erwähnt, daß ein Hemmhofradius von 35 mm den größten meßbaren Radius darstellt. Desweiteren ist auch die Aktivität gegenüber *Escherichia coli* und *Bacillus megaterium* noch als gut zu bezeichnen.

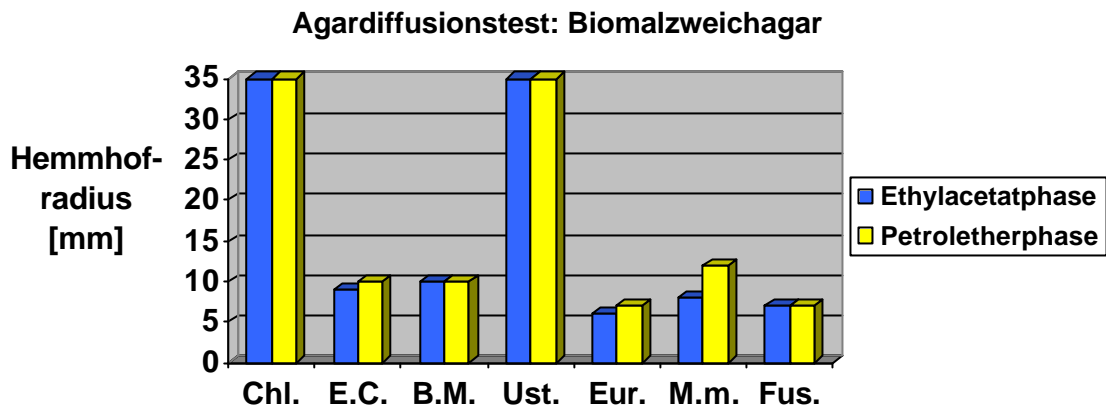


Diagramm 1: Ergebnisse des Agardiffusionstests der Rohextrakte.

Ein Vergleich mit den Biodiagrammen der Naturstoffe **1**, **3**, **4**, **5** und **7** zeigt eindeutig, daß die Substanzen **1** und **3** hauptsächlich für die im Rohextrakt beobachtete Wirkung verantwortlich sind (Diagramm 2). Besonders hervorzuheben ist die außerordentlich starke Aktivität des Naturstoffs **3** gegen *Ustilago violacea* und *Chlorella fusca*. Aus Substanzmangel konnte von dem Sekundärmetaboliten **3** nur noch die Wirkung gegen *Bacillus megaterium* getestet werden. Naturstoff **1** besitzt ebenfalls eine als gut zu bezeichnende Wirkung gegen *Ustilago violacea* und *Chlorella fusca* (Diagramm 2).

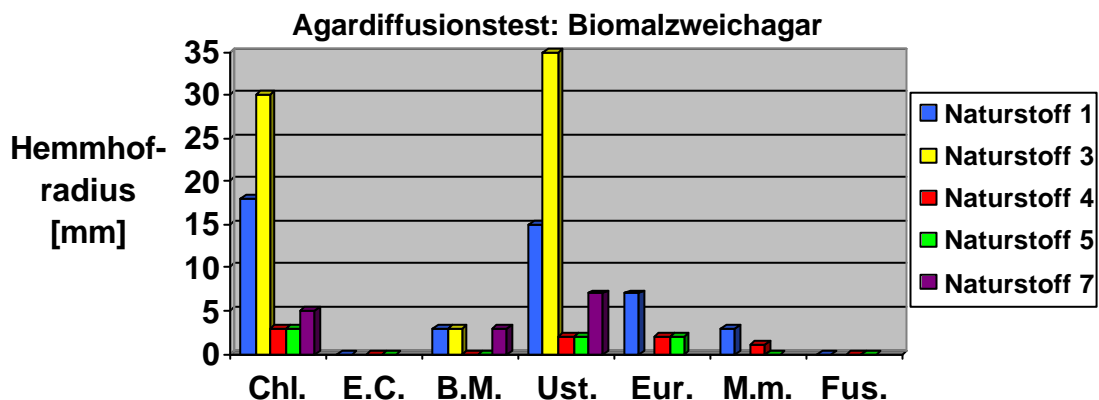


Diagramm 2: Ergebnisse der Agardiffusionstests der Naturstoffe **1**, **3**, **4**, **5** und **7**.

Die stark herbiziden Eigenschaften des Sekundärmetaboliten **1** werden durch die Ergebnisse des Keimlings- und Lemna-Tests belegt (Tab. 9 u. 10). Im Keimlingstest war nach sieben Tagen eine vollkommene Hemmung des Keimwachstums zu beobachten.

Keimlingstest		
Versuchsdauer	2 Tage	7 Tage
Naturstoff 1 *	2 von 15 Samen zeigen Keimwachstum	0 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 1 **	14 von 15 Samen zeigen Keimwachstum	15 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 2 ***	14 von 15 Samen zeigen Keimwachstum	15 von 15 Samen sind gekeimt

Tabelle 9: Wirkung des Naturstoffs **1** im Keimlingstest. Als Testorganismus dient *Lepidum sativum* (Kresse).

* 0.25 ml einer Lösung von 10 mg Naturstoff **1** in 1ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser.

** 0.25 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser.

*** 2.50 ml steriles Wasser.

Der Lemna-Test zeigte bereits nach zwei Tagen einen völligen Stillstand des Pflanzenwachstums. Nach sieben Tagen waren sämtliche Blätter der Testorganismen weiß gefärbt, so daß von einer 100 %igen Wachstumshemmung gesprochen werden kann.

Lemnatest			
Versuchsdauer	0 Tage	2 Tage	7 Tage
Naturstoff 1 * (9 Blätter grün)	9 Blätter grün	9 Blätter teilweise weiß	9 Blätter alle weiß
Referenz 1 ** (8 Blätter grün)	8 Blätter grün	17 Blätter alle grün	37 Blätter alle grün
Referenz 2 *** (9 Blätter grün)	9 Blätter grün	20 Blätter alle grün	45 Blätter alle grün

Tabelle 10: Wirkung des Naturstoffs **1** im Lemnatest.

* 0.25 ml einer Lösung von 10 mg Naturstoff **1** in 1ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser.

** 0.25 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser.

*** 2.50 ml steriles Wasser.

Bemerkenswert ist auch, daß Naturstoff **4** im Gegensatz zu Naturstoff **1** (Diagramm 2) fast keine Wirkung mehr zeigt. Fraglich bleibt, ob dies auf das Fehlen der Methoxygruppe, auf die schlechte Löslichkeit der Verbindung oder auf Fehler bei der Testung zurückzuführen ist.

Das isolierte Cladosporin (**7**) zeigt ebenfalls eine - wenn auch deutlich schwächere – Aktivität gegen *Chlorella fusca* und *Ustilago violacea*. Aus Substanzmangel konnte ebenfalls nur noch gegen *Bacillus megaterium* getestet werden.

3.1.4.2.2. Pharmakologische Aktivität

Die Testergebnisse des „Pharma-Grundscreenings“ sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt. Zur besseren Einordnung der Testergebnisse sei auf die Tabelle 8 (Seite 50) verwiesen. Im Fibrinogen-Test zeigte der Naturstoff **3** bei einer Konzentration von 5×10^{-6} mol/l eine beachtliche Hemmung von 81 %. Nachtests ergaben, daß trotz dieser starken Aktivität die Wirkung der Substanz als nicht verfolgenswert einzustufen ist.

Naturstoff 1		
	Konzentration (mol/l)	Hemmung/Wirkung (%)
cdc25	5.00e-06	-2.97
Immunologie PTKs Kinase KDR6	5.00e-06	19.2
Onkologie PTKs Kinase TEK	5.00e-06	3.77

Tabelle 11: Pharmakologische Aktivität des Naturstoffs **1**.

Naturstoff 3		
	Konzentration (mol/l)	Hemmung/Wirkung (%)
Serotonin RB 5-HT1D	4.00e-06	2.09
Immunologie PTKs Kinase ZAP0	5.00e-05	3.75
Fibrinogen	5.00e-06	81.0
ICE-Inhibition	5.00e-05	-0.115

Tabelle 12: Pharmakologische Aktivität des Naturstoffs **3**.

3.2 Stamm 2225

3.2.1. Pilzbeschreibung

Der Pilzstamm 2225 wurde in einer aus Ägypten stammenden Erdprobe entdeckt. Er gehört zu der nicht näher bestimmten Gattung *Fusarium* sp.. Bisher sind über 50 Arten dieser Gattung bekannt. Telemorphe Gattungen sind *Gibberella* und *Nectria*. Seit den vierziger Jahren sind aus den verschiedenen Arten von *Fusarium* eine große Zahl chemisch unterschiedlicher Stoffe isoliert und charakterisiert worden.^[58,59] Substanzen von einigen *Fusarium* sp. sind gegen Mycobakterien aktiv. Es sind aus ihnen Fusarium-Toxine wie Butenolide und Depsipeptide bekannt. Desweiteren bilden *Fusarium* sp. verschiedene gegen Wirbeltiere wirksame Toxine, z. B. Steroidtoxine.^[60] So verursachen sie unter anderem Fruchtbarkeitsstörungen bei Schweinen und Rindern sowie eine Verringerung der Lege-

leistung bei Hühnern. Sie produzieren auch Hemmstoffe der Proteinsynthese und solche Toxine, die beim Menschen die alimentäre toxische Aleukie (ATA) verursachen.^[58]

Im integrierten Pflanzenschutz haben Mower et al.^[61] *Fusarium roseum* als Hyperparasit gegen den Mutterkornpilz (*Claviceps purpurea*) erfolgreich eingesetzt. *Fusarium* sp. enthalten neben saprophytischen Vertretern auch einige wirtschaftlich wichtige Pflanzenparasiten. Sie verursachen bei Kartoffeln (*Fusarium solani*), Erbsenwurzel und Tomaten (Fusarium-Welke) große Schäden.^[62]

3.2.2. Isolierung der Naturstoffe 8 und 9

Der Pilz der Gattung *Fusarium* sp. wurde in 36 Fernbachkolben auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar angesetzt. Die Kultivierungsdauer betrug genau 90 Tage. Anschließend wurde das vom Nährmedium getrennte Kulturgut mit Wasser und zerstoßenem Eis verdünnt und im Warring-Blender homogenisiert. Die so erhaltenen homogenen Kulturbrühen wurden in einen Scheidetrichter übergeführt, um nachfolgend einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat extrahiert zu werden. Das Ethylacetat selber wurde vor dem Gebrauch mit 100 ml 1 %iger NaHCO_3 -Lösung je Liter Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde der Rückstand der Petrol- und Ethylacetatphase in 20 bzw. 30 ml einer 1:1-Lösung Aceton/Methanol aufgenommen, um so erste Bioaktivitätstests durchzuführen.

Zur Auftrennung der rotbraun gefärbten Rohextrakte wurde die Säulenchromatographie und die präparative Schichtchromatographie genutzt. Den vorher angefertigten Dünnschichtchromatogrammen war zu entnehmen, daß die Hauptfraktion aus einer unpolaren Substanz mit einem R_F -Wert von 0.95 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %) bestand. Die rote Substanz, die wahrscheinlich auch für die Färbung des Rohextrakts verantwortlich ist, färbte sich bei einem R_F -Wert von 0.2–0.5 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %) zuerst violett und dann schwarz. Der langgezogene schwarze Substanzfleck veränderte seine Lage selbst durch mehrmaliges Entwickeln der DC-Karte in einer Dichlormethanolösung mit einem Methanolgehalt von 10 % nicht mehr, so daß davon auszugehen ist, daß sich die Substanz auf dem DC zersetzte.

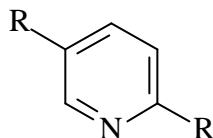
Neben einer Vielzahl kleinerer Fraktionen konnte ein definierter Substanzfleck mit einem R_F -Wert von 0.1–0.2 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8 %) detektiert werden. Die Vorfraktionierung der Ethylacetat-Rohextrakte erfolgte mittels Säulenchromatographie mit einem Lösungsmittelgradienten von 1–10 % Methanol in Dichlormethan. In der unpolarsten Fraktion befand sich

ein Triglycerid, bestehend aus einem Linolsäure- und zwei Ölsäureresten. Die rote Substanz färbte sich, wie auf der DC-Karte, dunkelrot bis schwarz und war durch Erhöhung des Methanolanteils nur in Spuren zu eluieren. Aus der unpolarsten, violettgefärbten Fraktion (21 mg) gelang nach mehrmaliger präparativer Schichtchromatographie die Isolierung eines weißen Feststoffs. NMR- und massenspektroskopische Untersuchungen belegten, daß der weiße Feststoff aus einem 1:1-Gemisch der Naturstoffe **8** und **9** bestand. Die Trennung der beiden Sekundärmetaboliten war partiell durch Kristallisation aus Methanol möglich.

3.2.3. Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe **8** und **9**

3.2.3.1. Naturstoff **8**

Der aus Methanol in farblosen Prismen kristallisierende Sekundärmetabolit **8** schmilzt bei 118–120 °C. Im chemischen Screening auf DC-Folie ($R_f = 0.35$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10 %) reagierte die Substanz positiv mit dem Sprühreagenz Bromkresol-Grün, was ein sicherer Hinweis auf eine Carbonsäurefunktion ist. Der Naturstoff **8** ist nur in polaren Lösungsmitteln wie Methanol oder DMSO in Lösung zu bringen. Im ^1H - und ^{13}C -Spektrum werden zwei aliphatische Methylengruppen, eine olefinische Methylengruppe, vier aromatische oder olefinische Methingruppen und drei aromatische quartäre Kohlenstoffatome registriert, wobei das Signal bei 166.03 ppm wohl der Carbonsäurefunktion zuzuordnen ist. Auffällig ist im Protonenspektrum das tieffeldverschobene Ein-Proton-Signal bei 8.53 ppm, das im C,H-COSY mit dem ^{13}C -NMR-Signal bei 149.46 ppm koppelt. Charakteristisch sind diese extrem zu tiefem Feld verschobenen Signale für die 2- bzw. 6-Position in Pyridinderivaten. Der ungerade Molpeak von 177 sowie das Fragmention $m/e = 92$ sind weitere Hinweise auf einen Pyridinabkömmling. Der Pyridingrundkörper muß ferner in 2-Position substituiert sein, da nur ein Proton diese charakteristische Tieffeldverschiebung aufweist. Das tieffeldverschobene Singulett-Signal des Protons in 6-Position spricht für einen weiteren Substituenten in 5-Position (Teilstruktur I). Die Duplett-Signale bei 7.94 und 7.80 ppm für die beiden verbleibenden Protonen bestätigen mit einer für *ortho*-ständige Protonen typischen Kopplungskonstanten von 7.5 Hz und einem Kreuzsignal im H,H-COSY-Spektrum diese Annahme.



Teilstruktur I

Dem H,H-COSY-Spektrum ist weiter zu entnehmen, daß das Triplet bei 2.75 ppm, welches einer aliphatischen Methylengruppe zuzuordnen ist, mit einem Multiplett bei 2.35 ppm koppelt, welches ebenfalls einer CH₂-Gruppe zugeordnet wird. Das Multiplett seinerseits koppelt mit dem olefinischen Ein-Proton-Signal bei 5.79 ppm, das erwartungsgemäß ein Kreuzsignal zur olefinischen Methylengruppe zeigt, so daß ein 1-Butenyl-Fragment konstruiert werden kann. Das Pyridinderivat ist demnach von einem 1-Butenylrest und einer Carbonsäurefunktion in 2- bzw. 5-Position substituiert. Die Zuordnung, welcher Substituent in 2- bzw. in 5-Position zu finden ist, wird mit Hilfe des H,C-COLOC-Experiments geklärt. So zeigt dieses Experiment eine ³J-Kopplung zwischen dem C-6 Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von 149.46 ppm und der Methylengruppe mit der Protonenverschiebung von 2.75 ppm, woraus zu folgern ist, daß der Butenylrest die 5-Position besetzt (Abb. 35).

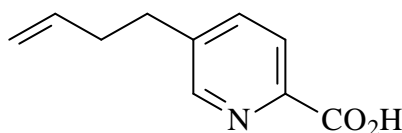


Abb. 35: Naturstoff 8.

Zur Verifizierung des Strukturvorschlags wurde abschließend eine Röntgenstrukturanalyse angefertigt, die die Richtigkeit der postulierten Struktur belegt (Abb. 36). Interessanterweise ist der Naturstoff 8 demzufolge über eine Wasserstoffbrückenbindung mit seiner Betainstruktur verknüpft.

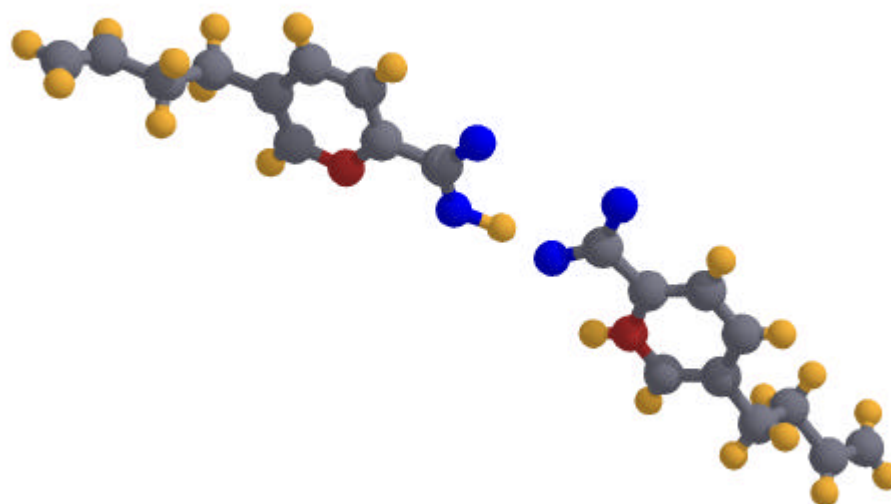


Abb. 36: Der Naturstoff **8** im Kristall.

Die Literaturrecherche ergibt, daß der Naturstoff **8**, der als Dehydrofusarinsäure bezeichnet wird, erstmals 1954 von Stoll^[63] aus *Gibberella fujikuroi* isoliert wurde. Drei Jahre später gelang der gleichen Arbeitsgruppe die Isolierung der Substanz aus *Fusarium lycopersici*^[64]. Die Synthese dieser als Welkstoff bekannten phytotoxischen Substanz wurde erstmals von Steiner^[65] beschrieben.

3.2.3.2. Naturstoff **9**

Der bei 82–84 °C schmelzende Naturstoff **9** reagiert ebenfalls im chemischen Screening auf DC-Folie positiv mit dem Sprühreagenz Bromkresol-Grün. Die Schwerlöslichkeit der Verbindung in Lösungsmitteln mittlerer Polarität sowie das Laufverhalten ($R_f = 0.35$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 10 %) auf der DC-Karte sind weitere Indizien, die für eine Carbonsäurefunktion sprechen. Ein Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Naturstoffe **8** und **9** belegt, daß beide Verbindungen aufgrund der fast gleichen chemischen Verschiebung strukturell große Ähnlichkeit aufweisen sollten. So zeigt das Protonen- und ^{13}C -NMR-Spektrum des Sekundärmetaboliten **9** wiederum bei 8.53 bzw. 149.31 ppm die charakteristischen Signale für eine Methingruppe in 2- bzw. 6-Position eines Pyridinderivates. Auch die restlichen chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten, die dem Pyridingrundkörper zuzuordnen sind, weisen fast identische Signale auf. Größere Differenzen

zwischen den chemischen Verschiebungen sind nur in der Seitenkette auszumachen. Während in den Spektren der Verbindung **8** eine olefinische CH₂- und CH-Gruppe sowie zwei aliphatische Methylengruppen registriert werden konnten, sind in den Spektren des Naturstoffs **9** eine aliphatische Methylgruppe und drei Methylengruppen mit den chemischen Verschiebungen von 0.86, 1.26, 1.55 und 2.64 ppm im Protonenspektrum zu beobachten. Der Naturstoff **9** besitzt demnach statt einer 1-Butenylseitenkette einen (*n*)-Butylrest in 5-Position des Picolingrundkörpers. Der im Vergleich zu Naturstoff **8** um zwei Masseneinheiten größere Molpeak bei 179 belegt gleichfalls, daß Naturstoff **9** die hydrierte Form des Naturstoffs **8** darstellt (Abb. 37).

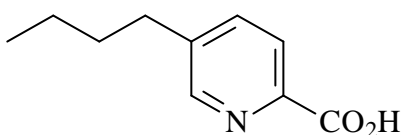


Abb. 37: Die Struktur des Naturstoffs **9**.

Der als Fusar- bzw. Fusarinsäure bezeichnete Naturstoff **9** wurde erstmals 1934 von Yabula und Mitarbeitern^[66] aus Kulturfiltraten von *Fusarium heterosporium* Xees isoliert und strukturell aufgeklärt. Desweiteren wurde er gemeinsam mit Dehydrofusarinsäure (**8**) in wechselnden Mengenverhältnissen von Stoll^[63] aus *Gibberella fujikuroi* und *Fusarium lycopersici*^[64] isoliert. Dabei wurde festgestellt, daß beide Kulturen nach kurzer Inkubationszeit nur Fusarinsäure (**9**) enthielten, während die Dehydrofusarinsäure (**8**) erst bei älteren Kulturen auftrat. Die vermeintliche Schlußfolgerung, daß die Fusarinsäure (**9**) eine Vorstufe der Dehydrofusarinsäure (**8**) ist, konnte von Pitel^[67] nicht belegt werden, da der Naturstoff **8** seinerseits einer Umwandlung in die Fusarinsäure (**9**) unterliegt, so daß keine einfache Edukt-Produkt-Beziehung zwischen beiden Komponenten ableitbar war. Ferner konnte an ¹⁴C-markierter Fusarin- (**9**) bzw. Dehydrofusarinsäure (**8**) gezeigt werden, daß beide weiter zur 10-Hydroxyfusarinsäure und 11-Chloro-10-hydroxyfusarinsäure metabolisiert werden.

Anhand von Plattners^[68] Untersuchungen waren 1954 erste Aussagen zur Phytotoxizität der Fusarinsäure (**9**) möglich. Ihm gelang der Nachweis, daß ein aus *Fusarium lycopersici* Sacc., dem Erreger der Tomatenwelke, isoliertes Stoffwechselprodukt mit Fusarinsäure (**9**) identisch ist. Weitere 15 Jahre danach fanden Hiduka et al.^[69] in der Fusarinsäure (**9**) einen Hemmstoff der Dopamin-β-Hydrolase (DBH) mit stark antihypertensiver Wirkung. Ferner ist bekannt,

daß Naturstoff **9** auch in andere Stoffwechselvorgänge eingreift, z.B. beeinflusst er den Serotonin-Metabolismus.^[70,71]

Aufgrund des breiten Wirkspektrums ist es nicht verwunderlich, daß bereits 1954 von Plattner^[67] erste Versuche zur Synthese dieser Verbindung durchgeführt wurden. Unter der Vielzahl der weiteren Synthesen^[72–75] sollte speziell die von Waldner^[76,77] genannt werden. Ihm gelang es, ausgehend von α,β -ungesättigten Hydrazonen und 2-Chloracrylnitril in einer zweistufigen Synthese Fusarinsäure und einige Derivate herzustellen.

3.2.4. Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 2225

3.2.4.1. Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig

Im Diagramm 3 sind die Ergebnisse der Agardiffusionstests der Ethylacetatphasen der Rohextrakte dargestellt. Aus diesem ist ersichtlich, daß, im Bezug auf das Nährmedium, keine großen Aktivitätsunterschiede festzustellen sind. Die Wirkung gegen *Chlorella fusca* ist mit einem Hemmhofradius von 14 bzw. 16 mm als gut zu bezeichnen. Eine mäßige Aktivität zeigen die Rohextrakte gegen *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* und *Ustilago violacea*. Erwähnt sei desweiteren, daß die Petroletherphasen der Biomalz- und Malz-Soja-Weichagarmedien keine Hemmung zeigten.

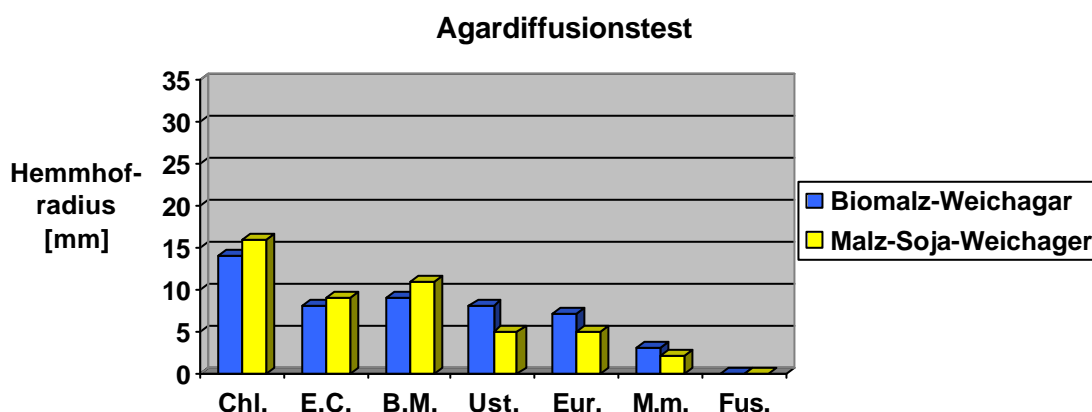


Diagramm 3: Agardiffusionstests der Rohextrakte (Ethylacetatphasen).

Die sehr starken herbiziden Eigenschaften der Rohextrakte wurden durch den Keimlings- und Lemnatest belegt. In beiden Tests wurde eine 100 %ige Wachstumshemmung festgestellt. Die Auswertung der Tests mit Erklärung sind in Tabelle 13 illustriert.

Keimlingstest	
Versuchsdauer	6 Tage
Biomalz*	0 von 15 Samen sind gekeimt
Malz-Soja*	0 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 1**	15 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 2***	14 von 15 Samen sind gekeimt

Tabelle 13: Wirkung der Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar-Rohextrakte im Keimlingstest (* 0.25 ml einer Lösung des Rohextraktes in 30 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser; **, *** Referenzen und Testorganismus siehe Seite 52, Tabelle 9).

Der Vergleich der Ergebnisse der Agardiffusionstests der Rohextrakte und der Fusarinsäure (Diagramm 4) belegt eindeutig, daß mit dieser Substanz die aktive Komponente aus dem Pilzextrakt isoliert wurde. Aus Substanzmangel konnte auch hier nur gegen *Chlorella fusca*, *Bacillus megaterium* und *Ustilago violacea* getestet werden.

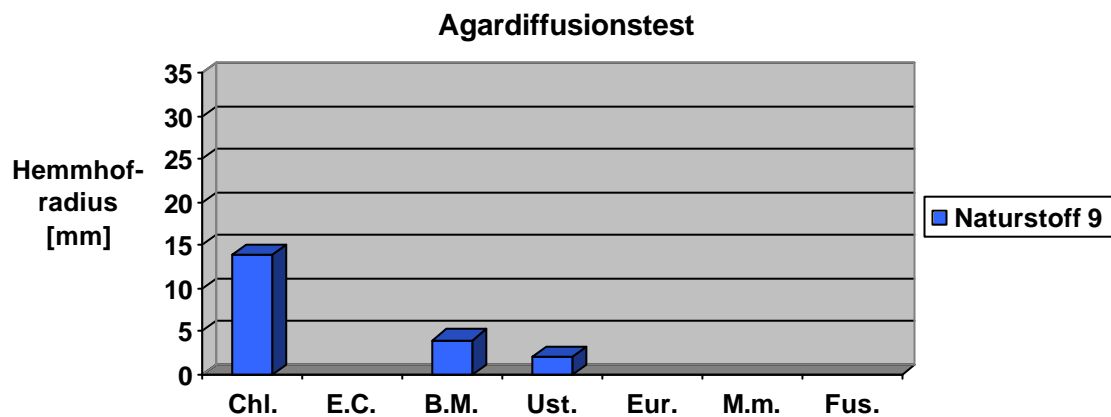


Diagramm 4: Der Agardiffusionstest des Naturstoffs 9.

3.3. Stamm 3184

3.3.1. Pilzbeschreibung

Beim Pilzstamm 3184, der aus der Pflanze *Robinia pseudacacia* (Niedersachsen) isoliert wurde, handelt es sich um einen endophytisch lebenden Pilz der Gattung *Monodictys fluctuata*. Er gehört zur Abteilung der *Fungi imperfecti*. In der Testung ist der Stamm hauptsächlich wegen seiner herbiziden Wirkung aufgefallen.

3.3.2. Isolierung der Naturstoffe 10, 11 und 12

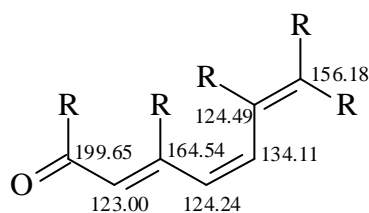
Der Pilz der Gattung *Monodictys fluctuata* wurde auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar 73 Tage kultiviert. Danach wurde das Kulturgut mit Wasser und zerstoßenem Eis im Warring-Blender homogenisiert und einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde zuvor mit 1 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung neutral gewaschen. Anschließend wurde das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand in 5 ml eines Aceton-Methanol-Gemisches (1:1) aufgenommen. Die vor der Fraktionierung angefertigten Dünnschichtchromatogramme zeigten, daß die Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakte im wesentlichen aus einer unpolaren Substanz (R_F -Wert: 0.84 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %) und einem Bereich mit polaren Substanzen besteht (R_F -Wert: 0.2–0.6 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %). Die Vorfraktionierung erfolgte mittels Säulenchromatographie. Als Elutionsmittel wurde Dichlormethan mit einem Methanolgehalt von 1–5 % verwandt. In der unpolarsten Fraktion (R_F -Wert: 0.48–0.86; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %) befanden sich zwei Fette, die nicht weiter charakterisiert wurden, und der schwach UV-aktive Naturstoff **10** (R_F -Wert: 0.48; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %), der durch zweimalige präparative Schichtchromatographie in reiner Form (10 mg) erhalten wurde.

Die polarste Fraktion enthielt neben einer Vielzahl buntgefärbter, nicht isolierbarer Substanzen zwei Naturstoffe, die durch ihre starke UV-Aktivität leicht zu detektieren und isolieren waren. Die Reinigung der Sekundärmetabolite **11** und **12** gelang durch mehrmalige präparative Schichtchromatographie. Als Elutionsmittel wurde ein Lösungsmittelgemisch, bestehend aus Dichlormethan und 4 % Methanol, verwandt. Von den in Aceton gut löslichen Naturstoffen **11** und **12** konnte auf diese Weise insgesamt 58 bzw. 8 mg isoliert werden.

3.3.3. Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 10, 11 und 12

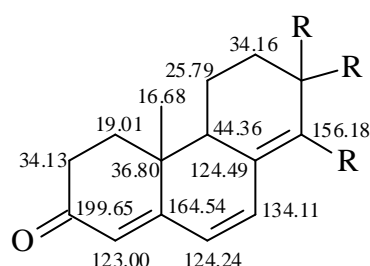
3.3.3.1. Naturstoff 10

Der gelbe Feststoff besitzt einen Schmelzpunkt von 85–87 °C. Mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm ist er dünnschichtchromatographisch ($R_f = 0.48$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %) detektierbar. Der Naturstoff **10** löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität wie Dichlormethan oder Chloroform. Schlecht ist er in unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan oder Petrolether löslich. Der spezifische Drehwert der Substanz beträgt $[\alpha]_D^{20} = + 537^\circ$ ($c = 0.67$ in CH_2Cl_2). Die NMR-Spektren der Verbindung zeigen, daß die Substanz sechs Methylgruppen besitzt. Zwei dieser Methylgruppen zeigen im Protonenspektrum ein Singulett bei 0.96 bzw. 1.00 ppm, während für die restlichen vier CH_3 -Gruppen je ein Duplett mit einer chemischen Verschiebung von 0.83, 0.85, 0.93 und 1.06 ppm detektierbar ist. Desweiteren sind noch sechs Methylen-, jeweils fünf aliphatische und olefinische Methingruppen, zwei aliphatische quartäre Kohlenstoffatome und eine Carbonylfunktion mit einer chemischen Verschiebung von $\delta = 199.65$ ppm registrierbar. Im IR-Spektrum ist bei 1685 cm^{-1} eine scharfe Bande zu beobachten, die in Übereinstimmung mit der chemischen Verschiebung im ^{13}C -NMR-Spektrum für ein α,β -ungesättigtes Keton spricht. Weitere signifikante Hinweise sind ebenfalls die chemischen Verschiebungen der olefinischen Methingruppe bei 123.00 ppm und der quartären ^{13}C -NMR-Signale bei 124.49, 156.18 und 164.54 ppm, die für einen konjugativen Effekt der Ketogruppe sprechen. Belegt wird diese Hypothese durch Auswertung des HMBC-Spektrums. Es zeigt, daß die Methingruppe bei 123.00 ppm eine geminale Kopplung zur Carbonylgruppe und eine vicinale Kopplung zur Methingruppe bei 124.49 ppm aufweist, wobei für letztere im H,H-COSY- bzw. Protonenspektrum eine *cis*-Kopplung ($J = 9.5\text{ Hz}$) zu dem Proton der Methingruppe mit der ^{13}C -NMR-Verschiebung von 134.11 ppm registrierbar ist. Das zugehörige Protonensignal bei 6.60 ppm zeigt im HMBC-Spektrum wiederum Kreuzsignale zu den quartären C-Atomen bei 156.18 bzw. 164.54 ppm, so daß Teilstruktur I formuliert werden kann.



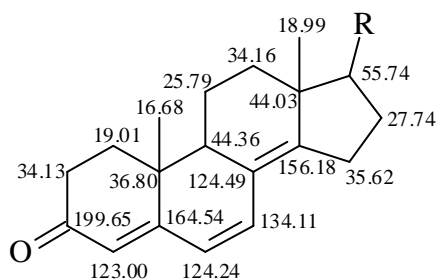
Teilstruktur I

Desweiteren zeigen die beiden olefinischen Methingruppen mit den chemischen Verschiebungen von 123.00 und 124.24 ppm im HMBC-Spektrum eine 3J -Kopplung zu dem quartären Kohlenstoffatom bei 36.80 ppm. Von diesem ausgehend, sind 2J - und 3J -Kopplungen zu einer Methylgruppe bei 16.68 ppm, einer Methingruppe bei 44.36 ppm und zu zwei Methylengruppen bei 34.13 und 19.01 ppm zu beobachten. Während die Methylengruppen wiederum mit der Carbonylgruppe koppeln, zeigt die Methingruppe bei 44.36 ppm im H,H-COSY- und HMBC-Spektrum ein Kreuzsignal zu den Methylengruppen bei 25.79 und 34.16 ppm. Letztere CH_2 -Gruppe koppelt mit dem C-Atom bei 156.18 ppm, so daß folgende Teilstruktur formuliert werden kann:



Teilstruktur II

Dem H,H-COSY ist weiter zu entnehmen, daß die Methylengruppen mit den ^{13}C -NMR-Verschiebungen von 35.62 und 27.74 ppm miteinander koppeln. Letztere zeigt ein weiteres Kreuzsignal mit einer Methingruppe bei 55.74 ppm, die ebenfalls im HMBC-Spektrum eine 3J -Kopplung zu einem Singulett-Signal einer Methylgruppe mit der chemischen Verschiebung von 18.99 ppm zeigt. Diese erzeugt im HMBC-Spektrum weitere Kreuzkopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 44.03 und 156.18 ppm, so daß das als Teilstruktur III bezeichnete Steroidgrundgerüst konstruiert werden kann.



Teilstruktur III

Die Methingruppe bei 55.74 ppm zeigt im H,H-COSY ein Kreuzsignal zur Methingruppe bei 39.31 ppm. Desweiteren ist im HMBC-Spektrum ebenfalls eine geminale Konnektivität zur Methingruppe und eine vicinale Kopplung zur Methylgruppe bei 21.25 ppm detektierbar. Die Methyl- und Methingruppen erzeugen ferner Kreuzkopplungen zu den olefinischen CH-Gruppen bei 132.58 und 135.04 ppm, die im H,H-COSY- bzw. im HMBC-Spektrum weitere 2J - und 3J -Konnektivitäten mit den Methingruppen bei 42.91 und 33.12 ppm eingehen. Während letztere im H,H-COSY mit zwei Methylgruppen koppelt, kann für die Methingruppe bei 42.91 ppm nur eine Kopplung zu einer Methylgruppe registriert werden, was zur Konstruktion der in Abb. 38 dargestellten Struktur führt.

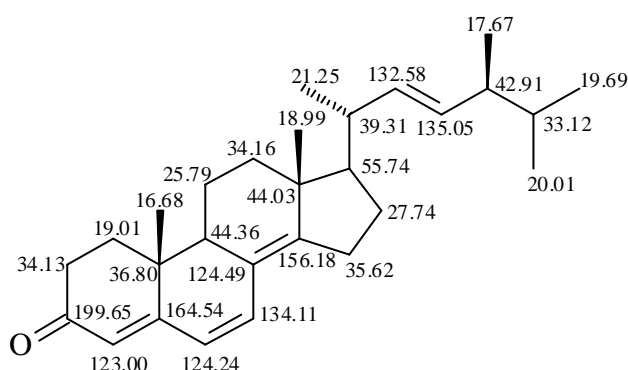


Abb. 38: Absolute Konfiguration des Naturstoffs **10**.

Eine Literaturrecherche ergibt, daß das Steroid namens Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on (**10**) von Schulte^[78] 1968 isoliert wurde. In terrestrischen Basidiomyceten wie z. B. *Astraeus hygrometricus*^[79], *Ganoderma australe* und *Skleroderma polyrhizum*^[80] ist das Steroid weit verbreitet. Selbst aus den marinen Deuteromyceten *Dendryphiella salina*^[81] konnte es isoliert werden.

3.3.3.1.1. Biosynthese des Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3ons (**10**)

Fütterungsversuche mit ^3H -markierten Steroiden bewiesen^[82], daß Ergosterol (**22**) eine Vorstufe des Sekundärmetaboliten **10** darstellt. Das Markierungsexperiment zeigte deutlich, daß das Ergosterol (**22**) in das in Abbildung 39 gezeigte Triol **23** übergeführt wird, das durch weitere Oxidation in das 3-Keto-5 α ,8-diol **24** umgewandelt wird. Durch die zweimalige Dehydrogenierung gelangt man schließlich zum Naturstoff **10**.

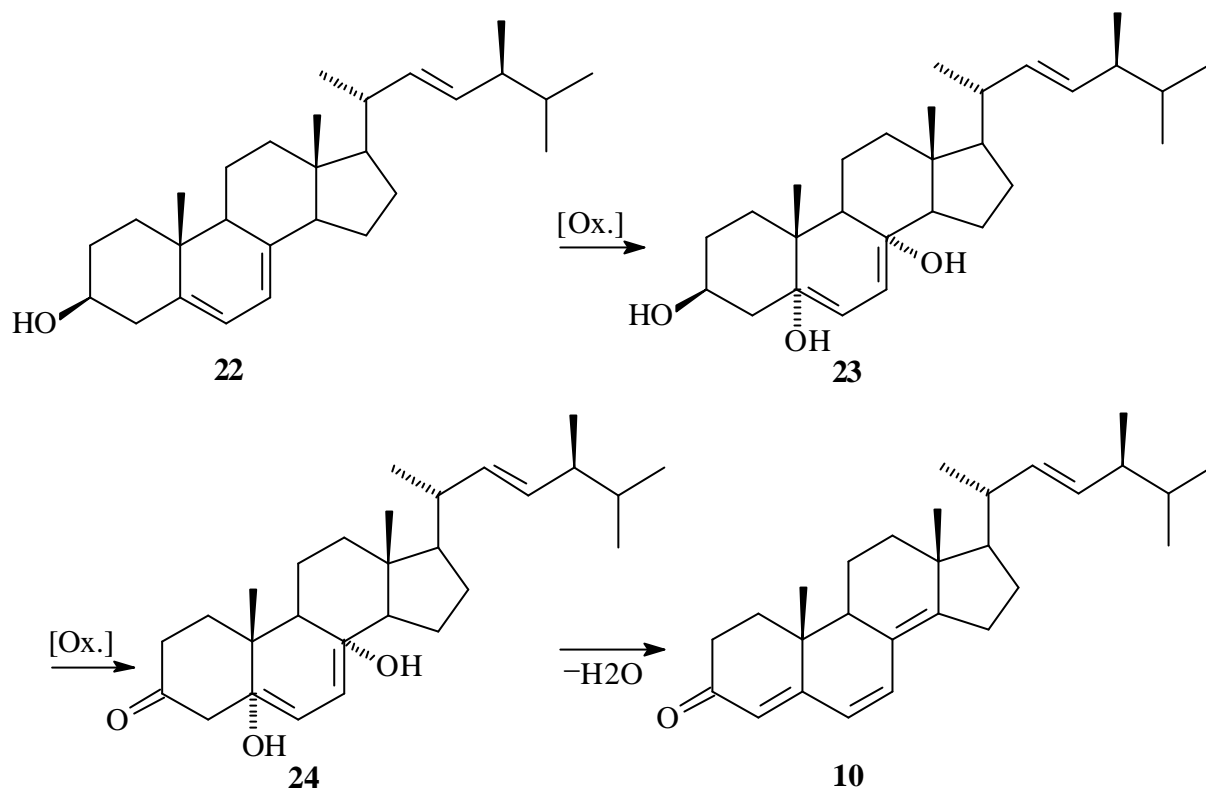
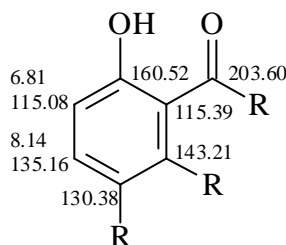


Abb. 39: Biosynthese des Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-ons (10).

3.3.3.2. Naturstoff 11

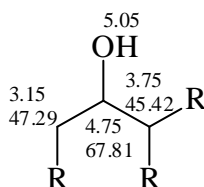
Der Sekundärmetabolit **11** fällt als hellgelber Feststoff mit einem R_f -Wert von 0.32 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) und einem Zersetzungspunkt von ca. 250 °C an. Er löst sich gut in Aceton und Methanol, schlecht dagegen in Lösungsmitteln mittlerer Polarität, wie z. B. Chloroform. Das IR-Spektrum zeigt eine für Carbonylgruppen charakteristische Bande bei 1647 cm^{-1} und eine breite Bande bei 3410 cm^{-1} , die für OH-Gruppen typisch ist. Im ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung sind zehn Kohlenstoffatome detektierbar. Die Auswertung der ^1H -, ^{13}C -NMR- und DEPT-Spektren zeigt, daß diese Signale einer aliphatischen Methylengruppe, zwei aliphatischen und aromatischen Methingruppen, vier aromatischen quartären Kohlenstoffatomen und einer Carbonylgruppe bei 203.60 ppm zuzuordnen sind. Dem Protonenspektrum ist zu entnehmen, daß die aromatischen Protonen ein AX-Spin-System mit einer *ortho*-Kopplung ($J = 8.8\text{ Hz}$) bilden und das scharfe Singulett bei 12.10 ppm dem Signal einer chelierten OH-Gruppe entspricht. Das relativ stark hochfeldverschobene Signal bei $\delta = 6.18\text{ ppm}$ ist offensichtlich in *ortho*-Position zur OH-Gruppe zu finden. Die Tieffeldverschiebung des zweiten aromatischen Protons bei 8.14 ppm ist

typisch für ein Proton, das sich in *meta*-Position zur OH-Gruppe und *para*-Position zur Carbonylgruppe befindet. Weitere Indizien, die für die Teilstruktur I sprechen, sind die charakteristischen ^{13}C -NMR-Verschiebungen für die aromatische CH-Gruppe bei 115.08 ppm und die der quartären Kohlenstoffatome bei 160.52, 115.39 und 143.21 ppm.



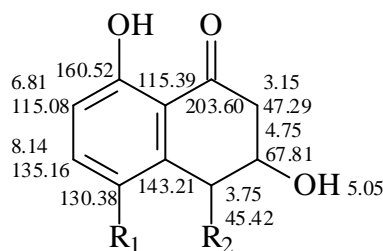
Teilstruktur I

Im H,H-COSY werden, ausgehend von der Methingruppe bei 4.75 ppm, Kreuzsignale zu dem Protonensignal der Methylengruppe mit den chemischen Verschiebungen von 3.03 und 3.15 ppm und der Methingruppe bei 3.75 ppm beobachtet. Die CH-Gruppe bei 4.75 ppm weist eine weitere Kopplung zu einem Duplett bei 5.05 ppm ($J = 5.4$ Hz) auf, das aufgrund der Austauschbarkeit der Protonen und der ^{13}C -NMR-Verschiebung der CH-Gruppe (67.81 ppm) als OH-Proton identifiziert wird.



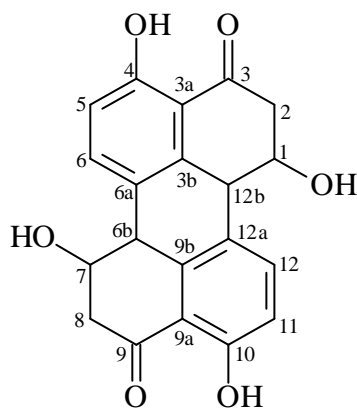
Teilstruktur II

Die Protonen der Methylengruppe zeigen im Protonenspektrum jeweils eine geminale Kopplung von 14.5 Hz sowie eine vicinale Kopplung von 5.8 bzw. 11.9 Hz. Im COLOC-Spektrum beobachtet man ausgehend von diesen Signalen eine Korrelation zur Carbonylgruppe. Von der Methingruppe bei 3.75 ppm sind Konektivitäten zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 143.21 und 130.38 ppm detektierbar, so daß das Fragment II nur, wie in Teilstruktur III dargestellt, mit dem aromatischen Rest verknüpft sein.



Teilstruktur III

Als vorläufige Summenformel erhält man $C_{10}H_8O_3R_1R_2$. Das Molekulargewicht des Naturstoffs **11** muß also größer als 176 g/mol sein und die Reste R_1 und R_2 dürfen kein weiteres 1H - und ^{13}C -NMR-Signal erzeugen. Das Massenspektrum zeigt, daß die Verbindung eine Molmasse von 352 besitzt. Die Reste R_1 und R_2 besitzen also gleichfalls eine Masse von 176. Das einzige Fragment, welches beide Bedingungen erfüllt, ist das in Teilstruktur III dargestellte Fragment mit der Summenformel $C_{10}H_8O_3$ selbst. Die Verknüpfung dieser Fragmente erfolgt aufgrund einer im COLOC-Spektrum beobachteten 3J -Kopplung zwischen dem Kohlenstoffatom bei 135.16 ppm und der Methingruppe bei 3.75 ppm (Abb. 40).

Abb. 40: Die Struktur des Naturstoffs **11**.

Die Aufklärung der relativen Konfiguration des Naturstoffs **11** erfolgt durch die Auswertung der Kopplungskonstanten. Die vicinalen Kopplungskonstanten zwischen C-2 bzw. C-8 und C-1 bzw. C-7 ($J_{ae} = 5.8$ Hz und $J_{aa} = 11.9$ Hz) zeigen, daß der Cyclohexanonring vorzugsweise in einer Halbsessel-Konformation mit der Hydroxylgruppe in äquatorialer Position vorliegt. Die 3J -Kopplung zwischen C-1 bzw. C-7 und C-12b bzw. C-6b besitzt mit 9.0 Hz ebenfalls einen für axial-axial angeordnete Protonen typischen Wert. Das nur der haploide Satz an Protonen-

und ^{13}C -NMR-Resonanzen in den NMR-Spektren registrierbar ist läßt sich nur durch die Existenz einer C_2 -Achse senkrecht zur Molekülebene und somit einer *cis*-Anordnung der Protonen 6b-H und 12b-H erklären (Abb.40).

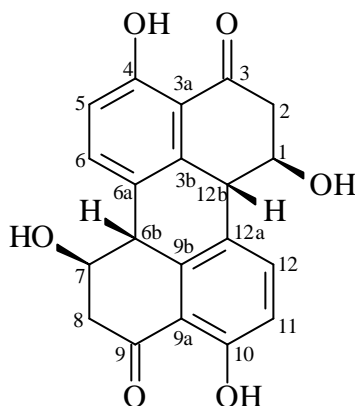


Abb. 41: Die absolute Konfiguration des Naturstoffs **11**.

Eine Recherche in der Chapman-Hall-Datenbank ergab, daß der in Abb. 41 dargestellte Naturstoff namens Stemphyperylenol (**11**) 1986 von Nasini^[83] aus *Stemphylium botrysum* var. *Lactucum* isoliert und charakterisiert wurde. Ihm gelang auch die Aufklärung der absoluten Konfiguration. Strobel^[84] isolierte 1989 den phytotoxisch wirkenden Naturstoff aus *Alternaria cassiae*.

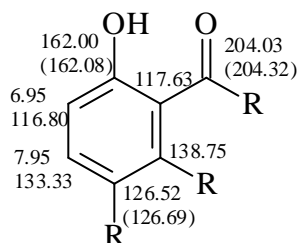
3.3.3.3. Naturstoff 12

Der Naturstoff **12** wird als gelber Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 150–152 °C isoliert. Die Substanz besitzt einen R_f -Wert von 0.25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) und einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 451^\circ$ ($c = 0.07$; MeOH). Das IR-Spektrum zeigt wiederum zwei scharfe Absorptionsbanden bei 1651 cm^{-1} und 1645 cm^{-1} , die für zwei Carbonylbanden sprechen. Desweiteren sind drei relativ breite Banden bei 3238 , 3418 und 3473 cm^{-1} detektierbar. Durch die hochauflösende Massenspektroskopie wird die Molmasse zu $368.089 \pm 3\text{ ppm}$ bestimmt, woraus sich unter Berücksichtigung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten eine Summenformel von $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ergibt.

Die Auswertung der ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektren und des DEPT-Experiments läßt erkennen, daß die Verbindung aus zwei aliphatischen Methylgruppen, drei einfach oxygenierten alipha-

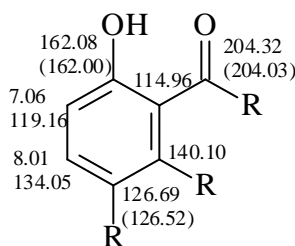
tischen Kohlenstoffatomen, vier aromatischen CH-Gruppen, acht aromatischen oder olefinischen quartären Kohlenstoffatomen und zwei Carbonylgruppen aufgebaut ist, wobei es sich bei letzteren aufgrund ihrer chemischen Verschiebung (204.03 und 204.32 ppm) und ihrer IR-Absorptionsbanden um Arylketone handelt. Die vier aromatischen Protonen mit den chemischen Verschiebungen von 6.95, 7.06, 7.95 und 8.01 ppm zeigen jeweils nur ein *ortho*-koppelndes AX-Spin-System. Das H,H-COSY-Spektrum bestätigt, daß das Proton bei 6.95 ppm und 7.05 ppm nur eine 3J -Kopplung mit dem Proton bei 7.95 bzw. 8.01 ppm eingeht. Hervorzuheben sind desweiteren die scharfen Signale bei 12.35 und 12.58 ppm. Sie sind charakteristisch für chelatisierte OH-Gruppen. Die chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum von 162.00 und 162.08 ppm und die hochfeldverschobenen Protonenresonanzen sind weitere Indizien.

Im HMBC-Spektrum sind, ausgehend vom Protonensignal bei 6.95 ppm, Kreuzsignale zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 117.63, 162.00 (oder 162.08) und 126.52 (oder 126.69) ppm zu beobachten. Die in Klammern aufgeführten chemischen Verschiebungen sollen andeuten, daß eine zweifelsfreie Zuordnung zwischen den Signalen mit fast identischer Verschiebung nicht möglich ist. Die 2J - und 3J -Kopplungen des *ortho*-ständigen Protons bei 7.95 ppm zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 126.52 (oder 126.69), 162.00 (oder 162.08) und 138.75 ppm führt zur Konstruktion der Teilstruktur Ia.

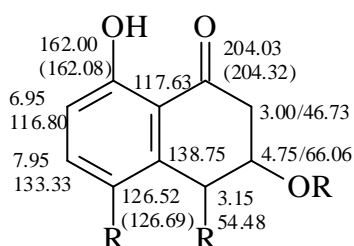


Teilstruktur Ia

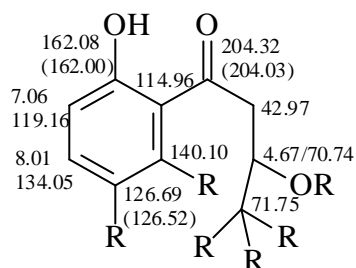
Ausgehend vom Proton bei 7.06 ppm sind im HMBC-Spektrum analoge geminale und vicinale Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen mit der chemischen Verschiebung von 114.96, 162.08 (oder 162.00) und 126.69 (oder 126.52) ppm registrierbar. Ebenso zeigt das *ortho*-ständige Proton bei 8.01 ppm auffällig ähnliche Konnektivitäten zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 126.69 (oder 126.52), 162.08 (oder 162.00) und 140.10 ppm (Teilstruktur Ib).

**Teilstruktur Ib**

Dem ^1H , ^1H -COSY-Spektrum ist weiter zu entnehmen, daß die Methingruppe mit der ^{13}C -NMR-Verschiebung von 54.48 ppm mit einer CH-Gruppe koppelt, die aufgrund ihres Protonensignals bei 4.75 ppm und der ^{13}C -NMR-Verschiebung von 66.06 ppm wohl einfach oxygeniert ist. Diese zeigt ein weiteres Kreuzsignal zur Methylengruppe bei 46.73 ppm. Im HMBC-Spektrum koppelt diese Methylengruppe mit dem quartären Kohlenstoffatom bei 117.63 ppm, mit der Keto-Gruppe und der Methingruppe bei 54.48 ppm. Die Methingruppe ihrerseits zeigt 2J - und 3J -Konnektivitäten zu den quartären Kohlenstoffatomen bei 117.63, 126.52 (oder 126.69) und 138.75 ppm, so daß Teilstruktur IIa formuliert werden kann.

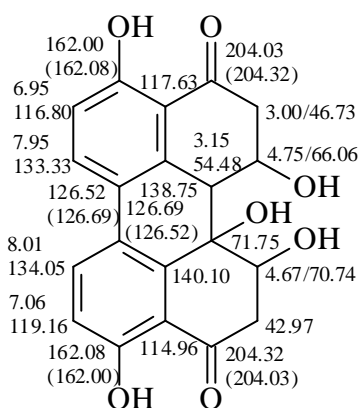
**Teilstruktur IIa**

Im aliphatischen Bereich des ^1H , ^1H -COSY-Spektrums sind Kreuzsignale der Methylengruppe mit der ^{13}C -NMR-Verschiebung von 42.97 ppm zum Doppel-Duplett-Signal bei 4.67 ppm detektierbar, das aufgrund seiner ^{13}C -NMR-Verschiebung von 70.74 ppm ebenfalls monooxygeniert ist. Dem HMBC-Spektrum ist zu entnehmen, daß die Methylengruppe mit einer Ketogruppe, einem quartären Kohlenstoffatom bei 114.96 ppm und einem einfach oxygenierten quartären Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von 71.75 ppm koppelt (Teilstruktur IIb).



Teilstruktur IIb

Der Vergleich der Teilstrukturen IIa und IIb mit der Teilstruktur III des Naturstoffs **11** (Seite 67) zeigt, daß diese strukturell sehr große Ähnlichkeit aufweisen. Aufschluß über die Verknüpfung der Teilstrukturen IIa und IIb erhält man durch die weitere Auswertung des HMBC-Spektrums. Aus diesem ist ersichtlich, daß die Methingruppe bei 54.48 ppm (Teilstruktur IIa) sowohl mit den einfach oxygenierten Kohlenstoffatomen bei 70.74 und 71.75 ppm als auch mit dem quartären ^{13}C -NMR-Signal bei 140.10 ppm koppelt. Unter Berücksichtigung der massenspektroskopisch bestimmten Summenformel muß der Naturstoff **12** die in Abb. 42 dargestellte Struktur besitzen.

Abb. 42: Die Struktur des Naturstoffs **12**.

Die Aufklärung der relativen Konfiguration erfolgt durch die Auswertung der Kopplungskonstanten. Die vicinalen Kopplungskonstanten zwischen den Protonen der Methingruppe bei 54.48 ppm und 66.06 ppm ($^3J = 8.6$ Hz) zeigen, daß die OH-Gruppe in dem in Halbsesselkonformation vorliegenden Cyclohexanonring ebenso wie bei Naturstoff **11** in äquatorialer Position angeordnet sein muß und die Protonen die axialen Positionen einnehmen (Abb. 43).

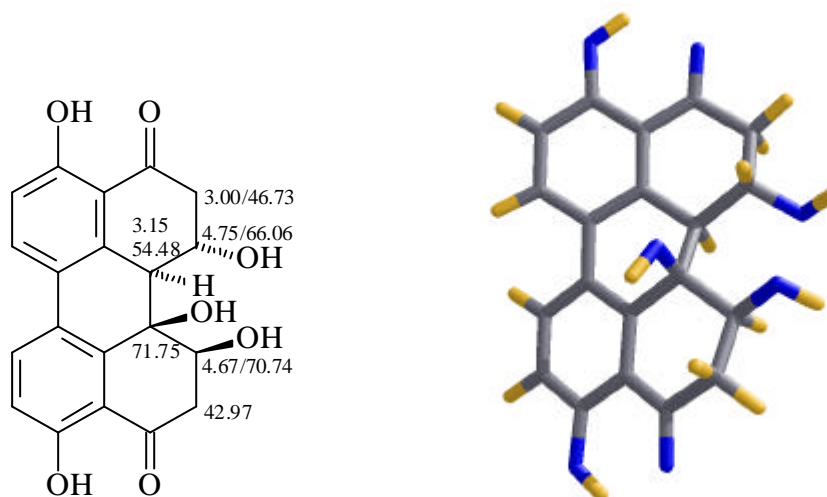


Abb. 43: Die relative Konfiguration und dreidimensionale Struktur des Naturstoffs **12**.

Im zweiten Cyclohexanonring ist ebenfalls eine große vicinale Kopplungskonstante von $J = 12.5$ Hz zwischen den Protonen der Methingruppe bei 70.74 ppm und dem axial angeordneten Proton der Methylengruppe bei 42.97 ppm zu beobachten, so daß auch hier die OH-Gruppe äquatorial angeordnet sein muß. Um beide Cyclohexanonringe verknüpfen zu können, muß die OH-Gruppe am quartären Kohlenstoffatom mit der chemischen Verschiebung von 71.75 ppm axial angeordnet sein. Die so konstruierbare relative Konfiguration des literaturunbekannten Sekundärmetaboliten **12** ist in Abb. 43 dargestellt. Der Vergleich der Kopplungskonstanten, der chemischen Verschiebungen der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren sowie die fast ideale Übereinstimmung der CD-Spektren mit dem strukturell fast identischen Stempyltoxin I (**25**)^[83] (Abb. 44) belegt, daß beide Verbindungen die gleiche relative Konfiguration besitzen. Bei Naturstoff **12** handelt es sich demnach um einen neuen interessanten Vertreter aus der Klasse der Stemphyl- bzw. Altertoxine, die als Phytotoxine aus *Stemphylium botryosum*, *Alternaria tenius*, *Alternaria mali* bzw. *Alternaria cassiae* bekannt sind.^[85–89]

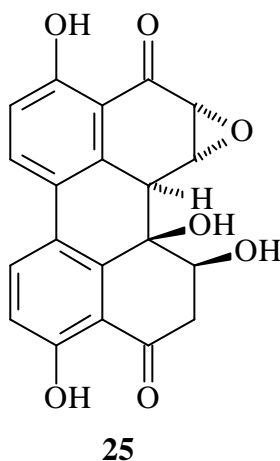


Abb. 44: Die relative Konfiguration des Stemphyliotoxins I (**25**).

3.3.3.3.1. Biosynthese der Naturstoffe **11** und **12**

Okuno et al.^[90] zeigten durch Fütterungsversuche mit [2-¹³C]-markiertem Natriumacetat, daß die Biosynthese des Alterperyleneols (**26**) (Abb. 45) wahrscheinlich über die oxidative Kupplung zweier Tetralon-Derivate **28** verläuft.

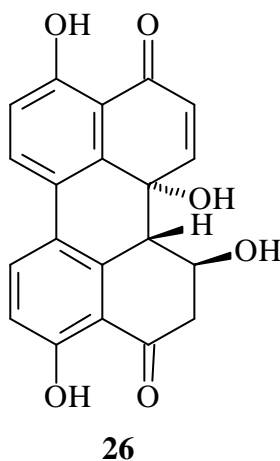


Abb. 45: Alterperyleneol (**26**).

Eine hypothetische Vorstufe dieser Tetralon-Derivate **28** sollte dem Markierungsexperiment zufolge ein ¹³C-markiertes Pentaketid **27** sein (Abb. 46). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit kann vermutet werden, daß die Naturstoffe **11** und **12** einen vergleichbaren Biosyntheseweg besitzen. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, daß der Naturstoff **11**

unter einer Vielzahl von Perylen-Derivaten die einzige Verbindung ist, die statt der üblichen Kopf/Kopf-Verknüpfung der Tetralon-Derivate eine Kopf/Schwanz-Verknüpfung aufweist.

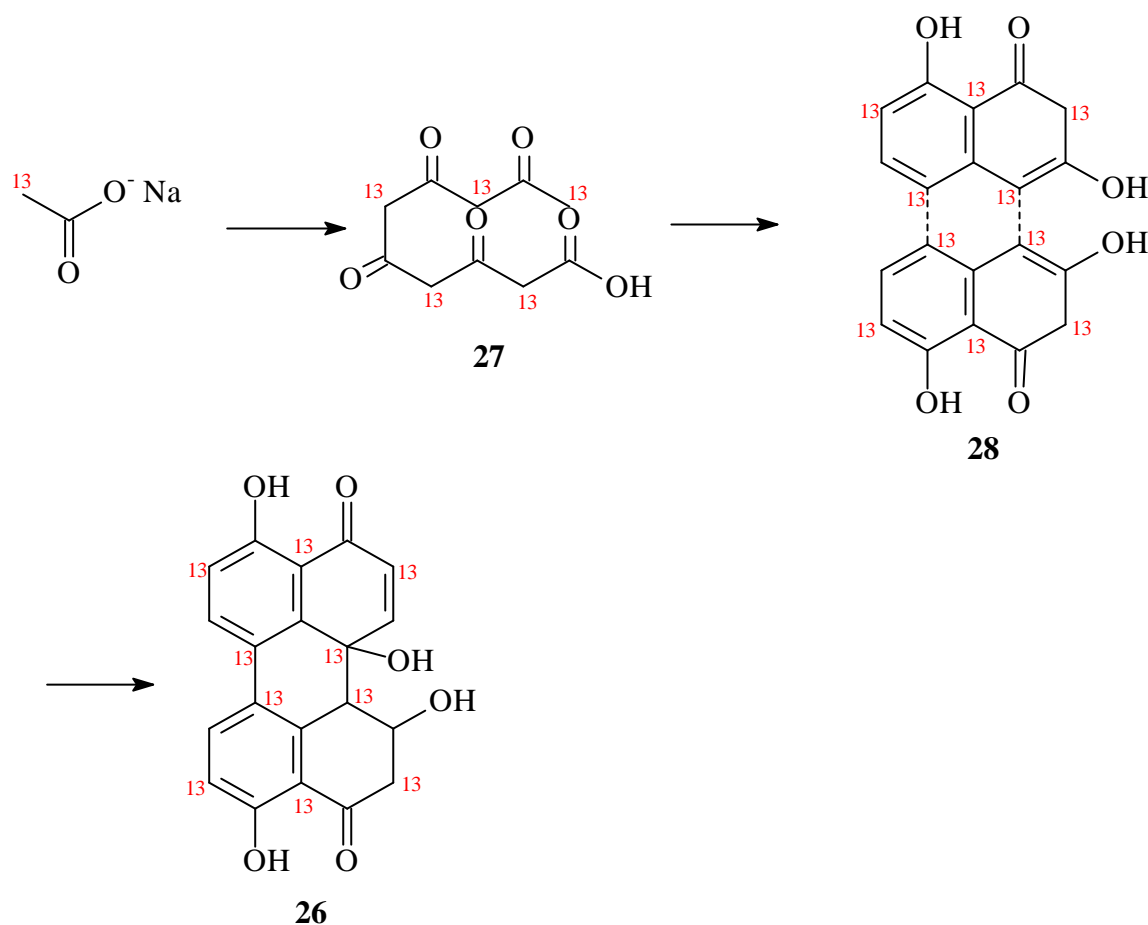


Abb. 46: Biosynthese des Alterperylenol (26).

3.3.4. Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3184

3.3.4.1. Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig

Im Agardiffusionstest zeigte der Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakt eine gute Wirkung gegen *Ustilago violacea* und eine sehr gute Aktivität gegen *Chlorella fusca* (Diagramm 5). Durch den Lemna-Test wird die sehr starke herbizide Wirkung der Rohextrakte bestätigt (Tab. 14). Für die Petroletherphasen beider Rohextrakte war keinerlei Wirkung feststellbar.

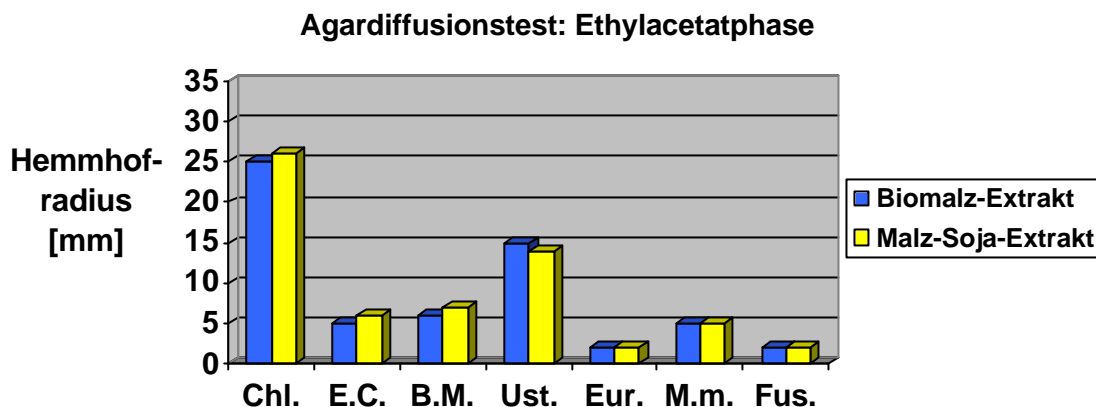


Diagramm 5: Agardiffusionstest des Biomalz- und Malz-Soja-Rohextraktes.

Lemnatest			
Versuchsdauer	1. Tag	2. Tag	6. Tag
Biomalz-Extrakt*	4 Blätter gelb-grün	4 Blätter gelb-weiß	4 Blätter weiß
Malz-Soja-Extrakt*	4 Blätter gelb-grün	4 Blätter weiß	4 Blätter weiß
Referenz 1**	4 Blätter grün	9 Blätter grün	21 Blätter grün
Referenz 2***	4 Blätter grün	8 Blätter grün	21 Blätter grün

Tabelle 14: Lemnatest der Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakte (* 0.25 ml einer Lösung des Rohextraktes in 5 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser; **, *** Referenzen und Testorganismus siehe Seite 52, Tabelle 10).

Das in Diagramm 6 dargestellte Ergebnis des Agardiffusionstests des Steroids **10** zeigt, daß dieses eine mäßige Wirkung gegen *Ustilago violacea* und *Chlorella fusca* besitzt. Beachtlicher ist das Wirkpotential des Stemphyperylenols (**11**), insbesondere seine stark herbiziden Eigenschaften, die durch eine 89 %ige Abnahme der Photosynthese-Aktivität belegt wird (Tab. 15). Zudem macht der Vergleich der Agardiffusionstests der Rohextrakte und des Naturstoffs **11** deutlich, daß vermutlich dieser aufgrund des fast identischen Wirkspektrums für die Aktivität des Pilzextraktes verantwortlich ist.

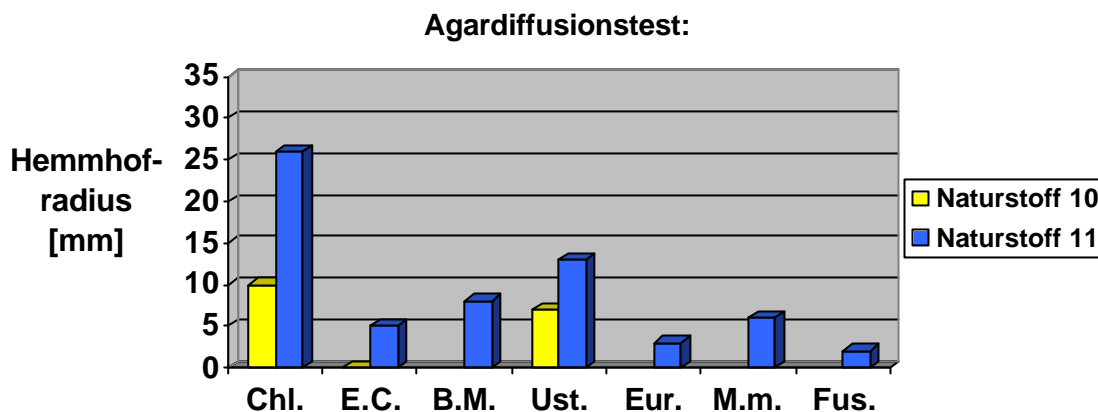


Diagramm 6: Ergebnisse der Agardiffusionstests der Naturstoffe **10** und **11**.

Photosyntheseaktivitätsmessung*			
	Photosyntheseaktivitätsmessung [$\mu\text{mol O}_2/(\text{h} \cdot \text{ml})$]		Abnahme der Photosyntheseaktivität
Testsubstanzen	Vor der Applikation des Naturstoffes	Nach der Applikation des Naturstoffes	[$\mu\text{mol O}_2/(\text{h} \cdot \text{ml})$](%)
Naturstoff 11	0.28	0.03	0.25 (89)
Referenz**	0.52	0.41	0.11 (21)

Tabelle 15: Photosyntheseaktivitätsmessung des Stemphyperylenols (**11**).

* Zählkammertiefe: 0.1 mm.

Zellkonzentration: $2 \cdot 10^{-7}$ Zellen/ml.

Konzentration der Testsubstanz: 100 μl der gelösten Substanz (100mg/ml Aceton/Methanol 1:1) auf 3 ml Zellsuspension.

** Kontrollmessung mit Lösungsmittelgemisch Aceton/Methanol 1:1.

3.3.4.2. Pharmakologische Aktivität

Die Testergebnisse der Immunologie-, Onkologie- und des Serotonin-Rezeptortests für den Sekundärmetaboliten **11** sind in Tabelle 16 dargestellt. Die Auswertung der Tests ergab, daß die Substanz keine verfolgenswerten Wirkungen in den Testsystemen zeigte.

Naturstoff 11		
	Konzentration (mol/l)	Hemmung/Wirkung (%)
Serotonin RB 5-HT1D	4.00e-06	-10.8
Immunologie PTKs Kinase ZAP0	5.00e-05	-12.7
Onkologie PTKs Kinase TEK	5.00e-05	-21.2

Tabelle 16: Die Ergebnisse der pharmakologischen Testung des Stemphyperylenol (**11**).

3.4. Stamm 3004

3.4.1. Pilzbeschreibung

Der Pilzstamm 3004 stammt aus einer Bodenprobe aus China (4000 m). Die taxonomische Bestimmung war aufgrund fehlender Sporulation noch nicht möglich.

3.4.2. Isolierung der Naturstoffe 13, 14, 15 und 16

Die Isolierung der Naturstoffe **13**, **14**, **15** und **16** erfolgte aus dem Pilzstamm 3004. Als Nährmedien dienten Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar. Nach einer Kultivierungsdauer von 128 Tagen wurde das grüne Pilzmycel mit Wasser und zerstoßenem Eis verdünnt und anschließend in einem Warring-Blender homogenisiert. Das Kulturgut wurde in einen Scheidetrichter übergeführt und einmal mit Petrolether und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Das Ethylacetat wurde vor dem Gebrauch mit 100 ml 1 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt. Nach dem Abdampfen des Petrolethers und des Ethylacetats wurde der Rückstand in einer Aceton-Methanol-Lösung (1:1) aufgenommen. Die Anzucht einer zweiten Charge des Pilzstammes erfolgte unter gleichen Kultivierungsbedingungen. Die Aufarbeitungsmethodik war mit der oben beschriebenen weitgehend identisch. Statt Petrolether und Ethylacetat wurde das homogenisierte Pilzmycel zur besseren Phasentrennung mit Dichlormethan extrahiert. Die Aufnahme des Rückstandes in einer Aceton-Methanol-Lösung (1:1) entfiel ebenfalls.

In den Dünnschichtchromatogrammen der herkömmlich aufgearbeiteten Rohextrakte konnte ein auffällig fluoreszierender, isolierter Substanzfleck mit einem R_F -Wert von 0.6 in Dichlormethan detektiert werden. Die Isolierung der als Naturstoff **13** bezeichneten Substanz gelang durch einmalige Säulenchromatographie mit einer Ausbeute von 57 mg aus insgesamt 1.82 bzw. 1.68 g Rohextrakt. Als Laufmittel diente eine Dichlormethanolösung mit 2 % Methanolanteil. Ein weiterer definierter Substanzfleck war in einer braun gefärbten Fraktion

bei einem R_f -Wert von 0.3 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %) zu beobachten. Durch mehrmalige präparative Schichtchromatographie konnte aus der Fraktion der braune Naturstoff **14** mit einem R_f -Wert von 0.91 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) in reiner Form isoliert werden.

Aus den mit Dichlormethan extrahierten Rohextrakten wurde in Analogie zu den herkömmlichen Rohextrakten der Naturstoff **13** durch einfache Säulenchromatographie isoliert. Aus dem vorfraktionierten Pilzextrakt konnten in einer polaren Fraktion (R_f -Wert: 0.4–0.7 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %)) die Naturstoffe **15** und **16** mit einem R_f -Wert von 0.8 und 0.9 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 3 %) durch mehrmalige Schichtchromatographie isoliert werden.

3.4.3. Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 13, 14, 15 und 16

3.4.3.1. Naturstoff 13

Der Naturstoff **13** kristallisiert in Form gelber Nadeln, die bei 256 °C schmelzen. Die relativ unpolare Substanz (R_f -Wert = 0.6 in CH_2Cl_2) löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität, wie Chloroform oder Dichlormethan. Bemerkenswert ist dabei die auffällige violette Fluoreszenz der Substanz. Der spezifische Drehwert beträgt $[\alpha]_D^{20} = +75.1$ (1.36 in CHCl_3). Das IR-Spektrum zeigt bei 1709 cm^{-1} eine intensive Absorptionsbande, die für Carbonylgruppen typisch ist. Die relativ breite Bande bei 3436 cm^{-1} hingegen ist charakteristisch für eine OH-Valenzschwingung. Den ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektren und dem DEPT 135-Experiment ist zu entnehmen, daß die Substanz vier Methylgruppen, jeweils eine aliphatische und aromatische Methingruppe und zwölf quartäre Kohlenstoffatome besitzt, von denen eines aufgrund der ^{13}C -NMR-Verschiebung sp^3 -Charakter besitzt (Tab.17).

C	Naturstoff 13	
	¹³ C-NMR (δ/ppm)	¹ H-NMR (δ/ppm)
1	165.73 (s)	–
2	–	–
3	164.59 (s)	–
3a	93.75 (s)	–
3b	135.61 (s)	–
4	164.59 (s)	–
5	119.50 (s)	–
6	166.57(s)	–
6a	108.84 (s)	–
7	150.28 (s)	–
7a	24.14(q)	2.83 (s)
8	117.60(d)	6.82 (s)
9	166.25 (s)	–
9a	97.51 (s)	–
1'	14.93 (q)	1.53 (d)
2'	92.48 (d)	4.75 (q)
3'	43.83 (s)	–
4'	21.10 (q)	1.34 (s)
5'	25.83(q)	1.59 (s)

Tabelle 17: ¹H- und ¹³C-NMR-Daten des Naturstoffs **13**.

Für drei der vier Methylgruppen sind im Protonenspektrum Singulett-Signale registrierbar. Die vierte zeigt ein Duplett-Signal mit einer Kopplungskonstanten von 6.6 Hz. Das zum gleichen Spin-System gehörende Quartett ist bei 4.75 ppm detektierbar. Die scharfen Signale bei 11.39 und 11.62 ppm im Protonenspektrum sind charakteristisch für chelierte OH-Protonen. Die ¹³C-NMR-Verschiebung der entsprechenden Carbonylsignale zeigen mit 166.25 und 164.59 ppm eine für Aryl- bzw. α,β-ungesättigte Ester, Lactone oder Carbonsäureanhydride signifikante Hochfeldverschiebung. Die vorläufige Summenformel mit Heteroatomanteil lautet demnach C₁₈H₁₆O₆ bzw. C₁₈H₁₆O₅, was einer Molmasse von 328 bzw. 312 entspricht.

Die massenspektroskopischen Untersuchungen belegen, daß der Naturstoff **13** mit einer Molmasse von 328 sechs Sauerstoffatome besitzt. Im ¹³C-Spektrum der Verbindung fallen neben den tieffeldverschobenen oxygenierten quartären Arylkohlenstoffatomen C-4, C-9 und C-6 die hochfeldverschobenen ¹³C-Resonanzen der quartären Arylkohlenstoffatome bei 93.8, 97.5 und 108.8 ppm auf. Aufgrund der chemischen Verschiebung ist davon auszugehen, daß

diese ebenso wie die Methingruppe C-8 in *ortho*-Position zu den phenolischen OH-Gruppen zu finden sind.

Unter Berücksichtigung der Informationen aus den IR-, Massen- und NMR-Spektren wurde eine Recherche in der Chapman-Hall-Datenbank durchgeführt. Diese ermöglichte eine eindeutige Identifizierung des Sekundärmetabolits **13** als eine literaturbekannte Verbindung.^[91] Der Naturstoff **13** wurde erstmals durch Oxidation von Atrovenetin (**29**) (Abb. 50) erhalten^[92,93] und später aus Kulturen von *Penicillium herquei*^[94], *Roesleria pallida*^[95], *Roesleria hypogea*^[96] und *Aspergillus silvaticus*^[97] isoliert. Die absolute Konfiguration des Anhydrids **13** wurde von Homma et al.^[97] durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt.

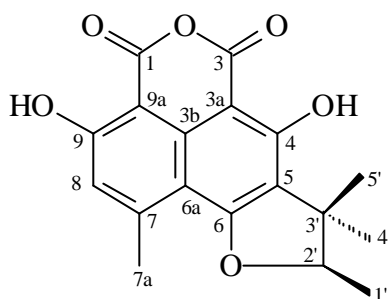


Abb. 47: Die Struktur des Naturstoffs **13**.

3.4.3.2. Naturstoff **14**

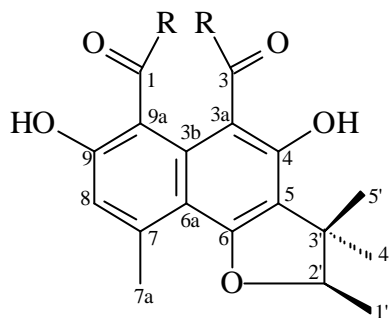
Der Naturstoff **14** wird als brauner Feststoff isoliert. Er besitzt einen Schmelzpunkt von 231 °C. Die Substanz, die in Lösungsmitteln mittlerer Polarität gut löslich ist, zeigt einen R_f -Wert von 0.91 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %). Im IR-Spektrum werden bei 1711, 1645 und 1631 cm^{-1} intensive Absorptionsbanden beobachtet, die für Carbonylgruppen charakteristisch sind. Die breite Bande bei 3407 cm^{-1} spricht wiederum für eine OH-Valenzschwingung. Die chemischen Verschiebungen des Protonenspektrums entsprechen weitgehend denen der Verbindung **13** (Tab. 18). Im ^1H -NMR-Spektrum des Sekundärmetaboliten **14** ist im Gegensatz zum Naturstoff **13** ein weiteres Drei-Protonen-Singulett bei 2.22 ppm und ein Duplett bei 3.33 ppm detektierbar. Auffällig ist aber auch das Auftreten von Doppelpeaks (Tab. 18). Insbesondere im ^{13}C -NMR-Spektrum der Verbindung weisen einige der insgesamt 33 Signale fast gleiche chemische Verschiebungen auf.

C	Naturstoff 13		Naturstoff 14	
	¹³ C-NMR (δ/ppm)	¹ H-NMR (δ/ppm)	¹³ C-NMR (δ/ppm)	¹ H-NMR (δ/ppm)
1	165.73 (s)	–	197.57/199.78 (s)	–
2	–	–	77.67 (s)	–
2a	–	–	51.96/52.29 (t)	3.31/3.36 (s)
2b	–	–	206.45/206.76 (s)	–
2c	–	–	31.13/31.27 (q)	2.22 (s)
3	164.59 (s)	–	199.78 (s)	–
3a	93.75 (s)	–	103.08 (s)	–
3b	135.61 (s)	–	137.85 (s)	–
4	164.59 (s)	–	165.77/165.82 (s)	–
5	119.50 (s)	–	118.75/118.88 (s)	–
6	166.57(s)	–	166.53/166.57 (s)	–
6a	108.84 (s)	–	110.08 (s)	–
7	150.28 (s)	–	149.48/149.54 (s)	–
7a	24.14(q)	2.83 (s)	24.63 (q)	2.75 (s)
8	117.60(d)	6.82 (s)	118.25 (d)	6.76 (s)
9	166.25 (s)	–	166.53 (s)	–
9a	97.51 (s)	–	105.98 (s)	–
1'	14.93 (q)	1.53 (d)	14.86 (q)	1.49/1.50 (s)
2'	92.48 (d)	4.75 (q)	91.97 (d)	4.66 (q)
3'	43.83 (s)	–	43.67/43.70 (s)	–
4'	21.10 (q)	1.34 (s)	21.00 (q)	1.30/1.33 (s)
5'	25.83(q)	1.59 (s)	25.88/26.11 (q)	1.54/1.55 (s)

Tabelle. 18: Vergleich der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der Naturstoffe **13** und **14**.

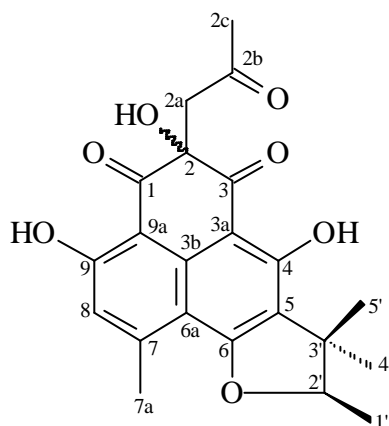
Dem Massenspektrum ist zu entnehmen, daß die Verbindung **14** eine Molmasse von 398 besitzt. Mit der HREIMS wird die Molmasse zu 398.136 ± 3 ppm bestimmt, woraus sich unter Berücksichtigung der NMR-Daten eine Summenformel von C₂₂H₂₂O₇ ergibt. Bemerkenswert ist ferner, daß das Massenspektrum der Verbindung **14** ein fast identisches Fragmentierungsmuster wie Naturstoff **13** zeigt.

Die genaue Auswertung der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren belegt ebenso die strukturelle Ähnlichkeit der Naturstoffe **13** und **14**. So ist anhand der fast identischen chemischen Verschiebung sowie der analogen ²J- und ³J-Kopplungen im HMBC-Spektrum das gleiche NaphthalinGrundgerüst konstruierbar (Teilstruktur I).



Teilstruktur I

Die beiden Carbonylbanden C-1 und C-3 zeigen im HMBC-Spektrum desweiteren eine Kreuzkopplung zu den Protonensignalen bei 3.31 bzw. 3.36 ppm, welche laut HMQC-Spektrum mit den ^{13}C -NMR-Signalen der Methylengruppe bei 52.29 bzw. 51.96 ppm korrelieren. Die Methylengruppen koppeln ihrerseits mit dem für aliphatische Ketogruppen typischen ^{13}C -NMR-Signal bei 206.45 bzw. 206.76 ppm, einem quartären, vermutlich monooxygenierten Kohlenstoffatom bei 77.67 ppm und mit der Methylgruppe bei 2.22 ppm, so daß unter Berücksichtigung der ermittelten Summenformel die in Abb. 48 dargestellte Struktur formuliert werden kann.

Abb. 48: Die Struktur des Naturstoffs **14**.

Eine Literaturrecherche ergibt, daß der Naturstoff **14** erstmals von Ayer et al.^[91] aus dem Ascomyceten *Gremmeniella abietina* isoliert wurde. Ayer stellte dabei fest, daß das Aceton-Addukt **14** durch eine Aldolreaktion des entsprechenden Triketons mit Aceton in Gegenwart von katalytischen Mengen an Essigsäure gebildet wird. Das so entstandene Diastereomeren-gemisch erklärt auch das Auftreten der vielen fast identischen chemischen Verschiebungen im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum.

3.4.3.3. Naturstoff **15**

Naturstoff **15** wird in Form eines grünen Feststoffs mit einem Schmelzpunkt von 217 °C isoliert. Der Naturstoff **15** löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität und besitzt einen R_f -Wert von 0.79 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %).

Das IR-Spektrum zeigt wiederum eine typische Carbonylabsorptionsbande bei 1641 cm^{-1} und eine breite Bande bei 3421 cm^{-1} . Die massenspektroskopischen Untersuchungen ergeben, daß die Verbindung eine Molmasse von 340 besitzt. Das Protonenspektrum des Naturstoffs **15** weist ebenfalls sehr große Ähnlichkeit mit dem des Naturstoffs **13** auf und zeigt zudem wie Naturstoff **14** Signale mit fast identischer chemischer Verschiebung. Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind analog dem ^{13}C -NMR-Spektrum des Naturstoffs **14** 34 Signale detektierbar, von denen einige ebenfalls diese „Doppelpeak-Charakteristik“ aufweisen.

C	Naturstoff 13		Naturstoff 15	
	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	165.73 (s)	—	196.00 (s)	—
2	—	—	86.95/177.02 (s)	—
3	164.59 (s)	—	193.76 (s)	—
3a	93.75 (s)	—	105.05 (s)	—
3b	135.61 (s)	—	138.34/138.68 (s)	—
4	164.59 (s)	—	166.76 (s)	—
5	119.50 (s)	—	119.12/119.50 (s)	—
6	166.57(s)	—	168.27 (s)	—
6a	108.84 (s)	—	110.34/110.96 (s)	—
7	150.28 (s)	—	150.40/152.40 (s)	—
7a	24.14(q)	2.83 (s)	24.69/24.97 (q)	2.74/2.77 (s)
8	117.60(d)	6.82 (s)	118.47/119.01 (d)	6.64/6.71 (s)
9	166.25 (s)	—	167.29 (s)	—
9a	97.51 (s)	—	108.21/109.84 (s)	—
1'	14.93 (q)	1.53 (d)	14.90 (q)	1.48/1.50 (s)
2'	92.48 (d)	4.75 (q)	92.25/92.91 (d)	4.68/4.77 (q)
3'	43.83 (s)	—	43.60/43.66 (s)	—
4'	21.10 (q)	1.34 (s)	20.98 (q)	1.31/1.32 (s)
5'	25.83(q)	1.59 (s)	25.67/25.91 (q)	1.55 (s)

Tabelle 19: Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **13** und **15**.

Die Auswertung der ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren führt zur Konstruktion des bereits bei Naturstoff **13** und **14** beschriebenen Naphthalingrundgerüsts (Seite 82/ Teilstruktur I). Aufgrund der Masse von 312 der Teilstruktur I und den ^{13}C -NMR-Signalen bei 193.16 und 196.00 ppm handelt es sich bei den Carbonylgruppen wohl um Ketogruppen, so daß zur im Massenspektrum registrierten Molmasse von 340 nur eine Massendifferenz von 28 beobachtbar ist, die einer weiteren Carbonylgruppe entsprechen würde. Man gelangt so fast erwartungsgemäß, bedingt durch das bereits angesprochene abgewandelte Extraktionsverfahren, zu dem als Atrovenetinon bezeichneten Triketon **15** (Abb. 49).

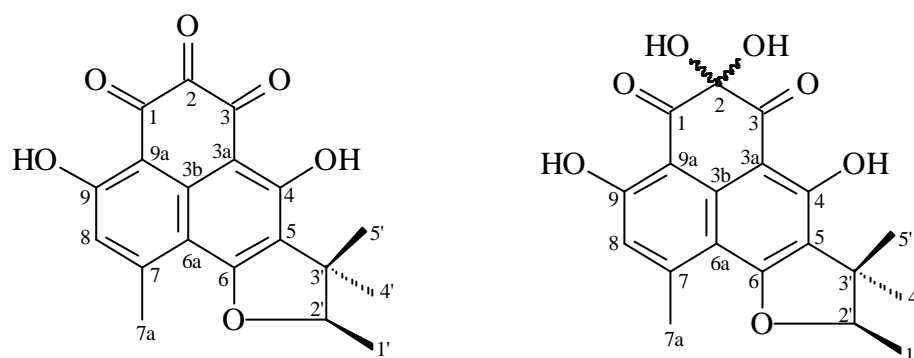


Abb. 49: Die Struktur des Naturstoffs **15** und dessen Hydrats.

Die Verbindung wurde 1986 erstmals von Ayer^[91] aus *Gremmeniella abietina* isoliert und charakterisiert. Die große Vielzahl der ^{13}C -NMR-Signale wird von Ayer et al. durch die Bildung eines Hydrats erklärt (Abb. 49). Er stellte fest, daß bei einem Wechsel des Lösungsmittels von DMSO-d_6 zu CD_2Cl_2 das Signal bei 88 ppm verschwindet und ein weiteres Carbonylsignal bei ca. 176 ppm detektierbar ist. In unseren Spektren ist also davon auszugehen, daß beide Verbindungen vorliegen werden. Die Darstellung des Naturstoffs **15** gelang L.C.Vining^[94] bereits 1963 durch Oxidation des Atrovenetins (**29**) (Abb. 50) mit Benzochinon.

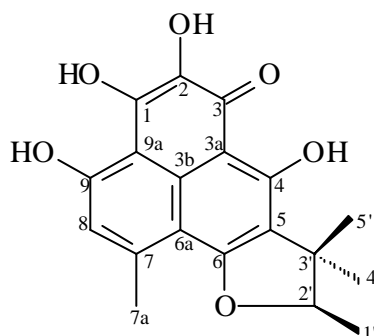


Abb. 50: Die Struktur des Atrovenetins (**29**).

3.4.3.4. Naturstoff 16

Der Naturstoff **16** wird als brauner Feststoff mit einem Schmelzpunkt von 202 °C isoliert. Die Substanz besitzt einen R_f -Wert von 0.87 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) und ist gut löslich in Lösungsmitteln mittlerer Polarität wie Dichlormethan oder Chloroform. Der spezifische Drehwert beträgt $[\alpha]_D^{20} = -101.1$ ($c = 0.11$ in CHCl_3). Im Massenspektrum der Verbindung **16** ist ein Molpeak bei 312 beobachtbar. Ein Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren der Naturstoffe **13** und **16** zeigt, daß diese wiederum strukturell sehr große Ähnlichkeit aufweisen (Tab. 20).

C	Naturstoff 13		Naturstoff 16	
	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	165.73 (s)	—	196.00 (s)	—
2	—	—	86.95/177.02 (s)	—
3	164.59 (s)	—	193.76 (s)	—
3a	93.75 (s)	—	105.05 (s)	—
3b	135.61 (s)	—	138.34/138.68 (s)	—
4	164.59 (s)	—	166.76 (s)	—
5	119.50 (s)	—	119.12/119.50 (s)	—
6	166.57(s)	—	168.27 (s)	—
6a	108.84 (s)	—	110.34/110.96 (s)	—
7	150.28 (s)	—	150.40/152.40 (s)	—
7a	24.14(q)	2.83 (s)	24.69/24.97 (q)	2.74/2.77 (s)
8	117.60(d)	6.82 (s)	118.47/119.01 (d)	6.64/6.71 (s)
9	166.25 (s)	—	167.29 (s)	—
9a	97.51 (s)	—	108.21/109.84 (s)	—
1'	14.93 (q)	1.53 (d)	14.90 (q)	1.48/1.50 (s)
2'	92.48 (d)	4.75 (q)	92.25/92.91 (d)	4.68/4.77 (q)
3'	43.83 (s)	—	43.60/43.66 (s)	—
4'	21.10 (q)	1.34 (s)	20.98 (q)	1.31/1.32 (s)
5'	25.83(q)	1.59 (s)	25.67/25.91 (q)	1.55 (s)

Tabelle 20: Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **13** und **16**.

Auffällig ist im ^1H -NMR-Spektrum des Sekundärmetaboliten **16**, daß die OH-Protonen aufgrund der fehlenden Chelatisierung als typisch breite Signale bei 7.63 bzw. 7.89 ppm registriert werden. Unter Berücksichtigung der Molmasse der Verbindung, der bereits bekannten NMR-Signale für das Naphthalingrundgerüst und der Carbonylsignale bei 186.53 und 190.06 ppm kann die in Abb. 51 dargestellte Struktur formuliert werden.

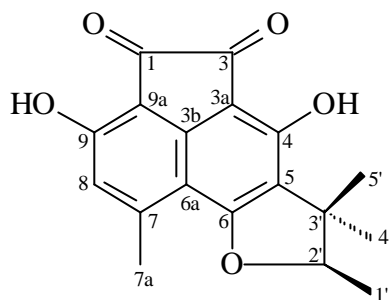


Abb. 51: Die Struktur des Naturstoffs **16**.

Eine Literaturrecherche ergibt, daß das Enantiomer der Verbindung 1986 ebenfalls von Ayer^[91] aus dem Ascomyceten *Gremmeniella abietina* isoliert und charakterisiert werden konnte. Abschließend sei noch angemerkt, daß die als Sclerodinon bezeichnete Verbindung **16** das einzig bekannte Beispiel für einen Naturstoff ist, der eine Acenaphthalin-Chinon-Struktur besitzt.

3.4.4. Biosynthese der Naturstoffe 13, 15 und 16

Biosynthetische Studien^[98] mit [1-¹³C]-markiertem Natriumacetat haben gezeigt, daß der Phenalenon-Kern aus einem Heptaketid (**30**) aufgebaut wird (Abb. 52). Der Dihydrofuranring hingegen wird durch ein Mevalonat gebildet. Das Ergebnis dieses Biosyntheseweges ist das Atrovenetin (**29**) bzw. der Naturstoff **15** (Atrovenetinon), der durch Oxidation des Atrovenetins (**29**) entsteht.

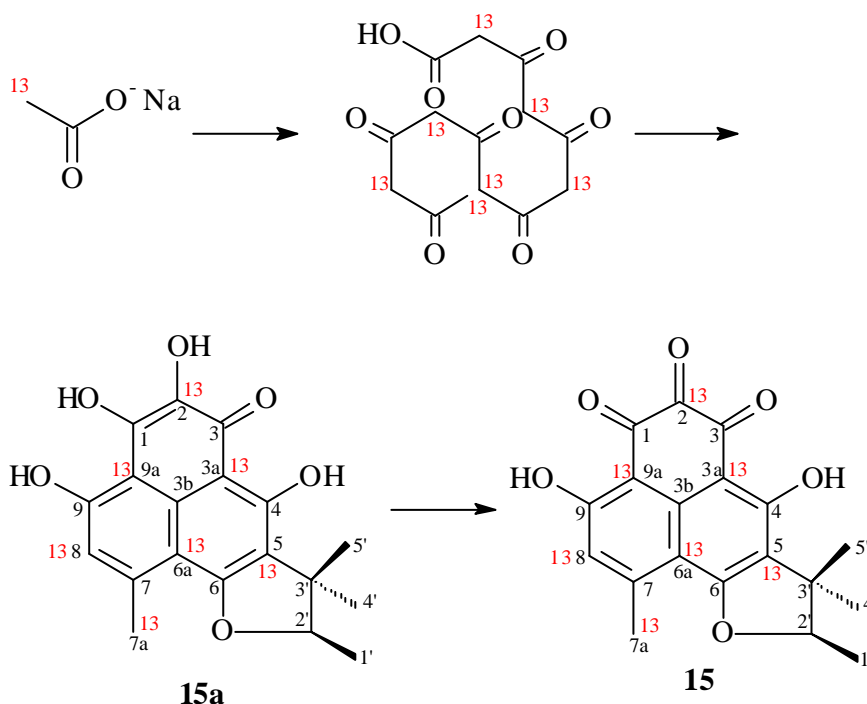


Abb. 52: Die Biosynthese des Atrovenetinons (**15**).

Durch weitere separat ausgeführte Experimente^[99] mit [1-¹³C]- und [2-¹³C]-markiertem Natriumacetat konnte ferner bewiesen werden, daß Atrovenetinon (**15**) eine Vorstufe des Naturstoffs **16** ist, der durch Verlust des C-2-Kohlenstoffatoms entsteht. Ein möglicher Biosyntheseweg ist in Abb. 53 dargestellt. Durch die nachfolgende Oxidation des Naturstoffs **16** gelangt man schließlich zum Naturstoff **13**, der im Experiment erwartungsgemäß das gleiche Anreicherungsmuster wie Naturstoff **16** zeigte.

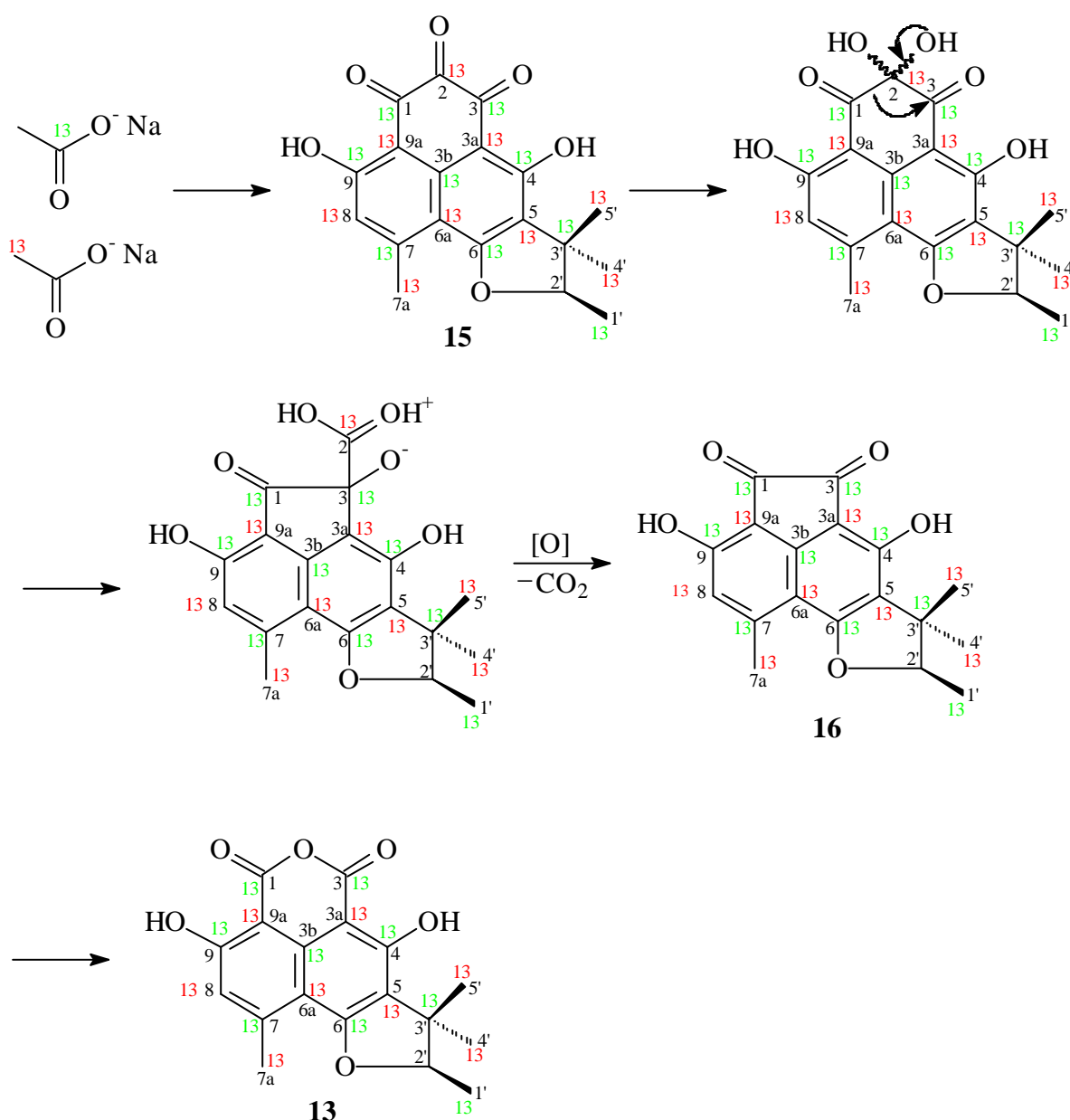


Abb. 53: Die Biosynthese der Naturstoffe **13** und **16**.

Ob die Naturstoffe **13**, **15** und **16** originärer Herkunft sind oder durch in vitro Luftoxidation des Atrovenetins (**29**) gebildet werden, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Ayer^[99] ist der Ansicht, daß aufgrund der relativ langsamen Luftoxidation des Sclerodions (**16**) oder des Atrovenetins (**29**) dies nicht die einzige Quelle dieser Naturstoffe sein kann. Er hält es für wahrscheinlich, daß *Gremmeniella abietina* die Oxidation des Atrovenetins (**29**) katalysiert.

3.4.5. Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3004

3.4.5.1. Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig

Der Agardiffusions-, Kresse- und Lemnatest wurde nur von den herkömmlich aufgearbeiteten Rohextrakten angefertigt. Die in Diagramm 7 und den Tabellen 21 und 22 dargestellten Testergebnisse belegen, daß die Rohextrakte nur eine sehr geringe oder gar keine herbi-, fungi- oder bakteriozide Wirkung besitzen.

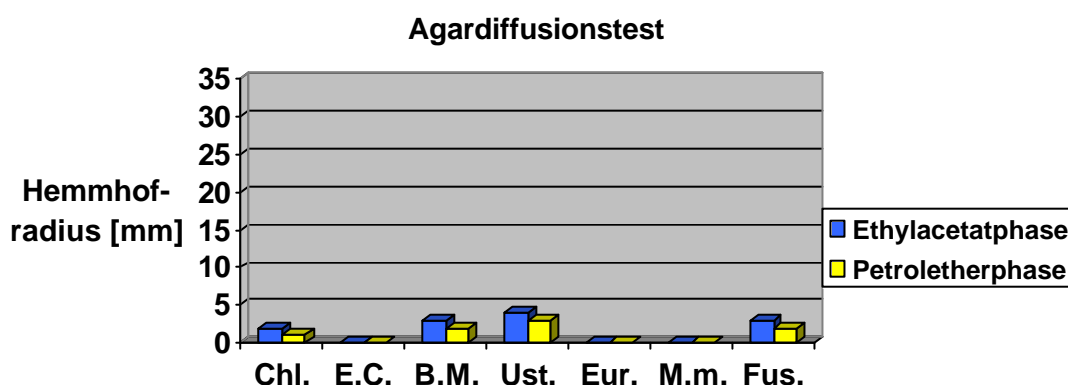


Diagramm 7: Die Ergebnisse der Agardiffusionstests der Rohextrakte.

Keimlingstest		
Versuchsdauer	1. Tag	7. Tag
Biomalz-Extrakt*	4 von 15 Samen zeigen Wachstum	4 von 15 Samen sind gekeimt
Malz-Soja-Extrakt*	10 von 15 Samen zeigen Wachstum	10 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 1**	14 von 15 Samen zeigen Wachstum	15 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 2***	14 von 15 Samen zeigen Wachstum	15 von 15 Samen sind gekeimt

Tabelle 21: Wirkung der Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakte im Keimlingstest (* 0.25 ml einer Lösung des Rohextraktes in 5 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser; **, *** Referenzen und Testorganismus siehe Seite 52, Tabelle 9).

Lemnatest			
Versuchsdauer	1. Tag	4. Tag	5. Tag
Biomalz-Extrakt*	8 Blätter grün	8 Blätter grün	13 Blätter weiß
Malz-Soja-Extrakt*	7 Blätter grün	7 Blätter weiß	7 Blätter weiß
Referenz 1**	11 Blätter grün	11 Blätter grün	16 Blätter grün
Referenz 2***	12 Blätter grün	12 Blätter grün	14 Blätter grün

Tabelle 22: Lemnatest der Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakte (*, **, *** Referenzen und Testorganismus siehe Seite 52, Tabelle 9).

Die aus den herkömmlich aufgearbeiteten Rohextraktchargen stammenden Reinsubstanzen **13** und **14** zeigen erwartungsgemäß im Agardiffusionstest fast keine Wirkung. Im Gegensatz dazu besitzen das Sclerodion (**16**) und insbesondere das Atrovenetinon (**15**) eine als gut einzustufende Aktivität gegen *Ustilago violacea*. Beide Naturstoffe wurden bekanntlich aus dem mit Dichlormethan extrahierten Rohextrakten isoliert.

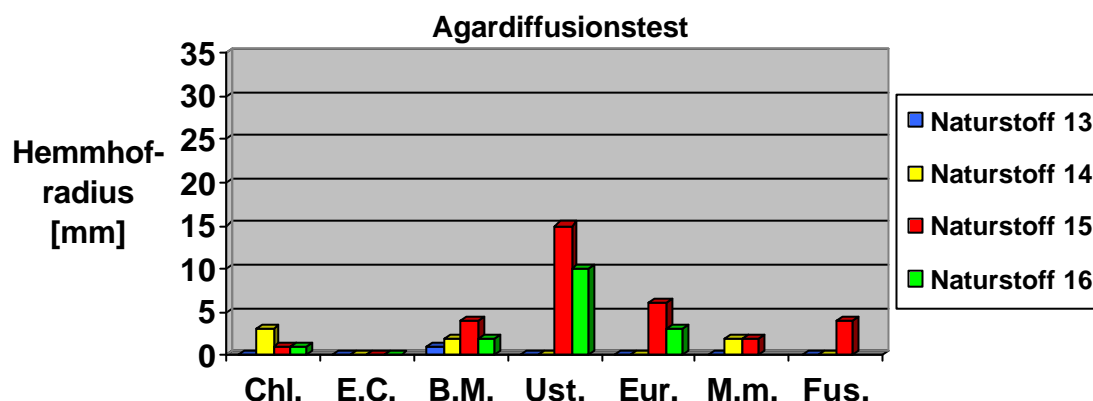


Diagramm 8: Die Ergebnisse der Agardiffusionstests der Naturstoffe **13**, **14**, **15** und **16**.

3.5. Stamm 3304

3.5.1. Pilzbeschreibung

Der Pilzstamm 3304 stammt aus einer Bodenprobe von der Richards Bay in Südafrika. Taxonomisch konnte auch dieser noch nicht bestimmt werden.

3.5.2. Isolierung der Naturstoffe 17, 18 und 19

Der Pilzstamm 3304 wurde in 24 Fernbachkolben 91 Tage bei Raumtemperatur auf den Nährmedien Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar kultiviert. Anschließend wurden die Pilzkulturen, wie bereits beschrieben, homogenisiert und einmal mit Petrolether und zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Lösemittel wurden abgedampft und der Rückstand für die Bioaktivitätsmessung in 5 ml einer Aceton-Methanol-Lösung (1:1) aufgenommen. Die Isolierung der Reinsubstanzen erfolgte mittels Säulen- und präparativer Schichtchromatographie.

Die erste säulenchromatographische Vorfraktionierung des Rohextraktes lieferte den Naturstoff **17** (37 mg) mit einem R_f -Wert von 0.82 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %) in reiner Form. Durch Erhöhung des Methanolgehalts von 2 auf 6 % wurde der Rohextrakt in insgesamt zwölf Fraktionen eingeteilt. Aus der zweiten Fraktion konnte mit einem R_f -Wert von 0.62 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %) durch präparative Schichtchromatographie der Naturstoff **18** (24 mg) isoliert werden. Der Naturstoff **19** wurde in der neunten Fraktion detektiert. Die Verbindung zeigte auf dem Dünnschichtchromatogramm einen langgezogenen Substanzfleck, der von einer großen Linolsäurematrix überlagert wurde. Die Isolierung des Naturstoffs **19** (7 mg) gelang durch präparative reversed-phase Schichtchromatographie (R_f -Wert: 0.72 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 10 %).

3.5.3. Strukturaufklärung und Beschreibung der Naturstoffe 17, 18 und 19

3.5.3.1. Naturstoff 17

Der unpolare, optisch inaktive Naturstoff **17** wird als gelbes Öl isoliert. Er ist mit einem R_f -Wert von 0.82 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %) gut mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm detektierbar. Das IR-Spektrum weist eine für Carbonylgruppen typische Bande bei 1705 cm^{-1} auf. Im Protonenspektrum werden vier Drei-Protonen-Singulets bei 2.01, 3.76, 3.87 und 3.92 ppm

registriert, wobei die Signale von 3.76–3.92 ppm aufgrund ihrer chemischen Verschiebung Methoxygruppen zuzuordnen sind. Zwischen 6.27 und 7.47 ppm werden weitere Signale beobachtet, die anhand ihrer chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten und Integralgrößen als sieben olefinische und aromatische Protonen identifiziert werden.

Die Auswertung der ^{13}C -NMR-, DEPT- und HMQC-Spektren ergibt, daß die Verbindung eine Methylgruppe, drei Methoxy-, sieben olefinische bzw. aromatische Methingruppen und sechs quartäre Kohlenstoffatome besitzt, von denen das Signal bei 168.14 ppm unter Berücksichtigung der IR-Bande bei 1705 cm^{-1} einem α,β -ungesättigten Ester zugeschrieben werden muß (Tab. 23).

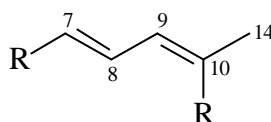
Naturstoff 17		
C	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	110.46 (d)	6.87 (d)
2	155.34 (s)	–
3	121.48 (s)	–
4	130.49 (d)	7.27 (d)
5	119.49 (d)	6.92 (dd)
6	138.30 (s)	–
7	130.68 (d)	6.44 (d)
8	127.66(d)	6.61 (dd)
9	129.93 (d)	6.27 (dd)
10	132.61 (s)	–
11	111.06 (s)	–
12	159.36 (d)	7.46 (s)
13	168.14 (s)	–
14	24.17 (q)	2.01 (s)
15	62.38 (q)	3.87 (s)
16	52.03 (q)	3.76 (s)
17	56.49 (q)	3.92 (s)

Tabelle 23: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Naturstoffs **17**.

Die vorläufige Summenformel der Verbindung lautet demnach $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_4$ bzw. $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5$.

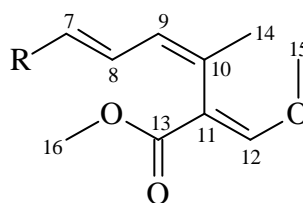
Das Massenspektrum zeigt einige „Doppelpeaks“, die sich um zwei Einheiten unterscheiden und die aufgrund ihrer Signalgrößen dem Isotopenverhältnis (3:1) der Chlorisotope ^{35}Cl und ^{37}Cl entsprechen. Der Molpeak der Verbindung bei 322 bzw. 324 entspricht demzufolge der Summenformel $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{ClO}_4$. Die konstitutionelle Strukturaufklärung erfolgt mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie. Das Proton mit der chemischen Verschiebung von

6.61 ppm koppelt laut H,H-COSY-Spektrum mit den Protonen bei 6.44 und 6.27 ppm. Das Proton mit der chemischen Verschiebung von 6.27 ppm koppelt seinerseits sowohl im H,H-COSY- als auch im HMBC-Spektrum mit dem Drei-Protonen-Singulett der Methylgruppe bei 2.01 ppm (14-H) (Teilstruktur I).



Teilstruktur I

Ausgehend von der Methoxygruppe mit der chemischen Verschiebung von 3.76 ppm (16-H) im Protonenspektrum, ist im HMBC-Spektrum eine 3J -Konnektivität zur Estercarbonylgruppe bei 168.14 ppm zu beobachten. Diese zeigt weiter eine vicinale Kopplung zum Singulett-Signal bei 7.46 ppm (12-H), das wiederum mit der Methoxygruppe mit den chemischen Verschiebungen von 3.87 ppm bzw. 62.38 ppm (C-15) und den quartären Kohlenstoffatomen bei 111.06 (C-11) und 132.61 ppm (C-10) koppelt. Unter Berücksichtigung der im HMBC-Spektrum ersichtlichen Kreuzkopplungen dieser quartären Kohlenstoffatome zur Methylgruppe mit der chemischen Verschiebung von 2.01 ppm und der markanten Hochfeldverschiebung des Kohlenstoffatoms bei 111.06 ppm lässt sich Teilstruktur II konstruieren.



Teilstruktur II

Die Protonensignale bei 6.61 (8-H) und 6.44 ppm (7-H) weisen im HMBC-Spektrum vicinale bzw. geminale Kopplungen zu einem quartären Kohlenstoffatom bei 138.30 ppm auf. Weitere 3J -Kopplungen sind, ausgehend vom Proton mit der chemischen Verschiebung von 6.44 ppm, zu den Methingruppen bei 110.44 (C-1) und 119.49 ppm (C-5) zu registrieren. Die entsprechenden Protonensignale bei 6.87 (1-H) und 6.92 ppm (5-H) bilden zusammen mit der Protonenresonanz bei 7.27 ppm (4-H) ein ABC-Spinsystem. Das Doppelduplett bei 6.92 ppm zeigt mit 1.7 Hz erwartungsgemäß eine *meta*-Kopplung zum Proton 1-H und desweiteren eine *ortho*-Kopplung zum Proton bei 7.27 ppm. Die Protonenresonanzen bei 6.87 (1-H) bzw. 7.27 ppm (4-H) zeigen im HMBC-Spektrum Kopplungen zu den quartären Kohlenstoffatomen mit

den chemischen Verschiebungen von 121.48 (C-3) und 155.34 ppm (C-2), wobei für letzteres Signal eine weitere 3J -Kopplung zur Methoxygruppe bei 3.92 ppm (17-H) registrierbar ist. Aufgrund der relativ starken Hochfeldverschiebung des Protons bei 6.87 ppm ist davon auszugehen, daß sich dieses in *ortho*-Position zur Methoxygruppe befindet, so daß die in Abb. 54 dargestellte Struktur formuliert werden kann.

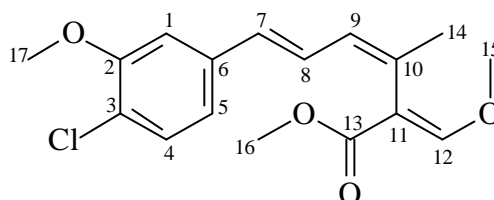


Abb. 54: Die Struktur des Natustoffs **17**.

Während die *trans*-Anordnung der Protonen 7-H und 8-H durch die Größe der Kopplungskonstanten von 15.5 Hz eindeutig bestimmbar ist, kann anhand der Kopplungskonstanten von 10.3 Hz der Protonen 8-H und 9-H keine gesicherte Aussage über die Stereochemie der Doppelbindung gemacht werden.

Eine Literaturrecherche ergibt, daß der als Strobilurin B bezeichnete Naturstoff **17** erstmals 1977 von Anke et al. aus dem Basidiomyceten *Strobilurus tenacellus* isoliert^[100] und charakterisiert^[101] wurde. Später wurde diese Verbindung in Mycelkulturen von Pilzen der Gattungen *Mycene zephira*, *Oudemansiella mucida*, *Hydropus*, *Cyphellopsis* und *Xerula* aufgefunden.^[101,102] Untersuchungen zur Stereochemie der Protonen 7-H, 8-H und 9-H belegten, daß die Protonen *trans* zueinander angeordnet sind. Kontrovers wurde die Konfiguration der Doppelbindung in 9-Stellung diskutiert. Schramm und Steglich^[101] postulierten ebenso wie Sedmera und Vondracek^[103,104] eine (9*E*)-Konfiguration. Steglich^[105] korrigierte sechs Jahre später die früher vorgeschlagene (9*E*)-Konfiguration. Aufgrund dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurden eigene NOE-Messungen durchgeführt, die zeigten, daß durch die Sättigung der Protonenresonanz der Methylgruppe C-14 die Intensität des 9-H-Signals um 18 % erhöht wird, d. h. die Methylgruppe C-14 und das Proton 9-H also *cis*-angeordnet sind und die Doppelbindung somit *Z*-konfiguriert ist.

Strobilurin B besitzt von den bekannten Strobilurinabkömmlingen die stärkste fungizide Wirkung. Verantwortlich für die überaus starke Wirkung gegen saprophytische und phytopathogene Pilze ist die (*E*)- β -Methoxyacrylat-Einheit.^[106] Die Synthese des Strobilurin B (**17**) wurden von Schramm^[105] sowie der Arbeitsgruppe von Vondracek^[107] durchgeführt.

3.5.3.2. Naturstoff 18

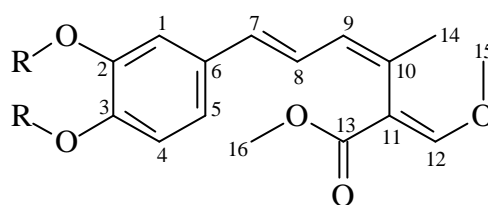
Der Naturstoff **18** wird in Form eines gelben Öls mit einem R_f -Wert von 0.62 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %) isoliert. Er löst sich gut in Lösungsmitteln mittlerer Polarität und besitzt einen spezifischen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} = +21.0^\circ$ ($c = 0.64$, EtOH). Die scharfe Absorptionsbande bei 1708 cm^{-1} ist ein Indiz für eine Carbonylgruppe.

C	Naturstoff 17		Naturstoff 18	
	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	110.46 (d)	6.87 (d)	122.79 (d)	6.94 (d)
2	155.34 (s)	–	147.24 (s)	–
3	121.48 (s)	–	151.18 (s)	–
4	130.49 (d)	7.27 (d)	121.02 (d)	6.87 (d)
5	119.49 (d)	6.92 (dd)	121.96 (d)	6.97 (d)
6	138.30 (s)	–	134.12 (s)	–
7	130.68 (d)	6.44 (d)	130.75 (d)	6.38 (d)
8	127.66(d)	6.61 (dd)	126.07 (d)	6.52 (d)
9	129.93 (d)	6.27 (dd)	130.20 (d)	6.24 (d)
10	132.61 (s)	–	131.19 (s)	–
11	111.06 (s)	–	111.23 (s)	–
12	159.36 (d)	7.46 (s)	159.24 (s)	7.45 (s)
13	168.14 (s)	–	168.23 (s)	–
14	24.17 (q)	2.01 (s)	24.09 (q)	1.99 (s)
15	62.38 (q)	3.87 (s)	62.35 (q)	3.87 (s)
16	52.03 (q)	3.76 (s)	52.04 (q)	3.77 (s)
17	56.49 8q)	3.92 (s)	69.13 (t)	3.98 u. 4.26 (m)
18	–	–	82.37 (t)	3.53 (d)
19	–	–	81.01 (s)	–
20	–	–	21.21 (q)	1.25 (s)
21	–	–	28.13 (q)	1.50 (s)
22	–	–	67.77 (t)	4.10 u. 4.15 (m)
23	–	–	121.31 (d)	5.36 (m)
24	–	–	137.82 (s)	–
25	–	–	26.24 (s)	1.79 (s)
26	–	–	18.51 (s)	1.72 (s)

Tabelle 24: Vergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten der Naturstoffe **17** und **18**.

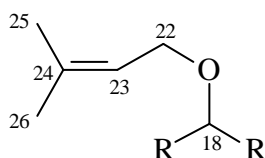
Dem ^1H -, ^{13}C -Spektren und dem DEPT-Experiment ist zu entnehmen, daß die Substanz fünf Methyl-, zwei vermutlich monooxygenierte Methylen-, zwei Methoxy-, neun Methingruppen und acht quartäre Kohlenstoffatome besitzt (Tab. 24).

Die Molmasse der Substanz beträgt laut Massenspektrum 442, woraus sich aufgrund der Informationen aus den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren die Summenformel $\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{O}_6$ ergibt. Ein Vergleich der Protonen vom ^{13}C -NMR-Spektrum der Naturstoffe **17** und **18** zeigt, daß beide Verbindungen einige fast identische Signale aufweisen (Tab. 24). So ist der Hexatrien-Rest, der eine endständige β -Methoxyacrylat-Gruppierung enthält, ebenso wie der trisubstituierte Aromat ein Bestandteil des Naturstoffs **18**. Unter Berücksichtigung der chemischen Verschiebung von 151.18 ppm des C-3-Kohlenstoffatoms und der Hochfeldverschiebung sämtlicher aromatischer Protonensignale ist davon auszugehen, daß der aromatische Kern neben dem Hexatrien-Rest von zwei Sauerstoffatomen substituiert ist (Teilstruktur I).



Teilstruktur I

Dem HMBC-Spektrum ist zu entnehmen, daß die Methylgruppen mit den chemischen Verschiebungen von 18.51 (C-26) und 26.24 ppm (C-25) jeweils mit der anderen Methylgruppe koppeln, mit dem quartären Kohlenstoffatom bei 137.82 ppm (C-24) und der Methingruppe bei 121.31 ppm (C-23). Letztere zeigt im H,H-COSY-Spektrum eine Kreuzkopplung zur Methylengruppe, die aufgrund ihrer chemischen Verschiebung von 4.15 und 67.77 ppm (C-22) wohl monooxygeniert ist. Im HMBC-Spektrum sind, wiederum ausgehend von den Protonensignalen der CH_2 -Gruppe, 2J - und 3J -Konnektivitäten zu der Methingruppe bei 121.31 ppm, dem quartären Kohlenstoffatom bei 137.82 und einer Methingruppe bei 82.37 ppm (C-18) detektierbar (Teilstruktur II).



Teilstruktur II

relativ niedrigen Wellenzahl und der Absorptionsbanden bei 3458 und 3378 cm^{-1} , die (N–H)-Valenzschwingungen zuzuordnen sind, wird die Carbonylgruppe als ein Carbonsäureamid identifiziert.

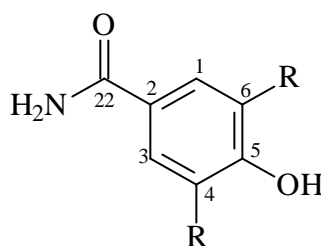
Dem ^1H -, ^{13}C -NMR-Spektren und dem DEPT-135-Experiment ist zu entnehmen, daß die Substanz vier Methyl-, jeweils fünf Methylen- und Methingruppen sowie acht quartäre Kohlenstoffatome und drei austauschbare Protonen bei 6.00 (2 Protonen) bzw. 6.12 ppm (1 Proton) besitzt (Tab. 25).

Naturstoff 19		
C	^{13}C -NMR (δ/ppm)	^1H -NMR (δ/ppm)
1	128.12 (d)	7.53 (d)
2	126.30 (s)	–
3	126.81 (d)	7.74 (d)
4	120.53 (s)	–
5	153.01 (s)	–
6	129.86 (s)	–
7	29.41(t)	3.44 (d)
8	121.00(d)	5.35 (t)
9	138.55 (s)	–
10	40.12 (t)	1.94-2.12 (m)
11	26.92 (t)	1.94-2.12 (m)
12	124.27 (d)	5.11 (m)
13	135.75 (s)	–
14	40.12 (t)	1.94-2.12 (m)
15	27.11 (t)	1.94-2.12 (m)
16	124.74 (d)	5.13 (m)
17	131.76 (s)	–
18	16.71 (q)	1.77 (s)
19	16.47 (q)	1.62 (s)
20	18.13 (q)	1.62 (s)
21	26.14 (q)	1.70 (s)
22	168.57 (s)	–

Tabelle 25: ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten des Naturstoffs **19**.

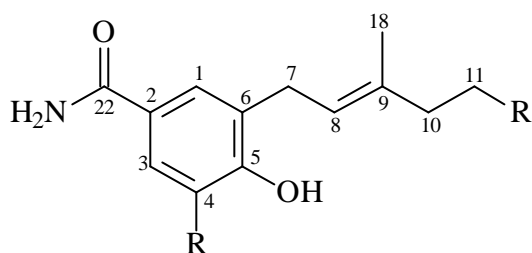
Im Protonenspektrum werden bei 7.53 und 7.74 ppm zwei Protonenresonanzen registriert, die ein AX-Spinsystem bilden. Aufgrund der Kopplungskonstanten von 1.8 Hz und der chemischen Verschiebung ist davon auszugehen, daß es sich bei diesen um aromatische *ortho*-koppelnde Protonen handelt.

Dem HMBC-Spektrum ist zu entnehmen, daß die beiden Protonen mit einem quartären Kohlenstoffatom bei 168.57 ppm koppeln, das aufgrund seiner chemischen Verschiebung dem Carbonsäureamid zuzuordnen ist. Desweiteren ist für beide Protonen eine 3J -Kopplung zu einem quartären ^{13}C -NMR-Signal detektierbar, das mit 153.01 ppm eine charakteristische Verschiebung für ein oxygeniertes aromatisches Kohlenstoffatom zeigt. Die Austauschbarkeit des Protonensignals bei 6.12 ppm und das Fehlen weiterer typischer Signale für mono-oxygenierte Kohlenstoffatome im Protonen- und ^{13}C -NMR-Spektrum sprechen gleichfalls, für eine phenolische OH-Gruppe (Teilstruktur I).



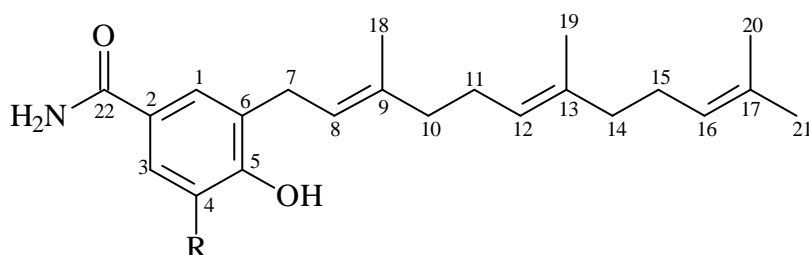
Teilstruktur I

Während für das Protonensignal bei 7.74 ppm (3-H) im HMBC-Spektrum nur eine weitere Kopplung zu einem quartären ^{13}C -NMR-Signal bei 120.53 ppm (C-4) registriert wird, zeigt das Protonensignal bei 7.53 ppm (1-H) zwei weitere Kopplungen zu einem quartären Kohlenstoffatom bei 129.86 ppm und einer aliphatischen Methylengruppe (C-7) mit den Protonen- bzw. ^{13}C -NMR-Resonanzen von 3.44 bzw. 29.41 ppm. Das Duplett bei 3.44 ppm koppelt im H,H-COSY-Spektrum mit einem Triplet bei 5.35 ppm (8-H). Die Korrelation des Triplets zu einer ^{13}C -NMR-Verschiebung von 121.00 ppm im HMQC-Spektrum belegt eindeutig den olefinischen Charakter der Methingruppe. Im HMBC-Spektrum koppelt die Methingruppe (C-8) mit einem quartären Kohlenstoffatom bei 138.55 ppm (C-9), der Methylgruppe C-18 und einer Methylengruppe (C-10) mit den chemischen Verschiebungen von 1.94–2.12 bzw. 40.12 ppm. Die Methylgruppe C-18 zeigt 2J - und 3J -Konnektivitäten zum quartären Kohlenstoffatom bei 138.55 ppm und zur CH₂-Gruppe bei 40.12 ppm. Die Protonenresonanzen der Methylengruppe korrelieren im H,H-COSY- bzw. HMBC-Spektrum mit einer Methylengruppe mit den chemischen Verschiebungen von 1.94–2.12 ppm und 26.92 bzw. 27.11 ppm (Teilstruktur II).



Teilstruktur II

Im H,H-COSY- bzw. HMBC-Spektrum sind, ausgehend von den Methylengruppen C-10 und C-11, Kopplungen zur Methingruppe bei 5.11 bzw. 5.13 ppm zu beobachten. Die entsprechenden ^{13}C -NMR-Signale werden bei 124.27 bzw. 124.74 ppm detektiert. Die Kohlenstoffatome der Methingruppen zeigen wiederum ein Kreuzsignal zu einem Drei-Protonen-Singulett bei 1.62 ppm, das wiederum mit dem quartären Kohlenstoffatom C-13 und einer CH_2 -Gruppe mit einer chemischen Verschiebung von 40.12 ppm koppelt. Die Protonensignale der Methylengruppe zeigen im H,H-COSY-Spektrum gleichfalls Kopplungen zu einer Methylengruppe bei 26.92 bzw. 27.91 ppm, die ihrerseits im H,H-COSY-Spektrum mit einer Methingruppe bei 5.11 bzw. 5.13 ppm koppelt. Im HMBC-Spektrum zeigt die Methingruppe 3J -Kopplungen zu zwei Methylgruppen (C-20 und C-21) mit einer chemischen Verschiebung von 1.70 bzw. 1.62 ppm, die desweiteren im HMBC-Spektrum miteinander und mit dem quartären Kohlenstoffatom C-17 koppeln, so daß folgende Teilstruktur konstruiert werden kann:



Teilstruktur III

Der Vergleich der Literaturdaten^[111–113] belegt, daß die Doppelbindungen der als Farnesylrest bezeichneten Seitenkette sämtlich (*E*)-Konfiguration aufweisen. Die anhand der Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_2\text{R}$ berechnete Molmasse der Verbindung beträgt $340 + m_{\text{R}}$. Die massenspektroskopischen Untersuchungen ergeben, daß der Sekundärmetabolit **19** eine Molmasse von 375 bzw. 377 besitzt. Die Massendifferenz von 35 bzw. 37 und das Intensitätsverhältnis von 3:1 des Peaks bei 375 zum Peak bei 377 belegen eindeutig, daß der

Benzolkern ein Chloratom als weiteren Substituenten trägt (Abb. 55). Durch die Bestimmung der Präzisionsmasse zu 375.19740 ± 5 ppm wurde dies abschließend verifiziert.

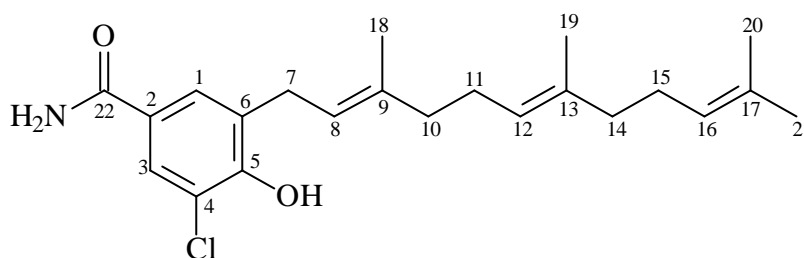


Abb. 55: Die Struktur des Naturstoff **19**.

Die Literaturrecherche ergibt, daß der vorliegende Naturstoff **19** noch unbekannt ist. Strukturelle Ähnlichkeit besitzt der Sekundärmetabolit **19** einerseits zu dem bereits in diesem Pilzextrakt gefundenen Strobilurin B (**17**) und andererseits zu einer Verbindung namens Coniothyriomycins (**31**) (Abb. 56), die aus *Coniothyrium*^[114] isoliert wurde, wobei jedoch anzumerken ist, daß die für die Wirksamkeit der Verbindungen verantwortliche (*E*)- β -Methoxyacrylat- bzw. Fumaramidsäuremethylester-Einheit in diesem Molekül nicht vorhanden ist.

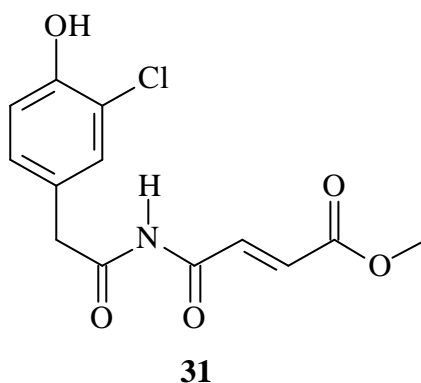


Abb. 56: Coniothyriomycin.

3.5.4. Biologische Aktivität der Naturstoffe des Pilzstammes 3304

3.5.4.1. Pflanzenschutz-Screening der Mikrobiologie in Braunschweig

Im Diagramm 9 sind die Agardiffusionstests der auf Biomalz- und Malz-Soja-Weichagar kultivierten Rohextrakte dargestellt. Die Petrolether- und Ethylacetatfraktionen wiesen eine vergleichbare Wirkung auf. Auch im Bezug auf das Nährmedium konnten keine gravierenden Unterschiede in den Bioaktivitäten festgestellt werden. Eine ganz hervorragende Wirkung zeigten alle Rohextrakte gegen Pilze. Besonders hervorzuheben ist die überaus starke Wirkung gegen *Eurotium repens* (Ascomycet) und *Ustilago violacea* (Ustomycet). Auch die Wirkung gegen *Mycotypha microspora* (Zygomycet) und *Fusarium oxysporum* ist noch als sehr gut zu bezeichnen.

Die Kresse- und Lemnatests belegen, daß auch die herbiziden Wirkungen der Rohextrakte als gut einzustufen sind.

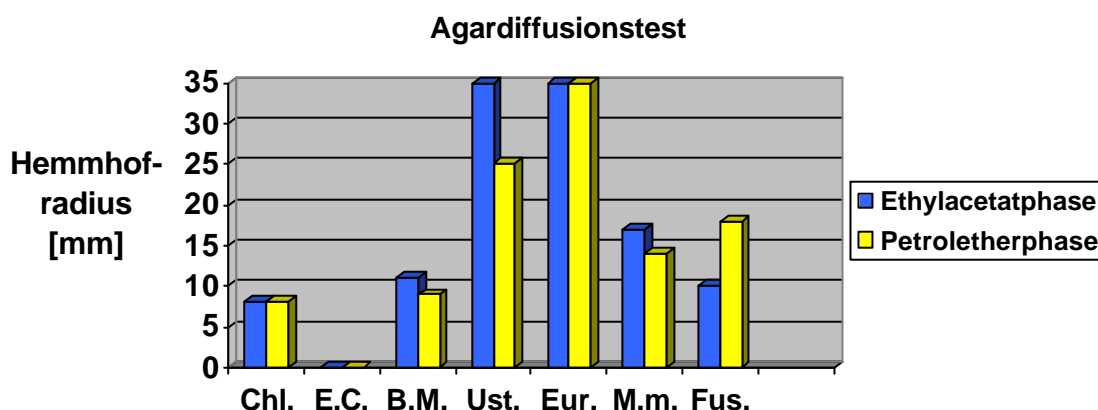


Diagramm 9: Die Ergebnisse der Agardiffusionstests der Rohextrakte.

Keimlingstest		
Versuchsdauer	1. Tag	6. Tag
Biomalz-Extrakt*	1 von 15 Samen zeigt Wachstum	0 von 15 Samen sind gekeimt
Malz-Soja-Extrakt*	1 von 15 Samen zeigt Wachstum	0 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 1**	14 von 15 Samen zeigen Wachstum	15 von 15 Samen sind gekeimt
Referenz 2***	15 von 15 Samen zeigen Wachstum	15 von 15 Samen sind gekeimt

Tabelle 26: Wirkung der Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakte im Keimlingstest (* 0.25 ml einer Lösung des Rohextraktes in 5 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser; **, *** Referenzen und Testorganismus siehe Seite 52, Tabelle 9).

Lemnatest			
Versuchsdauer	0. Tag	1. Tag	6. Tag
Biomalz-Extrakt*	8 Blätter grün	5 Blätter weiß	8 Blätter weiß
Malz-Soja-Extrakt*	8 Blätter grün	6 Blätter weiß	8 Blätter weiß
Referenz 1**	8 Blätter grün	10 Blätter grün	24 Blätter grün
Referenz 2***	7 Blätter grün	9 Blätter grün	27 Blätter grün

Tabelle 27: Lemnatest der Biomalz- und Malz-Soja-Rohextrakte (* 0.25 ml einer Lösung des Rohextraktes in 5 ml Aceton/Methanol (1:1) und 2.25 ml steriles Wasser; **, *** Referenzen und Testorganismus siehe Seite 52, Tabelle 10).

Der Vergleich der Testergebnisse der Agardiffusionstests der Rohextrakte mit denen des Strobilurin B (**17**) und Strobilurin G (**18**) belegen, daß die stark fungizide Wirkung auf diese Substanzen zurückzuführen ist. Besonders das Strobilurin B (**17**), daß als Leitstruktur für die von der BASF AG vertriebenen Strobilurin-Fungizide diente, zeigt gegen *Ustilago violacea* und *Eurotium repens* Maximalwerte der Hemmung. Der Naturstoff **19** besitzt eine mäßig gute Aktivität gegen *Ustilago violacea* und *Eurotium repens* und eine sehr gute Wirkung gegen *Bacillus megaterium*.

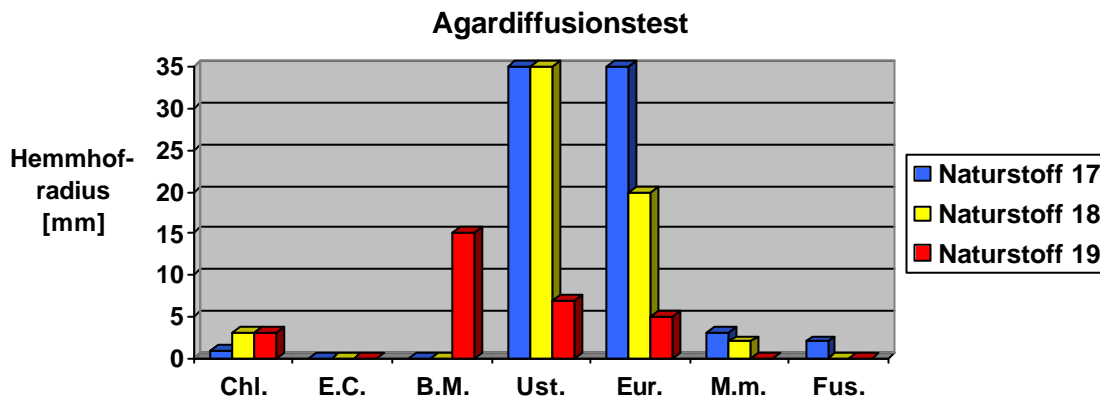


Diagramm 10: Die Ergebnisse der Agardiffusionstests der Naturstoffe **17**, **18** und **19**.

3.6. Naturstoff aus der Pflanze *Usnea dasypoga* Rohi

3.6.1. Isolierung des Naturstoffs 20

Die Isolierung des Naturstoffs **20** gelang der Arbeitsgruppe von Dr. Wahyudi Priyono Suwarso (Indonesien) aus einem Kilogramm getrocknetem Pflanzenmaterials der oben genannten Spezie. Über das Extraktionsverfahren liegen keine weiteren Informationen vor.

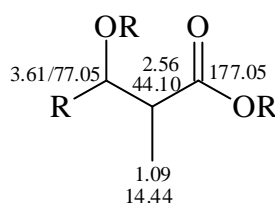
3.6.2. Strukturaufklärung und Beschreibung des Naturstoffs 20

Der Naturstoff **20** kristallisiert in Form farbloser bzw. weißer Nadeln, die einen Schmelzpunkt von 109–110 °C besitzen. Der Drehwert des optisch aktiven Sekundärmetaboliten beträgt $[\alpha]_D^{20} = -2.5^\circ$ ($c = 0.6$; CH_2Cl_2). Dünnschichtchromatographisch ist der Naturstoff durch Besprühen mit einer Ethanol-Schwefelsäure-Lösung (8 % H_2SO_4) mit einem R_f -Wert von 0.45 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %) detektierbar. Das IR-Spektrum zeigt bei 1728 cm^{-1} eine intensive Carbonylabsorptionsbande. Ein weiteres Charakteristikum ist die breite Bande bei 3435 cm^{-1} , die für eine OH-Valenzschwingung spricht.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum werden insgesamt zehn unterschiedliche Signale registriert, wobei das Signal bei 177.16 ppm unter Berücksichtigung der Carbonylabsorption im IR-Spektrum für einen Ester bzw. eine Carbonsäure spricht. Die weitere Auswertung des Protonen- und DEPT-135-Experiments ergibt, daß die Substanz neben der Carbonylgruppe aus drei Methylgruppen, die im Protonenspektrum jeweils ein Duplett zeigen, vier Methingruppen, von denen zwei aufgrund ihrer ^{13}C -NMR-Verschiebung von 71.11 bzw. 77.05 ppm monooxygeniert sind, und zwei Methylengruppen besteht. Im Protonenspektrum werden bei 3.97 und 3.23 ppm zwei für austauschbare Protonen charakteristische Signale registriert. Durch das Austauschexperiment mit D_2O und die typischen ^{13}C -NMR-Verschiebungen für monooxygenierte Kohlenstoffatome können diese Signale als OH-Gruppen identifiziert werden. Auffällig ist desweiteren die Unschärfe der übrigen Protonensignale, die trotz optimaler Abstimmung des NMR-Gerätes auf die Probe nicht vollständig beseitigt wird.

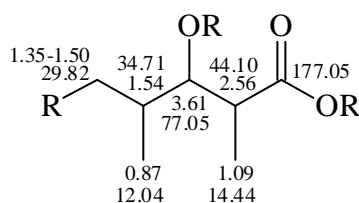
Die konstitutionelle Strukturaufklärung erfolgt mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie. Dem HMBC-Spektrum ist zu entnehmen, daß die Ester- bzw. Carbonsäuregruppe bei 177.05 ppm mit einer Methingruppe mit den chemischen Verschiebungen von 2.56 bzw. 44.10 ppm und einer Methylgruppe bei 1.09 bzw. 14.44 ppm koppelt. Die

Methylgruppe zeigt im Protonenspektrum ein Duplett mit einer Kopplungskonstanten von 6.7 Hz. Für das Protonensignal der Methingruppe wird ein nicht ausreichend aufgespaltenes Multiplett mit einer Kopplungskonstanten von 7.0 Hz detektiert. Im H,H-COSY-Spektrum ist, ausgehend von der Methylgruppe, ein Kreuzsignal zur Methingruppe registrierbar. Diese zeigt im H,H-COSY-Spektrum eine weitere Kopplung zur Methingruppe bei 3.61 ppm. Im HMQC-Spektrum korreliert dieses Protonensignal mit einem ^{13}C -NMR-Signal bei 77.05 ppm. Die Protonen- und ^{13}C -NMR-Resonanzen sprechen dafür, daß diese Methingruppe mono-oxygeniert ist. Desweiteren sind im HMBC-Spektrum, ausgehend von den Protonensignalen der Methylgruppe bei 1.09 ppm, Kreuzsignale zu den Kohlenstoffatomen der beiden Methingruppen registrierbar, so daß Teilstruktur I konstruiert werden kann.



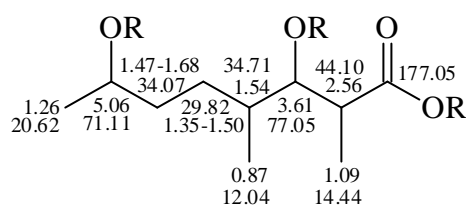
Teilstruktur I

Im Protonenspektrum wird für das Ein-Proton-Signal bei 3.61 ppm ein Doppel-Duplett mit Kopplungskonstanten von 2.4 und 8.8 Hz detektiert. Im H,H-COSY-Spektrum wird folglich eine weitere Kopplung zur CH-Gruppe mit der chemischen Verschiebung von 1.54 ppm beobachtet. Die entsprechende ^{13}C -NMR-Resonanz ist bei 34.71 ppm zu finden. Diese Methingruppe zeigt erwartungsgemäß im H,H-COSY-Spektrum eine Kreuzkopplung zu einem weiteren Drei-Protonen-Duplett mit den chemischen Verschiebungen von 0.78 bzw. 12.04 ppm. Im HMBC-Spektrum werden, ausgehend von dem Protonensignal der Methylgruppe, Kopplungen zur Methylengruppe mit der ^{13}C -NMR-Verschiebung von 29.82 ppm und den beiden Methingruppen bei 34.71 und 77.05 ppm beobachtet (Teilstruktur II).



Teilstruktur II

Die Methylengruppe bei 29.82 ppm korreliert laut HMQC-Spektrum mit den Protonenverschiebungen von 1.35–1.50 ppm. Diese zeigen im H,H-COSY-Spektrum Kreuzsignale zu Protonenresonanzen bei 1.47–1.68 ppm, die zu einer weiteren Methylengruppe mit einer chemischen Verschiebung von 34.07 ppm gehören. Im HMBC-Spektrum ist von dieser Verschiebung eine 3J -Konnektivität zur Protonenresonanz der Methylgruppe bei 1.26 ppm registrierbar. Diese zeigt wiederum im H,H-COSY-Spektrum eine Kopplung zur Methingruppe bei 5.06 ppm, die aufgrund ihrer Korrelation zur ^{13}C -NMR-Verschiebung von 71.11 ppm monooxygeniert ist. Abschließende Bestätigung findet die so konstruierbare Teilstruktur III durch die Kreuzkopplung des Protons bei 5.06 ppm zu den Protonensignalen bei 1.47–1.68 ppm.



Teilstruktur III

Die massenspektroskopischen Untersuchungen ergeben, daß der Naturstoff **20** eine Molmasse von 558 besitzt. Die Summenformel der Teilstruktur III lautet, unter Berücksichtigung des OH-Protonensignals im ^1H -NMR-Spektrum, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{R}_1\text{R}_2$. Dies entspricht einer Molmasse von $M = 202 + m_{\text{R}_1} + m_{\text{R}_2}$. Unterstellt man weiter, daß die Verbindung aufgrund der geringen Anzahl von 10 registrierbaren ^{13}C -NMR-Signalen sehr symmetrisch aufgebaut ist, so legt dies den Schluß nahe, daß die Carboxygruppe mit einem der beiden Hydroxygruppen verestert ist. Die Masse eines solchen Teilfragments mit der Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_3$ beträgt demnach 186. Daraus kann gefolgert werden, daß die Verbindung **20** vermutlich aus drei Einheiten dieser Dihydroxycarbonsäure, die aus Symmetriegründen ein cyclisches Makrolacton bilden, aufgebaut ist. Fraglich ist nur, welche der in Abbildung **57** dargestellten Strukturvarianten das Molekül aufweist.

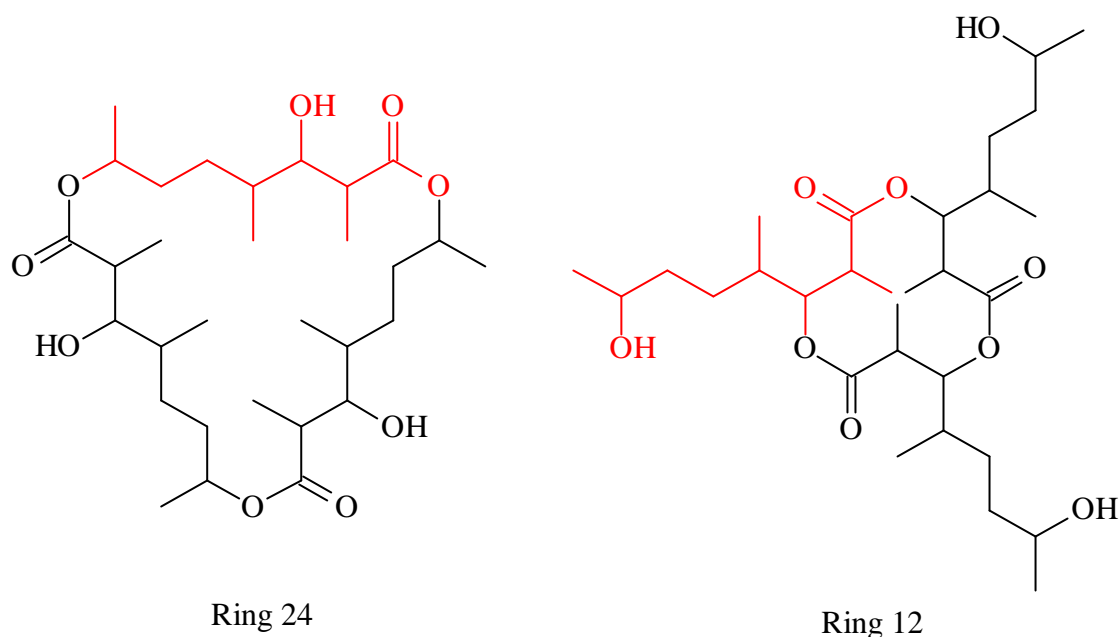


Abb. 57: Mögliche Strukturvarianten des Naturstoffs **20**.

Vergleicht man die Protonensignale der monooxygenierten Methingruppen miteinander, so spricht die stärkere Tieffeldverschiebung des Signals bei 5.06 ppm für eine stärkere Entschirmung, die durch den Elektronensog eines Esters bzw. Lactons verursacht wird, also für das 24-gliedrige Lacton. Möglicherweise, wenn auch nicht sonderlich wahrscheinlich, sind aber auch andere Effekte, wie z.B. Anisotropieeffekte, verursacht durch die Carbonylgruppen, für den Tieffeldshift verantwortlich, so daß auch das 12-gliedrige Lacton eine probabilistische Struktur darstellt. Zur absolut zweifelsfreien strukturellen Aufklärung wurde deshalb von 2 mg des Naturstoffs **20** ein Triacetat hergestellt, das entweder für das Signal bei 5.06 oder 3.61 ppm einen deutlichen Tieffeldshift zeigen sollte. Tatsächlich ist im Protonenspektrum des Triacetats für das Doppel-Duplett bei 3.61 ppm eine Tieffeldverschiebung zu 5.14 ppm zu beobachten, die eindeutig belegt, daß das Makrolacton **20** eine 24er Ringgröße besitzt.

Die Aufklärung der relativen Konfiguration erfolgt durch die Auswertung der Kopplungskonstanten und der NOE-Differenzspektren. Die Methingruppe bei 3.61 ppm zeigt im Protonenspektrum bekanntlich ein Doppel-Duplett mit Kopplungskonstanten von 2.4 und 8.8 Hz. Für die benachbarte Methingruppe mit einer chemischen Verschiebung von 2.56 ppm ist ein Sechstett detektierbar, daß vier Kopplungskonstanten von 7.0 bzw. 7.1 Hz und eine von 1.7 Hz aufweist. Idealerweise müßte für das Protonensignal der CH-Gruppe durch die Kopplung zur Methylgruppe bei 1.09 ppm und zur Methingruppe bei 3.61 ppm ein Oktett registrierbar sein. Da das Duplett der Methylgruppe eine Kopplungskonstante von 7.0 Hz besitzt, sollte die zweite Kopplungskonstante einen vergleichbaren Wert zeigen, so daß zwei Peaks gleiche chemische Verschiebungen aufweisen. Der Vergleich der Kopplungsmuster

belegt eindeutig, daß die zweite Kopplungskonstante einen Wert von 8.8 Hz besitzt, d. h. daß die Protonen der Methingruppe der Karplus-Kurve entsprechend einen relativ großen Torsionswinkel einschließen. Im Gegensatz dazu sollte der Torsionswinkel der Methingruppe bei 3.61 und 1.54 ppm aufgrund der Kopplungskonstanten von 2.4 Hz relativ klein sein (Abb. 58).

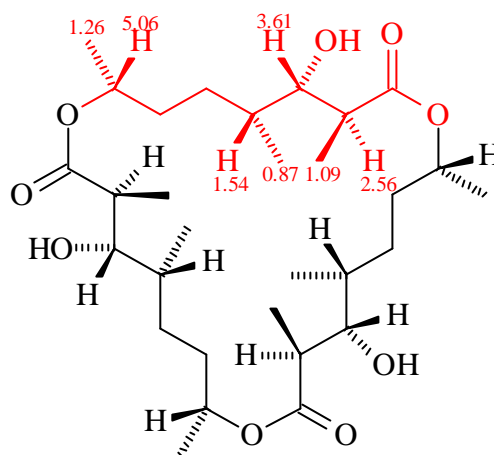


Abb. 58: Die Struktur und relative Konfiguration des Naturstoffs **20**.

Bestätigung findet die Auswertung der Kopplungskonstanten durch die Messung von NOE-Differenzspektren. Sättigt man das Protonensignal der Methylgruppe bei 0.87 ppm, so beobachtet man für das Proton bei 2.56 ppm eine Intensitätssteigerung von 8.6 %. Der vergleichsweise große Wert spricht für eine nahezu ekliptische Anordnung der Methylgruppe zum Proton. Ebenso erfährt das Protonensignal bei 3.61 ppm eine Intensitätssteigerung von 4 %, wenn die Protonenresonanz der Methylgruppe bei 1.09 ppm gesättigt wird. Desweiteren ist durch die Sättigung dieses Signals ein NOE-Effekt für das Proton bei 5.06 ppm (3.1 %) und 1.54 ppm registrierbar. Strahlt man abschließend auf die Protonenresonanz der dritten Methylgruppe bei 1.26 ppm ein, so erfahren die Protonen bei 2.56 (1.9 %) und 3.61 ppm (1.7 %) eine Intensitätssteigerung, so daß der Naturstoff **20** unter Berücksichtigung der Kopplungskonstanten zwangsläufig die in Abb. 59 dargestellte dreidimensionale Struktur besitzen muß.

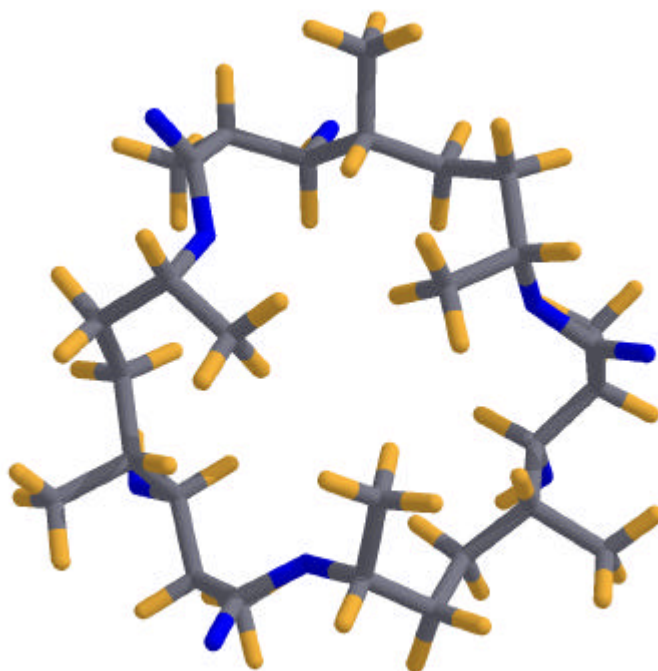


Abb. 59: Dreidimensionale Struktur des Naturstoffs **20**.

Der Sekundärmetabolit **20** stellt ein literaturunbekanntes, C_3 -symmetrisches Makrolid dar. Der Makrolacton-Ring entsteht wahrscheinlich, wie bei anderen Makroliden auch, auf dem Polyketid-Biosyntheseweg.^[116] Bis heute sind mehr als 500 verschiedene Makrolide bekannt.^[115] Das Wirkungsspektrum, der meist biologisch aktiven Verbindungen, ist sehr unterschiedlich. Wegen dieser Vielfalt werden die Makrolide hauptsächlich in die folgenden Klassen eingeteilt.

Die von Streptomyceten produzierten, klassischen Makrolide enthalten einen 12-, 14-, oder 16gliedrigen Lacton-Ring und 1–3 Zuckerbausteine. Zu nennen sind u. a. Carbomycin, Erythromycin und Oleandomycin^[115], die auch klinisch eingesetzt werden. Sie wirken bei geringer Toxizität vornehmlich gegen Gram-positive Bakterien, aber zum Teil auch gegen Spirochaeten und/oder Viren. Sie hemmen die Proteinbiosynthese durch Bindung an die 50S-Untereinheit der prokaryotischen 70S-Ribosomen. Ihnen gegenüber stehen die von Streptomyceten und Pilzen gebildeten, nicht-klassischen Makrolide gegenüber, die in der Ringgröße vergleichbar sind, aber keine Zuckerbausteine aufweisen und trotzdem biologisch aktiv sind (z.B. Albocyclin, Soraphen, Brefeldin A).

Die überwiegend von Streptomyceten produzierten Polyen-Makrolide enthalten 20–38gliedrige Lacton-Ringe, die auf der einen Seite eine unterschiedliche Anzahl konjugierter Doppelbindungen (4–7), auf der anderen eine Poly-(1-hydroxy-1,2-ethandiyl)-Kette aufweisen. Sie sind häufig mit einem Aminozyucker (z.B. D-Mycosamin) glykosiert. Die

Polyen-Makrolide zeigen als amphiphile Moleküle Wechselwirkungen mit der Zellmembran eukaryotischer Zellen und sind bei nicht zu vernachlässigender (Nieren-)Toxizität durchweg antifungisch wirksam. Klinisch werden sie daher zum Teil gegen Pilz- und Hefeinfektionen eingesetzt.

Zu den Spiro-Makroliden gehören Avermectine und Milbemycine, die gegen Endo- und Ektoparasiten bei Tieren und als Insektizide im Pflanzenschutz einen großen Markt besitzen.

Die Pleco-Makrolide weisen neben dem Lacton-Ring eine gefaltete Seitenkette auf. Sie sind hochaktive ATP_{ase}-Inhibitoren (z.B. Concanamycin A, Bafilomycin A₁). Daneben gibt es eine zunehmende Zahl ungewöhnlicher Makrolactone mit bis zu 60 Ringgliedern (Quinolido-mycin A₁), die aus verschiedenen, auch marinen Organismen stammen.

4. Synthese

4.1 Planung und Durchführung erster Syntheseschritte zur Darstellung des Naturstoffs Stemphyperylenol (11)

4.1.1. Motivation

Der aus dem endophytisch lebenden Pilz der Gattung *Monodictys fluctuata* stammende Sekundärmetabolit **11** zeigte sowohl im Agardiffusionstest als auch im Photosyntheseaktivitätstest eine sehr starke herbizide Wirkung. Aus diesem Grund besteht ein berechtigtes Interesse, diese synthetisch vernachlässigte Stoffklasse durch eine einfache Synthesestrategie zugänglich zu machen und durch Derivatisierung die Wirksamkeit der Verbindung noch zu erhöhen.

4.1.2. Syntheseplanung

Zum Aufbau des Naturstoffs **11** können unter Berücksichtigung der C_2 -Symmetrie des Moleküls retrosynthetisch verschiedene Schnitte angesetzt werden. Einige dieser Varianten sind in Abb. 62 dargestellt.

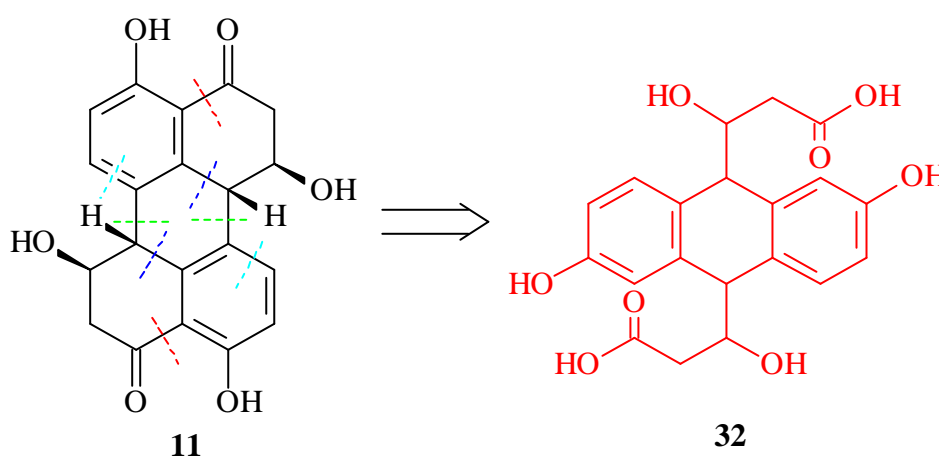


Abb. 62: Retrosynthetische Varianten zur Darstellung des Stemphyperylenols (**11**).

Die synthetisch am einfachsten zugängliche Basiskomponente stellt vermutlich ein in 9,10-Position funktionalisiertes Anthracenderivat (**32**) dar (Abb. 62). Als Ausgangsverbindung für diesen Syntheseweg sollte demnach ein Anthrachinonderivat (**33**) dienen (Abb. 63), das im ersten Schritt zum 2,6-Dihydroxyanthracen (**34**) reduziert wird. Der Schutz der

Hydroxygruppen erfolgt in der nächsten Stufe durch Veretherung mit Dimethylsulfat. Durch eine Diels-Alder-Reaktion und nachfolgender Verseifung des entstehenden cyclischen Carbonats (**36**) wird die Verbindung in das Diol (**37**) übergeführt, das durch eine Natriumperjodatspaltung in den Dialdehyd (**38**) umgewandelt wird. Der nucleophile Angriff von carbanioniden Organometallverbindungen kann im nächsten Schritt mit den klassischen Grignardreagenzien erfolgen. Vorzuziehen sind jedoch Organotitan- oder Organozirkoniumreagenzien, da insbesondere die Organozirkoniumreagenzien eine bedeutend höhere Carbonylphilie und geringere Basizität als Grignardreagenzien besitzen.^[117,118] Die Hydroxyfunktionen werden wiederum durch Veretherung mit Dimethylsulfat geschützt. Mittels einer Lemieux-Rudloff-Oxidation^[119] mit Kaliumpermanganat und Natriumperjodat in Dioxan/Wasser und genauer Kontrolle des pH-Wertes gelangt man zur Dicarbonsäure (**41**), die säurekatalysiert zur Verbindung (**42**) cyclisiert werden kann.^[120] Die abschließende Spaltung der Ethergruppen mit BCl_3 führt zum Stemphyrylenol (**11**).

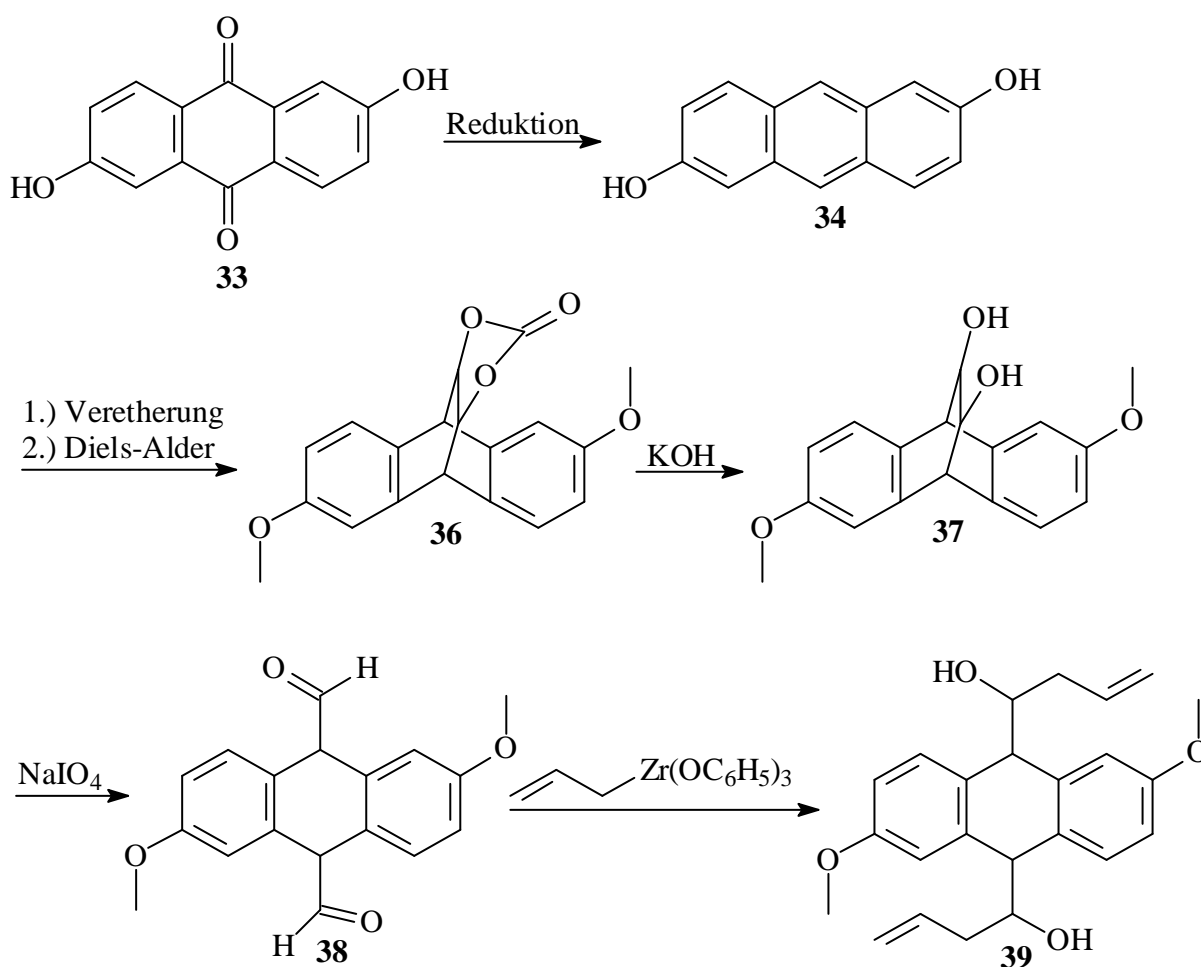


Abb. 63: Fortsetzung nächste Seite.

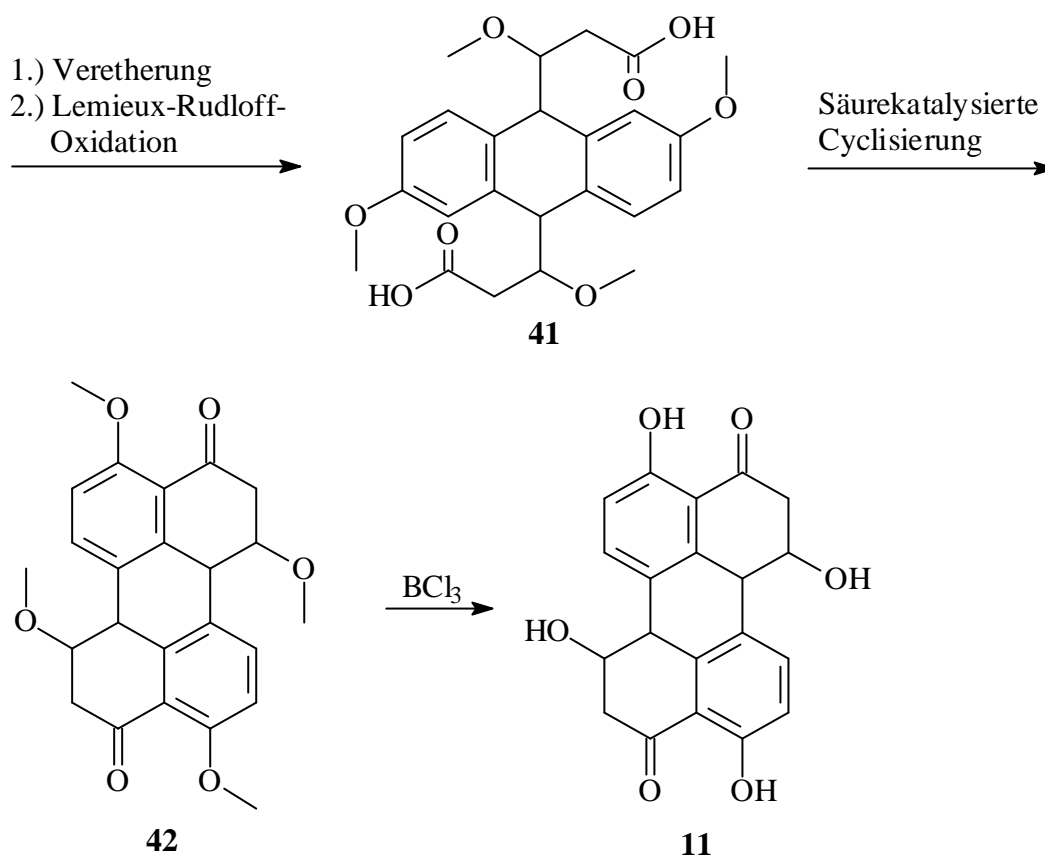


Abb. 63: Syntheseplan zur Darstellung von Stemphyperylenol (11).

4.1.3. Durchführung

Über die Reduktion von Anthrachinonderivaten zu Anthracenderivaten ist in der Literatur vielfach berichtet worden.^[121–123] Die Reduktion des 2,6-Dihydroxyanthrachinons (**33**) mit Zinkstaub in Pyridin oder Ammoniakwasser führt zu stark schwankenden Ausbeuten von 15–45 %. Durch Kelly's und Shanon's Variante^[124] mit Zinkstaub und Cyclohexyl-*p*-toluolsulfonat konnte hauptsächlich das in Abb. 64 gezeigte Bianthryl **44** hergestellt werden. Die Darstellung des Cyclohexyl-*p*-toluolsulfonats erfolgte, ausgehend von *p*-Toluolsulfonsäure und Cyclohexanol, nach dem Verfahren von Hickingbotton und Rogers.

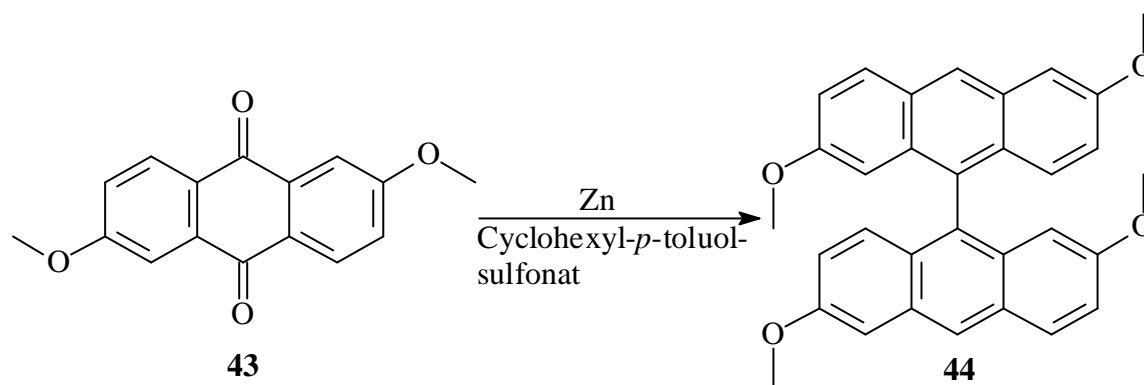


Abb. 64: Reduktion des 2,6-Dimethoxyanthrachinons (**43**) mit Zinkstaub und Cyclohexyl-*p*-toluolsulfonat.

Auch die Umsetzung des 2,6-Dimethoxyanthrachinons (**43**) nach der Methode von Clemmensen^[125] lieferte schlechte Ausbeuten.

Die einzig gangbare Variante^[126], durch die eine hervorragende Ausbeute von 92 % erzielt wurde, stellte die Reduktion mit einem Überschuß an Natriumborhydrid dar (Abb. 65). Die so erhaltene Verbindung wurde nach der Reinigung durch Flash-Chromatographie mit Dimethylsulfat in trockenem Aceton verethert.^[127] Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisation in Eisessig und Waschen mit Wasser.

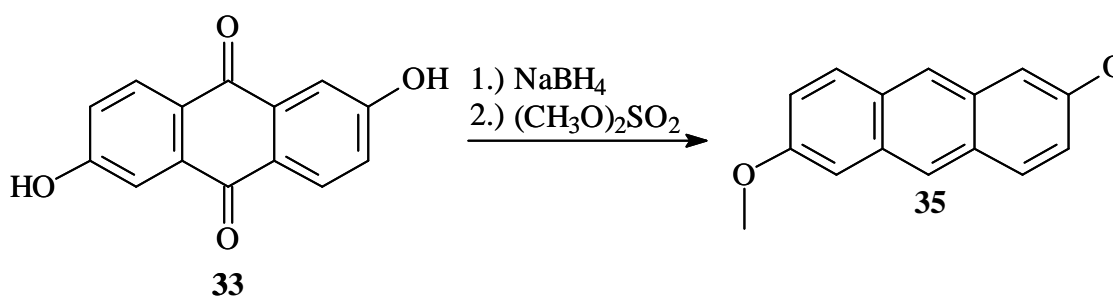


Abb. 65: Reduktion von 2,6-Dihydroxyanthrachinon (**33**) mit Natriumborhydrid und Veretherung der Hydroxygruppen mit Dimethylsulfat.

Die Diels-Alder-Reaktion^[128] des 2,6-Dimethoxyanthracens (**35**) wurde in Vinylencarbonat (**45**), das gleichzeitig als Dienophil fungierte, vorgenommen (Abb. 66). Die Temperatur der Reaktionslösung wurde auf 170–180 °C eingestellt. Eine maximale Ausbeute von 71 % konnte bei Reaktionszeiten von ca. sechs Stunden erzielt werden. Bei längeren Reaktionszeiten entstand ein beträchtlicher Anteil an Zersetzungsprodukt. Die Reinigung des cyclischen Carbonats **36** erfolgte säulenchromatographisch. Als Lösungsmittel wurde Dichlormethan verwandt.

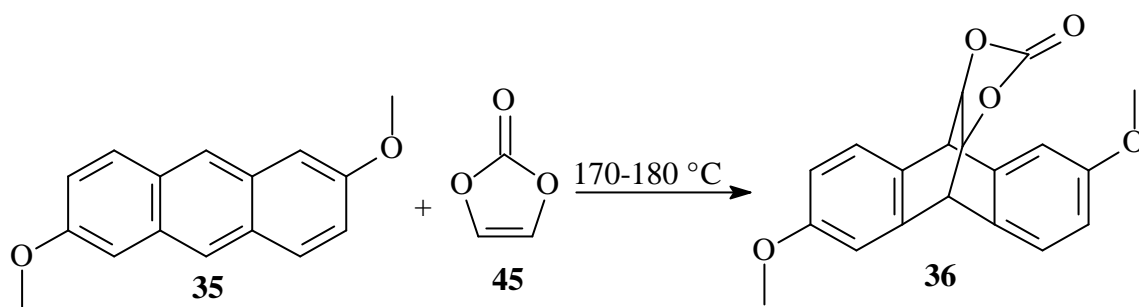


Abb. 66: Darstellung des cyclischen Carbonats **36** mittels Diels-Alder Reaktion.

Die Herstellung des Vinylencarbonats (**45**) gelang nach einer Methode von Newman und Addor.^[129] Ethylencarbonat wurde im ersten Schritt mit Sulfurylchlorid unter UV-Bestrahlung in trockenem Tetrachlorkohlenstoff zum Monochlorethylencarbonat umgesetzt (Abb. 67). Die Kontrolle der sehr heftig einsetzenden Reaktion erfolgte durch die Regulierung der Intensität der Bestrahlung. Ferner mußte darauf geachtet werden, daß das entstehende SO₂- und HCl-Gas in wässriger Natronlauge absorbiert wurde. Das destillierte Produktgemisch, bestehend aus ca. 75 % Monochlorethylencarbonat **46** (¹H-NMR-Analyse), Ethylencarbonat (**47**) und Dichlorethylencarbonat, wurde ohne weitere Trennung in der nächsten Stufe eingesetzt, in der die Eliminierung mittels Triethylamin durchgeführt wurde (Abb. 67). Die Reinigung des Vinylencarbonats (**45**) erfolgte mittels Kugelrohrdestillation.

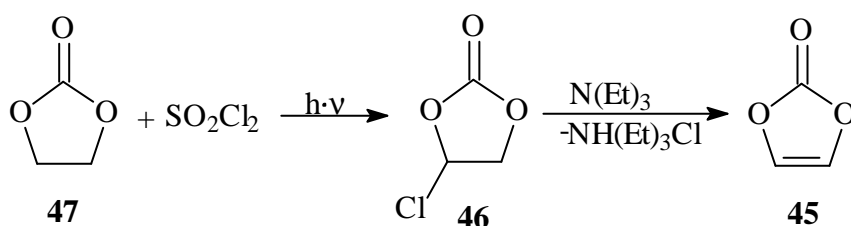


Abb. 67: Darstellung des Vinylidencarbonat (**45**).

Zur Darstellung des cyclischen Diols **37** wurde das Diels-Alder-Produkt **36** in einer ethanolschen Kaliumhydroxidlösung zwei Stunden bei 60 °C gerührt (Abb. 68). Das in 96 %iger Ausbeute isolierbare Produkt wurde ohne weitere Reinigung in der nachfolgenden Perjodatspaltung eingesetzt. Diese lieferte in einer hervorragenden Ausbeute von 93 % den Dialdehyd **38** (Abb. 68).

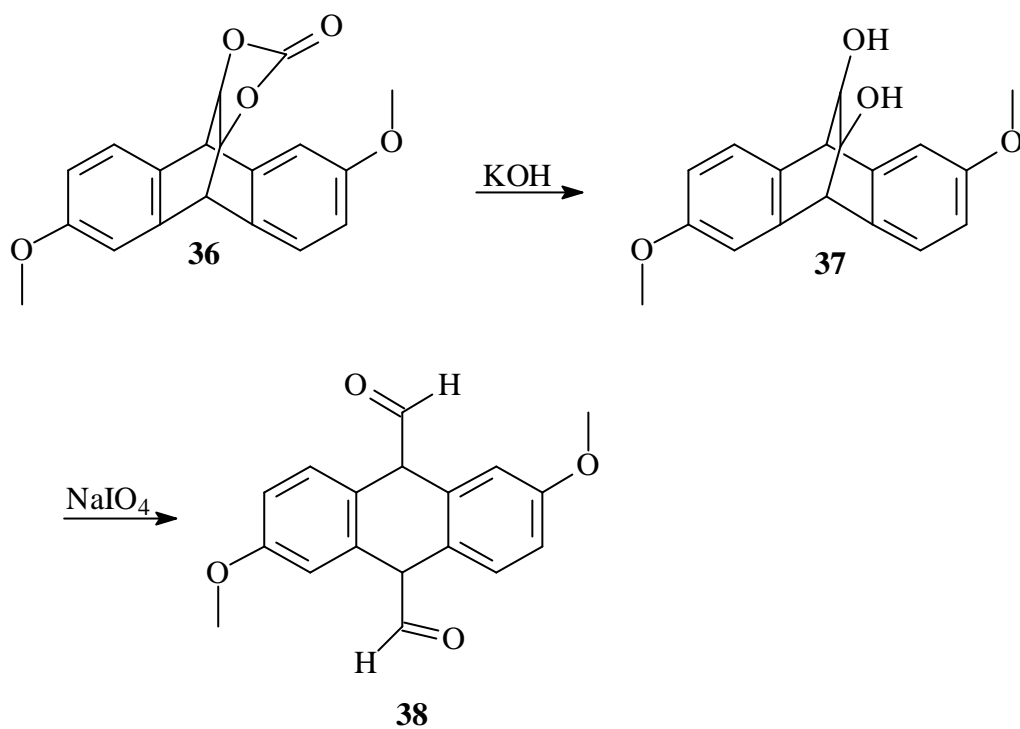


Abb. 68: Darstellung des Diols **37** und des Dialdehyds **38**.

Da der Strukturaufklärung einiger hochinteressanter Sekundärmetabolite Vorrang gegeben wurde, mußte die Synthese an dieser Stelle unterbrochen werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung, Identifizierung und biologische Wirksamkeit unterschiedlicher, von Pilzen produzierter Sekundärmetabolite beschrieben. Gewonnen wurden die Naturstoffe aus den Pilzstämmen 3037, 2225, 3184, 3004 und 3304, die entweder endophytisch lebende Pilze (3184) waren oder an extremen Standorten in China (3037, 3004), Ägypten (2225) oder Südafrika (3304) gefunden wurden.

Aus dem Pilzstamm 3037 konnten sieben Sekundärmetabolite isoliert und identifiziert werden, von denen sechs der großen Gruppe der Diterpene zugeordnet werden konnten. Bei den Naturstoffen **1–4** handelt es sich um Terpenoid-Lactone, die strukturell sehr große Ähnlichkeit zu den Inumakilactonen, Nagilactonen und Podolactonen aufweisen.

Während die Naturstoffe **1** und **3** erstmals von Andersen^[42] und Ellestad^[43] charakterisiert werden konnten, stellen die Sekundärmetabolite **2** und **4** literaturunbekannte Verbindungen dar. Der Metabolit **2** ist dabei unter der Vielzahl der strukturverwandten Substanzen die einzige, die am Kohlenstoffatom C-13 keinen Substituenten trägt. Der Naturstoff **4** wurde aus polareren Fraktionen des Pilzextraktes isoliert. Ungewöhnlich ist, daß dieser im Gegensatz zu den Verbindungen **1** und **3** *R*- statt *S*-Konfiguration am C-13 aufweist.

Die unbekannten Sekundärmetabolite **5** und **6** sind gleichfalls der Gruppe der Diterpenoide zuzuordnen. Im Gegensatz zu den Naturstoffen **1–4** besitzen diese anstatt des 5-Ringlactons eine freie Carbonsäurefunktion und in Analogie zum Naturstoff **2** keinen Substituenten am C-13. Interessanterweise scheint es sich bei Naturstoff **6** tatsächlich um eine Vorstufe des Naturstoffs **2** zu handeln, denn durch wenige chemische Modifikationen könnte die Verbindung **6** in den Naturstoff **2** umgewandelt werden.

Desweiteren gelang es, aus dem Pilzstamm 3037 den Sekundärmetaboliten Cladosporin (**7**) zu isolieren. Bekannt ist, daß diese erstmals von Scott^[51] isolierte Verbindung antimikrobielle, insektizide und phytotoxische Eigenschaften besitzt.^[56]

Die biologische Testung ergab, daß mit den Naturstoffen **1–7** im wesentlichen die Komponenten isoliert wurden, die für Bioaktivität des Rohextraktes verantwortlichen waren. Besonders hervorzuheben ist die hervorragende fungizide Wirkung des Naturstoffs **3**, die den Ergebnissen des Agardiffusionstests zufolge, vergleichbar ist mit der Wirkung von handelsüblichen Fungiziden. Desweiteren besitzt die Substanz **3** neben einer sehr guten herbizide Aktivität auch eine starke Wirkung als Fibrinogen-Hemmer.

Da die Naturstoffe **2, 3, 4, 5** und **6** aus Substanzmangel nur in beschränktem Umfang getestet werden konnten und der Pilz eine beachtenswerte Vielfalt an Sekundärmetaboliten produziert,

sei an dieser Stelle angemerkt, daß eine nochmalige Anzucht des Pilzstammes 3037 ratsam erscheint.

Aus dem Pilzstamm 2225 gelang die Isolierung der Dehydrofusarinsäure (**8**) und der Fusarinsäure (**9**). Die Dehydrofusarinsäure (**8**) wurde von Stoll^[63] aus *Gibberella fujikauoi* isoliert, die Fusarinsäure (**9**) konnte aus dem Pilz der Art *Fusarium heterosporium* Xees gewonnen werden.^[66] Das Picolinsäurederivat **9** besitzt neben einer ausgeprägten phytotoxischen Aktivität^[67] auch die Eigenschaften, die Dopamin- β -Hydrolase^[69] zu hemmen und andere Stoffwechselvorgänge wie z.B. den Serotonin-Metabolismus^[70,71] zu beeinflussen.

Die Naturstoffe **10**, **11** und **12** konnten aus dem Pilzstamm 3184 isoliert werden. Bei Verbindung **10** handelt es sich um das literaturbekannte Steroid Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-on (**10**), das 1968 von Schulte^[78] erstmals beschrieben wurde. Der Sekundärmetabolit **11** stellt ein ebenfalls literaturbekanntes Perylenderivat namens Stemphyperylenol (**11**) dar, das 1986 von Nasini^[83] aufgeklärt wurde. Der Naturstoff **12** dagegen ist in der Literatur noch nicht beschrieben worden, wenngleich dieser mit den bereits bekannten Vertretern aus der Klasse der Stemphyl- bzw. Altertoxine strukturell sehr eng verwandt ist. Die Aufklärung der relativen Konfiguration erfolgte durch die Auswertung der Kopplungskonstanten des Protonenspektrums und dem Vergleich des CD-Spektrums mit dem des strukturell sehr ähnlichen Stemphyloxin I (**25**). Die Aufklärung der absoluten Konfiguration der Verbindung **12** durch den Vergleich des experimentell bestimmten CD-Spektrums mit dem quantenmechanisch berechneten CD-Spektrum steht zur Zeit noch aus. Sollte dies gelingen, so wäre dies ein wertvoller Beitrag zur Aufklärung der absoluten Konfiguration sämtlicher strukturell eng verwandter Substanzen dieser Stoffklasse.

Die biologische Testung des Stemphyperylenol (**11**) zeigte, das die Verbindung sehr gute herbizide Eigenschaften besitzt. Zudem macht der Vergleich der Agardiffusionstests der Rohextrakte und des Naturstoffs **11** deutlich, daß dieser aufgrund des fast identischen Wirkspektrums für die Aktivität des Pilzextraktes verantwortlich ist.

Aus dem Pilzstamm 3004 wurden insgesamt vier Sekundärmetabolite isoliert und identifiziert. Aus den herkömmlich aufgearbeiteten Rohextrakten konnten das Naphthalinderivat **13** und das Acetonadukt **14** des Naturstoffs **15** gewonnen werden. Der Sekundärmetabolit **13** wurde 1963 aus Kulturen von *Penicillium hergei*^[94] isoliert. Aus den, ohne Ethylacetat und Aceton aufgearbeiteten Pilzkulturen, gelang die Isolierung der Naphthalinderivate **15** und **16**, die von Ayer erstmals 1986 beschrieben worden sind.^[91] Im Agardiffusionstest zeigte lediglich Naturstoff **15** eine als gut zu bezeichnende Wirkung gegen *Ustilago violacea*.

Die Isolierung der Naturstoffe **17**, **18** und **19** erfolgte aus dem Pilzstamm 3304. Bei Naturstoff **17** handelt es sich um das von Anke und Steglich^[100] isolierte und charakterisierte Strobilurin B, das als Leitstruktur für die von der BASF AG vertriebenen Strobilurin-Fungizide diente. Der Sekundärmetabolit **18** stellt ein weiteres Strobilurinderivat dar, das erstmals 1990 von Fredenhagen^[108,109] aufgeklärt wurde. Die als Strobilurin G (**18**) bezeichnete Substanz zeigt neben interessanten fungiziden Eigenschaften auch in vitro Tumoraktivität gegen menschliche T-24 Harnblasenkrebszelllinien.^[110] Der Naturstoff **19** stellt ein literaturunbekanntes mit einem Famesylrest substituiertes Benzoessäureamid dar, das strukturelle Ähnlichkeit zum Strobilurin B (**17**) und zu einer Verbindung namens Coniothyriomycin (**31**) aufweist. Der Agardiffusionstest der Naturstoffe **17** und **18** belegt die hervorragende fungizide Wirkung der Strobilurinderivate, insbesondere das Strobilurin B (**17**) zeigt Maximalwerte der Hemmung gegen *Ustilago violacea* und *Eurotium repens*. Der literaturunbekannte Sekundärmetabolit **19** besitzt eine sehr gute Aktivität gegen *Bacillus megaterium*.

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herrn Dr. Wahyudi Priyono Suwarso (Indonesien) wurden uns zur Strukturaufklärung 14 mg des Naturstoffs **20** überlassen. Der Sekundärmetabolit **20** wurde von der oben genannten Arbeitsgruppe aus dem Pflanzenextrakt der Pflanze *Usnea dasypoga* Rohi isoliert. Die Identifizierung der Substanz **20** ergab, daß es sich bei dieser um ein literaturunbekanntes, C₃-symmetrisches 24-gliedriges Makrolacton handelt. Zur Zeit befindet sich der strukturell außergewöhnliche Sekundärmetabolit **20** in der pharmakologischen Testung der BASF AG.

Im synthetischen Teil der vorliegenden Arbeit wurden die ersten Schritte zur Darstellung des Stemphyperylenols (**11**) vorgestellt. Der Naturstoff **11** zeigte sowohl im Agardiffusionstest als auch im Photosyntheseaktivitätstest sehr starke herbizide Wirkung, so daß Interesse bestand, diese synthetisch vernachlässigte Stoffklasse durch eine einfache Synthese zugänglich zu machen und durch Derivatisierung die Wirksamkeit der Verbindung gegebenenfalls noch zu erhöhen. Als Ausgangskomponente diente das 2,6-Dihydroxyanthrachinon (**33**), das durch die Reduktion mit NaBH₄ und anschließender Veretherung in sehr guten Ausbeuten in das Anthracenderivat **35** übergeführt wurde. Dieses wurde durch eine Diels-Alder-Reaktion mit Vinylencarbonat (**45**) zum cyclischen Carbonat **36** umgesetzt, welches nachfolgend in einer ethanolischen KOH-Lösung zum Diol **37** verseift wurde. Die anschließende Perjodatspaltung lieferte ebenfalls in sehr guten Ausbeuten den Dialdehyd **38**. Da der Strukturaufklärung einiger sehr interessanter Naturstoffe Vorrang gegeben wurde, mußte an dieser Stelle die Synthese unterbrochen werden. Dennoch konnte gezeigt werden, daß durch die eingeschlagene Synthesestrategie ein eleganter Zugang zur Verbindung **11** möglich scheint.

6. Experimenteller Teil

6.1. Allgemein verwendete Analysen- und Meßmethoden

Analytische Dünnschichtchromatographie (DC):

Die analytische Dünnschichtchromatographie wurde mit Kieselgel-Fertigfolien (Kieselgel 60 F254) der Fa. E. Merck AG, Darmstadt durchgeführt. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$ und 366 nm). Zur zusätzlichen Detektion einzelner Substanzen wurden folgende Sprühreagenzien verwandt :

- Schwefelsäure-Reagenz (Universalreagenz)

Eine 8 %ige ethanolische Schwefelsäurelösung diente als Sprühreagenz. Die DC-Folie wird anschließend so lange mit der Heizpistole erwärmt, bis die Substanz sichtbar wird.

- Bromkresol-Grün

Es wurde eine 0.04 %ige Lösung in Isopropanol, die mit 2N Natronlauge auf pH-7 eingestellt wurde, benutzt. Säuren bilden sofort gelbe Flecken.

Schmelzpunktbestimmung:

Die Schmelzpunkte wurden in offenen Kapillaren mit einer Schmelzpunktsbestimmungssapparatur der Fa. Gallenkamp gemessen und sind unkorrigiert.

Säulenchromatographie:

Als stationäre Phase diente Kieselgel 60 (230–400 mesh, 0.040–0.063 mm) der Fa. Merck AG, Darmstadt.

Präparative Schichtchromatographie:

Für die präparative Schichtchromatographie wurden mit Kieselgel 60- und RP-18 beschichtete Fertigplatten der Fa. Macherey und Nagel verwandt. Desweiteren wurden selbstangefertigte Dickschichtplatten, die mit Kieselgel 60 PF254 plus Gips (Fa. Merck) beschichtet waren, benutzt.

HPLC:

Für die HPLC wurde von der Fa. Merck eine Hibar-Fertigsäule RT (250–25) LiChrosorb Si 60 (7 μm) mit einer Hibar-Vorsäule (30–4) LiChrosorb Si 60 (5 μm) bzw. eine LiChrosorb RP 18 (7 μm)-Säule, die Pumpen mit der Bezeichnung L-6000 bzw. L-5200 Intelligent Pump, der LC-Organizer 885-5931 mit dem Rheodyne 6-Wegeventil 7125, der Detektor 655 A bzw. L-3000 Photo Diode Array und der Chromato-Integrator D 2000 der Fa. Merck/Hitachi verwandt. Die Proben wurden vor ihrer Verwendung über eine kurze Kieselgelsäule bzw. Keramikfritte filtriert. Die Reinigung der Lösungsmittel wurde nach Standardmethoden

vorgenommen. Für die HPLC wurden die Lösungsmittel zusätzlich noch im Ultraschallbad (Laboson 200) entgast.

Massenspektroskopie:

Die Massenspektren sowie die Bestimmung der Feinmassen wurden von Herrn Dr. Schiebel und Frau Döring von der TU Braunschweig an einem Finnigan MAT 8430 (70 eV), von Herrn Jonk an einem Fison MD 800 und von Herrn Dr. Schulze von der Universität Bremen an einem Finnigan MAT 8200 (70 eV) aufgenommen. Den genannten Personen sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Die relativen Intensitäten, bezogen auf den Basispeak, sind hinter den Massen in Klammern angegeben.

Röntgenstrukturanalyse:

Die Röntgenstrukturanalysen wurden von Herrn Dr. U. Flörke (Uni-GH Paderborn) durchgeführt, dem ich hiermit herzlich danke.

Infrarotspektroskopie:

Die IR-Spektren der untersuchten Substanzen wurden mit dem FTIR-Gerät 510 p der Fa. Nicolet aufgenommen. Die Bearbeitung der Spektren erfolgte mit Hilfe des PCIR-Programms derselben Firma. Die Angabe der Probenmatrix erfolgt in Klammern, die der Wellenzahlen in $[\text{cm}^{-1}]$.

UV/VIS-Spektroskopie:

Zur Aufnahme der UV/VIS-Spektren wurde das Spektrometer UV-2101 PC der Fa. Shimadzu verwendet.

Optische Rotation:

Die Drehwerte wurden in den angegebenen Lösungsmitteln und Konzentrationen mit dem Polarimeter 241 der Fa. Perkin-Elmer in einer unthermostatisierten Standardküvette ($d = 1 \text{ dm}$) unter Verwendung einer Natriumlampe (D-Linie, $\lambda = 589 \text{ nm}$) bestimmt.

CD-Spektroskopie:

Die Aufnahme der CD-Spektren erfolgte an dem Spektrometer J-20 der Fa. Jasco.

NMR-Spektroskopie:

Die Kernresonanzspektren wurden an einem Bruker ARX 200-, ARX 400- bzw. DMX 600-Spektrometer aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ wurden auf das jeweils verwandte deuterierte Lösungsmittel als inneren Standard bezogen und sind in ppm angegeben. Die Abkürzungen für die Multiplizitäten lauten:

(s)	Singulett	bzw.	quartäres Kohlenstoffatom
(d)	Duplett	bzw.	tertiäres Kohlenstoffatom
(t)	Triplett	bzw.	sekundäres Kohlenstoffatom
(q)	Quartett	bzw.	primäres Kohlenstoffatom
(m)	Multiplett		
(ps)	Pseudo-Singulett		
(pd)	Pseudo-Duplett		
(pt)	Pseudo-Triplett		
(pq)	Pseudo-Quartett		

Für die Aufnahme der NMR-Spektren am ARX 400- und DMX 600-Spektrometer bedanke ich mich recht herzlich bei Herrn Dr. V. Wray (GBF Braunschweig).

6.2. Mikrobiologische Arbeitsmethoden

Die Auswahl, Anzucht, Pilzbestimmung und die Durchführung der Aktivitätstests wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Aust, Institut für Mikrobiologie der TU Braunschweig, durchgeführt. Für die geleistete Arbeit und die gute Kooperation möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. B. Schulz, Frau Qunxiu Hu und Herrn Dr. S. Dräger meinen besonderen Dank aussprechen.

6.2.1. Anreicherung der Pilze in Submerskultur

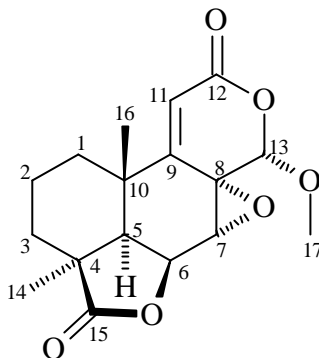
Alle in dieser Arbeit aufgeführten Pilzstämme wurden entweder auf Biomalz- oder Malz-Soja-Weichagar-Nährmedien kultiviert. Hierzu wurden 200 oder 250 ml des Mediums in Fernbachkolben gefüllt. Nach der Sterilisation im Autoklaven (121 °C, 2 bar) wurde der entsprechende Pilz von einer Schrägagarkultur überimpft und stehend bei Raumtemperatur bis zu 122 Tage inkubiert.

6.3. Experimenteller Teil zur Naturstoffisolierung

Zur Nummerierung der Kohlenstoffatome innerhalb der Zeichnungen sei vorab angemerkt, daß diese nicht den Anspruch erhebt, „IUPAC-konform“ zu sein. Vielmehr wurde die Nummerierung der bekannten oder strukturell verwandten Verbindungen aus der Literatur übernommen.

6.3.1. Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7.

6.3.1.1. 7-Methoxy-3a,10b-dimethyl-6,6a-epoxy-1,2,3,3a,5a,7,10b,10c-octahydro-5,8-dioxa-acephenanthrylen-4,9-dion (**1**)



Summenformel: $C_{17}H_{20}O_6$.–

Molmasse: 320.–

Schmelzpunkt: 231 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +91^\circ$ ($c = 0.98$, MeOH).–

R_f -Wert: 0.78 (CH_2Cl_2 /MeOH 2 %).–

IR (KBr): $\nu[cm^{-1}] = 3421, 1773, 1717, 1458$.–

MS (CI/ NH_3 (pos.)) m/z (%): 338 $[M+NH_4]^+$ (50), 321 $[M+H]^+$ (18).–

MS (CI/ NH_3 (neg.)) m/z (%): 319 $[M-H]^-$ (25).–

HRMS (CI/ NH_3 (neg.)): theor.: 319.118 $[M-H]^-$

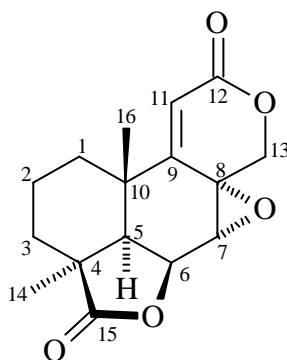
exper.: 319.118 \pm 2 ppm Res.: 10.000

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.14$ (s, 3H, 16-H), 1.29 (s, 3H, 14-H), 1.44–1.80 (m, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 1.90 (d, 1H, $J_{5,6} = 4.4$ Hz, 5-H), 2.15–2.28 (m, 1H, 3-H), 3.67 (s, 3H, 17-H),

4.02 (d, 1H, $J_{7,6} = 1.1$ Hz, 7-H), 4.95 (dd, 1H, $J_{6,5} = 4.4$ Hz, $J_{6,7} = 1.1$ Hz, 6-H), 5.46 (s, 1H, 13-H), 6.04 (s, 1H, 11-H).–

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 17.9$ (t, C-2), 24.5 (q, C-16), 25.6 (q, C-14), 28.7 (t, C-3), 29.9 (t, C-1), 36.3 (s, C-10), 42.3 (s, C-4), 44.1 (d, C-5), 53.4 (d, C-7), 56.6 (s, C-8), 58.1 (q, C-17), 72.3 (d, C-6), 99.9 (d, C-13), 118.8 (d, C-11), 157.5 (s, C-9), 162.6 (s, C-12), 180.6 (s, C-15).–

6.3.1.2. 3a,10b-Dimethyl-6,6a-epoxy-1,2,3,3a,5a,7,10b,10c-octahydro-5,8-dioxa-acephenanthrylen-4,9-dion (**2**)



Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_5$.–

Molmasse: 290.–

Schmelzpunkt: 223–224 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13.2^\circ$ ($c = 0.24$, CH_2Cl_2).–

R_f -Wert: 0.78 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %).–

UV (CH_3OH): λ_{max} [nm](ϵ): 270.5 (14513), 249.5 (8152).–

IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 1778, 1716, 1212, 1041, 951$.–

MS (200 °C) m/z (%): 290 [M]⁺ (2), 232 (25), 219 (70), 204 (80), 189 (50), 176 (45), 160 (100).–

MS (CI/NH₃ (pos.)) m/z (%): 308 [M+NH₄]⁺ (100), 291 [M+H]⁺ (12).–

MS (CI/NH₃ (neg.)) m/z (%): 290 [M]⁻ (50).–

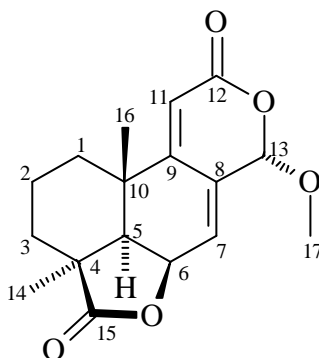
HRMS (CI/NH₃ (neg.)): theor.: 290.115

exper.: 290.115 ± 2 ppm Res.: 10.000

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 1.15 (s, 3H, 16-H), 1.30 (s, 3H, 14-H), 1.39–1.61 (m, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 1.90 (d, 1H, *J*_{5,6} = 4.4 Hz, 5-H), 2.15–2.28 (m, 1H, 3-H), 3.90 (d, 1H, *J*_{7,6} = 1.4 Hz, 7-H), 4.13 (d, 1H, *J*_{13,13} = 12.4 Hz, 13-H), 4.71 (d, 1H, *J*_{13,13} = 12.4 Hz, 13-H), 4.98 (dd, 1H, *J*_{6,5} = 4.4 Hz, *J*_{6,7} = 1.4 Hz, 6-H), 6.04 (s, 1H, 11-H).–

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 17.5 (t, C-2), 24.0 (q, C-16), 25.3 (q, C-14), 28.4 (t, C-1), 29.6 (t, C-3), 35.9 (s, C-10), 41.9 (s, C-4), 43.8 (d, C-5), 53.2 (d, C-7), 55.5 (s, C-8), 71.9 (d, C-13), 72.2 (t, C-6), 118.4 (d, C-11), 157.6 (s, C-9), 162.5 (s, C-12), 180.2 (s, C-15).–

6.3.1.3. 7-Methoxy-3a,10b-dimethyl-1,2,3,3a,5a,7,10b,10c-octahydro-5,8-dioxacephenanthrylen-4,9-dion (**3**)



Summenformel: $C_{17}H_{20}O_5$.–

Molmasse: 304.–

Schmelzpunkt: 222 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -206^\circ$ ($c = 0.45$, MeOH).–

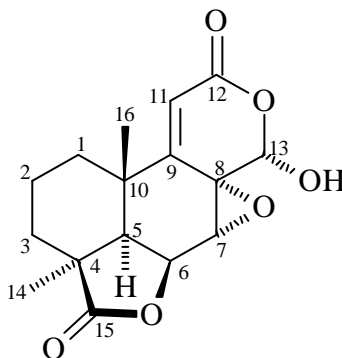
R_f -Wert: 0.74 (CH_2Cl_2 /MeOH 2 %).–

IR (KBr): $\nu[cm^{-1}] = 3398, 1765, 1735, 1720, 1459$.–

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.21$ (s, 3H, 16-H), 1.37 (s, 3H, 14-H), 1.51–1.90 (m, 5H, 1-H, 2-H, 3-H), 1.96 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz, 5-H), 2.27–2.42 (m, 1H, 3-H), 3.76 (s, 3H, 17-H), 5.06 (t, 1H, $J = 4.6$ Hz, 6-H), 5.78 (s, 1H, 13-H), 5.80 (s, 1H, 11-H), 6.60 (d, 1H, $J = 4.6$ Hz, 7-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 17.8$ (t, C-2), 24.2 (q, C-16), 25.1 (q, C-14), 28.1 (t, C-1), 30.3 (t, C-3), 35.4 (s, C-10), 43.2 (s, C-4), 48.4 (d, C-5), 57.9 (q, C-17), 71.7 (d, C-6), 101.6 (d, C-13), 112.2 (d, C-11), 124.4 (d, C-7), 133.3 (s, C-8), 157.9 (s, C-9), 163.1 (s, C-12), 181.2 (s, C-15).–

6.3.1.4. 7-Hydroxy-3a,10b-dimethyl-6,6a-epoxy-1,2,3,3a,5a,7,10b,10c-octahydro-5,8-dioxa-acephenanthrylen-4,9-dion (**4**)



Summenformel: $C_{16}H_{18}O_6$.–

Molmasse: 306.–

Schmelzpunkt: 241 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -34.1^\circ$ ($c = 0.23$; MeOH).–

R_f -Wert: 0.62 (CH_2Cl_2 /MeOH 4 %).–

UV (CH_3OH): $\lambda_{max}[nm]$ (ϵ): 271 (13500).–

IR (KBr): $\nu[cm^{-1}] = 3336, 1788, 1696, 1089$.–

MS (CI/ NH_3 (pos.)) m/z (%): 324 $[M+NH_4]^+$ (100).–

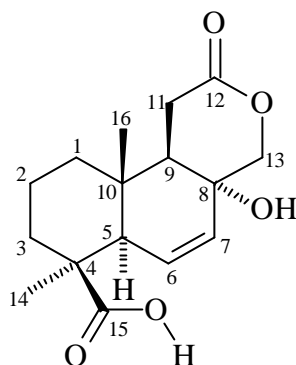
MS (CI/ NH_3 (neg.)) m/z (%): 305 $[M-H]^-$ (35), 278 (100).–

HRMS (DCI/ NH_3 (neg.)): theor.: 305.10251 $[M-H]^-$

exper.: 305.10237 \pm 0.5 ppm Res.: 3000 (10 % Tal-Def)

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.07$ (s, 3H, 16-H), 1.23 (s, 3H, 14-H), 1.39–1.74 (m, 2H, 1-H), 1.39–1.74 (m, 2H, 2-H), 1.39–1.74 (m, 1H, 3-H), 1.80 (d, 1H, $J_{5,6} = 4.4$ Hz, 5-H), 2.10–2.20 (m, 1H, 3-H), 3.92 (d, 1H, $J_{7,6} = 1.1$ Hz, 7-H), 4.90 (dd, 1H, $J_{6,5} = 4.4$ Hz, $J_{6,7} = 4.4$ Hz, 6-H), 5.54 (bs, 1H, 13-H), 5.99 (s, 1H, 11-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 18.0$ (t, C-2), 24.5 (q, C-14), 24.5 (q, C-16), 28.8 (t, C-3), 30.0 (t, C-1), 36.1 (s, C-10), 42.3 (s, C-4), 44.4 (d, C-5), 54.1 (d, C-7), 57.4 (s, C-8), 72.4 (d, C-6), 97.2 (d, C-13), 117.6 (d, C-11), 176.5 (s, C-9), 163.0 (s, C-12), 180.6 (s, C-15).–

6.3.1.5. 8-Hydroxy-12-oxo-(8 α)-13-oxa-podocarpa-16-säure (5)

Summenformel: C₁₆H₂₂O₅.–

Molmasse: 294.–

Schmelzpunkt: 237 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -38.5^\circ$ (c = 0.21, MeOH).–

R_f-Wert: 0.31 (CH₂Cl₂/MeOH 4 %).–

UV (CH₃OH): λ_{\max} [nm] (ε): 272.5 (12130).–

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 3400, 1719, 1692.–

MS (150 °C) m/z (%): 263 (30), 189 (10), 118 (100).–

MS (CI/NH₃ (pos.)) m/z (%): 312 [M+NH₄]⁺ (100).–

MS (CI/NH₃ (neg.)) m/z (%): 294 [M]⁻ (35), 276 [M-H₂O]⁺ (100).–

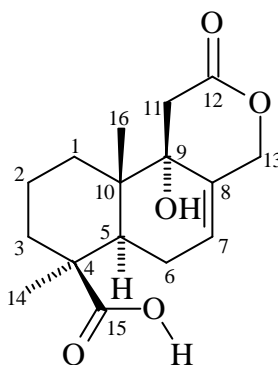
HRMS (CI/NH₃ (neg.)): theor.: 294.1467

exper.: 294.1504 Res.: 5000 (10% Tal.Def.)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ = 0.76 (s, 3H, 16-H), 1.05–1.22 (m, 2H, 1-H), 1.30 (s, 3H, 14-H), 1.45–1.49 (m, 1H, 2-H), 1.44–1.57 (m, 1H, 2-H), 1.81–1.88 (m, 1H, 3-H), 2.04 (pt, 1H, $J_{5,6}$ = 2.4 Hz, 5-H), 2.18–2.22 (m, 1H, 3-H), 2.29 (pd, 1H, $J_{9,11}$ = 9.1 Hz, 9-H), 2.35 (pd, 1H, $J_{11,11}$ = 17.8 Hz, 11-H), 2.95 (dd, 1H, $J_{11,9}$ = 9.5 Hz, $J_{11,11}$ = 17.8 Hz, 11-H), 3.46 (d, 1H, $J_{13,13}$ = 11.4 Hz, 13-H), 4.43 (bs, 1H, OH), 5.73 (dd, 1H, $J_{7,5}$ = 3.0 Hz, $J_{7,6}$ = 10.4 Hz, 7-H), 6.65 (dd, 1H, $J_{6,5}$ = 1.7 Hz, $J_{6,7}$ = 10.4 Hz, 6-H), 10.00–11.50 (bs, 1H, OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3): δ = 12.1 (q, C-16), 19.2 (t, C-2), 28.0 (q, C-14), 31.7 (t, C-11), 36.5 (s, C-10), 37.5 (t, C-3), 37.7 (t, C-1), 42.9 (s, C-4), 49.7 (d, C-9), 51.7 (d, C-5), 69.0 (t, C-13), 84.2 (s, C-8), 122.7 (d, C-7), 134.4 (d, C-6), 176.4 (s, C-12), 177.9 (s, C-15).–

6.3.1.6. 9-Hydroxy-12-oxo-(8)-13-oxa-podocarpin-16-säure (6)



Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_5$.–

Molmasse: 294.–

Schmelzpunkt: 226 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -22.5^\circ$ ($c = 0.08$; MeOH)

R_f -Wert: 0.27 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %).–

UV (CH_3OH): λ_{max} [nm] (ϵ): 272.0 (13674).–

IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3502, 3152, 1728, 1701$.–

MS (DCI/ NH_3 (pos.)) m/z (%): 312 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (50), 294 $[\text{M}]^+$ (25).–

MS (DCI/ NH_3 (neg.)) m/z (%): 293 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (60), 292 (100).–

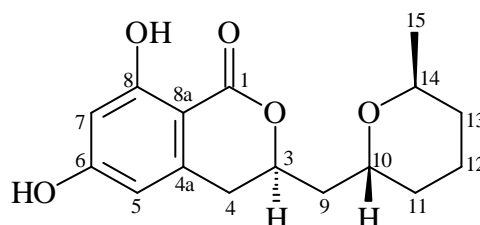
HRMS (DCI/ NH_3 (neg.)): theor.: 293.13890 $[\text{M}-\text{H}]^-$

exper.: 293.13826 ± 2.1 ppm, Res.: 3000 (10 % Tal-Def)

^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.84$ (s, 3H, 16-H), 1.01–1.20 (m, 1H, 3-H), 1.28 (s, 3H, 14-H), 1.33–1.44 (m, 1H, 1-H), 1.55–1.63 (m, 1H, 2-H), 1.80–1.97 (m, 1H, 1-H), 1.87–2.04 (m, 1H, 2-H), 2.13 (dd, 1H, $J_{5,6} = 5.9$ Hz, $J_{5,6} = 11.3$ Hz, 5-H), 2.14–2.24 (m, 1H, 3-H), 2.33–2.49 (m, 1H, 6-H), 2.64 (d, 1H, $J_{11,11} = 15.2$ Hz, 11-H), 2.80 (d, 1H, $J_{11,11} = 15.2$ Hz, 11-H), 2.88–2.96 (m, 1H, 6-H), 4.79 (m, 1H, $J_{13,13} = 12.6$ Hz, 13-H), 4.90 (m, 1H, $J_{13,13} = 12.6$ Hz, 13-H), 5.89 (m, 1H, 7-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 15.1$ (q, C-16), 19.4 (t, C-2), 24.6 (t, C-6), 28.2 (q, C-14), 30.1 (t, C-1), 37.3 (t, C-11), 38.3 (t, C-3), 40.3 (s, C-10), 43.2 (d, C-5), 43.9 (s, C-4), 69.8 (t, C-13), 72.9 (s, C-9), 126.2 (d, C-7), 130.9 (s, C-8), 174.7 (s, C-12), 180.2 (s, C-15).–

6.3.1.7. 3,4-Dihydro-6,8-dihydroxy-3-(6-methyl-2-tetrahydropyranylmethyl)-isocumarin (**7**)



Summenformel: $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{O}_5$.–

Molmasse: 292.–

Schmelzpunkt: 187–188 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -22.8^\circ$ ($c = 0.18$, EtOH).–

R_f -Wert: 0.35 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 2 %).–

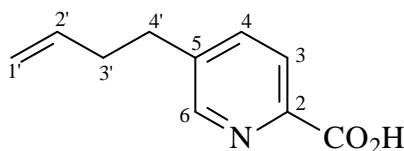
IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3410, 1734, 1648, 1637$.–

^1H -NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.22$ (d, 3H, $J_{15,14} = 6.5$ Hz, 15-H), 1.33 (m, 1H, 11-H), 1.35 (m, 1H, 13-H), 1.67 (m, 2H, 12-H), 1.67 (m, 1H, 11-H), 1.67 (m, 1H, 13-H), 1.85 (dd, 1H, $J_{9,10} = 2.8$ Hz, $J_{9,3} = 9.0$ Hz, 9-H), 1.95 (dd, 1H, $J_{9,10} = 3.9$ Hz, $J_{9,3} = 10.1$ Hz, 9-H), 2.81 (m, 2H, 4-H), 3.99 (m, 1H, 14-H), 4.12 (m, 1H, 10-H), 4.7 (m, 1H, 3-H), 6.17 (d, 1H, $J_{5,7} = 1.9$ Hz, 5-H), 6.30 (d, 1H, $J_{7,5} = 1.9$ Hz, 7-H), 11.07 (s, OH).–

^{13}C -NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 18.42$ (t, C-12), 19.31 (q, C-15), 30.62 (t, C-11), 30.72 (t, C-13), 33.42 (t, C-4), 39.04 (t, C-9), 66.29 (d, C-10), 68.09 (d, C-14), 76.08 (d, C-3), 101.18 (s, C-8a), 101.73 (d, C-7), 106.62 (d, C-5), 141.47 (s, C-4a), 163.20 (s, C-6), 164.07 (s, C-8), 169.74 (s, C-1).–

6.3.2. Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 8 und 9.

6.3.2.1. 5-Butyl-3-enylpicolinsäure (8) (Dehydrofusarinsäure)



Summenformel: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_2$.–

Molmasse: 177.–

Schmelzpunkt: 118–120 °C.–

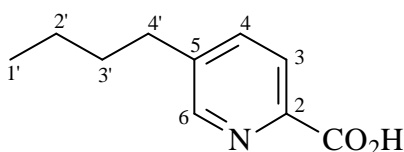
R_F-Wert: 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 10 %).–

MS (200 °C) m/z (%): 177 [M]⁺ (5), 136 (45), 135 (100), 92 (30), 91 (28).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.35 (m, 2H, 2'-H), 2.75 (t, 2H, J_{1',2'} = 7.4 Hz, 1'-H), 4.97 (m, 2H, 4'-H), 5.79 (m, 1H, 4'-H), 7.80 (m, 1H, 4-H), 7.94 (d, 1H, J_{3,4} = 7.5 Hz, 3-H), 8.53 (s, 1H, 6-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 35.02 (t, C-2'), 32.10 (t, C-1'), 116.70 (t, C-4'), 125.30 (d, C-3), 138.08 (d, C-4), 138.18 (d, C-3'), 141.62 (s, C-5), 146.07 (s, C-2), 149.46 (d, C-6), 166.03 (s, CO₂H).–

6.3.2.2. 5-Butylpicolinsäure (**9**) (Fusarinsäure)



Summenformel: C₁₀H₁₃NO₂.–

Molmasse: 179.–

Schmelzpunkt: 82–84 °C.–

R_F-Wert: 0.35 (CH₂Cl₂/MeOH 10 %).–

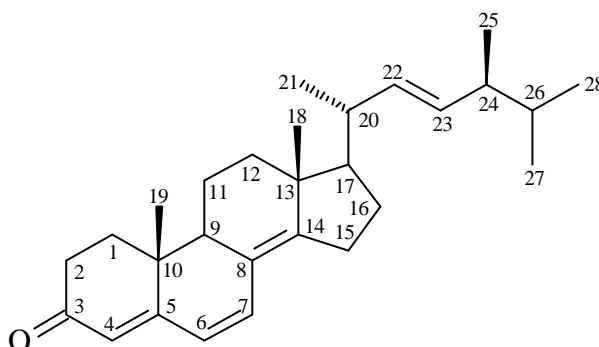
MS (200 °C) m/z (%): 179 [M]⁺ (5), 135 (100), 133 (35), 92 (30), 91 (28).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.86 (t, 3H, J_{4',3'} = 7.2 Hz, 4'-H), 1.26 (m, 2H, 2'-H), 1.55 (m, 2H, 2'-H), 2.64 (t, 2H, J_{1',2'} = 7.5 Hz, 1'-H), 7.80 (m, 1H, 4-H), 7.94 (d, 1H, J_{3,4} = 7.5 Hz, 3-H), 8.53 (s, 1H, 6-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 14.55 (q, C-4'), 22.53 (t, C-3'), 33.35 (t, C-2'), 32.56 (t, C-1'), 125.22 (t, C-3), 137.92 (t, C-4), 140.76 (s, C-5), 145.96 (s, C-2), 149.31 (d, C-6), 166.03 (s, CO_2H).–

6.3.3. Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 10, 11 und 12

6.3.3.1. Ergosta- 4, 6, 8 (14), 22-tetraen-3-on (10)



Summenformel: $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}$.–

Molmasse: 392.–

Schmelzpunkt: 85–87 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +537^\circ$ ($c = 0.67$; CH_2Cl_2)

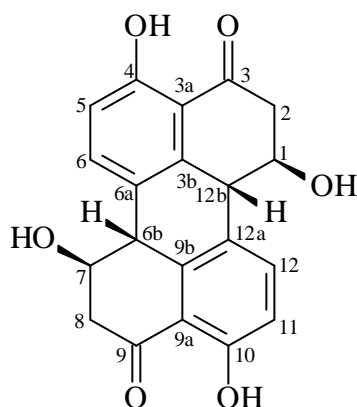
R_f -Wert: 0.48 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 %).–

^1H -NMR (600 MHz, CDCl_3): δ = 0.83 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 28-H), 0.85 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz, 27-H), 0.93 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 25-H), 0.96 (s, 3H, 18-H), 1.00 (s, 3H, 19-H), 1.06 (d, 3H, $J = 6.7$ Hz, 21-H), 1.26 (m, 1H, 17-H), 1.31 (m, 1H, 16-H), 1.49 (m, 1H, 26-H), 1.55 (m, 1H, 15-H), 1.60 (m, 1H, 1-H), 1.70 (m, 1H, 1-H), 1.80 (m, 1H, 12-H), 1.83 (m, 1H, 15-H), 1.87 (m, 1H, 24-H), 2.01 (m, 1H, 12-H), 2.08 (m, 1H, 16-H), 2.14 (m, 1H, 9-H), 2.15 (m, 1H, 20-H), 2.31 (m, 1H, 12-H), 2.31 (m, 1H, 11-H), 2.46 (m, 1H, 11-H), 2.50 (m, 2H, 2-H), 5.24

(m, 1H, 22-H), 5.24 (m, 1H, 23-H), 5.74 (s, 1H, 4-H), 6.03 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, 6-H), 6.61 (d, 1H, $J = 9.5$ Hz, 7-H).–

^{13}C -NMR (150 MHz, CDCl_3): $\delta = 16.68$ (q, C-19), 17.67 (q, C-25), 18.99 (q, C-18), 19.01 (t, C-1), 19.69 (q, C-28), 20.01 (q, C-27), 21.25 (q, C-21), 25.79 (t, C-11), 27.74 (t, C-16), 33.12 (d, C-26), 34.13 (t, C-2), 34.16 (t, C-12), 35.62 (t, C-15), 36.80 (s, C-10), 39.31 (d, C-20), 42.91 (d, C-24), 44.03 (s, C-13), 44.36 (d, C-9), 55.74 (d, C-17), 123.00 (d, C-4), 124.49 (d, C-6), 124.49 (s, C-8), 132.58 (d, C-22), 134.11 (d, C-7), 135.04 (d, C-23), 156.18 (s, C-14), 164.54 (s, C-5), 199.65 (s, C-3).–

6.3.3.2. 1,2,6b,7,8,12b-Hexahydro-1,4,7,10,-tetrahydroxy-3,9-perylendion (**11**) (Stemphyperyleneol)



Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$.–

Molmasse: 352.–

Schmelzpunkt: 250 °C (Zers.).–

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 378^\circ$ ($c = 0.20$; MeOH).–

R_f -Wert: 0.32 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %).–

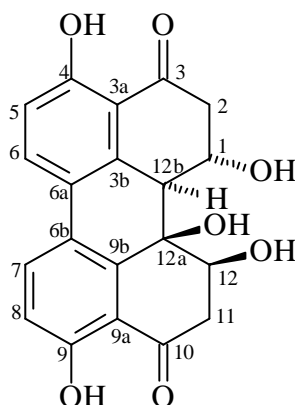
IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3410, 1647, 1467, 1228, 1066$.–

MS (200 °C) m/z (%): 353 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (8), 352 $[\text{M}]^+$ (10), 308 (72), 280 (62), 262 (82), 152 (100).–

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): δ = 3.03 (dd, 2H, J = 5.8 Hz, J = 14.5 Hz, H- 2a, 8a-H), 3.15 (dd, 2H, J = 11.9 Hz, J = 14.5 Hz, 2b-H, H- 8b), 3.75 (d, 2H, J = 9.0 Hz, 6b-H, 12b-H), 4.75 (m, 2H, 1-H, 7-H), 5.04 (d, J = 5.4 Hz, 1H, OH), 6.81 (d, 2H, J = 8.8 Hz, 5-H, 11-H), 8.14 (d, 2H, J = 8.8 Hz, 6-H, 12-H), 12.10 (s, 2H, OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, Aceton- d_6): δ = 45.42 (d, C-6b, C-12b), 47.29 (t, C-2, C-8), 67.81 (d, C-1, C-7), 115.08 (d, C-5, C-11), 115.39 (s, C-3a, C-9a), 130.38 (s, C-6a, C-12a), 135.16 (d, C-6, C-12), 143.21 (s, C-3b, C-9b), 160.52 (s, C-4, C-10), 203.60 (s, C-3, C-9).–

6.3.3.3. (1S*,12S*,12aR*,12bS*)-1,4,9,12,12a-Pentahydroxy-3,10-dioxo-1,2,3,10,11,12,12a,12b-octahydroperylene (**12**)



Summenformel: $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_7$.–

Molmasse: 368.–

Schmelzpunkt: 180-182 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 451^\circ$ ($c = 0.07$; MeOH).–

R_f -Wert: 0.25 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 4 %).–

UV (CH_3OH): λ_{max} [nm] (ϵ): 254 (24513), 285.5 (11817), 353.5 (4162).–

IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3473, 3418, 3238, 1651, 1645, 1352, 1223$.–

CD ($c = 3.94 \cdot 10^{-4}$ g/ml in MeOH) [nm] ($\Delta\epsilon$): 390 (+ 2.8), 347 (+ 3.7), 294 (+ 5.8).–

MS (200 °C) m/z (%): 369 $[M+H]^+$ (100), 368 $[M]^+$ (70), 307 (60), 306 (80).–

HREIMS: theor.: 368.090

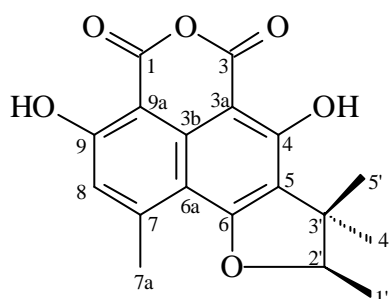
exper.: 368.089 ± 3 ppm Res.: 10.000 (10 % Tal-Def)

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Aceton- d_6): δ = 2.82 (dd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J = 16.3$ Hz, 11-H), 2.99 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, 2-H), 3.01 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz, 2-H), 3.15 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz, 12b-H), 3.17 (dd, 1H, $J = 12.5$ Hz, $J = 16.3$ Hz, 11-H), 4.67 (dd, 1H, $J = 4.5$ Hz, $J = 12.5$ Hz, 12-H), 4.75 (m, 1H, 1-H), 6.13 (s, 2H, OH), 6.95 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 5-H), 7.06 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 8-H), 7.95 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 6-H), 8.01 (d, 1H, $J = 8.7$ Hz, 7-H), 12.35 (s, 1H, OH), 12.58 (s, 1H, OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, Aceton- d_6): δ = 42.97 (t, C-11), 46.73 (t, C-2), 54.48 (d, C-12b), 66.06 (d, C-1), 70.74 (d, C-12), 71.75 (s, C-12a), 114.96 (s, 9a), 116.80 (d, C-5), 117.63 (s, C-3a), 119.16 (d, C-8), 126.52 (s, C-6a oder 6b), 126.69 (s, C6a oder C-6b), 133.33 (d, C-6), 134.05 (d, C-7), 138.75 (s, C-3b), 140.10 (s, C-9b), 162.00 (s, C-4 oder C-9) 162.08 (s, C-4 oder C-9), 204.03 (s, C-3 oder C-10), 204.32 (s, C-3 oder C-10).–

6.3.4. Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 13, 14, 15 und 16

6.3.4.1. 2,3-Dihydro-4,7-dihydroxy-2,3,3,9-tetramethylnaphtho-[1,2-b]furan-5,6-dicarbonsäureanhydrid (**13**)



Schmelzpunkt: 256 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = +75.1^\circ$ ($c = 1.36$; CHCl_3)

R_f -Wert: 0.60 (CH_2Cl_2).–

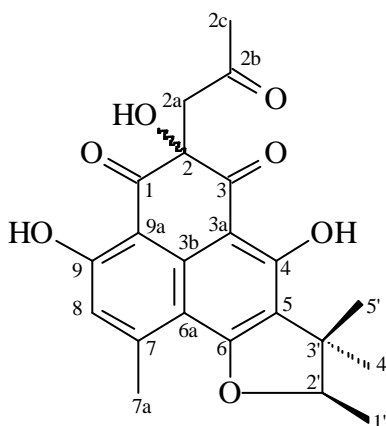
IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3436, 1709, 1623, 1459, 1302, 1035$.–

MS (200 °C) m/z (%): 328 $[\text{M}]^+$ (37), 312 (100), 295 (29), 269 (58), 257 (30).–

^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.34$ (s, 3H, 4'-H), 1.53 (d, 3H, $J_{1',2'} = 6.6$ Hz, 1'-H), 1.59 (s, 3H, 5'-H), 2.83 (s, 3H, 7a-H), 4.75 (q, 1H, $J_{2',1'} = 6.6$ Hz, 2'-H), 6.82 (s, 1H, 8-H), 11.38 (s, 1H, OH), 11.62 (s, 1H, OH).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.92$ (q, C-1'), 21.10 (q, C-5'), 24.14 (q, C-7a), 25.89 (q, C-4'), 43.83 (s, C-3'), 92.48 (d, C-2'), 93.74 (s, C-3a), 97.49 (s, C-9a), 108.83 (s, C-6a), 117.60 (d, C-8), 119.50 (s, C-5), 135.61 (s, C-3b), 150.29 (s, C-7), 164.59 (s, C-4), 165.16 (s, C-3), 165.72 (s, C-1), 166.24 (s, C-9), 166.58 (s, C-6).–

6.3.4.2. 8,9-Dihydro-3,5,7-trihydroxy-1,8,8,9-tetramethyl-5-(1-propyl-2-on)-4*H*-phenaleno-[1,2-*b*]furan-4,6-dion (**14**)



Summenformel: $C_{22}H_{22}O_7$.–

Molmasse: 398.–

Schmelzpunkt: 231 °C.–

R_f -Wert: 0.91 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 4 %).–

UV (CH_3OH): λ_{max} [nm] (ϵ): 344.5 (41234), 267.5 (29328), 239 (16634).–

IR (KBr): $\nu [cm^{-1}]$ = 3407, 1711, 1645, 1632, 1382.–

MS (200 °C) m/z (%): 398 $[M]^+$ (13), 355 (25), 327 (55), 313 (100), 297 (75), 269 (35).–

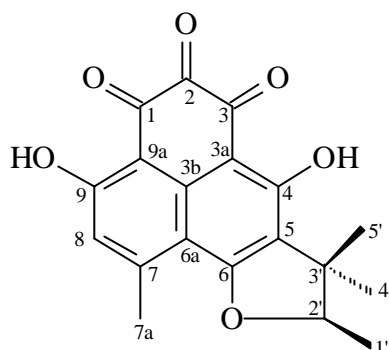
HREIMS: theor.: 398.135979

exper.: 398.136553 \pm 3 ppm Res.: 5000

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.30 (s, 3H, 4'-H), 1.33 (s, 3H, 4'-H), 1.49 (d, 3H, $J_{1',2'} = 6.6$ Hz, 1'-H), 1.50 (d, 3H, $J_{1',2'} = 6.6$ Hz, 1'-H), 1.54 (s, 3H, 5'-H), 1.55 (s, 3H, 5'-H), 2.22 (s, 6H, 2c-H), 2.75 (s, 6H, 7a-H), 3.31 (s, 2H, 2a-H), 3.36 (s, 2H, 2a-H), 3.68 (bs, 2H, OH), 4.66 (q, 2H, $J_{2',1'} = 6.6$ Hz, 2'-H), 6.76 (s, 2H, 8-H), 12.84 (d, 2H, OH), 13.36 (d, 2H, OH).–

^{13}C -NMR (50 MHz, $CDCl_3$): δ = 14.86 (q, C-1'), 15.03 (q, C-1'), 21.00 (q, C-4'), 24.63 (q, C-7a), 25.88 (q, C-5'), 26.11 (q, C-5'), 31.13 (q, C-2c), 31.27 (q, C-2c), 43.67 (s, C-3'), 43.70 (s, C-3'), 51.96 (t, C-2a), 52.29 (t, C-2a), 77.67 (s, C-2), 91.97 (d, C-2'), 103.08 (s, C-3a), 105.98 (s, C-9a), 110.08 (s, C-6a), 118.25 (d, C-8), 118.75 (s, C-5), 118.88 (s, C-5), 137.85 (s, C-3b), 149.48 (s, C-7), 149.54 (s, C-7), 165.77 (s, C-4), 165.82 (s, C-4), 166.33 (s, C-9), 166.41 (s, C-9), 166.53 (s, C-6), 166.57 (s, C-6), 197.52 (s, C-3), 197.57 (s, C-3), 199.78 (s, C-1), 206.45 (s, C-2b), 206.76 (s, C-2b).–

6.3.4.3. 8,9-Dihydro-3,7-dihydroxy-1,8,8,9-tetramethyl-4*H*-phenaleno-[1,2-*b*]furan-4,5,6-trion (**15**)



Summenformel: $C_{19}H_{16}O_6$.–

Molmasse: 340.–

Schmelzpunkt: 217 °C.–

R_f -Wert: 0.79 ($CH_2Cl_2/MeOH$ 4 %).–

IR (KBr): $\nu[cm^{-1}] = 3421, 1641, 1610, 1447, 1593$.–

UV (CH_3OH): $\lambda_{max}[nm]$ (ϵ): 340.5 (4110), 269.0 (27050), 239.0 (13543).–

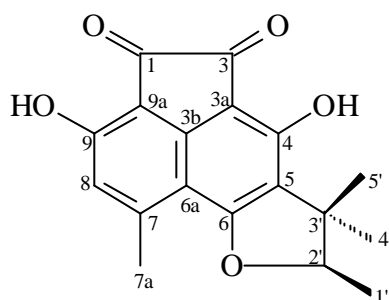
MS (200 °C) m/z (%): 340 $[M]^+$ (30), 327 (35), 312 (27), 297 (100), 269 (40).–

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 1.31$ (s, 3H, 4'-H), 1.32 (s, 3H, 4'-H), 1.48 (d, 3H, $J_{1',2'} = 6.5$ Hz, 1'-H), 1.50 (d, 3H, $J_{1',2'} = 5.5$ Hz, 1'-H), 1.55 (s, 3H, 5'-H), 2.74 (s, 3H, 7a-H), 2.77 (s, 3H, 7a-H), 4.68 (pt, 1H, $J_{2',1'} = 6.5$ Hz, 2'-H), 4.77 (pt, 1H, $J_{2',1'} = 6.6$ Hz, 2'-H), 6.64 (s, 1H, 8-H), 6.71 (s, 1H, 8-H), 12.71 (s, 1H, OH), 12.93 (s, 1H, OH), 1.20 (s, 1H, OH), 13.82 (s, 1H, OH).–

^{13}C -NMR (50 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 14.90$ (q, C-1'), 20.98 (q, C-4'), 24.69 (q, C-7a), 24.97 (q, C-7a), 25.67 (q, C-5'), 25.91 (q, C-5'), 43.60 (s, C-3'), 43.66 (s, C-3'), 86.95 (s, C-2), 92.25 (d, C-2'), 92.91 (d, C-2'), 102.28 (s, C-3a), 105.05 (s, C-3a), 108.21 (s, C-9a), 109.84 (s,

C-9a), 110.34 (s, C-6a), 110.96 (s, C-6a), 118.47 (d, C-8), 119.01 (d, C-8), 119.12 (s, C-5), 119.50 (s, C-5), 138.34 (s, C-3b), 138.68 (s, C-3b), 150.40 (s, C-7), 152.10 (s, C-7), 166.76 (s, C-4), 167.29 (s, C-6), 168.27 (s, C-9), 168.78 (s, C-9), 177.02 (s, C-2), 179.28 (s, C-3), 179.52 (s, C-1), 193.76 (s, C-3), 196.00 (s, C-1).–

6.3.4.4. 7,8-Dihydro-3,6-dihydroxy-1,7,7,8-tetramethylenacenaphthol[5,4-*b*]furan-4,5-dion (**16**)



Summenformel: C₁₈H₁₆O₅.–

Molmasse: 312.–

Schmelzpunkt: 202 °C.–

R_f-Wert: 0.79 (CH₂Cl₂/MeOH 4 %).–

[α]_D²⁰ = – 101.1 ° (c = 0.11; CHCl₃)

IR (KBr): ν[cm^{–1}] = 3432, 1685, 1634, 1617, 1364.–

MS (200 °C) m/z (%): 312 [M]⁺ (28), 297 (75), 285 (20), 269 (100), 241 (20), 213 (32).–

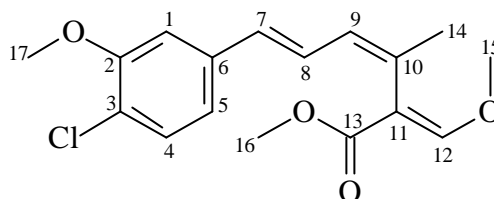
¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.31 (s, 3H, 4'-H), 1.50 (d, 3H, J_{1',2'} = 6.7 Hz, 1'-H), 1.55 (s, 3H, 5'-H), 2.76 (s, 3H, 7a-H), 4.70 (q, 1H, J_{2',1'} = 6.3 Hz, 2'-H), 6.67 (s, 1H, 8-H), 7.63 (s, 1H, OH), 7.89 (s, 1H, OH).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 14.89 (q, C-1'), 21.43 (q, C-4'), 22.42 (q, C-7a), 26.08 (q, C-5'), 43.69 (s, C-3'), 92.35 (d, C-2'), 106.49 (s, C-3a), 107.44 (s, C-9a), 109.57 (s, C-6a),

117.85 (d, C-8), 119.96 (s, C-5), 146.81 (s, C-7), 151.56 (s, C-3b), 154.72 (s, C-9), 155.28 (s, C-4), 164.78 (s, C-6), 186.53 (s, C-3), 190.06 (s, C-1).–

6.3.5. Strukturdaten und Substanzcharakteristika der Naturstoffe 17, 18 und 19

6.3.5.1. 3'-Methoxy-4'-chloromucidin (Strobilurin B) (17)



Summenformel: C₁₇H₁₉ClO₄.–

Molmasse: 322.–

R_F-Wert: 0.82 (CH₂Cl₂/MeOH 1 %).–

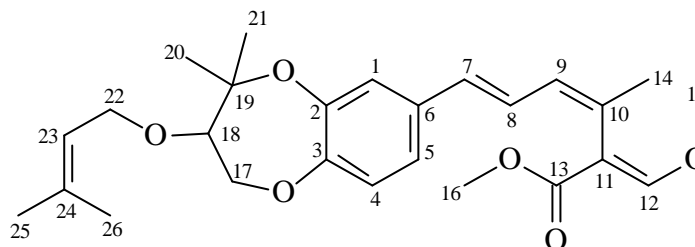
IR (KBr): ν[cm⁻¹] = 1705, 1622, 1235, 1121.–

MS (200 °C) m/z (%): 322 [M]⁺ (100), 290 (36), 263 (50), 231 (35), 206 (35), 185 (80).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 2.01 (s, 3H, 14-H), 3.76 (s, 3H, 16-H), 3.87 (s, 3H, 15-H), 3.92 (s, 3H, 17-H), 6.27 (dd, 1H, J_{9,14} = 1.3 Hz, J_{8,9} = 10.3 Hz, 9-H), 6.44 (d, 1H, J_{7,8} = 15.5 Hz, 7-H), 6.61 (dd, 1H, J_{8,7} = 15.5 Hz, J_{8,9} = 10.3 Hz, 8-H), 6.87 (d, 1H, J_{1,5} = 1.7 Hz, 1-H), 6.92 (dd, 1H, J_{5,1} = 7.1 Hz, J_{5,4} = 8.2 Hz, 5-H), 7.27 (d, 1H, J_{4,5} = 8.2 Hz, 4-H), 7.46 (s, 1H, 12-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 24.17 (q, C-14), 52.03 (q, C-16), 56.49 (q, C-17), 62.38 (q, C-15), 110.46 (d, C-1), 111.06 (s, C-11), 119.49 (d, C-5), 121.48 (s, C-3), 127.66 (d, C-8), 129.93 (s, C-9), 130.49 (d, C-4), 130.68 (d, C-7), 132.61 (s, C-10), 138.30 (s, C-6), 155.34 (s, C-2), 159.36 (d, C-12), 168.14 (s, C-13).–

6.3.5.2. [2(*E*),3*Z*,5*E*]-6-[3,4-Dihydro-4,4-dimethyl-3-[(3-methyl-2-butenyl)oxy]-2*H*-1,5-benzodioxepin-7-yl]-2-(methoxymethylen)-3-methyl-3,5-hexadiensäure-methylester (**18**)



Summenformel: C₂₆H₃₄O₆.–

Molmasse: 442.–

R_f-Wert: 0.62 (CH₂Cl₂/MeOH 2 %).–

IR (KBr): ν[cm⁻¹] = 1708, 1500, 1266, 1118.–

Drehwert: [α]_D²⁰ = + 21.0 ° (c = 0.64, EtOH)

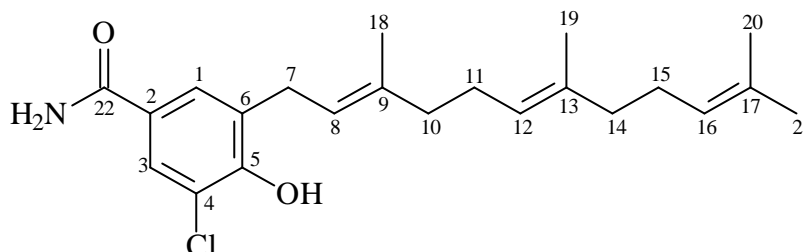
MS (200 °C) m/z (%): 442 [M]⁺ (20), 305 (40), 237 (60), 153 (100).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1.25 (s, 3H, 20-H), 1.50 (s, 3H, 21-H), 1.72 (s, 3H, 26-H), 1.79 (s, 3H, 25-H), 1.99 (s, 3H, 14-H), 3.53 (dd, 1H, *J*_{17,18} = 3.3 Hz, *J*_{17,18} = 7.7 Hz, 18-H), 3.77 (s, 3H, 16-H), 3.87 (s, 3H, 15-H), 3.98 (m, 1H, 17-H), 4.10 (m, 1H, 22-H), 4.15 (m, 1H, 22-H), 4.26 (m, 1H, 17-H), 5.36 (m, 1H, 23-H), 6.24 (dd, 1H, *J*_{9,14} = 1.3 Hz, *J*_{9,8} = 10.0 Hz, 9-H), 6.38 (d, 1H, *J*_{7,8} = 15.3 Hz, 7-H), 6.52 (dd, 1H, *J*_{8,9} = 10.0 Hz, *J*_{8,7} = 15.3 Hz, 8-H), 6.87 (d, 1H, *J*_{4,5} = 8.8 Hz, 4-H), 6.94 (d, 1H, *J*_{1,5} = 2.0 Hz, 1-H), 6.97 (d, 1H, *J*_{5,4} = 8.8 Hz, *J*_{5,1} = 2.0 Hz, 5-H), 7.45 (s, 1H, 12-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 18.51 (q, C-26), 21.21 (q, C-20), 24.09 (q, C-14), 26.24 (q, C-25), 28.13 (q, C-21), 52.04 (q, C-16), 62.35 (q, C-15), 67.77 (t, C-22), 69.13 (t, C-17), 81.01 (s, C-19), 82.37 (d, C-18), 111.23 (s, C-11), 121.02 (d, C-4), 121.31 (d, C-23), 121.96 (d, C-5), 122.79 (d, C-1), 126.07 (d, C-8), 130.20 (d, C-9), 130.75 (d, C-7), 131.19 (s, C-10),

134.12 (s, C-6), 137.82 (s, C-24), 147.24 (s, C-2), 151.18 (s, C-3) 159.24 (d, C-12), 168.23 (s, C-13).–

6.3.5.3. 3-Chlor-4-hydroxy-(3,7,11-trimethyl-2,6,10-dodecatrienyl)-benzoesäureamid (**19**)



Summenformel: $C_{22}H_{30}ClNO_2$.–

Molmasse: 375.–

Schmelzpunkt: 47–49 °C.–

R_f -Wert: 0.31–0.42 (CH_2Cl_2 /MeOH 3 %).–

UV (CH_2Cl_2): λ_{max} [nm] (ϵ): 429 (599), 274.5 (45270), 257.5 (7786), 233.5 (5847).–

IR (KBr): $\nu[cm^{-1}]$ = 3458, 3378, 3197, 1654, 1388.–

MS (200 °C) m/z (%): 377 [M (^{37}Cl)]⁺ (4), 375 [M (^{35}Cl)]⁺ (12), 239 (41), 222 (20), 191 (40), 184 (30), 136 (46), 81 (32), 69 (100), 41 (45).–

HREIMS: theor.: 375.1965

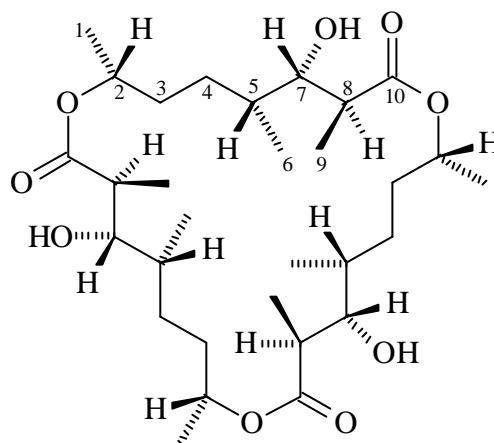
exper.: 375.1974 \pm 5 ppm Res.: 8.000 (10 % Tal-Def)

1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$): δ = 1.62 (s, 6H, 19-H, 20-H), 1.70 (s, 3H, 21-H), 1.77 (s, 3H, 18-H), 1.94–2.12 (m, 8H, 10-H, 11-H, 14-H, 15-H), 3.44 (d, 2H, $J_{7,8}$ = 7.2 Hz, 7-H), 5.11 (m, 1H, 12-H), 5.13 (m, 1H, 16-H), 5.35 (t, 1H, $J_{8,7}$ = 7.2 Hz, 8-H), 6.00 (bs, 2H, NH_2), 6.12 (bs, 1H, OH), 7.53 (d, 1H, $J_{1,3}$ = 1.8 Hz, 1-H), 7.74 (d, 1H, $J_{3,1}$ = 2.0 Hz, 3-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 16.47 (q, C-19), 16.71 (q, C-18), 18.13 (q, C-20), 26.14 (q, C-21), 26.92 (t, C-11), 27.11 (t, C-15), 29.41 (t, C-7), 40.12 (t, C-10), 40.12 (t, C-14), 120.53 (s, C-4), 121.00 (d, C-8), 124.27 (d, C-12), 124.74 (d, C-16), 126.30 (s, C-2), 126.81 (d, C-3), 128.12 (d, C-1), 129.86 (s, C-6), 131.76 (s, C-17), 135.75 (s, C-13), 138.55 (s, C-9), 153.01 (s, C-5), 168.57 (s, CONH_2).–

6.3.6. Strukturdaten und Substanzcharakteristika des Naturstoffs 20 und dessen Triacetats

6.3.6.1. 3,7-Dihydroxy-2,4,-dimethyloctansäure-7,7',7''-trilactid (20)



Summenformel: $\text{C}_{30}\text{H}_{54}\text{O}_9$.–

Molmasse: 558.–

Schmelzpunkt: 108–110 °C.–

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.5^\circ$ ($c = 0.6$; CH_2Cl_2).–

IR (KBr): $\nu[\text{cm}^{-1}] = 3435, 1728, 1458, 1375, 1182, 1124$.–

MS (200 °C) m/z (%): 558 $[\text{M}]^+$ (1.5), 540 (2), 530 (2.5), 355 (5), 270 (18), 187 (92), 169 (100), 113 (88), 95 (22).–

MS (CI/NH₃ (pos.)) m/z (%): 576 [M+NH₄]⁺ (100), 558 [M]⁺ (10).–

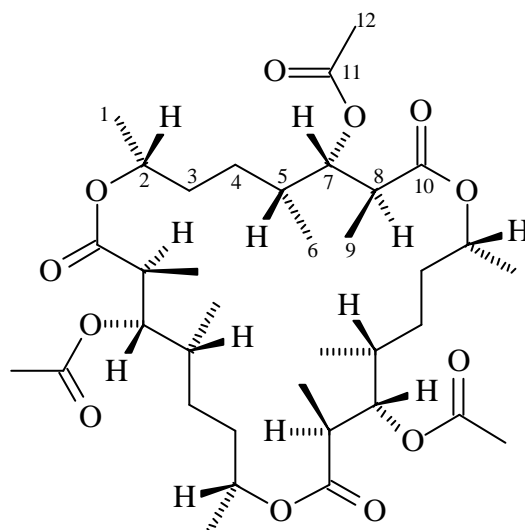
HRMS (DCI/NH₃ (neg.)): theor.: 557.37679 [M–H][–]

exper.: 557.36562 ± 3.3 ppm Res.: 3000 (10 % Tal-Def)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.87 (d, 3H, *J*_{6,5} = 6.5 Hz, 6-H), 1.09 (d, 3H, *J*_{9,8} = 7.0 Hz, 9-H), 1.26 (d, 3H, *J*_{1,2} = 6.3 Hz, 1-H), 1.35–1.50 (m, 2H, 4-H), 1.47–1.68 (m, 2H, 3-H), 1.54 (m, 1H, 5-H), 2.56 (m, 1H, 8-H), 3.61 (dd, 1H, *J*_{7,5} = 2.4 Hz, *J*_{7,8} = 8.8 Hz, 7-H), 5.06 (m, 1H, 2-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 12.04 (q, C-6), 14.44 (q, C-9), 20.62 (q, C-1), 29.12 (t, C-4), 34.07 (t, C-3), 34.71 (d, C-5), 44.16 (d, C-8), 71.11 (d, C-2), 77.05 (d, C-7), 177.05 (s, C-10).–

6.3.6.2. 3-Acetoxy-7-hydroxy-2,4,-dimethyloctansäure-7,7',7''-trilactid



Der Macrolid **20** (2 mg, 3.6 µmol) wird in Essigsäureanhydrid (0.1 ml) mit Pyridin (0.03 ml) und DMAP (1 mg) versetzt. Nach zweistündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz in Dichlormethan aufgenommen und siebenmal mit 2 molarer Salzsäure gewaschen. Anschließend wird die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel mit einer Heißluftpistole (Stufe 1) abgedampft. Das so erhaltene gelbgefärbte Öl wird nochmals unter Hochvakuum getrocknet und ohne weitere Reinigung vermessen (Ausbeute: ca. 2.2 mg, 90 %)

R_f-Wert: 0.8 (CH₂Cl₂/MeOH 2 %).–

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 1742, 1726, 1273, 1183, 1027.–

MS (DCI/NH₃ (neg.)) m/z (%): 683 [M–H]⁻.–

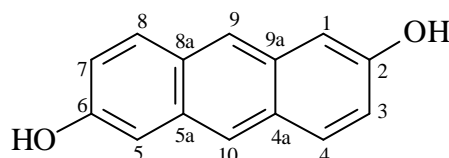
HRMS (DCI/NH₃ (neg.)): theor.: 663.39651 [M–H]⁻.–

exper.: 663.40063 ± 4.1 ppm Res.: 3000 (10 % Tal-Def)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 0.90 (d, 3H, $J_{6,5}$ = 6.8 Hz, 6-H), 1.18 (d, 3H, $J_{1,2}$ = 6.5 Hz, 1-H), 1.20 (d, 3H, $J_{9,8}$ = 7.1 Hz, 9-H), 1.30–2.00 (m, 5H, 3-H, 4-H, 5-H), 2.11 (s, 3H, 12-H), 2.83 (m, 1H, 8-H), 4.90 (m, 1H, 2-H), 5.15 (dd, 1H, $J_{7,5}$ = 4.0 Hz, $J_{7,8}$ = 8.2 Hz, 7-H).–

6.4. Experimenteller Teil zur Naturstoffsynthese des Stemphypervylenols (11)

6.4.1. 2,6-Dihydroxyanthracen (34)



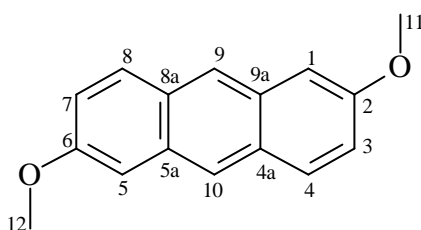
In einem 500 ml Dreihalskolben wird 2,6-Dihydroxyanthrachinon (**33**) (3.0 g, 0.0125 mol) mit Natriumborhydrid (6.0 g, 0.1546 mol) in einer 2N Natriumcarbonatlösung (100 ml) sechs Stunden bei Raumtemperatur unter heftiger Gasentwicklung gerührt. Der Reaktionsansatz verfärbt sich dabei dunkelrot. Nach Beendigung der Gasentwicklung und erfolgter Umsatzkontrolle mittels Dünnschichtchromatographie wird der Ansatz mit 6N Salzsäure (150 ml) angesäuert und der Feststoff abgesaugt. Dieser wird abschließend durch Flash-Chromatographie (LM: CH₂Cl₂/MeOH 3 %) gereinigt. Die Ausbeute an gelbem 2,6-Dihydroxyanthracen **34** beträgt 2.42 g (92 %) (Smp.: 270 °C (Zers.); Lit.^[126]).

R_f-Wert: 0.3 (CH₂Cl₂/MeOH 3 %).–

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): δ = 7.14 (dd, 2H, $J_{3,4(7,8)} = 9.0$ Hz, $J_{3,1(7,5)} = 2.4$ Hz, 3-H, 7-H), 7.24 (d, 2H, $J_{1,3(5,7)} = 2.2$ Hz, 1-H, 5-H), 7.85 (d, 2H, $J_{4,3(8,7)} = 9.0$ Hz, 4-H, 8-H), 8.15 (s, 2H, 9-H, 10-H), 8.62 (s, 2H, 2 OH).–

$^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, Aceton- d_6): δ = 107.44 (d), 120.54 (d), 123.83 (d), 128.91 (s), 129.70 (d), 131.83 (s), 154.19 (s).–

6.4.2. 2,6-Dimethoxyanthracen (**35**)

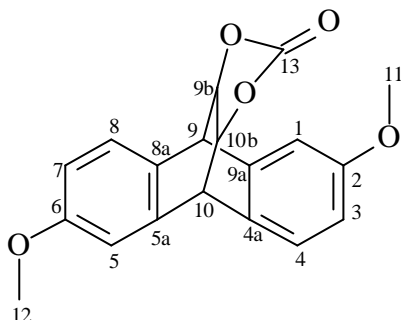


Zu einer Mischung bestehend aus 2,6-Dihydroxyanthracen (**34**) (3.5 g, 0.0147 mol) und Kaliumcarbonat (11.7 g, 0.0847 mol) in 500 ml trockenem Aceton wird unter Rühren Dimethylsulfat (42 ml) getropft. Nach sechsstündigem Refluxieren wird der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt und mittels eines Tropftrichters mit Triethylamin (50 ml) versetzt. Das Aceton und Trimethylamin werden am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand auf Eiswasser (400 ml) gegossen. Der Feststoff wird abgesaugt und in Eisessig (100 ml) umkristallisiert. Man erhält das Dimethoxyanthracen **35** in Form eines hellgelben Feststoffs (Ausbeute: 3.4 g, 86 %) (Smp.: 251 °C, Lit.^[127] 257 °C).

R_f -Wert: 0.8 (CH_2Cl_2).–

MS (200 °C) m/z (%): 238 $[\text{M}]^+$ (53), 223 (10), 208 (50), 195 (48), 165 (8100), 152 (35).–

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, Aceton- d_6): δ = 4.00 (s, 6H, 11-H, 12-H), 7.18 (dd, 2H, $J_{3,4(7,8)} = 8.8$ Hz, $J_{3,1(7,5)} = 2.5$ Hz, 3-H, 7-H), 7.21 (s, 2H, 1-H, 5-H), 7.88 (d, 2H, $J_{4,3(8,7)} = 8.8$ Hz, 4-H, 8-H), 8.24 (s, 2H, 9-H, 10-H).–

6.4.3. 2,6-Dimethoxy-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-carbonat (36)

2,6-Dimethoxyanthracen (**35**) (0.25 g, 1.1 mmol) wird in einem 25 ml Dreihalskolben mit Vinylencarbonat (**45**) zehn Stunden bei 170–180 °C unter Argonatmosphäre refluxiert. Nach Beendigung der Reaktion und anschließender Umsatzkontrolle wird das überschüssige Vinylencarbonat (**45**) abdestilliert und im nächsten Ansatz wiederverwandt. Der verbleibende schwarze Rückstand wird mit Dichlormethan (4 x 25 ml) ausgelaugt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand säulenchromatographisch (LM: CH₂Cl₂) gereinigt. Die Ausbeute an weißem Diels-Alder-Produkt **36** beträgt 0.243 g (71 %).

R_f-Wert: 0.4 (CH₂Cl₂).–

Schmelzpunkt: 150 °C.–

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 1789, 1779, 1619, 1484, 1165, 1020.–

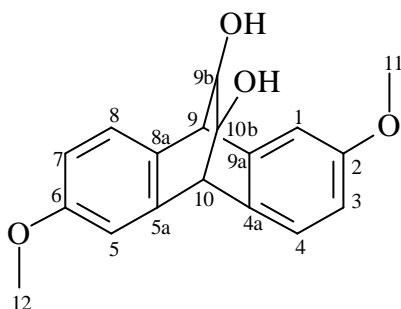
MS (200 °C) m/z (%): 325 [M+H]⁺ (10), 324 [M]⁺ (25), 238 (100), 195 (38).–

HREIMS: theor.: 324.09976
 exper.: 324.10048 ± 2.2 ppm

UV (CH₂Cl₂): λ_{max} [nm] (ϵ): 283.5 (47114), 229.5 (4158).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 3.82 (s, 6H, 11-H, 12-H), 4.61 (d, 2H, $J_{9,9b(10,10b)} = 1.7$ Hz, 9-H, 10-H), 4.89 (pt, 2H, $J_{9b,9(10b,10)} = 1.7$ Hz, 9b-H, 10b-H) 6.74–6.82 (m, 2H, 3-H, 7-H), 6.97 (d, 2H, $J_{1,3(5,7)} = 2.4$ Hz, 1-H, 5-H), 7.30 (d, 2H, $J_{4,3(8,7)} = 8.2$ Hz, 4-H, 8-H).–

6.4.4. 2,6 Dimethoxy-9,10-dihydro-9,10-ethanoanthracen-11,12-diol (37)



MS (200 °C) m/z (%): 298 [M]⁺ (2), 238 (100), 195 (30).—

MS (CI/NH₃ (pos.)) m/z (%): 316 [M+NH₄]⁺ (100), 298 [M]⁺ (25).–

MS (DCI/NH₃ (neg.)) m/z (%): 297 [M–H][–] (70), 268 (100).–

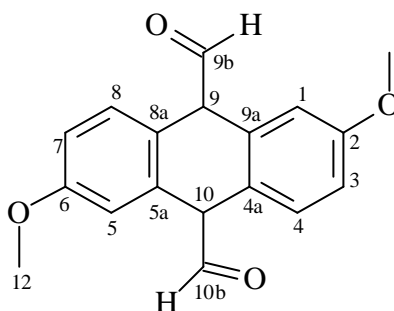
HRMS (DCI/NH₃ (neg.)): theor.: 297.11267 [M–H][–]

exper.: 297.11169 ± 3.3 ppm Res.: 4000 (10 % Tal-Def)

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 3.04 (s, 2H, OH) 3.79 (s, 6H, 11-H, 12-H), 4.10 (s, 2H, 9-H, 10-H), 4.31 (s, 2H, 9b-H, 10b-H) 6.71 (m, 2H, 3-H, 7-H), 6.94 (d, 2H, *J*_{1,3}(5,7) = 2.4 Hz, 1-H, 5-H), 7.26 (d, 2H, *J*_{4,3}(8,7) = 8.5 Hz, 4-H, 8-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 51.14 (q), 51.24 (q), 55.79 (d), 68.48 (d), 68.62 (d), 111.45 (d), 111.60 (d), 111.75 (d), 113.25 (d), 125.94 (d), 127.50 (d), 130.95 (s), 132.43 (s), 141.28 (s), 142.42 (s), 158.91 (s), 158.97 (s).–

6.4.5. 2,6-Dimethoxy-9,10-dihydro-anthracen-9,10-dicarbaldehyd (**38**)



Eine Lösung von Natriumperjodat (1.02 g, 4.7 mmol) in Wasser (3.7 ml) wird zu einer Suspension bestehend aus dem Diol **37** (1.25 g, 4.2 mmol), Wasser (48 ml) und Ethanol (0.75 ml) gegeben. Der Reaktionsansatz wird vier Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wird mit Dichlormethan (100 ml) extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet. Anschließend wird das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen und der verbleibende Feststoff säulenchromatographisch (LM: CH₂Cl₂) gereinigt. Die Ausbeute an Dialdehyd **38** beträgt 0.94 g (93 %).

R_f-Wert: 0.4 (CH₂Cl₂/MeOH 1 %).–

Schmelzpunkt: 173 °C.–

IR (KBr): ν [cm⁻¹] = 1723, 1713, 1610, 1510, 1230, 1031.–

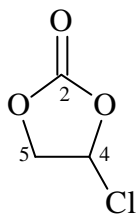
UV (CH₂Cl₂): λ_{max} [nm] (ϵ): 450.0 (2134), 340.0 (7527) 287.5 (44025).–

MS (200 °C) m/z (%): 296 [M]⁺ (1), 267 (15), 239 (100), 238 (60), 195 (30).–

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 3.87 (s, 6H, 11-H, 12-H), 4.86 (d, 2H, $J_{9,9b(10,10b)} = 2.2$ Hz, 9-H, 10-H), 6.97 (m, 2H, 3-H, 7-H), 7.01 (d, 2H, $J_{1,3(5,7)} = 2.4$ Hz, 1-H, 5-H), 7.33 (d, 2H, $J_{4,3(8,7)} = 8.3$ Hz, 4-H, 8-H), 9.39 (d, 2H, $J_{9b,9(10b,10)} = 2.1$ Hz, 9b-H, 10b-H).–

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃): δ = 55.85 (q), 59.75 (d), 114.67 (d), 115.36 (d), 122.33 (s), 131.12 (d), 132.06 (s), 160.18 (s), 196.96 (d).–

6.4.6. 4-Chlorethylencarbonat (**46**)



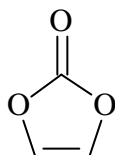
Ethylencarbonat (**47**) (20.0 g, 0.23 mol) und Sulfurylchlorid (30.1 g, 0.23 mol) werden in 125 ml trockenem CCl₄ gelöst und in einem UV-Reaktor unter Bestrahlung mit einer 500 W UV- Lampe auf 80 °C erhitzt. Die Kontrolle der heftig einsetzenden Reaktion erfolgt durch die Regulierung der Intensität der Bestrahlung. Freiwerdendes SO₂- und HCl-Gas wird mittels eines PVC-Schlauches aus der Apparatur direkt in die Entlüftung des Abzuges geleitet. Nach 3 Stunden wird der Reaktionsansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Die untere Phase des Zweiphasengemisches, welche hauptsächlich CCl₄ enthält, wird abgetrennt und im nächsten Ansatz wiederverwandt.

Die obere Phase wird am Rotationsverdampfer eingengt und destillativ (90 °C, 47 mbar) gereinigt. Man erhält 25.8 g eines Gemisches, bestehend aus 75 % 4-Chlorethylencarbonat (**46**) (^1H -NMR-Analyse) und 25 % Ethylencarbonat (**47**), das direkt in der nächsten Stufe eingesetzt wird.

^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 4.54–4.64 (m, 1H, 5-H), 4.81–4.90 (m, 1H, 5-H), 6.48 (dd, 1H, $J_{4,5}$ = 5.5 Hz, $J_{4,5}$ = 1.5 Hz, 4-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 74.50 (t, C-5), 86.09 (d, C-4), 153.17 (s, C-2).–

6.4.7. Vinylencarbonat (**45**)



Zu einem 3:1-Gemisch (25.8 g), bestehend aus Chlorethylencarbonat **46** und Ethylencarbonat **47** wird in 30 ml trockenem Diethylether unter Rückflußbedingungen 4 Stunden Triethylamin (27.2 g, 0.269 mol) getropft. Nach 39-stündigem Refluxieren wird der schwarze Rückstand viermal mit Dichlormethan (4 x 150 ml) ausgelaugt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgezogen und der Rückstand durch zweimalige Kugelrohrdestillation gereinigt. Man erhält des Vinylencarbonat in Form von farblosen Kristallen (15.3 g, ca. 79 %, Sdp. 120 °C, 43 mbar, Schmp. 22 °C, Lit.^[129,130] 22 °C).

^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3): δ = 7.17 (s, 2H, 4-H, 5-H).–

^{13}C -NMR (50 MHz, CDCl_3): δ = 132.06 (d, C-4, C-5), 153.75 (C-2).–

7. Abkürzungen

CI	Chemische Ionisation
DCI	Direkte chemische Ionisation
EI	Elektronenstoß-Ionisation
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
COLOC	Correlation Spectroscopy via Long-Range Coupling
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multibond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
NOE	Nuclear Overhauser Effect
SC	Säulenchromatographie
PSC	Präparative Schicht-Chromatographie

8. Literaturverzeichnis

- [1] H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, New York, **1985**, 6. Aufl., S. 1 ff.
- [2] E. Müller, W. Löffler, *Mykologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1982**, 4. Aufl..
- [3] J. Webster, *Pilze, Eine Einführung*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1983**, 1. Aufl., S. 1 ff.
- [4] C. J. Alexopoulos, *Einführung in die Mykologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1966**, 1. Aufl., S. 2 ff.
- [5] J. A. von Arx, *Ein kurzer Abriß der Mykologie unter besonderer Berücksichtigung der Pilze in Reinkultur*, Verlag von J. Cramer, **1968**, 1. Aufl., S. 9 ff.
- [6] D. M. Wilson, *Ad. Chem. Ser.* **1976**, 149, 90.
- [7] M. Henning, *Handbuch für Pilzfreunde*, Fischer, Stuttgart, **1988**, 2. Aufl., Bd. 1-6.
- [8] W. B. Turner, *Fungal Metabolites*, Academic Press, **1971**, S. 11 ff.

- [9] J. D. Bu' Lock, *Secondary Metabolism of Microorganism* (Hrsg.: Industrial Aspects of Biochemistry), **1974**, S. 335.
- [10] J. D. Bu' Lock, *Secondary Metabolism in Fungi and its Relationship to Growth and Development in the Filamentous Fungi I* (Hrsg.: Smith & Berry), Edward Arnold, London, **1975**, S. 33.
- [11] H. I. Haavik, *Folia Microbiol.* **1979**, 24, 365.
- [12] S. W. Drew, A. L. Demain, *Ann. Rev. Microbiol.* **1977**, 31, 343.
- [13] A. L. Demain, *Pure and Appl. Chem.* **1986**, 58 (2), 219.
- [14] E. D. Weinberg, *Adv. Microbiol. Physiol.* **1970**, 4, 1.
- [15] E. D. Weinberg, *Dev. ind. Microbiol.* **1974**, 15, 70.
- [16] A. Michel, *Dissertation*, Paderborn, **1994**, S. 3.
- [17] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, S. Hirzel wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1990**, 2. Aufl., S. 23.
- [18] P. W. Brian, *Sym. Soc. Gen. Microbiol.* **1977**, 31, 343.
- [19] C.T. Calam, *Folia Microbiol.* **1979**, 24, 276.
- [20] J. F. Martin, A. L. Demain, *Microbiol. Rev.* **1980**, 44, 230.
- [21] H. Zöhner, *Folia Microbiol.* **1979**, 24, 435.
- [22] A. A. Newman, *Chemistry of Terpenes and Terpenoids* (Hrsg.: Academic Press), New York, **1972**.
- [23] F. C. Czygan, *Biogene Arzneistoffe*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig, **1984**, S. 12.
- [24] L. Ruzicka, *Experienta* **1953**, 9, 357.
- [25] F. Lynen, *Angew. Chem.* **1965**, 77, 929.
- [26] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, S. Hirzel wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, **1990**, 2. Aufl., S. 470.
- [27] K. Weinges, Bähr, W., Ebert, W., K. Göritz, H. D. Marx, *Fortsch. Chem. org. Naturstoffe* **1969**, 27, 158.
- [28] N. M. Packter, *Biosynthesis of Acetate-derived Compounds*, Wiley, London, **1973**.
- [29] N. M. Packter, *The Biochemistry of Plants*, Academic Press, London, **1980**, Bd. 4, S. 535.

- [30] J. N. Collie, *J. Chem. Soc.* **1907**, 91, 1806.
- [31] A. J. Birch, F. W. Donovan, *Aust. J. Chem.* **1953**, 6, 360.
- [32] A. J. Birch, *Fortschr. chem. org. Naturstoffe* **1957**, 14, 186.
- [33] A. J. Birch, *Proc. Chem. Soc.* **1962**, 3.
- [34] P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, S. Hirzel wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, **1990**, 2. Aufl., S. 526.
- [35] S.W. Pelletier, *Alkaloids. Chemical and Biological Perspectives*, Wiley, New York, **1983**, Bd. 1.
- [36] K. Mothes, *Pharmazie* **1981**, 36, 199.
- [37] W. Döpke, *Einführung in die Chemie der Alkaloide*, Akademie-Verlag, Berlin, **1968**.
- [38] M. Shamma, *The isoquinoline alkaloids*, Academic Press, New York, **1972**.
- [39] W. I. Taylor, *Indol alkaloids*, Pergamon Press, Oxford, **1966**.
- [40] M. Christensen, *Species Diversity and Dominance in Fungal Communities*, in *Mycology Series V2, The Fungal Community, Its Organisation and Role in the Ecosystem*, New York, **1981**, S. 201.
- [41] K. H. Domsch, *Pilze aus Agarböden*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1970**.
- [42] N. R. Andersen, P. R. Rasmussen, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 469.
- [43] G. A. Ellestad, R. H. Evans, M. P. Kunstmann, J. E. Lancaster, G. O. Morton, *J.A.C.S.* **1970**, 92, 5483.
- [44] van Eijk, G. W., *Antonie van Leeuwenhoek* **1988**, 54, 325.
- [45] H. Kakisawa, *Chem. Comm.* **1973**, 802.
- [46] K. Bruns, *Tetrahedron* **1968**, 24, 3417.
- [47] M. Adinolfi, *Tetrahedron Lett.* **1972**, 695.
- [48] M. Adinolfi, *Gazz. Chim. Ital.* **1973**, 103, 1271.
- [49] S. C. Welch, *J. Am Chem. Soc.* **1977**, 99, 549.
- [50] R. B. Woodward, H. Baer, *J. Am. Chem. Soc.* **1948**, 70, 1161.
- [51] P. M. Scott, *J. Antibiot.* **1971**, 24, 747.
- [52] J. F. Grove, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1972**, 2400.
- [53] J. F. Grove, *J. Chem. Soc. Perkin 1* **1973**, 2704.

- [54] G. A. Ellstad, *J. Org. Chem.* **1973**, 38, 4204.
- [55] J. P. Springer, *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29, 853.
- [56] P. M. Scott, *Dev. Food Sci.* **1984**, 8, 457.
- [57] B. J. Rawlings, P. B. Reese, Ramer, S. E., Vederas, J. C., *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3382.
- [58] H. Dörfelt, *Lexikon der Mykologie*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, **1986**, S. 156.
- [59] B. Kögel, *Rec. Trav. Chim.* **1944**, 63, 5.
- [60] P. A. Plattner, K. Vogler, R. O. Studer, P. Quitt, Keller-Schierlem, W., *Helv. Chim. Acta* **1963**, 111, 927.
- [61] R. L. Mower, W. C. Snyder, Hancock, J. G., *Phytopathology* **1975**, 65, 5.
- [62] G. Losse, Raue, H., *Chem. Ber.* **1967**, 101, 1532.
- [63] C. H. Stoll, J. Renz, *Phytophatol. Zeitschrift* **1954**, 22, 233.
- [64] C. H. Stoll, J. Renz, U. E. Gäumann, *Phytophatol. Zeitschr.* **1957**, 29, 380.
- [65] K. Steiner, *Helv. Chim. Acta* **1963**, 46, 690.
- [66] T Yabula, K. Kambe, T. Hayashi, *J. Agric. Chem. Soc. Jap.* **1934**, 10, 1059.
- [67] D. W. Pitel, L. C. Vining, *Can. J. Biochem.* **1970**, 48, 623.
- [68] P. A. Plattner, W. Keller, A. Boller, *Helv. Chim. Acta* **1954**, 37, 1379.
- [69] H. Hiduka, K. Nayatsu, K. Takeya, *J. Antibiotics* **1969**, 22, 228.
- [70] H. Hiduka, *Nature (London)* **1971**, 54, 231.
- [71] C. A. Korduba, J. Veals, *ibid.* **1974**, 190, 459.
- [72] H. Vogt, H. Mayer, *Tetrahedron Lett.* **1966**, 5887.
- [73] R. Tschesche, W. Fuehrer, *Chem. Ber.* **1978**, 111, 3502.
- [74] K. Miyano, T. Sakasai, H. Hamano, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 2328.
- [75] J. Oehlke, J. Schroetter, E. Dove, *Pharmazie* **1983**, 38, 591.
- [76] A. Waldner, *Helv. Chem. Acta* **1988**, 71, 486.
- [77] A. Waldner, *Syn. Commun.* **1989**, 19, 2371.
- [78] K. E. Schulte, G. Rucker, H. Fachmann, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 4763.
- [79] Y. Takaishi, Murakami, Y., *Phytochemistry* **1987**, 26, 2341.
- [80] A. G. Gonzales, J. B. Barrera, *Phytochemistry* **1983**, 22, 1049.

- [81] A. Guerriero, V. Cuomo, *Helv. Chem. Acta* **1990**, 73, 2090.
- [82] P. G. Gassman, T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 5811.
- [83] G. Nasini, A. Arnone, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1986**, 525.
- [84] G. Strobel, J. Clardy, C. Hradil, *Phytochemistry* **1989**, 28, 73.
- [85] E. Stack, E. P. Mazzola, *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 866.
- [86] E. Stack, *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 426.
- [87] G. F. Griffin, *J. Chromatogr.* **1983**, 280, 363.
- [88] G. Strobel, A. Stierle, *J. Nat. Prod.* **1989**, 52, 42.
- [89] R. J. Cole, *Handbook of Toxic Fungal Metabolites*, Academic Press, New York, **1981**, S. 640.
- [90] T. Okuno, I. Natsume, K. Sawai, T. Matsumoto, *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5653.
- [91] W. A. Ayer, Y. Hoyano, M. S. Pedras, I. van Altena, *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 1585.
- [92] D. H. R. Barton, P. De Mayo, G. A. Raistrick, *Tetrahedron* **1959**, 6, 48.
- [93] I. C. Paul, G. A. Simm, *J. Chem. Soc.* **1965**, 1097.
- [94] N. Narasimhachari, L. C. Vining, *Can. J. Chem.* **1963**, 41, 641.
- [95] G. W. van Eijk, *Phytochemistry* **1971**, 10, 3263.
- [96] O. Bachmann, B. Kemper, H. Musso, *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 305.
- [97] K. Homma, K. Fukuyama, Y. Katsube, Y. Kimura, T. Hamosaki, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, 44, 1333.
- [98] T. J. Simpson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1979**, 1233.
- [99] W. A. Ayer, M. S. Pedras, D. E. Ward, *Can. J. Chem.* **1987**, 65, 760.
- [100] T. Anke, F. Oberwinkler, W. Steglich, G. Schramm, *J. Antibiot.* **1977**, 30, 806.
- [101] G. Schramm, W. Steglich, T. Anke, F. Oberwinkler, *Cem. Ber.* **1978**, 111, 2779.
- [102] J. Bäuerle in *Dissertation*, Tübingen, **1981**.
- [103] P. Sedmera, F. Nerud, V. Musilek, M. Vondracek, *J. Antibiot.* **1981**, 34, 1089.
- [104] P. Sedmera, F. Nerud, V. Musilek, M. Vondracek, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1983**, 48, 1508.
- [105] W. Steglich, T. Anke, G. Schramm, B. Schwalge, Bert Steffan, *Liebigs Ann. Chem.* **1984**, 1616.

- [106] W. Steglich, B. Steffan, T. Anke, W. Weber, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 207.
- [107] M. Vondracek, J. Capova, K. Culik 180775, 1979.
- [108] A. Fredenhagen, A. Kuhn, H. Peter, *J. Antibiot.* **1990**, 43, 655.
- [109] A. Fredenhagen, P. Hug, Peter, H., *J. Antibiot.* **1990**, 43, 661.
- [110] T. Meyer, U. Regenass, D. Fabbro, E. Alteri, *Int. J. Cancer* **1989**, 43, 851.
- [111] M. Ahsan, A. I. Gray, P. G. Waterman, *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 673.
- [112] C. Zdero, F. Bohlmann, R. M. King, H. Robinson, *Phytochemistry* **1986**, 25, 509.
- [113] F. Gomez, L. Quijano, J. S. Calderon, T. Rios, *Phytochemistry* **1980**, 19, 2202.
- [114] C. Franke, *Dissertation*, Braunschweig, **1991**.
- [115] T. Omura, *Macrolide Antibiotics*, Academic Press, New York, **1984**.
- [116] J. Staunton, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 1331.
- [117] D. Seebach, Leo Wilder, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 1972.
- [118] Leo Wilder, D. Seebach, *Helv. Chem. Acta* **1982**, 65, 1085.
- [119] U. Lemieux, E. von Rudloff, *Can. J. Chem.* **1955**, 33, 1701, 1710, 1714.
- [120] R. H. Thomson, *J. Chem. Soc.* **1952**, 5, 1822.
- [121] J. Hall, A. George, *J. Chem. Soc.* **1923**, 2029.
- [122] D. W. Cameron, P. E. Schütte, *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 2121.
- [123] J. T. Traxler, *Syn. Commun.* **1977**, 7, 161.
- [124] Shannon, J. S., W. Kelly, *Aust. J. Chem.* **1960**, 13, 103.
- [125] H. L. Bradlow, C. A. van der Werf, *J. Am. Chem. Soc.* **1947**, 69, 1254.
- [126] P. Boldt, *Chem. Ber.* **1967**, 100, 1270.
- [127] L. H. Briggs, G. A. Nicholls, *J. Chem. Soc.* **1951**, 1138.
- [128] K. Murdock, R. G. Child, Y. Lin, J. D. et al Warren, *J. Med. Chem.* **1982**, 25, 505.
- [129] M. S. Newman, R. W. Addor, *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, 77, 3789.
- [130] G. Wulff, P. Birnbrich, *Chem. Ber.* **1992**, 125, 473.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Markus John
Buschweg 13
59609 Anröchte
geb. am 09. August 1966 in Lippstadt
verheiratet, 1 Kind

Schul Ausbildung:

1973 – 1977

Grundschule in Anröchte

1977 – 1983

Realschule in Anröchte

Abschluß: Fachoberschulreife

1986 – 1989

Abendgymnasium in Lippstadt

Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

1983 – 1986

Ausbildung zum Werkzeugmacher
Hella KG in Lippstadt

Berufstätigkeit:

1986 – 1989

Werkzeugmacher

Studium:

1989

Studium der Tiermedizin an der tiermedizinischen
Hochschule in Hannover

1990 – 1995

Studium der Chemie an der Universität-Gesamthochschule
Paderborn

Vordiplom 02/1993

Diplom 10/1995

Thema der Diplomarbeit: Synthese und Untersuchung des
Schmelzverhaltens von flüssigkristallinen Azofarbstoffen

Promotion:

1996 – 1998

Experimenteller Teil der Dissertation unter der Leitung von
Herrn Prof. K. Krohn an der Universität-Gesamthochschule
Paderborn

Berufspraxis:

11/1995 – 05/1998

wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Organischen Chemie an
der Universität-Gesamthochschule Paderborn
Betreuung und Wartung des Kernresonanzspektrometers