

**Isolierung und Strukturaufklärung von
Xanthon-Derivaten, Anthrachinonen,
Angucyclinen und anderen
Sekundärmetaboliten aus terrestrischen
und marinen Bakterien**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von
Katja El-Hachach
aus Göttingen

Bonn 2007

Angefertigt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Referent: Prof. Dr. G. M. König

Korreferent: Prof. Dr. H. Laatsch

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn

http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr: 2008

Die vorliegende Dissertation wurde im Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Bonn und im Institut für Organische und Biomolekulare Chemie der Universität Göttingen in der Zeit vom Oktober 1999 bis Oktober 2006 unter der Leitung von Frau Prof. Dr. G. M. König und Herrn Prof. Dr. H. Laatsch durchgeführt.

Frau Prof. Dr. G. M. König danke ich für die Unterstützung und intensive Betreuung während meiner Promotionszeit in ihrer Abteilung. Stets habe ich sehr gerne an meine Anfänge und unsere zahlreichen Diskussionen in ihrem Labor gedacht.

Herrn Prof. Dr. H. Laatsch danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit, für seine ständige Bereitschaft, auftretende Probleme zu diskutieren sowie sein Verständnis für die lange Zeitspanne wegen meiner Mutterschaft.

Für meine Eltern

INHALT

1.	Theoretischer Teil.....	1
1.1.	Einleitung	1
	Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen	3
	Strategien zum Auffinden neuer Naturstoffe.....	5
	Auswahl geeigneter Quellen zum Auffinden von neuen, aktiven Naturstoffen.....	7
	Marine Mikroorganismen	10
1.2.	Aufgabenstellung.....	13
1.3.	Screening nach Sekundärmetaboliten in Bakterienextrakten.....	14
	Primärscreening	16
	Sekundärscreening.....	17
	Biologisches Screening.....	17
	Pharmakologisches Screening	18
	Chemisches Screening.....	19
	Untersuchung ausgewählter Bakterien-Stämme	21
	Terrestrische Streptomyceten	22
	Stamm GW13/580	22
	Acetamid.....	25
	23-Desoxycervinomycin A ₁	26
	Bearbeitung des Rohextraktes (II).....	34
	Cervinomycin A ₂	35

Cervinomycin A ₁ / Cervinomycin A ₁ -Diacetat	38
Stamm GW 13/1783	45
4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent- 3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dion.....	46
Stamm GW 16/3993	52
Mithramycin	53
Stamm GW 44/1571	62
Cosmomycin A.....	63
Cytorhodin J	70
Marine Streptomyceten.....	78
Stamm B 5546	78
14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2	80
Collismycin A.....	91
Stamm B 6278	95
Aufarbeitung von Stamm B 6278.....	97
A-7784 99	
Vineomycin C.....	105
Fridamycin D.....	108
Rabelomycin.....	112
Mutabahamycin	114
Bearbeitung des Rohextraktes (II) von Stamm B 6278	132
Vineomycin A ₁	133

Bakterienstämme aus der Nordsee.....	137
Stamm Hel 38	137
Ubichinon-10.....	139
Nostoxanthin.....	141
Stamm Fpep1 (Pic95)	144
Aufarbeitung des Rohextraktes (I).....	145
N ^β -Acetyltryptamin	145
Aufarbeitung des Rohextraktes (II)	146
Zeaxanthin	148
Stamm Pico II 5.3	150
AB-400 150	
Ausblick.....	157
Zusammenfassung	159
2. Experimenteller Teil	171
2.1. Material und Methoden	171
Untersuchung ausgewählter Bakterienstämme.....	182
Terrestrische Streptomyceten	182
Stamm GW 13/580	182
Primärscreening.....	182
Fermentation und Aufarbeitung	183
Isolierung.....	184
Fermentation im 50 l-Maßstab	186

Stamm GW 13/1783	190
Primärscreening.....	190
Fermentation und Aufarbeitung	191
Isolierung.....	192
Stamm GW 16/3993	193
Primärscreening.....	193
Fermentation und Aufarbeitung	194
Stamm GW 44/1571	197
Primärscreening.....	197
Fermentation und Aufarbeitung	198
Isolierung.....	198
Marine Streptomycceten.....	201
Stamm B 5546	202
Primärscreening.....	202
Fermentation und Aufarbeitung	202
Isolierung.....	203
Stamm B 6278	205
Primärscreening.....	205
Fermentation und Aufarbeitung	206
Isolierung.....	207
Bakterienstämme aus der Nordsee.....	215
Hel 38	215

Primärscreening.....	215
Isolierung.....	216
Stamm Fpep1 (Pic 95).....	218
Primärscreening.....	218
Fermentation und Aufarbeitung.....	219
Isolierung.....	219
Isolierung.....	220
Stamm Pico II 5.3.....	221
3. Anhang.....	2
Verzeichnis der Tabellen.....	2
Ausgewählte NMR-Spektren.....	4

Abkürzungsverzeichnis

bzw.: beziehungsweise

DC: Dünnschichtchromatographie

DCI: direkte chemische Ionisation

EI: Elektronenstoßionisation

ESI: Elektronensprayionisation

GC: Gaschromatographie

HMBC: Protonendetektierte C,H-Fernkopplungen

HMQC: Protonendetektierte C,H-¹J-Kopplungen

HPLC: Hochleistungsflüssigchromatographie

MS: Massenspektrometrie

NMR: Kernmagnetische Resonanz

PDC: Plattendickschichtchromatographie

SC: Säulenchromatographie

sog.: sogenannt

u.a.: unter anderem

v.a.: vor allem

1. Theoretischer Teil

1.1. Einleitung

Die Naturstoffchemie entstand aus der ureigenen Neugier des Menschen, welche durch sensorische Reize wie Geschmack und Geruch oder durch das Phänomen der Farbe, aber vor allem durch das Bedürfnis nach Heilung und Linderung von Krankheiten geweckt wurde. Die Verwendung von Pflanzenmaterial zu Heilzwecken ist schon seit Jahrtausenden in der traditionellen chinesischen Medizin bekannt. So findet sich bereits in dem Standardwerk der altchinesischen Medizin Nei Ching (3000 v. Chr.) des legendären „Gelben Kaisers“ Huang Ti eine Auflistung von 151 Arzneiprodukten pflanzlichen Ursprungs¹. Darunter ist eine der wohl bekanntesten chinesischen Arzneipflanzen, der Ginkgo-Baum (*Ginkgo biloba*), dessen Blattextrakt bis zum heutigen Tage intensive Anwendung zur symptomatischen Behandlung hirnor- ganisch bedingter Leistungsstörungen, Schwindel oder Tinnitus findet². Die stete Weiterentwicklung der Drogenkunde sowie der Fortschritt in der analytischen Chemie des 19. Jahrhunderts brachten schließlich Inhaltsstoffe verschiedenster Naturstoffgruppen mit diverser Wirkung auf den menschlichen Organismus oder von anderem, z.B. industriellen Nutzen hervor. So wurde durch den Apotheker F. W. Sertürner 1805/1806 das Morphin - als erstes Alkaloid - in Reinform isoliert. Damit gelang es erstmalig, aus einer Droge anhand von analytisch-chemischen Arbeitsmethoden das wirksame Prinzip zu formulieren³. Die Reindarstellung einer arzneilich wirksamen Substanz ermöglichte nicht nur eine gezielte pharmakologische Untersuchung, sondern ließ auch eine Optimierung der Dosierung von Arzneistoffen zu.

Der Physiologe A. Kossel unterschied die sogenannten Primärmetaboliten von den Sekundärmetaboliten⁴. Die erstgenannte Gruppe kommt dabei ubiquitär vor und entspringt dem Grundstoffwechsel von Organismen. Hierzu gehören beispielsweise die Nucleinsäuren, Proteine, Lipide und Kohlenhydrate. Zu den Vertretern der zweiten Gruppe hingegen gehören z.B. die Terpene, Alkaloide, Polyketide und andere, deren Vorkommen oftmals für ganz bestimmte Organismen charakteristisch ist und welche häufig von pharmazeutischem Interesse sind. Die Bedeutung der Sekundärmetabolite für den jeweiligen Produzenten ist oft noch unklar. Jedoch kommen beispielsweise Abwehr- oder Lockfunktionen in Betracht.

Während die Vielzahl der Arzneistoffe bis in die Anfänge des 20. Jahrhunderts vornehmlich aus pflanzlichem Material gewonnen wurde, war die Entdeckung des Penicillins im Jahre 1928 durch den Bakteriologen A. Fleming von entscheidender Bedeutung für die Gewinnung von Naturstoffen aus Mikroorganismen⁵. Wegweisend für diese Entwicklung waren zuvor jedoch die Identifizierung von Mikroorganismen als Auslöser von Infektionskrankheiten durch R. Koch im Jahre 1876⁶ sowie die ein Jahr später folgende Beobachtung von L. Pasteur, daß sich bestimmte Mikroorganismen gegenseitig in ihrem Wachstum hemmen. Damit war der Begriff der Antibiose geprägt¹. Erst 1939 gelang es dem Biochemiker E. B. Chain und dem Pathologen H. Florey, das Penicillin (**1**) in Reinform zu gewinnen und in größerer Menge herzustellen⁷.

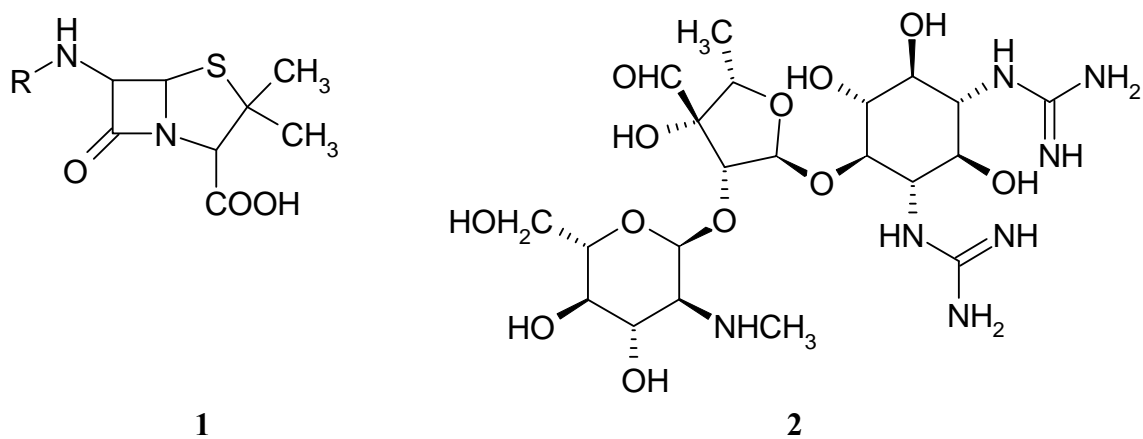


Abbildung 1: (**1**) = allgemeine Strukturformel für Penicillin (R = variabler Rest) und Streptomycin (**2**).

Durch die Entdeckung des Penicillins (**1**) wurde weltweit eine systematische Suche nach weiteren Antibiotika ausgelöst. Dabei wurden neben zusätzlichen β -Lactam-Antibiotika wie den Cephalosporinen und Cephamycinen, neue Antibiotika-Klassen (vor allem bakteriellen Ursprungs) erschlossen. So folgte zum Beispiel kurze Zeit später die Isolierung von Streptomycin (**2**) – dem ersten Vertreter der Aminoglycosidantibiotika - aus dem Bakterium *Streptomyces griseus* durch A. Schatz⁸.

Entwicklung von Antibiotika-Resistenzen

Auch wenn die Entwicklung von Antibiotika vielen tödlich verlaufenden Infektionserkrankungen vorerst ihren Schrecken nahm, führte schließlich ein allzu bedenkenloser Umgang mit diesen Arzneimitteln dazu, daß immer mehr Erreger Resistenzen entwickelten. So glaubte man noch vor dreißig Jahren vor allem in den Industriestaaten, die Infektionskrankheiten erfolgreich besiegt zu haben. Daher verlagerte sich der Schwerpunkt der pharmazeutischen Forschung auf die Behandlung von chronischen Erkrankungen, wie z.B. denen des Herzens oder der Alzheimererkrankung. Erst das vermehrte Auftreten von resistenten Krankheitserregern und vor allem die Entwicklung von Multiresistenzen bis hin zu einer beginnenden Zunahme der Resistenzen gegen wichtige Reserveantibiotika, wie z.B. das Vancomycin, lenkten die Aufmerksamkeit wieder auf das Gebiet der Infektiologie bzw. der Antibiotikaforschung. Mittlerweile sind Infektionskrankheiten nicht nur weltweit, sondern auch in den Industrieländern, zusammen mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs, führend bei den Todesursachen (siehe auch Abbildung 2).

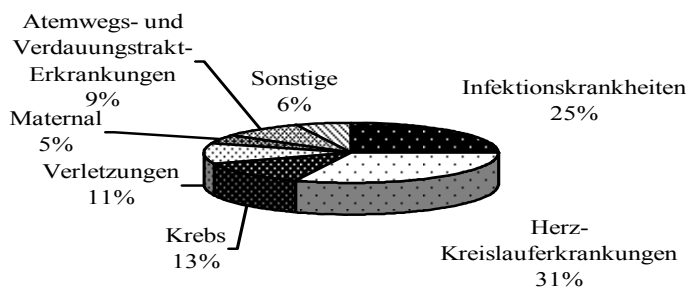


Abbildung 2: Weltweit häufigste Todesursachen für 1998; nach WHO 1999⁹, eigene Darstellung.

Doch neben einer oft voreiligen und unspezifischen Verordnungspraxis von Antibiotika spielen auch vor allem Anwendungsfehler, wie vorzeitiges Absetzen des verordneten Antibiotikums, übermäßiger Gebrauch bzw. Mißbrauch und Fehleinsatz (z.B. Unterdosierung oder Applikation eines Antibiotikums ohne Vorliegen einer bakteriellen Infektion) eine bedeutende Rolle. Dabei zeigen nicht nur nosokomiale Erreger einen erheblichen Resistenzzuwachs, sondern auch der ambulante Bereich

weist diese Tendenz deutlich auf¹⁰. Außerdem führt die Verwendung von Antibiotika in der Tiermedizin sowie vor allem der Tiermast und Landwirtschaft zu einem Anstieg von resistenten Keimen. So gelangte auch durch den Einsatz von Avoparcin - einem weiteren Vertreter der Vancomycin-Gruppe - der gegen Vancomycin resistente und vorerst nur bei Tieren auftretende Erreger *Enterococcus faecium* in die Nahrungsmittelkette und bahnte sich damit seinen Weg in den Humanbereich¹¹.

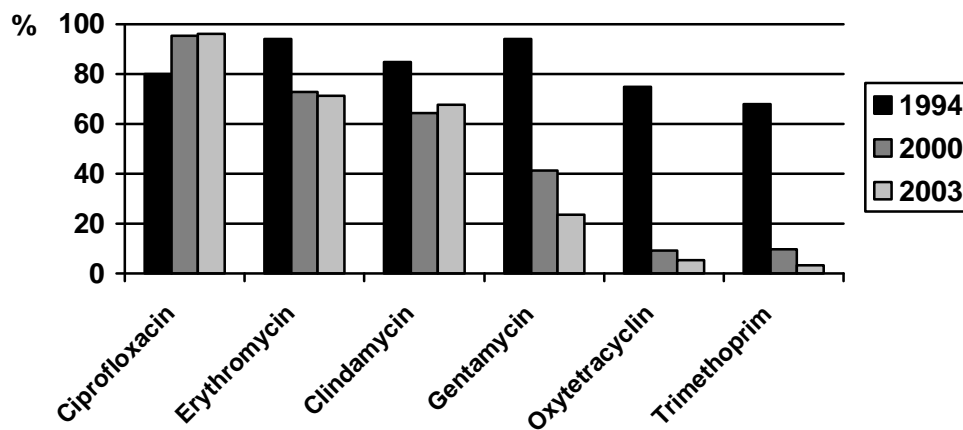


Abbildung 3: Häufigkeit der Resistenzen gegen ausgewählte Antibiotika bei MRSA (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) aus Krankenhausinfektionen in Deutschland. Eigene Darstellung nach den Daten des Nationalen Referenzzentrums für Staphylococcen¹².

Eine Verbreitung der Resistenzträger wird nicht zuletzt z.B. durch eine Zunahme des globalen Handels, des Tourismus und durch Epidemien in Kriegs- oder Krisengebieten gefördert. Auf diesem Hintergrund besteht beständig die Gefahr, die noch letzten wirksamen Medikamente gegen alte oder aber gar neu auftretende Infektionskrankheiten zu verlieren. Daher ist es unerlässlich, auf diesem Forschungsgebiet wieder neu zu investieren. So muß nicht nur ein Umdenken vor allem in den Bereichen der Humanmedizin und der Tierzucht erfolgen, sondern es müssen auch die Mechanismen der Resistenzbildung sowie diagnostische Nachweismethoden eindringlicher erforscht werden. Letztendlich ist hierbei aber gerade die Tätigkeit auf dem Gebiet der Naturstoffchemie bzw. der Antibiotikaforschung von erheblicher Bedeutung im Wettlauf mit der Entwicklung von Resistenzen.

Strategien zum Auffinden neuer Naturstoffe

Wenn auch Zufallsentdeckungen wie das Penicillin unwahrscheinlicher geworden sind, so kann jedoch das Ausarbeiten umfangreicher Strategien zum Auffinden neuer Wirkstoffe zu weiteren Erfolgen führen. Ausschlaggebend sind hierbei nicht zuletzt Auswahl und Umfang der eingesetzten Screeningverfahren oder anderer Suchkriterien, wie z.B. die Auswahl des Untersuchungsmaterials (z.B. Micro- oder Makroorganismen, Pilze oder Bakterien) und dessen Quelle (z.B. Tiefsee- oder Seichtwassersedimente). Je nach Zielsetzung, ob die Suche nach einer bestimmten Wirkung eines neuen oder gar bekannten Naturstoffs oder die Beschreibung neuer Naturstoffstrukturen mit bestimmter oder beliebiger Aktivität im Vordergrund stehen, lassen sich verschiedene Vorgehensweisen erarbeiten. So z.B. bietet das konventionelle biologische Screening die Möglichkeit, allgemeine Eigenschaften wie Cytotoxizität oder antibiotische Wirkungen festzustellen, ohne jedoch näheren Aufschluß über die genauen Wirkmechanismen zu liefern. Da vor allem Forschungsprojekte in der Pharmaindustrie die gezielte Suche nach einem bestimmten Wirkungsmuster vorgeben, hat sich das sogenannte *targetorientierte Screening* entwickelt, welches in der Regel nicht nur ein bestimmtes Krankheitsbild betrachtet, sondern gleichzeitig auch ganz konkrete Zielstrukturen bei der Wirksamkeitsfindung vorgibt. Hierunter fallen beispielsweise verschiedene Rezeptor- und Enzymmodelle (z.B. Suche nach Inhibitoren der HIV-Protease mittels ELISA). Einerseits ist hierbei die oftmals hohe Empfindlichkeit derartiger Testsysteme zu bedenken. Denn eine hohe Empfindlichkeit kann dazu führen, daß eine Minderkomponente detektiert wird, die unter Umständen hauptsächlich für die Gesamtwirkung eines Extraktes verantwortlich ist, wodurch Schwierigkeiten bei der Reindarstellung aufgrund von zu kleinen Substanzmengen entstehen könnten. Andererseits ist im Allgemeinen bei biologischen Testsystemen die Übertragbarkeit von *in vitro* Modellen auf *in vivo* Modelle nicht immer gegeben. Noch bis Anfang der 90iger Jahre erfolgte die Durchführung dieser aufwendigen Screeningmethode „per Hand“. Doch dank der Entwicklung des High Throughput Screenings (HTS) konnte die Wirkstofffindung automatisiert und damit äußerst effizient gestaltet werden. So werden in kurzer Zeit roboterunterstützt große Substanzzahlen mit Hilfe geeigneter Verfahren getestet. Jedoch gerade wegen dieses Geräteaufwands und den damit verbundenen Kosten ist das HTS für den universitären Laboralltag ohne Relevanz. Sinnvoll scheint daher eine Kooperation mit der Pharmaindustrie, gerade wenn es darum geht, möglichst schnell mehrere Substanzen oder gegebenenfalls Substanzgemische auf spezifische Wirkungen zu untersuchen.

Im Gegensatz zu der Verwendung von den beschriebenen biologischen bzw. pharmakologischen Testsystemen, bietet ein chemisches oder physikalisches Screening vielfältige Möglichkeiten, die sich in Aufwand und Selektivität beliebig variieren lassen. So kann die im chemischen Screening häufig eingesetzte, schnell durchführbare Dünnschichtchromatogramm-Kontrolle von Rohextrakten, Fraktionen oder Reinsubstanzen durch die Kombination mit entsprechenden Detektionsmethoden (UV-Absorption, Fluoreszenzlöschung, Sprühreagenzien etc.) umfangreich genutzt werden. Hierdurch können neben Aussagen über Strukturelemente vor allem bei Extrakten und Fraktionen, Informationen über die Komplexität eines Substanzgemisches und dessen Trenneigenschaften erhalten werden.

Eine physikalisch-analytische Screening-Methode ist beispielsweise eine durch $^1\text{H-NMR}$ -Spektren kontrollierte Fraktionierung während der Aufarbeitung von Extrakten und Fraktionen sowie deren Bewertung durch HPLC-UV oder HPLC-MS-Analyse. Diese physikalischen Detektionsmöglichkeiten lassen bereits zu einem frühen Zeitpunkt Aussagen über die Struktur einer Substanz zu und beschleunigen so deren Aufklärungsprozeß. Liegt die Substanz schließlich in reiner Form vor, so sollte möglichst zügig bestimmt werden können, ob es sich um einen neuen oder bereits bekannten Naturstoff handelt. Neben den Datenbanken „Dictionary of Natural Products“ (DNP) von Chapman & Hall und den Chemical Abstracts (CA) sowie MARINLIT¹³ bietet hier vor allem die Datenbank AntiBase^{®14,15} optimale Voraussetzungen für eine schnelle Identifizierung von Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen. Anhand von spektroskopischen Informationen wie z.B. $^{13}\text{C-NMR}$ -, $^1\text{H-NMR}$ -Daten sowie der Masse der isolierten Verbindung ermöglicht eine Substrukturrecherche in Kombination mit Ausschlußkriterien in kurzer Zeit und mit hoher Wahrscheinlichkeit die Entscheidung, ob ein bekannter oder möglicherweise neuer Naturstoff vorliegt. Handelt es sich um einen unbekanntes Naturstoff, so erhält man zusätzlich durch entsprechende Substrukturvorschläge wertvolle Hinweise für die nachfolgende Strukturaufklärung anhand von 2D-NMR-Experimenten, deren Aufwand bei durch AntiBase[®] als bekannt identifizierten Verbindungen entfällt, so daß Zeit und Kosten eingespart werden können.

Neben der Auswahl von geeigneten Screeningverfahren bieten aber auch biotechnologische Maßnahmen oder gentechnische Beeinflussungen der Untersuchungsorganismen die Möglichkeit, neue Naturstoffe zu finden, indem also ein Organismus durch gezielte Einwirkung in die Lage gebracht wird, bestimmte Naturstoffe (entweder andere als bisher oder vorhandene in detektierbarer bzw. isolierbarer

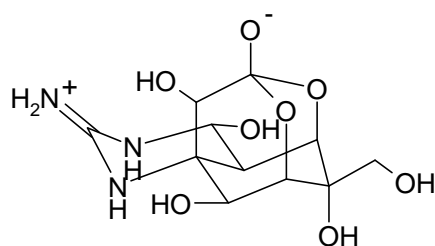
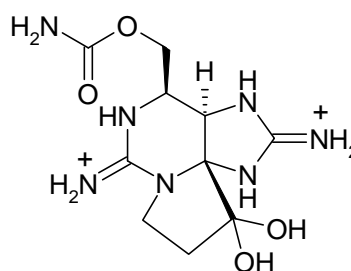
Menge) zu produzieren. So kann sich das Metabolitenmuster eines Bakterienstammes durch Variation der Kulturbedingungen stark ändern. Dieser Gedanke findet sich auch im OSMAC-Prinzip wieder (One strain, many compounds)¹⁶. Durch Änderung der Kultivierungsmethoden können gegebenenfalls sogenannte „schlafende Gene“ aktiviert, bzw. die Produktion eines bestimmten Sekundärmetaboliten gezielt gefördert werden. Für eine Reproduktion derartiger Ergebnisse ist dabei eine genaue Dokumentation der Kultivierungsbedingungen und deren strikte Einhaltung erforderlich. Dennoch wird häufig beobachtet, daß auch bei gleichbleibenden Bedingungen ein Mikroorganismus die Potenz zur Produktion einer bestimmten Substanz einbüßen kann.

Um den Aufwand und die damit verbundenen Kosten möglichst gering zu halten, ist also eine optimale Kombination dieser vorgestellten Methoden nötig, welche von klarer Zieldefinition sowie angemessener zeitlicher Abfolge begleitet sein sollte. Ferner ist der Zielsetzung entsprechend, geeignetes Untersuchungsmaterial von möglichst ergiebigen oder wenig erforschten Quellen auszuwählen. Als Quelle von antibiotisch wirksamen Substanzen sind im wesentlichen Mikroorganismen geeignet, während pflanzliche oder synthetische bzw. semisynthetische Produkte vorwiegend als Medikamente bei Herzerkrankungen (z.B. Digitalis), Analgetika (z.B. Acetylsalicylsäure) oder zur Beeinflussung des zentralen Nervensystems (z.B. Atropin) Anwendung finden. Dabei liegt der Vorteil der Gewinnung von Naturstoffen aus Mikroorganismen vor allem in deren kurzen Generationszeiten. So können große Stoffmengen nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen oder gentechnischer Manipulation in sehr kurzer Zeit erhalten werden. Dagegen ist die Verwendung von Pflanzen mit einem erheblich größeren Aufwand verbunden, da Anbau und Pflege sowie die Wachstumszeiten wesentlich umfangreicher und kostenintensiver sind.

Auswahl geeigneter Quellen zum Auffinden von neuen, aktiven Naturstoffen

Man kennt derzeit über 8000 Antibiotika aus Pilzen und Actinomyceten und ca. 3000 aus anderen Organismen wie Flechten, Algen, Pflanzen und höheren Tieren. Zählt man hierzu noch die semisynthetischen Produkte, so beläuft sich die Zahl auf mehr als 32.000 Verbindungen^{17, 14}. Der Hauptteil der zur Zeit bekannten mikrobiellen Sekundärmetabolite stammt vorwiegend von terrestrischen Actinomyceten¹⁸. Diese Quelle wurde jedoch mittlerweile fast erschöpfend untersucht, wodurch es

notwendig wird, neue Ressourcen zu erschließen. Da das Meer rund siebenzig Prozent der Erdoberfläche ausmacht, liegt der Gedanke nahe, marine Organismen bei der Suche nach neuen Wirkstoffen zu erforschen¹⁹. Marine Ressourcen liefern ein reiches Ideenpool für neue Wirkstrukturen. Häufig werden ganz neuartige und unerwartete Strukturtypen gefunden. Dieses Potential ist nicht zuletzt auf eine enorme Artenvielfalt zurückzuführen. Spezifisch marine Sekundärmetabolite werden vor allem ausgehend von den entsprechenden Anpassungsmechanismen an die besonderen ökologischen Lebensbedingungen im Meer erwartet. So gewann die marine Naturstoffchemie in der Vergangenheit vor allem durch die Isolierung von hochwirksamen Antitumor-Drogen, wie z.B. Bryostatin, Dolastatin, Eleutherobin usw., aber auch von Toxinen wie dem von Dinoflagellaten produzierten Brevetoxin A oder der Okada-säure sowie der als Bakterienmetabolite erkannten Gifte Tetrodotoxin (**3**) und Saxitoxin (**4**) an Interesse²⁰.

**3****4**

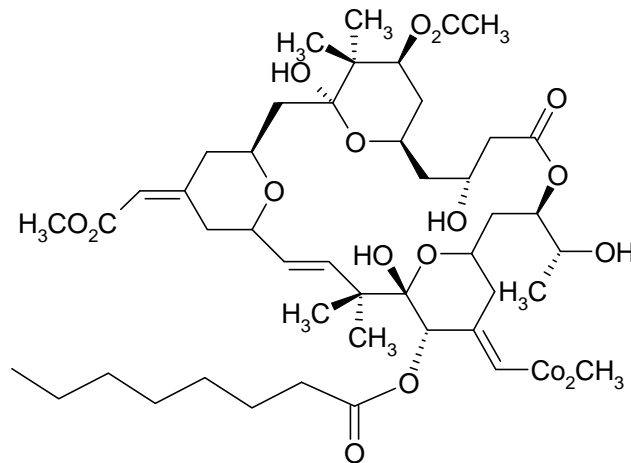
Die strukturelle Vielfalt von marinen Naturstoffen mit gleichfalls unterschiedlicher biologischer Aktivität spiegelt sich außerdem in den in Tabelle 1 ausgewählten Beispielen wieder²¹. Die dort aufgeführten Beispiele entstammen allesamt marinen Makroorganismen, die seit langem eine wichtige Quelle für neue Sekundärmetabolite sind.

Tabelle 1: Aus marinen Makroorganismen isolierte Wirkstoffe.

Verbindung	Substanzklasse	Aktivität
Manoalid (<i>Schwamm</i>)	Terpene	Antiphlogistisch (in der klinischen Phase)
Halomon (<i>Rotalge</i>)	Halogenierte Terpene	Antitumorwirkung (sehr differentielle Wirkung)
Halichondrin B (<i>Schwamm</i>)	Polyether	Antitumorwirkung (in der präklinischen Phase)
Didemnine (<i>Manteltier</i>)	Peptid	Antitumorwirkung (in der klinischen Phase)
Discodermolide (<i>Schwamm</i>)	Lacton	Stabilisiert Mikrotubuli (in der klinischen Phase)
Palau´amine (<i>Schwamm</i>)	Guanidine	Immunsuppressiv, zytotoxisch

Jedoch steht die Nutzung von marinen Makroorganismen als Quelle neuer Wirksubstanzen vor dem Problem der Nachbeschaffung ausreichend hoher Substanzmengen für weiterführende Untersuchungen oder gar der medizinischen Verwendung²². Da jedoch das natürliche Habitat von Makroorganismen nicht unbegrenzt auszuschöpfen ist, ergeben sich neben einem relativ großen Sammelaufwand auch ökologische Probleme. Jedoch kann das Problem der Nachlieferung von Rohmaterial bzw. der gewünschten Verbindungen gegebenenfalls durch die Synthesechemie oder durch gentechnologische Maßnahmen gelöst werden. Letzteres geschieht durch einen entsprechenden Gentransfer vom Makroorganismus in einen leicht kultivierbaren Mikroorganismus. Eine Kultivierung von marinen Makroorganismen ist bisher nur teilweise und in einem nur äußerst beschränkten Umfange gelungen, welcher einen effizienten Wirkstoffzugang nicht ermöglicht²¹.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß über eine mögliche Symbiose von Makroorganismus und Mikroorganismus diskutiert wird. Dies führt schließlich zu der Annahme, daß die von den Makroorganismen isolierten Sekundärmetabolite in Wirklichkeit von assoziierten Mikroorganismen gebildet werden. Dabei unterscheidet man zwischen einer endosymbiontischen und einer epibiotischen Form. Eine bakterielle Endosymbiose scheint bei der Bryostatinproduktion des Bryozoons *Bugula neritina* eine Rolle zu spielen²³ (siehe Abbildung 4).



5

Marine Mikroorganismen

Mittlerweile wurden im Zuge der Suche nach neuen pharmazeutisch anwendbaren Substanzen um 10.000 Verbindungen aus marinen Organismen isoliert²⁴. Dabei stammten bis 1999 nur ca. 400 von marinen Mikroorganismen (siehe Abbildung 5).

Marine Mikroorganismen werden nicht nur von Makroorganismen, sondern auch vor allem von Sedimenten, Seewasser oder von faulendem Holz isoliert²⁵. Dabei sind das leichte Sammeln der Proben (Zugänglichkeit) sowie die vielfältigen Kultivierungsmöglichkeiten (und damit die gezielte Einflußnahme auf die Produktion von Sekundärmetaboliten) von Vorteil. So hat sich mittlerweile die marine Mikrobiologie als ergiebiges und zukunftssträchtiges Forschungsfeld etabliert, was auch die folgenden Beispiele zeigen.

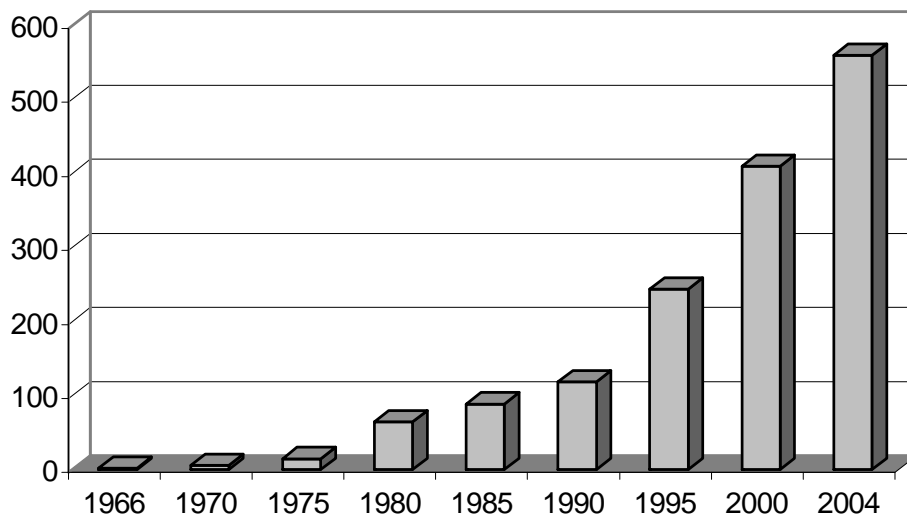


Abbildung 4: Zeitlicher Anstieg der Anzahl der publizierten, aus marinen Mikroorganismen isolierten Naturstoffe¹⁴.

Schon Rosenfeld und Zobell²⁶ sowie Grein und Meyers²⁷ stellten fest, daß marine Bakterien Produzenten antimikrobieller Substanzen sind. Einige Beispiele für biologisch aktive Sekundärmetabolite von marinen Bakterien sowie eines marinen Pilzes, zeigt die Abbildung 6. Das von Oberflächen-assoziierten Bakterien gebildete Octalactin (**6**) zeichnet sich durch cytotoxische Wirkungen gegen verschiedene Krebszelllinien aus²⁸. Das Alkaloid Helquinolin (**7**) wurde aus Nordseebakterien isoliert und zeigte antibiotische Wirkungen gegen verschiedene Bakterien²⁹. Die Verbindung Istamycin A (**8**) konnte aus Sedimentbakterien erhalten werden und weist antibiotische Eigenschaften vor allem gegen Aminoglycosidantibiotika-resistente Keime auf²⁸. Schließlich konnten auch für den Pilzmetaboliten Epicoccamid (**9**) antibiotische Eigenschaften nachgewiesen werden³⁰.

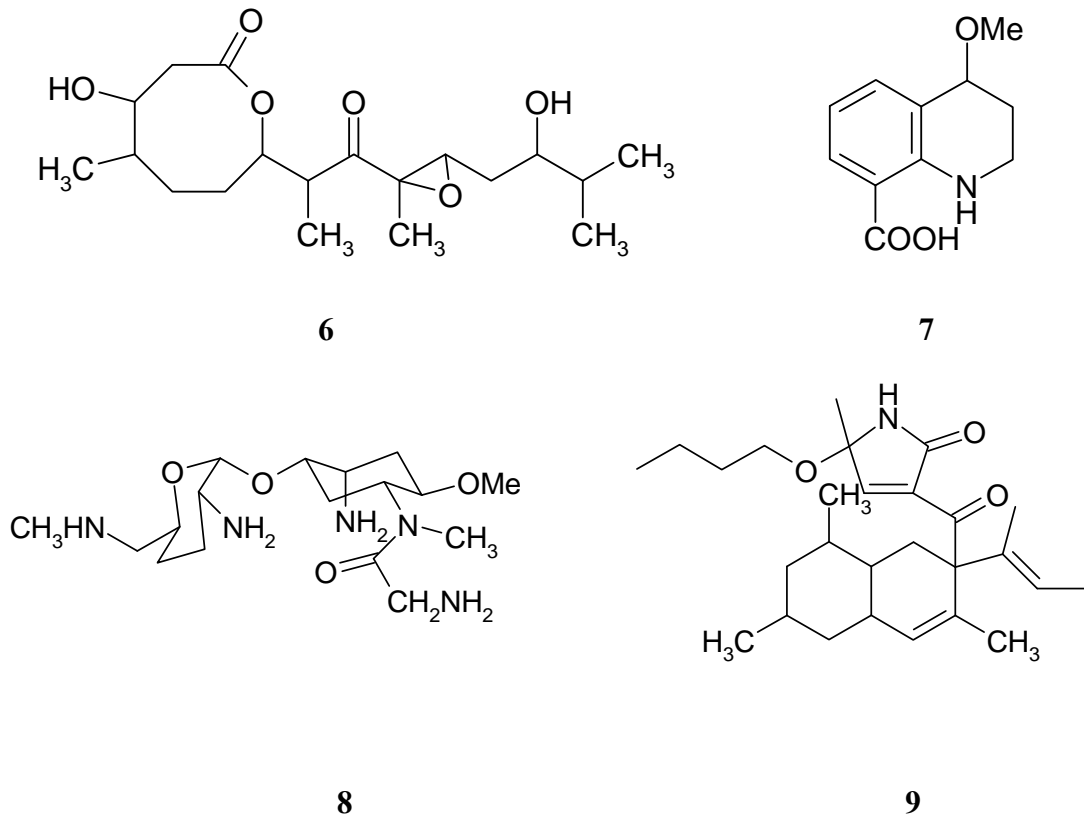


Abbildung 5: Beispiele für biologisch aktive Sekundärmetabolite aus marinen Mikroorganismen: Octalactin A (6), Helquinoline (7), Istamyacin A (8) und Epicoccamid (9).

Als *marine* Bakterien werden solche bezeichnet, die aus marinen Quellen (z.B. Seewasser-Sedimente, Seewasser-Organismen) isoliert worden sind und die unter typisch marinen Bedingungen reproduktiv und metabolisch aktiv sind³¹. Diese sehr allgemeine Definitionsmöglichkeit berücksichtigt, daß ein Großteil der sogenannten marinen Bakterien oftmals terrestrischen Ursprungs sein könnte (beispielsweise durch Transport aus Flüssen ins Meer). So verwundert es auch nicht, daß derartige Bakterien eine große Bandbreite an Medien mit unterschiedlichen Salzkonzentrationen tolerieren, bzw. die von obligat marinen Bakterien isolierten Sekundärmetabolite oftmals den terrestrischen Sekundärmetaboliten ähneln³¹. Jedoch konnten nach M. S. Rappe *et al.* bereits bei einer $\alpha 3$ -Untergruppe (*Roseobacter*-Clade) der α -*Proteobacter*-Unterklasse der Proteobakterien, phylogenetische Unterschiede zu solchen von terrestrischem Ursprung gefunden werden³². Außerdem zählt die Gattung *Pseudoalteromonas* zu den „wirklich“ marinen Bakterien. Da aber gegenwärtig nur ein Bruchteil des natürlichen Habitats der marinen Bakterien erfaßt wurde, ist davon

auszugehen, daß mit Sicherheit eine Vielzahl der obligat marinen Bakterien bis jetzt noch unbekannt ist (siehe Abbildung 7).

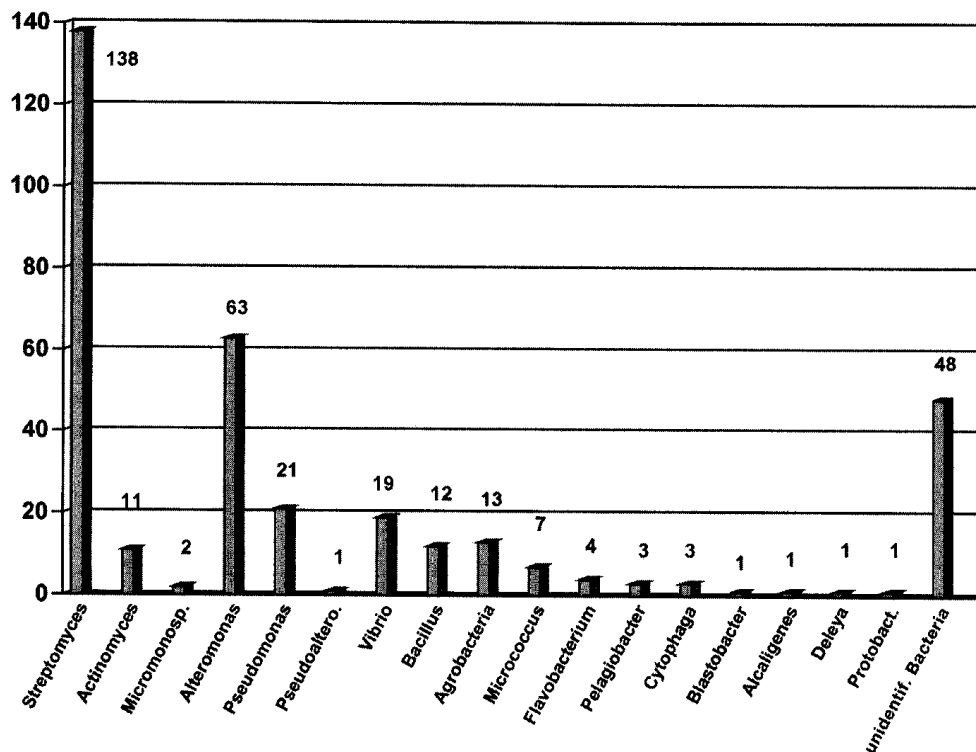


Abbildung 6: Taxonomische Verteilung der aus marinen Bakterien isolierten Naturstoffe²³.

Da sowohl die marine Flora als auch die marine Fauna bislang noch ungenügend untersucht worden sind, was wie oben geschildert vor allem auf den Bereich der marinen Mikroorganismen zutrifft, tut sich hier ein vielversprechendes Forschungsfeld auf.

1.2. Aufgabenstellung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in dem Auffinden neuer Sekundärmetabolite aus Bakterien und deren Strukturaufklärung. In Anlehnung an die zuvor geschilderten Strategien bei der Suche nach neuen, aktiven Naturstoffen stand damit die Auswahl eines geeigneten Bakterienstammes an erster Stelle. Hierzu wurden zunächst aus der Sammlung von marinen und terrestrischen Streptomycceten der Abteilung Laatsch neben der Farbigkeit der Bakterienkolonien oder des Substrates auch mor-

phologische Besonderheiten betrachtet. Entscheidend jedoch für eine engere Auswahl waren aber vor allem Auffälligkeiten sowohl im chemischen als auch biologischen Screening von vorliegenden Rohextrakten der Bakterienkulturen. Die immer noch ergiebige Quelle terrestrischer und mariner Streptomyceten sollte außerdem um weniger intensiv erforschte Bakterien der Gattung *Sphingomonas* und des *Cytophaga/ Flexibakterium-Clusters* aus der Nordsee ergänzt werden. Hierbei war jedoch nicht nur die Isolierung neuer Naturstoffe vorrangig, sondern da es sich um *typisch* marine Bakterienstämme handelt, sollten zudem mit den Möglichkeiten eines chemischen Labors auch Kultivierungsbedingungen optimiert werden. So sind nach den Angaben von Fenical und Jensen¹⁸ bislang weniger als 5 % der mikroskopisch erfaßten Mikroorganismen unter sogenannten Standardbedingungen kultivierbar, was gleichzeitig die Nutzung dieser großen Naturstoffressource beschränkt. Die Entwicklung neuer Kulturmedien mit spezifischen Nährstoffen und Wachstumsfaktoren ist daher unumgänglich. Außerdem läßt die Biosynthesechemie noch viele Fragen offen. So z.B. scheinen sich einerseits die Biosynthesewege zwischen marinen und terrestrischen Bakterien zu ähneln, bzw. von den Bedingungen des jeweiligen Habitats abhängig zu sein (z.B. sind nicht nur marine Bakterien in der Lage, Bromverbindungen zu produzieren, sondern auch terrestrische, wenn ihnen Brom zur Verfügung gestellt wird). Auf der anderen Seite existieren vermutlich Biosynthesewege, die ausschließlich bzw. typischerweise sog. rein marinen Mikroorganismen zuzuordnen sind (z.B. könnten hierzu die Pseudoalterobactine A und B zählen, die von als typisch marin geltenden *Pseudoalteromonas*-Bakterien produziert werden)³³.

Daher war bei der Untersuchung der Nordseebakterien im Rahmen dieser Arbeit auch die Erfassung von bereits bekannten Naturstoffen für die Aufklärung des Primär- und Sekundärmetabolismus von Bedeutung, entsprechend des Themas des Nordseeprojektes: „Sekundärmetabolite mariner Mikroorganismen aus der Nordsee in Abhängigkeit von ihrer Stellung im Phylogenetischen System.“

In diesem Zusammenhang waren ferner die Vergleiche zwischen dem Metabolitenmuster von terrestrischen mit marinen Streptomyceten bzw. den Bakterien aus der Nordsee interessant.

1.3. Screening nach Sekundärmetaboliten in Bakterienextrakten

Der Aufgabenstellung dieser Arbeit entsprechend, wurde eine Auswahl und Kombination von verschiedenen Screeningmethoden getroffen, die nachfolgend im

Detail besprochen werden. Dabei wurden Verfahren des biologischen, pharmakologischen und chemischen Screenings angewendet und die jeweiligen Screeningergebnisse differenziert bewertet. Einzelheiten zur Durchführung und zu den Bewertungskriterien finden sich in den entsprechenden Kapiteln „Biologisches-, Pharmakologisches- und Chemisches Screening“.

Hierbei wurde den Resultaten des chemischen Screenings oftmals die höhere Priorität eingeräumt, da so weitgehend ausgeschlossen werden konnte, daß chemisch interessante Verbindungen oder solche, die in anderen, zum Zeitpunkt des Primärscreenings noch nicht verwendeten Testsystemen möglicherweise aktiv wären, negativ selektiert wurden. Außerdem ließ das chemische Screening – wenn auch nur im begrenzten Umfang – im Gegensatz zu dem biologischen Screening eine Vorausschau auf die Art von Substanzklassen zu.

Dennoch gilt es im Einzelfall individuell zu entscheiden, so daß nicht ein zwar chemisch weniger interessanter, aber biologisch oder pharmakologisch dafür sehr auffälliger Bakterienstamm ununtersucht blieb.

Um detailliertere Strukturaussagen zu erhalten, wurden Sprühreagenzien eingesetzt, die aufgrund von spezifischen Farbreaktionen nur ganz bestimmte Strukturelemente nachweisen (z.B. weist Ehrlichs Reagenz durch rosa oder violette Farbreaktionen Indole nach). Für allgemeine Informationen über ein Substanzgemisch wurden universelle Sprühreagenzien (z.B. Anisaldehyd/Schwefelsäure) eingesetzt und UV-Absorption bzw. Fluoreszenz-löschende Eigenschaften der einzelnen Substanzen bzw. der einzelnen „spots“ auf dem Dünnschichtchromatogramm bewertet. Die Kombination dieser Informationen lieferte nicht nur Hinweise auf vorliegende Substanzklassen, sondern gab gleichzeitig Aufschluß über die Polaritätsverhältnisse der verschiedenen Komponenten der untersuchten Rohextrakte oder Fraktionen und diente damit gleichzeitig als Vorbereitung für den weiteren Aufarbeitungsprozeß, indem geeignete Fließmittelsysteme erstellt werden konnten. Außerdem ermöglichte die DC-Kontrolle innerhalb des Trennprozesses das schnelle Wiederauffinden einer gesuchten Substanz aus verschiedenen Fraktionen und gab in gewissen Grenzen Auskunft über die Reinheit der Substanz. Sämtlich verwendete Sprühreagenzien sowie die verwendete Fließmittelsysteme werden im Kapitel „Chemisches Screening“ ausführlich beschrieben.

Bei der Auswahl der biologischen Screeningmöglichkeiten lag der Focus auf der Untersuchung von antibiotischen, herbiziden und cytotoxischen Eigenschaften der Bakterienrohextrakte mit Hilfe von ausgewählten Testorganismen. Auch hierbei war - wie bereits erwähnt - zu beachten, daß bei einem rein biologisch dominierten Screening durch die Festlegung auf die oben geschilderte Auswahl an bioaktiven Eigenschaften, eine Vielzahl an möglichen Aktivitäten (wie z.B. antivirale, antiphlogistische, immunsuppressive Eigenschaften) unberücksichtigt blieben, wodurch eine Vielzahl an interessanten Verbindungen nicht selektiert werden würden, so daß das biologische Screening von zweiter Priorität war. Gleichmaßen wurde auch bei der Weiterbearbeitung der Extrakte verfahren, die vorzugsweise chemisch kontrolliert, jedoch mit ergänzender biologischer Fraktionierung erfolgten. Von den erhaltenen Reinsubstanzen wurden schließlich in pharmakologischen Testsystemen detaillierte Aktivitätsprofile erstellt, sowie cytotoxische Wirkungen in Krebszellinientests untersucht. Wichtig war also eine balancierte Nutzung von verschiedenen Screeningmöglichkeiten in einer zeitlich sinnvollen Reihenfolge.

Primärscreening

Das Primärscreening umfaßte im Vorfeld die Organisation der Stammhaltung der Bakterien, deren Kultivierung sowie anschließend der Rohextraktbereitung aus den Kulturen. Für die Stammhaltung wurden die von den verschiedenen Kooperationspartnern in Reinkulturen gelieferten Bakterienstämme auf Agarplatten mit entsprechendem Medium subkultiviert. Die erhaltenen Kulturen wurden schließlich fotografiert und morphologisch beschrieben, um auch noch nach einem längeren Zeitraum als Identifikationshilfe zu dienen. Die sporenbildenden Bakterien wurden zusätzlich als Erdkulturen gelagert und zusätzlich wie die Nordseebakterien als tiefgefrorene Glycerineinlagerungen in flüssigem Stickstoff archiviert. Von den angefertigten Subkulturen wurden Schüttelkulturen im 1 l-Maßstab hergestellt und für einen Zeitraum von drei Tagen fermentiert. Die Kulturbrühen wurden im Anschluß gefriergetrocknet und das auf diese Weise erhaltene Lyophilisat unter Ultraschall mit Ethylacetat extrahiert. Dabei vermeidet das Lyophilisieren der Kulturlösungen eine Emulsionsbildung bei der anschließenden Extraktion mit Ethylacetat, die bei Verwendung kleiner Kulturvolumina stark stören würde. Zu beachten war jedoch, daß bei diesem Verfahren sehr polare Bestandteile, so auch Medienkomponenten wie z.B. Zucker, extrahiert werden konnten, so daß in jedem Fall parallel entsprechende Blindproben angefertigt werden mußten. In der Regel werden die stark polaren Substanzen jedoch

bei der späteren Bearbeitung des Bakterienstammes in größerem Maßstab nicht mehr beobachtet, da wegen des größeren Kulturvolumens die Kulturbrühe direkt extrahiert wird. Die in unserer Abteilung etablierten und verwendeten Screeningverfahren werden nachfolgend im Detail besprochen.

Sekundärscreening

Die Auswahl eines Stammes basierte auf den Ergebnissen des Primärscreenings. Dagegen erfolgte das Sekundärscreening während der Aufarbeitung der aus Großkulturen (20 - 50 l-Maßstäbe in Schüttelkultur oder im Fermenter) erhaltenen Bakterienrohextrakte vorzugsweise unter chemisch kontrollierter, jedoch mit ergänzender biologischer Fraktionierung. Oft wurde dabei beobachtet, daß ein ursprünglich aktiver Rohextrakt während des Trennprozesses an Wirkung in den biologischen Tests verlor. Über die Ursache können in der Regel nur Spekulationen angestellt werden. War beispielsweise ein Rohextrakt des Primärscreenings aktiv und der aus dem Großansatz hervorgehende Extrakt inaktiv, konnten veränderte Kultivierungsbedingungen oder auch ein Plasmidverlust der Bakterien, Mutationen im Bakteriengenom oder Kontaminationen der Kulturen mit Fremdkeimen für den Verlust der Potenz des Bakterienstammes zur Produktion aktiver Substanzkomponenten ausschlaggebend sein. Aber auch Zersetzungserscheinungen der aktiven Verbindungen beim Aufarbeitungsprozeß der Extrakte könnten ursächlich sein. Ferner konnte ein Aktivitätsverlust hierbei auch durch das Aufheben von synergistisch wirkenden Effekten verschiedener Verbindungen, die nun in einzelnen Fraktionen getrennt voneinander vorlagen, zurückzuführen sein.

Biologisches Screening

Mit Hilfe des biologischen Screenings wurden die Rohextrakte der Bakterien auf antibiotische, herbizide sowie cytotoxische Eigenschaften geprüft. Dies sollte exemplarisch an ausgewählten Mikroorganismen, Algen und schließlich dem Salinenkrebs *Artemia salina* realisiert werden. Zu der Gruppe der Mikroorganismen gehörten die grampositiven Bakterien *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57, besitzt hohe Empfindlichkeit durch eine dünne Zellmembran) sowie der gramnegative Bakterienstamm *Escherichia coli* und schließlich der Hefepilz *Candida albicans* sowie der Pilz *Mucor miehei* (Tü 284). Zu den verwendeten Algen gehörten die Mikroalgen *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*

und *Scenedesmus subspicatus*. Für die Untersuchung der Mikroorganismen und Algen wurde der Agardiffusionstest als Testmethode gewählt. Dazu benutzte man Agarplatten, die einen Testorganismus gleichmäßig suspendiert enthielten. Die Rohextraktlösungen wurden in Filterpapierscheibchen (Durchmesser: 9 mm, 50 µl Auftragsvolumen) aufgesogen und zur Diffusion auf den Agar gelegt (Scheibchentest). Hierbei wurden die Rohextrakte in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol zu 100 mg/ml gelöst. Nach Bebrütung der Platten ließ sich bei Vorliegen eines wirksamen Extraktes ein Hemmhof um die aufgetragene Testlösung feststellen. Der Durchmesser dieser Hemmzone diente der Beurteilung der antibiotischen bzw. herbiziden Aktivität des Rohextraktes. So wurde ein Hemmhofdurchmesser von

11-20 mm als schwach wirksam,

21-30 mm als wirksam und

> 30 mm als stark wirksam bewertet.

Für den Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* wurden jeweils 20 µg des zu testenden Rohextraktes in 5 bis 10 µl Dimethylsulfoxid gelöst und zu 0.2 ml einer Nährlösung mit etwa dreißig Larven von *Artemia salina* gegeben. Nach 24 h wurde die Mortalitätsrate ermittelt. Dabei wurde eine Mortalitätsrate von

> 95 % als stark wirksam

60-95 % als wirksam

10-59 % als schwach wirksam

< 10 % als unwirksam bewertet.

Ferner wurde durch O. Kayser aus Berlin³⁶ Aktivitäten gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* und den Erreger der viszeralen Leishmaniose (Kala-Azar), *Leishmania donovani*, geprüft.

Pharmakologisches Screening

Das biologische Screening wurde durch pharmakologische Testsysteme ergänzt, bei denen spezifische Wirkungen der Testsubstanzen anhand von Zell- oder Rezeptormodellen überprüft wurden. Das pharmakologische Screening erfolgte in Koope-

ration mit pharmazeutischen Unternehmen und pharmakologischen Instituten. So teste die Firma Boehringer Mannheim im HTS-Verfahren erhaltene Rohextrakte in diversen Enzymassays, bei denen u.a. Inhibitoren der HIV-Protease oder der induktiven NO-Synthase (iNOS) gesucht wurden. Durch die Firma Onkotest³⁴ und Prof. Dr. med. W. Beil aus Hannover³⁵ wurden die cytotoxische Wirkung der Extrakte gegen verschiedene Krebszelllinien untersucht.

Das pharmakologische Screening war dabei vor allem den Reinsubstanzen vorbehalten, da die verwendeten Testverfahren eine hohe Empfindlichkeit aufwiesen. Eine Testung von komplexen Substanzgemischen birgt damit die Gefahr, daß gegebenenfalls auch Minderkomponenten für eine beobachtete Wirkung verantwortlich waren, welche schließlich jedoch aufgrund unzureichender Substanzmengen nicht isoliert werden könnten. In diesem Zusammenhang war auch der finanzielle Aufwand zu berücksichtigen, der mit den pharmakologischen Testsystemen verbunden war. So sollten im Idealfall Reinsubstanzen eingesetzt werden, deren Struktur aufgeklärt war, um bei bekannten Verbindungen sicherstellen zu können, daß die betreffenden Substanzen auf die zu untersuchenden pharmakologischen Eigenschaften nicht bereits getestet worden sind.

Nur in besonderen Fällen wurden auch Rohextrakte oder Fraktionen in den pharmakologischen Tests untersucht, z.B. wenn es darum ging, gezielt nach Verbindungen zu suchen, die in diesen Testsystemen aktiv sind, oder um die biologische und pharmakologische Potenz eines Bakterienstammes möglichst umfassend zu beschreiben. Letzteres traf beispielsweise auf die Untersuchung der Nordseebakterien zu.

In der vorliegenden Arbeit wird bis auf Ausnahmen nur auf positive Testergebnisse verwiesen

Chemisches Screening

Das chemische Screening wurde im Wesentlichen von der Analyse der Rohextrakte mit Hilfe der schnell und einfach durchführbaren sowie preiswerten Dünnschichtchromatographie bestimmt. Hierzu wurden die DC-Platten in einem Fließmittelsystem aus Chloroform und Methanol entwickelt. Um einen möglichst breiten Polaritätsbereich zu erfassen, wurden Konzentrationen von 5 % und 10 % Methanol verwendet. Gegebenenfalls wurde Methanol auch durch Isopropanol ersetzt, um bessere Trennungen im mittleren Polaritätsbereich zu erzielen. Alternativ wurden auch

Mischungen aus Cyclohexan und Ethylacetat eingesetzt, was bei einigen Fraktionen zur besseren Trennleistung führte. Anschließend wurden die Chromatogramme bei Tageslicht und unter UV-Licht (254 nm) bewertet und durch Fotografien dokumentiert. Hiernach wurden die Chromatogramme mit unterschiedlich selektiven Sprühreagenzien behandelt und abermals fotografiert:

Anisaldehyd/Schwefelsäure ist ein universelles Sprühreagenz für Naturstoffe, welches Farbdifferenzierungen zuläßt und damit auf bestimmte Substanzklassen hinweisen kann. So werden z.B. Makrolide, Phenole, Sapogenine und höhere Alkohole grau, Glycoside braun und Steroide meist violett angefärbt.

Ehrlichs Reagenz weist Indole durch rosa/violette Farbreaktion nach. Harnstoffe, Pyrrole und Furane werden braun, N-Heterocyclen grau.

INPTC (2-[p-Iodophenyl]-3-[p-nitrophenyl]-5-phenyl-2H-tetrazoliumbromid) ist ein sehr selektives Sprühreagenz, mit dem Carbonyl- und Thiocarbonylverbindungen nachgewiesen werden können (gelbe bis orange Flecken auf dem Dünnschichtchromatogramm).

Palladiumchlorid-Sprühreagenz weist organisch gebundenen Schwefel durch gelbe Farbreaktion nach.

Eisen(III)-chlorid-Sprühreagenz: frisch hergestellte 2 %ige wässrige Lösung von Eisen(III)-chlorid. Hydroxamsäuren und deren Derivate werden durch Komplexbildung mit Eisen(III)-Ionen rot gefärbt, Phenole zeigen eine grünblaue oder violette Farbreaktion, Brenzcatechine geben eine grüne Farbreaktion.

Fluorescein-Natrium-Sprühreagenz (mit Wasserstoffperoxid) weist organisch gebundenes Halogen nach, indem die Halogenatome oxidativ aus der entsprechenden Verbindung gespalten werden. Das resultierende Halogenmolekül reagiert im Anschluß mit Fluorescein zu dem rosa Farbstoff Eosin.

Mit *konzentrierter Schwefelsäure* wurden v.a. gelbe Verbindungen betüpfelt, um durch Schwarzfärbung Polyene und durch Grün- oder Blaufärbung Carotinoide zu erkennen. Gelbe oder rötliche Verbindungen wurden zusätzlich mit *Natronlauge* betüpfelt, um bei roter oder violetter Farbänderung auf das Vorliegen von *peri-Hydroxychinonen* schließen zu können.

Wie das Beispiel der *Bioautographie* zeigt, lassen sich biologische und chemoanalytische Screeningmethoden im gewissen Umfang auch in einem Schritt kombinieren. Hierbei wird das Dünnschichtchromatogramm eines Rohextraktes oder einer Fraktion auf eine mit Testorganismen beimpfte Agarplatte gebracht. Zuvor ließ man das Fließmittel von dem Dünnschichtchromatogramm vollständig verdunsten und schnitt die Folie anschließend so an, daß die Substanzen in den Agar diffundieren konnten und Hemmhöfe ggf. sichtbar wurden. Die auf diese Weise präparierte Kultur ließ man 24 h bei 37 °C wachsen. In entsprechender Spotlage war dann bei bestehender Aktivität ein Hemmhof zu beobachten. Diese Methode ermöglicht eine frühe Erkennung der Korrelation von Substanz und Wirkung und wurde hier im Einzelfall genutzt.

Außerdem wurden die Rohextrakte unter Verwendung eines Diodenarray-Detektors (DAD) durch HPLC analysiert. Die erhaltenen Chromatogramme und UV/VIS-Spektren wurden anschließend mit denen von Reinverbindungen in einer internen Datenbank verglichen. Hierdurch können oftmals sehr wertvolle Informationen über die Struktur des Chromophors einer Verbindung erhalten werden, die für die spätere Strukturaufklärung hilfreich sind oder die Beurteilung erleichtern, ob die Weiterbearbeitung des Extraktes lohnenswert ist bzw. unter welchen Trennbedingungen diese erfolgen könnte.

Untersuchung ausgewählter Bakterien-Stämme

Die Auswahl der Bakterienstämme richtete sich neben der Auswertung des Primärscreening-Ergebnisses auch nach der Quelle der Bakterien. So wurden Bakterien aus der abteilungsinternen Sammlung terrestrischer und mariner Streptomycceten untersucht. Zusätzlich standen Bakterien aus der Nordsee zur Verfügung. Die Rohextrakte wurden schließlich grob durch Vakuum-Säulenchromatographie (Vakuum-Liquid-Chromatographie = VLC) oder Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel mit unterschiedlichen Gradientensystemen vorgetrennt und mit Hilfe von präparativer Dickschichtchromatographie (PDC), Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 und durch HPLC gereinigt. Die Vakuum-Säulenchromatographie wurde außer zur Vortrennung von Rohextrakten auch zur Aufarbeitung von komplexen Rohextraktfraktionen eingesetzt und hat sich hierbei als besonders zeitsparende und effektive Methode erwiesen. Da sich der Aufarbeitungsprozeß nach den jeweiligen Eigenschaften der Rohextrakte (wie Polarität der Substanzkomponenten, Komplexität der Zusammensetzung der Rohextrakte) richtete, konnte kein einheitliches Isolierschema

vorgeben werden: letzteres basierte immer auf den vorliegenden Bedingungen. Von den erhaltenen Reinsubstanzen wurden zunächst Massenspektren, ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen und die hierdurch erhaltenen Informationen über vorliegende Substrukturen der entsprechenden Verbindung mit Hilfe von AntiBase[®] analysiert. Zu diesem Zeitpunkt konnte oftmals schon abgeschätzt werden, ob ein neuer oder bekannter Naturstoff vorlag bzw. welcher Naturstoffgruppe die Verbindung zuzuordnen war. Konnte nach der Datenbankrecherche kein passender Eintrag für die isolierte Verbindung gefunden werden, oder war im Falle einer vermutlich bekannten Verbindung kein NMR-Datenvergleich möglich, wurden zur weiteren Strukturauflärung bzw. eindeutigen Identifizierung der Struktur H,H-COSY-Spektren sowie HSQC- und HMBC-Spektren gemessen und ausgewertet. War hier nach schließlich die Struktur der Verbindung bekannt, wurde durch erneute Suche in den Datenbanken AntiBase[®], Chemical Abstracts, Beilstein und „Dictionary of Natural Products“ (DNP) geklärt, ob es sich um einen neuen Naturstoff, bzw. noch nicht veröffentlichten Verbindung handelte. Abschließend wurden durch biologische und pharmakologische Untersuchungen, detaillierte Aktivitätsprofile der neuen Naturstoffe erstellt. Dabei wurde auf die Testsysteme zurückgegriffen, die in den Kapiteln „Biologisches Screening“ und „Pharmakologisches Screening“ beschrieben worden sind.

Terrestrische Streptomyceten

Stamm GW13/580

Der terrestrische Streptomycet GW13/580 fiel im biologischen Screening durch eine jeweils mittlere Aktivität des Stammextraktes gegen die Testkeime *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) und *Candida albicans* auf. Gegen *Artemia salina* wurde eine Mortalitätsrate von 25 % festgestellt. Im chemischen Screening waren bei Tageslicht zwei intensiv gelbe polare Zonen auffällig, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure schwarz verfärbten.

Der Stamm wurde zur näheren Untersuchung als 15 l-Schüttelkultur fermentiert. Die Kulturbrühe sowie die Zellmasse wurden jeweils mit Ethylacetat extrahiert. Der Rohextrakt dieser 15 l-Schüttelkultur wurde durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel und Säulenchromatographie an Sephadex in mehrere Fraktionen getrennt, wobei allein die nach biologischer Kontrolle gegen *Escherichia coli*,

Bacillus subtilis, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) und *Candida albicans* aktiven Fraktionen weiter untersucht worden sind. Die Hemmtestergebnisse der ausgewählten Hauptfraktionen sind in Tabelle 18 (Experimenteller Teil) aufgeführt.

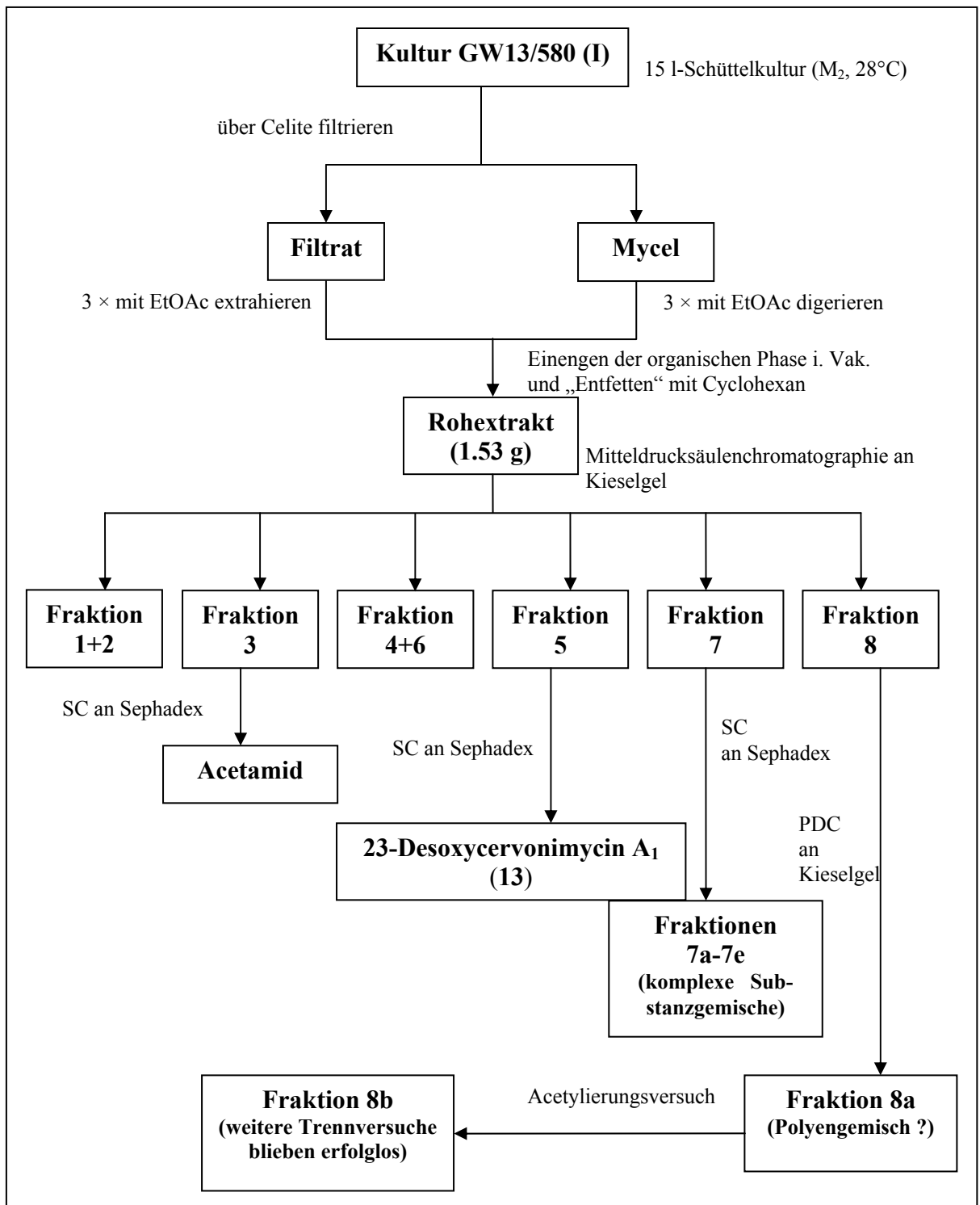


Abbildung 7: Aufarbeitungsschema für die 15 l-Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. GW13/580. SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie.

Acetamid

Die Fraktion 3 lieferte nach Säulenchromatographie an Sephadex einen farblosen Feststoff, welcher bei Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum als kristallines Sublimat anfiel. Die Masse der Verbindung betrug nach dem EI-Massenspektrum $m/z = 59.0$. Unter Berücksichtigung der beschriebenen Eigenschaften war dies ein Hinweis auf die Verbindung Acetamid. Die Dünnschichtchromatogramme des erhaltenen Sublimats und von authentischem Acetamid zeigten übereinstimmende R_f -Werte. Damit sowie durch das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte die Verbindung leicht als Acetamid identifiziert werden. Ob das isolierte Acetamid tatsächlich ein Stoffwechselprodukt des Stammes GW13/580 war, bleibt zu diskutieren. Möglicherweise könnte es auch ein Abbauprodukt der ebenfalls aus Stamm GW13/580 isolierten Cervinomycine sein. In der Literatur wurden jedoch hierzu bislang keine Veröffentlichungen gefunden. Da Acetamid industriell als Lösungsmittelzusatz oder Weichmacherstabilisator verwendet wird, war hiernach ebenfalls nicht auszuschließen, daß das isolierte Acetamid ein Artefakt war.

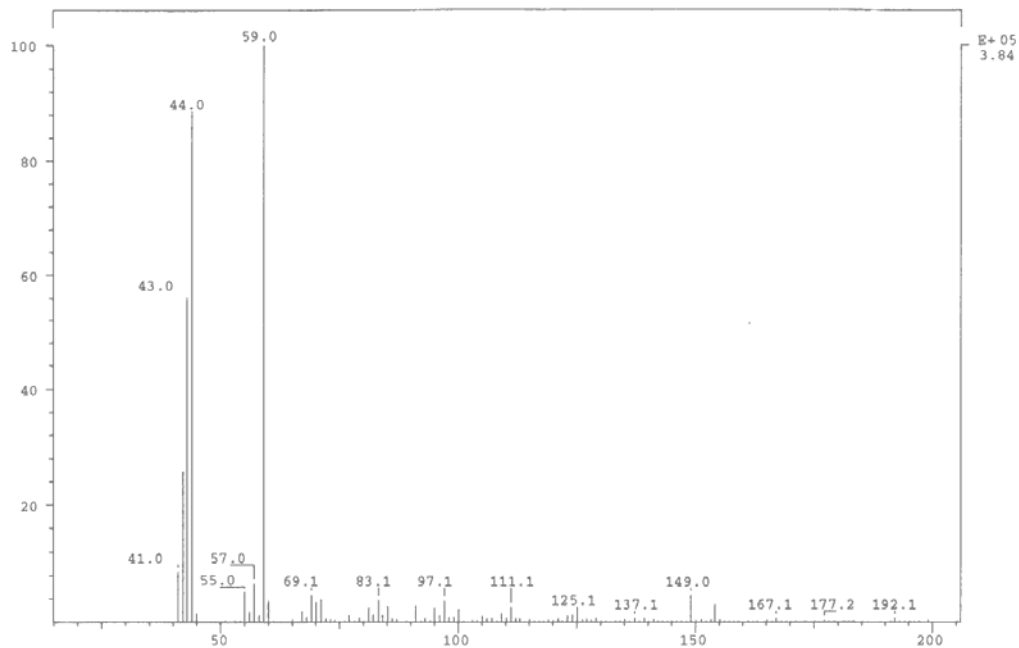


Abbildung 8: EI-MS (70 eV) von Acetamid.

23-Desoxycervinomycin A₁

Aus Fraktion 5 erhielt man nach Säulenchromatographie an Sephadex eine in sämtlichen Lösungsmitteln schwerlösliche gelbe Verbindung, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure schwach rötlich verfärbte. Das EI-Massenspektrum zeigte einen Molekülpeak bei $m/z = 513$, der durch ein CI-Massenspektrum bestätigt wurde. Durch EI-Hochauflösung konnte die Summenformel zu $C_{29}H_{23}NO_8$ bestimmt werden. Demnach mußte die Verbindung aufgrund der ungeraden Massenzahl eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen enthalten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren zwei Singulets mit den Intensitäten von jeweils 1H bei $\delta = 14.74$ und 10.07 auffällig, von denen das erste wegen der charakteristischen Tieffeldverschiebung eindeutig einer chelierten Hydroxygruppe zuzuordnen war. Da die Substanz mit Natronlauge keine Farbreaktion zeigte, wurde ein *peri*-Hydroxychinon ausgeschlossen. Das Singulett bei $\delta = 10.07$ konnte einer phenolischen Hydroxygruppe oder einem Aldehyd-Proton entsprechen; da kein D_2O -Austausch durchgeführt wurde, war allerdings eine andere Ursache nicht auszuschließen. Bei $\delta = 8.37$ und 7.81 lagen zwei 1H-Dubletts mit leichtem Dacheffekt und einer identischen Kopplungskonstanten von 9 Hz, was auf *ortho*-ständige Protonen schließen ließ. Außerdem zeigte der aromatisch-olefinische Bereich drei weitere Singulets der Intensität von je 1H bei $\delta = 7.59$, 7.40 und 7.17 , was nur durch mehrere unabhängige Aromaten oder ein ausgedehntes aromatisches System zu erklären war. Im aliphatischen Bereich lag bei $\delta = 4.23$ ein Multipllett der Intensität von 2H, das nach dem HSQC-Spektrum einer Methylengruppe entsprach.

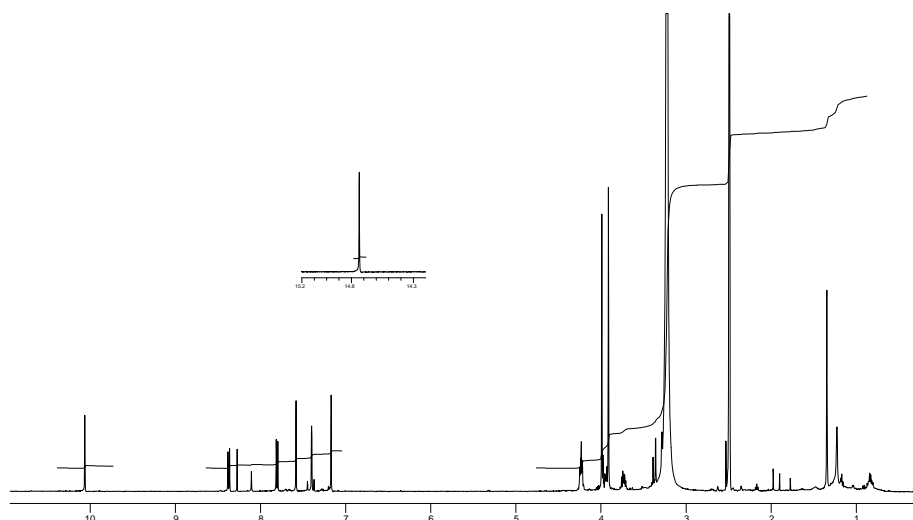


Abbildung 9: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz) von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei $50\text{ }^\circ\text{C}$.

Diesem folgten zwei Singulettts der Intensität von jeweils 3H, deren chemische Verschiebung ($\delta = 3.99$ und 3.91) charakteristisch für die Protonen aromatisch gebundener Methoxygruppen war. Ferner wurden zwei Multipletts bei $\delta = 3.95$ und 3.74 sowie zwei Dubletts $\delta = 3.37$ und 3.27 mit einer Intensität von je 1H festgestellt. Die beiden letztgenannten Signale waren dabei zum größten Teil durch ein breites Wassersignal überlagert. Den Abschluß bildete ein Singulett der Intensität von 3H bei $\delta = 1.35$ für eine Methylgruppe. Eine Substruktursuche in AntiBase[®] unter Berücksichtigung der Molmasse, der Anzahl an Methyl- und Methoxygruppen sowie der *ortho*-ständigen Protonen führte zu 77 Einträgen, von denen aber nur sieben das Auftreten von drei aromatischen Singulettts erklären konnten und dabei eine ungerade Stickstoffanzahl aufwiesen. Hierunter war die Gruppe der Cervinomycine vertreten. Da jedoch keine der Verbindungen exakt auf die gemessenen Daten paßte, war die Verbindung 23-Desoxycervinomycin A₁ sehr wahrscheinlich neu.

Das ¹³C-NMR-Spektrum (DMSO) wies bei $\delta = 175.3$ ein Signal auf, welches einem Carbonylkohlenstoffatom in einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester oder einem Aldehyd entsprechen könnte. Die sieben Signale bei $\delta = 164.8$ - 140.8 schienen aromatische Kohlenstoffatome mit Sauerstoffverknüpfung anzuzeigen. Außerdem lagen im Bereich sp^2 -hybridisierter C-Atome 14 Signale, wobei dasjenige bei $\delta = 100.0$ auch einem acetalischen Kohlenstoffatom zugeordnet werden konnte. Hierzu fehlte jedoch ein entsprechendes Signal im ¹H-NMR-Spektrum, so daß man eventuell von einem Ketal ausgehen konnte. Entsprechende Überlegungen galten für das Signal bei $\delta = 92.0$. Im Bereich der Aliphaten verblieben noch fünf Signale. Dabei waren die Signale bei $\delta = 56.2$ und 55.8 sehr wahrscheinlich C-Atomen von Methoxygruppen zuzuordnen, was den 3H-Singulettts bei $\delta = 3.99$ und 3.91 im ¹H-NMR-Spektrum entsprach. Das Signal bei $\delta = 22.1$ mußte der bereits vermuteten Methylgruppe zuzuordnen sein.

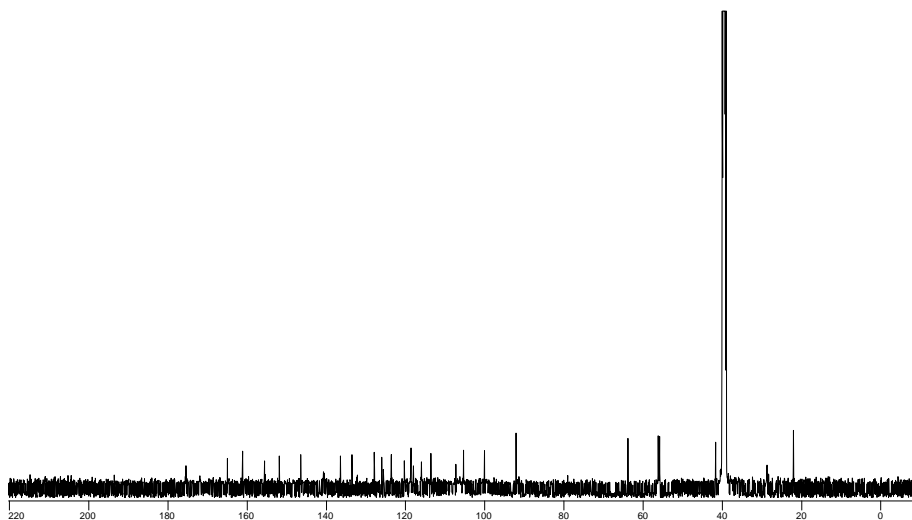


Abbildung 10: ^{13}C -NMR-Spektrum (500 MHz) von 23-Desoxycervinomycin A_1 (**13**) in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei $50\text{ }^\circ\text{C}$.

Im HSQC-Spektrum war eine Kopplung des Protons bei $\delta = 10.07$ auf das C-Atom bei $\delta = 115.9$ auffällig, wobei es sich demnach um ein ungewöhnlich stark tieffeldverschobenes aromatisches Proton handeln mußte. Damit konnten die nach dem ^1H -NMR-Spektrum vermutete phenolische Hydroxygruppe oder ein Aldehyd ausgeschlossen werden. Im HMBC-Spektrum koppelte dieses Proton auf die quartären C-Atome bei $\delta = 117.9$, 125.5 , 141.1 und 175.3 . Das Proton bei $\delta = 7.81$ zeigte im HMBC-Spektrum Kopplungen auf die quartären C-Atome bei $\delta = 117.9$, 136.33 und 125.5 . Im H,H-COSY-Spektrum konnte eine Korrelation zu dem Proton bei $\delta = 8.37$ beobachtet werden, was das Vorliegen von *ortho*-ständigen Protonen und damit die entsprechende Vermutung nach Bewertung des ^1H -NMR-Spektrums stützte. Dabei zeigte das Proton bei $\delta = 8.37$ im HMBC-Spektrum Korrelationen zu den quartären C-Atomen bei $\delta = 136.3$, 125.9 und 140.8 sowie eine schwache Kopplung auf das C-Atom bei 117.9 . Ferner konnten im HMBC-Spektrum Kopplungen von dem Proton bei $\delta = 7.40$ auf die Kohlenstoffatome bei $\delta = 136.3$, 117.9 , 107.2 und 40.1 festgestellt werden. Auf das C-Atom bei $\delta = 107.2$ koppelten außerdem das Proton bei $\delta = 3.37$ und das Proton der chelierten Hydroxygruppe bei $\delta = 14.74$. Letzteres koppelte zu den C-Atomen bei $\delta = 161.0$ und 117.9 . Damit mußte die Hydroxygruppe an das C-Atom bei $\delta = 161.0$ gebunden sein. Aus den geschilderten Korrelationen ließ sich das in Abbildung 13 vorliegende Strukturfragment I mit Phenanthren-Grundgerüst ableiten.

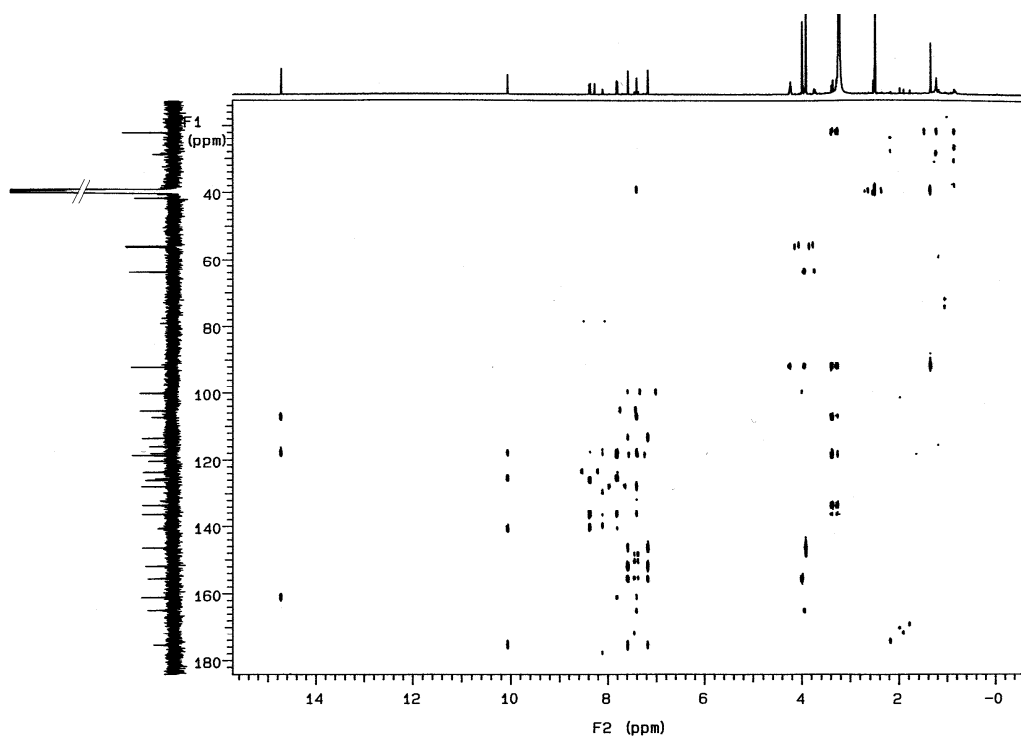


Abbildung 11: HMBC-Spektrum (500 MHz) von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) in DMSO.

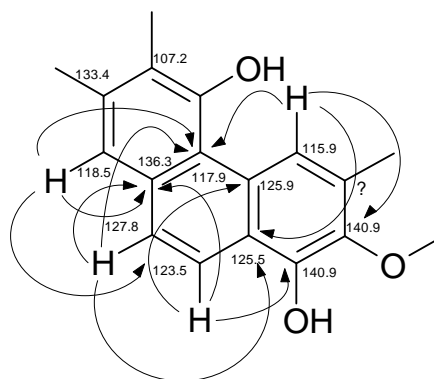


Abbildung 12: Die wichtigsten HMBC-Kopplungen des Strukturfragments I.

Den HSQC-Korrelationen zufolge, waren an die Methylengruppe bei $\delta_c = 39.9$ die Protonen mit Signalen bei $\delta = 3.27$ und 3.37 gebunden. Dabei zeigte das Proton bei $\delta = 3.37$ Kopplungen auf die C-Atome bei $\delta = 107.2$, 133.4 , 118.5 des Fragments I, so daß von dieser Methylengruppe ausgehend das Strukturfragment II erschlossen wurde. So war von dem Proton bei $\delta = 3.27$ dieser Methylengruppe eine schwache

Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 136.3$ zu beobachten. Ferner waren Kopplungen zu den C-Atomen bei $\delta = 92.0$ und 22.1 vorhanden. Dabei wurde für das quartäre C-Atom bei $\delta = 92.0$ wegen der charakteristischen chemischen Verschiebung, zunächst ein Ketal angenommen (ein Acetal wurde wegen des Fehlens eines entsprechenden Signals im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ausgeschlossen). Auf dieses C-Atom koppelten neben den Protonen der Methylgruppe bei $\delta = 1.35$ die Methylenprotonen bei $\delta = 4.26\text{--}4.20$, die an das C-Atom bei $\delta = 63.8$ gebunden waren und das Proton mit Multipllett bei $\delta = 3.98\text{--}3.93$, welches an die Methylengruppe bei $\delta = 41.7$ gebunden war. Durch H,H-COSY Korrelationen konnte nachgewiesen werden, daß beide Methylengruppen benachbart waren. Da außer dem C-Atom bei $\delta = 164.8$ nach Auswertung sämtlicher HMBC-Korrelationen keine weiteren C-Atome in diesem Abschnitt zu erwarten waren, schien das hiernach erstellte Fragment II mit den beiden benachbarten Methylengruppen abgeschlossen zu sein (siehe Abbildung 14). Damit mußten die C-Atome bei $\delta = 63.8$ und 41.7 jeweils direkt an die Sauerstoffatome des Ketals anschließen.

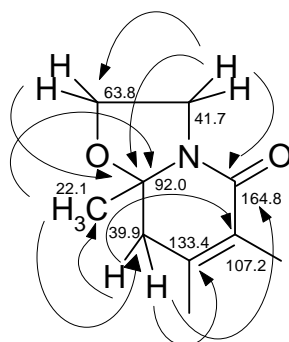


Abbildung 13: Die wichtigsten HMBC-Kopplungen des Strukturfragments II.

Für eine Methylenkohlenstoff-Sauerstoffverknüpfung war das entsprechende Signal mit $\delta = 41.7$ ungewöhnlich stark hochfeldverschoben, wenn auch entsprechende Werte bei Epoxiden gefunden werden. Unerklärlich war jedoch die große Differenz von $\Delta\delta \approx 22$ für die chemischen Verschiebungen der postulierten Alkoxygruppen, die auf die ähnliche chemische Umgebung nicht paßt. Plausibler war daher eine Verknüpfung zu einem Stickstoffatom, welches nach der Summenformel im Molekül enthalten sein mußte. Dann würde an dieses Stickstoffatom das C-Atom bei $\delta = 164.8$ anschließen. Hierfür sprachen neben der chemischen Verschiebung, die HMBC-Kopplungen der Methylenprotonen bei $\delta = 3.98\text{--}3.93$ bzw. $3.78\text{--}3.70$ zu diesem C-Atom. Zusätzlich waren Kopplungen des aromatischen Protons bei $\delta = 7.40$

auf das C-Atom bei $\delta = 107.2$ zu sehen. Daher mußte das Carbonylkohlenstoffatom zwischen dem Stickstoffatom und dem aromatischen C-Atom bei $\delta = 107.2$ positioniert sein. Dies wurde auch durch die Kopplung der chelierten Hydroxygruppe bei $\delta = 14.74$ auf das C-Atom bei $\delta = 107.2$ bestätigt. Das Strukturfragment II wies damit ein *N,O*-Ketal und ein Lactam als Strukturelemente auf (siehe Abbildung 15). Zuletzt wurde anhand von HMBC-Korrelationen das Strukturfragment III aufgeklärt (siehe Abbildung 15).

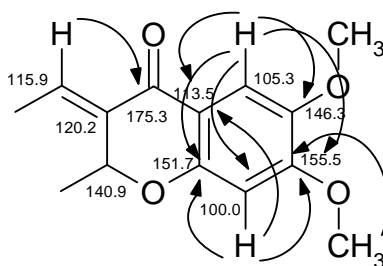


Abbildung 14: Die wichtigsten HMBC-Kopplungen des Strukturfragments III.

Hierzu wurde das Kopplungsmuster der beiden verbliebenen aromatischen Protonen bei $\delta = 7.59$ und 7.17 ausgewertet. Aufgrund der HSQC-Korrelationen wurden sie den C-Atomen bei $\delta = 105.3$ bzw. 100.0 zugeordnet. Dabei zeigte das Proton bei $\delta = 7.17$ Kopplungen auf die quartären C-Atome bei 113.5 , 151.7 und 155.5 . Die nach $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zu erwartenden Methoxygruppen konnten durch HMBC-Kopplungen lokalisiert werden. So koppelten die Protonen bei $\delta = 3.99$ auf die C-Atome bei $\delta = 100.0$, 146.3 und 155.5 . Die Protonen bei $\delta = 3.91$ wiesen dagegen eine schwache Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 105.3$ und eine stärkere Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 146.3$ auf. Damit mußte die Methoxygruppe mit der chemischen Verschiebung von $\delta = 56.2$ und den Protonen bei $\delta = 3.99$ mit dem C-Atom bei $\delta = 155.5$ verknüpft sein. Die Methoxygruppe mit $\delta_{\text{C}} = 55.8$ und $\delta_{\text{H}} = 3.91$ war hiernach an das C-Atom bei 146.3 gebunden. Nun verblieben die C-Atome bei $\delta = 120.2$ und 175.3 . Da das aromatische Kohlenstoffatom bei 151.7 wegen der relativen Tieffeldlage sehr wahrscheinlich eine Sauerstoffverknüpfung aufwies, mußte das C-Atom bei $\delta = 113.5$ mit dem Carbonylkohlenstoffatom bei $\delta = 175.3$ verknüpft sein, da auch hierauf eine Kopplung des Protons bei $\delta = 7.59$ festzustellen war. Zu dem C-Atom bei $\delta = 120.2$ konnte keine HMBC-Kopplungen beobachtet werden, jedoch kam als einzige mögliche Position das in Fragment I noch

nicht charakterisierte C-Atom in Frage. Dieses war demnach mit dem C-Atom bei $\delta = 175.3$ verbunden, wofür auch die Kopplung des Protons bei $\delta = 10.07$ sprach. Hiermit war die Verknüpfung der Strukturfragmente festgelegt (siehe Abbildung 16), was zu der Verbindung 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) führte. Die auffällige Tieffeldverschiebung des Protons bei $\delta = 10.07$ konnte eventuell auf den entschirmenden Einfluß der Hydroxygruppe in Position C-26 zurückzuführen sein. Zwischen deren Sauerstoffatom und dem Proton bei $\delta = 10.07$ könnte eine Wasserstoffbrücke vorliegen, welche wegen der angularen Struktur des Moleküls relativ stabil sein müßte.

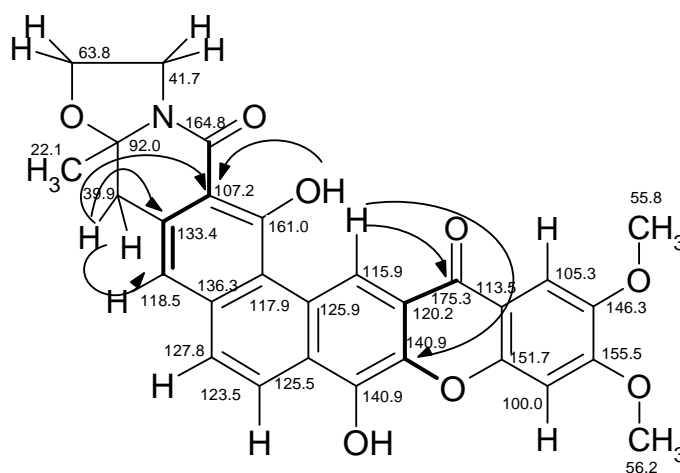
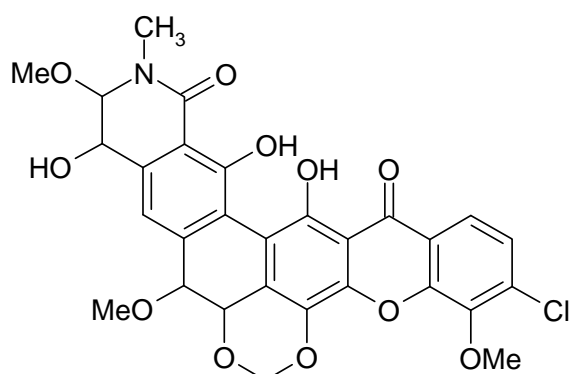
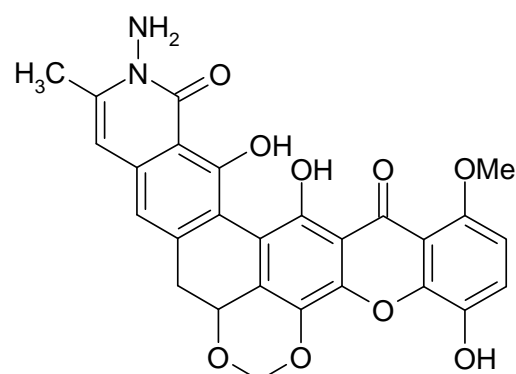


Abbildung 15: Wichtige HMBC-Kopplungen für die Verknüpfung der Strukturfragmente I – III. Die fettgedruckten Bindungen zeigen die Verknüpfungsstellen der einzelnen Fragmente an.

23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) wurde weder in den Datenbanken Chemical Abstracts, Beilstein noch in AntiBase[®] oder dem Dictionary of Natural Products (Chapman & Hall) gefunden und ist damit ein neuer Naturstoff. Bei 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) handelte es sich um ein Derivat von Cervinomycin A₂ (**14**) bzw. dessen Hydrochinon, Cervinomycin A₁ (**15**). Dabei ist **13** mit dem Hydrochinonderivat Cervinomycin A₁ bis auf die OH-Gruppe in Position C-23 identisch, die bei 23-Desoxycervinomycin A₁ fehlt. Damit kann **13** den Xanthonantibiotika zugeordnet werden, zu denen außerdem z.B. die Verbindungen Lysolipin I (**11**) und Albofungin (**12**) gehören, die aber auch im Gegensatz zu **13** an dem C-23 entsprechenden Position eine Hydroxgruppe tragen.

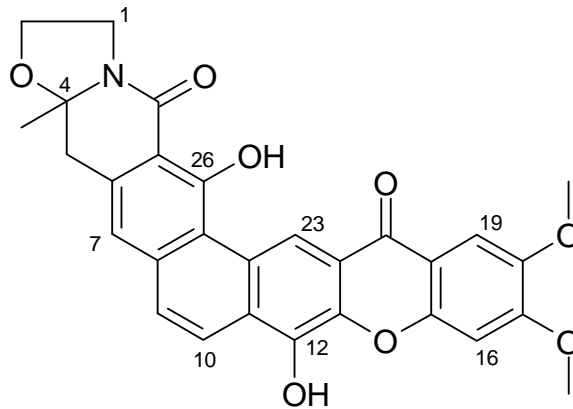


11



12

23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) zeigte in den Tests gegen neun verschiedene Krebs-Zelllinien mit $IC_{50} = 0.74 \mu\text{g/ml}$ eine relativ hohe und selektive cytotoxische Wirkung gegen LXFL 529L-Zellen (Zellen eines humanen Lungenkarzinoms). Außerdem wurde die Aktivität von **13** gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* geprüft³⁶, wobei im Vergleich zu dem Standard Chloroquin aber deutlich geringere Aktivitäten gefunden wurden. Verwendet wurden dabei der Chloroquin-resistente *Plasmodium falciparum* Stamm K1 sowie der Chloroquin-empfindliche Stamm NF54. ($IC_{50} K1_{(23\text{-Desoxycervinomycin A}_1)} = 968 \text{ ng/ml}$, $IC_{50} K1_{(\text{Chloroquin})} = 70 \text{ ng/ml}$; ($IC_{50} NF54_{(23\text{-Desoxycervinomycin A}_1)} = 950 \text{ ng/ml}$, $IC_{50} NF54_{(\text{Chloroquin})} = 3.7 \text{ ng/ml}$.) Da von **13** insgesamt nur 3.0 mg isoliert worden sind, konnten zunächst umfangreichere biologische bzw. pharmakologische Untersuchungen nicht durchgeführt werden.



13

Bearbeitung des Rohextraktes (II)

Um die Substanz **13** in größerer Menge zu gewinnen, wurde der Stamm GW13/580 im 50 l-Maßstab nachfermentiert und der nach Aufarbeitung resultierende Rohextrakt als GW13/580 (II) bezeichnet.

Die Fraktion 2 lieferte nach Waschen mit Methanol und anschließender präparativer Dickschichtchromatographie zwei Reinsubstanzen, deren Molmassen durch ESI-Massenspektrometrie zu $m/z = 527$ (**14**) und $m/z = 529$ (**15**) bestimmt wurden. Hierbei war auffällig, daß diese Molmassen mit denen des Redoxpaares von Cervinomycin A₁/ Cervinomycin A₂ übereinstimmten und zudem aus dem Rohextrakt I des Stammes GW 13/580 das Cervinomycin-Derivat 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) isoliert worden war. Damit lag die Vermutung nahe, daß es sich bei den hier isolierten Verbindungen um Cervinomycin A₁ und Cervinomycin A₂ handeln konnte.

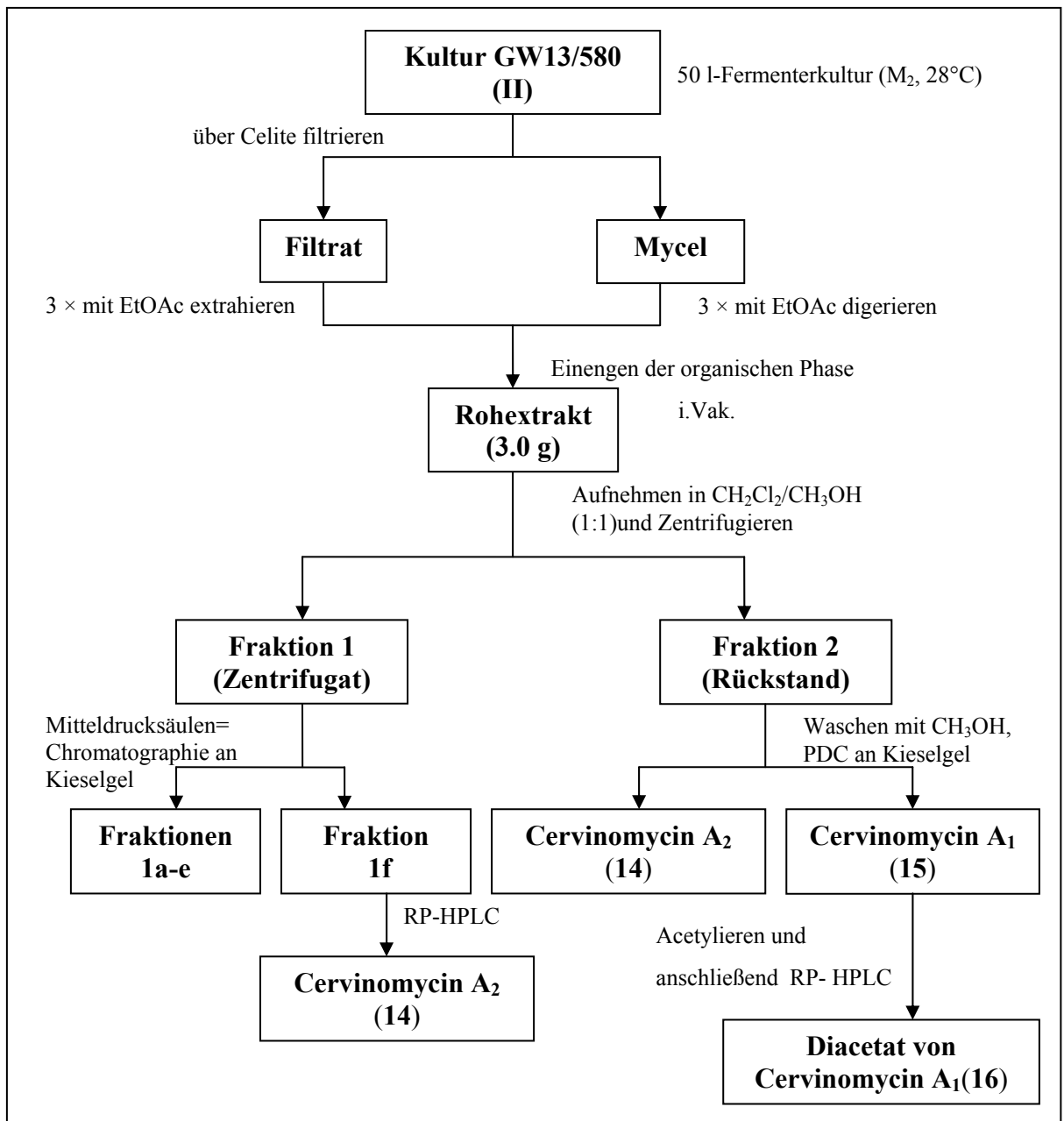


Abbildung 16: Aufarbeitungsschema für *Streptomyces* sp. GW13/580 (II) (SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie)

Cervinomycin A₂

Die Verbindung **14** mit der Molmasse von $m/z = 527$ zeigte im ¹H-NMR-Spektrum ein Singulett bei $\delta = 13.76$ für das Proton einer chelierten Hydroxygruppe an. Ferner waren im aromatischen Bereich Dubletts für zwei *ortho*-ständige Protonen bei $\delta = 8.30$ und 7.90 sowie drei Singuletts bei $\delta = 7.65$, 7.15 und 7.13 zu erkennen.

Die Signale bei $\delta = 4.25$ und 3.30 - 3.20 wurden aufgrund der Intensität von jeweils $2H$ und der charakteristischen chemischen Verschiebung Methylengruppen zugeordnet. Die Multipletts bei $\delta = 4.05$ und 3.79 - 3.75 mit einer Intensität von jeweils $1H$ wurden nach Vergleich mit den Literaturwerten für Cervinomycin A_2 ³⁷ auf eine Methylengruppe zurückgeführt. Die Singulets bei $\delta = 4.02$ und 4.01 zeigten die erwarteten aromatischen Methoxygruppen an, und zuletzt verblieb das Signal bei $\delta = 1.39$ für eine aliphatische Methylgruppe. Alle Werte und Signalinterpretationen standen in Übereinstimmung mit Cervinomycin A_2 (**14**).

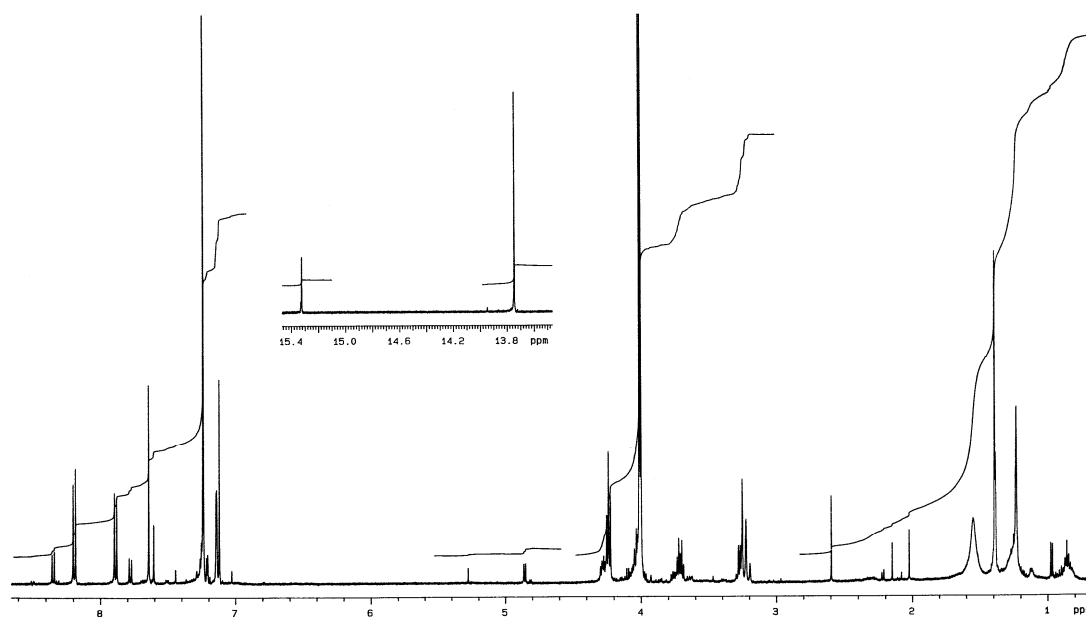


Abbildung 17: 1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cervinomycin A_2 (**14**) in $CDCl_3$.

Auch die Werte des ^{13}C -NMR-Spektrums von **14** zeigten keine nennenswerten Abweichungen zu den Literaturdaten von Cervinomycin A_2 ³⁷ (siehe Tabelle 2). Damit wurde die Verbindung (**14**) als Cervinomycin A_2 identifiziert.

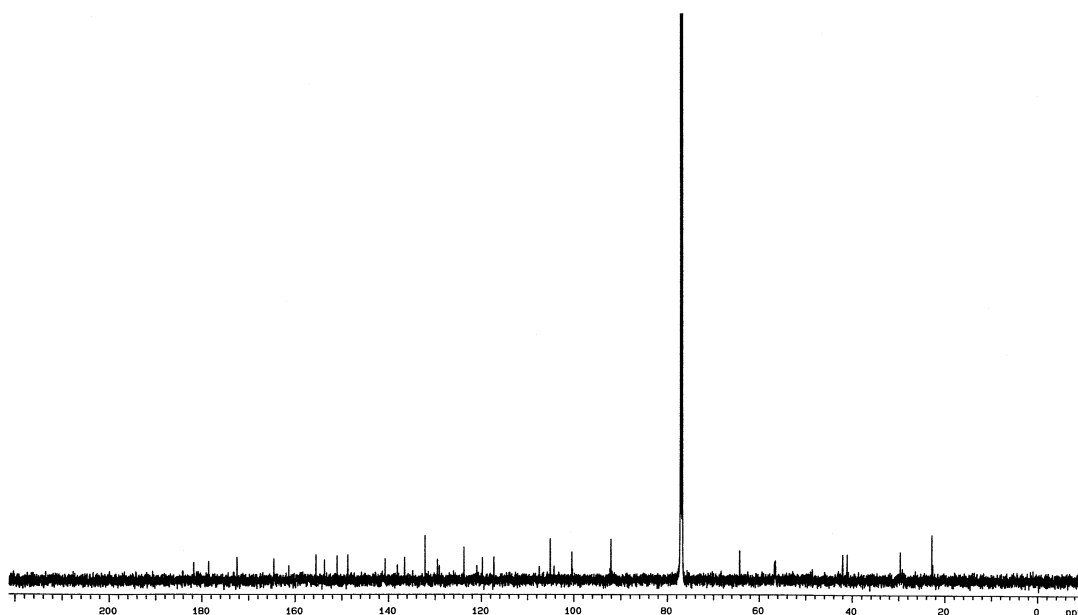
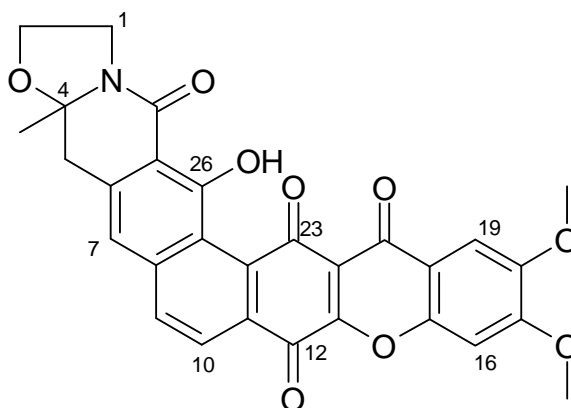


Abbildung 18: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von Cervinomycin A₂ (**14**) in CDCl_3 .

Das Cervinomycin A₁/A₂-Gemisch wurde erstmals 1982 aus *Streptomyces cervinus* von S. Ōmura *et al.*³⁸ isoliert und die Struktur beider Komponenten 1986 durch Derivatisierungsversuche aufgeklärt^{31,39}. Cervinomycin A₁ und Cervinomycin A₂ zeigen antibiotische Aktivitäten gegen anaerobe Bakterien, Mycoplasmen sowie einige grampositive Bakterien. Gegen gramnegative Bakterien und Pilze wurden nach S. Ōmura *et al.* keine Aktivitäten festgestellt, wohingegen die hier isolierten Proben schwache bis sehr schwache Aktivitäten gegen *Escherichia coli* und *Candida albicans* zeigten (s. Tabelle 3)³⁷. Die Aktivitäten der isolierten Verbindung **14** im Agardiffusionstest sind in Tabelle 3 aufgeführt.



14

Auch die Fraktion 1 lieferte nach Reinigung durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel und HPLC eine gelbe Verbindung, deren Molmasse durch Elektrospray-Massenspektrometrie zu 527 Dalton bestimmt wurde. Aufgrund der geringen Ausbeute dieser Substanz von 1 mg und der schlechten Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln konnten keine aussagekräftigen ^{13}C -NMR-Spektren erhalten werden. Bei Auswertung der ^1H -NMR-Spektren und deren jeweiligen Vergleiche, konnte es sich um die Verbindung Cervinomycin A₂ (**14**)³⁷ handeln. Weitere Verbindungen ließen sich aus der Fraktion 1 in nennenswerter Menge nicht isolieren.

Cervinomycin A₁ / Cervinomycin A₁-Diacetat

Die Molmasse der Verbindung **15** mit $m/z = 529$ war identisch mit der von Cervinomycin A₁. Da **15** in verschiedenen Lösungsmitteln nur schwer löslich bzw. unlöslich war, gelang lediglich die Aufnahme eines ^1H -NMR-Spektrums, während ein auswertbares ^{13}C -NMR-Spektrum nicht erhalten werden konnte. Daher sollte im Anschluß durch einen Acetylierungsversuch die Löslichkeit von **15** erhöht werden. Nach der Acetylierung von Cervinomycin A₁ (**15**) mit Acetanhydrid wurde das resultierende Reaktionsprodukt durch RP-HPLC gereinigt. Die Vergleiche des Dünnschichtchromatogramms sowie des ^1H -NMR-Spektrums und Massenspektrums von **15** mit denen des gereinigten Acetylierungsproduktes **16**, ließen auf eine erfolgreiche Acetylierung schließen, da sich die R_f -Werte sowie die ^1H -NMR-Spektren und die Massenspektren von **15** und **16** unterschieden. So wies das Acetylierungsprodukt **16** einen R_f -Wert von 0.96 auf, während **15** deutlich polarer war (R_f -Wert von Cervinomycin A₁ = 0.68). Im ^1H -NMR-Spektrum von **16** wurden zusätzlich zwei Singulets für Methylgruppen festgestellt, die der chemischen Verschiebung zufolge auf zwei Acetylgruppen zurückzuführen waren. Schließlich konnte im EI-MS-Spektrum die Molmasse für das Reaktionsprodukt von **16** auf 613 Dalton festgelegt werden. Dies würde dem Diacetat **16** von Cervinomycin A₁ entsprechen.

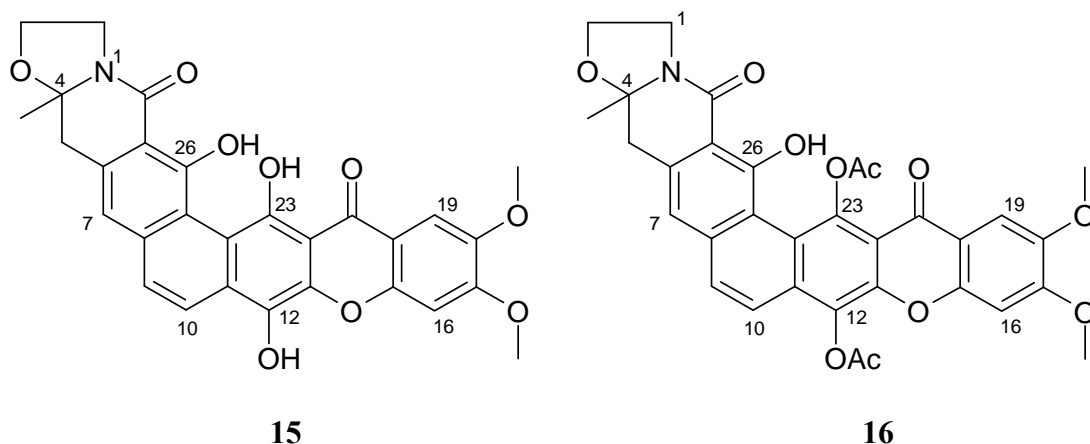


Abbildung 19: Cervinomycin A₁ (**15**) und das Diacetat von Cervinomycin A₁ (**16**).

Im ¹H-NMR-Spektrum war ein 1H Signal bei $\delta = 14.98$ für das Proton nur einer chelierten Hydroxygruppe zu erkennen. Im Falle des vermuteten Diacetats waren damit die beiden chinoiden Hydroxygruppen acetyliert worden, da sich die ¹³C-NMR-Daten für die entsprechenden chinoiden C-Atome ($\delta_{C-23} = 168.8$ und $\delta_{C-12} = 168.3$) nur marginal unterschieden. Wäre dagegen nur eine Hydroxygruppe des Hydrochinons acetyliert worden, wäre eine größere Differenz der ¹³C-NMR-Daten zu erwarten. Ferner konnten im aromatischen Bereich fünf Protonen identifiziert werden. Hiervon lagen neben drei Singulets der Intensität von jeweils 1H bei $\delta = 7.69$, 7.66 und 6.89 zwei 1H-Dubletts bei $\delta = 7.63$ und 7.58 vor. Da die Kopplungskonstanten beider Dubletts übereinstimmten, mußten die zugehörigen Protonen benachbart sein. Diese Daten paßten auf das Grundgerüst von Cervinomycin A₁ (**15**). Im Aliphaten-Bereich waren ein Multiplett bei $\delta = 4.26-4.18$ mit einer Intensität von 2H und zwei Multipletts der Intensität von je 1H zu sehen, was in Anlehnung an **15** den benachbarten Methylengruppen entsprechen würde. Die Singulets bei $\delta = 2.60$ und 2.10 mit der Intensität von jeweils 3H entsprachen der chemischen Verschiebung zufolge den Methylgruppen der Acetatreste. Außerdem konnten ein Singulett der Intensität von 2H bei $\delta = 3.31$ für eine Methylengruppe sowie zwei Singulets für zwei aromatische Methoxygruppen bei $\delta = 4.00$ beobachtet werden. Sämtliche ¹H-NMR-Daten ließen die Annahme von **16** zu. Das ¹³C-NMR-Spektrum zeigte bei $\delta = 181.4$, 174.5, 168.8 und 168.3 wie erwartet vier Signale für Carbonylkohlenstoffatome. Im Bereich sp²-hybridisierter Kohlenstoffe waren schließlich 20 und im Aliphaten-Bereich neun Signale zu sehen, was im Einvernehmen zu dem vermuteten Diacetat von Cervinomycin A₁ stand. Dabei konnte das Signal bei $\delta = 92.2$ in Analogie zu 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) dem quartären C-Atom des N,O-Ketals zugeordnet

werden.

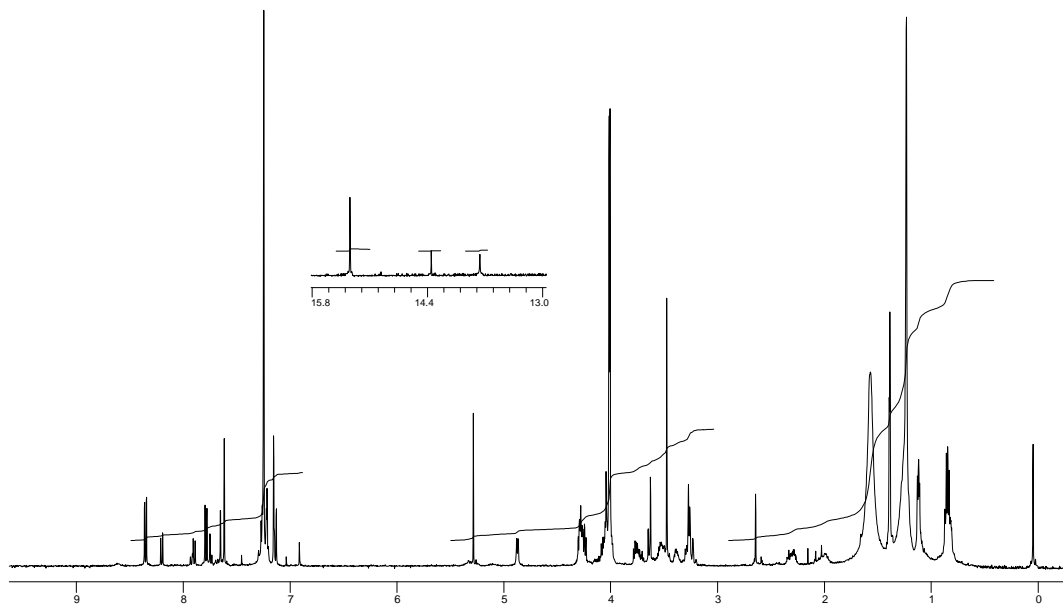


Abbildung 20: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cervinomycin A₁ (**15**) in CDCl_3 .

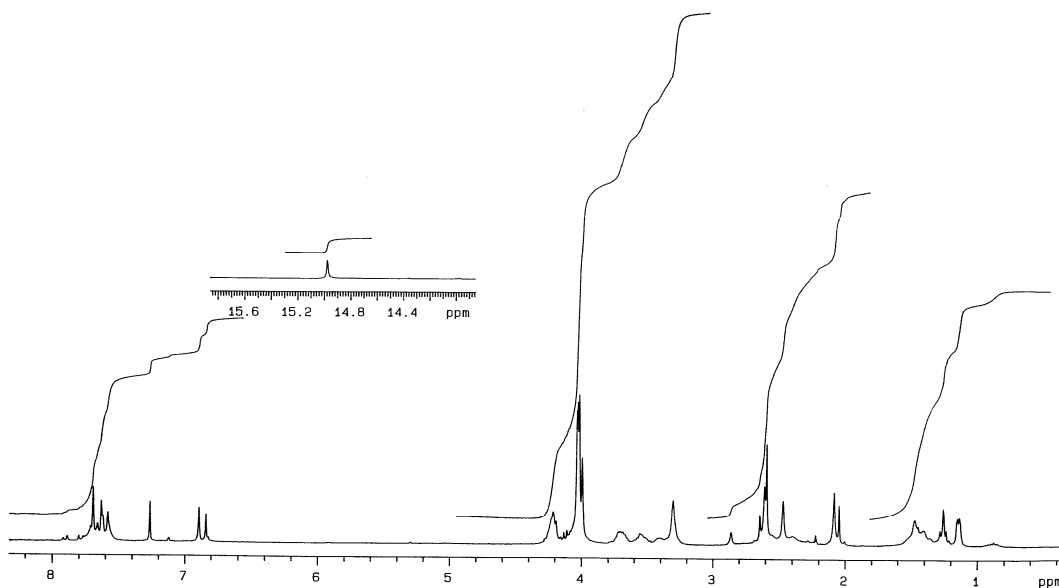


Abbildung 21: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Cervinomycin A₁-diacetat (**16**) in CDCl_3 .

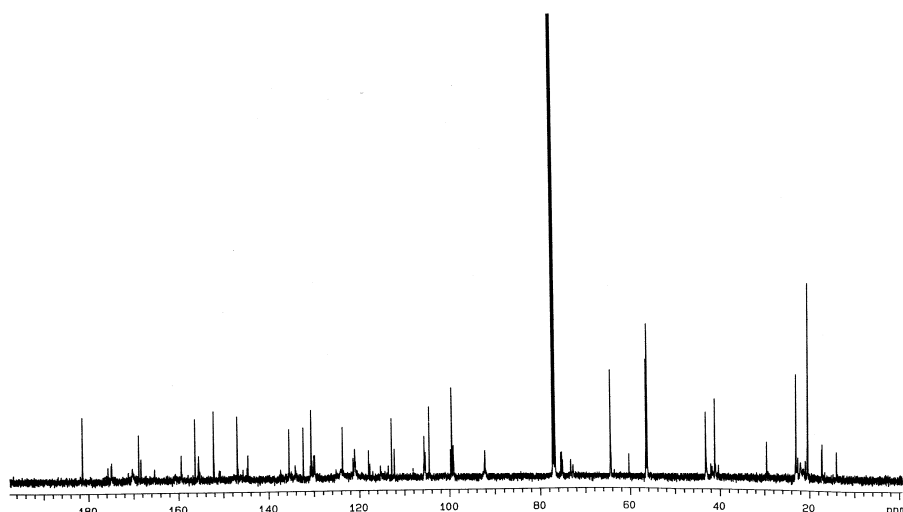


Abbildung 22: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Cervinomycin A_1 -diacetat (**16**) in CDCl_3 .

Das Signal bei $\delta = 56.3$ wurde den nach dem ^1H -NMR-Spektrum vermuteten Methoxygruppen zugeordnet, während die Signale bei $\delta = 20.52$ und 20.57 auf die Methylgruppen der Acetylreste hindeuteten. Da in der zugänglichen Literatur keine Daten für ein Cervinomycin-diacetat gefunden werden konnten, wurden zur genauen Identifizierung sowie zur genauen Klärung von Struktur-Alternativen die HSQC-, HMBC- und H,H-COSY-Spektren aufgenommen und ausgewertet.

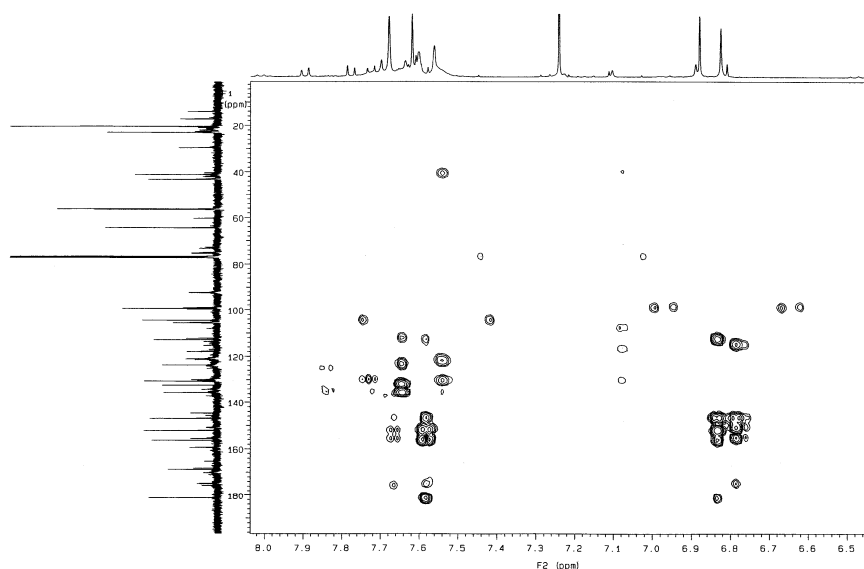


Abbildung 23: HMBC-Spektrum (500 MHz) von Cervinomycin A_1 -diacetat (**16**) in CDCl_3 .

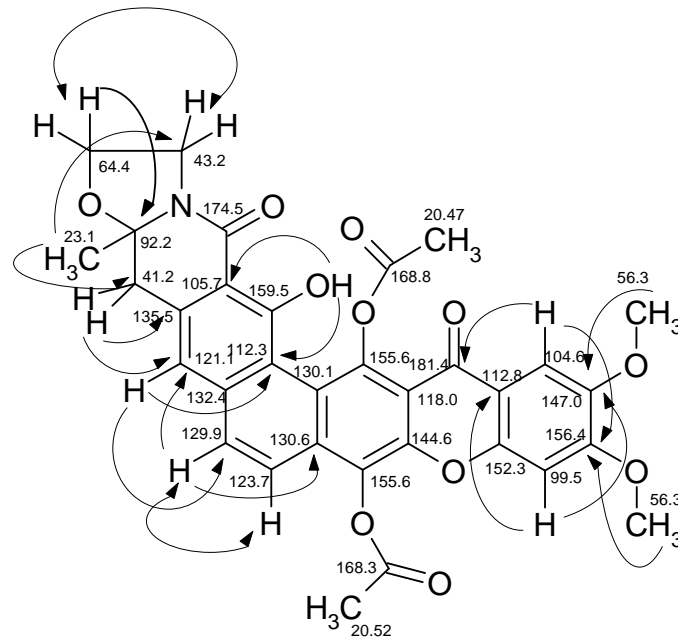


Abbildung 24: Ausgewählte HMBC- und H,H-COSY-Korrelationen des Diacetats **16** von Cervinomycin A₁.

Auch wenn nicht auf alle Kohlenstoffatome Fernkopplungen zu sehen waren und einige Signale wegen unzureichender Auflösung nicht exakt festgelegt werden konnten, so waren doch die übrigen Korrelationen ausreichend, um das Cervinomycin-Grundgerüst nachzuweisen und beide Acetylreste zu lokalisieren. Demnach mußten, wie bereits nach Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums vermutet, die beiden Hydroxygruppen des Hydrochinons acetyliert worden sein, da das Proton der Hydroxygruppe mit $\delta_{\text{H}} = 14.98$ Kopplungen auf die C-Atome bei $\delta = 159.5$, 112.3 und 105.7 aufwies, womit diese Hydroxygruppe an das Kohlenstoffatom in Position C-26 gebunden war. Die wichtigsten HMBC-Kopplungen sind in Abbildung 25 dargestellt. Außerdem wurde die Struktur durch Vergleich der ¹³C-NMR-Daten mit denen von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) sowie Cervinomycin A₂ (**14**)³⁷ abgesichert (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**), Cervinomycin A₁-Diacetat (**16**) und Cervinomycin A₂ (**14**)³⁷.

C-Atom	23-Desoxycervinomycin A ₁	Cervinomycin A ₁ -Diacetat	Cervinomycin A ₂ (lit.)	Cervinomycin A ₂ (exp.)
1	41.7	43.2	41.9	42.1
2	63.8	64.4	64.1	64.3
4	92.0	92.2	92.1	92.2
5	39.9	41.2	40.8	41.1
6	133.4	135.5	136.5	136.6
7	118.5	121.1	117.5	117.3
8	136.3	23.1	140.6	140.8
9	127.8	129.9	132.2	132.2
10	123.5	123.7	123.6	123.8
11	125.5	130.6**	129.6	129.6
12	140.9	155.6	178.3	178.6
13	140.9	144.6	153.7	153.8
15	151.7	152.3	151.0	151.1
16	100.0	99.5	100.3	100.5
17	155.5	156.4	155.6	155.6
18	146.3	147.0	148.7	148.8
19	105.3	104.6	104.8	104.7
20	113.5	112.8	119.5	119.8
21	175.3	181.4	172.7	172.5
22	120.2	118.0	120.6	121.0
23	115.9	155.6	181.7	181.8
24	125.9	130.1**	137.7	138.2
25	117.9	112.3	120.6	121.0
26	161.0	159.5	160.8	161.5
27	107.2	105.7	107.3	107.2
28	164.8	174.5	164.4	164.6
30	22.1	23.5	22.6	22.9
17-OCH ₃	56.2	56.3	56.6	56.6
18-OCH ₃	55.8	56.3	56.3	56.5
12-OCOCH ₃	-	168.3*	-	-
23-OCOCH ₃	-	168.8*	-	-
12-OCOCH ₃	-	20.52	-	-
23-OCOCH ₃	-	20.47	-	-

*, **Signale sind jeweils gegeneinander austauschbar

Das Cervinomycin A₁-diacetat (**16**) zeigte im Agardiffusionstest eine schwache Aktivität gegen die Testkeime *Mucor miehei* (Tü 284), *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 47). Im Zuge der Derivatisierungsversuche zur Aufklärung der Struktur von Cervinomycin wurde von A. Nakagawa und S. Ōmura ein Triacetat-Derivat erhalten³⁷. Zwar wurden die NMR-Daten hierzu nicht veröffentlicht, jedoch wurden interessante Aktivitäten z.B. gegen *Clostridium difficile*, *Peptococcus variabilis* und *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* sowie Aktivitäten gegen Mycoplasmen beschrieben. Diese Ergebnisse beziehen sich auf eine vorausgehende Studie von A. Nakagawa *et al.* im Jahre 1986⁴⁰. Hierbei wurden neben Cervinomycin A₁ (**15**) und Cervinomycin A₂ (**14**) auch das Monoacetat sowie Triacetat von Cervinomycin A₁ auf ihre antimikrobiellen Fähigkeiten (insbesondere gegen anaerobe Bakterien) im Vergleich mit Clindamycin getestet. Besonders das Triacetat zeigte dabei herausragende Aktivitäten und erwies sich im Allgemeinen potenter oder wenigstens genauso wirkungsvoll wie Clindamycin. Von besonderer Bedeutung waren jedoch die Aktivitäten gegen clindamycinresistente Staphylokokken- und Streptokokken-Stämme. Nicht nur wegen dieser Eigenschaften, sondern auch wegen der hohen Löslichkeit bei gleichzeitig relativ geringer Toxizität wird das Cervinomycin A₁-Triacetat nach den Angaben von A. Nakagawa und S. Ōmura als Medikament gegen anaerobe Bakterien entwickelt³⁷. Die Tabelle 3 führt die Bioaktivitäten der Hemmtestkontrolle des Diacetates von Cervinomycin A₁ (**16**) im Vergleich zu Cervinomycin A₁ (**15**), Cervinomycin A₂ (**14**) und 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) auf. Die antimikrobielle Aktivität von 23-Desoxycervinomycin A₁ war dabei vergleichbar mit der von Cervinomycin A₁, was evtl. auf ähnliche Polaritätseigenschaften zurückzuführen war. Auch die beiden hydrophoberen Cervinomycinderivate – Cervinomycin A₂ und Cervinomycin A₁-diacetat – unterschieden sich untereinander kaum in ihren Aktivitäten, jedoch zeigte das nach Acetylierung von **15** erhaltene, hydrophobere Diacetat von Cervinomycin A₁ im Gegensatz zu Cervinomycin A₁ (**15**) deutlich höhere Aktivitäten gegen die grampositiven Testkeime *Streptomyces viridochromogenes* (Tü57) und *Staphylococcus aureus* (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Aktivitäten der Cervinomycin-Derivate **15**, **14**, **16** und **13** im Agardiffusionstest (Hemmhofdurchmesser in mm)

Testkeim	Cervinomycin A ₁ (15)	Cervinomycin A ₂ (14)	Cervinomycin A ₁ -diacetat (16)	23- Desoxycervinomycin A ₁ (13)
<i>Escherichia coli</i>	15	15	18	13
<i>Bacillus subtilis</i>	19	15	18	19
<i>Streptomyces virido.</i> (Tü 57)	21	27	30	21
<i>Candida albicans</i>	11	0	0	11
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	18	20	12
<i>Chlorella sorokiniana</i>	12	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	12	0	0	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	14	0	0	0

Stamm GW 13/1783

Im biologischen Screening fiel der Stamm GW 13/1783 durch mittlere Aktivitäten gegen die Testkeime *Bacillus subtilis* und *Mucor miehei* (Tü 284) sowie eine Wachstumshemmung gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) auf. Im chemischen Screening war bei DC eine bei Tageslicht gelbe Zone auffällig, die sich mit NaOH rot verfärbte. Aus einer 24 l-Schüttelkultur wurde nach einer Fermentationszeit von fünf Tagen durch Extraktion mit Ethylacetat und Aceton ein braungelber Rohextrakt erhalten. Durch Vakuum-Säulenchromatographie wurde der Extrakt in vier Fraktionen getrennt. Von diesen zeigte nur noch die Fraktion 3 Aktivitäten im Plattendiffusionstest, wobei eine mittlere Hemmung von *Bacillus subtilis* beobachtet wurde.

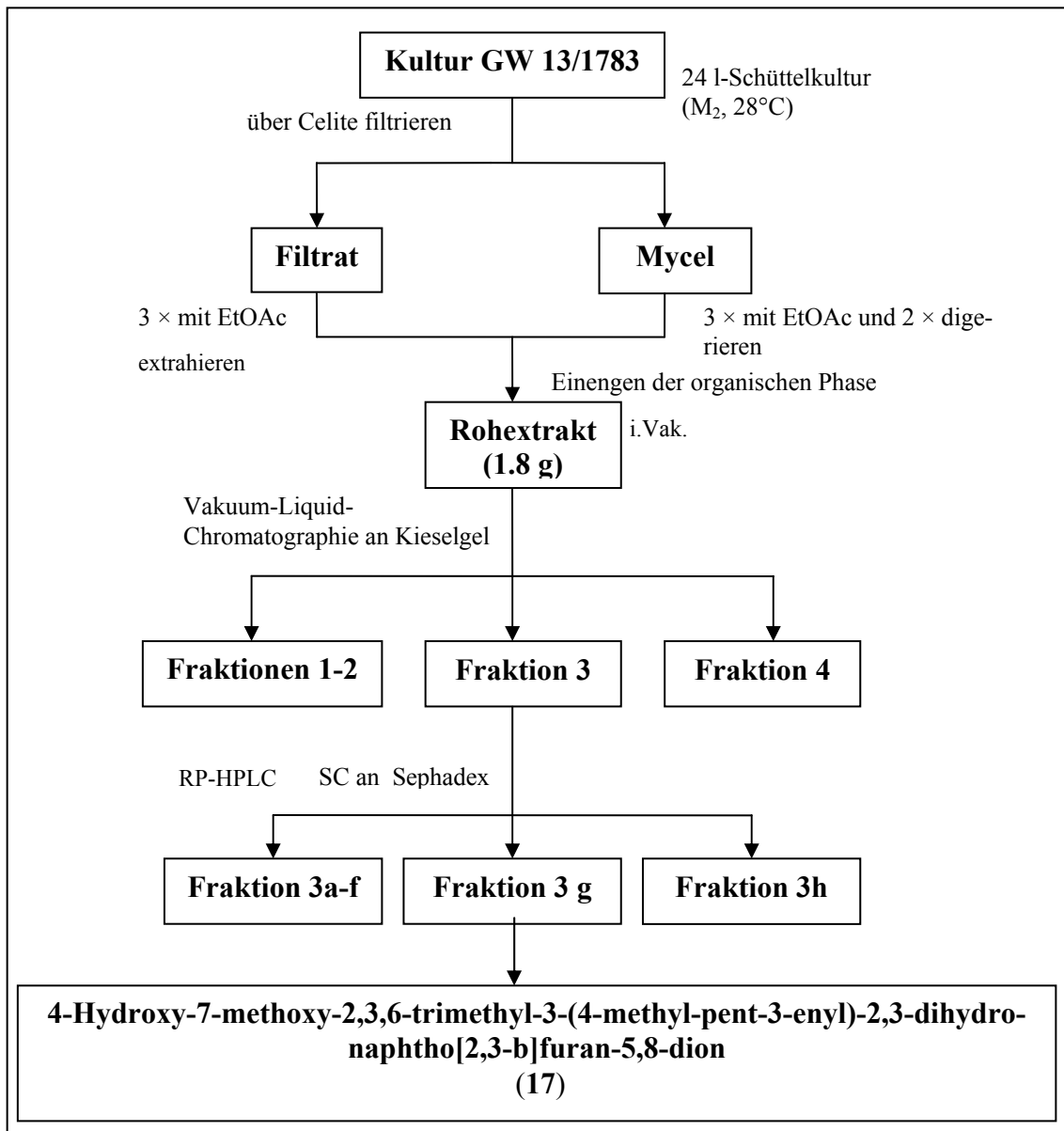


Abbildung 25: Aufarbeitungsschema für die 24 l-Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. Stamm GW 13/1783. SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie.

4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dion

Durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 wurde die Fraktion 3 in mehrere, jeweils noch aus komplexen Substanzgemischen zusammengesetzten Unterfraktionen getrennt. Die Unterfraktionen 3 g und 3 h zeigten bei DC die im Primärscre-

ning aufgefallene gelbe Zone ($R_f = 0,8$), die jeweils durch *semi*-präparative RP-HPLC gereinigt wurden. Beide Fraktionen lieferten eine gelbe Verbindung, die sich mit Natronlauge rötlich verfärbte und einen R_f -Wert von 0.8 aufwies ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\% \text{CH}_3\text{OH}$). Allein die Retentionszeiten zeigten bei vergleichbaren HPLC-Trennbedingungen geringfügige Differenzen. Die ^1H -NMR-Spektren sowie die Massenspektren der Verbindungen stimmten jedoch überein. So legte das ESI-Massenspektrum jeweils die Molmasse auf 370 Dalton fest. Durch ein EI-Massenspektrum konnte dieser Wert bestätigt werden. Bei der Auswertung des ^1H -NMR-Spektrum fiel auf, daß von insgesamt elf Signalen sechs Signale Singulett waren. Kombiniert mit der chemischen Verschiebung der entsprechenden Signale, konnten bereits hierdurch zahlreiche Strukturinformationen erhalten werden. So wurde unter Berücksichtigung der roten Farbreaktion mit Natronlauge für das Singulett bei $\delta = 9.85$ mit der Intensität von 1H eine chelierte Hydroxygruppe angenommen. Anzumerken bei dieser Interpretation war jedoch die relativ starke Hochfeldverschiebung des Signals. Das Singulett mit einer Intensität von 1H bei $\delta = 6.69$ deutete auf ein aromatisches Proton ohne Protonen in vicinaler Stellung hin. Bei $\delta = 3.53$ lag ein Singulett mit einer Intensität von 3H, was typischerweise einer Methoxygruppe zugeordnet wurde. Schließlich zeigten die Singulett mit jeweils einer Intensität von 3H bei $\delta = 1.56, 1.20, 1.10$ drei Methylgruppen ohne vicinale Protonen an. Das Quartett mit einer Intensität von 1H bei $\delta = 4.35$ und das Dublett der Intensität von 3H bei $\delta = 0.98$ mit übereinstimmender Kopplungskonstante wiesen auf eine CHCH_3 -Gruppe hin. Schließlich waren bei $\delta = 4.62$ ein Multiplett der Intensität 1H und eine Signalgruppe bei $\delta = 1.50$ mit einer Intensität von 4H zu erkennen.

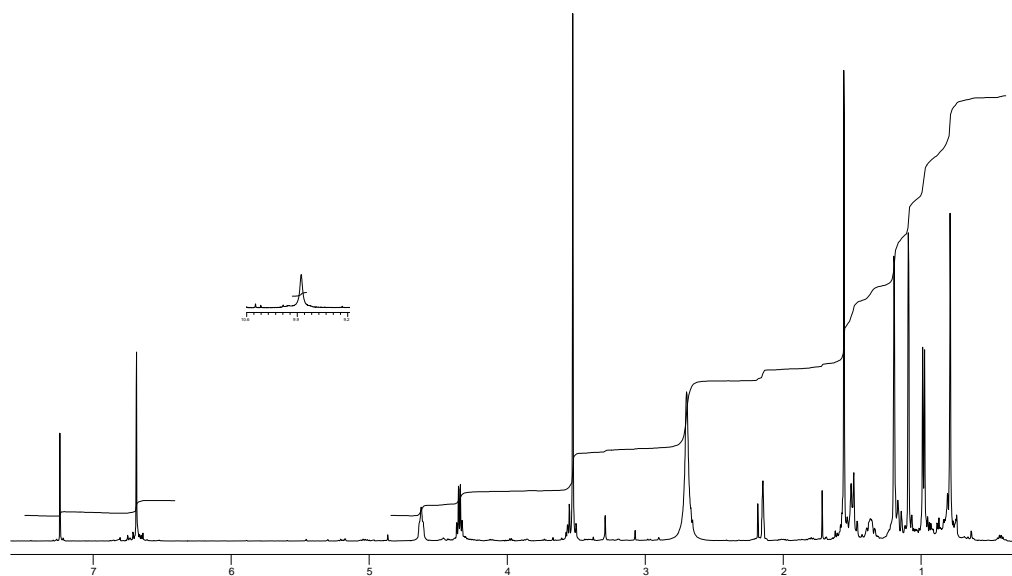


Abbildung 26: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von **17** in CDCl_3 .

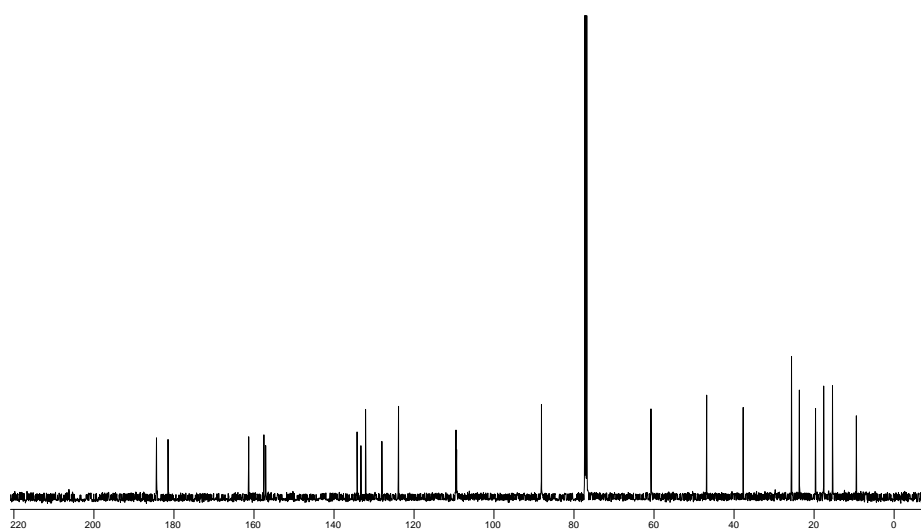


Abbildung 27: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von **17** in CDCl_3 .

Im ^{13}C -NMR-Spektrum fielen zwei Signale bei $\delta = 184.2$ und 181.3 auf, die vermutlich die Carbonylkomponenten eines chinoiden Systems darstellten. In diesem Fall würde die nach ^1H -NMR-Spektrum vermutete Hydroxygruppe zu dem C-Atom bei $\delta = 184.2$ cheliert vorliegen, da dieses gegenüber dem zweiten Carbonylkohlenstoffatom die größere Tieffeldverschiebung aufwies. Die drei Signale bei $\delta = 161.2$, 157.4 und 156.9 deuteten auf aromatische C-Atome mit Sauerstoffbindung hin. Im Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome verblieben sieben Signale, so daß unter Berücksichtigung der bisherigen Signalanzahl wahrscheinlich ein Hydroxynaphthochinon und zwei olefinische Kohlenstoffatome vorliegen mußten. Ein aliphatisches Kohlenstoffatom mit Sauerstoffbindung wurde durch das Signal bei $\delta = 88.1$ angezeigt. Das Signal bei $\delta = 60.7$ konnte der bereits erwarteten Methoxygruppe zugeordnet werden. Im Bereich zwischen $\delta = 46.8$ und 9.4 lagen acht Signale, die nach dem HSQC-Spektrum einem quartären C-Atom, einem Methin-, zwei Methylen- und fünf Methyl-Kohlenstoffatomen entsprachen. Mit diesen Daten wurde bei einer Substruktursuche in der Datenbank AntiBase[®] eine unbenannte Verbindung **17** [P. Sedmera, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 870-872] erhalten. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten⁴¹ ließ keinen Zweifel an der Übereinstimmung beider Verbindungen (siehe Tabelle 4). Jedoch fiel beim Vergleich der ^1H -NMR-Daten auf, daß in der Literatur für das Proton der chelierten Hydroxygruppe ein erstaunlich hochfeldverschobener Wert der chemischen Verschiebung von nur $\delta = 6.96$ angegeben worden war. Dagegen wurde bei der isolierten Verbindung **17** für das Proton der Hydroxygruppe ein Wert von $\delta = 9.85$ gefunden, was für eine chelierte Hydroxygruppe ein nimmer noch ungewöhnlich niedriger Wert ist. Beide Protonenspektren wurden mit CDCl_3 als Lösungsmittel gemessen. Für **17** konnte die in der Literatur postulierte Struktur allerdings jetzt durch HMBC-Korrelationen, HSQC- und COSY-Spektren bestätigt werden.

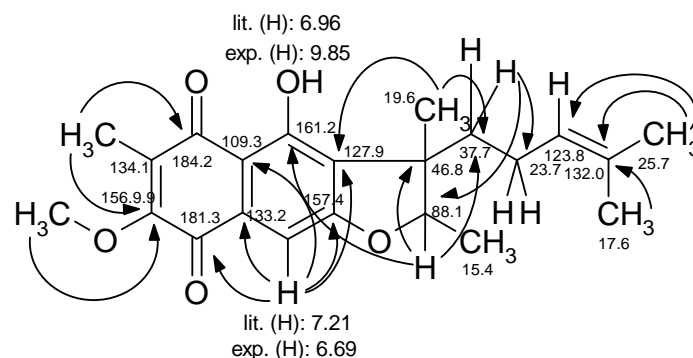


Abbildung 28: Ausgewählte HMBC-Korrelationen von **17**.

Die wichtigsten HMBC-Korrelationen von **17** sind in Abbildung 29 dargestellt.

Tabelle 4: Vergleich der isolierten Verbindung mit den Literaturwerten für **17**⁴¹.

C-Atom	17 (lit.)	17 (exp.)
2	88.06	88.1
3	46.83	46.8
3a	127.89	127.9
4	161.20	161.2
4a	109.17	109.3
5	184.19	184.2
6	134.05	134.1
7	156.92	156.9
8	181.33	181.3
8a	133.18	133.2
9	109.44	109.4
9a	157.59	157.4
10	37.77	37.7
11	23.68	23.7
12	123.84	123.8
13	131.91	132.0
14	17.57	17.6
15	25.62	25.7
2-Me	15.38	15.4
3-Me	19.58	19.6
6-Me	9.42	9.4
7-OMe	60.67	60.7

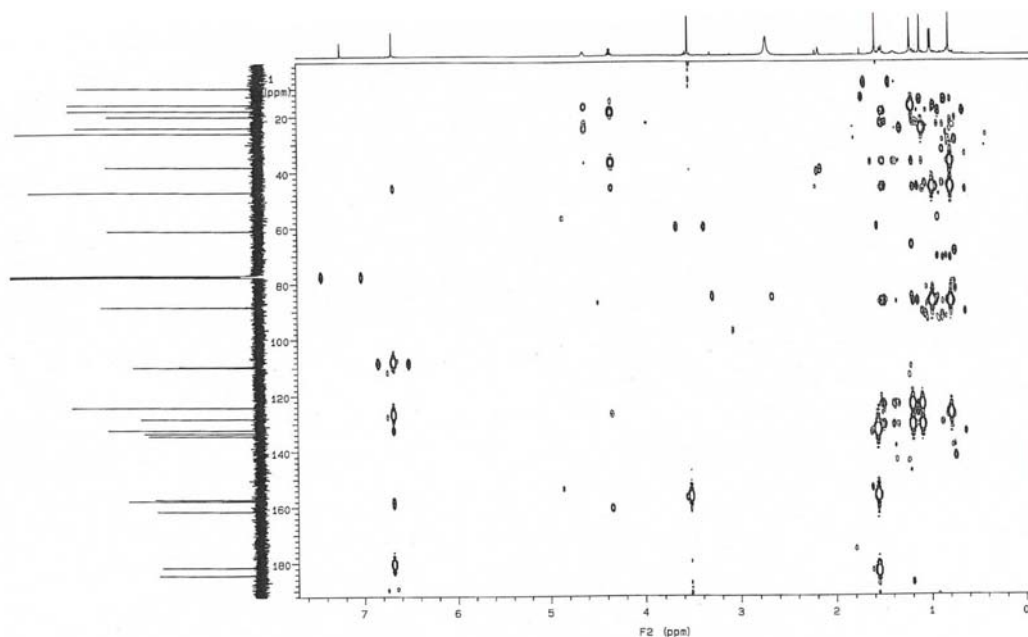
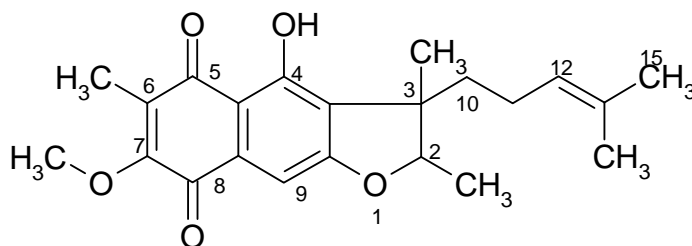
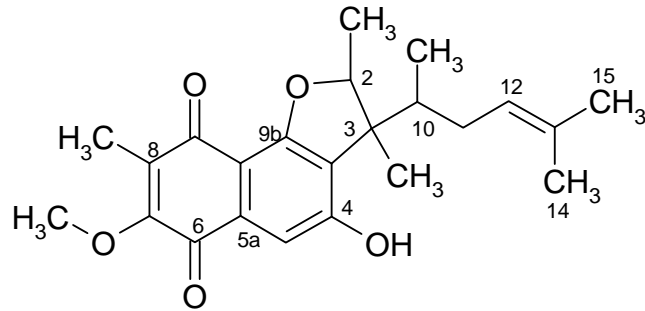


Abbildung 29: HMBC-Spektrum (500 MHz) von **17** in CDCl_3 .

Die Verbindung gehört zu der Familie der Furanonaphthoquinone und wurde 1991 erstmals von P. Sedmera⁴¹ aus *Streptomyces cinnamonensis* isoliert. Bei der isolierten Verbindung **17** konnten keine Bioaktivitäten gegen die in dieser Arbeit benutzten Testkeime festgestellt werden, obwohl die Fraktion 3, aus welcher **17** isoliert worden ist, mittelstarke Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* aufwies. In der Literatur konnten keine Angaben zu den biologischen Eigenschaften von **17** gefunden werden. Jedoch konnte nach M. Ishibashi *et al.*⁴² für das mit 4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dion (konstitutionsisomeres Furaquinocin C (**18**)) cytotoxische Aktivitäten gegen B16 Maus-Melanom- und HeLa S3-Zelllinien (Zellen des humanen Cervix-Karzinoms) festgestellt werden.



17



18

Stamm GW 16/3993

Der Stamm GW 16/3993 wuchs unter Bildung eines schwarzen Luftmycels bei dunkelgelber Färbung des Agarnährmediums. Der entsprechende Ethylacetatextrakt der Schüttelkultur aus dem Primärscreening zeigte bei DC im Tageslicht zwei gelbe Zonen, die sich mit Anisaldehyd/Schwefelsäure grün verfärbten. Das biologische Screening zeigte eine mittlere und schwache Aktivität gegen *Mucor miehei* (Tü 284) bzw. *Staphylococcus aureus* sowie schwache Aktivitäten gegen die Grünalgen *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus subspicatus*. Gegen *Artemia salina* wurde eine Mortalitätsrate von 55 % erzielt. Der Stamm wurde als Schüttelkultur im Maßstab von 20 l fermentiert. Durch Extraktion mit Ethylacetat und Aceton erhielt man einen dunkelbraunen Rohextrakt, der in Methanol gelöst und mit Cyclohexan entfettet wurde. Die biologische Aktivität des hieraus resultierenden Extraktes wurde durch Bioautographie ermittelt. Dabei zeigte vor allem die unpolarste der gelben Zonen Aktivitäten gegen die genannten Testkeime. Der Rohextrakt wurde durch Vakuum-Säulenchromatographie in fünf Fraktionen getrennt, wobei die Fraktion 4 die gesuchte aktive, gelblichgrüne Verbindung enthielt (siehe Tabelle 21).

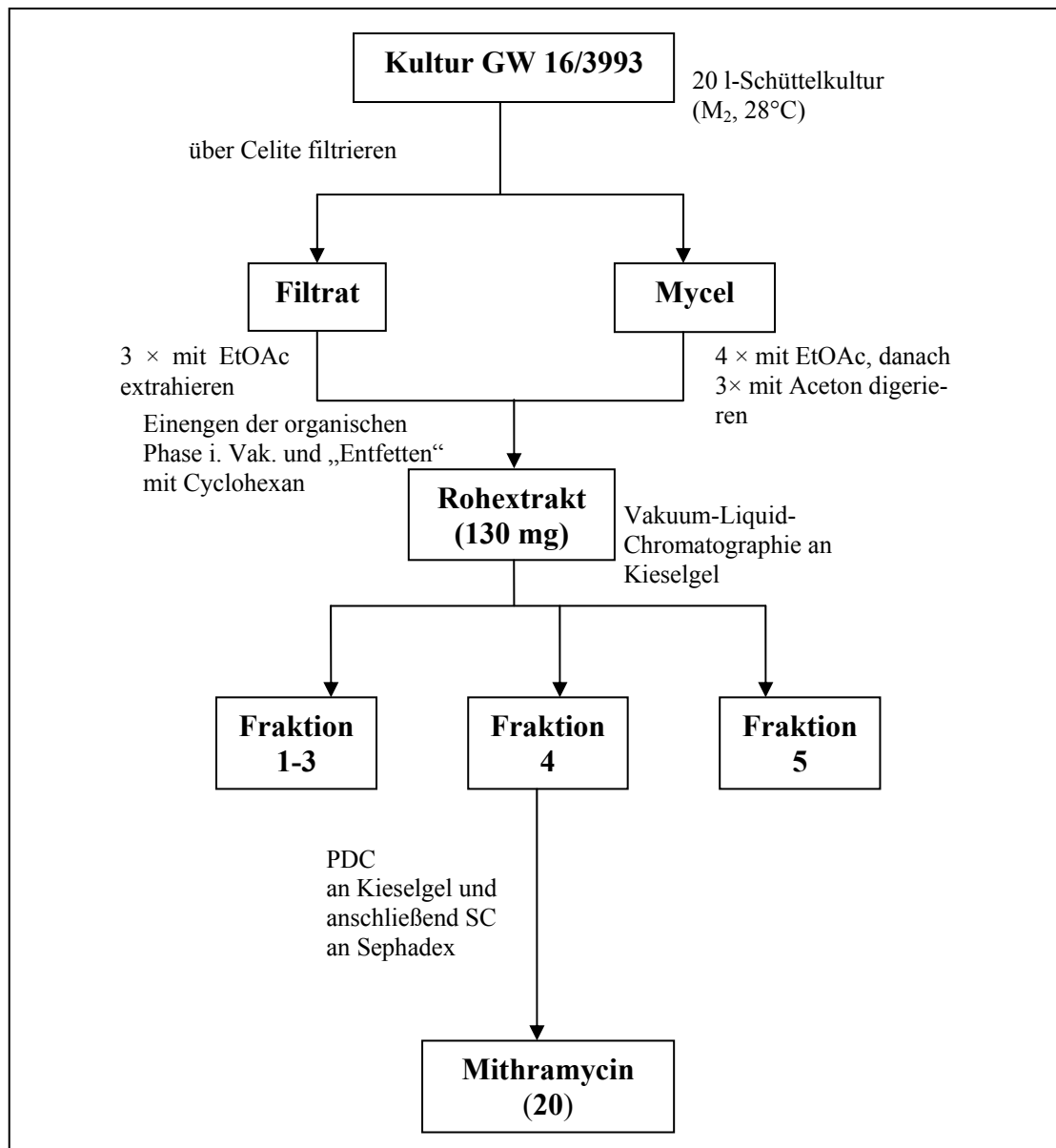


Abbildung 30: Aufarbeitungsschema der 20 l-Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. GW 16/3993. SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie.

Mithramycin

Die Fraktion 4 wurde durch präparative Dickschichtchromatographie an Kieselgel getrennt. Durch nachfolgende Säulenchromatographie an Sephadex erhielt man die gesuchte gelblichgrüne Verbindung **20**. Mit Hilfe des ESI-Massenspektrums wurde aus dem $[M-H]^-$ -Signal eine Molmasse von 1084 ermittelt; im EI-Massenspektrum konnte kein Molpeak erzielt werden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigt

te bei $\delta = 6.61$ und 6.43 zwei Singulets der Intensität von jeweils 1H, wobei es sich um olefinische oder aromatische Protonen handeln konnte. Zwei Dubletts der Intensität von je 1H bei $\delta = 5.20$ und 5.17 signalisierten möglicherweise acetalische Protonen. Der Bereich von $\delta = 4.75$ bis 2.79 wies vierzehn Signale mit einer Gesamtintensität von 25H auf. Dieser Bereich ist u.a. charakteristisch für OCH-Gruppierungen, so daß unter Berücksichtigung der vermuteten acetalischen Protonen und des fehlenden Molekülions im EI-Massenspektrum, Zuckerreste zu erwarten waren. Das Singulett bei $\delta = 3.41$ mit einer Intensität von 3H deutete eine aliphatische Methoxygruppe an. Zwischen $\delta = 2.74$ und 1.44 lagen ein Singulett bei $\delta = 2.15$ für eine Methylgruppe sowie vier Multipletts und vier Dubletts von Dubletts. Bei $\delta = 1.27$ lag ein Multiplett der Intensität von 1H. Die drei Dubletts bei $\delta = 1.39$, 1.31 und 1.21 mit einer Intensität von je 3H wiesen ebenso auf Methylgruppen hin wie das Singulett bei $\delta = 1.26$ mit einer Intensität von 3H und das Multiplett bei $\delta = 1.25$ - 1.23 mit einer Intensität von 6H.

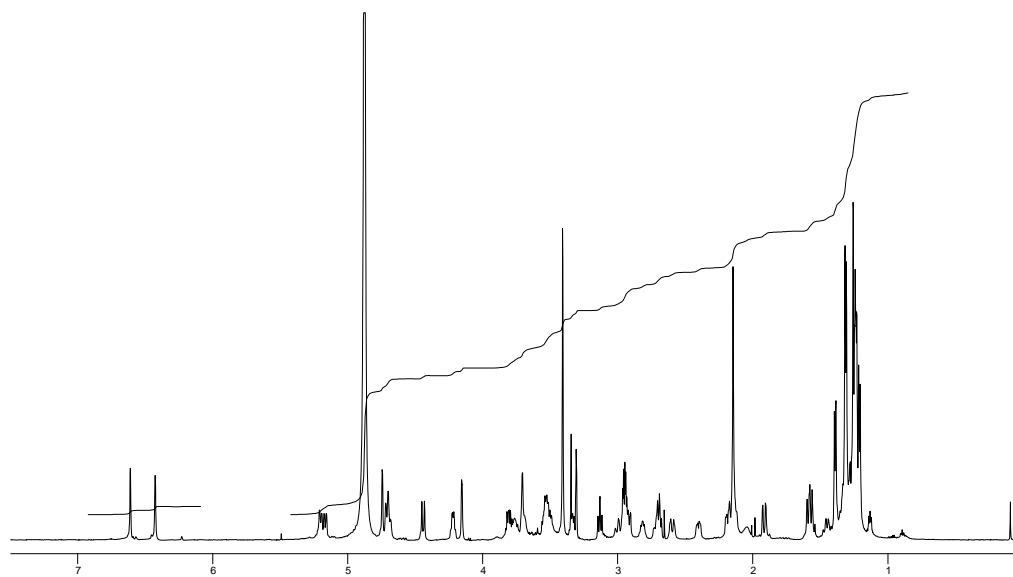


Abbildung 31: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Mithramycin (**20**) in CD_3OD .

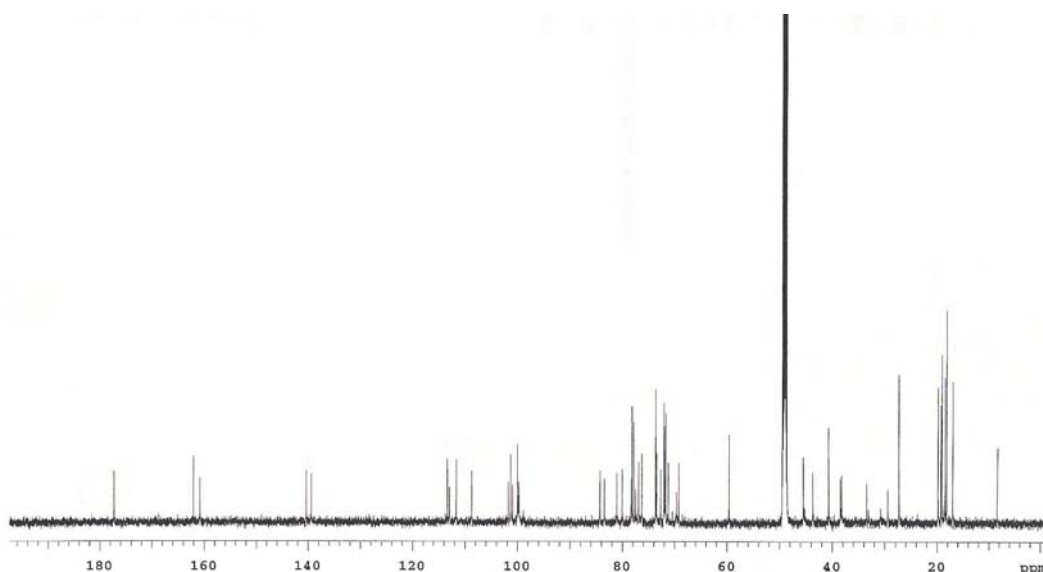


Abbildung 32: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von Mithramycin (**20**) in CD_3OD .

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sieht man zwei Signale bei $\delta = 213.7$ und 197.7 von Ketocarboxylfunktionen, wobei letzteres auch charakteristisch für ein α,β -ungesättigtes Keton ist. Das Signal bei $\delta = 177.3$ kann eventuell auf eine Carboxyl- oder Estergruppe zurückzuführen sein. Die Signale bei $\delta = 162.0$ und 160.8 sind charakteristisch für aromatische C-Atome mit Sauerstoffbindung. Ferner weist der aromatisch-olefinische Bereich sechs Signale auf. Weitere sechs Signale bei $\delta = 101.7 - 99.7$ sind typisch für acetalische C-Atome, wobei allerdings auch hochfeldverschobene sp^2 -Kohlenstoffatome nicht auszuschließen sind. Im Bereich von $\delta = 84.3$ bis 69.2 liegen 19 Signale, die mit großer Wahrscheinlichkeit OCH-Gruppierungen zuzuordnen sind. Das Signal bei $\delta = 59.6$ bestätigt die nach dem ^1H -NMR-Spektrum vermutete Methoxygruppe. Schließlich waren nach dem ^{13}C /APT-NMR-Spektrum Signale für sechs Methylen, eine Methin und acht Methylgruppen zu erwarten. Eine Substruktursuche in AntiBase[®] mit einer Auswahl dieser Daten führte zu der Verbindung Mithramycin (**20**).

Mithramycin (= Aureolsäure, Plicamycin, Mithracin[®]) ist ein Glycosidantibiotikum mit Chromomycinon als Aglykon (siehe Abbildung 34) und fünf Desoxyzuckerresten. Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit den veröffentlichten Werten von J. Thiem *et al.*⁴³ sowie den ^{13}C -NMR-Daten für das Mithramycin-Decaacetat⁴⁴ wiesen jedoch z.T. Abweichungen von mehr als $\Delta\delta = 5$ auf (siehe Tabelle 5). Außerdem konnten für Mithramycin (**20**) in der angegebenen Literatur⁴³ nicht alle Verschiebun-

gen exakt zugeordnet werden. Zur Strukturüberprüfung wurden daher HSQC-, HMBC- und H,H-COSY-Experimente durchgeführt. Anhand des HSQC-Spektrums konnten sämtliche C,H-Zuordnungen getroffen werden (siehe Tabelle 5). Mit Hilfe der 2D-Experimente konnte schließlich die Struktur des Aglykons der isolierten Verbindung **20** mit hoher Sicherheit als Chromomycinon (**19**) identifiziert werden. Da Chromomycinon auch das Aglykon von Mithramycin (**20**) ist, sprach dies für die Annahme, daß es sich bei der isolierten Verbindung tatsächlich um Mithramycin handeln (**20**) könnte. Dennoch muß darauf hingewiesen werden, daß sich einige der experimentellen ^{13}C -NMR-Werte von den in der Literatur angegebenen erheblich unterschieden (siehe Markierungen in Tabelle 5).

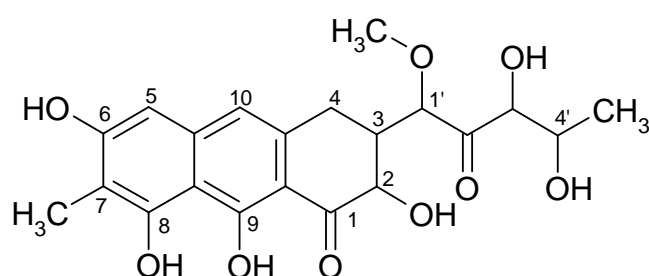


Abbildung 33: Chromomycinon (**19**) (entspricht dem Aglykon von Mithramycin (**20**)).

Im HMBC-Spektrum von **20** sah man Kopplungen der Protonen bei $\delta = 6.61$, 2.15 und 5.20 auf das C-Atom bei $\delta = 160.8$. Damit war die Position des letzteren als C-6 bestimmt, da aufgrund der Kopplung des acetalischen Protons bei $\delta = 5.20$ hier die O-glycosidische Verknüpfung zur Disaccharidkette erfolgen mußte. Die Position C-8 wurde ausgeschlossen, da sie mit zwei 4J -Kopplungen anstelle von zwei 2J -Kopplungen (von $\delta_{\text{H}} = 5.20$, 6.61) gegenüber C-6 eindeutig benachteiligt war. Die Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 6.16$ und 2.15 koppelten ferner auf das C-Atom bei $\delta = 108.7$ in Position C-7, welche in der Literatur⁴³ jedoch mit $\delta_{\text{C}} = 112.1$ angegeben war. Von dem Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.43$ gingen vier Kopplungen auf die C-Atome bei $\delta_{\text{C}} = 140.4$ (C-10a), 113.0 (C-9a), 139.4 (C-4a) und 29.4 (C-4) aus. Dabei entsprach laut Literatur⁴³ dem C-Atom C-9a ein Wert von $\delta_{\text{C}} = 108.8$, womit die Kohlenstoffatome C-7 und C-9a im Vergleich mit der Literatur gegeneinander vertauscht zu sein schienen. Jedoch konnten im HMBC-Spektrum der isolierten Verbindung eindeutig eine 3J -Kopplung des Protons bei $\delta = 6.61$ sowie eine 2J -Kopplung von den Methylprotonen bei $\delta = 2.15$ auf das C-Atom bei 108.7 festgestellt werden, wonach diesem nur die

Position C-7 zugeordnet werden konnte (siehe Tabelle 5). Auch die ^{13}C -NMR-Daten für die Position C-4 wiesen einen deutlichen Unterschied zu den Literaturwerten auf. So wurde in der Literatur⁴³ ein Wert von $\delta = 45.2$ angegeben, während der experimentelle Wert zu $\delta = 29.4$ bestimmt wurde. Jedoch konnte die Zuordnung des experimentellen Wertes für die Position C-4 mit der bereits erwähnten Kopplung der Protonen bei $\delta = 6.43$ und 4.75 im Seitenkettenrest begründet werden. Auch die Kopplungen auf die C-Atome bei $\delta = 139.4$ und 113.0 der an das C-Atom bei $\delta = 29.4$ assoziierten Protonen sprachen für die postulierte Position. Erwähnenswert war, daß das C-Atom C-4 des entsprechenden Decaacetats von Mithramycin⁴⁴ einen Wert von $\delta = 26.7$ aufwies und damit dem experimentellen Wert für Mithramycin eher entsprach. Einen weiteren Unterschied stellte das Carbonyl-C-Atom bei $\delta = 197.7$ dar. Nach Thiem *et al.*⁴³ wurde hier der Wert zu $\delta = 204.2$ bestimmt. Auf die C-Atome bei $\delta = 162.0$ und 177.3 konnten keine HMBC-Kopplungen festgestellt werden. Daher wurden die NMR-Daten von einer Messung in DMSO verwendet, um mögliche HMBC-Kopplungen des chelierten Protons im offset-Bereich zu beobachten. Entsprechend den Erwartungen, sah man eine 2J -Kopplung des Protons der chelierten Hydroxygruppe bei $\delta = 14.71$ (in DMSO) auf das C-Atom bei $\delta = 160.4$ (DMSO), welches dem C-Atom bei $\delta = 162.0$ (Methanol) entsprach. Damit war die chelierten Hydroxygruppe an das Kohlenstoffatom in Position C-9 gebunden, während die verbleibende aromatische Hydroxygruppe mit dem stark tieffeldverschobenen Signal für das C-Atom bei $\delta = 177.3$ verknüpft sein mußte, was der Position C-8 entsprach. Auch der Wert für C-8 wich dabei stark von dem Literaturwert ab (siehe Tabelle 5). Zuletzt verblieb die Position C-8a, die dem Signal bei $\delta = 111.7$ zugeordnet wurde. Jedoch konnten auf dieses C-Atom keine HMBC-Kopplungen beobachtet werden. Alle übrigen Daten entsprachen den in der Literatur angegebenen für Mithramycin (**20**)⁴³.

Tabelle 5: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von Mithramycin (**20**) mit Literaturwerten^{43, 44}.

Position**	Mithramycin- Decaacetat (lit.) ^{I, 44}	Mithramycin (exp.) ^{II}	Mithramycin (lit.) ^{III, 43}
1	202.8	197.7*	204.2
2	77.0	78.3	78.4
3	41.9	43.7	43.4
4	26.7	29.4*	45.2
4a	138.8	139.4	139.7
5	106.7	100.9	102.4
6	157.4	160.8	160.3
7	120.8	108.7*	112.1
CH ₃ -7	20.9	8.3	8.5
8	147.4	177.3*	165.1
8a	112.6	111.7	109.3
9	163.5	162.0*	156.8
9a	109.9	113.0*	108.8
10	116.5	113.4	118.1
10a	136.9	140.4	137.0
1'	81.5	83.5	83.2
OCH ₃ -1'	58.7	59.6	59.6
2'	204.5	213.7	213.3
3'	77.5	80.0	80.0
4'	68.7	69.2	69.4
5'	15.9	17.0	17.0
1A	96.8	99.8	99.0
2A	36.2	38.2	38.3
3A	73.9	77.9	77.5
4A	74.3	76.3	76.3
5A	70.8	72.0	72.1
6A	17.9	19.7	19.8
1B	96.2	100.0	100.2
2B	36.6	38.4	38.0
3B	70.3	71.6	72.0
4B	74.1	83.5	78.2
5B	70.6	73.6	73.7
6B	17.8	19.2	18.7

1C	100.6	101.7	102.1
2C	36.9	40.6	40.8
3C	74.0	84.2	81.2
4C	74.8	77.9	77.9
5C	70.6	72.6	73.4
6C	17.8	19.1	18.6
1D	97.1	101.3	100.2
2D	32.4	33.4	33.2
3D	72.8	80.1	81.2
4D	70.2	76.9	76.7
5D	69.7	73.5	73.4
6D	16.9	18.1	18.1
1E	95.8	99.7	97.7
2E	43.2	45.4*	28.1*
3E	70.5	71.9	71.8
3E-CH ₃	27.3	27.3	27.3
4E	77.5	71.2	72.1
5E	68.2	69.6	70.4
6E	17.6	18.4	18.5

I: J. Thiem *et al.*, gemessen in CD₃OD; II: gemessen in CD₃OD; III: S.E. Wohlert *et al.*, gemessen in CDCl₃

*: auffällige Abweichungen zum Literaturwert; **: Die Zählweise der Zuckermoleküle wurde von S. E. Wohlert *et al.* übernommen⁴⁴.

Mit Unterstützung des H,H-COSY-Spektrums konnte schließlich die Seitenkette identifiziert werden. Die wichtigsten HMBC- und H,H-COSY-Korrelationen sind in Abbildung 35 dargestellt.

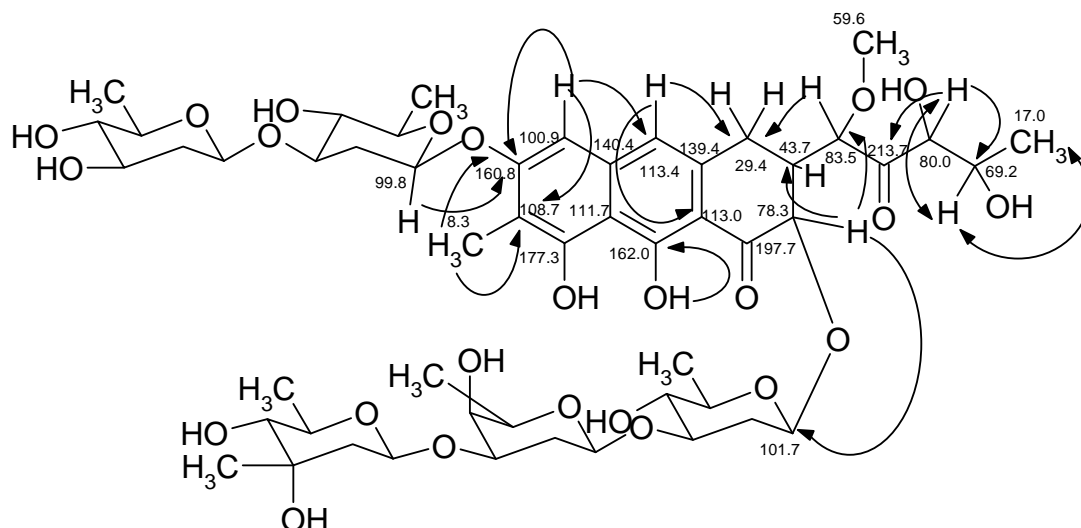
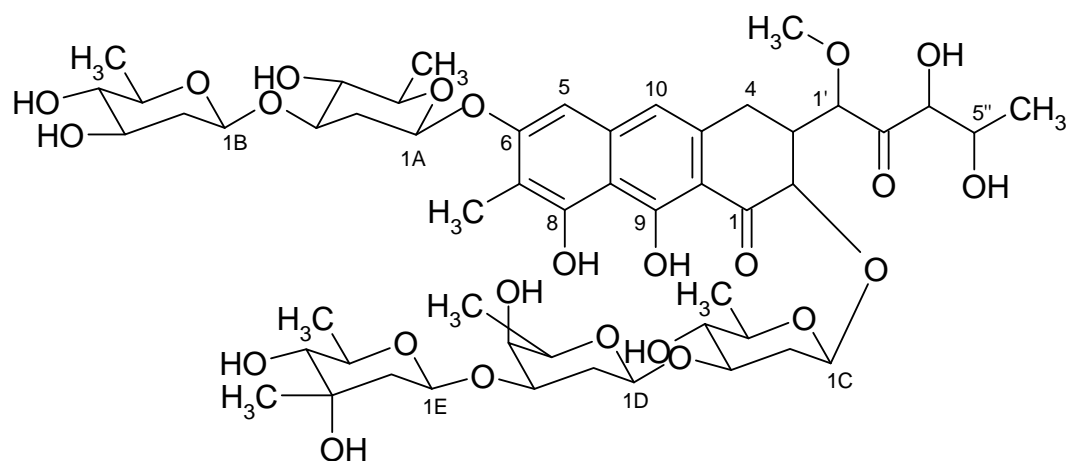


Abbildung 34: Ausgewählte HMBC (\rightarrow) - und H,H-COSY (\leftrightarrow)-Kopplungen des Aglykons von Mithramycin (**20**); die Aufnahme der Spektren erfolgte in CD_3OD . Eine Ausnahme bildet die durch den gestrichelt gezeichneten Pfeil dargestellte Kopplung, die erst durch Aufnahme von **20** in DMSO sichtbar wurde.

Eine vollständige Ermittlung der Konstitution vor allem im Zuckerbereich war nicht möglich, da sich mehrere NMR-Signale überlagerten. Ein Tochterionen-Massenspektrum gab näheren Aufschluß über Art und Sequenz der Zuckerreste: Dabei entsprach dem Signal bei $m/z = 847$ im Tochterionen-Massenspektrum eine Massendifferenz von 259 zu dem Quasimolekülsignal bei $m/z = 1106$. Diese Differenz war der Disaccharidkette (A-B) zuzuordnen und damit den Zuckereinheiten D-Olivose-3 \rightarrow 1-D-Olivose. Das Signal bei $m/z = 427$ wiederum wies eine Differenz von $\Delta m = 420$ zu dem Signal bei $m/z = 847$ auf. Dies entsprach der Abspaltung der Trisaccharidkette (C-E), bestehend aus D-Olivose-3 \rightarrow 1-D-Olivose-D-3 \rightarrow 1-D-Mycarose. Durch die Massendifferenzen zwischen den außerdem auftretenden Signalen bei $m/z = 703$ und 573 mit den entsprechenden Massendifferenzen von 144, 130 und 146 konnte diese Sequenz bestätigt werden. Da die Disaccharideinheit zuerst abgespalten wurde, schien die Disaccharidkette O-glycosidisch an die *aromatische Einheit* des Aglykons gebunden zu sein, weil eine β -Spaltung an aromatischen Systemen bevorzugt ist.

Die Ermittlung der Kopplungskonstanten konnte wegen sich überlagernder Signale nicht erfolgen. So blieben vor allem stereochemische Fragen offen.



20

Mithramycin (Plicamycin[®]) gehört wie auch die Chromomycine, Chromocyclo-mycine, die Olivomycine und UCH 9 zu der Gruppe der Aureolsäure-Antibiotika⁴⁴. Mithramycin zeigt eine Cytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien, wie z.B. gegen die von Gehirntumoren. Dabei wird durch ein Mithramycin-Dimer-Chelat mit zweiwertigen Metallionen (vorzugsweise Fe^{2+} , $[(\text{Mithramycin})_2\text{-Fe(II)}]$) die Proteinbindung an GC-reiche Regulationseinheiten der SV40- und c-myc-Promotoren verhindert^{45, 46}, wodurch der Transkriptionsvorgang gestört wird. Von klinischer Bedeutung ist der Einsatz gegen bestimmte Tumorarten wie z.B. metastasierendes *Carcinoma embryonale* (ein von embryonalem Gewebe ausgehendes Carcinom, das v.a. Leber und Hoden betrifft) und gegen die sogenannte Paget's bone disease (*Ostitis deformans*)⁴³. Auch gegen Hypercalciämie und Hypercalciurie in Verbindung mit bösartigen Tumoren wird Mithramycin eingesetzt⁴⁵.

Der erste Versuch zur Strukturaufklärung von Mithramycin (**20**) wurde 1968 von M. N. Kolosov *et al.* vorgestellt⁴⁷. In darauffolgenden Publikationen wurden die Sequenz sowie die Position der glycosidischen Bindungen der Zuckerreste mehrmals korrigiert. So lag bei dem Strukturvorschlag von Thiem *et al.*⁴³ der Zucker Olivose nicht wie bei Kolosov *et al.*⁴⁷ in der Mitte der Trisaccharideinheit, sondern befand sich in Zucker A der Disaccharidkette. Schließlich wurde die Struktur durch Patel *et al.*⁴⁸ erneut überarbeitet, wobei die Olivose nun wieder im Zentrum des Trisaccharids zu finden war; im Gegensatz zu Kolosov *et al.* aber in Position C-3D mit dem folgenden Zucker verknüpft war⁴⁴. (Bei Kolosov *et al.* erfolgte die Anknüpfung in Position C-4D.) Da jedoch keine Beweise für den Strukturvorschlag von Patel *et al.*⁴⁸

aufgeführt worden sind, wurde durch S. E. Wohlert *et al.*⁴⁴ die Struktur erneut überarbeitet und durch verschiedene NMR-Experimente bestätigt. Als endgültige Struktur gilt der durch Wohlert *et al.* bewiesene Vorschlag von Patel *et al.*⁴⁸.

Stamm GW 44/1571

Der Rohextrakt des Stammes GW 44/1571 fiel im biologischen Screening durch mittelstarke Aktivitäten gegen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* auf. Im Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* konnte eine Mortalitätsrate von 93 % festgestellt werden. Im chemischen Screening waren auf dem Dünnschichtchromatogramm einige bei Tageslicht rote, z.T. stark schleifende Zonen auffällig, die mit Natronlauge eine blaue Farbreaktion zeigten. Der Streptomyces wurde schließlich im 15 l-Maßstab als Schüttelkultur fermentiert. Die folgende Extraktion mit Ethylacetat lieferte einen dunkelroten Rohextrakt von 2.6 g, welcher nach Aufnahme in Methanol mit Cyclohexan extrahiert wurde. Das verbleibende Methanolgemisch wurde durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel in sechs Fraktionen getrennt. Für die Weiterbearbeitung wurde hiervon die Fraktion 5 bevorzugt, da vor allem diese durch interessante Aktivitäten bei der Hemmtestkontrolle auffiel (siehe Tabelle 23) und sie zudem mit 442.7 mg die größte Fraktionsmenge aufwies. Alle anderen Fraktionen stellten äußerst komplexe Substanzgemische mit gleichzeitig geringer Menge dar, weshalb eine weitere Aufreinigung im Vergleich zur Fraktion 5 trotz teilweise interessanter Bioaktivitäten nicht lohnenswert war. Die Fraktion 5 wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex und anschließender präparativer Dickschichtchromatographie gereinigt (siehe Abbildung 36). Man erhielt zwei rote Verbindungen **22** und **25**, die sich mit Natronlauge blauviolett verfärbten.

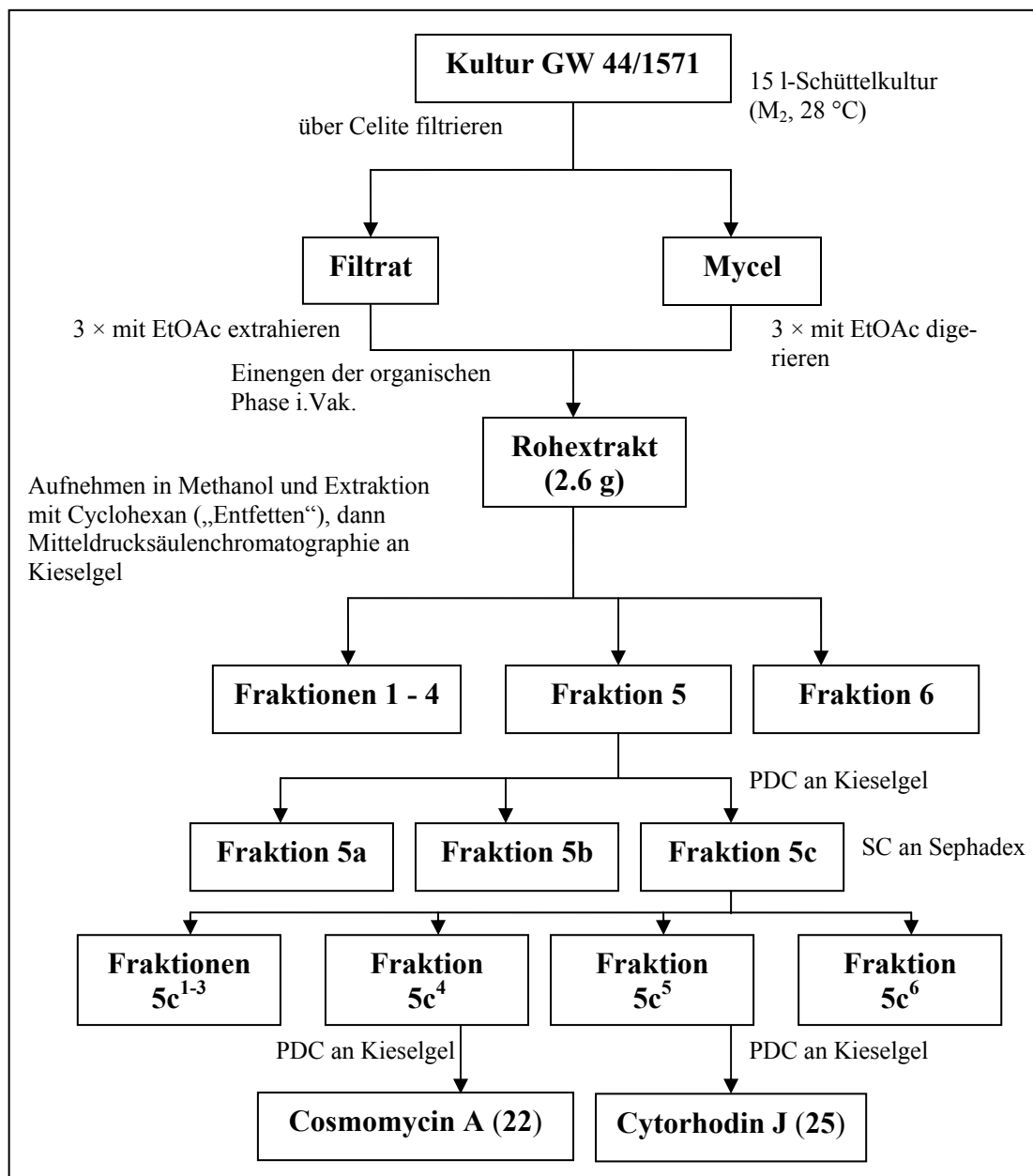


Abbildung 35: Aufarbeitungsschema für die 15 l-Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. GW 44/1571. (SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie.)

Cosmomycin A

Die Masse der isolierten Verbindung **22** konnte durch ESI-Massenspektrometrie zu 755.6 Dalton bestimmt werden. Damit war von einer ungeraden Anzahl an Stickstoffatomen auszugehen. Im EI-Massenspektrum konnte dagegen kein Molpeak erhalten werden. Das ¹H-NMR-Spektrum ließ bei $\delta = 13.83$, 12.63 und 12.08 drei 1H-Singulets erkennen, die aufgrund ihrer Tieffeldlage chelierten Hydroxygruppen zu-

geordnet wurden. Bereits mit diesen Informationen konnten nach einer Recherche in AntiBase[®] allein die Verbindungen Cosmomycin A (**22**) und das patentierte Kesarirhodin B (**21**) erhalten werden. Beide Verbindungen gehören zu der Familie der Anthracyclinantibiotika und unterscheiden sich lediglich in der Position eines Trisaccharids, welches O-glycosidisch mit dem aliphatischen Ring des Aglykons verknüpft ist. Während bei Cosmomycin A (**22**) die O-glycosidische Verknüpfung in Position C-10 erfolgt, findet sich das O-glycosidisch gebundene Trisaccharid bei Kesarirhodin B (**21**) in Position C-7. Dabei ist das Trisaccharid von **21** identisch mit dem von **22** und weist folgende Zuckersequenz auf: Ring A: Rhodosamin, Ring B und C: Rhodinose. Ferner zeigten die Signale im ¹H-NMR-Spektrum bei $\delta = 7.7$, 7.66-7.59 und 7.22-7.18 mit jeweils einer Intensität von 1H, ein aromatisches ABC-System an, wie es auch auf die Verbindungen **21** und **22** zutraf. Der Bereich von $\delta = 5.48$ -4.97 wies vier Singulets der Intensität von je 1H auf und war charakteristisch für acetalische Protonen.

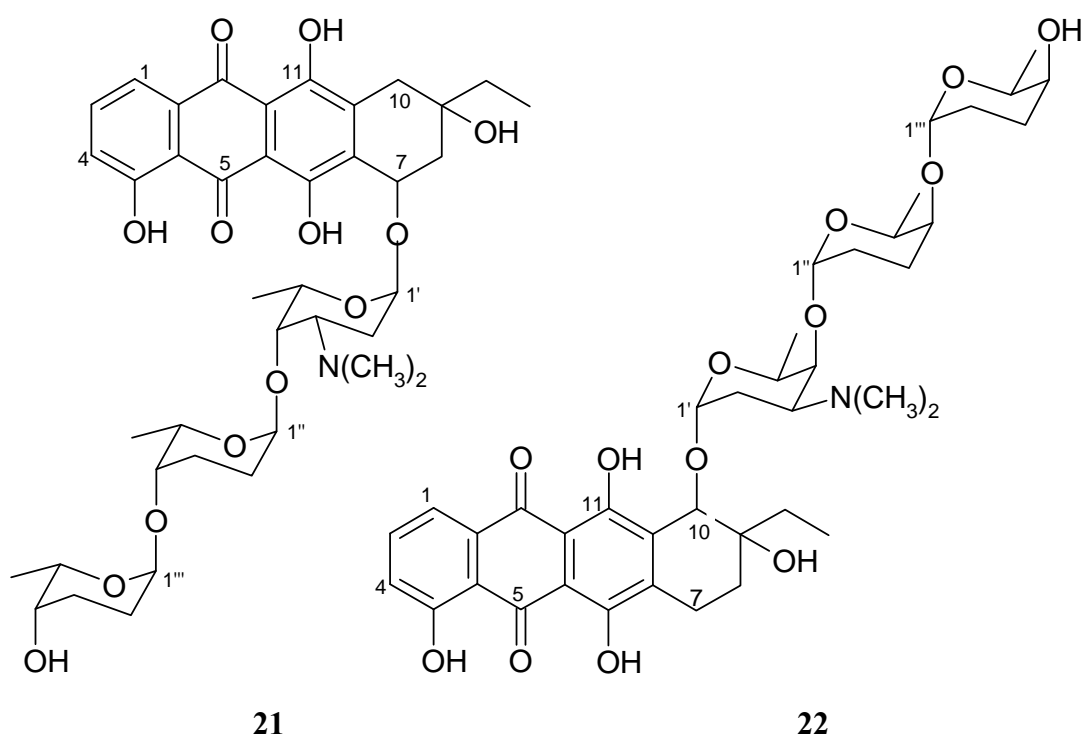


Abbildung 36: Kesarirhodin B (**21**) und Cosmomycin A (**22**).

Wenn es sich bei der isolierten Verbindung tatsächlich um **21** oder **22** handelte, so waren hiervon drei der Signale den anomeren Protonen im Trisaccharid zuzuordnen. Bei $\delta = 2.95$ -2.90 und 2.85-2.75 lagen zwei Multipletts der Intensität von 1 H

mit leichtem Dacheffekt. Zwei Singulets mit jeweils einer Intensität von 3 H erschienen bei $\delta = 2.67$ und 2.53 . Diese Signallage war charakteristisch für an Stickstoff gebundene Methylgruppen und könnte einer Dimethylaminogruppe entsprechen, wie sie bei den Verbindungen **21** bzw. **22** vorkam. Im aliphatischen Bereich verblieben elf Multipletts und drei Dubletts. Sollte es sich bei der isolierten Verbindung um Kesarirhodin B (**21**) handeln, so waren im aliphatischen Bereich zwei Singulets der Intensität von 2H für die Methylengruppen in den Positionen C-9 und C-10 zu erwarten. Da keine entsprechenden Signale vorzufinden waren, konnte Kesarirhodin B (**21**) schnell ausgeschlossen werden. Ein $^1\text{H-NMR}$ -Datenvergleich mit den veröffentlichten Werten⁴⁹ für Cosmomycin A (**22**) zeigte weitgehende Übereinstimmung. Auffällig war der Unterschied der Signale für die Diethylaminogruppe. Während die veröffentlichten Daten ein breites Singulett bei $\delta = 2.25$ für beide Methylgruppen angaben, waren diese Methylgruppen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Verbindung als zwei deutlich getrennte, scharfe Singulets bei $\delta = 2.67$ und 2.53 zu sehen.

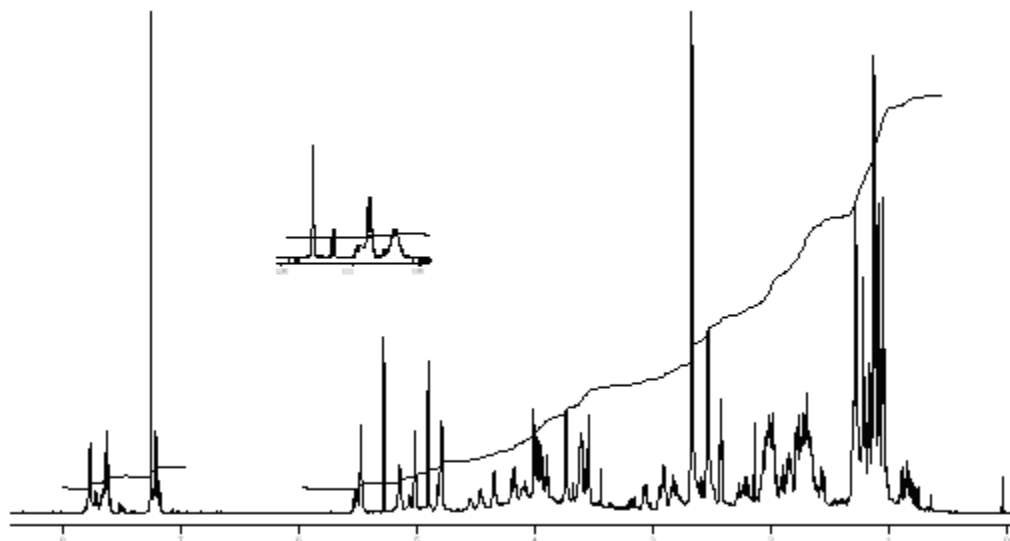


Abbildung 37: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz) von Cosmomycin A (**22**) in CDCl_3 .

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum waren bei $\delta = 190.8$ und 185.7 zwei typische Signale für Ketocarbonylfunktionen zu erkennen. Die chemische Verschiebung der Signale bei δ

= 162.5, 158,0 und 156.3 war charakteristisch für aromatische Kohlenstoffatome mit Sauerstofffunktion, wobei es sich nach ^1H -NMR-Spektrum sehr wahrscheinlich um die drei chelierten Hydroxygruppen handelte. Auch diese Daten standen im Einklang mit einem Anthrachinongrundgerüst wie bei **22**. Dem verbleibenden Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome waren neun Signale zu entnehmen. Die Signale bei $\delta = 98.6, 98.2$ und 96.3 waren charakteristisch für acetalische C-Atome und könnten damit den anomeren C-Atomen in einem Zuckerrest entsprechen, wie es bei dem Glycosidantibiotikum **22** der Fall war. Dies würde auch das fehlende EI-Molekülion erklären, da Glycosidantibiotika in der Regel während der Ionisation fragmentieren und häufig nur noch das Aglykon detektiert werden kann. Im Bereich von $\delta = 74.0$ bis 61.0 lagen zehn Signale, wobei nach dem ^{13}C /APT-NMR-Spektrum neun Signale Methingruppen und das Signal bei $\delta = 71.7$ einem quartären C-Atom zuzuordnen waren. Bei den Signalen mit den chemischen Verschiebungen von $\delta = 41.9$ und 41.2 konnte es sich um die vermutete Dimethylaminogruppe handeln. (Jedoch konnten auch zwei Monomethylaminogruppen vorliegen. Um in diesem Fall der ungeraden Molmasse der Verbindung Rechnung zu tragen, müßte noch mindestens ein zusätzliches drittes Stickstoffatom vorliegen. Diese Möglichkeit konnte aber unter Berücksichtigung der Masse sämtlicher ^1H -, bzw. ^{13}C -Signale im Abgleich mit der ermittelten Gesamtmasse ausgeschlossen werden, da ein drittes Stickstoffatom sich nicht mehr mit der Molmasse der Substanz vereinbaren ließe. Zuletzt sah man Signale zwischen $\delta = 31.0$ bis 20.9 für sechs Methylengruppen und im Bereich von $\delta = 18.1$ bis 6.6 vier Signale für Methylgruppen.

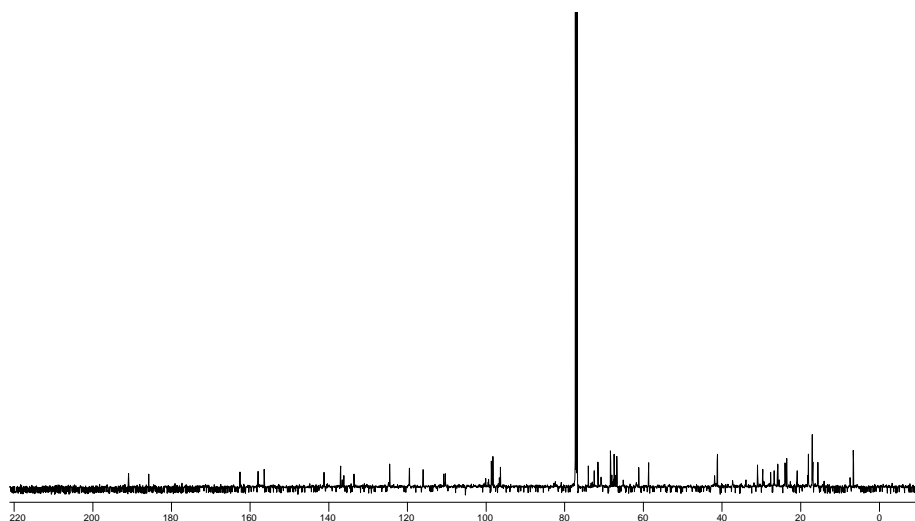


Abbildung 38: ^{13}C -NMR-Spektrum (50 MHz) von Cosmomycin A (**22**) in CDCl_3 .

Ein Vergleich veröffentlichter ^{13}C -NMR-Daten von Cosmomycin A⁵⁰ (**22**) mit der isolierten Verbindung zeigte weitgehend Übereinstimmung (siehe Tabelle 6). Eine Ausnahme stellten wie im ^1H -NMR-Spektrum die Werte für die Dimethylaminogruppe dar ($\delta_{\text{Cexp}} = 41.9$ und 41.2 , $\delta_{\text{Clit}} = 43.3$). Zur Strukturkontrolle wurden daher ein H,H-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektrum gemessen und ausgewertet. Das Aglykon der isolierten Verbindung entsprach hiernach dem von Cosmomycin A (**22**). In Abbildung 40 sind die entsprechenden HMBC- und H,H-COSY-Kopplungen dargestellt.

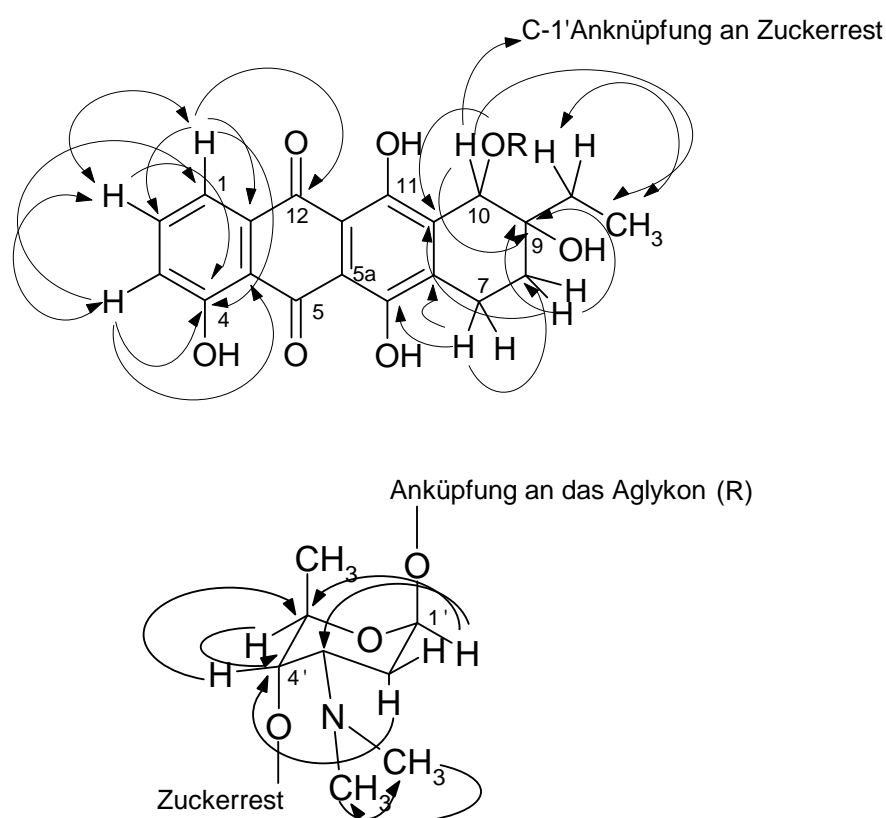


Abbildung 39: Aglykon von Cosmomycin A (**22**) und der Zucker Rhodosamin (**23**), welcher O-glycosidisch mit dem Aglykon verknüpft ist.

Die Identität der Zuckermoleküle konnte nicht eindeutig festgelegt werden, da sich die zugehörigen Signale im ^1H -NMR-Spektrum stark überlagerten. Lediglich der an das Aglykon gebundene Zucker-Ring A konnte nach H,H-COSY und HMBC-Korrelationen als Rhodosamin (**23**) identifiziert werden (siehe Abbildung 40). Die C-Atome der Dimethylaminogruppe koppelten im HMBC-Spektrum gegenseitig aufeinander. Der verbleibende Zuckerrest sollte mit Hilfe eines Tochterionen-Massenspektrums näher definiert werden. Dabei erhielt man nach der ersten Frag-

mentierung zwei Signale bei $m/z = 643$ und $m/z = 528$. Dem ersten Signal entspricht eine Massendifferenz von 114 zum Gesamtmolekül mit $m/z = 757$, dem zweiten Signal eine Differenz von 229, was für die beiden erwarteten Rhodiose-Moleküle sprechen würde. Eine zweite Fragmentierung gab eine Differenz von 175 zwischen den Signalen bei $m/z = 528$ und 353. Dies entsprach der Abspaltung von einem Wassermolekül und dem bereits als Rhodosamin identifizierten Zucker A. Dieser war O-glycosidisch in Position C-10 mit dem Aglykon verbunden, wie eine Kopplung des Protons am anomeren Kohlenstoffatom mit $\delta_{\text{H}} = 5.48$ auf das C-Atom in Position C-10 bei $\delta = 70.7$ zeigte. Hiernach lag die gleiche Zuckersequenz wie bei Cosmomycin A (**22**) vor. Da auch das Aglykon dem des Cosmomycins A entsprach und auch die ^{13}C -NMR-Werte gute Übereinstimmung zeigten, handelte es sich bei der isolierten Verbindung sehr wahrscheinlich um Cosmomycin A (**22**). Letzteres wurde 1984 erstmals von Toshihiko Ando *et al.*⁵⁰ aus *Streptomyces cosmosus* isoliert und ist aktiv gegen Tumorzelllinien der Maus (ID_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = 0.091; MSV-3T3) sowie gegen epidermale Karzinom-Zellen des Menschen (ID_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = 0.16; KB). Im Agardiffusionstest wurden mittelstarke Aktivitäten der isolierten Verbindung **22** gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* gefunden (siehe Tabelle 10).

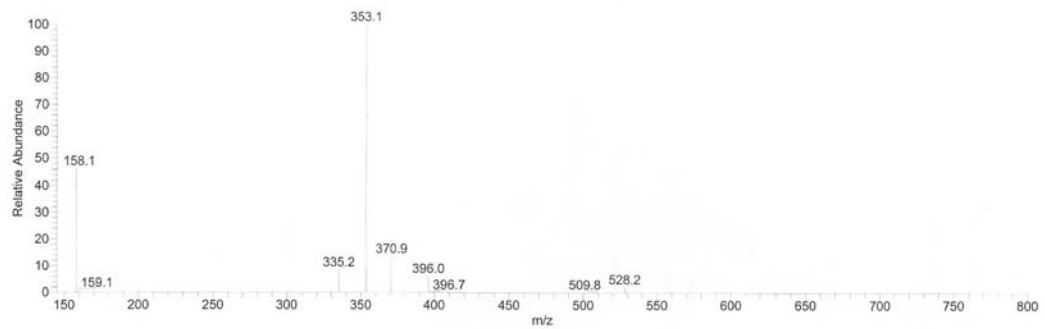
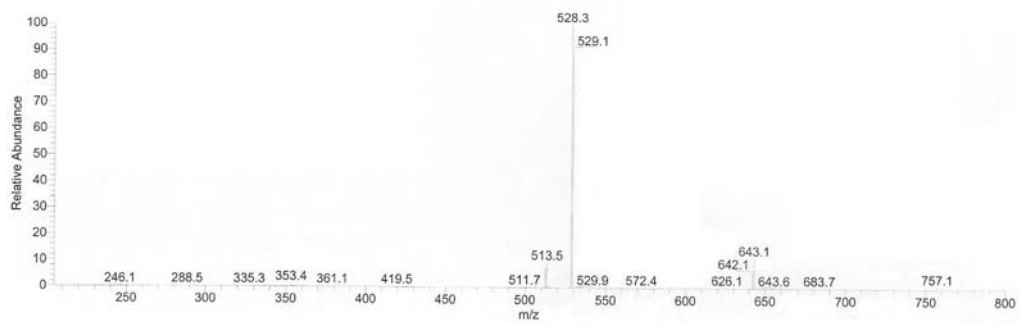
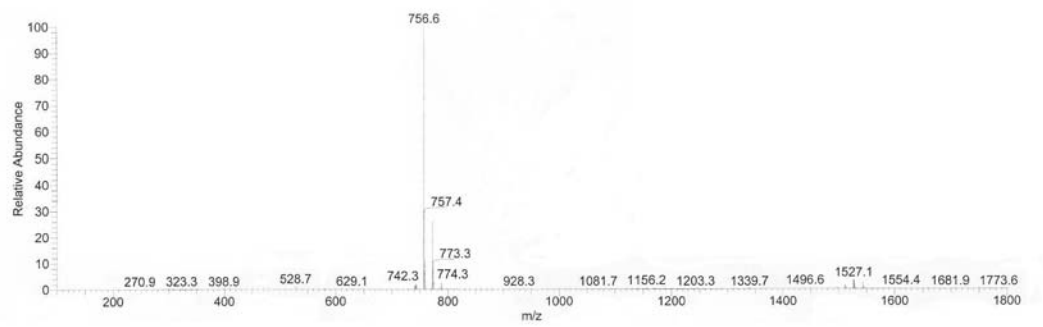


Abbildung 40: Tochterionen-Massenspektrum von Cosmomycin A (22).

Tabelle 6: Vergleich der ^{13}C -NMR-Literaturwerte für Cosmomycin A (**22**)⁵⁰ mit den experimentellen Werten.

Position	Cosmomycin A _(lit.)	Cosmomycin A _(exp.)
1	119.3	119.4
2	136.8	136.1
3	124.2	124.5
4	162.3	162.5
4a	115.8	116.0
5	190.4	190.8
5a	110.5	110.8
6	156.4	156.3
6a	137.2	136.9
7	21.0	20.9
8	26.9	26.8
9	71.7	71.6
10	70.1	70.7
10a	141.1	141.0
11	158.2	158.0
11a	110.0	110.3
12	185.3	185.7
12a	133.4	133.5
13	30.9	31.0
14	6.7	6.6
1'	97.0	96.3
2'	29.7	29.7
3'	61.5	61.0
4'	74.2	72.6
5'	68.8	68.4
6'	18.1	18.1
N(CH ₃)	43.3	41.9/41.2
1''	98.6	98.3
2''	24.6	23.9
3''	24.6	24.0
4''	75.3	74.0
5''	66.7	66.7
6''	17.1	17.1
1'''	99.5	98.6
2'''	23.6	23.6
3'''	26.0	25.8
4'''	66.7	67.4
5'''	67.5	68.3
6'''	17.1	16.9

Cytorhodin J

Die zweite Verbindung **25** konnte mit einem Gemisch aus $\text{CHCl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ von der Sephadex-Säule eluiert werden. Die Molmasse wurde anhand des ESI-Massenspektrums zu 770 Dalton bestimmt. Im EI-Massenspektrum konnte kein Molpeak erzielt werden. Das ^1H -NMR-Spektrum ließ drei chelierte Hydroxygruppen bei $\delta =$

13.53, 12.86 und 12.18 erkennen. Dem Bereich aromatischer Protonen waren ein Dublett bei $\delta = 7.87$ und ein Multiplett bei $\delta = 7.30$ sowie ein Triplet bei $\delta = 7.69$ mit jeweils der Intensität von 1H zu entnehmen. Zwischen $\delta = 5.43$ bis 3.95 lagen acht Signale mit einer Gesamtintensität von 9H. Dieser Bereich ist u.a. charakteristisch für Protonen mit geminaler Sauerstofffunktion. Bei $\delta = 3.70$ lag ein Singulett mit der Intensität von 3H, welches einen Methylester oder eine aromatisch gebundene Methoxygruppe anzeigen könnte. Bei $\delta = 3.58, 3.54$ und 3.50 lagen drei Singulets mit jeweils einer Intensität von 1H. Zwischen $\delta = 2.39$ und 1.53 erschienen vier Multipletts mit einer Gesamtintensität von 14H, was auf sieben Methylengruppen schließen ließ. Schließlich waren vier Methylgruppen den Signalen bei $\delta = 1.10$ bis 1.26 zuzuordnen.

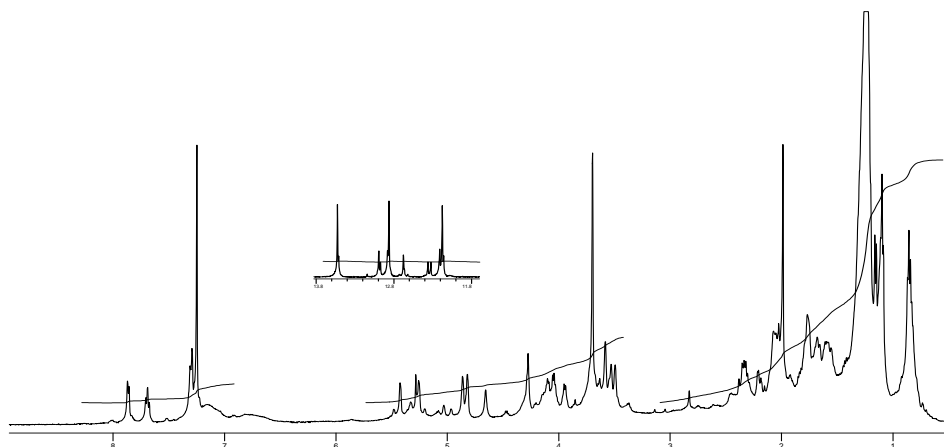


Abbildung 41: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cytorhodin J (**25**) in CDCl_3 .

Im ^{13}C -NMR-Spektrum wurden bei $\delta = 190.9$ und 186.2 zwei Ketocarbonylfunktionen angezeigt, die wegen der relativ hochfeldverschobenen Lage einem chinoiden System zuzuordnen waren.

Die Signale bei $\delta = 162.8, 157.1$ und 157.0 wurden den nach dem ^1H -NMR-Spektrum vermuteten C-Atomen mit chelierten Hydroxygruppen zugeordnet. Das Signal bei $\delta = 171.5$ wies auf das C-Atom einer Carbonsäure- bzw. Carbonsäureesterfunktion hin. Dem Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome waren neun Signale zu entnehmen. Wenn es sich hierbei ausschließlich um aromatische Kohlenstoffatome handelte, dann könnten diese zusammen mit den Kohlenstoffatomen der chelierten Hydroxygruppen und den beiden Ketocarbonylfunktionen ein Anthrachinongerrüst bilden. Die Signale bei $\delta = 101.5, 99.6$ und 99.5 wurden auf drei acetal-

sche Kohlenstoffatome zurückgeführt. Zwischen $\delta = 75.0 - 66.8$ lagen sieben Signale, für die der charakteristischen chemischen Verschiebung zufolge, Kohlenstoffatome mit Sauerstoffbindung angenommen wurden. Das Signal bei $\delta = 52.3$ war typisch für Methoxygruppen. Dabei konnte eine aromatisch gebundene Methoxygruppe ausgeschlossen werden, da hierfür ein entsprechendes Signal bei $\delta_C \approx 150-160$ für das zugehörige aromatische Kohlenstoffatom fehlte. Auch ein aliphatischer Methylether konnte ausgeschlossen werden, da in diesem Fall ein weiteres Signal im Bereich von $\delta = 50 - 75$ zu erwarten wäre, welches hier jedoch fehlte. Hingegen sprach für einen Methylester das Signal bei $\delta = 171.5$, dessen chemische Verschiebung u.a. typisch für ein Carbonyl-C-Atom in einem Carbonsäureester war. Der Bereich zwischen $\delta = 33.5$ und 22.6 war nur ungenügend auswertbar, da Signale von Verunreinigungen störten.

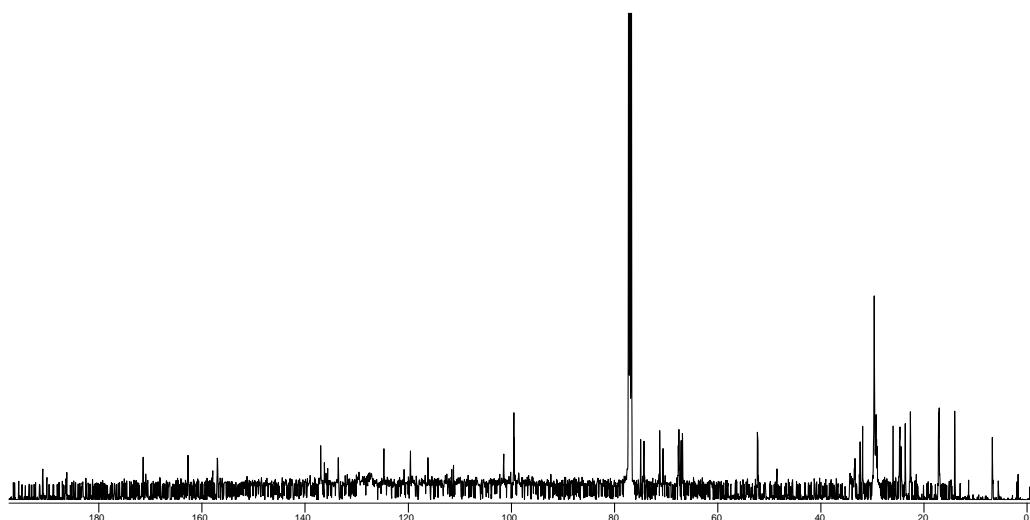


Abbildung 42: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Cytorhodin J (**25**) in CDCl_3 .

Näheren Aufschluß lieferte schließlich das HSQC-Spektrum. Hiernach waren den Multipletts zwischen $\delta_H = 2.39$ und 1.53 , denen eine Gesamtintensität von 16H entsprach, die fünf Signale bei $\delta_C = 33.5, 33.4, 24.8, 24.7$ und 24.5 zuzuordnen. Damit mußten einige der Signale im ^{13}C -Spektrum zusammenfallen bzw. nur unzureichend aufgelöst sein. Die verbleibenden Signale in dem genannten Bereich von $\delta = 33.5$ bis 22.6 zeigten im HSQC-Spektrum zum einen Teil keine Korrelationen, was möglicherweise auf quartäre C-Atome zurückzuführen war (ein auswertbares ^{13}C -APT/NMR-Spektrum konnte wegen zu geringer Substanzmenge nicht erhalten werden). Für diese Möglichkeit wären die Signale jedoch auffällig stark hochfeldver-

schoben. Zum anderen Teil waren Kopplungen von Protonensignalen zu erkennen, die jedoch nach Bewertung der jeweiligen Integrale nicht zu der gesuchten Verbindung gehören konnten. Schließlich konnte mit Hilfe des HMBC-Spektrums allein das Signal bei $\delta = 32.4$ als quartäres Kohlenstoffatom (C-13) identifiziert werden, da hierauf deutliche Kopplungen von den Protonen des Multipletts bei $\delta = 2.20-2.15$ zu sehen waren. Zuletzt zeigten die Signale bei $\delta = 17.2, 17.1, 14.1$ und 6.8 , die nach Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums erwarteten vier Methylgruppen an. Mit diesen Daten wurde eine Substruktursuche in AntiBase[®] durchgeführt, wobei man als einzigen Eintrag die patentierte Verbindung Cytorhodin J (**25**)⁵¹ erhielt (siehe Abbildung 44). Ein Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten ergab weitgehende Übereinstimmung⁵² (siehe Tabelle 7), $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten wurden nicht veröffentlicht.

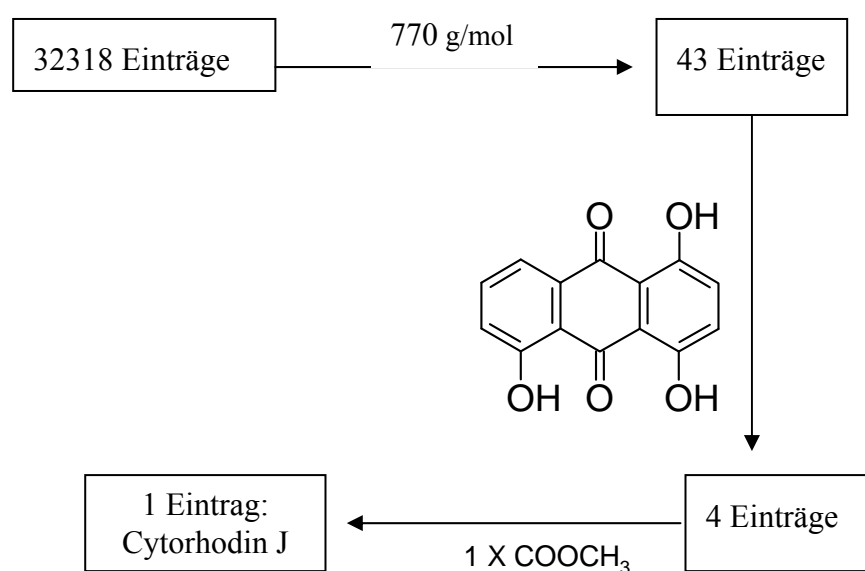


Abbildung 43: Struktursuche in AntiBase[®] mit ausgewählten spektroskopischen Daten von **25**.

Tabelle 7: Vergleich der ^1H -NMR-Daten von Cytorhodin J (**25**) exp. Mit den Literaturwerten⁵².

Position	Cytorhodin J (lit.)	Cytorhodin J (exp.)
1	7.88	7.87
2	7.7	7.69
3	7.34	7.30
4-, 6-, 11-OH	13.52, 12.88, 12.19	13.52, 12.86, 12.18
7	5.28	5.27
10	4.3	4.28
1'	5.45	5.43
1'', 1'''	4.83-4.86	4.82, 4.86
4', 4'', 4'''	3.51-3.6	3.50, 3.54, 3.58
5', 5'', 5'''	3.94-4.12	3.95, 4.15-4.03
COOCH ₃	3.7	3.70
1 × CH ₂	2.36	2.34
7 × CH ₂	1.7-2.25	2.15-2.22, 2.02-2.10, 1.55-1.80
OH	1.6	-
4 × CH ₃	1.1-2.2	1.32-1.20, 1.16, 1.10

Cytorhodin J (**25**) gehört zu der Familie der Anthracyclinglycosid-Antibiotika. Das Aglykon entspricht dabei der Verbindung ϵ -Rhodomycinon (**24**)⁵³. In Position C-7 findet sich die O-glycosidische Bindung zu einem Trisaccharid, bestehend aus drei Molekülen Rhodiose. Da in dem Patent⁵¹ für **25** keine ^{13}C -NMR-Daten veröffentlicht waren, wurden schließlich zur sicheren Bestimmung der Struktur die H,H-COSY, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen und ausgewertet. Dabei ließen die HMBC-Kopplungen keinen Zweifel darüber, daß das Aglykon der isolierten Verbindung mit ϵ -Rhodomycinon (**24**) identisch war (siehe Abbildung 45). Zur zusätzlichen Absicherung der Struktur wurden die ^{13}C -NMR-Werte von **25**⁵³ mit denen für das Aglykon der isolierten Verbindung verglichen. Dabei stimmten die Werte im Wesentlichen überein; eine Ausnahme bildete verständlicherweise die Position C-7, von welcher die O-glycosidische Bindung ausging (siehe Tabelle 8).

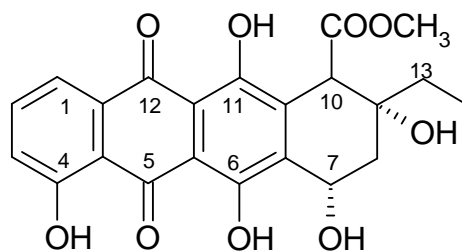


Abbildung 44: ϵ -Rhodomycinon (**24**) (entspricht dem Aglykon von Cytorhodin J (**25**)).

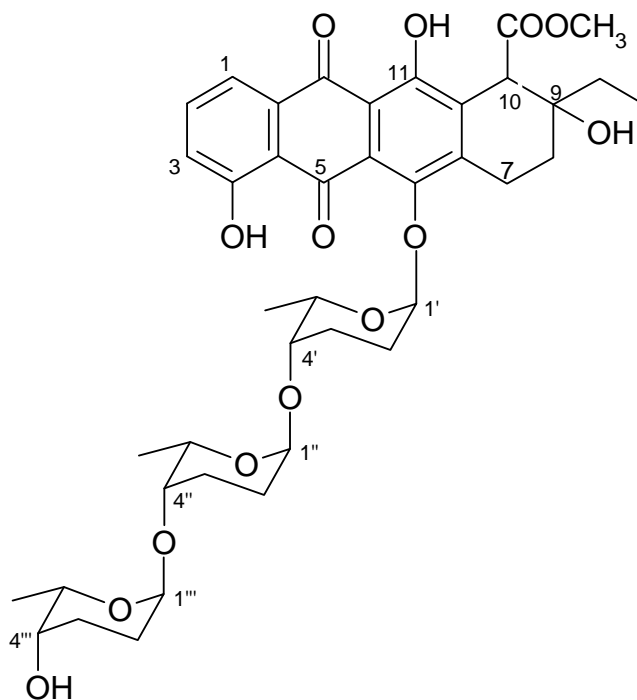
Zwar konnten durch HSQC-Experimente sämtliche C→H Zuordnungen getroffen werden (siehe Tabelle 9), jedoch konnten die genauen Positionen sowie die Verknüpfung zum Aglykon des Trisaccharids nicht angegeben werden, da zum Teil die entsprechenden HMBC-Kopplungen fehlten und die H,H-COSY-Korrelationen nur unzureichend waren. Das Tochterionen-Massenspektrum stützte aber die Annahme, daß das Trisaccharid aus drei Rhodnose-Einheiten aufgebaut sein mußte. Nach Fragmentierung der Substanz waren zwei Signale bei $m/z = 679$ und 565 zu erkennen. Dies entsprach einer Massendifferenz zu dem Quasimolekülpeak bei $m/z = 793$ von 114 bzw. 228, so daß insgesamt die beiden endständigen Rhodnosemolekülen abgespalten sein mußten. Wenn auch die Stereochemie des Trisaccharids nicht geklärt werden konnte, so scheint die isolierte Verbindung nach dieser Datenlage sowie aufgrund der guten Übereinstimmung mit den veröffentlichten $^1\text{H-NMR}$ -Werten⁵², mit Cytorhodin J (**25**) identisch zu sein.

Cytorhodin J (**25**) hemmt das Wachstum von verschiedenen Mikroorganismen wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* und *Candida albicans*⁵². Die isolierte Verbindung **25** zeigte im Agardiffusionstest mittelstarke Aktivitäten gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptomyces viridochromogenes* (siehe Tabelle 10).

Tabelle 8: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von Cytorhodin J (**25**) (exp.) mit den Literaturwerten für ϵ -Rhodomycinon (**24**)⁵³ (gemessen in CDCl_3).

C-Atom	ϵ -Rhodomycinon	Cytorhodin J exp.
1	119.4	119.6
2	137.7	137.0
3	124.6	124.8
4	162.1	162.8
4a	115.6	116.2
5	190.3	190.9
5a	111.1	111.6
6	155.9*	157.1
6a	134.4	135.7
7	61.8	71.3
8	34.2	33.5
9	71.5	70.6
10	52.3	52.25
10a	136.9	136.3
11	156.2*	157.0
12	185.7	186.2
12a	133.0	133.6
13	32.4	32.4
14	6.5	6.8
15	171.3	171.5
16	51.5	52.29

*Signale sind austauschbar



25

Tabelle 9: HSQC-Korrelationen des Trisaccharid-Teils von Cytosporin J (**25**).

C-Atom [δ]	H-Atom [δ]
101.5	5.43
99.6	4.86
99.5	4.84
75.0	3.50
74.3	3.54
67.7	4.15-4.03
67.6	3.58
67.1	3.95
66.8	4.15-4.03
26.0	1.80-1.55
24.8	2.10-2.02
24.7	1.73-1.53
17.19	1.13-1.08
17.15	1.21
17.10	1.16

Tabelle 10: Bioaktivitäten des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. GW 44/1571, der Kieselfraktion 5 des entsprechenden Rohextraktes sowie von Cosmomycin A (**22**) und Cytorhodin J (**25**) im Vergleich.

Testkeim	Rohextrakt	Fraktion 5	Cosmomycin A	Cytorhodin J
<i>Escherichia coli</i>	20	25	25	23
<i>Bacillus subtilis</i>	21	25	25	23
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	18	20	20	17
<i>Candida albicans</i>	0	0	0	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	23	23	21
<i>Chlorella sorokiniana</i>	11	18	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	11	16	0	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0	12	0	0

Marine Streptomyceten

Stamm B 5546

Der Rohextrakt des marinen Streptomyceten Stammes B 5546 zeigte im biologischen Screening schwache Aktivität gegen *Chlorella sorokiniana* und starke Aktivität gegen *Mucor miehei* (Tü 284). Da der im Primärscreening eingesetzte Rohextrakt gegen alle übrigen Testorganismen wirkungslos war, lag eine sehr selektive Wirkung vor. Beim chemischen Screening waren auf dem Dünnschichtchromatogramm zwei bei Tageslicht gelbe Zonen ($R_f = 0.92$ und $R_f = 0.56$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\% \text{CH}_3\text{OH}$) sowie mehrere Fluoreszenz löschende Zonen auffällig. Die Anzucht des Stammes erfolgte im Umfang einer 24 l-Schüttelkultur, die nach viertägigem Wachstum mit Ethylacetat und Aceton extrahiert worden ist. Der hieraus resultierende gelbbraune Gesamtrohextrakt von 1.87 g wurde durch Vakuum-Liquid-Chromatographie in vier Frakti-

onen vorgetrennt. Nach Überprüfen der biologischen Aktivität (siehe Tabelle 25) wurden die Fraktionen 3 und 4 bevorzugt weiterbearbeitet. Dabei fiel auf, daß die Fraktionen 2-4 gegen alle Testorganismen aktiv waren und nun gegen *Streptomyces viridochromogenes* bei Fraktion 3 sogar eine mittlere Aktivität vorlag, während gegen *Mucor miehei* (Tü 284) nur noch schwache Aktivitäten beobachtet wurden.

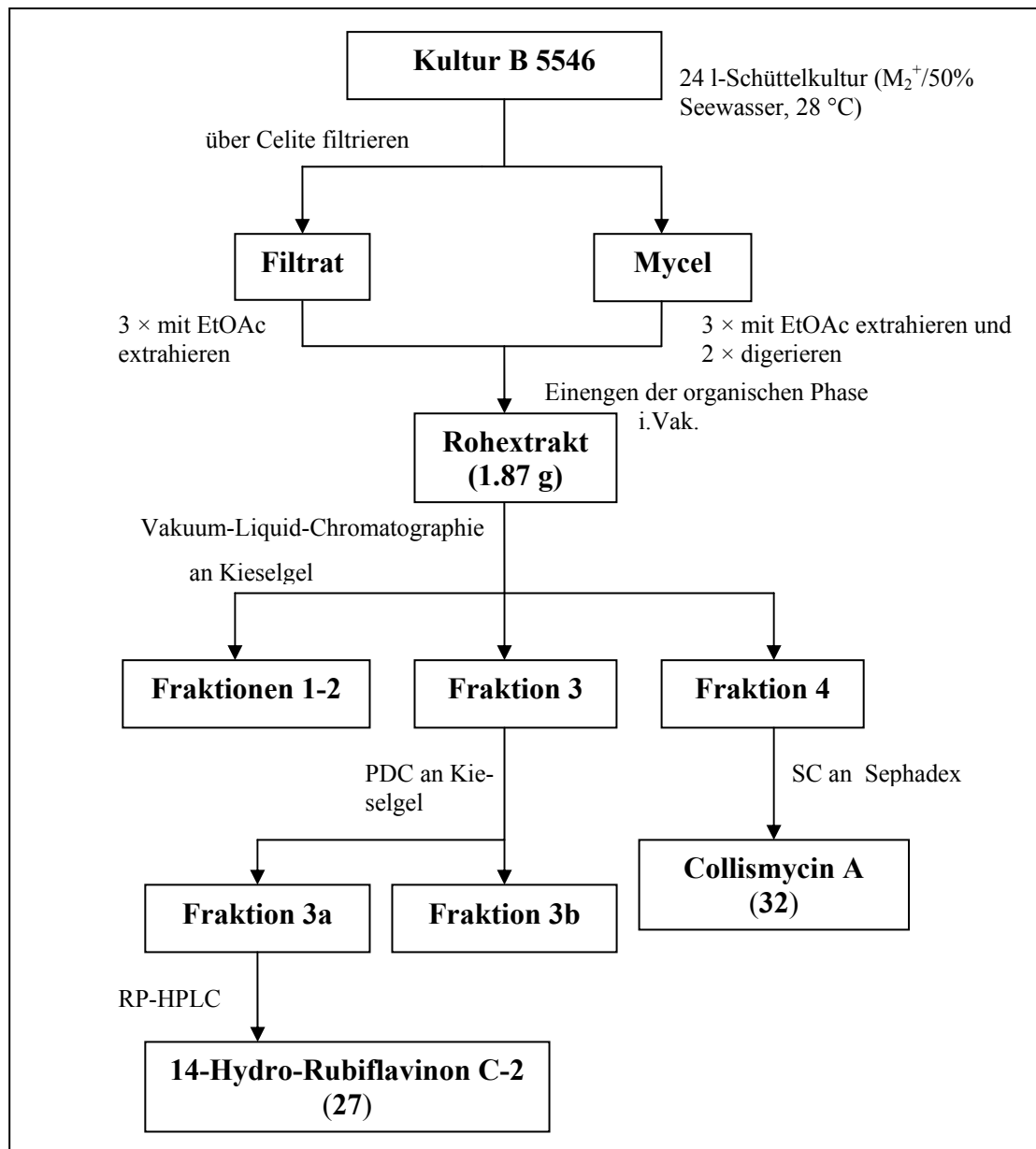


Abbildung 45: Aufarbeitungsschema für die 24 l-Schüttelkultur von *Streptomyces* sp. B 5546 (SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie; RP = reverse phase).

14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2

Die Fraktion 3 wurde durch PDC an Kieselgel und anschließender präparativer RP-HPLC gereinigt. Man erhielt die unpolare gelbe Verbindung, welche bereits im Primärscreening ($R_f = 0.96$; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\% \text{CHCl}_3$) aufgefallen war. Das ESI-Massenspektrum ließ eine Molmasse von 388 Dalton annehmen. Der Molekülpeak im EI-Massenspektrum mit $m/z = 388$ bestätigte diese Vermutung. Durch EI-Hochauflösung konnte schließlich die Summenformel der zu $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_5$ bestimmt werden. Die Substanz verfärbte sich mit Natronlauge rot, was möglicherweise auf ein *peri*-Hydroxychinon zurückzuführen war. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum unterstützte diese Vermutung durch das Singulett der Intensität von 1H bei $\delta = 12.94$, welches einer chelierten Hydroxygruppe entsprach. Ferner waren Signale für ein ABC-Spinsystem zu erkennen ($\delta = 7.80, 7.66$ und 7.34), welche typischerweise in zwei Dubletts von Dubletts und ein Triplett aufgespalten waren. Ein Singulett der Intensität von 1H bei $\delta = 6.22$ deutete auf ein olefinisches oder aromatisches Proton hin. Die zwei Multipletts mit jeweils einer Intensität von 1H bei $\delta = 5.53$ und 5.38 wurden olefinischen Protonen zugeordnet. Das Quartett bei $\delta = 2.84$ zeigte ein Proton an, welches bei Übereinstimmung der jeweiligen Kopplungskonstanten ($J = 7.0 \text{ Hz}$) zu der Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.58$ benachbart war, deren Signal als Dublett aufgespalten vorlag. Zwei Multipletts mit deutlichem Dacheffekt der Intensität von jeweils 1H waren bei $\delta = 2.71$ und 2.49 zu sehen. Dabei können ausgeprägte Dacheffekte oftmals als Hinweis auf eine geminale Stellung der Kopplungspartner gewertet werden. Außerdem lag bei $\delta = 3.00$ ein Singulett der Intensität von 3H vor, wobei es sich aufgrund der relativen Tieffeldlage des Signals wahrscheinlich um eine aromatisch gebundene Methylgruppe handelte. Jedoch konnte auch durchaus eine hochfeldverschobene, aliphatische Methoxygruppe in Frage kommen. Diese Möglichkeit wurde durch die Auswertung des anschließenden ^{13}C -Experiments ausgeschlossen, da ein entsprechendes Signal im Bereich von $\delta \approx 40-60$ fehlte. Schließlich verblieb ein Dublett bei $\delta = 1.42$ für eine Methylgruppe.

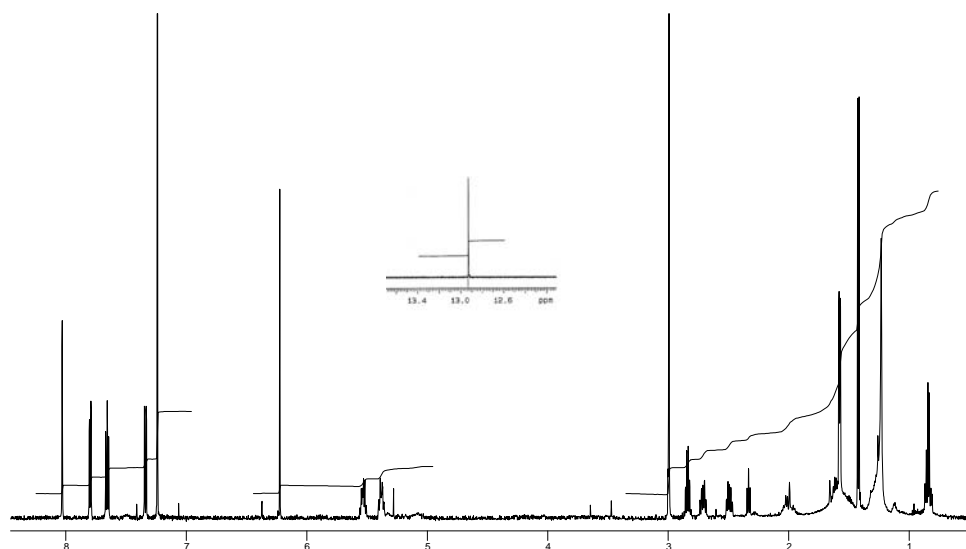


Abbildung 46: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz) von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) in CDCl_3 .

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte zwei Signale bei $\delta = 187.3$ und 182.0 , die charakteristisch für Chinonkohlenstoffatome waren. Der Unterschied der chemischen Verschiebung für diese Atome war damit zu erklären, daß die nach dem ^1H -NMR-Spektrum identifizierte Hydroxygruppe zu dem Sauerstoffatom der Carbonylgruppe bei tieferem Feld ($\delta_{\text{C}} = 187.3$) cheliiert war. Die Signale bei $\delta = 179.3$ und 172.4 konnten auf Carbonylfunktionen in beispielsweise einer Carbonsäureester- oder Carbonsäureamidgruppe hinweisen. Die Signale bei $\delta = 162.6$ und 156.7 waren typisch für aromatische Kohlenstoffatome mit Sauerstoffbindung, wobei eines hiervon auf die cheliierte Hydroxygruppe zurückzuführen war. Ferner verblieben im aromatisch/olefinischen Bereich 13 Signale zwischen $\delta = 111.3 - 149.7$. Dieser Datenlage zufolge wurde von einem Hydroxyanthrachinon als Grundgerüst für die isolierte Verbindung ausgegangen. Schließlich waren im aliphatischen Bereich zwischen $\delta = 12.9 - 39.0$ fünf Signale zu erkennen, die nach Vergleich mit dem ^{13}C /APT-NMR-Spektrum auf eine Methin-, eine Methylen- und drei Methylgruppen zurückzuführen waren.

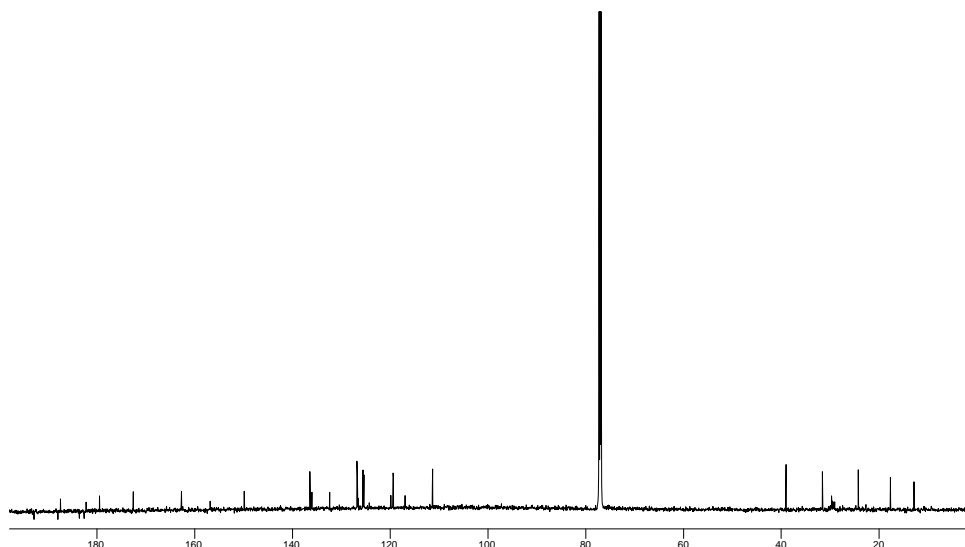


Abbildung 47: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von 14,15-Dihydro-rubiflavin C-2 (**27**) in CDCl_3 .

Eine Datenbankrecherche in AntiBase[®] mit diesen Angaben ergab keinen exakt passenden Eintrag. Jedoch wurde nach einer weniger eingrenzenden Suche Verbindungen aus der Familie der Pluramycin-Antibiotika mit ähnlichen NMR-Daten angezeigt. Anhand der anschließend durchgeführten H,H-COSY, HSQC und HMBC Experimente ließ sich tatsächlich das für Pluramycine typische Anthrachinon- γ -Pyron-Grundgerüst nachweisen (siehe Abbildung 49).

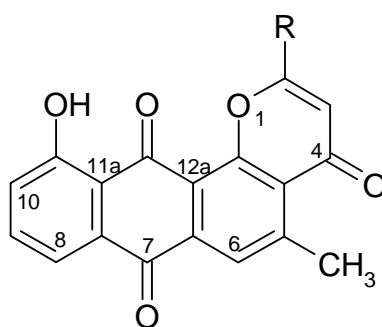
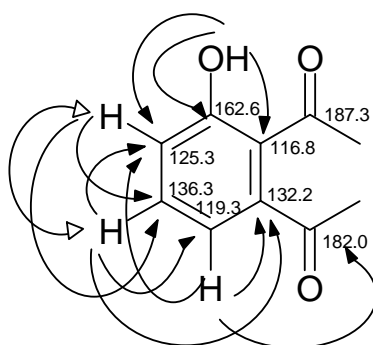


Abbildung 48: Pluramycin-Grundgerüst (**26**)

So zeigte das Proton der Hydroxygruppe im HMBC-Spektrum zwei 3J -Kopplungen auf die Kohlenstoffatome bei $\delta = 116.8$ (C_q) und 125.3 (CH , 7.34) sowie

eine 2J -Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 162.6$, das der chemischen Verschiebung nach die Hydroxygruppe tragen mußte. Die Protonen bei $\delta = 7.34$ und 7.80 koppelten auf das quartäre C-Atom bei $\delta = 116.8$ (3J), das Proton bei $\delta = 7.80$ zeigte zudem zwei 3J -Kopplungen auf die C-Atome bei 182.0 und 125.3 (CH, 7.24). Das Proton bei $\delta = 7.66$ koppelte auf das quartäre C-Atom bei $\delta = 132.3$. Schließlich wurde durch die H,H-COSY-Korrelationen die Positionen der drei aromatischen Protonen des 1,2,3-trisubstituierten Benzolringes endgültig geklärt (siehe Fragment I in Abbildung 50).



I

Abbildung 49: HMBC- (\rightarrow) und H,H-COSY-Korrelationen (\leftrightarrow) des Fragmentes I von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**).

Das Proton bei $\delta = 8.30$ wies vier 3J -Kopplungen zu den C-Atomen bei $\delta = 182.0$, 126.5 , 119.7 und 24.3 auf. Ferner war eine schwache 4J -Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 187.3$ zu erkennen.

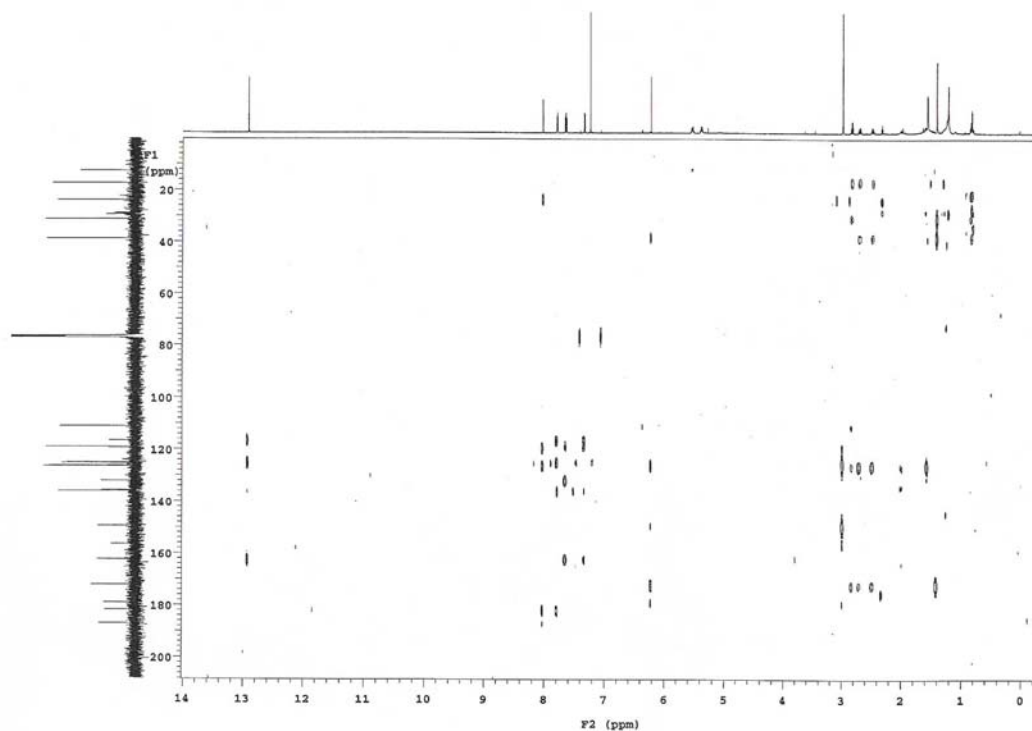


Abbildung 50: HMBC-Spektrum (600 MHz) von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (27) in CDCl_3 .

Das olefinische Proton bei $\delta = 6.22$ koppelte auf die C-Atome bei $\delta = 172.4$, 149.7 , 39.0 und zeigte eine schwache Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 179.3$. Die Protonen des Singulets bei $\delta = 3.00$ ließen sich nach der HMQC-Auswertung dem C-Atom bei $\delta = 24.3$ zuordnen und zeigten zwei 3J -Kopplungen zu den C-Atomen bei $\delta = 125.5$ (CH, 8.30 ppm) und 149.7 sowie eine 2J -Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 119.7$, an welches also die Methylgruppe gebunden war. Außerdem lagen deutliche 4J -Kopplung auf die C-Atome bei $\delta = 126.5$, 156.7 und 179.3 vor. Obwohl bei HMBC-Experimenten in der Regel 2J - und 3J -Kopplungen auftreten, können mitunter bei fixierten Ringsystemen auch 4J - und 5J -Kopplungen beobachtet werden. Damit war das Anthrachinon- γ -Pyrone-Grundgerüst aufgeklärt. Die Seitenkette wurde vor allem durch H,H-COSY-Korrelationen festgelegt.

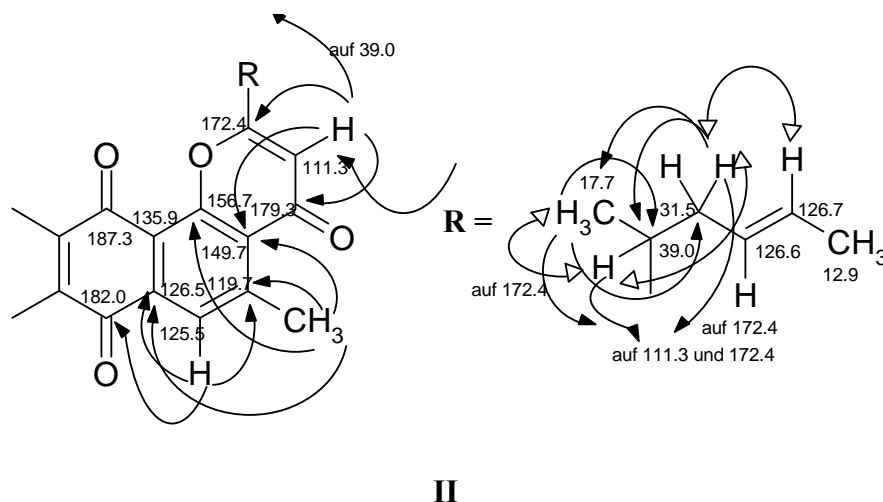


Abbildung 51: HMBC- (→) und H,H-COSY-Korrelationen (↔) des Fragments II und des Seitenkettenrestes R von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (27).

So korrelierte das Signal bei $\delta = 1.42$ der Methylgruppe mit $\delta_C = 17.7$ zu dem Methinproton bei $\delta = 2.84$ und zeigte außerdem eine 3J -Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 172.4$. Das Methinproton bei $\delta = 2.84$ war nach der HSQC-Kopplung dem C-Atom bei $\delta = 39.0$ zuzuordnen und koppelte seinerseits auf das C-Atom bei $\delta = 172.4$. Hiermit war die Verknüpfung der Seitenkette zu dem Grundgerüst bestimmt. Das Proton bei $\delta = 2.84$ korrelierte im H,H-COSY-Spektrum mit den Protonen bei $\delta = 2.81$ und 2.71 , die mit dem C-Atom bei $\delta = 31.5$ verknüpft waren und welche untereinander geminale H,H-Kopplungen zeigten, auf die auch der starke Dacheffekt im ^1H -NMR-Spektrum Hinweise lieferte. Beide Protonen waren nach der H,H-COSY-Auswertung zu dem Proton bei $\delta = 5.38$ benachbart und dieses zu dem Proton bei $\delta = 5.53$. Letztere waren mit den C-Atomen 126.6 bzw. 126.7 assoziiert, womit die zweite Doppelbindung lokalisiert war (eine eindeutige Zuordnung der Protonen war wegen der ungenügend aufgelösten Kohlenstoffatomsignale nicht möglich).

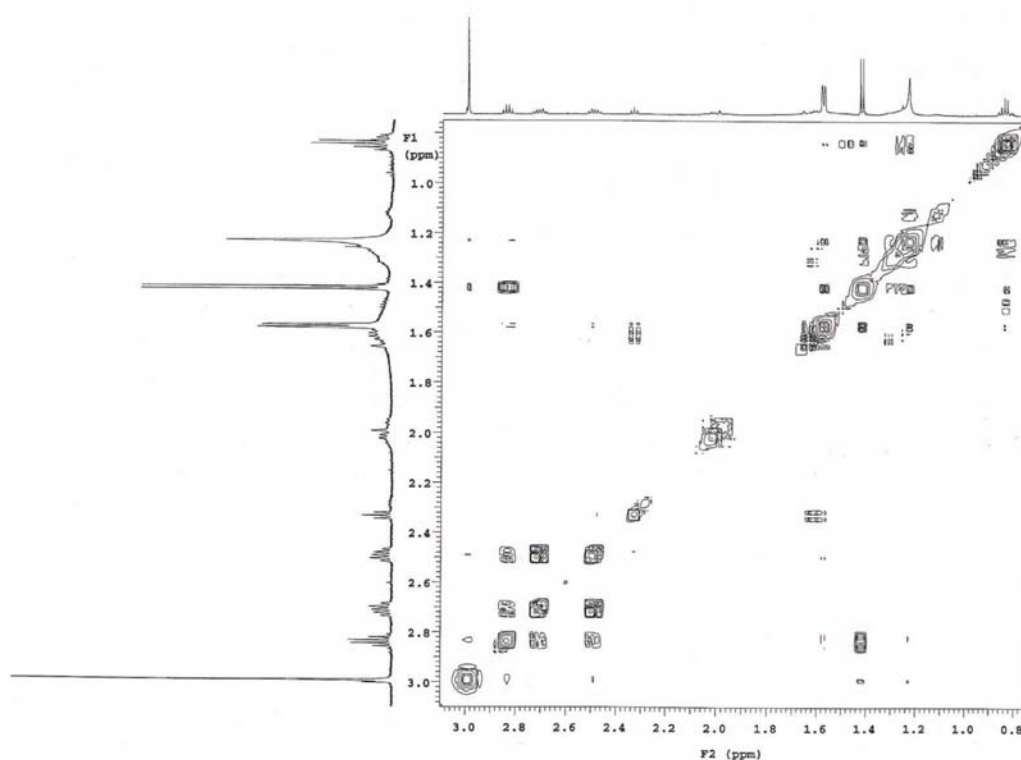


Abbildung 52: Ausschnitt des H,H-COSY-Spektrums (600 MHz) von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) in CDCl_3 .

Das Proton bei $\delta = 5.53$ war schließlich zu der terminalen Methylgruppe benachbart ($\delta_{\text{H}} = 1.58$ und $\delta_{\text{C}} = 12.9$). Nicht geklärt werden konnte, ob es sich hierbei um *cis*- oder *trans*-ständige Protonen handelte, da die Signale beider Protonen als Multiplett aufgespalten waren und damit eine Kopplungskonstante nicht ermittelt werden konnte. Auch war keine ausreichende Substanzmenge für NOE-Experimente vorhanden. Es war aber anzunehmen, daß die stabilere *E*-Form vorlag. So wurde beispielsweise von R. W. Schuhmacher *et al.*⁵⁵ beobachtet, daß das Pluramycinderivat Rubiflavinon C-1 (**29**) (*cis*-ständige Protonen in den Positionen C-17 und C-18) während des Isolierungsprozesses zu Rubiflavinon C-2 (**28**) (*trans*-ständige Protonen in den Positionen C-17 und C-18) isomerisiert. Das gleiche wurde auch von H. Nadig *et al.* festgestellt.⁵⁴

Allein auf das quartäre C-Atom bei $\delta = 135.9$ konnte keine HMBC-Kopplung beobachtet werden. Jedoch sollte aufgrund des gesamten Korrelationsmusters der NMR-Daten und dem Vergleich mit Literaturwerten bekannter Pluramycine⁵⁵, wie z.B. Rubiflavinon C-1 die in Abbildung 57 angegeben Position in Betracht kommen.

Bemerkenswert für die Charakterisierung der Seitenkette war auch das Fragmentierungsmuster im EI-Massenspektrum. So waren neben dem Molekülpeak bei m/z (%) = 388.1 (39) vor allem die Peaks bei m/z (%) = 334.1 (56) und m/z (%) = 281.1 (100) aufgefallen. Hierbei beträgt die erste Massendifferenz zum Molekülpeak 54, welche auf eine McLafferty-Umlagerung zurückzuführen ist. Dabei wurde das H-Atom in Position C-17 (unter Verschiebung der π -Elektronen der Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 auf C-3) auf das C-Atom in Position 3 übertragen. Dadurch kam es zum Bindungsbruch zwischen C-14 und C-16 und zur Abspaltung einer ungeladenen C_4H_6 -Einheit (siehe Abbildung 54). Die Massendifferenz von 53 zwischen den Peaks bei m/z = 334.1 und 281.1 ließ sich durch eine anschließende Retro-Diels-Alder-Reaktion (RDA-Reaktion) erklären. Hierbei kam es zu der in Abbildung 55 dargestellten Verschiebung der Bindungen im „McLafferty-Produkt“ unter Bildung einer Dien- und einer En-Komponente. Dabei ist die Dien-Komponente der Ladungsträger und erscheint mit einer Masse von m/z = 281.1. Der RDA-Reaktionstyp wird häufig bei Naturstoffen vorgefunden und ist dabei oft sehr hilfreich bei deren Identifizierung.

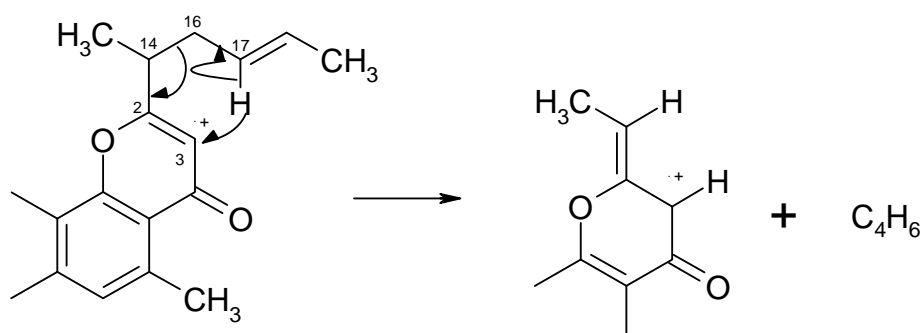


Abbildung 53: McLafferty-Umlagerung im Seitenkettenbereich von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (27).

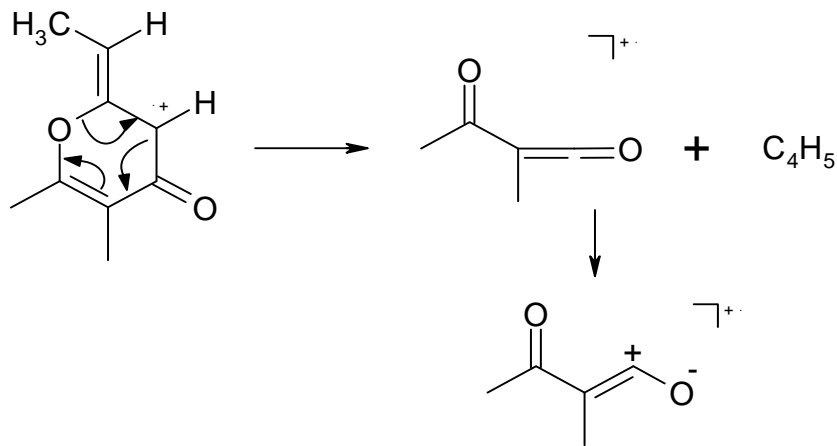


Abbildung 54: Retro-Diels-Alder-Reaktion des „McLafferty-Produkts“ von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**).

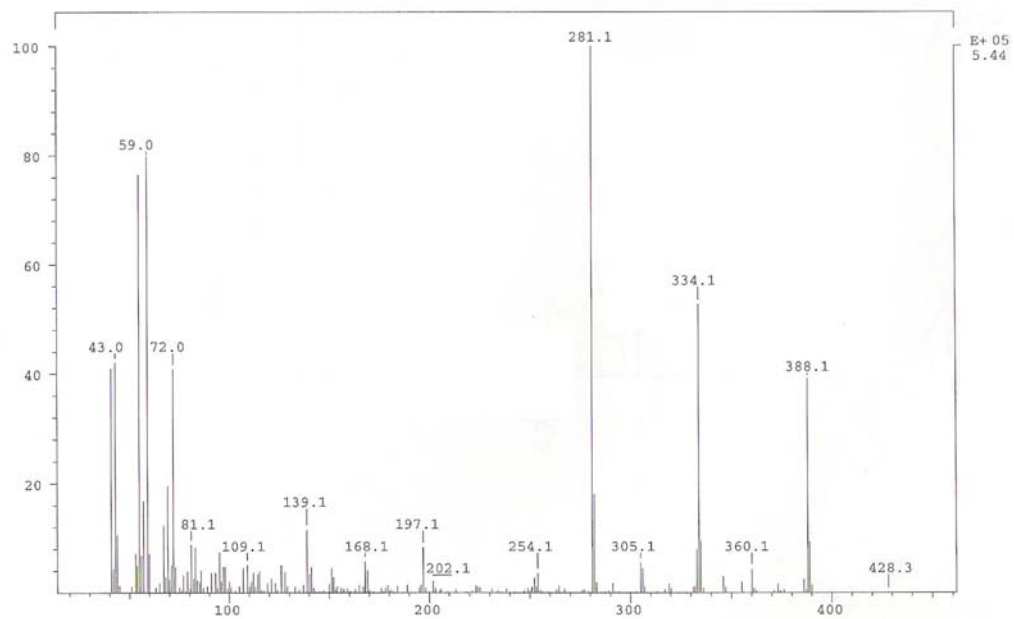


Abbildung 55: EI-Massenspektrum von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**).

Die Verbindung 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) wurde weder in den Datenbanken Chemical Abstracts, Beilstein noch in AntiBase[®] oder dem Dictionary of Natural Products (DNP) gefunden und gilt damit als neuer Naturstoff. 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) zeigte schwache Aktivitäten gegen die Bakterien *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und mittelstarke Aktivitäten

gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57). Keine Aktivitäten konnten gegen die getesteten Grünalgen festgestellt werden.

Tabelle 11: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten (δ -Werte) von β -Indomycinon⁵⁵ (**30**), 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) und Rubiflavinon C-1⁵⁵ (**29**).

C-Atom	β -Indomycinon (lit.)	14,15-Dihydro- rubiflavinon C- 2	Rubiflavinon C-1 (lit.)
2	171.8	172.4	164.4
3	109.6	111.3	109.7
4	179.2	179.3	179.6
4a	126.3	126.5	126.8
5	150.0	149.7	150.1
6	125.7	125.5	125.6
6a	136.0	135.9	136.8
7	181.8	182.0	182.2
7a	132.3	132.3	132.8
8	119.5	119.3	139.5
9	136.5	136.3	119.5
10	125.4	125.3	136.6
11	162.7	162.2	163.0
11a	116.8	116.8	117.3
12	187.4	187.3	188.0
12a	119.6	119.7	119.4
12b	156.1	156.7	156.6
13	24.2	24.3	24.2
14	73.7	39.0	123.5
15	26.1	17.7	12.4
16	38.2	31.5	131.0
17	123.1	126.7*	125.6
18	129.6	126.6*	135.4
19	13.0	12.9	14.2

*Werte sind austauschbar

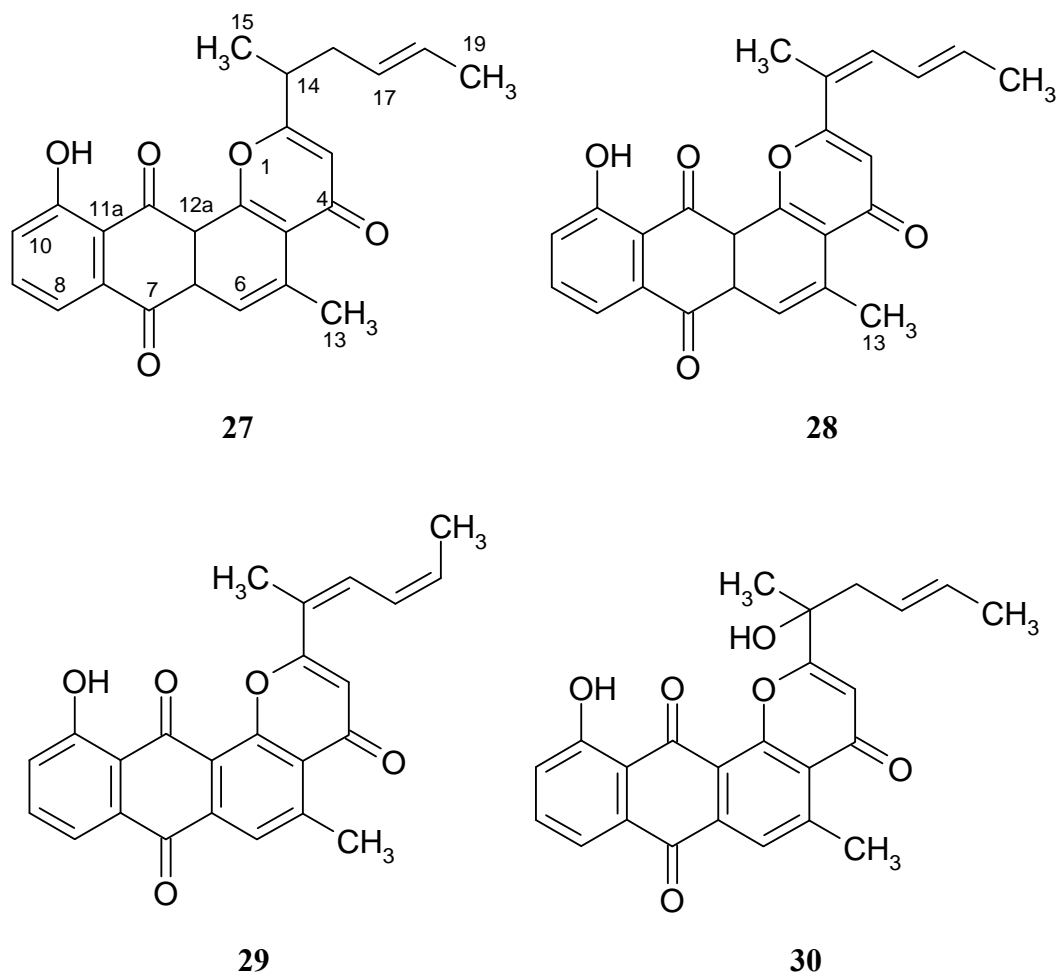


Abbildung 56: 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**), Rubiflavinon C-2 (**28**), Rubiflavinon C-1 (**29**) und β -Indomycinon (**30**).

Die Pluramycine sind eine Gruppe von Antibiotika mit antibakterieller und anti-tumoraler (DNA-Interkalation und/ oder Alkylierung) Wirkung und wurden bisher hauptsächlich von terrestrischen Streptomycceten isoliert⁵⁶. Wie das hier isolierte 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) oder die von Schuhmacher *et al.*⁵⁵ isolierten Indomycinone zeigen, kommen auch fakultativ marine Streptomycceten als Quelle in Frage. Strukturell gemeinsam ist diesen Verbindungen das Anthrachinon- γ -Pyrone-Grundgerüst, welches häufig in den Positionen C-8 und C-10 C-glykosidisch mit einem Aminozucker verknüpft ist (siehe Abbildungen 57 und 58). In diesem Fall spricht man von den „klassischen Pluramycinen“. Von ihnen unterscheiden sich die Altromycine, welche keinen Aminozucker in Position C-8 aufweisen, jedoch in Position C-5 über einen Methylester mit einem Zucker verknüpft sind. Die Pluramycinone

dagegen, zu denen auch 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) zählt liegen nicht als Glykoside vor⁵⁷.

Ein Gemisch aus Rubiflavinon C-1 und Rubiflavinon C-2 weist zum Beispiel nach R. W. Schuhmacher *et al.* eine cytotoxische Aktivität gegen die UV20 Mutante von CHO Zelllinien (Ovarialzellen des chinesischen Hamsters) auf⁵⁵. Dieser Zellientypus ist durch einen mangelhaften DNA-Reparaturmechanismus charakterisiert. Bei den Verbindungen β - und α -Indomycinon konnten nach Biabani *et al.* Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* mit MIC-Werten von 100 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 113 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden⁵⁸. Außerdem hemmten sie das Wachstum von *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* und *Streptomyces* sp. Tü 824⁵⁸. Zudem wurden auch in einem DPPH-Test (= 2,2'-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, kolorimetrischer Test zum Nachweis von Antioxidantien) antioxidative Eigenschaften nachgewiesen⁵⁹. Die Isolierung von Pluramycin A (**31**) aus *Streptomyces pluricologrescens* wurde 1956 zum ersten Mal von K. Maeda *et al.* dokumentiert⁶⁰. Die Struktur von Pluramycin A (**31**) wurde erstmals 1977 von Shinichi Kondo *et al.* aufgeklärt⁶¹.

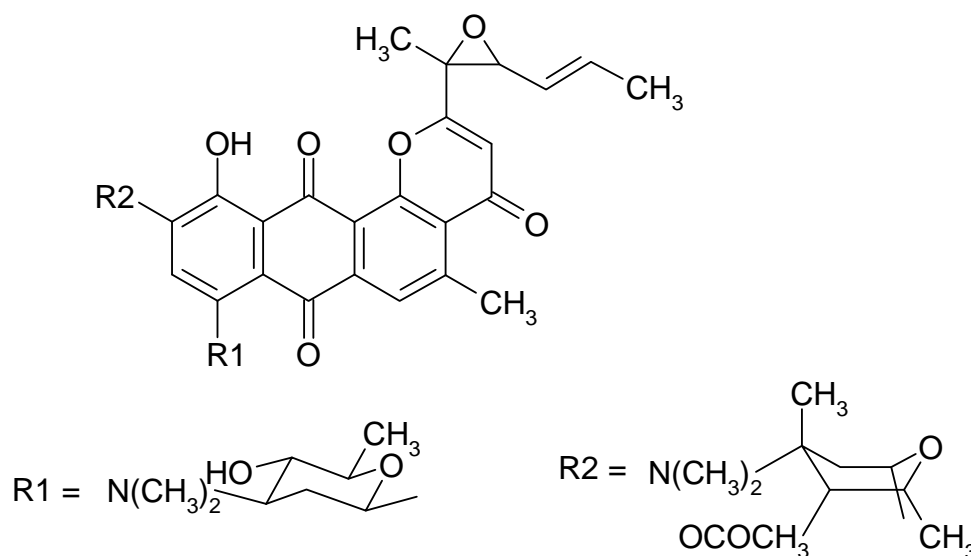


Abbildung 57: Struktur von Pluramycin A (**31**).

Collismycin A

Die Fraktion 4 lieferte nach Trennung an Sephadex eine farblose, in Methanol unlösliche Substanz, die nadelförmig auskristallisierte. Bei DC konnte die Verbin-

ung durch Ansprühen mit Anisaldehyd/Schwefelsäure als violette, schleifende Zone sichtbar gemacht werden. Das ESI-Massenspektrum deutete auf eine Molmasse von 275 Dalton hin, was durch das EI-Massenspektrum bestätigt wurde. Da die Masse ungerade war, mußte auch eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen vorliegen. Im ^1H -NMR-Spektrum waren drei Singulets bei $\delta = 9.71$ (breites Signal), 9.09 und 8.03 mit jeweils einer Intensität von 1H zu erkennen. Ferner waren vier Signale mit jeweils einer Intensität von 1H bei $\delta = 8.65$ (Dublett von Dublett), 8.52 (Dublett), 7.84 (Dublett von Dublett von Dublett) und 7.32 (Dublett von Dublett von Dublett) zu sehen. Diesem Aufspaltungsmuster zufolge sowie nach dem Vergleich der Kopplungskonstanten der Signale, schien ein aromatisches ABCD-Spin-System vorzuliegen. Das Singulett der Intensität von 3H bei $\delta = 4.11$ war typisch für eine aromatisch gebundene Methoxygruppe. Bei $\delta = 2.36$ lag ebenfalls ein Singulett der Intensität von 3H vor (siehe Abbildung 59).

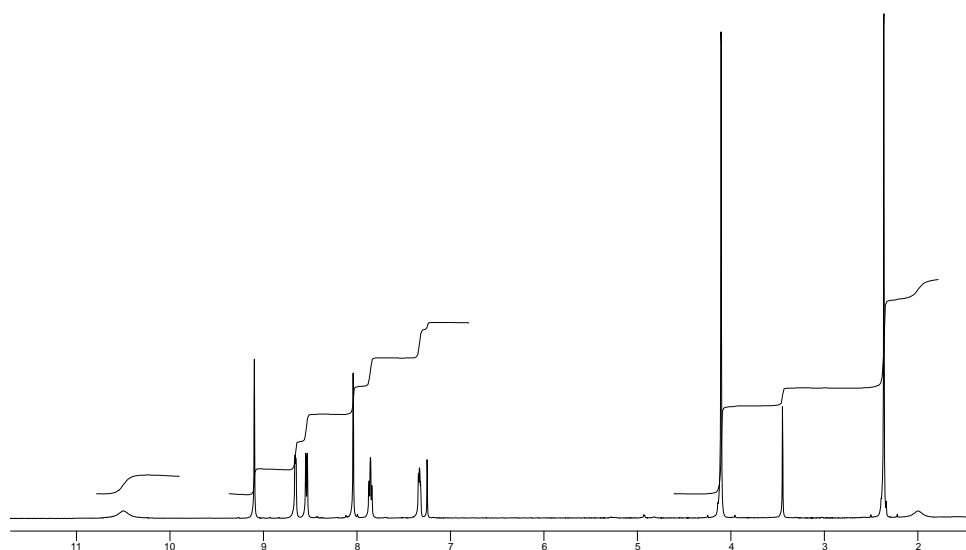


Abbildung 58: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Collismycin A (**32**) in CDCl_3 .

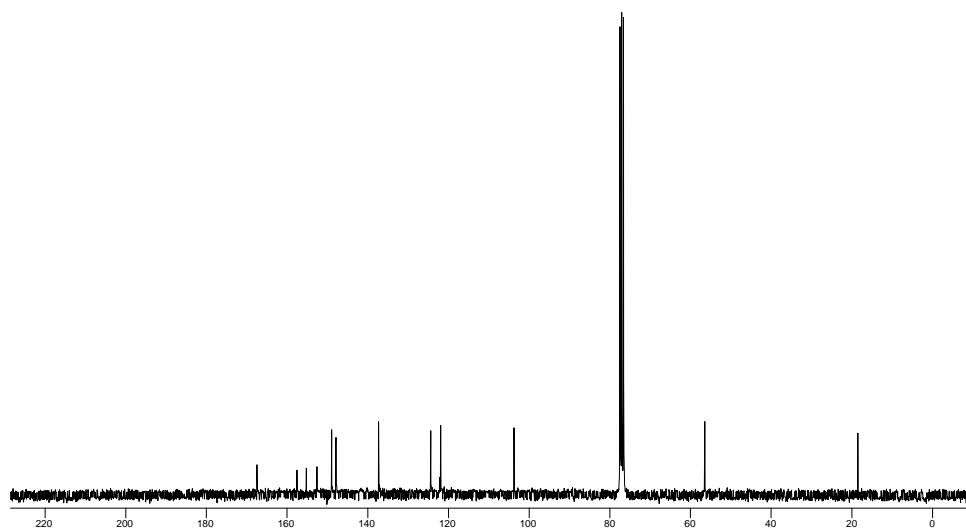


Abbildung 59: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Collismycin A (**32**) in CDCl_3 .

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 60) wies im Bereich von 167.3 – 103.7 11 Signale auf. Das Signal bei $\delta = 56.4$ deutete auf eine Methoxygruppe hin, wie sie nach Beurteilung des ^1H -NMR-Spektrums angenommen wurde. Das Signal bei $\delta = 18.5$ ließ sich sehr wahrscheinlich dem verbleibenden Protonensignal bei $\delta = 2.36$ und damit einer Methylgruppe zuordnen. Die Datenbanksuche in Antibase[®] führte zu neun Einträgen, von denen die Verbindungen Collismycin A (**32**) und Collismycin B (**33**) in Frage kamen. Der Vergleich der ^{13}C -NMR- und ^1H -NMR-Daten der isolierten Verbindung **32** mit den entsprechenden NMR-Literaturwerten für Collismycin A (**32**) und Collismycin B (**33**) zeigte im ^{13}C -NMR-Spektrum einen deutlichen Unterschied von 7-8 ppm zu der chemischen Verschiebung für das C-Atom in Position C-7 von Collismycin B (**33**). Die Daten verglichen mit denen des Stereoisomers Collismycin A (**32**) hingegen stimmten zufriedenstellend überein (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte von Collismycin A_{exp.} mit den Literaturwerten von Collismycin A (**32**) und Collismycin B (**33**)⁶².

C-Atom	Collismycin A (lit.)	Collismycin A (exp.)	Collismycin B (lit.)
2	157.4	157.4	154.8
3	103.7	103.7	104.9
4	167.4	167.3	168.2
5	122.1	122.1	121.0
6	152.6	152.5	152.2
7	147.6	147.8	140.2
8	56.4	56.4	56.7
9	18.5	18.5	18.4
2'	155.2	155.1	153.1
3'	121.9	121.8	121.0
4'	137.2	137.2	137.5
5'	124.3	124.3	124.9
6'	148.9	148.9	149.5

Damit wurde die Verbindung **32** als Collismycin A identifiziert. Collismycin A und B wurden erstmals 1994 von K. Shindo *et al.* aus *Streptomyces* sp. MQ22 isoliert⁶². Beide Verbindungen hemmten dosisabhängig in einem Rezeptortest die Bindung des Glucocortikoids Dexamethason mit einem IC₅₀-Wert von 1.5×10^{-5} (Collismycin A), bzw. 1.0×10^{-5} (Collismycin B)⁶² und sind damit eventuell als nichtsteroidale Entzündungshemmer von Interesse. Darüber hinaus konnten K. Shindo *et al.* mikrobiologische Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus niger* feststellen. Außerdem wurden auch cytotoxische Wirkungen gegen L1210-Zellen (Zellen einer lymphatischen Leukämie der Maus) mit IC₅₀ = 0.08 µg/ml genannt⁶². Stadler *et al.* stellten dabei eine Hemmung von **32** und **33** auf die Topoisomerase I in Pilzen fest⁶³. Die isolierte Verbindung **32** zeigte schwache Aktivitäten gegen *Escheri-*

chia coli, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus subspicatus* sowie mittlere Aktivität gegen *Mucor miehei* (Tü 284) und starke Aktivität gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57).

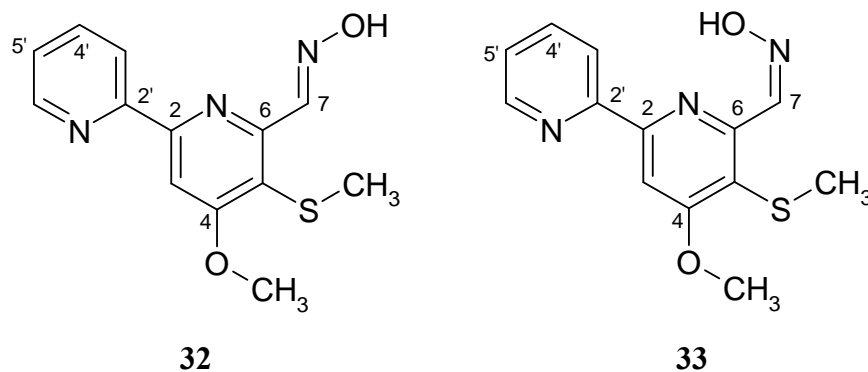
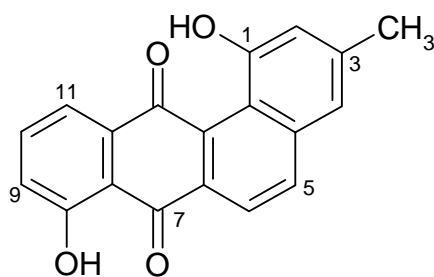


Abbildung 60: Das Stereoisomerenpaar Collismycin A (**32**) und Collismycin B (**33**).

Stamm B 6278

Angucyclin- und Anthrachinonantibiotika

Die Angucyclin-Antibiotika besitzen ein angulares, tetracyclisches, vom Benzanthracen abgeleitetes Gerüst (Benz[a]anthracinon) als chromophores System. In Anlehnung an die Nomenklatur der Anthracycline unterscheidet man die Angucycline von den Angucyclinonen. Erstere besitzen im Gegensatz zu den Angucyclinonen einen O-glycosidisch gebundenen Zuckerrest⁶⁴. Der älteste und zugleich am einfachsten aufgebaute Vertreter dieser Gruppe ist das Angucyclinon Tetrangomycin (**34**)⁶⁵.



34

Ferner werden die Angucycline und Angucyclinone auch durch das Vorkommen von einem oder zwei angular gebundener Sauerstoffatome in verschiedene Typen unterteilt (siehe Abbildungen 62 und 63)⁶⁶.

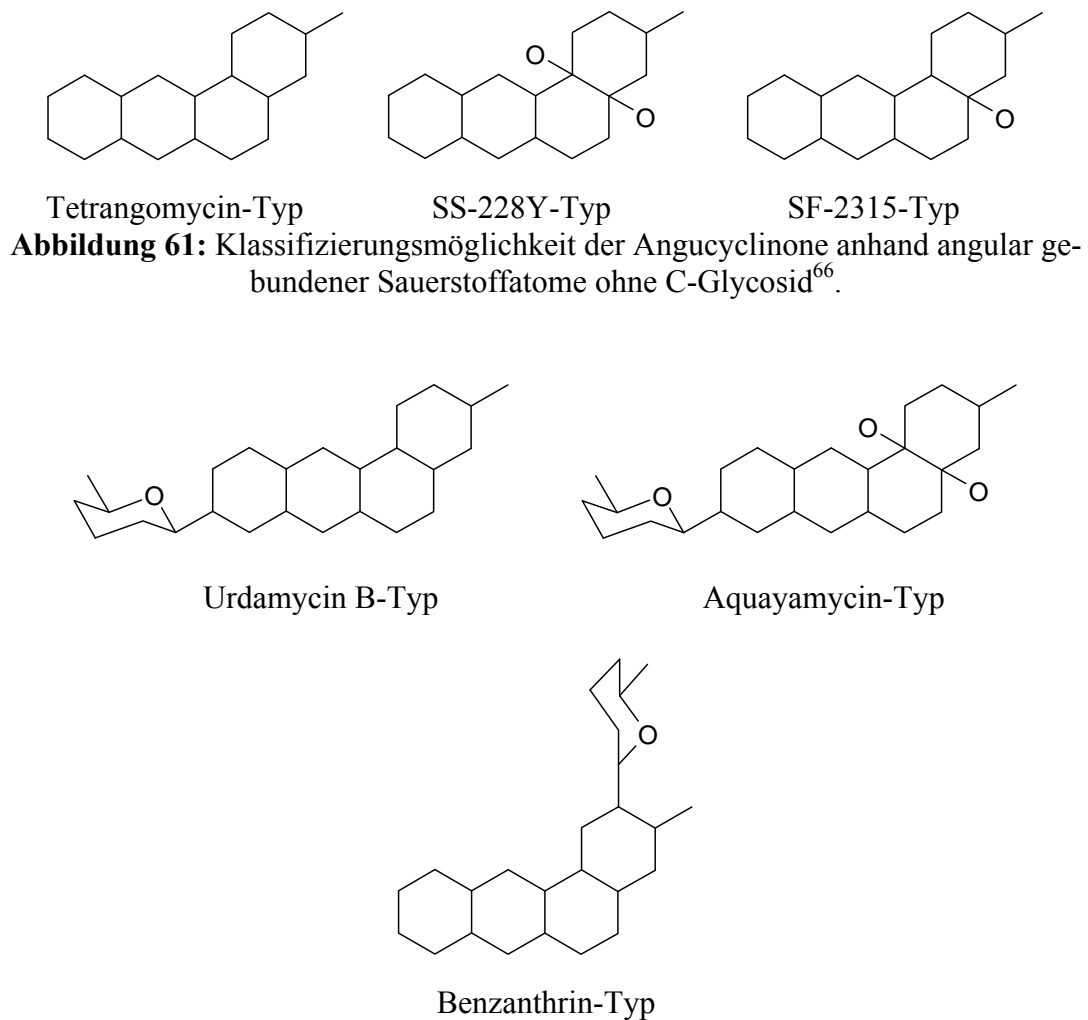


Abbildung 62: Klassifizierungsmöglichkeit der Angucycline anhand angular gebundener Sauerstoffatome und Position des C-Glycosids⁶⁶.

Zum allgemeinen Wirkungsspektrum der Angucyclinantibiotika gehören antibakterielle, cytostatische, antivirale und enzyminhibitorische (Hemmung von Hydroxylasen und/ oder Mono-Oxygenasen) Aktivitäten. Auch als Thrombozytenaggregationshemmer sind einige Angucycline (z.B. Kerriamycin B und C) in Erscheinung getreten⁶⁶.

Die Angucyclinantibiotika gehören der Gruppe der Polyketid-Antibiotika an. Nach N. Imamura *et al.*⁶⁷ resultieren durch Bindungsbruch zwischen den Kohlen-

stoffatomen in den Positionen C-1 und C-12b die Äquivalente mit Anthrachinongrundgerüst und entsprechender Seitenkette in Position C-2 (siehe Abbildungen 64 und 74).

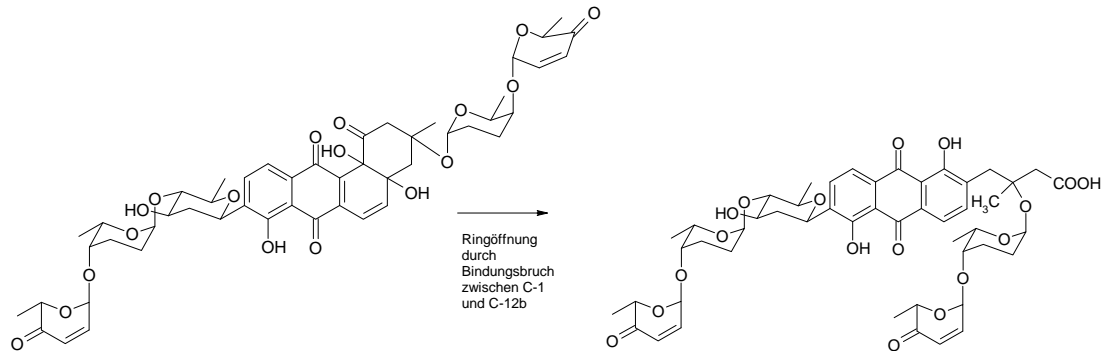


Abbildung 63: Bildung von Vineomycin B₂ aus Vineomycin A₁ (42) nach Imamura *et al.*⁶⁷.

Aufarbeitung von Stamm B 6278

Der Ethylacetatextrakt des marinen Streptomycceten-Stammes B 6278 zeigte im biologischen Screening mittlere bis schwache Aktivitäten gegen sämtliche Testorganismen, mit Ausnahme von *Staphylococcus aureus* und *Chlorella sorokiniana* (siehe Tabelle 26). Im chemischen Screening waren bei Tageslicht mehrere gelbe und orange Zonen auf dem Dünnschichtchromatogramm erkennbar, die sich mit NaOH rotviolett verfärbten. Der Stamm wurde zunächst im 20 l-Maßstab kultiviert. Nach Extraktion von Kulturbrühe und Mycel mit Ethylacetat erhielt man den Rohextrakt (I), der durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel in sechs Fraktionen getrennt wurde. Nach Bewertung des Dünnschichtchromatogramms und der Aktivitäten im Plattendiffusionstest (siehe Tabelle 27) wurde die Fraktion 3 vorzugsweise weiterbearbeitet. Durch PDC an Kieselgel erhielt man drei weitere Unterfraktionen 3a-3c, die jeweils durch präparative RP-HPLC weiter getrennt wurden. Es konnten fünf gelbe bzw. orange Reinsubstanzen isoliert werden, die jeweils mit Natronlauge eine rote Farbreaktion ergaben.

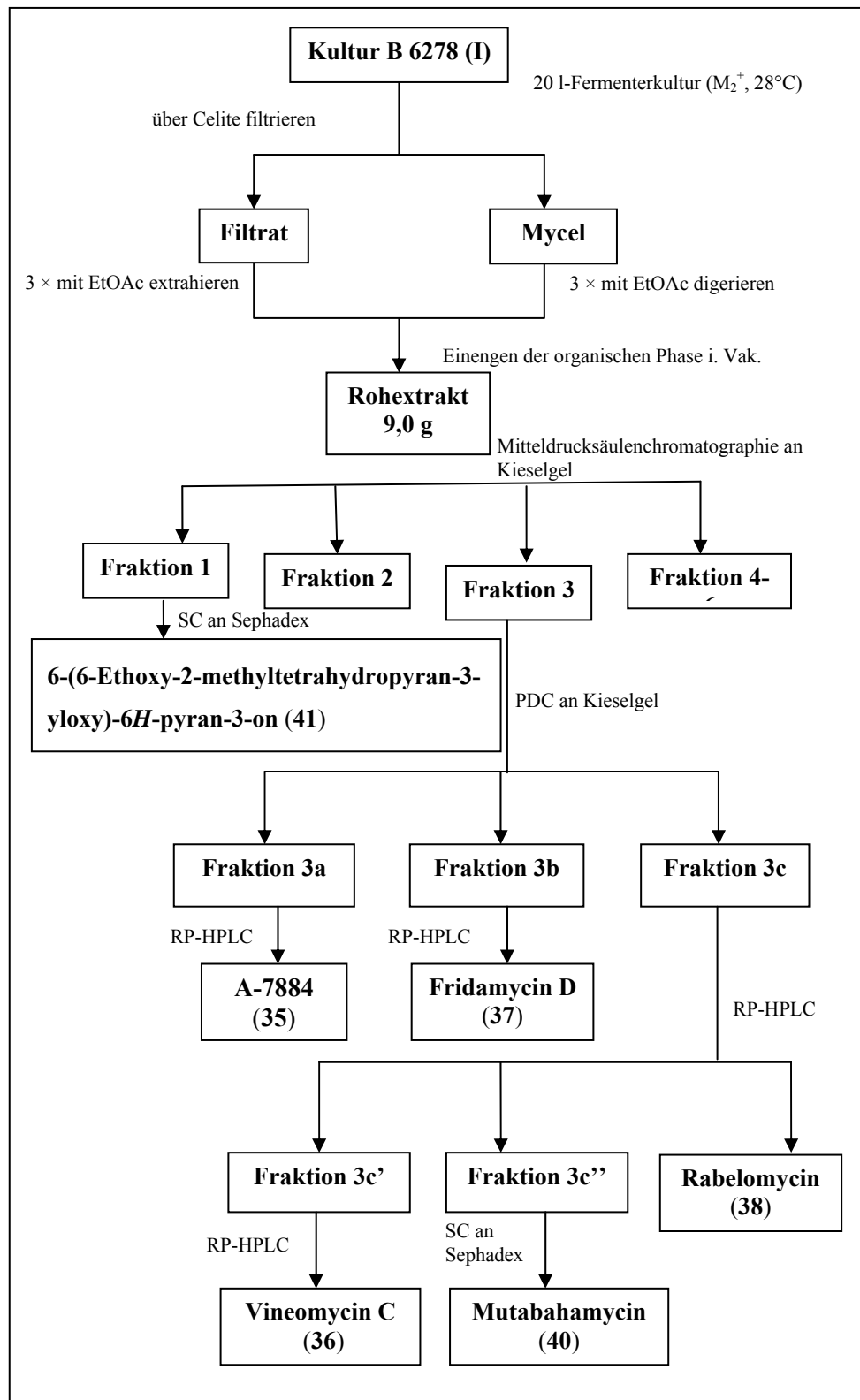


Abbildung 64: Aufarbeitungsschema für die 20 l-Fermenterkultur von *Streptomyces* sp. B 6278; (SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie; RP = reversed phase.)

A-7784

Die Fraktion 3a lieferte eine orange Verbindung, welcher durch ESI-Massenspektrometrie eine Molmasse von 710 Dalton zugeordnet werden konnte. Dem EI-Massenspektrum konnte jedoch kein Molekülionenpeak entnommen werden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte bei $\delta = 12.27$ ein scharfes Singulett der Intensität 1H, was auf eine chelierte Hydroxygruppe hinwies und der roten Farbreaktion mit Natronlauge zufolge wahrscheinlich ein *peri*-Hydroxychinon als Strukturelement für die Verbindung **35** annehmen ließ.

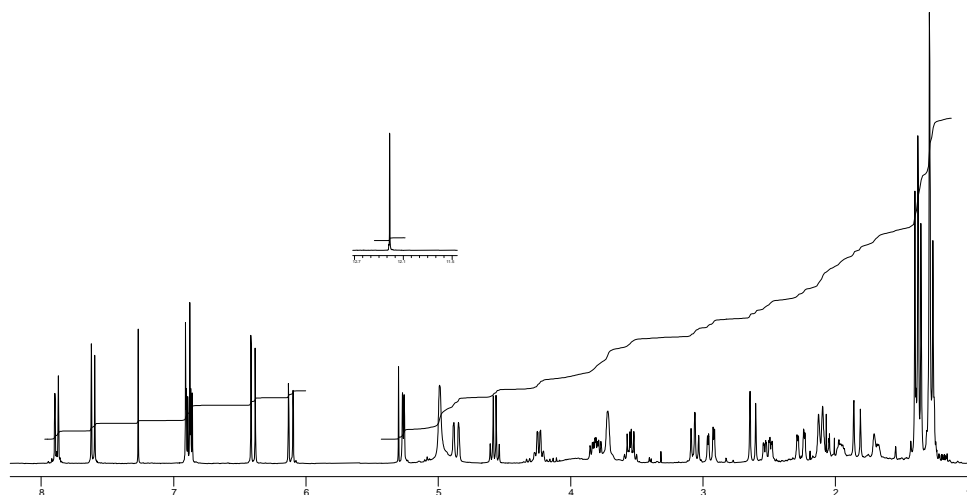


Abbildung 65: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz) von A-7884 (**35**) in CDCl_3 .

Im Bereich aromatisch/olefinischer Protonen wurden sechs Signale mit jeweils einer Intensität von 1H beobachtet. Dabei wiesen die beiden Dubletts bei tiefem Feld bei $\delta = 7.88$ und 7.61 - mit übereinstimmenden Kopplungskonstanten von 7.9 Hz - auf *ortho*-ständige Protonen hin. Die sich überschneidenden Signale bei $\delta = 6.99$ und 6.88 konnten als Dublett und als Dublett von Dublett identifiziert werden. Zwei weitere Dubletts lagen bei $\delta = 6.40$ und 6.11 . Aufgrund der chemischen Verschiebung und den Kopplungskonstanten von 9.8 Hz bzw. 10.2 Hz, mußte es sich um zwei Paare olefinischer, *cis*-ständiger Protonen handeln. (Hierbei war das Proton bei $\delta = 6.99$ zu dem Proton bei $\delta = 6.40$ und des Protons bei $\delta = 6.88$ zu dem Proton bei $\delta = 6.11$ benachbart.) Das Proton bei $\delta = 6.88$ stand ferner bei identischer Kopplungskonstanten von 3.4 Hz vicinal zu dem Proton bei $\delta = 5.27$. Im Bereich zwischen $\delta = 4.99$ und 3.06 lagen zwei Singulets, ein Dublett, zwei Quartetts, Zwei Multipletts und ein Triplet mit den Intensitäten von jeweils 1H. Da der Bereich von $\delta = 3.6$ bis 5.5 unter

anderem Protonen von Methingruppen mit geminaler Sauerstoffbindung zuzuordnen war, konnten die beobachteten Signale zwischen $\delta = 4.99$ und 3.06 möglicherweise auf Zuckermoleküle hinweisen. Hierfür sprach auch das Proton bei $\delta = 5.27$, dessen chemische Verschiebung typisch für acetalische bzw. anomere Protonen ist. Dies würde auch einen fehlenden Molekülpeak im EI-Massenspektrum erklären. Von Glycosidantibiotika können in der Regel keine EI-Massenspektren erhalten werden, da diese während der Ionisation gewöhnlich so stark fragmentieren, daß ein Molekülpeak nicht detektiert werden kann.

Zwei Dubletts von Dubletts mit den Intensitäten von jeweils 1H erschienen bei $\delta = 2.94$ und 2.26 . Bei $\delta = 2.62$ und 1.84 waren zwei Dubletts und bei $\delta = 2.51$ ein Dublett von Dublett von Dublett mit den Intensitäten von ebenfalls je 1H zu sehen. Zwei Multipletts mit der Intensität von jeweils 2H lagen bei $\delta = 2.11$ und 1.96 . Zuletzt verblieben vier Signale für Protonen von Methylgruppen, davon drei Dubletts bei $\delta = 1.39$, 1.37 und 1.27 sowie ein Singulett bei $\delta = 1.29$. Mit den erhaltenen Strukturinformationen wurde in AntiBase[®] eine Substrukturechereche durchgeführt (siehe Abbildung 67). Dabei kam die Verbindung A-7884 (**35**) als einzige Möglichkeit in Frage.

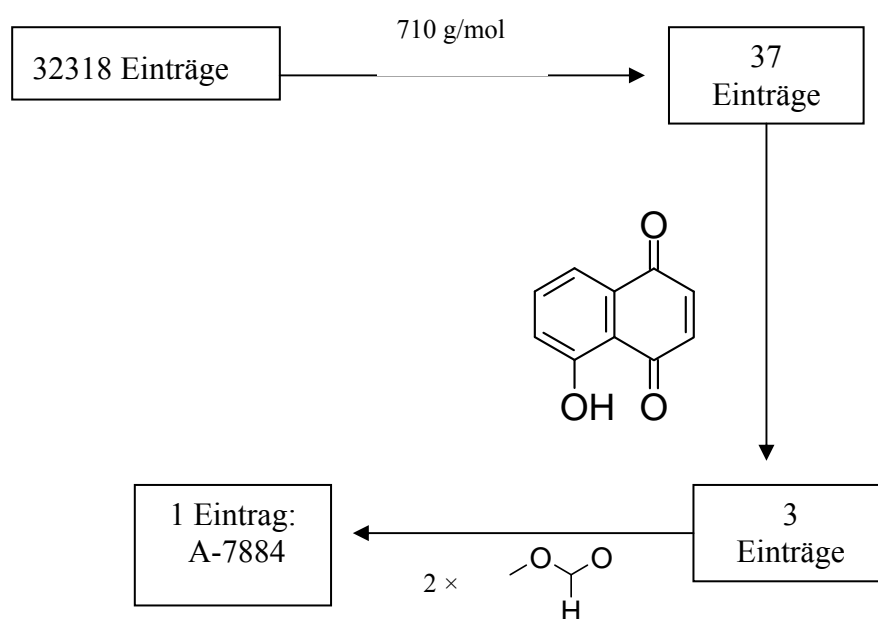


Abbildung 66: Suchverlauf in AntiBase[®] mit den spektroskopischen Daten von (**35**).

Die Struktur **35** wurde durch die ^{13}C -Daten bestätigt. Das Spektrum zeigte Signale für eine Ketocarbonylfunktionen bei $\delta = 204.9$ und 196.6 , wobei das hochfeldverschobene einer α,β -ungesättigte Ketogruppe entsprechen könnte. Die Signale bei $\delta = 187.9$ und 182.0 waren charakteristisch für die Carbonylkohlenstoffatome eines chinoides Systems. Da nach ^1H -NMR-Spektrum und Natronlaugetest ein *peri*-Hydroxychinon zu erwarten war, konnte davon ausgegangen werden, daß die entsprechende Hydroxygruppe zu der Ketogruppe bei $\delta = 187.9$ cheliert sein mußte, da diese gegenüber der zweiten Carbonylkomponente des Chinons deutlich tieffeldverschoben war. Dem Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome waren zwölf Signale zu entnehmen, wobei sich die Signale bei $\delta = 138.7$ überlagerten. Da jedoch unter Berücksichtigung der Strukturinformationen aus dem ^1H -NMR-Spektrum allein vier olefinische Kohlenstoffatome vorlagen, konnte ein Anthrachinon ausgeschlossen werden, und ein Benz[a]anthrachinon als Aglykon, wie es der durch Datenbankrecherche gefundenen Verbindung A-7884 (**35**) entsprach, war damit wahrscheinlicher. Die Signale bei $\delta = 99.5$ und 95.3 deuteten auf acetalische bzw. anomere C-Atome hin und stützten damit die Vermutung, daß Zucker vorhanden waren. Im ^{13}C /APT-NMR-Spektrum waren zwischen $\delta = 88.9$ bis 67.8 mehrere sich zum Teil überschneidende Signale für Methingruppen mit Sauerstoffbindung zu beobachten. Durch HSQC-Messung konnte die Zahl der C-Atome in diesem Bereich auf zehn festgelegt werden und entsprach damit den zehn Signalen des Protonenspektrums im Bereich von $\delta = 4.99$ bis 3.06 . Schließlich verblieben fünf Signale bei $\delta = 52.1, 43.2, 38.7, 25.1$ und 24.3 für Methylengruppen und vier Signale bei $\delta = 30.2, 18.4, 17.0$ und 15.1 für Methylgruppen.

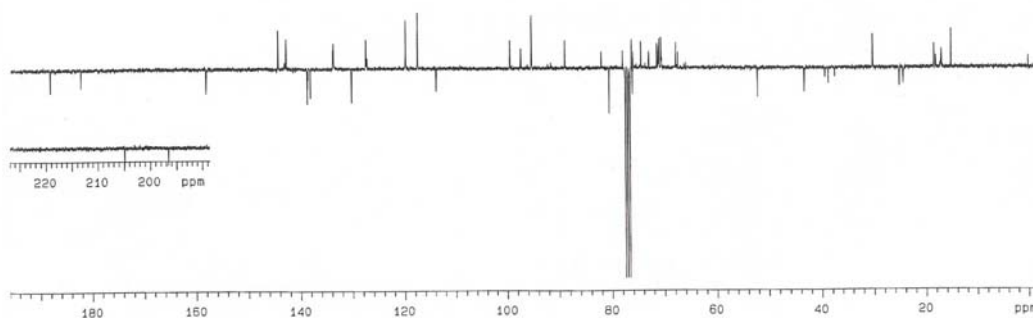


Abbildung 67: ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (75 MHz) von A-7884 (**35**) in CDCl_3 .

Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte mit den entsprechenden Literaturwerten⁶⁸ zeigte im Wesentlichen Übereinstimmung. Allein die Daten im Bereich um $\delta = 70$ konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Daher wurden zur Absicherung der Struktur H,H-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren aufgenommen und ausgewertet. Die gefundenen Korrelationen bestätigten, daß es sich um die Verbindung A-7884 (35) handeln mußte. In Abbildung 69 sind neben ausgewählten H,H-COSY-Korrelationen die wichtigsten HMBC-Kopplungen dargestellt.

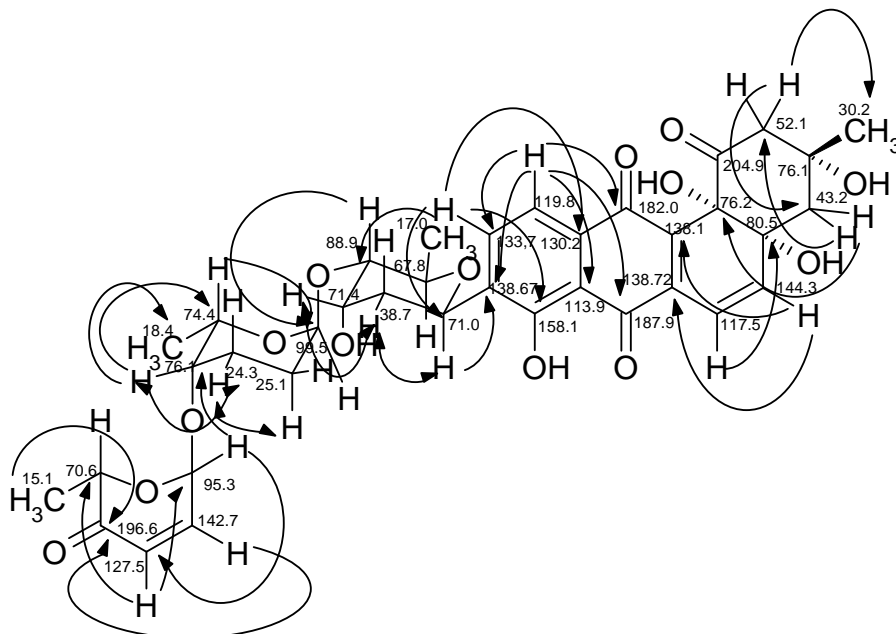


Abbildung 68: Ausgewählte HMBC- (\rightarrow) und H,H-COSY-Korrelationen (\leftrightarrow) von A-7884 (35).

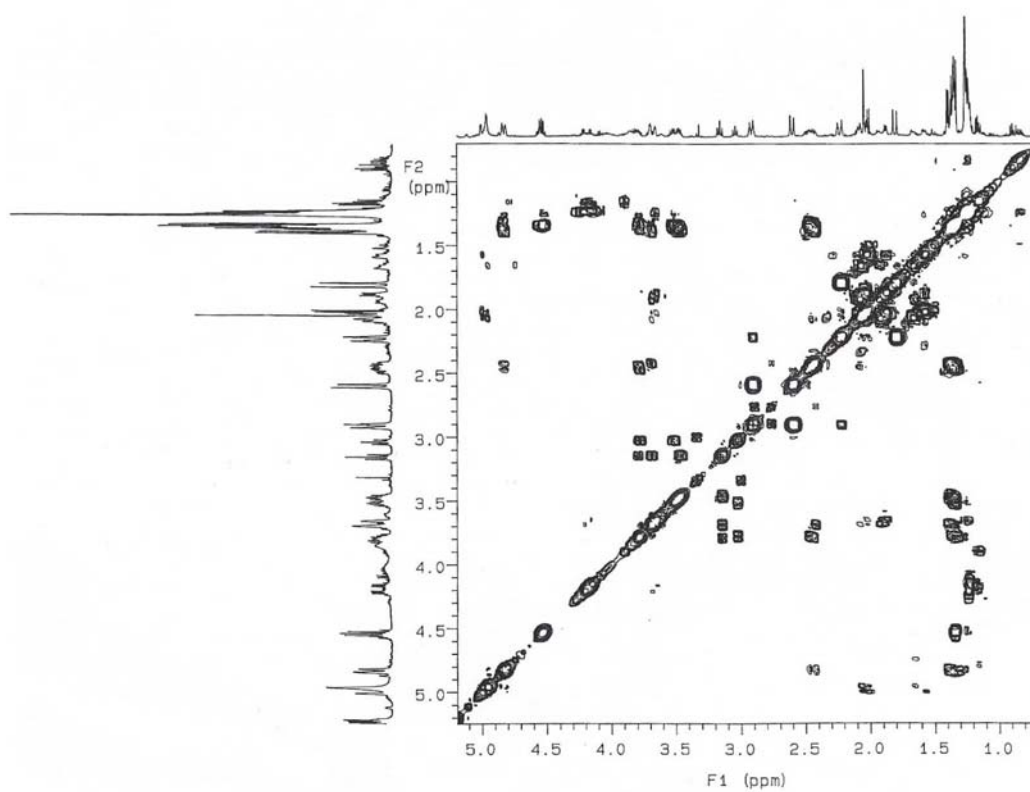


Abbildung 69: H,H-COSY-Spektrum (500 MHz) von A-7884 (**35**) in CDCl₃.

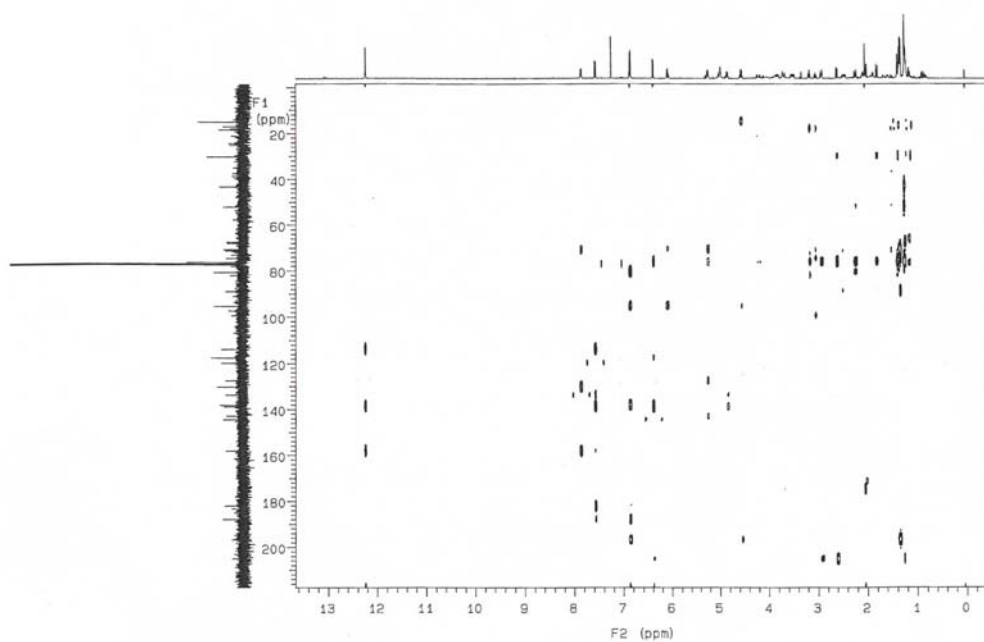
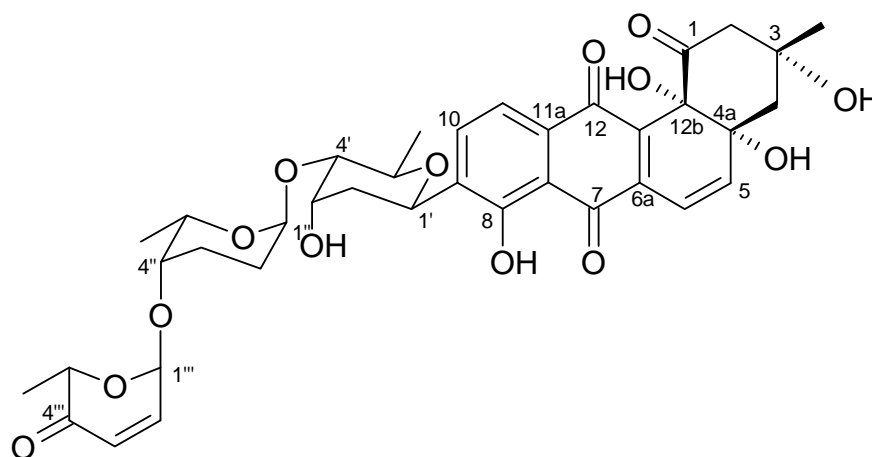


Abbildung 70: HMBC-Spektrum (500 MHz) von A-7884 (**35**) in CDCl₃.

35 zeigte schwache Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus* sowie mittelstarke Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* (siehe Tabelle 14). A-7884 (**35**) war im Cytotoxizitätstest gegen Krebs-Zelllinien mit $IC_{50} = 1.8 \mu\text{g/ml}$ aktiv. Außerdem wurde **35** auf antivirale und cytotoxische Eigenschaften gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* überprüft, wobei keine Aktivitäten festgestellt werden konnten.

A-7784 (**35**) gehört zu der Familie der Angucyclinantibiotika (Angucyclin vom Aquayamycin-Typ) und wurde von Kazunori isoliert und 1990 patentiert⁶⁹. A-7884 fördert die Aufnahme von LDL aus der Blutbahn⁶⁹. Außerdem hemmt es die Cytokin-induzierte Stickstoffmonoxidsynthese (i-NOS). Dieses Enzym katalysiert die Sauerstoff- und NADPH-abhängige Oxidation von L-Arginin zu Citrullin unter Freisetzung von Stickstoffmonoxid. Dadurch wird dessen Verteilung und Konzentration in Eukaryonten geregelt. Stickstoffmonoxid spielt in geringer Konzentration als Signalstoff eine Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen (z.B. Vasodilatation, Schmerzmediator). In höherer Konzentration wirkt es als Abwehrgift gegen Tumorzellen und Pathogene. Bei stark erhöhter Bildung von i-NOS können neurotoxische Wirkungen, fokale Ischämie und Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington verursacht werden⁶⁸. Daher ist die Regulierung der Konzentration von Stickstoffmonoxid bzw. der i-NOS neben dem Verstehen von physiologischen Prozessen vor allem auch von großem therapeutischem Interesse.



Vineomycin C

Die Fraktion 3c' ergab nach semipräparativer RP-HPLC eine gelbe Reinsubstanz. Die Quasimolekülsignale des ESI-Massenspektrums wiesen auf eine Molmasse von 710 Dalton hin. Ein interpretierbares EI-Massenspektrum konnte nicht erhalten werden. Die Verbindung **36** wies damit die gleiche Molmasse wie die Verbindung A-7884 (**35**) auf. Außerdem glichen sich auch die R_f -Werte beider Verbindungen, so daß es sich möglicherweise auch bei **36** um die Verbindung A-7884 (**35**) handeln könnte. Zweifel hierüber folgten aus den unterschiedlichen Farben der Verbindungen. Während A-7884 orange gefärbt war, war die Verbindung **36** deutlich gelb. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung **36** (siehe Abbildung 72) zeigte Ähnlichkeiten mit dem der Verbindung A-7884 (**35**), war aber im off-set-Bereich von diesem eindeutig verschieden (siehe Abbildungen 66 und 72).

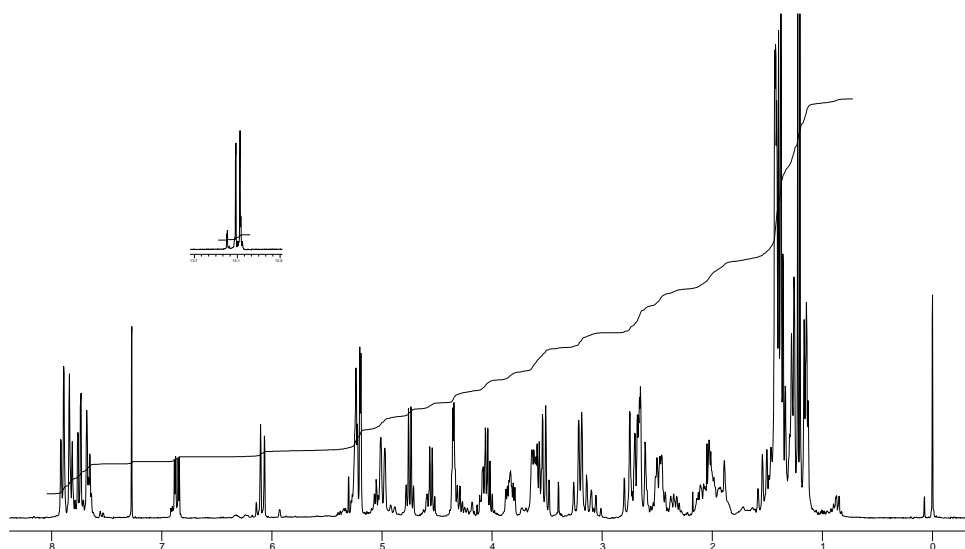


Abbildung 71: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500 MHz) von Vineomycin C (**36**) in CDCl_3 .

So waren z.B. bei der Verbindung **36** im Gegensatz zu **35** statt einem Signal zwei Signale für chelierte Hydroxygruppen bei $\delta = 12.91$ und 12.86 vorhanden. Die Rotfärbung der Verbindung mit Natronlauge deutete gleichermaßen auf ein *peri*-Hydroxychinon hin. Im Bereich von $\delta = 7.82 - 7.47$ waren vier Dubletts zu erkennen, bei denen es sich nach Vergleich der Kopplungskonstanten (und dem Auftreten von leichten Dacheffekten zwischen den Signalaaren), um zwei Paare von *ortho*-ständigen Protonen handeln mußte. Dagegen wies das Angucyclin A-7884 (**35**) in diesem Bereich nur ein Signalaar *ortho*-ständiger Protonen auf, so daß es sich bei

der Verbindung **36** möglicherweise um das offenkettige Anthrachinon-Analogon handeln konnte. Im ^1H -NMR-Spektrum von **36** konnten ferner zwei Signale bei $\delta = 6.87$ (Dublett von Dublett) und 6.10 (Dublett) festgestellt werden, die aufgrund der chemischen Verschiebung sowie der übereinstimmenden Kopplungskonstanten von 10 Hz den Protonen einer *cis*-ständigen olefinischen Doppelbindung zugeordnet werden, wie sie auch für A-7884 (**35**) identifiziert worden sind. Der Bereich von $\delta = 5.24 - 3.54$ gab acht Signale der Intensität von 1H an und deutete auf Protonen mit geminaler Sauerstofffunktion hin, wobei die tieffeldverschobenen Signale bei $\delta = 5.24$ und 4.99 wahrscheinlich auf acetalische, bzw. unter Annahme von Zuckermolekülen, auf anomere Protonen zurückzuführen waren. Schließlich traten bei $\delta = 3.11 - 1.21$ zwölf Signale auf, die aufgrund der Gesamtintensitäten 23 verbleibende Protonen vermuten ließen. Die Signale bei $\delta = 1.36 - 1.21$ wiesen charakteristischerweise auf vier Methylgruppen hin, was auch durch das ^{13}C /APT-NMR-Spektrum bestätigt wurde. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte ferner vier auffällige Signale zwischen $\delta = 196.6$ und $\delta = 174.1$. Unter Bezugnahme auf die Verbindung A-7884 (**35**) konnte hierbei das erste Signal einer α,β -ungesättigten Ketocarbonylfunktion entsprechen. Für das Signal bei $\delta = 174.7$ wurde eine Carbonsäure- bzw. Carbonsäureesterfunktion angenommen. Die Signale bei $\delta = 187.5$ und 187.3 ließen gleichermaßen wie bei **35** ein chinoides System vermuten. Da zwischen der chemischen Verschiebung beider Kohlenstoffatome keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren, schienen die Hydroxygruppen des offset-Bereichs jeweils zu einer Carbonylgruppe cheliiert vorzuliegen. Der aromatisch-olefinische Bereich wies 14 Signale auf, was für die nach Auswertung des Protonenspektrums bereits vermutete Anthrachinonstruktur der Verbindung **36** sprach. Damit konnte ein Benz[a]anthrachinongerüst wie bei A-7884 (**35**) ausgeschlossen werden. Außerdem konnten für die Verbindung **36** zwei acetalische C-Atome bei $\delta = 99.4$ und 95.2 identifiziert werden. Unter Berücksichtigung der Protonenanzahl von 26H , lag damit wohl neben zwei O-glycosidisch verknüpften Zuckern auch ein C-glycosidisch verknüpfter Zucker vor. Die acht Signale bei $\delta = 88.5 - 67.9$ waren C-Atomen mit Sauerstoffverknüpfung zuzuordnen, und dem Bereich von $\delta = 45.2 - 15.1$ konnten nach Vergleich mit dem ^{13}C /APT-NMR-Spektrum zwei Methylen- und wie bereits erwähnt vier Methylgruppen entnommen werden.

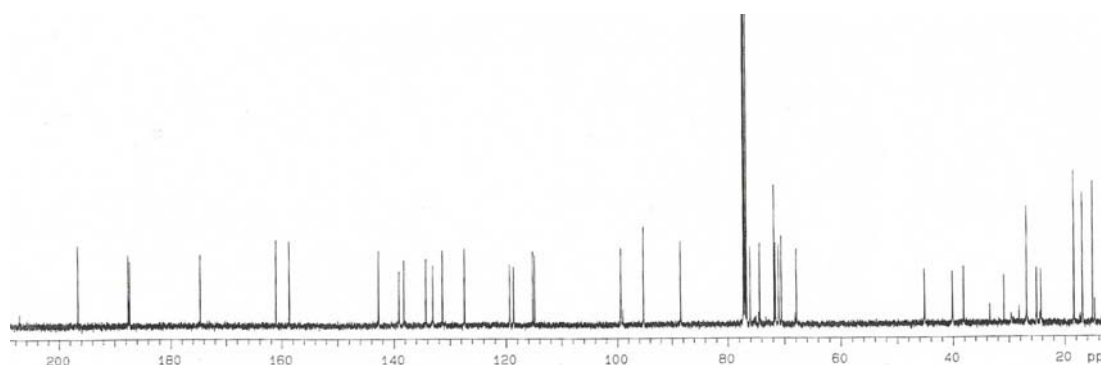


Abbildung 72: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Vineomycin C (**36**) in CDCl_3 .

Eine Substruktursuche in AntiBase[®] lieferte die Verbindung Vineomycin C (**36**). Ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit den Literaturwerten für Vineomycin C bestätigte die Übereinstimmung beider Verbindungen⁶⁸.

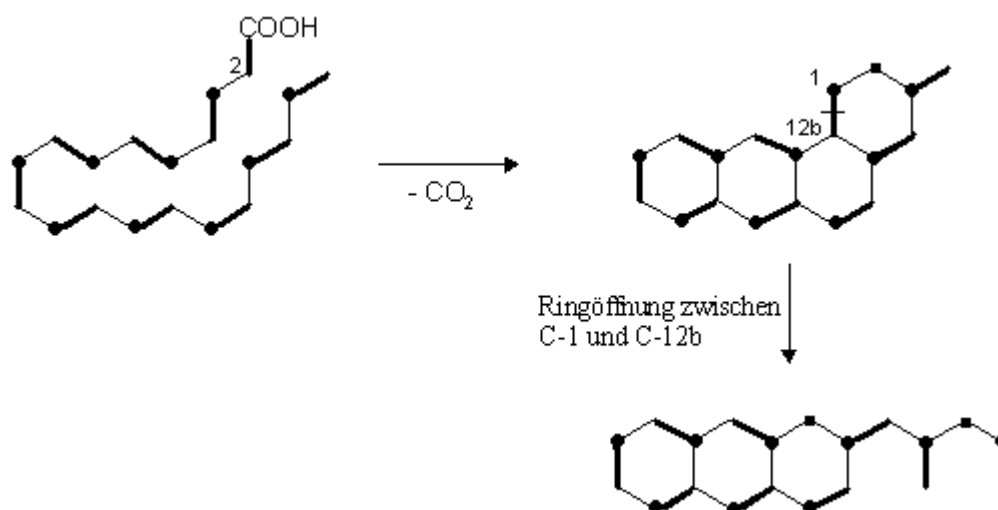
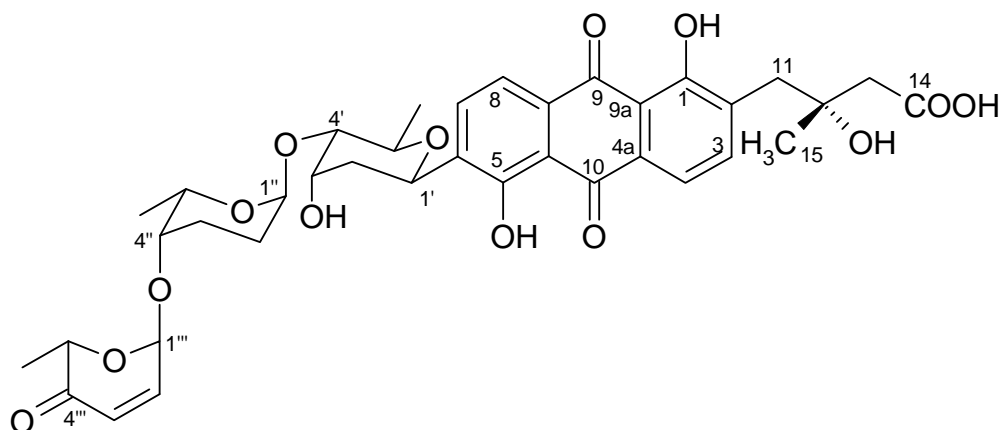


Abbildung 73: Schematische Darstellung eines Ausschnitts des Biosyntheseweges für die Chromophore von Vineomycin A₁ (**42**) und B₂ nach Imamura *et al.*⁶⁷.

Die Anthrachinon- bzw. Benz[a]anthrachinon-Antibiotika entstammen dem Polyketidweg. Von Imamura *et al.*⁶⁷ wurde 1982 der Biosyntheseweg des Angucyclins Vineomycin A₁ (**42**) und seinem offenkettigen Äquivalent Vineomycin B₂ vorgestellt. Unter Berücksichtigung dieser Studien zur Biosynthese von Benz[a]anthrachinon-Antibiotika, scheint A-7884 (**35**) der Vorläufer für das offenkettige Anthrachinonanalogon Vineomycin C (**36**) zu sein. Nach Imamura *et al.*⁶⁷ wird das Benz[a]anthrachinongerüst ausgehend von einem Dekaketid gebildet. Die für den Ringschluß bzw. die Bildung des angular annelierten Tetracyclus erforderli-

che Decarboxylierung soll dabei an dem Kohlenstoffatom C-2 des Dekaketids erfolgen. Die offenkettige Form wird schließlich durch Spaltung der Bindung zwischen C-1 und C-12b erhalten (siehe Abbildung 74).

Vineomycin C (**36**) wurde 1999 erstmals von Alvi *et al.* aus *Streptomyces* # AM1699 isoliert und hemmt wie die Verbindung A-7884 (**35**) das Enzym i-NOS⁶⁸. In eigenen Tests war die Verbindung ferner schwach aktiv gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*. (siehe Tabelle 14). Im Cytotoxizitätstest gegen Krebs-Zelllinien zeigte sie IC₅₀-Werte von 2.1 µg/ml. In Tests gegen Viren und den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* wurden keine Aktivitäten festgestellt.



36

Fridamycin D

Aus der Fraktion 3b wurde eine gelbe Verbindung **37** isoliert, deren Molmasse nach Auswertung des ESI-Masenspektrums auf 596 Dalton festgelegt werden konnte. Im ¹H-NMR-Spektrum von **37** fielen im offset-Bereich zwei scharfe Signale auf, die zwei chelierten Hydroxyprotonen zugeordnet wurden, wobei die Rotfärbung mit Natronlauge auf ein *peri*-Hydroxychinon hinwies. Dem aromatischen Bereich konnten bei $\delta = 7.88, 7.81, 7.76$ und 7.62 vier Dubletts mit einer Intensität von jeweils 1H entnommen werden. Nach Vergleich der Kopplungskonstanten, mußte es sich um zwei Paare *ortho*-ständiger Protonen handeln. Im Aliphatenbereich waren bei $\delta =$

5.17 und 4.97 zwei Dubletts, ein Dublett von Dublett bei $\delta = 4.33$ und 3.49, ein Quartett bei $\delta = 4.72$ und schließlich zwei Multipletts bei $\delta = 3.81$ und 3.56 zu sehen. Sämtliche Signale wiesen eine Intensität von 1H auf. Die relative Tieffeldlage dieser Protonen deutete auf eine jeweilige geminale Sauerstofffunktion hin, wobei die chemische Verschiebung des Signals bei $\delta = 5.17$ charakteristisch für ein acetalisches Proton war. Zwei Dubletts im Bereich für Methylenprotonen bei $\delta = 3.09$ und 3.01 stellten unter Berücksichtigung der relativ großen Kopplungskonstanten von 13 Hz möglicherweise ein geminales Protonenpaar dar. Bei $\delta = 2.63$ lag ein Dublett und bei $\delta = 2.58$ ein Singulett der Intensitäten von jeweils 2H vor. Zuletzt waren ein Multiplett bei $\delta = 2.46$ und ein Quartett $\delta = 1.50$ der Intensitäten von je 1H sowie drei Signale für Protonen von Methylgruppen bei $\delta = 1.40$, 1.36 und 1.31 zu erkennen. Mit diesen Daten wurde eine Substruktursuche in AntiBase[®] durchgeführt und lieferte nach bereits zwei Sucheinträgen die Verbindung Fridamycin D (**37**) als einzig in Frage kommende Substanz. Die Auswertung des ¹³C-NMR-Spektrums sollte nun diese Vermutung überprüfen.

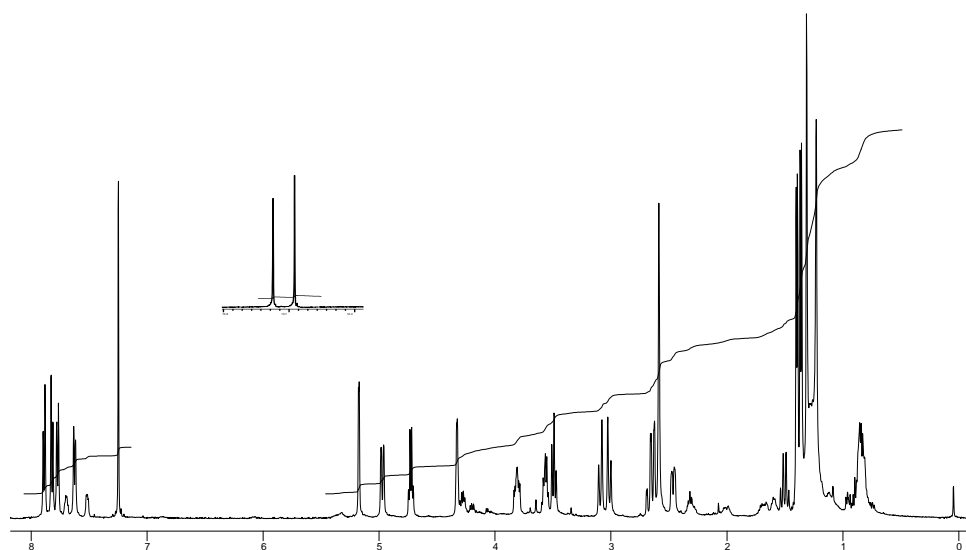


Abbildung 74: ¹H-NMR-Spektrum (500 MHz) von Fridamycin D (**37**) in CDCl₃.

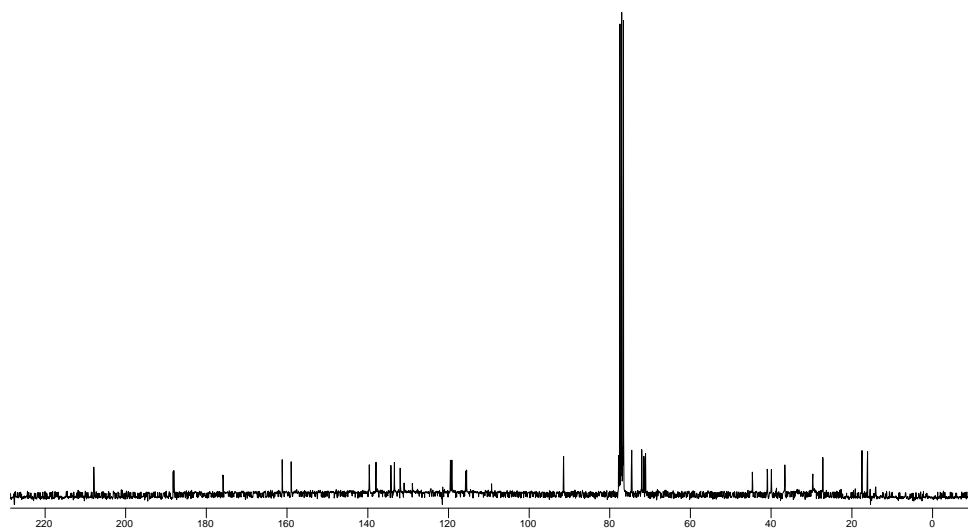


Abbildung 75: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Fridamycin D (**37**) in CDCl_3 .

Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte zwei sich überlagernde Signale bei $\delta = 187.9$, die den Ketogruppen eines chinoiden Systems zugeordnet wurden. Zu diesen mußten die bereits erwähnten Hydroxygruppen jeweils cheliert vorliegen. Das Signal bei $\delta = 207.7$ deutete auf eine Ketocarbonylfunktion hin, und das Signal bei $\delta = 175.9$ ließ eine Carbonsäure- oder Carbonsäureesterfunktion vermuten. Im Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffe konnten zwölf Signale festgestellt werden, was auf zwei Benzolringe schließen ließ, die zusammen mit dem chinoiden System sehr wahrscheinlich ein Anthrachinon bildeten. Das Signal bei $\delta = 91.4$ wies auf ein acetalisches C-Atom hin und stützt damit die oben geäußerte Vermutung für das Protonensignal bei $\delta = 5.17$. Die sechs Signale bei $\delta = 77.7 - 71.1$ waren vermutlich den demnach verbleibenden sechs Protonen mit geminaler Sauerstofffunktion zuzuordnen. Nach dem HSCQ-Spektrum konnten die Signale bei $\delta = 44.7, 40.9, 40.0$ und 26.6 Methylengruppen, die Signale bei $\delta = 27.2, 17.5$ und 16.1 den bereits nach Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums identifizierten Methylgruppen zugeordnet werden. Mit diesen Daten lieferte eine Substruktursuche in AntiBase[®] die Verbindung Fridamycin D (**37**) als einzig in Frage kommende Substanz. Fridamycin D wurde erstmals in der Dissertation von Kricke⁷⁰ vorgestellt. Ein Datenvergleich der NMR-Werte mit denen von Kricke veröffentlichten NMR-Daten für Fridamycin D (**37**) zeigte eine zufriedenstellende Übereinstimmung. Da in der Dissertation von Kricke keine Positionen für die C-Signale bei $71.09, 71.45, 74.50, 76.73$ und 77.68 angegeben wurden, führte man für eine eindeutige Zuordnung dieser Kohlenstoffatome HSQC- und HMQC-

Experimente durch. Die Auswertung dieser 2D-NMR-Messungen bestätigte, daß es sich bei der isolierten Verbindung um Fridamycin D (**37**) handelte. In Abbildung 77 sind die wichtigsten H,H-COSY- und HMBC-Korrelationen aufgeführt, mit denen die nach Kricke noch nicht aufgeklärten Positionen für die C-Atome bei $\delta_{C(\text{Kricke})} = 71.09, 71.45, 74.50, 76.73$ und 77.68 (bzw. $\delta_{C(\text{exp})} = 71.1, 71.5, 74.5, 74.6, 76.8$ und 77.7) bestimmt werden konnten.

Eine strukturelle Besonderheit von Fridamycin D (**37**) ist das Vorliegen eines Dioxanrings, der durch O-glycosidische Bindung zwischen C-4' und C-1'' sowie Bildung einer Etherbrücke zwischen C-3' und C-2'' durch nucleophilen Angriff der Hydroxygruppe bzw. des entsprechenden Alkoholats in Position C-3' des Zuckers D-Olivose auf den α, β -ungesättigten Ketozucker L-Aculose entsteht. Fridamycin D (**37**) zeigt geringe Aktivitäten gegen grampositive Bakterien⁷⁰, was sich mit dem hier isolierten Präparat reproduzieren ließ (Tabelle 14).

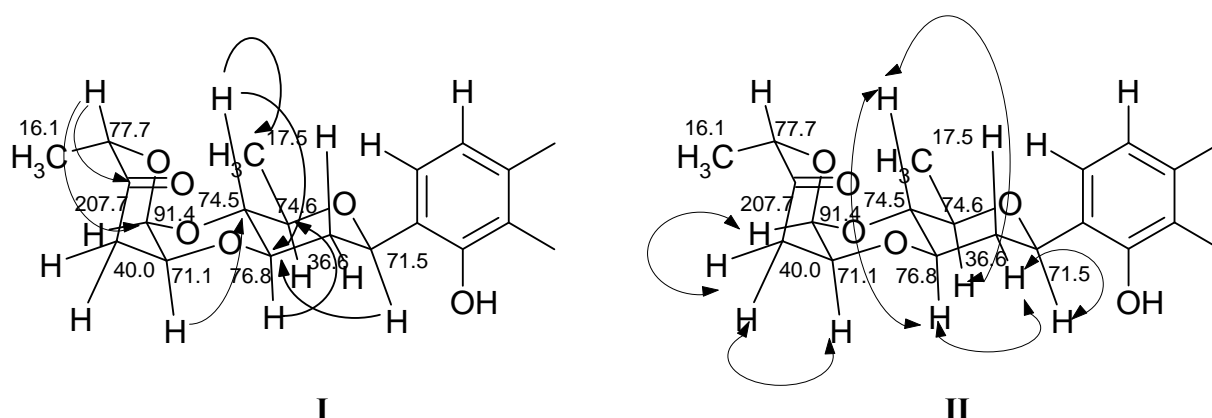
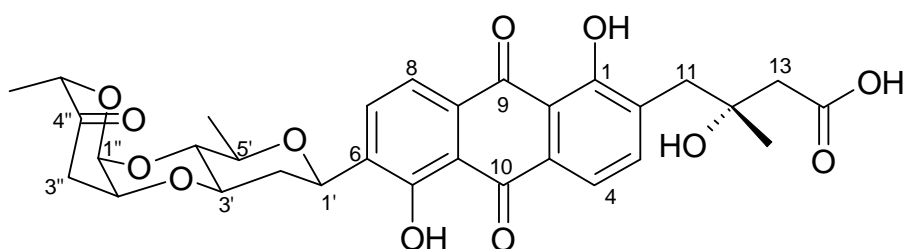


Abbildung 76: Die wichtigsten HMBC-Korrelationen (I) bzw. H,H-COSY-Korrelationen (II) zur Aufklärung des Zuckerrests in Fridamycin D (**37**) (Strukturausschnitt).



Rabelomycin

Die Fraktion 3c lieferte neben zwei weiteren Unterfraktionen (3c' und 3c'') die gelbliche Reinsubstanz **38**, deren Molmasse durch CI- und EI-Massenspektren zu 338 Dalton bestimmt wurde. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum fielen zwei scharfe Singulets bei $\delta = 12.26$ und 11.62 auf, die chelierten Hydroxygruppen zuzuordnen waren und von denen mindestens eine Hydroxygruppe aufgrund der rötlichen Farbreaktion mit Natronlauge sehr wahrscheinlich einem *peri*-Hydroxychinon zuzuordnen war. Ein Multiplett bei 7.70 - 7.60 der Intensität 2H und ein Multiplett bei $\delta = 7.27$ - 7.23 sowie ein Singulett bei $\delta = 6.97$ mit den Intensitäten von jeweils 1H zeigten vier aromatische Protonen an. Bei $\delta = 3.07$ waren ein Singulett und bei $\delta = 2.98$ ein Dublett zu erkennen. Beide Signale wiesen eine Intensität von 2H auf und schienen Methylengruppen zu entsprechen. Zuletzt zeigte das Spektrum ein Singulett bei $\delta = 1.48$ mit einer Intensität von 3H , was auf eine Methylgruppe hindeutete, die mit einem quartären Kohlenstoffatom verknüpft sein mußte. Eine Substrukturrecherche mit diesen Daten führte zu der Verbindung Rabelomycin (**38**). Zur näheren Charakterisierung der Struktur wurde schließlich das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum ausgewertet:

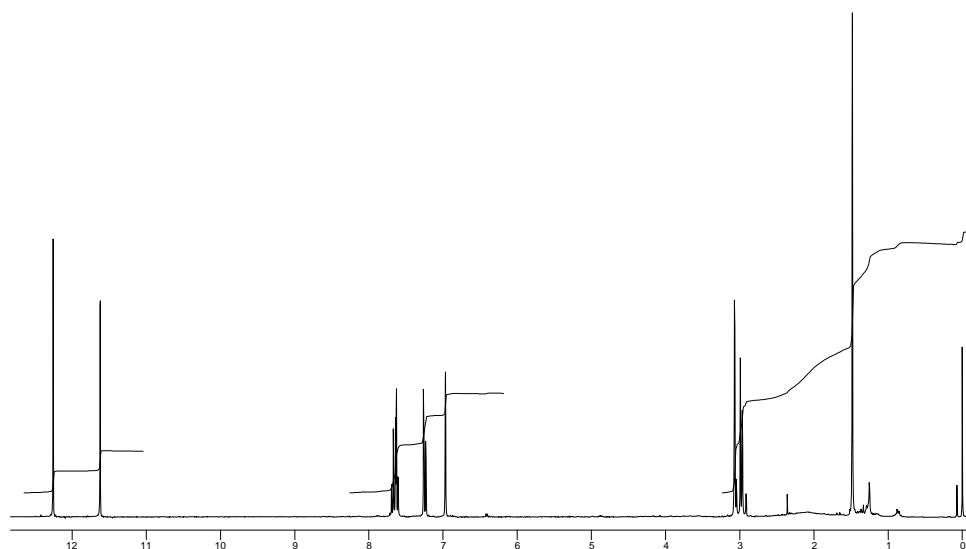


Abbildung 77: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz) von Rabelomycin (**38**) in CDCl_3 .

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum lagen bei $\delta = 196.2$, 192.5 und 183.2 Signale für drei Carbonylfunktionen, von denen die zwei letzteren der chemische Verschiebung zufolge vermutlich den Ketogruppen des nach dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum vermuteten Chins zuzuordnen waren. Ferner konnte für das C-Atom bei $\delta = 196.2$ eine Alde-

Hydroxygruppe ausgeschlossen werden, da im Protonenspektrum ein entsprechendes Signal bei $\delta = 9-10$ fehlte. Gegen eine Carbonsäure- oder Esterfunktion sprach die relativ hohe Tieffeldverschiebung. Somit lag wahrscheinlich ein Keton bzw. genauer ein α , β -ungesättigtes Keton vor. Den Signalen im Bereich von $\delta = 163.7-115.0$ entsprachen zwölf sp^2 -hybridisierte C-Atome, welche zusammen mit der vermuteten Hydroxychinoneinheit auf ein Dihydroxy-anthrachinon hinwiesen. Da sich die ^{13}C -NMR-Werte für die Ketogruppen des Chinons stark unterschieden, schienen beide Hydroxygruppen zu der Ketogruppe bei $\delta_{\text{C}} = 192.5$ cheliiert zu sein. Das aliphatische C-Atom bei $\delta = 72.1$ schien aufgrund seiner Tieffeldverschiebung mit einem Sauerstoffatom verknüpft zu sein. Es verblieben vier Signale im Aliphatenbereich, die unter Berücksichtigung des ^1H -NMR-Spektrums eine Methylgruppe, zwei Methylengruppen und ein quartäres Kohlenstoffatom anzeigten.

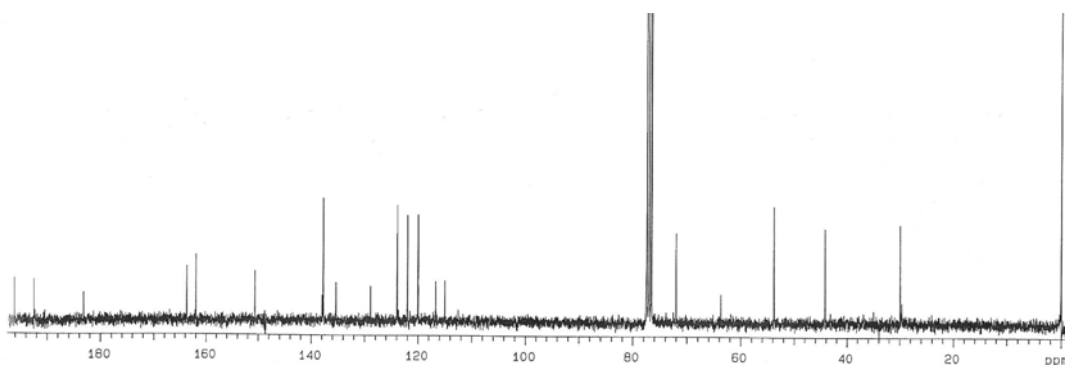
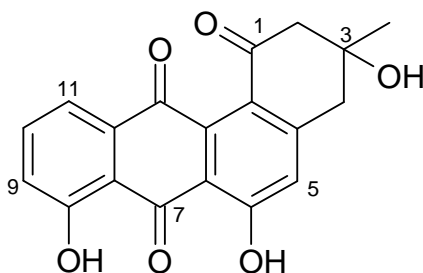


Abbildung 78: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Rabelomycin (**38**) in CDCl_3 .

Die Datenbanksuche in AntiBase[®] führte zu der Verbindung Rabelomycin (**38**). Ein ^{13}C -Datenvergleich mit den in der Dissertation von Schiebel⁷¹ veröffentlichten Werten zeigte zufriedenstellende Übereinstimmung. Rabelomycin (**38**) wurde 1970 erstmals von Wen-Chih Liu *et al.*⁷² aus *Streptomyces olivaceus* ATTC 21,549 isoliert. Es gehört zu der Gruppe der Angucyclinon-Antibiotika (Tetrangomycin-Typ)^{64, 66} und zeigt Aktivitäten gegen verschiedene grampositive Bakterien^{72,73}. Auch das Enzym i-NOS wird durch Rabelomycin gehemmt⁶⁸. Ferner wurden in der Dissertation von M. Schiebel⁷¹ Antitumorwirkungen von Rabelomycin gegen MCF 7 (Mammacarcinom), HMO2 (Magenadenocarcinom) und Hep-G2 (Lebercarcinom) Zellen dokumentiert^{68, 35}.



38

Mutabahamycin

Nach Trennung der Fraktion 3c'' and Sephadex konnte eine orange Verbindung erhalten werden, für welche nach Auswertung des ESI-Massenspektrums die Molmasse von $m/z = 838$ angenommen wurde. Ein interpretierbares EI-Massenspektrum wurde nicht erhalten. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnten bei $\delta = 13.24$ und 13.03 zwei chelierte Hydroxygruppen identifiziert werden. Da sich die Substanz mit Natronlauge rot verfärbte, schien wohl ein *peri*-Hydroxychinon vorzuliegen. Im aromatischen-olefinischen Bereich lagen sechs Signale mit jeweils einer Intensität von 1H. Hierzu gehörten vier Dubletts, wobei nach Auswertung der Kopplungskonstanten jeweils die Protonen der Signale bei $\delta = 7.87$ und 7.80 ($J = 8.0$ Hz) sowie bei $\delta = 7.75$ und 7.62 ($J = 6.8$ Hz) zueinander *ortho*-ständig waren. Das Signalpaar der Protonen bei $\delta = 6.86$ und 6.07 zeigte einen leichten Dacheffekt. Dabei war das Signal bei $\delta = 6.86$ als Dublett von Dublett, das zweite Signal als Dublett aufgespalten. Beide Signale wiesen eine Kopplungskonstante von $J = 10$ Hz auf, so daß man außerdem unter Berücksichtigung der chemischen Verschiebung schließlich von *cis*-ständigen Protonen einer olefinischen Doppelbindung ausgehen konnte.

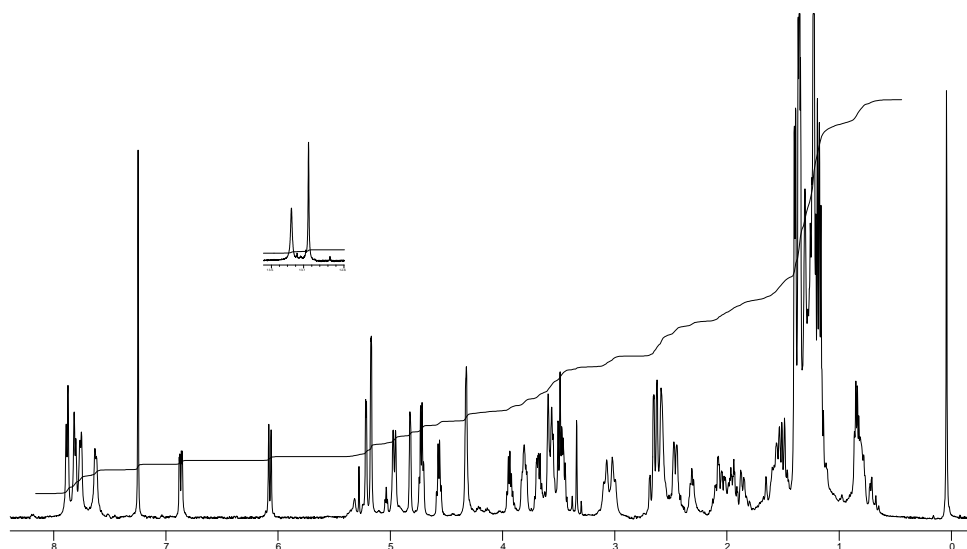


Abbildung 79: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Mutabahamycin (**40**) in CDCl_3 .

Im Bereich von $\delta = 1.47 - 5.21$ lagen 19 Signale, vorwiegend in Multipletts aufgespalten, die nach ihren Intensitäten auf insgesamt 26 Protonen zurückzuführen waren. Dabei fielen die sieben Signale zwischen $\delta = 4.32 - 5.21$ in den für acetalische Protonen charakteristischen Bereich. Nach Auswertung der ^{13}C -NMR-Daten waren drei O-glycosidisch gebundene Kohlenstoffatome zu erwarten ($\delta = 96.6, 95.4$ und 91.4). Im Bereich von $\delta = 1.16-1.39$ lagen zwei Dubletts und drei Singulets der Intensität von jeweils 3H, welche Methylgruppen zugeordnet wurden.

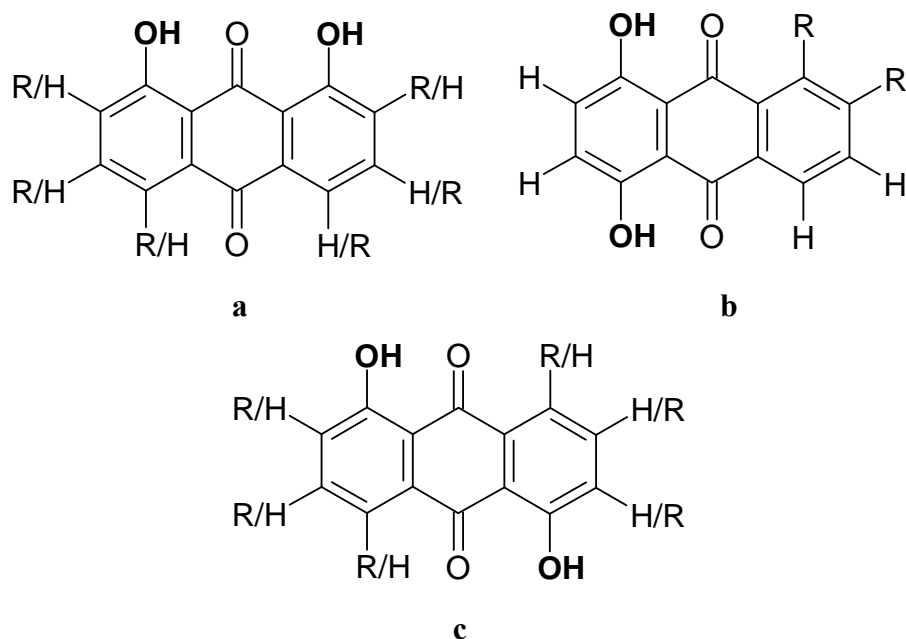


Abbildung 80: Mögliche Positionen der Hydroxyprotonen, bzw. der Seitenketten „R“ in der Verbindung (**40**).

Dem ^{13}C -NMR-Spektrum zufolge waren ferner sechs Methylen-, 18 Methin- und 14 quartäre Kohlenstoffatome zu erwarten. Die Signale bei $\delta = 189.0$ und 188.0 waren charakteristisch für die Carbonylkohlenstoffatome des erwarteten Hydroxychins. Aufgrund ihrer ähnlichen chemischen Verschiebung konnte ein 1,8-Dihydroxyanthrachinon ausgeschlossen werden. Damit kamen nach Abbildung 81 nur noch die Vorschläge (b) und (c) in Frage. Die Signale bei $\delta = 207.8$ und 197.2 deuteten auf Ketocarbonylfunktionen hin. Für die C-Atome bei $\delta = 161.0$ und 158.9 wurden Verknüpfungen zu jeweils einem Sauerstoffatom angenommen. Im aromatisch-olefinischen Bereich lagen 14 Signale, so daß wie erwartet ein Anthrachinongerüst sowie eine Doppelbindung in einem der hieran substituierten Seitenketten vorliegen mußten. Zwischen $\delta = 65.8$ und 77.7 befanden sich zehn Signale. Dieser Bereich zeigt unter anderem Kohlenstoffatome von aliphatischen Alkoholen und von Etherverbindungen an. Schließlich wurden im Bereich von $\delta = 44.7$ - 15.1 nach dem ^{13}C /APT-NMR-Spektrum sechs Methylen und fünf Methylgruppen identifiziert. Für die Verbindung **40** wurden nach Auswertung der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren insgesamt 42 Kohlenstoffatome und 47 Protonen ermittelt. Dies entspricht einer Masse von 551. Unter Berücksichtigung der durch ESI-MS ermittelten Molmasse von 838 verblieb nach Subtraktion von 551 ein Rest von 287. Unter der Annahme, daß die Verbindung neben Protonen und Kohlenstoffatomen nur noch Sauerstoffatome

enthielt, teilte man diese Restmasse durch 16. Hiernach mußte die Verbindung noch siebzehn Sauerstoffatome aufweisen. Unter Berücksichtigung der Masse von 17 Sauerstoffatomen lag immer noch eine nicht zugeordnete Restmasse von 15 vor. Diese Masse von 15 deutete auf ein weiteres Kohlenstoffatom sowie drei Protonen von vermutlich drei weiteren Hydroxygruppen hin. Ebenso denkbar war eine Methylgruppe, für welche aber die entsprechenden Signale im ^1H -NMR-Spektrum und im ^{13}C -NMR-Spektrum fehlten.

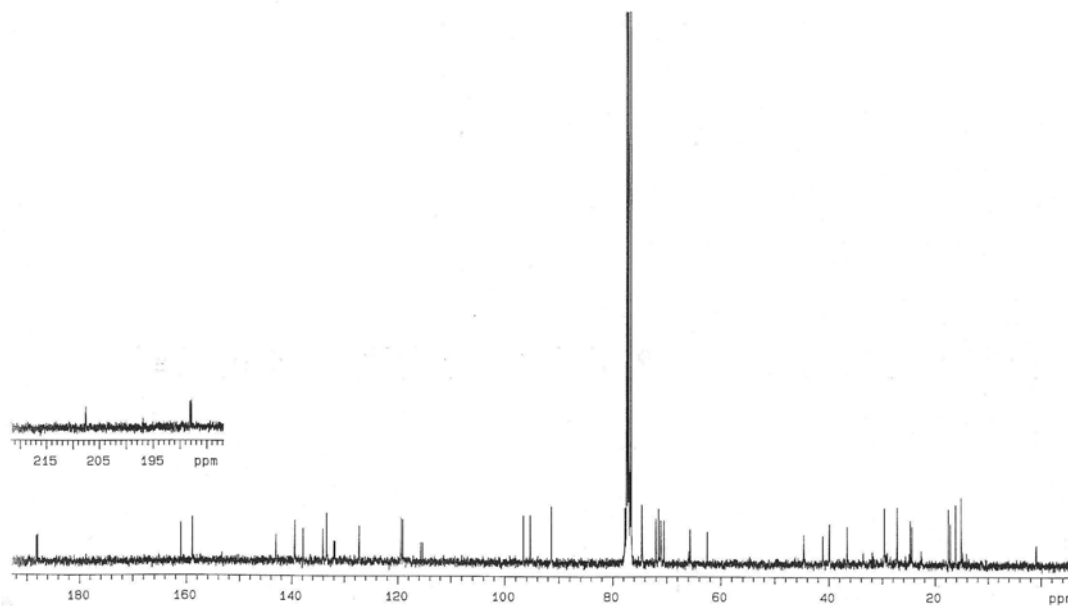


Abbildung 81: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Mutabahamycin (**40**) in CDCl_3 .

Da das ^{13}C -NMR-Spektrum jedoch kein Signal für ein weiteres C-Atom anzeigte, sollten die zweidimensionalen NMR-Spektren nähere Aufschlüsse über die Struktur der Verbindung **40** NMR-Spektren geben. Möglicherweise handelte es sich bei dem vermuteten C-Atom um ein quartäres C-Atom mit hoher Relaxationszeit und damit sehr geringer Signalintensität. In diesem Falle würde das Signal dann im Grundrauschen des Spektrums untergegangen sein, da die Meßzeit von immerhin 10.3 Stunden für ein ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis hier nicht ausreichte.

Nach Auswertung des HMQC-, HMBC- und H,H-COSY Spektrums konnten vorerst die drei Strukturfragmente (I), (II) und (III) identifiziert werden. Das Fragment (I) (siehe Abbildung 83) gibt die Struktur des Aglykons des vermuteten Dihydroxyanthrachinons an. Im HMBC-Spektrum koppelte hierbei das Proton der Hydroxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 13.03$ auf die C-Atome bei $\delta_{\text{C}} = 138.0$, 115.5 und 159.0 . Der

charakteristischen Lage im tiefen Feld zufolge war die Hydroxygruppe an dem Kohlenstoffatom bei $\delta = 159.0$ gebunden. Das Proton bei $\delta = 7.80$ koppelte auf die C-Atome bei $\delta = 189.0, 115.5, 159.0$ und 138.0 . Von dem Proton bei $\delta = 7.87$ wurden Kopplungen auf die C-Atome bei $\delta = 131.9, 115.5$ und 138.0 beobachtet. Ein Anthrachinongerüst annehmend, wurde hiernach die Position des Protons bei $\delta = 7.80$ auf die Position C-8 festgelegt. Hierfür sprach vor allem die Kopplung auf das Carbonylkohlenstoffatom bei $\delta = 189.0$. Da bereits nach Auswertung des $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums die Nachbarschaft dieses Protons zu dem Proton bei $\delta = 7.87$ feststand, mußte letzteres die Position C-7 erhalten. Damit konnte sich die Hydroxygruppe nur in Position C-5 befinden, wodurch das Aglykon (b) nach Abbildung 81 auszuschließen war. Aus allen weiteren HMBC-Korrelationen ließ sich das in Abbildung 84 dargestellte Aglykon (Fragment I) konstruieren. Zur weiteren Unterstützung der Strukturaufklärung wurden neben Vineomycin C (**36**) als Beispiel für ein Anthrachinon-Antibiotikum mit aliphatischem Seitenkettenrest auch das Angucyclin Saquayamycin A (**39**)⁷⁴ ausgewählt und die $^{13}\text{C-NMR}$ -Daten verglichen (siehe Tabelle 13). Hiernach wurde für den Seitenkettenrest von **40** eine terminale Carbonsäuregruppe angenommen. Jedoch konnte im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum kein Signal für das C-Atom einer Carboxylgruppe gefunden werden. Jedoch würde das C-Atom einer Carboxylgruppe zusammen mit drei weiteren Protonen den zuvor erwähnten und noch nicht zugeordneten Massenrest von 15 erklären. Da auch im HMBC-Spektrum keine Kopplungen in dem Signalbereich für Carboxykohlenstoffatome zu erkennen waren, wurde eine kleine Menge der Verbindung **40** mit Diazomethan methyliert, um die vermutete Carbonsäuregruppe zu beweisen. Das Methylierungsprodukt zeigte im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ein zusätzliches Signal bei $\delta = 3.72$, was in diesem Fall nur auf einen Methylester schließen ließ (siehe Abbildungen 80 und 83). Damit wurde die Anwesenheit einer Carbonsäuregruppe bestätigt.

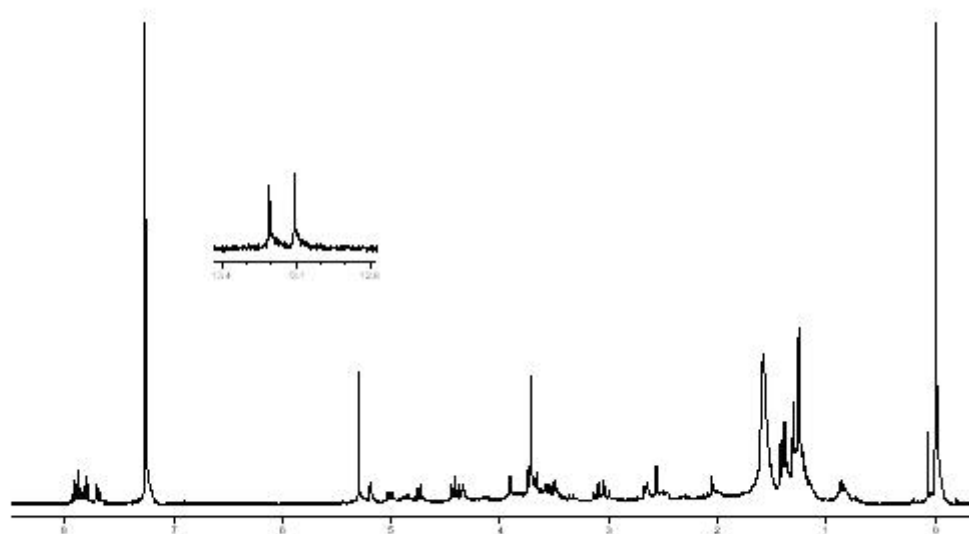


Abbildung 82: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) des Methylierungsproduktes von Mutabamycin in CDCl_3 .

Der aliphatische Seitenrest war mit Position C-2 des Anthrachinongrundgerüsts verknüpft. Dies bewiesen die Kopplungen der Methylenprotonen bei $\delta = 3.01$ und 3.09 auf das aromatische Kohlenstoffatom bei $\delta = 134.1$ (C-2) sowie die Kopplungen auf das C-Atom bei $\delta = 161.0$. Außerdem lag eine weitere Kopplung auf das Kohlenstoffatom bei $\delta = 72.1$ vor. Auf dieses C-Atom koppelten wiederum die Protonen der Methylengruppe bei $\delta = 2.58$. Dem ^{13}C /APT-Spektrum zufolge war das Signal bei $\delta = 72.1$ einem quartären Kohlenstoffatom zuzuordnen. Dessen chemische Verschiebung wies dabei auf ein geminales Sauerstoffatom hin. Damit blieb noch eine Bindung für das C-Atom bei $\delta = 72.1$ offen. Möglicherweise war es mit der Methylgruppe bei $\delta = 29.7$ verknüpft. Auch wenn keine HMBC-Kopplungen auf das C-Atom der Methylgruppe zu sehen waren oder die entsprechenden Protonen keine HMBC- oder H,H-COSY-Kopplungen zeigten, so sprachen Strukturvergleiche ähnlicher Anthrachinon-Antibiotika mit aliphatischem Seitenkettenrest wie Vineomycin C (**36**) oder Fridamycin D (**37**) für diese Annahme.

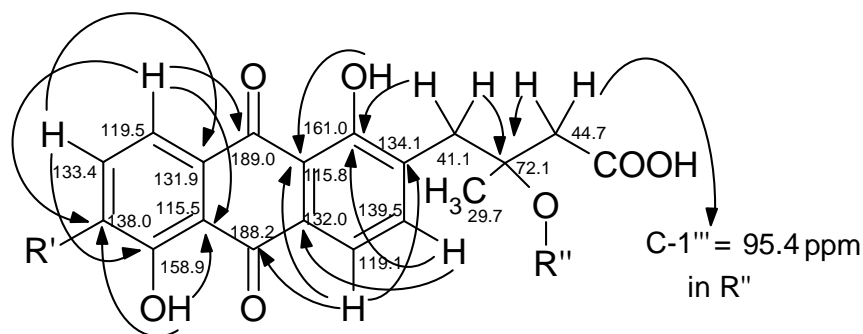


Abbildung 83: Ausgewählte HMBC-Korrelationen für das Fragment (I) der Verbindung (**40**).

Das Aglykon war in Position C-6 C-glycosidisch mit einem Zucker verknüpft, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um den Zucker D-Olivose handelte, wie ein Vergleich mit den Zuckern anderer Vineomycine, wie z.B. Saquayamycin A, vermuten ließ (siehe Abbildungen 85 und 90). Beide Disaccharideinheiten von Saquayamycin A sind bis auf den Zucker B mit den Disaccharideinheiten von **40** identisch. Da es sich insgesamt um für Angucycline typische Zucker handelt, liegt es nahe, daß die Zucker von **40** denen von **39** auch stereochemisch entsprechen.

Eine O-glycosidische Bindung wurde aufgrund der chemischen Verschiebung für das anomere C-Atom mit $\delta = 71.5$ ausgeschlossen, da bei einer O-glycosidischen Bindung das Signal für das anomere Kohlenstoffatom bei tieferem Feld ($\delta = 85 - 110$) läge. Die relative Konfiguration der Zucker konnte nicht bestimmt werden, da die Protonensignale vorwiegend als Multipletts aufgespalten vorlagen, bzw. sich überschneiden und so Kopplungskonstanten nicht ermittelt werden konnten. Für die Messung von auswertbaren NOESY-Spektren reichte dagegen die Substanzmenge von 4.0 mg nicht aus. Die Konstitution der Zucker wurde mit Hilfe der zweidimensionalen NMR- Spektren aufgeklärt.

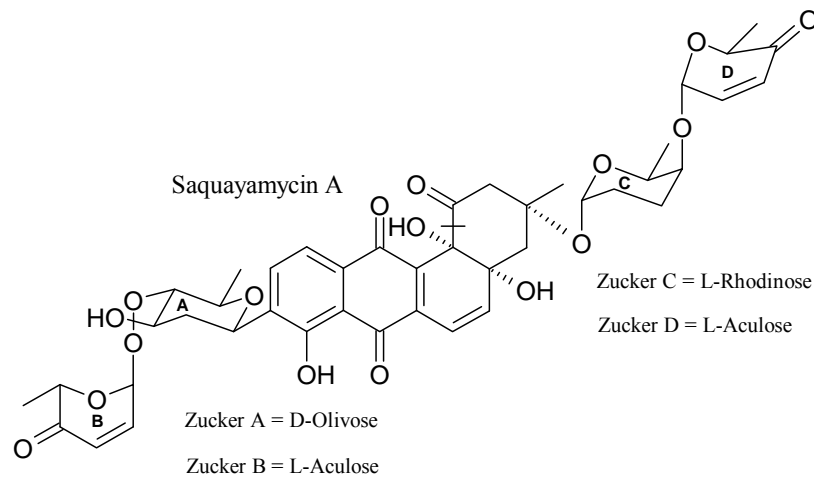


Abbildung 84: Saquayamycin A (39) mit Bezeichnung der Zuckersubstituenten A-D.

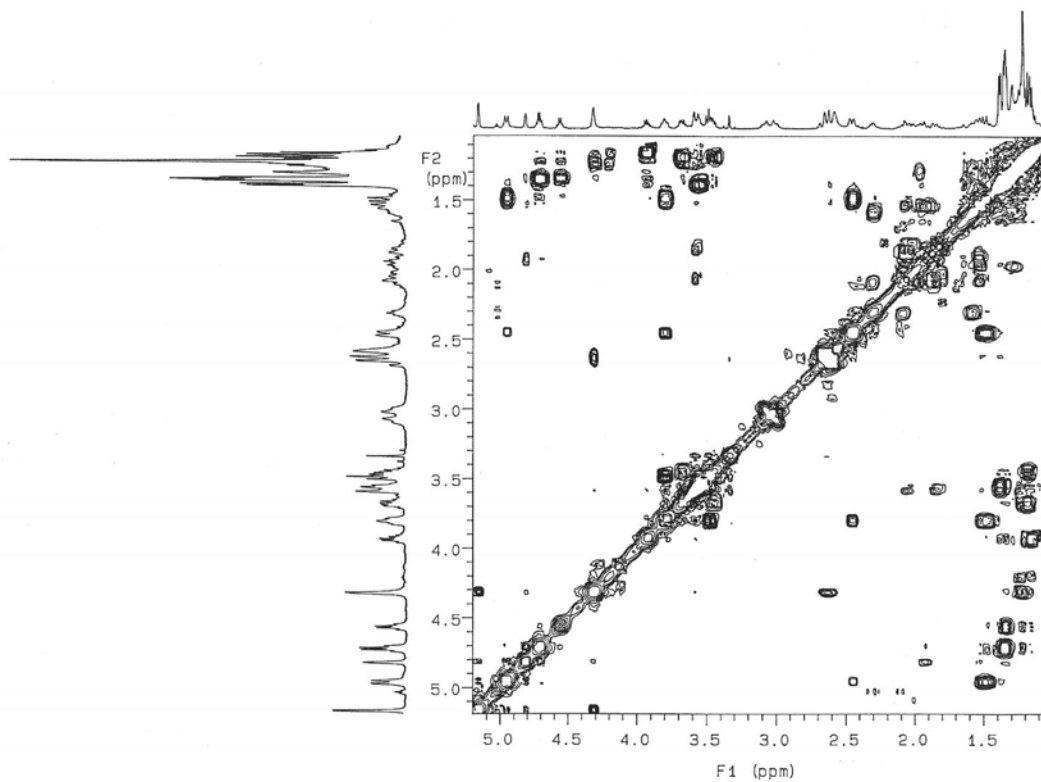


Abbildung 85: H,H-COSY-Spektrum (500 MHz) von Mutabahamycin (40) in CDCl_3 .

Dem HSQC-Spektrum zufolge war an das C-Atom bei $\delta = 71.5$ mit dem Proton bei $\delta = 4.96$ geknüpft. Die HMBC-Kopplungen des Protons bei $\delta = 4.96$ auf die aromatischen C-Atome bei $\delta = 138.0$ (C-6) und 133.4 (C-7) zeigten dabei die Verknüpfung

fung des Zuckerrestes mit dem Aglykon an. Die Struktur des Zuckerrestes konnte im Wesentlichen durch H,H-COSY-Korrelationen aufgelärt werden. So korrelierte das Proton bei $\delta = 4.96$ im H,H-COSY-Spektrum mit den Protonen der Methylengruppe bei $\delta = 1.60$ - 1.45 und 2.48 - 2.45 , die nach HSQC-Auswertung dem C-Atom bei $\delta = 36.6$ zugeordnet wurden. Beide Protonen dieser Methylengruppe waren der H,H-COSY-Korrelationen zufolge wiederum zu dem Proton bei $\delta = 3.80$ und dieses zu dem Proton bei $\delta = 3.46$ benachbart, das eine HMBC-Kopplung zu dem C-Atom bei 74.6 aufwies. Dieses C-Atom war mit dem Proton bei $\delta = 3.55$ verknüpft, welches eine H,H-COSY-Korrelation zu Protonen der Methylgruppe bei $\delta = 1.39$. An dieses Zuckermolekül war O-glycosidisch der Zucker 2-Hydroxy-cinerulose gebunden, wobei die Kopplung von dem Proton bei $\delta = 5.17$ auf das C-Atom bei $\delta = 74.5$ die Verknüpfungsstelle angab. Das Proton bei $\delta = 5.17$ korrelierte ferner im H,H-COSY-Spektrum mit dem Proton bei $\delta = 4.32$, welches mit dem C-Atom bei $\delta = 71.2$ verknüpft war. Das Proton bei $\delta = 4.32$ war durch die H,H-COSY-Korrelationen zu den Methylenprotonen bei $\delta = 2.64$ benachbart. Außerdem koppelte es im HMBC-Spektrum auf das Ketokohlenstoffatom bei $\delta = 207.8$ sowie auf das C-Atom bei $\delta = 77.7$, welches mit dem Proton bei $\delta = 4.72$ verknüpft war. Damit befand sich die Ketogruppe zwischen den Kohlenstoffatomen bei $\delta = 77.7$ und 41.1 , was der Position C-4'' entsprach. Das Proton bei $\delta = 4.72$ korrelierte schließlich im H,H-COSY-Spektrum mit den Methylprotonen bei $\delta = 1.36$ und zeigte auch eine Kopplung zu dem C-Atom dieser Methylgruppe ($\delta = 16.2$) im HMBC-Spektrum. In Abbildung 86 sind die wichtigsten HMBC- und H,H-COSY Korrelationen dieser Disaccharideinheit dargestellt.

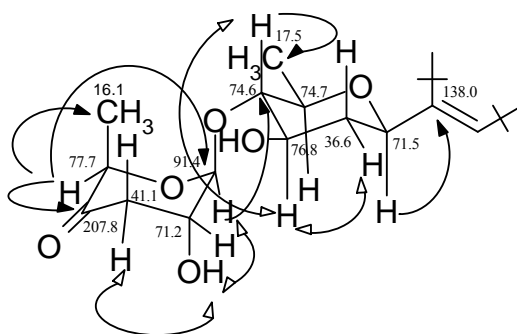


Abbildung 86: Ausgewählte HMBC- (→) und H,H-COSY-Korrelationen (↔) für das Fragment (II) der Verbindung **40**.

Tabelle 13: Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte von Mutabahamycin (**40**) mit denen von Saquayamycin A⁷⁴ (**39**) und dem Aglykon des Vineomycin C (**36**).

C-Atom	Saquayamycin A (lit.)	C-Atom	Mutabahamycin	Aglykon von Vineomycin C (exp.)
1	204.7	14	-	174.7
2	50.2	13	44.7	45.2
3	82.4	12	72.1	71.8
4	44.5	11	41.1	40.1
4a	79.9	2	134.1	134.2
5	145.6	3	139.5	139.2
6	117.4	4	119.1	118.6
6a	138.8	4a	132.0	131.4
7	188.2	10	188.2	187.3
7a	114.0	10a	115.5	115.0
8	158.0	5	158.9	158.7
9	138.2	6	138.0	138.3
10	133.5	7	133.4	133.1
11	119.6	8	119.5	119.4
11a	130.5	8a	131.9	131.4
12	182.2	9	189.0	187.5
12a	138.9	9a	115.8	115.3
12b	77.4	1	161.0	161.1
13	25.5	15	29.7	26.9
1'	71.1	1'	71.5	
2'	38.9	2'	36.6	
3'	71.3	3'	76.79	
4'	89.3	4'	74.6	
5'	74.4	5'	74.7	
6'	18.4	6'	17.5	
1''	95.2	1''	91.4	
2''	142.1	2''	77.7	
3''	127.3	3''	41.1	
4''	195.1	4''	207.8	
5''	71.6	5''	71.2	
6''	15.2	6''	16.1	
1'''	92.4	1'''	96.6	
2'''	24.7	2'''	24.4	
3'''	24.5	3'''	24.7	
4'''	76.2	4'''	76.76	
5'''	67.0	5'''	65.8	
6'''	17,1	6'''	17.2	
1''''	95.3	1''''	95.4	
2''''	143.0	2''''	143.1	
3''''	127.3	3''''	127.4	
4''''	196.7	4''''	197.2	
5''''	70.7	5''''	70.5	
6''''	15.1	6''''	15.1	

*Zählweise zwischen Angucyclinen und den offenkettigen Anthrachinonderivaten weicht voneinander ab. Gegenübergestellt sind die sich strukturell entsprechenden Atome.

An die aliphatische Seitenkette des Aglykons war ein weiteres Disaccharid (L-Rhodinose \rightarrow L-Aculose) gebunden. (siehe Abbildung 87).

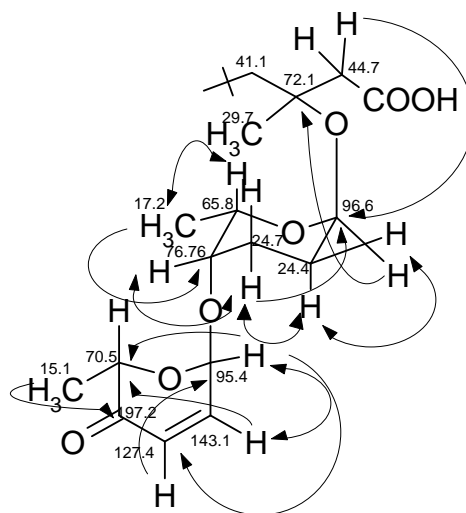


Abbildung 87: Ausgewählte HMBC- und H,H-COSY-Kopplungen für das Fragment (III) der Verbindung **40**.

Dabei wurde die Verknüpfungsstelle durch die Kopplung der Protonen bei $\delta = 2.58$ auf das Kohlenstoffatom bei $\delta = 96.6$ festgelegt. Die relative Tieffeldverschiebung dieses anomeren C-Atoms zeigte eine O-glycosidische Bindung an. Von dem Zuckerrest seinerseits ging eine Kopplung von den Methylenprotonen bei $\delta = 1.60$ - 1.45 auf das Kohlenstoffatom bei $\delta = 72.1$ aus. Außerdem zeigten sie eine H,H-COSY-Korrelationen zu den Protonen der Methylengruppe bei $\delta = 2.13$ - 1.80 . Diese Protonen wiederum korrelierten im H,H-COSY-Spektrum mit dem Proton bei $\delta = 3.60$ - 3.54 , das nach HSQC-Auswertung mit dem C-Atom bei $\delta = 76.76$ verknüpft war, was der Position C-4''' entsprach. Das Proton bei 3.96 - 3.91 zeigte eine HMBC-Kopplung auf das Kohlenstoffatom der Methylgruppe bei $\delta = 17.2$. Schließlich wies das anomere Proton bei $\delta = 4.82$ eine Kopplung auf das C-Atom bei $\delta = 65.8$ auf. Das anomere Proton des folgenden Zuckers bei $\delta = 5.21$ koppelte auf das Kohlenstoffatom in Position C-4''' mit $\delta = 76.76$ und legte damit die Verknüpfungsstelle zwischen den beiden Zuckermolekülen fest. Außerdem zeigte dieses anomere Proton eine Kopplung auf das Kohlenstoffatom bei $\delta = 70.5$ sowie eine Kopplung auf die beiden olefinischen C-Atome bei $\delta = 143.1$ und 127.4 . Die folgende Protonensequenz war durch die H,H-COSY-Korrelationen zwischen den Protonen bei $\delta = 5.21$ und 6.86 sowie den beiden olefinischen Protonen bei $\delta = 6.86$ und 6.07 festzustellen.

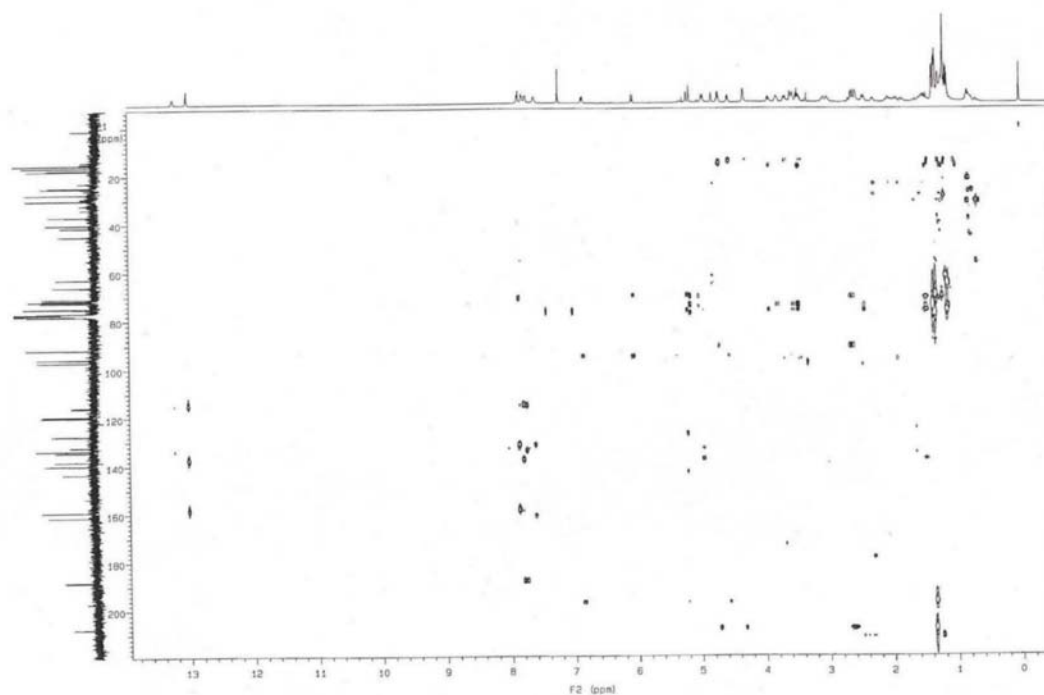
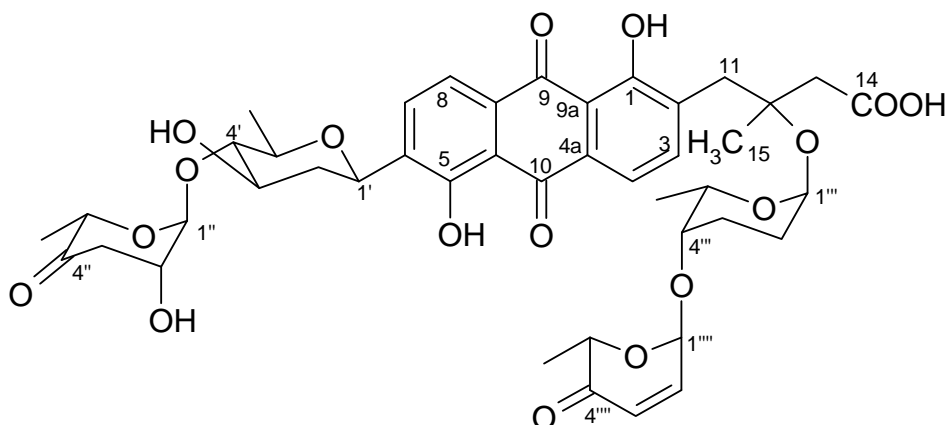


Abbildung 88: HMQC-Spektrum (500 MHz) von Mutabahamycin (**40**) in CDCl_3 .

Auf das Carbonylkohlenstoffatom bei $\delta = 197.2$ koppelten die Protonen bei $\delta = 6.86$, 4.56 und 1.35 . Demnach lag ohne Zweifel ein α,β -ungesättigter Ketozucker vor. Schließlich zeigte das Methinproton bei $\delta = 4.56$ eine Kopplung auf das Kohlenstoffatom der Methylgruppe bei $\delta = 15.13$, deren Protonen mit $\delta = 1.35$ ihrerseits auf das C-Atom der Methingruppe bei $\delta = 70.5$ koppelten (siehe Abbildung 89 und Tabelle 13). Die so identifizierten Fragmente (I), (II) und (III) ergaben damit die Verbindung **40**. Da weder in Antibase noch in den Datenbanken Chemical Abstracts und Dictionary of Natural Products die Verbindung **40** gefunden wurde, scheint es sich um eine neue Verbindung zu handeln. **40** war schwach aktiv gegen *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* (siehe Tabelle 14).



40

Die isolierte Verbindung wurde als Mutabahamycin (**40**) bezeichnet und gehört zu der Familie der Anthrachinon-Antibiotika, welche sich aus dem Polyketidweg ableiten. Die Anthrachinon-Antibiotika mit vergleichbarer aliphatischer Seitenkette wie bei Mutabahamycin können nach Imamura *et al.*⁶⁷ aus analogen Angucyclinonen entstehen (siehe Abbildung 74). Demzufolge könnte Mutabahamycin aus dem Angucyclin Saquayamycin A (**39**) hervorgegangen sein (daher wurde der Name Mutabahamycin für **40** in Anlehnung an das arabische Wort für „Nachfolge“ gewählt). So würde durch Ringöffnung von Saquayamycin A nach Bindungsbruch zwischen den Kohlenstoffatomen C-1 und C-12b das Aglykon von Mutabahamycin (**40**) resultieren. Das hieran O-glycosidisch gebundene Disaccharid C-D (L-Rhodinose → L-Aculose) (siehe Abbildung 90) entspricht dabei dem von Saquayamycin A. Dagegen unterscheidet sich die Disaccharidkette A-B (D-Olivose → 2-Hydroxy-Cinerulose) im Zucker B. Der Zucker B entspricht bei Saquayamycin A (**39**) dem Zucker L-Aculose (siehe Abbildung 85). Möglicherweise ist dieser Unterschied jedoch auf eine Addition von Wasser an die Doppelbindung der L-Aculose von Saquayamycin A zurückzuführen (siehe Abbildung 90). In der Literatur war kein entsprechender Zucker wie der Zucker B aus **40** zu finden, mit Ausnahme des vergleichbaren Methylierungsprodukts der L-Aculose (Methyl-3,6-dideoxy-2-O-methyl- α -L-threo-hexopyranosid-4-ulose).⁷⁷

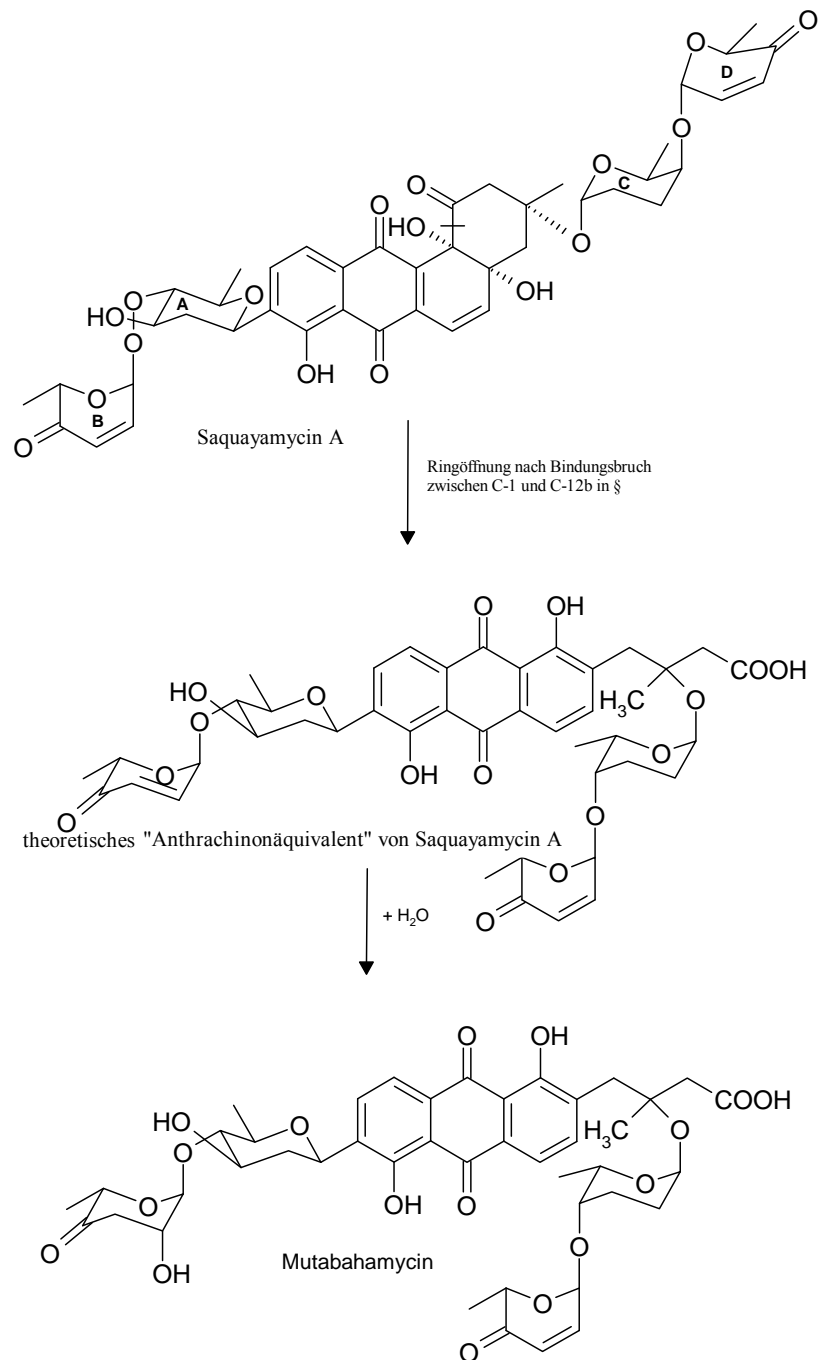


Abbildung 89: Mögliche Bildung von Mutabahamycin (40) aus Saquayamycin A (39).

Typische Desoxyzucker für die Gruppe der Angucycline und der sich von diesen ableitenden Anthrachinonantibiotika sind z.B. die Zucker D-Olivose (z.B. Saquayamycin A (39)), L-Aculose (z.B. in Saquayamycin A), L-Rhodinose (z.B. in Cytorhodin J (25)) oder L-Cinerulose (z.B. in Aclacinomycin A₁) (siehe Abbildung 90).

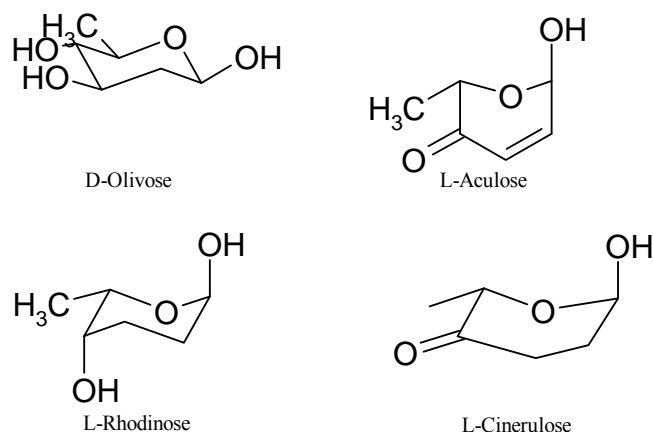


Abbildung 90: Das Vorkommen der Desoxyzucker wie z.B. D-Olivose, L-Aculose, L-Rhodinose und L-Cinerulose ist typisch für die Gruppe der Angucycline und der sich von diesen ableitenden Anthrachinonantibiotika⁶⁶.

6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on

Aus Fraktion 1 wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Schulz^{75, 76} im Rahmen einer Lipidphasenuntersuchung die Verbindung **41** erhalten. Dabei wurden sämtliche Massen- und NMR-Spektren in der Arbeitsgruppe Schulz gemessen und uns zur weiteren Strukturaufklärung vorgelegt. Nach EI-MS ergab sich eine Molmasse von 270 Dalton. Im ¹H-NMR-Spektrum waren zwei Signale im olefinischen Bereich auffällig. Außerdem lagen im für Zucker typischen Bereich von $\delta \approx 3.0 - 5.5$ neun Signale, wobei der Tieffeldlage zweier Signale zufolge von mindestens einem oder zwei acetalischen Protonen und damit im Falle eines Zuckers von mindestens ein oder zwei O-glycosidischen Bindungen auszugehen war. So sah man bei $\delta = 6.90$ ein Dublett vom Dublett mit einer Intensität von 1H, dessen zugehöriges Proton H,H-COSY-Kopplungen auf die Protonen bei $\delta = 6.10$ und 5.20 zeigte, welche jeweils als Dubletts mit einer Intensität von je 1H vorlagen. Der chemischen Verschiebung zufolge zeigten die Signale bei $\delta = 6.90$ und 6.10 wahrscheinlich olefinische Protonen an, während die chemische Verschiebung für das Proton bei $\delta = 5.20$ typisch für acetalische Protonen war, was durch Auswertung des HSQC-Spektrums bestätigt wurde, da dieses Proton an das Kohlenstoffatom mit der für acetalische C-Atome typischen chemischen Verschiebung von $\delta = 95$ gebunden war.

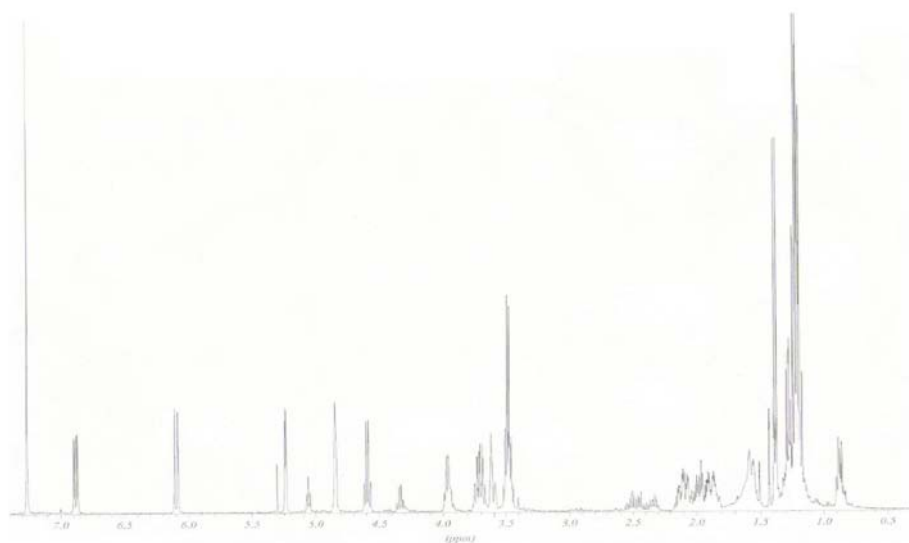


Abbildung 91: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von 6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on (**41**) in CDCl_3 .

Ferner ließen sich nach dem HSQC-Spektrum die olefinischen Protonen den Kohlenstoffatomen bei $\delta = 143$ und 127 zuordnen, was u.a. typisch für Doppelbindungen von α,β -ungesättigten Ketonen ist. Tatsächlich ließ sich im ^{13}C -NMR-Spektrum auch ein Signal für das C-Atom einer α,β -ungesättigten Ketogruppe bei $\delta = 197$ feststellen. Damit mußte das Strukturfragment $\text{O}=\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}(\text{OR})_2$ vorliegen. Das Proton bei $\delta = 4.84$ koppelte im H,H-COSY Spektrum auf die Protonen des Multipletts bei $\delta = 2.19-1.81$, welches eine Intensität von 2H aufwies und seinerseits Korrelationen zu dem Multiplett mit einer Intensität von 2H bei $\delta = 1.69-1.53$ zeigte. Nach dem HSQC-Spektrum war das Proton bei $\delta = 4.84$ mit dem Kohlenstoffatom bei $\delta = 97$ verknüpft, woraus ein weiteres acetalisches Strukturfragment $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OR})_2$ resultierte. Schließlich lagen im Bereich von $\delta = 4.60-3.95$ zwei Quartetts mit einer Intensität von je 1H , sowie ein Multiplett, ein Dublett von Quartett und ein Singulett mit einer Intensität von je 1H . Der chemischen Verschiebung zufolge mußten sich die Protonen der Quartetts in geminaler Position zu Sauerstoffatomen befinden, so daß zweimal das Strukturfragment $-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3$ vorlag. Das Proton des Dubletts eines Quartetts bei $\delta = 3.48$ bildete nach Auswertung des HSQC-Spektrums zusammen mit dem Proton des Multipletts bei $\delta = 3.71$ eine Methylengruppe, die der chemischen Verschiebung nach zu einem Sauerstoffatom benachbart war, so daß sich das Fragment $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ergab. Die Methylgruppen dieser

drei Strukturfragmente wurden im ^1H -NMR-Spektrum durch die Signale bei $\delta = 1.38, 1.24$ und 1.20 angezeigt.

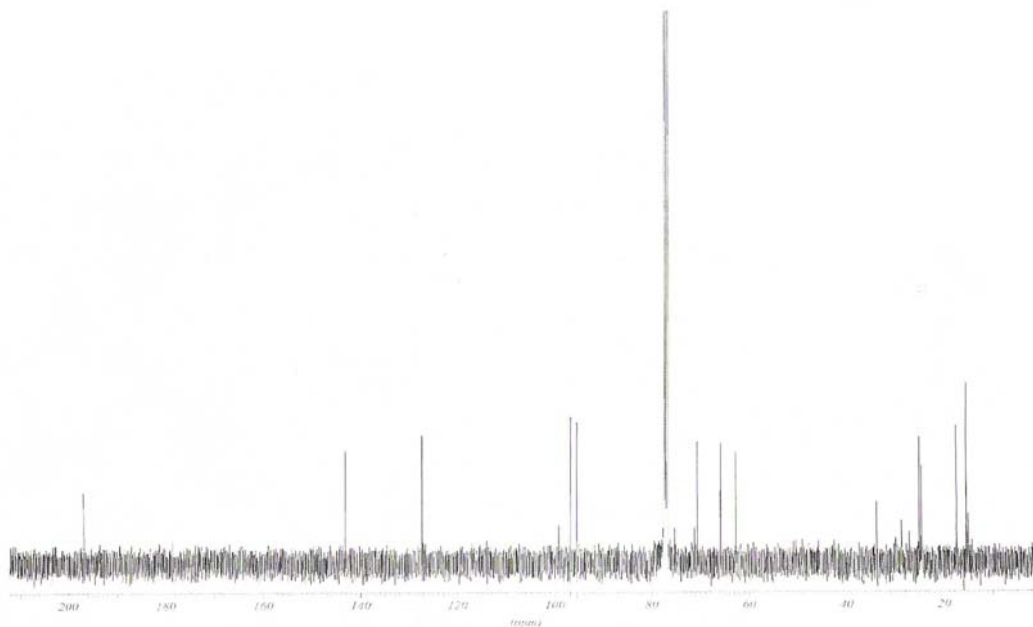


Abbildung 92: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) von 6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on (**41**) in CDCl_3 .

Eine Datenbankrecherche mit diesen NMR-Daten sowie der Molmasse der vorliegenden Verbindung führte zu keinem Eintrag. Daher wurde anhand der H,H -COSY, HSQC- und HMBC-Spektren die Gesamtstruktur aufgeklärt, was zu dem Disaccharid **41** führte. Mit Hilfe der HMBC-Korrelationen ließen sich die postulierten Strukturfragmente bestätigen und entsprechend zusammensetzen. Sämtliche HMBC- und H,H -COSY-Kopplungen, die zur Aufklärung des Disaccharids beitragen, sind in Abbildung 92 wiedergegeben.

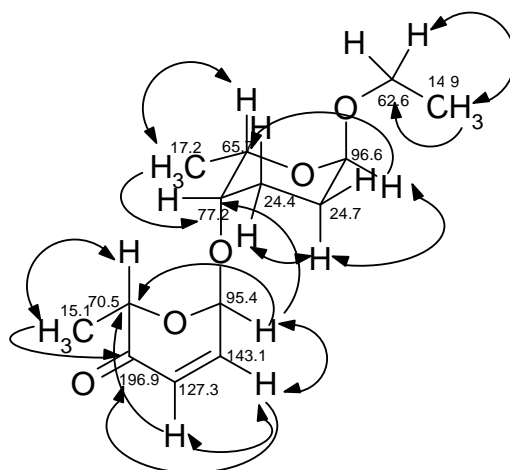
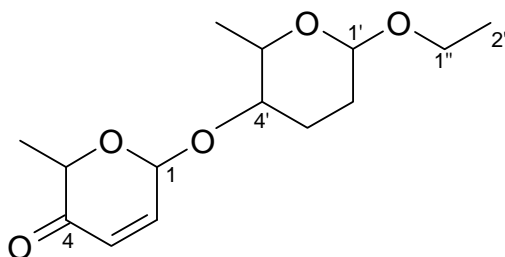


Abbildung 93: Ausgewählte HMBC- (→) und H,H-COSY-Kopplungen (↔) von **41**.

So bildete das α,β -ungesättigte Keton zusammen mit der $-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3$ -Gruppe einen Ketozucker, wie die Kopplungen der Protonen der Methylgruppe bei $\delta = 1.38$ auf das C-Atom der Ketogruppe bei $\delta = 197$ bewiesen. Das anomere Proton bei $\delta = 5.20$ koppelte im HMBC-Spektrum auf das Kohlenstoffatom der Methingruppe bei $\delta = 78$ und zeigte damit die Verknüpfungsstelle zu der zweiten Zuckereinheit an. Auf dieses Methinkohlenstoffatom waren HMBC-Kopplungen der Protonen der Methylgruppe sowie des Methinprotons des zweiten $-\text{O}-\text{CH}-\text{CH}_3$ Strukturfragments festzustellen. Da auf das Methinkohlenstoffatom dieses Fragments bei $\delta = 66$ das zweite anomere Proton eine HMBC-Kopplung zeigte, war auch die Struktur des zweiten Zuckers schnell aufgeklärt, da dieses zweite anomere Proton zu dem Fragment $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OR})_2-$ gehörte. Dieser zweite Zucker war schließlich O-glycosidisch mit der noch offenen Ethylgruppe verbunden, auf welche zwar keine Fernkopplungen zu erkennen waren, welches aber auch den chemischen Verschiebungen zufolge die einzige passende Möglichkeit war. Das Disaccharid (**41**) wurde weder in den Datenbanken Chemical Abstracts, Beilstein noch in AntiBase[®] oder dem Dictionary of Natural Products gefunden und gilt damit als neu. Anzumerken bleibt, daß das isolierte Disaccharid sich u.U. von der mit dem Aglykon von Vineomycin A₁ (**42**) (Zuckerringe D und E: L-Rhodinose→L-Aculose) oder von Mutabahamycin (**40**) O-glycosidisch verknüpften Disaccharideinheit (Zuckerringe C und D: L-Rhodinose→L-Aculose) ableiten könnte. Vineomycin A₁ wurde dabei aus dem Rohextrakt II des Stammes B 6278 isoliert. So könnte hierbei ein Zusammenhang darin bestehen, daß der Stamm B 6278 überschüssige Zucker in Form von Glycosiden speichert. Eine andere Möglichkeit wäre jedoch, daß während des Aufarbeitungsprozesses mit Chloroform durch Lichteinfluß Salzsäure entstanden ist, welche die Gly-

coside des Stammes B 6278 (also z.B. Vineomycin A₁) gespalten hat. Hiernach könnten die hydrolysierten Zucker mit Ethanol, welches ein Stabilisator für Chloroform ist, reagiert haben, was gegebenenfalls zu dem isolierten Disaccharid (**41**) geführt haben könnte. Die letzte Möglichkeit ist sehr wahrscheinlich, da Ethylether, Ethylester und Ethylglycoside in der Natur sehr selten sind. Interessant in diesem Zusammenhang ist jedoch, daß wie erwähnt neben der Verbindung Vineomycin C (**36**) auch das Angucyclin Vineomycin A₁ (**42**) isoliert worden ist. Dabei entsprechen die Zuckerringe D-E von **42**, wie oben geschildert, dem isolierten Disaccharid (**41**). Würde nun entsprechend der Studie von Imamura *et al.* (siehe Abbildung 74) aus Vineomycin A₁ nach Ringöffnung Vineomycin B₂ resultieren, dann ließe sich ausgehend von Vineomycin B₂ durch Abspaltung der entsprechenden Disaccharideinheit (Zuckerringe D-E) das Auftreten von Vineomycin C und dem isolierten Disaccharid 6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on (**41**) erklären, wodurch **41** nicht zwingend ein Artefakt wäre. Dennoch bleibt darauf zu verweisen, daß analog zu der Studie von Imamura *et al.* der direkte Vorläufer von Vineomycin C das Angucyclin A-7884 ist, welches ebenfalls aus dem Rohextrakt des Stammes B 6278 isoliert worden ist.


41

Bearbeitung des Rohextraktes (II) von Stamm B 6278

Der Stamm B 6278 wurde erneut unter vergleichbaren Bedingungen wie zuvor fermentiert und die resultierende Kulturbrühe sowie das Zellmaterial entsprechend extrahiert. Dabei erhielt man 2.3 g eines braungelben Rohextraktes. Dieser wurde ohne vorausgehende Extraktion mit Cyclohexan durch Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel in fünf Fraktionen getrennt. Ziel dieser zweiten Bearbeitung war die erneute Isolierung von Mutabahamycin (**40**) für weitere biologische und pharmakologische Untersuchungen. Nach DC-Kontrolle mit der aus Extrakt (I) isolierten

Reinsubstanz Mutabahamycin als Vergleich schien keine der vier Hauptfraktionen die gesuchte Verbindung zu enthalten. Da sich die Zonen auf dem Dünnschichtchromatogramm jedoch z.T. überschneiden, wurden die Fraktionen 2, 3 und 5 durch HPLC-MS analysiert. Aber auch hier konnte keine entsprechende Masse ($m/z = 838$) gefunden werden. Dennoch wurden die Fraktionen 2 und 3 weiterbearbeitet, da hauptsächlich diese Fraktionen bei Tageslicht bei DC orange und gelbe Zonen aufwiesen. Die Fraktion 2 lieferte nach Reinigung über Sephadex erneut Rabelomycin (**38**) sowie Fridamycin D (**37**).

Vineomycin A₁

Aus Fraktion 3 erhielt man eine dunkelorange Verbindung, deren Molmasse durch ESI-MS zu 935 Dalton bestimmt wurde. Da die Verbindung mit Natronlauge eine rote Farbreaktion zeigte und aus dem Rohextrakt der ersten Fermentation des Stammes B 6278 bereits verschiedene Anthrachinon- bzw. Angucyclinderivate isoliert worden sind, wurde auch hier ein Anthrachinon oder Angucyclin mit mindestens einer *peri*-Hydroxygruppe vermutet. So zeigte das ¹H-NMR-Spektrum auch ein entsprechendes Singulett der Intensität von 1H bei $\delta = 12.26$ (siehe Abbildung 95). Ferner konnten im aromatisch-olefinischen Bereich bei $\delta = 7.85$ und 7.57 zwei Dubletts der Intensität von je 1H mit identischen Kopplungskonstanten festgestellt werden, wonach von *ortho*-ständigen Protonen auszugehen war. Es folgten vier Dubletts bei $\delta = 6.87$, 6.41 , 6.08 und 6.02 mit der Intensität von je 1H sowie ein Multiplett bei $\delta = 6.85$ mit der Intensität von 2H. Der Tieffeldlage zufolge mußte es sich dabei um olefinische Protonen handeln, womit insgesamt drei olefinische Doppelbindungen zu erwarten waren. Die drei Signale mit den Intensitäten von 1, 2 und 1H bei $\delta = 5.24$, 5.23 und 4.96 deuteten auf vier acetalische Protonen hin. Der aliphatische Bereich von $\delta = 4.83$ - 1.64 ließ vierzehn Signale mit einer Gesamtintensität von 24H erkennen. Die Signale bei $\delta = 1.36$, 1.33 und 1.26 - 1.22 mit den Intensitäten von 3H, 6H und 9H ließen auf sechs Methylgruppen schließen. Nach einer Substrukturrecherche in AntiBase[®] erhielt man die Verbindung Vineomycin A₁ (**42**) als mögliche Strukturvorschlag. Mit Hilfe des ¹³C-NMR-Spektrums sollten daher nähere Strukturinformationen erhalten werden.

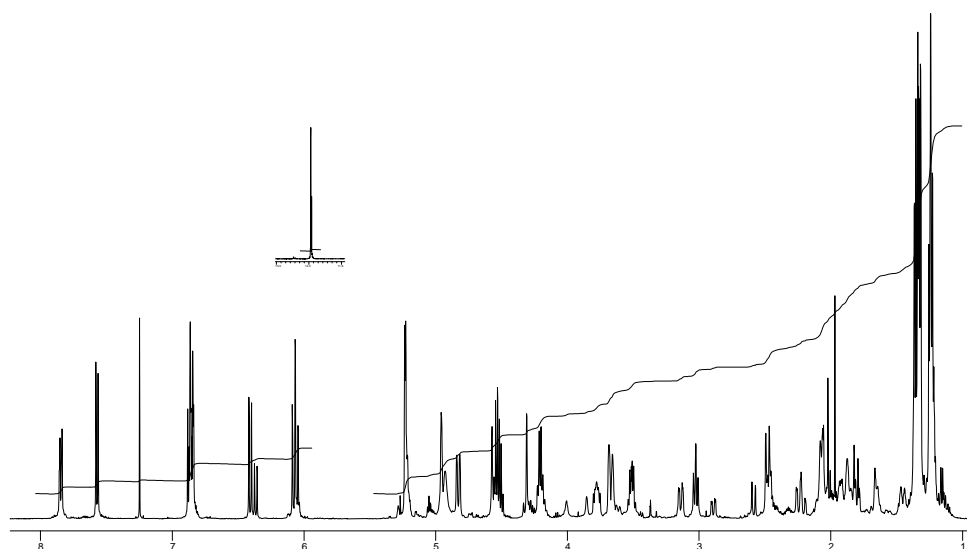


Abbildung 94: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Vineomycin A₁ (**42**) in CDCl_3 .

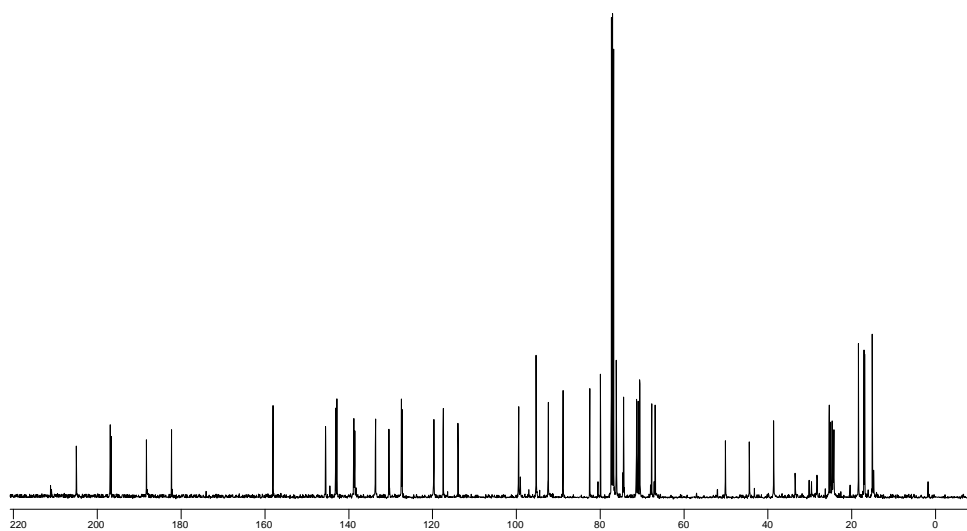
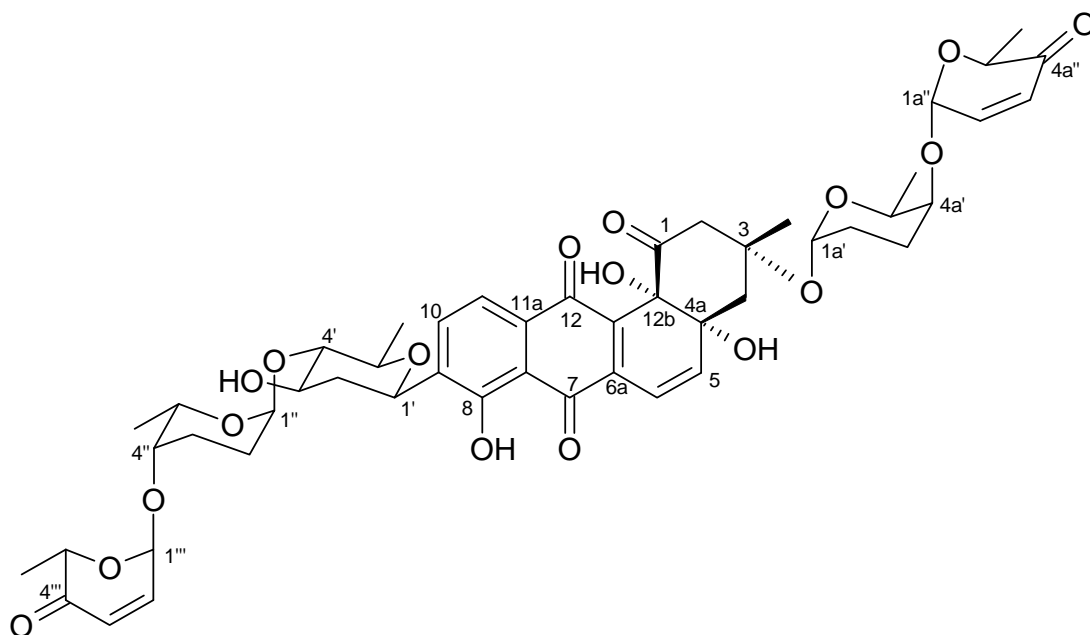


Abbildung 95: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Vineomycin A₁ (**42**) in CDCl_3 .

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 95) fielen bei tiefem Feld fünf Signale bei $\delta = 204.8$, 196.8 , 196.5 , 188.1 und 182.1 auf. Dabei war die chemische Verschiebung des ersten Signals charakteristisch für eine Ketocarboxylfunktion, während die Signale bei $\delta = 196.8$ und 196.5 typisch für α,β -ungesättigte Ketogruppen waren. Die Signale bei $\delta = 188.1$ und 182.1 wurden auf chinoide Carbonylkohlenstoffatome zu-

rückgeführt. Im Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome lagen vierzehn Signale. Da jedoch vier dieser Signale zu den olefinischen Kohlenstoffatomen der beiden α,β -ungesättigten Ketogruppen gehörten und dem 1H -NMR-Spektrum zufolge zwei weitere Signale olefinischen C-Atomen zuzuordnen waren, verblieben nur noch acht Signale für aromatische Kohlenstoffatome. Hiermit konnte das anfangs vermutete Anthrachinongrundgerüst ausgeschlossen werden und so wurde ein Angucyclin für die Verbindung **42** angenommen. Die nach dem 1H -NMR-Spektrum vermuteten acetalischen Protonen wurden im ^{13}C -NMR-Spektrum durch die Signale bei $\delta = 99.4, 95.2$ und 92.3 bestätigt, wobei das Signal bei $\delta = 95.2$ seiner Intensität nach zwei C-Atomen entsprechen mußte. Schließlich wurden im Bereich von $\delta = 88.8-66.8$ dreizehn Signale identifiziert, die sehr wahrscheinlich Methingruppen mit Sauerstoffverknüpfung anzeigten. Das $^{13}C/APT$ -NMR-Spektrum zeigte zuletzt sieben Methylengruppen und wie nach Auswertung des 1H -NMR-Spektrums erwartet, sechs Methylgruppen an. Mit diesen Angaben wurde in der Datenbank AntiBase[®] eine Substruktursuche durchgeführt. Dabei konnte nur das Angucyclin Vineomycin A₁ (**42**) mit entsprechender Masse gefunden werden. Ein Vergleich der ^{13}C -Daten ergab eine weitgehende Übereinstimmung⁷⁷. Außerdem wurde die komplexe Struktur der Verbindung **42** zusätzlich durch 2D-NMR-Experimente überprüft. Wie erwartet bestätigten die Korrelationen im H,H-COSY-Spektrum, HSQC-Spektrum und HMBC-Spektrum die Übereinstimmung mit der Struktur von Vineomycin A₁ (**42**).

Vineomycin A₁ wurde erstmals 1977 unter der Bezeichnung OS-4742 A₁ von Satoshi Omura *et al.*⁷⁸ aus *Streptomyces matensis* subsp. *vineus* isoliert; es gehört zu der Gruppe der Angucyclinantibiotika vom Aquayamycin-Typ. Die Substanz hemmt das Wachstum grampositiver Bakterien und ist wirksam gegen Sacroma 180 (fester Tumor der Maus)⁷⁸. Zudem wurde die Hemmung des Enzyms Prolylhydroxylase festgestellt⁷⁹. Die Prolylhydroxylase ist das Schlüsselenzym bei der Kollagensynthese. Ihre Aktivität ist bei verschiedenen Fibrosearten erhöht, wodurch Vineomycin A₁ (**42**) interessant für die Behandlung von fibrotischen Erkrankungen sein könnte. Für Vineomycin A₁ (**42**) werden u.a. die Bezeichnungen OS-4742 A₁⁷⁸ und P-1894B verwendet⁷⁹. Die isolierte Verbindung **42** zeigte im Agardiffusionstest mittelstarke Aktivitäten gegen *Staphylococcus aureus* sowie schwache Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* und *Mucor miehei* (Tü 284) (siehe Tabelle 14).



42

Tabelle 14: Bioaktivitäten der aus *Streptomyces* sp. Stamm B 6278 isolierten Anthrachinon- bzw. Angucyclinantibiotika.

Isolierte Substanz	Hemmhof Ø [mm] / Testkeime			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)
A-7884 (35)	19	23	24	0
Fridamycin D (37)	15	15	0	0
Rabelomycin (38)	14	11	11	11
Vineomycin C (36)	12	15	16	0
Mutabahamycin (40)	11	11	11	0
Vineomycin A ₁ (42)	14	11	11	11

Bakterienstämme aus der Nordsee

Stamm Hel 38

Der Stamm Hel 38 fiel im Primärscreening durch starke Aktivitäten gegen *Mucor miehei* (Tü 284) und *Chlorella vulgaris* auf (sämtliche Ergebnisse der Bioaktivitätstests siehe Tabelle 28). Darüber hinaus konnten im Zytotoxizitätstest gegen *Leishmania donovani* sehr hohe Aktivitäten und im Zytotoxizitätstest mit RAW-Makrophagen (Maus-Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7) mittlere Aktivitäten festgestellt werden. Im chemischen Screening waren gelbe und orange Zonen bei Tageslicht auf dem Dünnschichtchromatogramm auffällig. Schließlich wurde der Stamm Hel 38 von der Arbeitsgruppe von Siegmund Lang⁸⁰ im Maßstab einer 40 l-Fermenterkultur angezüchtet und das Kulturmedium und der Zellrückstand separat mit Ethylacetat extrahiert. Hiernach lagen ein Zellextrakt von 10.4 g und ein Zellüberstandsextrakt von 10.6 g vor. Da allein der Ethylacetatextrakt des Zellrückstandes noch mittlere Aktivitäten gegen *Mucor miehei* (Tü 284) und *Chlorella vulgaris* aufwies und der Extrakt des Überstandes nur am Startfleck eine orange Zone zeigte, wurde der Zellextrakt für eine Weiterbearbeitung ausgewählt. So wurde der Zellextrakt durch Vakuum-Säulenchromatographie in fünf Fraktionen getrennt. Da keine der Fraktionen eine Aktivität im Agardiffusionstest zeigte, wurden die Fraktionen nach chemisch geführter Kontrolle weiter analysiert. Die Weiterbearbeitung erfolgte trotz fehlender Bioaktivitäten, da das allgemeine Metabolitenspektrum der Nordseestämme aus chemotaxonomischer Hinsicht von Interesse war.

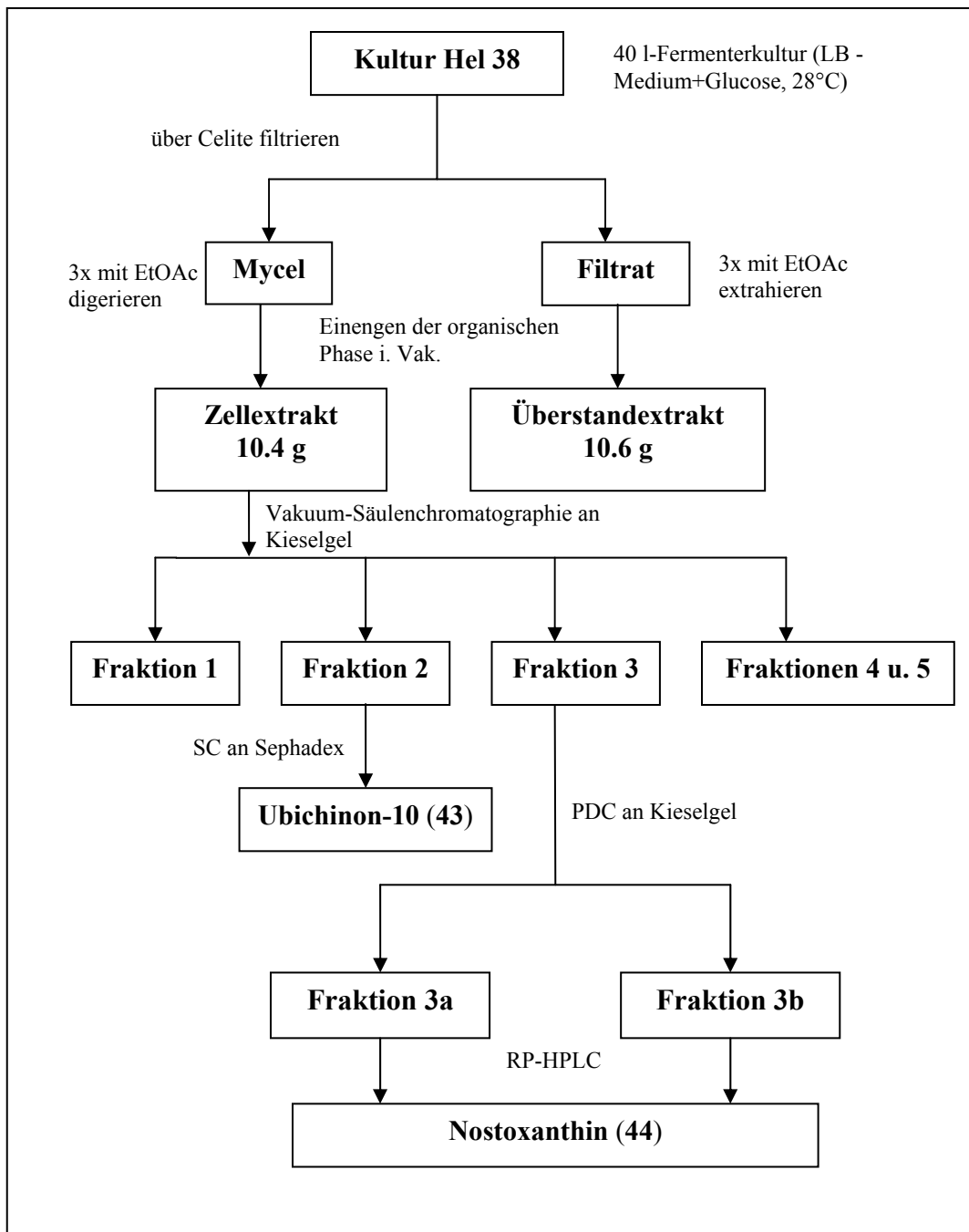


Abbildung 96: Aufarbeitungsschema für die 50 l-Fermenterkultur von *Spingomonas* sp. Hel 38; (SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie; RP = reversed phase.)

Ubichinon-10

Fraktion 2 enthielt eine unpolare, orange Verbindung, die durch Chromatographie an Sephadex in reiner Form erhalten wurde. Aufgrund des ESI-Massenspektrums (+ Modus) konnte die Molmasse zu 863 bestimmt werden. Jedoch zeigte das EI-Massenspektrum einen Molekülpeak bei 864.9. Diese Masse konnte auch im negativen Modus des ESI-MS ermittelt werden. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (siehe Abbildung 98) zeigte bei $\delta = 5.09$ ein Multiplett mit großer Intensität, welches u.a. charakteristisch für Alkensäure mit isolierten Doppelbindungen ist. Die beiden Singulets bei $\delta = 3.95$ und 3.96 wiesen den charakteristischen chemischen Verschiebungen zufolge auf zwei aromatisch gebundene Methoxygruppen hin. Das Multiplett bei $\delta = 2.08$ - 1.99 deutete Methylengruppen an und die Signale von $\delta = 1.71$ bis 1.57 zeigten typischerweise Methylgruppen an.

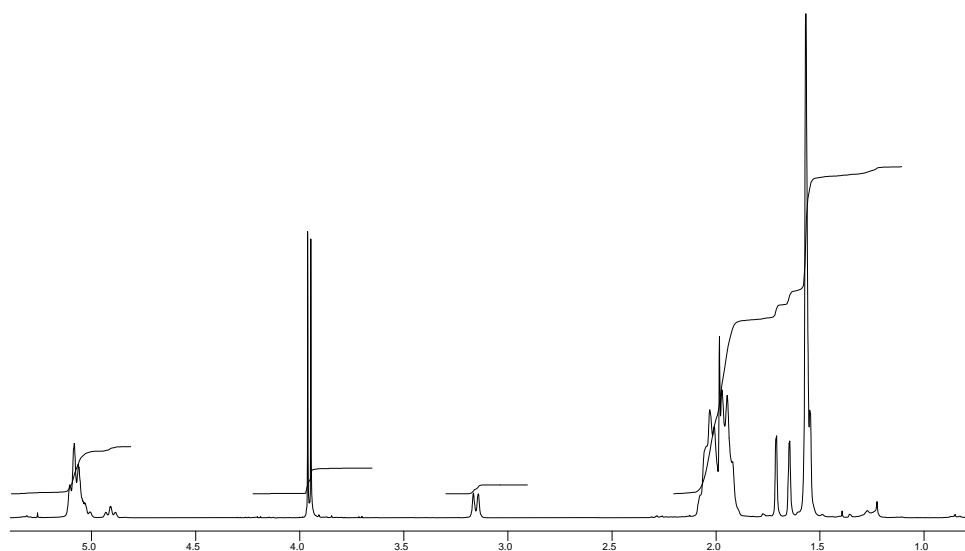


Abbildung 97: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (300 MHz) von Ubichinon-10 (**43**) in CDCl_3 .

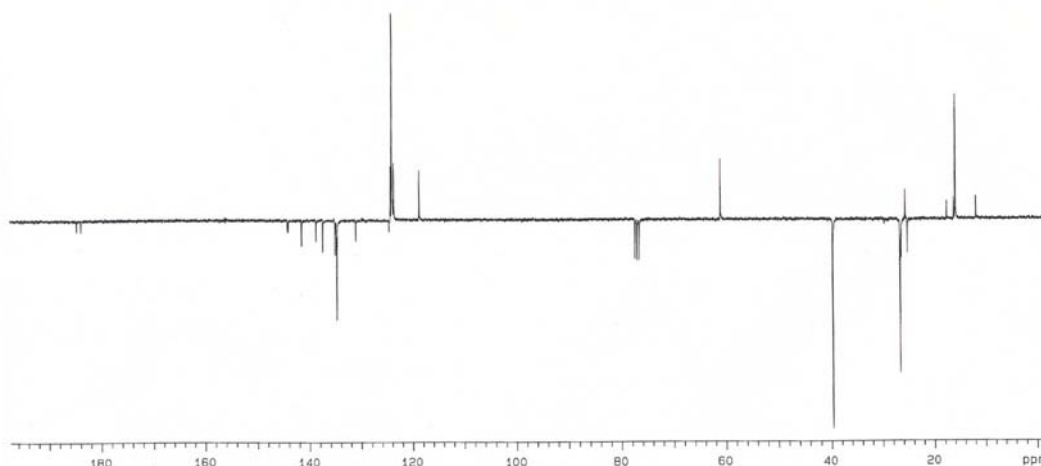


Abbildung 98: ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (75 MHz) von Ubichinon-10 (**43**) in CDCl_3 .

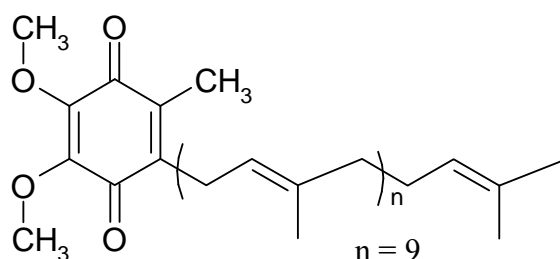
Das ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 99) bestätigte diese Annahmen und ließ zudem zwei Signale bei $\delta = 184.7$ und 183.8 für Ketocarbonylgruppen erkennen. Außerdem wies der Bereich von $\delta = 144.3$ bis 131.1 Signale für quartäre Kohlenstoffatome auf. Eine Substrukturrecherche in AntiBase[®] führte zu den Verbindungen Ubichinon-10 (**43**) und Dihydrubichinon-10. Die für die isolierte Substanz erhaltenen Massenspektren zeigten wie anfangs geschildert, die Massen für beide Verbindungen an. Im Falle von Dihydrubichinon-10 wäre jedoch ein NMR-Signal für eine aliphatische Methingruppe für C-39' zu erwarten. Dieses fehlte aber sowohl im ^{13}C /APT-NMR-Spektrum als auch im ^1H -NMR-Spektrum. Stattdessen zeigte das Signal im ^{13}C /APT-Spektrum bei $\delta = 131.1$ ein quartäres C-Atom an. Damit mußte es sich um Ubichinon-10 (**43**) handeln. Die Signale der Massenspektren, die auf eine Masse von 865 schließen ließen, konnten möglicherweise auf Verunreinigungen mit Dihydrubichinon-10 zurückzuführen sein. Häufig wird allerdings auch beobachtet, daß Chinone im Massenspektrometer zu ihren Hydrochinonen reduziert werden.

Da für Ubichinon-10 (**43**) in der Literatur keine ^{13}C -NMR Daten gefunden worden sind, wurden diejenigen des homologen Ubichinon-7 für einen ^{13}C -NMR-Datenvergleich verwendet⁸¹. Dabei stimmten alle Werte der sich entsprechenden Kohlenstoffatome zufriedenstellend überein.

Die Bezeichnung der Ubichinone geht auf ihre ubiquitäre Verbreitung in biologischen Systemen zurück. Hier fungieren sie als Elektronenüberträger in der Atmungs-

kette. Ubichinone sind Chinonderivate mit einer isoprenoiden Seitenkette. Sie werden entsprechend der Anzahl dieser Isopreneinheiten bezeichnet. Gleichsam ist diese Anzahl speziesabhängig. So weist die in Säugern häufigste Form zehn Isopreneinheiten auf, was dem Ubichinon-10 (= Coenzym Q) entspricht. Erwähnenswert ist ferner, daß das Auftreten von Ubichinon-10 ein Merkmal für fast alle Proteobakterien der α -Unterklasse ist. So zeigten chemotaxonomische Untersuchungen von Wagner-Döbler *et al.*⁸², daß die Helgolandstämme Hel 10^T und Hel 26 zu einer Untergruppe der α -Unterklasse der Proteobakterien gehören. Bei beiden Stämmen herrschte Ubichinon-10 von sämtlichen Chinonen der Atmungskette vor. Auch der hier untersuchte Stamm Hel 38 gehört zu dieser α -Unterklasse bzw. genauer zu der Gattung *Shingomonas*, wie die 16S-rDNA Analyse ergab⁸³. Für die Gattung *Shingomonas* sp. gilt Ubichinon-10 als vorherrschender Elektronenüberträger in der Atmungskette.

Ubichinon-10 (**43**) wurde 1957 erstmals von Crane *et al.*⁸⁴ aus den Mitochondrien von Rinderherzen isoliert. Die Struktur wurde ein Jahr später von Morton *et al.*⁸⁵ aufgeklärt. **43** findet nicht nur als Nahrungsergänzungsmittel Anwendung, sondern spielt auch eine Rolle bei der unterstützenden Behandlung von Herzkrankheiten⁸⁶.



43

Nostoxanthin

Die Fraktion 3 war intensiv orange gefärbt und wurde durch präparative Dickschichtchromatographie in die zwei Unterfraktionen 3a und 3b getrennt. Diese wiesen nach DC-Kontrolle, neben verschiedenen UV-aktiven, farblosen Substanzen jeweils eine schleifende, unpolare orange Zone mit ähnlichen R_f -Werten auf, die sich mit konzentrierter Schwefelsäure schwarz verfärbten, was ein Hinweis auf Polyene

war. Nach anschließender Reinigung dieser Unterfraktionen durch RP-HPLC erhielt man aus jeder Unterfraktion eine orange Verbindung mit ähnlichen R_f -Werten, aber leicht unterschiedlichen Retentionszeiten. Beide Verbindungen waren jedoch nach Vergleich der Molmassen sowie der ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren identisch. Dabei konnte anhand des ESI-Massenspektrums eine Molmasse von 600 Dalton ermittelt werden. Im ^1H -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 100) waren im aromatischen Bereich bei $\delta = 6.73$ und 6.67 zwei Multipletts zu erkennen. Diesen folgten fünf Dubletts bei $\delta = 6.41, 6.35, 6.24, 6.16$ und 6.10 mit den Intensitäten von jeweils 2H. Da sämtliche Kopplungskonstanten in dem Bereich zwischen 11 und 16 Hz lagen, handelte es sich sehr wahrscheinlich um ein System von konjugierten Doppelbindungen. Auf ein Polyen wies zusätzlich der anfangs erwähnte Test mit konzentrierter Schwefelsäure hin. Die Kopplungskonstanten der Dubletts lagen bei $\delta = 6.41, 6.16$ und 6.10 bei 15.1 bzw. 15.9 Hz, was deutlich auf *trans*-ständige Doppelbindungen hinwies. Die Kopplungskonstanten der Dubletts bei $\delta = 6.35$ und 6.24 lagen dagegen bei 11.4 Hz, was auf eine *cis*-ständige Doppelbindung hindeutete. Schließlich waren bei $\delta = 4.57$ und 4.51 zwei Singulets, bei $\delta = 2.34$ - 2.27 ein Dublett von Dublett und bei $\delta = 2.04$ - 1.96 ein Multiplett zu sehen, wobei die Protonen der beiden Singulets aufgrund der charakteristischen chemischen Verschiebung vermutlich zu Sauerstoffatomen benachbart waren. Es verblieben fünf Singulets zwischen $\delta = 1.99$ - 1.05 , bei denen es sich der Signalintensitäten sowie der chemischen Verschiebungen zufolge, um Signale für Methylgruppen handelte, die an quartäre Kohlenstoffatome gebunden waren. Da die Verbindung besonders im aliphatischen Bereich Signale aufwies, die aufgrund ihrer Intensitäten nicht zu der gesuchten Verbindung gehören konnten, wurden zur eindeutigen Signalzuordnung neben einem ^{13}C -NMR-Spektrum auch ein HSQC- und HMBC-Spektrum aufgenommen.

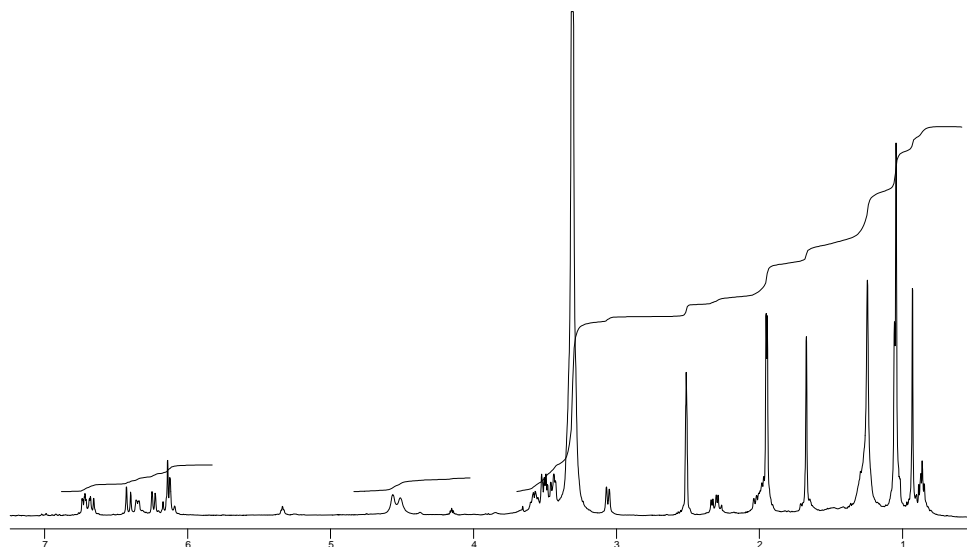


Abbildung 99: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Nostoxanthin (**44**) in DMSO.

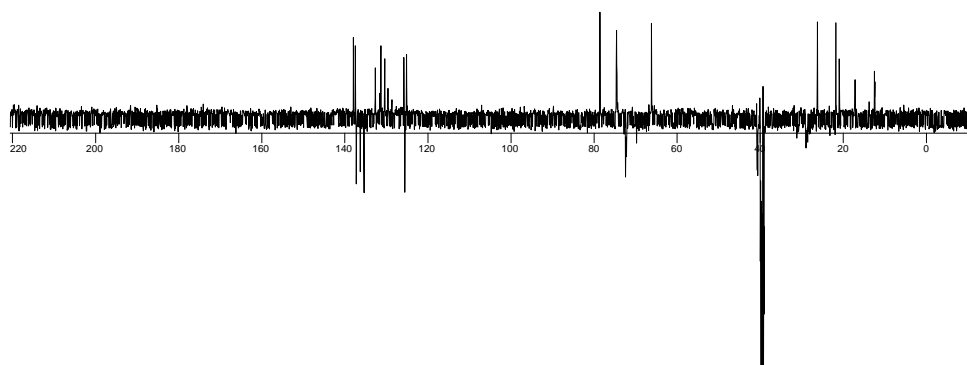
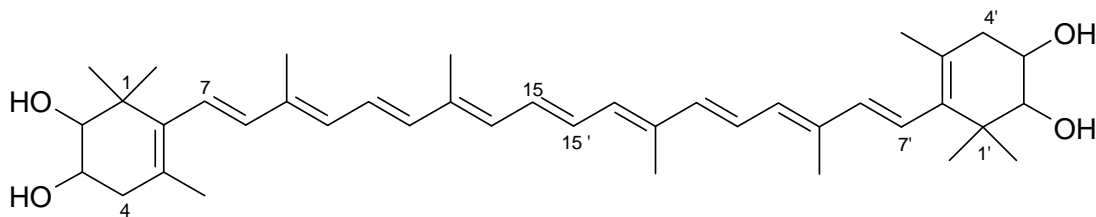


Abbildung 100: ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (150 MHz) von Nostoxanthin (**44**) in DMSO.

Das ^{13}C /APT-NMR-Spektrum zeigte im olefinischen Bereich vier Signale für quartäre Kohlenstoffatome und sieben Signale für Kohlenstoffatome von Methingruppen. Ferner wies der aliphatische Bereich bei tiefem Feld zwei Signale für Methingruppen und bei hohem Feld zwei Signale für eine Methylengruppe und ein quartäres C-Atom sowie fünf Signale für die Kohlenstoffatome von Methylgruppen auf. Nach diesen Informationen war von einer Molmasse von mindestens 266 auszugehen. Sind die Methingruppen bei tiefem Feld bei $\delta = 78.5$ und 66.1 jeweils einem Sauerstoffatom benachbart, worauf auch die Singulets bei $\delta = 4.57$ und 4.51

im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum einen Hinweis lieferten, dann wäre eine Molmasse von mindestens 298 anzunehmen. Entsprechen ferner die beiden Sauerstoffatome zwei Hydroxygruppen, dann läge eine Molmasse von 300 vor, was genau der Hälfte der gemessenen Molmasse entsprach. Damit handelte es sich sehr wahrscheinlich um ein symmetrisches Molekül. Eine Substruktursuche in AntiBase[®] führte zu dem Carotinoid Nostoxanthin (44).

Carotinoide sind essentiell für alle photosynthetischen Organismen. Sie bilden eine Gruppe von Pigmenten, die nicht nur in photosynthetischen, sondern auch in nicht-photosynthetischen Prokaryonten und Eukaryonten vorkommen. Bei photosynthetischen Organismen, sind sie proteingebunden am Prozeß der photosynthetischen Lichtabsorption beteiligt. Daneben bieten sie sowohl den phototrophen als auch den nicht-phototrophen Bakterien, einen Schutz vor photooxidativem Schaden^{87, 88}. Da Hel 38 zu der chemoheterotrophen Gattung *Shingomonas* sp. gehört, funktioniert hier Nostoxanthin als photooxidativer Schutz.



44

Stamm Fpep1 (Pic95)

Der Nordseestamm Fpep1 (Pic95), der dem Cytophaga/Flexibacterium-Cluster zugehörig ist, fiel im pharmakologischen Screening durch eine sehr hohe Aktivität gegen *Leishmania donovani* sowie durch eine hohe Aktivität im Zytotoxizitätstest mit RAW-Makrophagen auf. Hierbei wurde ein Ethylacetatextrakt des Stammes nach Kultivierung auf Cytophaga-Medium verwendet. Da das Wachstum auf dem Cyto-medium nicht zufriedenstellend war, wurden verschiedene Kulturmedien getestet.

Dabei wurden bei Verwendung von Fischmehl oder Luria-Bertani-Medium (LB50%-Medium) mit 50% Seewasser mit 80 mg/l bzw. 33.6 mg/l Rohextrakt die höchsten Ausbeuten erzielt. Auch im biologischen Screening waren diese beiden Extrakte am auffälligsten. So zeigte der nach Kultivierung auf Fischmehlmedium erhaltene Rohextrakt schwache bis mittlere Aktivitäten gegen *Mucor miehei* (Tü 284), *Chlorella sorokiniana* und *Chlorella vulgaris*. Der Rohextrakt der LB50%-Medium-(+ Glucose)-Kultur war dagegen schwach aktiv gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* sowie *Chlorella sorokiniana* und wies gegen *Chlorella vulgaris* eine sehr hohe Aktivität auf (siehe Tabelle 29). Schließlich wurde der Stamm Fpep1 insgesamt jeweils im Umfang einer 24 l-Schüttelkultur unter a: Verwendung des Fischmehlmediums (= Rohextrakt (I)) und b: unter Verwendung des LB50% (+ Glucose)-Mediums (= Rohextrakt (II)) kultiviert. Die Dünnschichtchromatogramme dieser beiden Rohextrakte unterschieden sich nicht auffällig von dem des Cytophaga-Medium-Extraktes. Die biologischen Aktivitäten im Agardiffusionstest waren reproduzierbar.

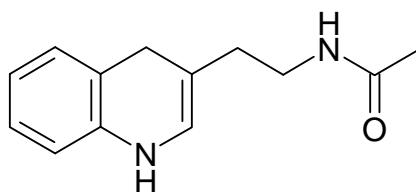
Aufarbeitung des Rohextraktes (I)

Den Rohextrakt (I) (1,6 g) aus der Kultivierung mit dem Kulturmedium „Fischmehl“ des Stammes Fpep1 (Pic95) erhielt man nach Extraktion von Zellmasse und Kulturmedium mit Ethylacetat. Anschließende Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel ergab vier Fraktionen. Hiervon wurde allein die Fraktion 3 durch Säulenchromatographie an Sephadex in weitere Unterfraktionen getrennt. Die Menge der Fraktion 2 war für eine Weiterbearbeitung nicht ausreichend hoch und die Fraktionen 1 bzw. 4 bestanden nach Bewertung des Dünnschichtchromatogramms im Wesentlichen aus Lipiden, bzw. stark polaren Verbindungen (Medienkomponenten).

N^β-Acetyltryptamin

Die Fraktion 3 enthielt eine farblose Verbindung, die sich nach DC mit dem Anisaldehyd-Sprühreagenz erst intensiv rot, dann nach einigen Minuten blauviolett verfärbte. Durch das ESI-Massenspektrum konnte die Masse zu 202 Dalton bestimmt werden. Nach Auswertung des ¹H-NMR-Spektrums wurde mit den entsprechenden in der Datenbank AntiBase[®] eine Substruktursuche durchgeführt, wobei allein N^β-Acetyltryptamin (**45**) als Verbindung in Frage kam. Auch die Werte des ¹³C-NMR-Spektrums standen mit dieser Vermutung im Einvernehmen. Ein Vergleich dieser

^{13}C -NMR-Werte mit denen von M. Schiebel⁷¹ veröffentlichten Daten für N^β -Acetyltryptamin (**45**) bestätigte schließlich die Struktur.

**45**

Aufarbeitung des Rohextraktes (II)

Der Rohextrakt (II) aus der Kultivierung des Stammes Fpep1 (Pic95) mit dem Medium LB50% (+ Glucose) wurde durch Extraktion des Zellrückstandes mit Ethylacetat und Aceton sowie Extraktion der Kulturbrühe mit Ethylacetat erhalten (siehe Abbildung 102). Durch Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel wurde die vereinigten Extrakte in sechs Fraktionen getrennt und durch präparative Dickschichtchromatographie sowie Säulenchromatographie an Sephadex weiter gereinigt.

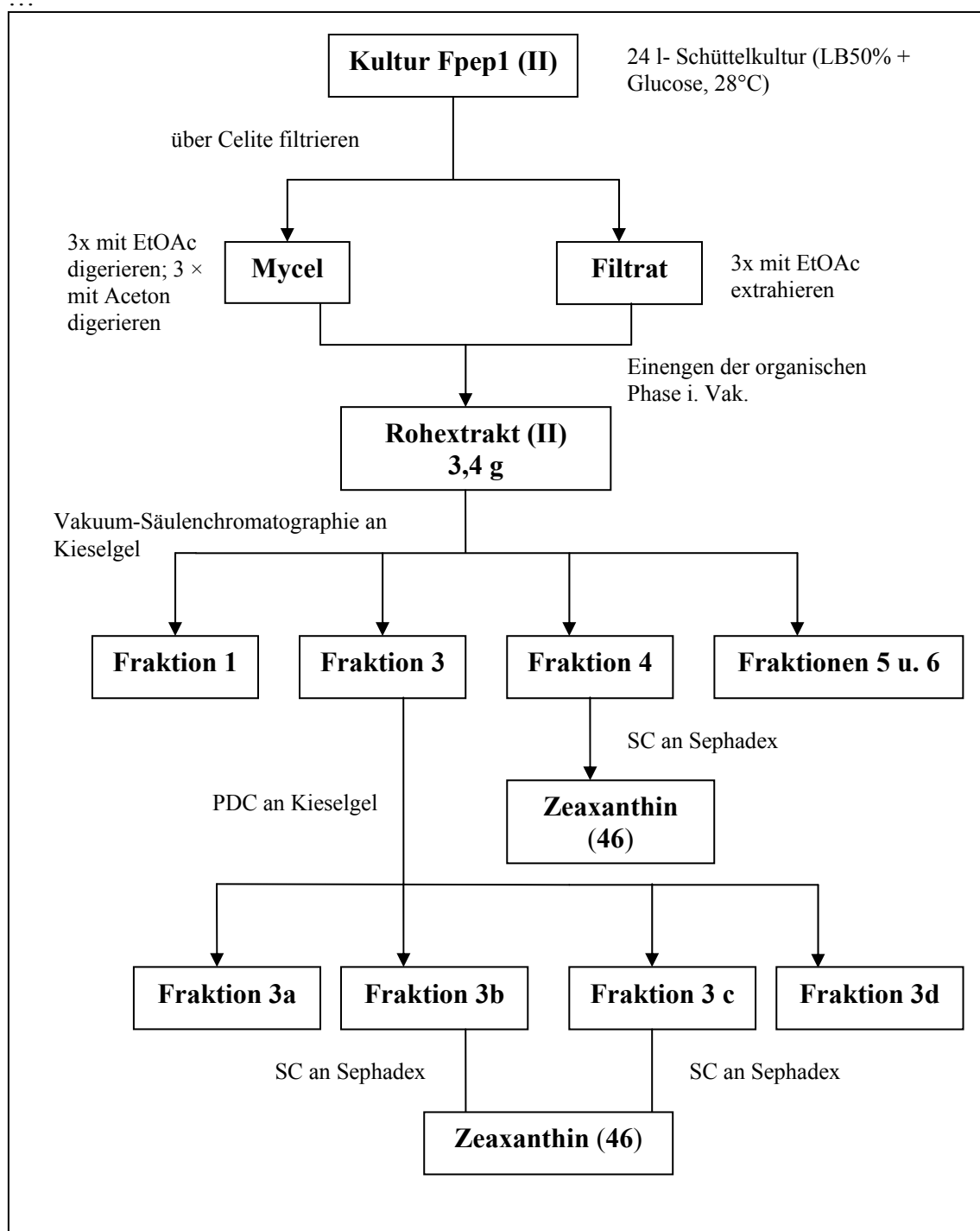


Abbildung 101: Aufarbeitungsschema für die 24 l-Schüttelkultur des *Cytophaga/Flexibacterium*-Cluster von Stamm Fpep1 (Pic95); (SC = Säulenchromatographie; PDC = Präparative Dickschichtchromatographie.)

Zeaxanthin

Die Fraktionen 3 und 4 lieferten nach Reinigung durch PDC (präparative Dickschichtchromatographie) und Sephadex-Säulenchromatographie eine gelborange Verbindung als Reinsubstanz. Aus dem EI-Massenspektrum konnte eine Molmasse von 568 Dalton ermittelt werden. Im ^1H -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 103) waren im Bereich aromatisch-olefinischer Protonen bei $\delta = 6.66$ - 6.60 , 6.24 und 6.16 - 6.07 drei Multipletts mit einer Intensität von 4H , 2H und 6H sowie ein Dublett bei $\delta = 6.35$ mit der Intensität von 2H zu sehen.

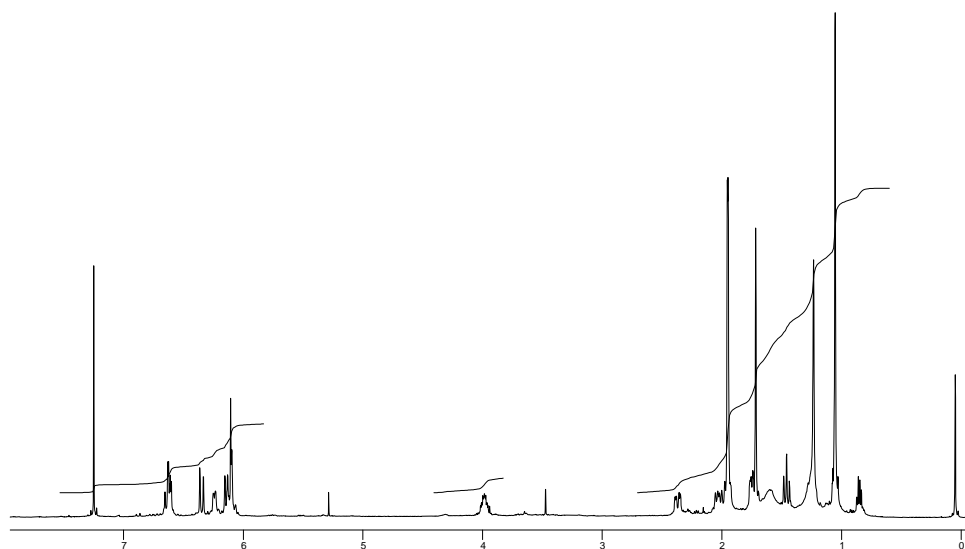


Abbildung 102: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Zeaxanthin (**46**) in CDCl_3 .

Bei $\delta = 3.99$ lag ein Multiplett der Intensität von 2H , was der chemischen Verschiebung zufolge auf ein benachbartes Sauerstoffatom hinwies. Ein Dublett vom Dublett der Intensität von 2H lag bei $\delta = 2.37$. Ferner waren bei $\delta = 2.06$ - 1.98 , 1.77 - 1.73 und zwei Multipletts und bei $\delta = 1.46$ ein Triplet mit jeweils einer Intensität von 2H zu sehen. Die drei Singulets mit den Intensitäten von 12H , 6H und wieder 12H bei $\delta = 1.95$, 1.72 und 1.06 wurden Methylgruppen zugeordnet.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 104) wies im Bereich sp^2 -hybridisierter Kohlenstoffatome elf Signale auf.

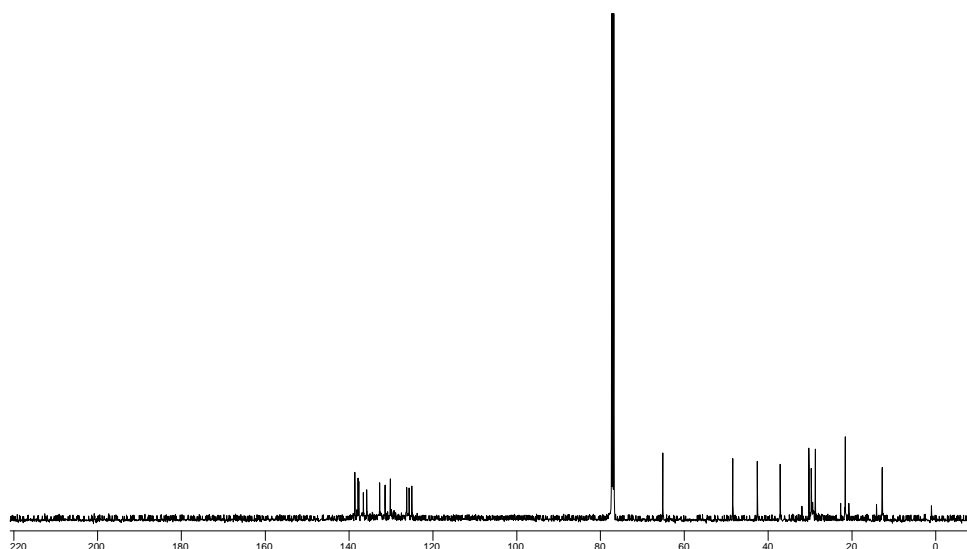
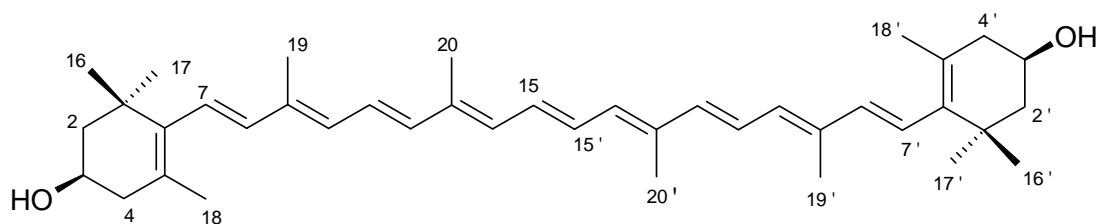


Abbildung 103: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Zeaxanthin (**46**) in CDCl_3 .

Bei $\delta = 65.1$ lag ein hochfeldverschobenes Signal für ein Kohlenstoffatom mit Sauerstoffbindung, welches bereits nach dem ^1H -NMR-Spektrum vermutet worden war. Im Bereich von $\delta = 48.4 - 37.1$ waren drei Signale zu erkennen, welche nach HSQC-Auswertung quartären Kohlenstoffatomen entsprachen. Schließlich konnten die vier Signale zwischen 30.3 und 12.75 dem ^{13}C /APT-NMR-Spektrum zufolge Methylgruppen zugeordnet werden. Durch eine Substruktursuche in AntiBase[®] konnte die isolierte Verbindung als Zeaxanthin identifiziert werden, was durch einen ^{13}C -NMR-Datenvergleich mit den Literaturwerten für Zeaxanthin (**46**) bestätigt worden ist.

Zeaxanthin gehört wie das zuvor erwähnte Nostoxanthin zu den sauerstoffhaltigen Carotinoiden (Xanthophylle). Neben der Rolle bei der Lichtabsorption in photosynthetischen Systemen sowie des photooxidativen Schutzes für den jeweiligen Organismus werden durch bestimmte Carotinoide auch Fließeigenschaften und Stabilität von Membranen bei Bakterien positiv beeinflusst⁸⁸. So wird beispielsweise bei dem thermophilen Eubakterium *Thermus thermophilus* die Membranstabilität bei hohen Temperaturen durch sog. Thermozeaxanthinderivate (z.B. Carotinoid-Glycosidester) erhöht⁸⁹.



46

Stamm Pico II 5.3

AB-400

Von der Arbeitsgruppe Malpartida⁹⁰ wurden 18 mg der Verbindung **47** als beiges Lyophilisat erhalten. Durch das ESI-Massenspektrum konnte die Molmasse zu 664.6 Dalton bestimmt werden. Im EI-Massenspektrum wurde kein Molpeak erhalten. Das ¹H-NMR-Spektrum (siehe Abbildung 105) zeigte bei $\delta = 9.04$, 8.90 und 8.43 drei verbreiterte Singulets mit jeweils einer Intensität von 1H an, welche der chemischen Verschiebung zufolge vermutlich aliphatischen Hydroxygruppen zuzuordnen waren. Ferner waren im Bereich von $\delta = 6.67$ -5.57 vier Multipletts mit einer Gesamtintensität von 10H zu sehen, die aufgrund der chemischen Verschiebung olefinischen Protonen zugeordnet wurden. Die drei Multipletts und das Triplet im Bereich von $\delta = 5.19$ -3.81 mit einer Gesamtintensität von 8H schienen Methingruppen in geminaler Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom anzuzeigen. Die beiden Dubletts bei $\delta = 3.28$ und 3.15 mit einer Intensität von jeweils 1H wiesen auf zwei benachbarte Protonen hin, da ihre Kopplungskonstanten identisch waren ($J = 7.7$ Hz). Der verbleibende aliphatische Bereich war durch acht Multipletts von $\delta = 2.80$ bis 1.38 und zwei Methylgruppen anzeigende Dubletts bei $\delta = 1.52$ und 1.27 charakterisiert.

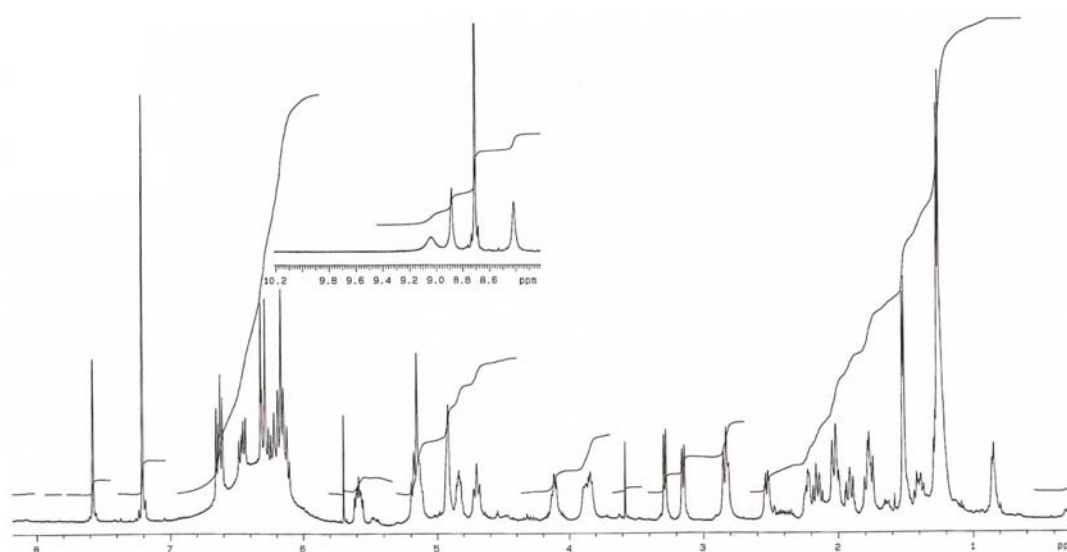


Abbildung 104: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von AB-400 (47) in Pyridin.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (siehe Abbildung 106) erkannte man ein schwaches Signal bei $\delta = 176.7$, das dem Kohlenstoffatom einer Carbonsäure, einem Carbonsäureester oder -amid zuzuordnen war. Dem Bereich sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome waren elf Signale zu entnehmen, wobei unter Berücksichtigung des ^1H -NMR-Spektrums nur olefinische C-Atome vorliegen konnten. Die Signale bei $\delta = 98.3$ und 97.9 deuteten zwei acetalische Kohlenstoffatome an. Da ein interpretierbares EI-Massenspektrum nicht erhalten wurde, konnte dies unter Berücksichtigung der beiden acetalischen Protonen ein Hinweis auf O-glycosidisch gebundene Zuckermoleküle sein, da O-Glycoside i.d.R. während des Ionisationsvorganges bei Aufnahme des EI-Massenspektrums stark fragmentieren. Die zwölf Signale von $\delta = 76.0$ bis 54.6 entsprachen vermutlich Kohlenstoffatomen mit Sauerstoffbindung, während die fünf Signale von $\delta = 47.7$ - 38.1 dem HSQC-Spektrum zufolge Methylgruppen anzeigten. Bei $\delta = 20.5$ und 18.5 wurden die zwei nach ^1H -NMR-Spektrum erwarteten Methylgruppen angezeigt.

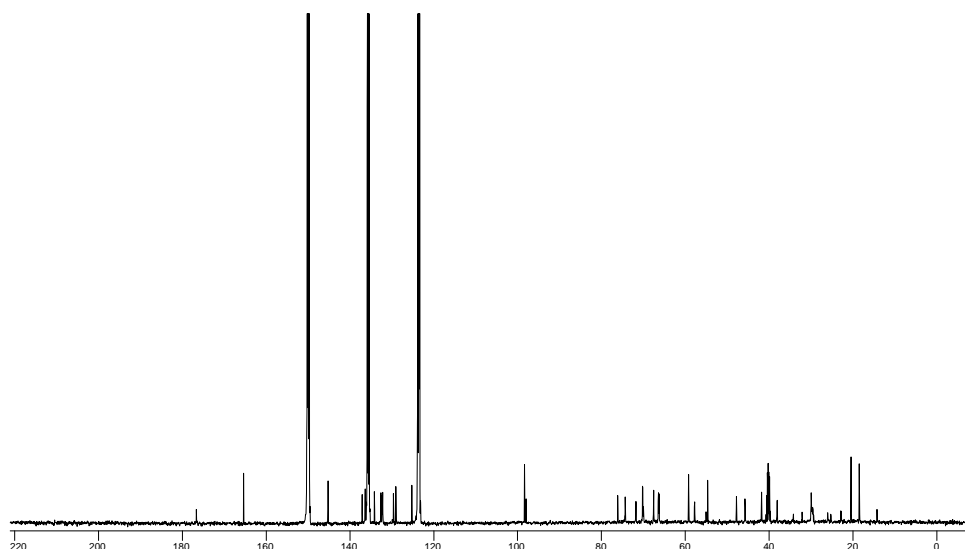
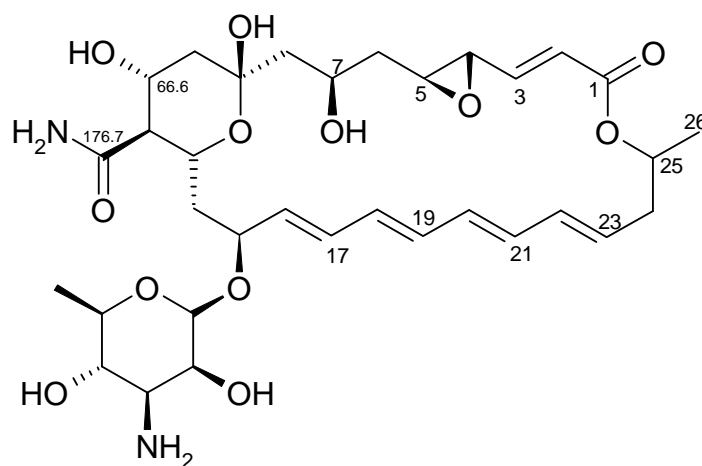


Abbildung 105: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von AB-400 (**47**) in Pyridin.

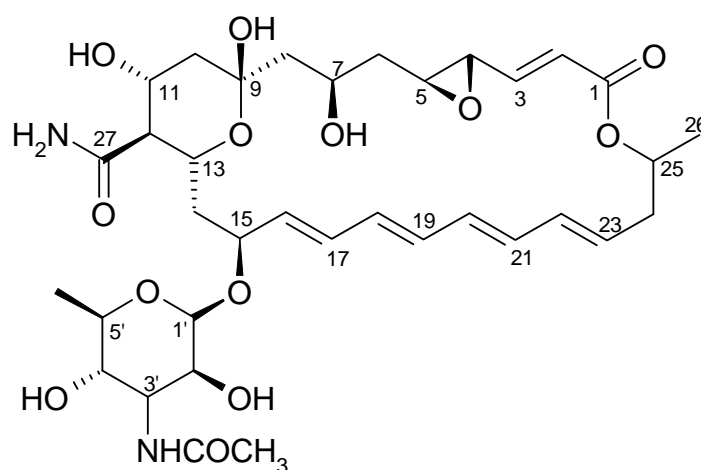
Diese Daten führten nach einer Substruktursuche in Antibase[®] zu dem Pimaricin-Derivat AB-400 (**47**). Da weder ^{13}C -NMR-Daten noch ^1H -NMR-Daten von AB-400 veröffentlicht waren, wurden die H,H-COSY-, HSQC- und HMBC-Spektren zur Strukturbestätigung ausgewertet. Zusätzlich wurden die ^{13}C -NMR-Werte der isolierten Verbindung **47** mit denen von N-Acetyl AB-400 (**48**) verglichen⁹¹.



47

Der ^{13}C -NMR-Datenvergleich zeigte weitgehend Übereinstimmung. Eine geringe Abweichung war bei dem Wert für das Kohlenstoffatom C-3' festzustellen, an welchem das N-Acetyl bzw. im Falle von AB-400 (**47**), die freie Aminogruppe gebun-

den war. Nach Auswertung der 2D-NMR-Spektren wurden jedoch Abweichungen für die C→H-Zuordnungen von **47** und N-acetyl AB-400 (**48**) festgestellt (siehe Markierungen in Tabelle 15). Die Abbildung 107 zeigt die wichtigsten H,H-COSY und HMBC-Korrelationen für die abweichenden Zuordnungen der entsprechenden Kohlenstoffatome von AB-400 (**47**) auf. Abgebildet sind **47** und **48** in der wahrscheinlicheren all-*trans* Konfiguration. Jedoch führen die erwähnten Unterschiede der chemischen Verschiebungen im ^{13}C -NMR-Spektrum für den Bereich konjugierter Doppelbindungen zu der Annahme, daß es sich bei **47** und **48** um *cis-trans*-Isomere handelt. Da jedoch die Protonensignale für die Protonen im Polyen-Bereich als Multipletts aufgespalten waren, konnten wegen fehlender Kopplungskonstanten keine Aussagen zu der Isomerie gemacht werden.



48

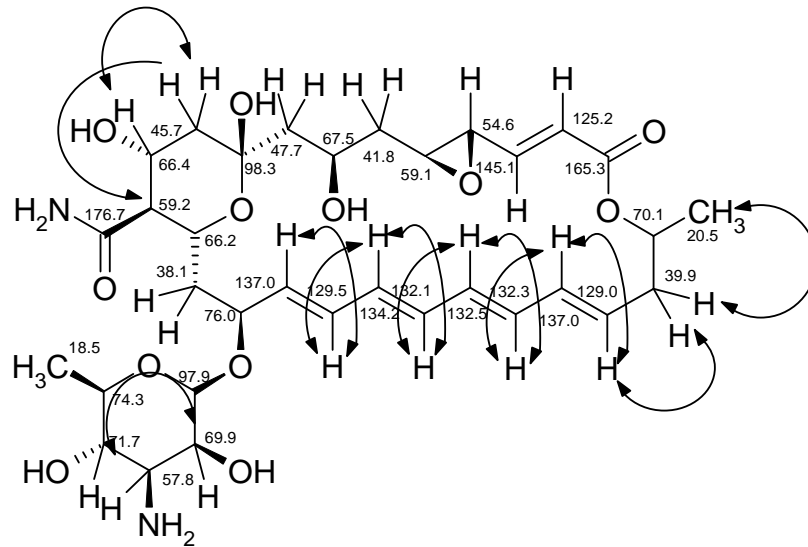


Abbildung 106: Darstellung der wichtigsten H,H-COSY (\leftrightarrow) und HMBC (\rightarrow) Korrelationen für die abweichenden Zuordnungen der entsprechenden Kohlenstoffatome von AB-400 (47), vgl. Tabelle 15.

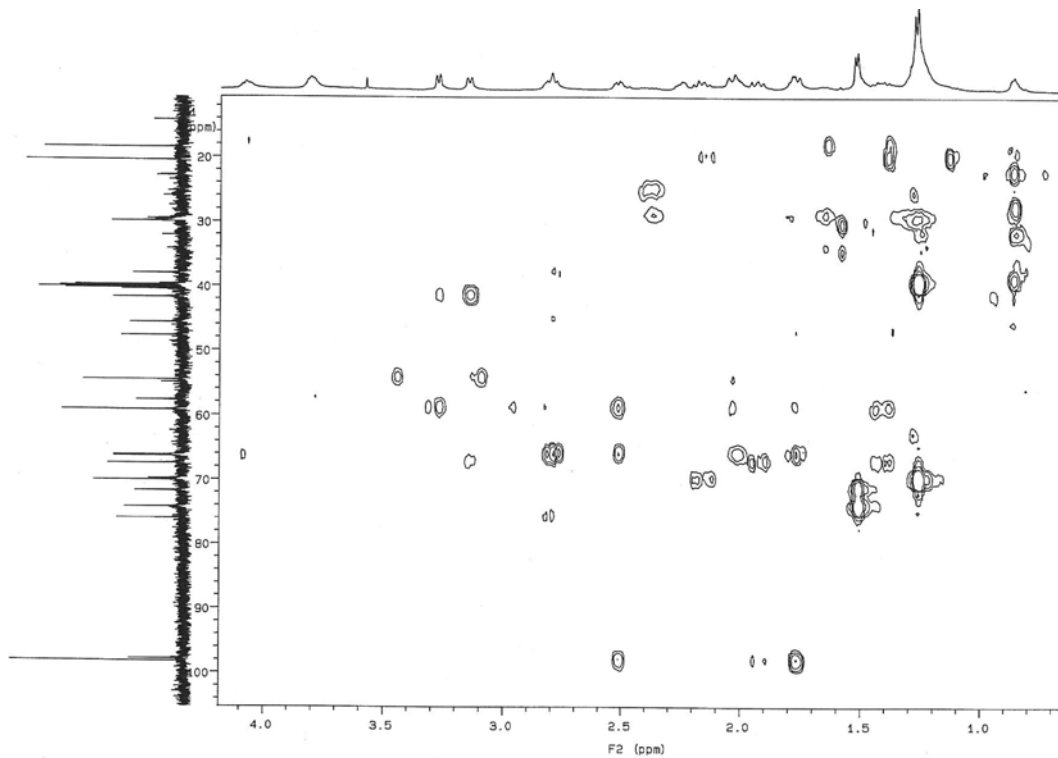


Abbildung 107: HMBC-Spektrum (500 MHz) von AB-400 (47) in Pyridin.

AB-400 wurde erstmals von Librada M. Cañedo *et al.*⁹¹ aus *Streptomyces costae* isoliert. Das N-Acetyl-Derivat von AB-400 wurde hierbei zur Erhöhung der Löslichkeit synthetisiert. AB-400 gehört zu der Familie der Polyen-Antibiotika und hemmt das Wachstum von *Candida albicans* und *Candida tropicalis*⁹¹.

Die Polyen-Antibiotika bestehen aus einem makrozyklischen Lactonring, der in der Regel mit dem Zucker β -D-Mycoamin glycosidisch verknüpft ist. Charakteristisch ist ferner ein System aus drei bis sieben konjugierten Doppelbindungen mit *all-trans* Konfiguration⁹².

Polyen-Antibiotika interagieren mit den Sterolen in Biomembranen. Daher wirken sie ausschließlich auf Eukaryonten, insbesondere auf hefeartige Pilze. Die Affinitätsunterschiede zu dem Ergosterol von Pilzmembranen und dem Cholesterol in Säugetieren sind nicht besonders groß, wodurch sich insbesondere bei parenteraler Applikation eine gewisse Toxizität ergibt⁹².

Tabelle 15: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von AB-400 (**47**) mit den entsprechenden Literaturwerten für N-Acetyl AB-400 (**48**).

Position	N-Acetyl AB-400 ^{lit.}	AB-400 ^{exp.}
1	165.2	165.3
2	125.3	125.2
3	145.2	145.1
4	54.6	54.6
5	59.2	59.1
6	41.9	41.8
7	67.6	67.5
8	47.8	47.7
9	98.3	98.3
10*	39.7	45.7
11	66.6	66.4
12	59.5	59.2
13	66.3	66.2
14	37.9	38.1
15	75.4	76.0
16*	134.2	137.0
17	129.1	129.5
18*	131.8	134.2
19	132.1	132.1
20	132.6	132.5
21*	136.4	132.3
22*	137.6	136.3
23	128.8	129.0
24*	45.9	39.9
25	70.1	70.1
26	20.4	20.5
27	176.7	176.7
1'	98.0	97.9
2'	71.0	69.9
3'	56.4	57.8
4'	72.6	71.7
5'	74.8	74.3
6'	18.9	18.5
3'-NHCOCH ₃	171.4	-
3'-NHCOCH ₃	23.2	-

* Werte weichen aufgrund verschiedener C→H Zuordnungen nach HSQC-Auswertung ab.

Ausblick

Von den bearbeiteten terrestrischen und marinen Streptomyceten wurden insgesamt 22 Verbindungen isoliert, von denen 18 bekannt waren. Die vier neuen Verbindungen stellten strukturverwandte Analoga bereits bekannter Sekundärmetabolite dar. Damit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Produktivität bzw. des Metabolitenspektrums zwischen marinen und terrestrischen Streptomyceten festgestellt werden. So stammten die isolierten Verbindungen hauptsächlich aus dem für Bakterien typischen Polyketid-Biosyntheseweg. Dieser Umstand mag auf die Tatsache zurückzuführen sein, daß marine und terrestrische Streptomyceten taxonomisch miteinander stark verwandt sind, bzw. die sogenannten „marinen“ Streptomyceten ursprünglich aus terrestrischem Habitat stammten. So bemerkt Kelecom²⁵, daß sich insbesondere marine Bakterien aus Oberflächen- und Flußmündungssedimenten den terrestrischen bezüglich des Sekundärmetabolitenspektrums im Allgemeinen sehr ähneln. Hingegen werden von Bakterien aus Sedimenten von Tiefseewasser häufig chemisch unerwartete Verbindungen erhalten, womit der Focus bei der Suche nach neuen Naturstoffen sich gegebenenfalls auf dieses Feld verlagern sollte. Aus den Nordseestämmen Hel 38 und Fpep1 (Pic95) wurden bekannte, ubiquitäre Verbindungen erhalten, darunter zwei Carotinoide und Ubichinon-10, welche dem Terpenstoffwechsel (bzw. im Falle des Ubichinons neben dem Terpenweg auch dem Shikimat-Weg) entstammten. Hiermit unterschieden sich die isolierten Verbindungen chemisch deutlich von denen der bearbeiteten marinen und terrestrischen Streptomyceten, wobei dieser Vergleich selbstverständlich statistisch nicht signifikant ist. Dennoch kann vermutet werden, daß diese Beobachtung auf deutlich taxonomische Unterschiede zurückzuführen war. In diesem Zusammenhang weist jedoch Kelecom²⁵ daraufhin daß die Chemie von marinen Bakterien schwer vorhersagbar ist. So wurden von taxonomisch unterschiedlichen Bakterien Verbindungen isoliert, die jedoch chemisch sehr ähnlich waren, während andere chemisch stark variierende Sekundärmetabolite zwar auf unterschiedliche Biosynthesewege der verschiedenen Bakterien zurückzuführen waren, wobei aber sehr wahrscheinlich vielmehr das Habitat der Bakterien als die Taxonomie der Bakterien eine Rolle zu spielen schien. Als Beispiel gibt Kelecom dabei die Gattung *Bacillus* an, deren isolierte Metabolite sämtlich nitrogeniert waren, was aber eher auf die Herkunft (wie z.B. Tiefseewasser, Schwämme) als auf die Bakterien selbst zurückzuführen war. Die Tabelle 16 zeigt einen Ausschnitt eines Überblicks über die chemischen Klassen von marinen, bakteriellen Sekundärmetaboliten nach Kelecom²⁵. Damit tut sich ein weiterer Ansatz bei der Suche

nach neuen Sekundärmetaboliten auf, der sich nicht nur auf die Taxonomie, sondern auch auf das chemische Umfeld der Bakterien konzentriert, dem durch entsprechende Kultivierungsversuche Rechnung getragen werden sollte. Hierbei ist ferner zu erwähnen, daß die bearbeiteten Bakterien aus der Nordsee anfangs schwer kultivierbar waren und erst nach mehreren Versuchen mit verschiedenen Nährmedien ausreichendes Wachstum mit entsprechender Sekundärmetabolitenproduktion zeigten.

Tabelle 16: Tendenzen des Auftretens chemischer Substanzklassen in marinen Bakterien (nach Kelecom²⁵).

Mikroorganismus (- Herkunft)	Biosyntheseweg	Substanzklasse
Actinomyceten - Küstensedimente - Tiefseesedimente - Seichtwasser	Acetogenine Acetogenine Acetogenine Terpene	Lactone Bromonaphthochinone Bromonaphthochinone u. Lactone Sesquiterpene
Alteromonas - Krustentiere - Offenes Meer - Schwämme	Stickstoffverbindung Stickstoffverbindung Stickstoffverbindung	Indole Cyclische Peptide Makrolactame und Amidester
Bacillus - Tiefes Wasser - Weichtiere - Schwämme	Stickstoffverbindung Stickstoffverbindung Stickstoffverbindung	Aminoglycoside Depsipeptide Cyclische Depsipeptide
Pseudomonas - Rotalgen - Manteltiere - Schwämme	Stickstoffverbindung Stickstoffverbindung Terpene Stickstoffverbindung	Cyclische Peptide Amide C-50-Carotinoide Diketopiperazine und Phenazine

Da gegenwärtig noch große Wissenslücken über die taxonomische Zuordnung vieler mariner Bakterienarten bestehen, ist hier eine intensivere Aufklärung für eine ergiebige Nutzung dieser Ressourcen Voraussetzung. So ermöglicht die phylogenetische

sche bzw. genetische Charakterisierung (16S rDNA-Analyse bzw. RAPD-Methode (random amplified polymorphic DNA) z.B. Einblicke in eventuell typisch marine Biosynthesewege. Die hieraus erhaltenen Informationen könnten schließlich für gezielte Variationen bei den Kultivierungsmethoden genutzt werden. Damit werden nicht nur wichtige Erkenntnisse für die Grundlagenforschung erhalten, sondern es bietet sich außerdem die Gelegenheit, die Potenz der marinen Mikroorganismen besser zu nutzen, indem eine optimale Steuerung der Sekundärstoffproduktion möglich wird.

Aussichtsreich für die Zukunft scheint auch die Untersuchung von Organismen, die unter extremen Lebensbedingungen wachsen, wie z.B. die halpophilen, thermophilen und psychrophilen Mikroorganismen, sowie die Nutzung ihrer besonders belastbaren Enzymsysteme⁹³.

Zusammenfassung

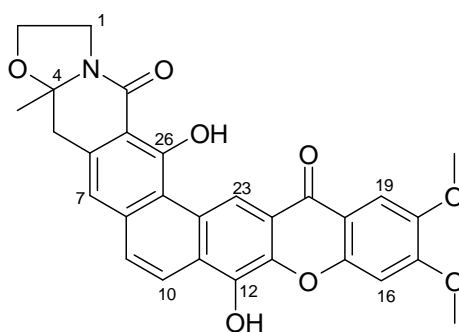
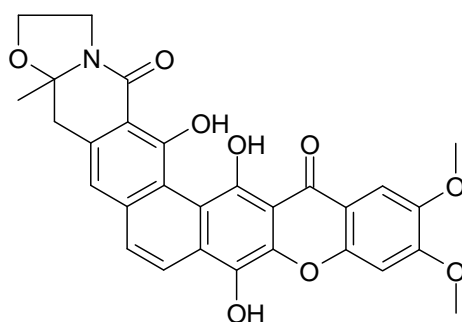
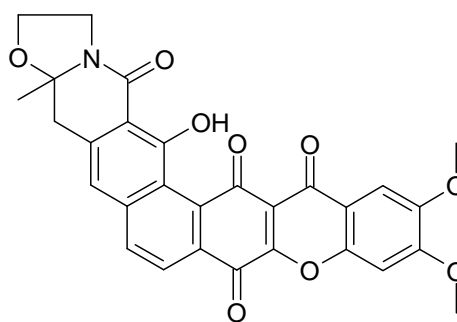
Naturstoffe werden direkt als Therapeutika gegen zahlreiche Krankheiten eingesetzt oder dienen als wertvolle Leitsubstanzen in der Entwicklung neuer Medikamente. Da noch viele Krankheiten nicht oder nur unzureichend behandelbar sind, ist ein besonderes Gebiet der Naturstoffchemie die Isolierung neuer, wirksamer Verbindungen aus verschiedenen Quellen, wie z.B. Pflanzen oder Mikroorganismen. Vor allem die Infektionskrankheiten stellen eine große Herausforderung bei der Suche nach neuen Wirkstoffen dar, da die Entstehung von resistenten Erregern ständig zunimmt und hierdurch unwirksam gewordene Medikamente durch solche mit neuen Wirkmechanismen ersetzt werden müssen. Um also entsprechend neue Naturstoffe zu finden, ist bei der Wirkstoffsuche neben dem Einsatz möglichst diverser biologischer Testsysteme (mit – in Abhängigkeit von der zu behandelnden Krankheit oder bei Infektionskrankheiten von der aktuellen Resistenzlage – gegebenenfalls neuen pharmakologischen Targets) auch die Verwendung von Untersuchungsmaterial aus bislang wenig erforschten Ökosystemen von Bedeutung, wie z.B. Mikroorganismen aus der Nordsee oder der Tiefsee im Allgemeinen. Gleichmaßen ist für eine erfolgreiche sowie ökonomische Naturstoffisolierung die Optimierung der oftmals sehr zeitaufwendigen Arbeitsschritte wichtig. Dies gelingt z.B. durch eine Kombination verschiedener biologischer und chemisch-analytischer Screeningverfahren mit spektroskopischen oder massenspektrometrischen Methoden und gekoppelter Nutzung der hierdurch erhaltenen Strukturinformationen in Datenbanken.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Bakterienstämme aus unterschiedlichen Quellen untersucht. So wurden neben terrestrischen und marinen Streptomyceten auch Bakterien der Gattung *Sphingomonas* und des *Cytophaga/ Flexibakterium-Clusters* aus der in diesem Rahmen noch wenig erforschten Nordsee verwendet. Bei der Stammauswahl und folgenden Bearbeitung von Rohextrakten bewährte sich – wie oben angedeutet – die Kombination von chemischen, physikalischen und biologischen Screeningmethoden (siehe Kapitel „Screening nach Sekundärmetaboliten in Bakterienextrakten“). Diese Kombination ermöglichte durch gezielte Fraktionierung der Rohextrakte ein schnelles Auffinden von chemisch interessanten und/oder aktiven Verbindungen. Besonders aussagekräftig waren hierbei die Methoden der HPLC-UV-Analyse sowie das HPLC-ESI-MS Screening, da bereits mit den hieraus erhaltenen Strukturinformationen in der Datenbank AntiBase[®] nach Strukturvorschlägen gesucht werden konnte. Das in der Abteilung Laatsch etablierte chemische Screening wurde bei den ausgewählten marinen Bakterienstämmen durch das Sprühreagenz Fluorescein-Natrium erweitert. Mit diesem Sprühreagenz können Verbindungen mit organisch gebundenem Brom nachgewiesen werden. Jedoch war keiner der untersuchten Extrakte bzw. Fraktionen in diesem Test positiv.

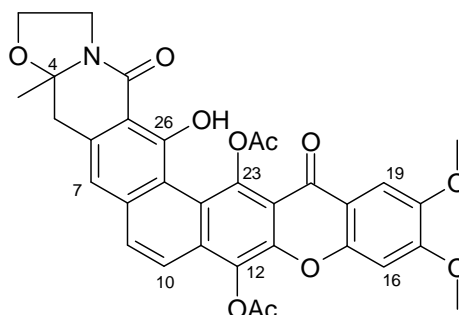
Schließlich wurden nach diesem - in Kapitel 3 - vorgestellten Screeningsystem vier terrestrische Streptomyceten, zwei marine Streptomyceten und zwei Bakterienstämme der Gattung *Sphingomonas* und des *Cytophaga/ Flexibakterium-Clusters* aus der Nordsee ausgewählt. Aus den nach Kultivierung auf dem Linearschüttler oder im Fermenter im Maßstab zwischen 15 - 50 l erhaltenen Rohextrakten wurden nach hauptsächlich biologisch-chemisch geführter Fraktionierung die besonders auffälligen Verbindungen isoliert und aufgereinigt.

So war der Stamm GW13/580 im chemischen Screening durch zwei intensiv gelbe Zonen aufgefallen, von denen sich die polarere Zone mit konzentrierter Schwefelsäure schwarz, die andere schwach rötlich verfärbte. Das biologische Screening zeigte Aktivitäten gegen die Testkeime *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) und *Candida albicans* auf. Man konnte schließlich aus dem Rohextrakt von GW13/580 Acetamid (**10**) sowie das gelbe Cervinomycinderivat 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) als neuen Naturstoff isolieren. Strukturanalytisch auffallend bei **13** war die Tieffeldlage des aromatischen Protons in Position C-23 bei $\delta = 10.07$. Bemerkenswert war ferner eine hohe selektive cytotoxische Wirkung von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) im Krebszellinientest gegen LXFL 529L-Zellen (Zellen eines humanen Lungenkarzinoms). Außerdem wurden leichte Aktivitäten

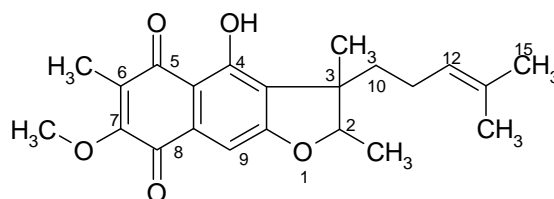
von **13** gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* festgestellt. Die Aktivitäten wurden dabei gegen den Chloroquin-resistenten *Plasmodium falciparum* Stamm K1 sowie den Chloroquin-empfindlichen Stamm NF54 geprüft. Wegen der Auffälligkeit im Krebszellinientest von **13** erfolgte die Nachfermentation des Stammes GW13/580 im Maßstab einer 50 l -Fermenterkultur, um die Substanz 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) für weiterführende pharmakologische Tests in größerer Menge zu erhalten. Leider waren hierbei die Ergebnisse der ersten Anzucht nicht reproduzierbar, was möglicherweise auf die Umstellung von der Schüttelkultur auf eine Fermenterkultivierung zurückzuführen war. Jedoch wurden aus dem Rohextrakt der 50 l-Fermenterkultur die der Verbindung 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) strukturverwandten Verbindungen Cervinomycin A₁ (**15**) und Cervinomycin A₂ (**14**) isoliert. Dabei stellen **15** und **14** ein Redoxpaar dar, wobei Cervinomycin A₂ (**14**) ein chinoides Strukturelement aufweist und Cervinomycin A₁ (**15**) das entsprechende Hydrochinon bildete. Der einzige strukturelle Unterschied zwischen **15** zu 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) bestand im Fehlen des chinoiden bzw. hydrochinoiden Charakters von **15**.

**13****15****14**

Die Strukturaufklärung von Cervinomycin A₁ (**15**) erfolgte wegen seiner Schwerlöslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln nach Acetylierung über das hieraus resultierende Diacetat (**16**). Neben schwachen Aktivitäten gegen *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* wurden für das Cervinomycin A₁-diacetat (**16**) starke Aktivitäten gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) gemessen.

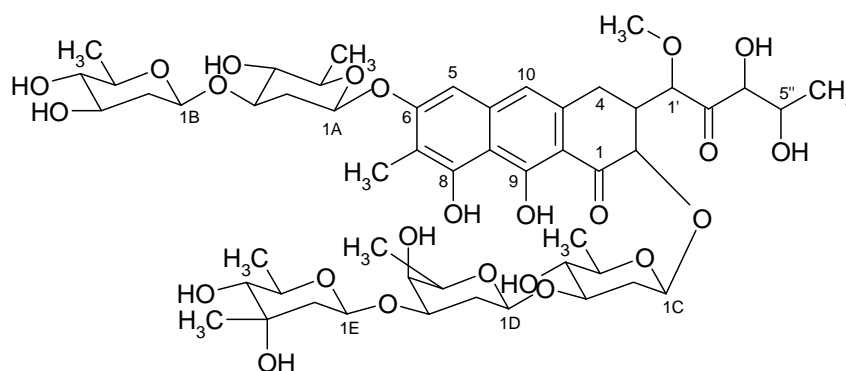
**16**

Der Rohextrakt des Streptomyceten GW13/1783 enthielt eine unpolare, gelbe Verbindung mit Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis*, *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) und *Mucor miehei* (Tü 284). Nach Reinigung des Rohextraktes durch Vakuum-Säulenchromatographie (VLC) mit Kieselgel, Säulenchromatographie an Sephadex und abschließender RP-HPLC konnte die Verbindung nach NMR- und massenspektrometrischer Analytik als das Furanonaphthochinon 4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dion (**17**) identifiziert werden. Auffällig hierbei war die Hochfeldverschiebung für das Proton der chelierten Hydroxygruppe mit $\delta = 9.85$. Anzumerken ist ferner, daß der entsprechende Literaturwert mit $\delta = 6.96$ ungewöhnlich stark hochfeldverschoben war und sich vom experimentellen Wert um immerhin $\Delta\delta 2.89$ unterschied.

**17**

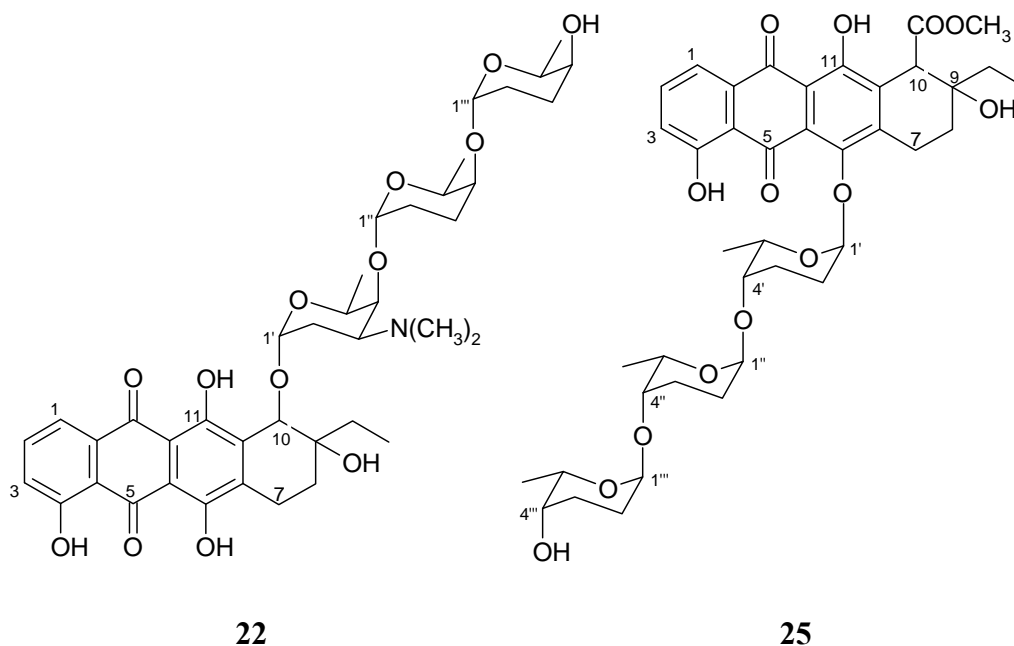
Der Streptomycet GW 13/3993 war durch eine gelbe Verbindung aufgefallen, die sich auf dem Dünnschichtchromatogramm mit Anisaldehyd/Schwefelsäure intensiv grün verfärbte. Durch Bioautographie konnte nachgewiesen werden, daß diese Ver-

bindung hauptsächlich verantwortlich für die im biologischen Primärscreening festgestellten Aktivitäten gegen die Testkeime *Mucor miehei* (Tü 284), *Staphylococcus aureus*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus subspicatus* war. Die Struktur der Verbindung war nach Auswertung von 2D-NMR-Spektren und nach Massenspektrometrie mit dem Aureolsäureantibiotikum Mithramycin (**20**) identisch. Für Mithramycin wurden in der Literatur Cytotoxizitäten gegen verschiedene Tumorzelllinien beschrieben und es wird klinisch (Mithracin®) gegen bestimmte Tumorarten wie z.B. metastasierendes *Carcinoma embryonale* (ein von embryonalem Gewebe ausgehendes Carcinom, das v.a. Leber und Hoden betrifft) und gegen die sog. Paget's bone disease (*Ostitis deformans*) eingesetzt. Auch gegen Hypercalciämie und Hypercalciurie in Verbindung mit bösartigen Tumoren wird Mithramycin verwendet.

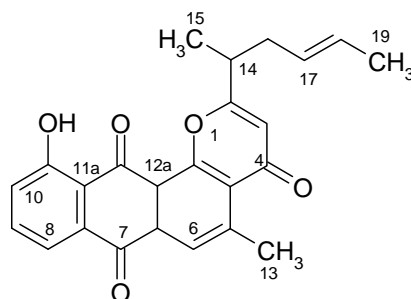


20

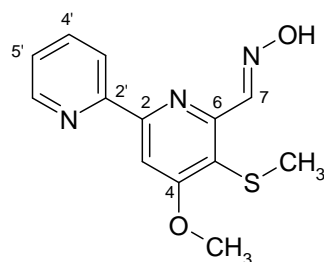
Aus dem Rohextrakt des terrestrischen Streptomyceten GW 44/1571 konnte man die beiden roten Anthracyclinantibiotika Cosmomycin A (**22**) und Cytorhodin J (**25**) isolieren. Um die Identität von **22** eindeutig von dem Substitutionsisomer Kesarirhodin B (**21**) abzugrenzen, wurde neben einem Literaturvergleich der ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten die Struktur zusätzlich durch Auswertung der 2D-NMR-Spektren und Massenspektren bestätigt. Auch die Identität von **25** wurde durch Auswertung von 2D-NMR-Experimenten abgesichert, da in der Literatur lediglich die ^1H -NMR-Werte veröffentlicht waren. Darüber hinaus erfolgte auch ein Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von **25** mit den veröffentlichten Werten für Rhodomycinon (**24**), welches dem Aglykon von Cytorhodin J (**25**) entsprach. Auch dieser Datenvergleich bestätigte die Identität von **25**.



Im Rohextrakt des marinen Streptomyeten B 5546 konnte das Pluramycinderivat 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) als neuer Naturstoff gefunden werden. Die unpolare, gelbe Verbindung war im Agardiffusionstest stark aktiv gegen *Mucor miehei* (Tü 284). Die Struktur von **27** wurde mit Hilfe von 2D-NMR-Spektren sowie ESI- und EI-Massenspektren aufgeklärt.



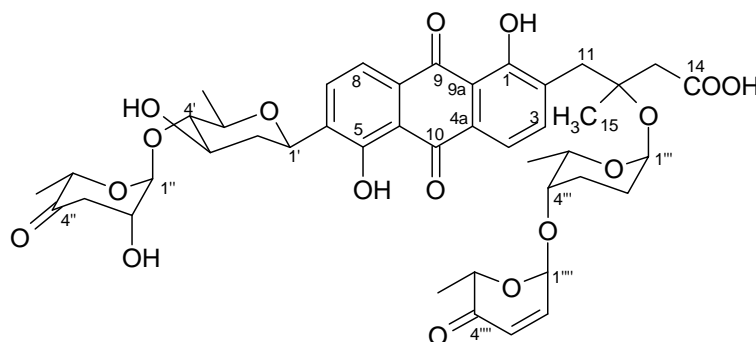
Außerdem fiel dieser Stamm durch eine unpolare, farblose Verbindung auf, welche bei 366 nm weißlich fluoreszierte, bei DC eine violette Farbreaktion mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Reagenz zeigte und sich mit FeCl_3 -Sprühreagenz rot und mit Palladium-Sprühreagenz gelb verfärbte. Die Verbindung bildete nadelförmige Kristalle und konnte schließlich als Collismycin A (**32**) identifiziert werden.



32

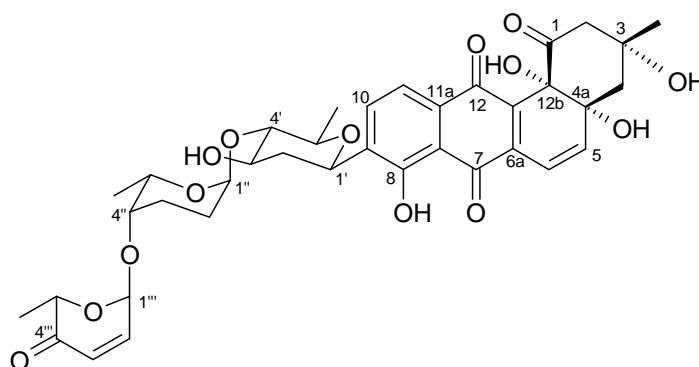
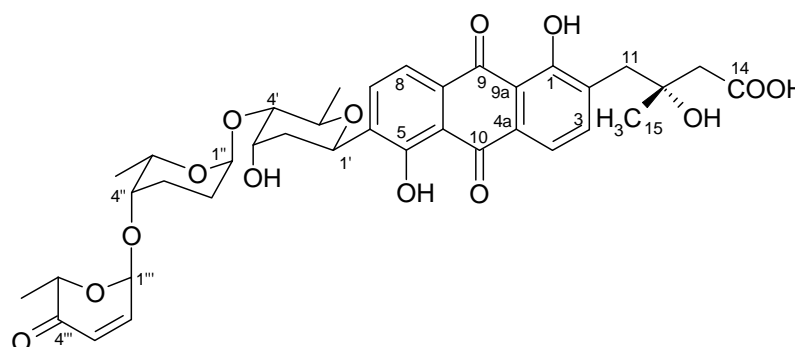
Der Rohextrakt des marinen Streptomyceten B 6278 fiel bei DC durch mehrere intensiv gelbe oder orange Zonen auf, die sich sämtlich mit NaOH rot verfärbten. Schließlich wurden die Angucycline A-7884 (**35**), Vineomycin A₁ (**42**) und das Angucyclinon Rabelomycin (**38**) sowie die Anthrachinonantibiotika Fridamycin D (**37**), die neue Verbindung Mutabahamycin (**40**), Vineomycin C (**36**) und das in der Literatur noch nicht beschriebene Disaccharid 6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6*H*-pyran-3-on (**41**) isoliert.

Auch für die Verbindung Mutabahamycin (**40**) konnte in der Literatur keine Veröffentlichung gefunden werden, wonach sie als neuer Naturstoff gilt. Wichtig für die Strukturaufklärung von **40** war der Beweis der terminalen Carboxygruppe im aliphatischen Seitenkettenrest. Da im ¹³C-NMR Spektrum kein Signal für das Carboxykohlenstoffatom zu sehen war und auch Kopplungen im HMBC-Spektrum in dem Signalfeld für Carboxykohlenstoffatome fehlten, wurde die Existenz der Carboxygruppe durch Methylierung mit Diazomethan nachgewiesen. Dabei basierte die Annahme einer Carboxygruppe auf dem Strukturvergleich mit den aus Stamm B 6278 isolierten Anthrachinonantibiotika Vineomycin C (**36**) und Fridamycin D (**37**) und außerdem einer nicht erklärbaren Massendifferenz von 15 zwischen der beobachteten und der aus den NMR-Daten vorausgesagten Masse.



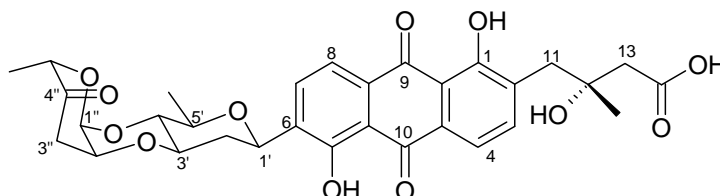
40

Interessant war außerdem die Isolierung der Verbindungen A-7884 (**35**) und Vineomycin C (**36**). Diese könnten nämlich in Anlehnung an die Biosyntheseuntersuchungen von Vineomycin A₁ (**42**) und Vineomycin B₂ von Imamura *et al.*⁶⁷ möglicherweise in direktem biosynthetischen Zusammenhang stehen. Damit würde das offenkettige Benz[*a*]anthrachinon Vineomycin B₂ aus dem Angucyclin Vineomycin A₁ (**42**) nach Ringöffnung durch Spaltung der Bindung zwischen C-1 und C-12b hervorgegangen sein (siehe Abbildung 74). Beide Verbindungen hemmen die Cytokin-induzierte Stickstoffmonoxidsynthese (i-NOS). Bei stark erhöhter Bildung von i-NOS können neurotoxische Wirkungen, fokale Ischämie und Krankheiten wie Alzheimer oder Huntington verursacht werden⁶⁸. Daher ist die Regulierung der Konzentration von Stickstoffmonoxid bzw. der i-NOS neben dem Verstehen von physiologischen Prozessen vor allem auch von großem therapeutischem Interesse.

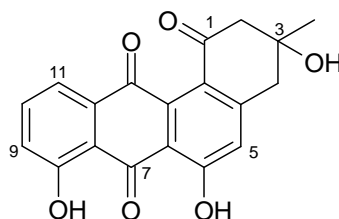
**35****36**

Die Struktur von Fridamycin D (**37**) wurde erstmals in der Dissertation von Kricke⁷⁰ vorgestellt. Die Strukturaufklärung der isolierten Verbindung **37** gelang durch einen Vergleich der ¹H- und ¹³C-NMR-Daten mit den von Kricke publizierten Daten sowie mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten, da in der Dissertation von Kricke die

Positionen nicht aller Kohlenstoffatome zugeordnet werden konnten. Eine strukturelle Besonderheit von Fridamycin D (**37**) ist das Vorliegen eines Dioxanrings, der durch O-glycosidische Bindung zwischen C-4' und C-1'' sowie Bildung einer Etherbrücke zwischen C-3' und C-2'' entsteht.

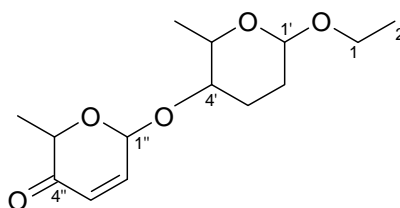
**37**

Die Verbindung **38** wurde nach Vergleich der veröffentlichten ^{13}C -NMR-Werte⁷¹ als Rabelomycin identifiziert. Es ist das einzige Angucyclinon, das aus dem Stamm B 6278 isoliert worden ist.

**38**

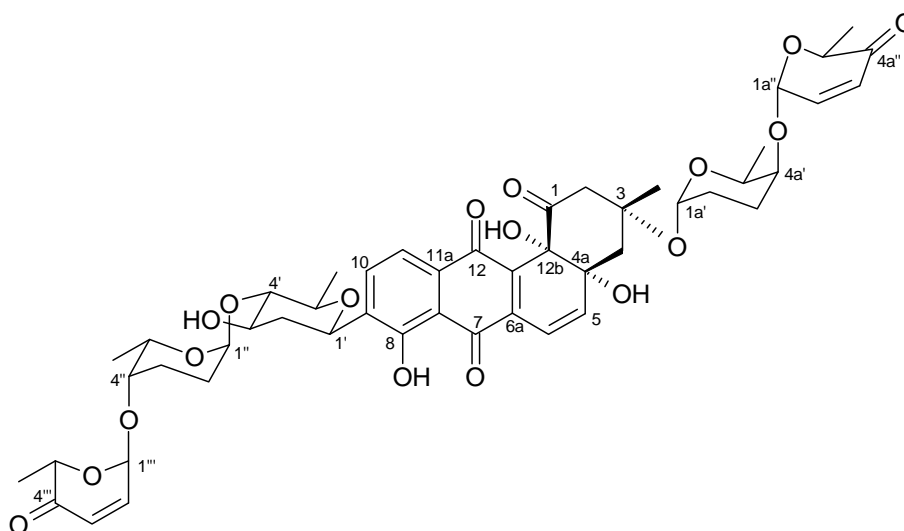
Schließlich wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Schulz⁷⁵ die Struktur eines Disaccharids aufgeklärt, welches sich nach Datenbankrecherche als neu erwies. Interessant war, daß das isolierte Disaccharid möglicherweise in Zusammenhang mit den Disaccharideinheiten der ebenfalls aus B 6278 isolierten Verbindungen Vineomycin A₁ (**42**) (Zuckerringe D und E: L-Rhodinose→L-Aculose) oder Mutabahamycin (**40**) (Zuckerringe C und D: L-Rhodinose→L-Aculose) stehen könnte. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür könnte sein, daß der Stamm B 6278 überschüssige Zucker in Form von Glycosiden speichert. Eine andere Möglichkeit wäre jedoch eine hydrolytische Spaltung der entsprechenden O-Glycoside von **42** und/oder **40** durch Salzsäure, welche möglicherweise während des Aufarbeitungsprozesses mit Chloroform durch Lichteinfluß entstanden ist. Hiernach könnten die hydrolysierten Zucker mit Ethanol, welches ein Stabilisator für Chloroform ist, reagiert haben, was gegebenenfalls zu dem isolierten Disaccharid (**41**) geführt haben könnte. Die letzte Möglichkeit

ist sehr wahrscheinlich, da Ethylether, Ethylester und Ethylglycoside in der Natur sehr selten sind.



41

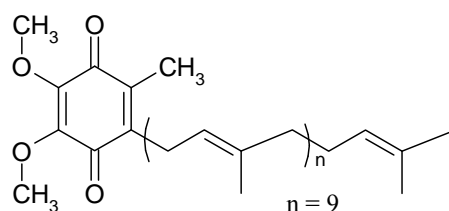
Die Verbindung Vineomycin A₁ (**42**) wurde bei dem Versuch der Nachisolierung von **40** aus dem Rohextrakt einer zweiten 20 l-Fermenterkultur des Stammes B 6278 erhalten. Neben antibiotischen und anticancerogenen Eigenschaften, hemmt **42** das Enzym Prolylhydroxylase, welches eine Rolle bei fibrotischen Erkrankungen spielt.



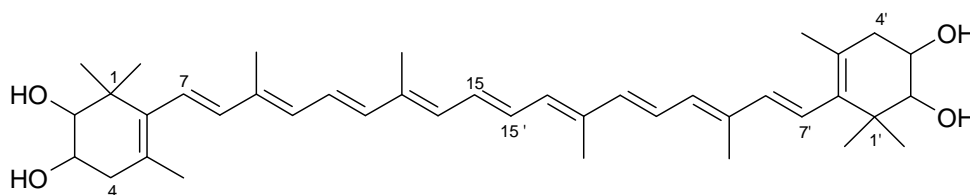
42

Im Rohextrakt des Nordseestammes Hel 38 fand man die Verbindungen Ubichinon-10 (**43**) und das Carotinoid Nostoxanthin (**44**). Erwähnenswert ist, daß das Auftreten von Ubichinon-10 ein Merkmal für fast alle Proteobakterien der α -Unterklasse ist, wie chemotaxonomische Untersuchungen von Wagner-Döbler *et al.*⁸² zeigten. Hierbei wurde demonstriert, daß die Helgolandstämme Hel 10^T und Hel 26 zu einer Untergruppe der α -Unterklasse der Proteobakterien gehören. Bei beiden Stämmen herrschte Ubichinon-10 von sämtlichen Chinonen der Atmungskette vor. Auch der hier untersuchte Stamm Hel 38 gehört zu dieser α -Unterklasse bzw. zu der Gattung

Shingomonas sp., für welche Ubichinon-10 als Hauptelektronenüberträger in der Atmungskette gilt.

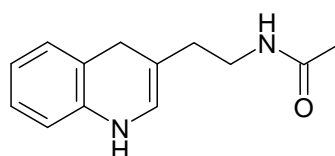


43



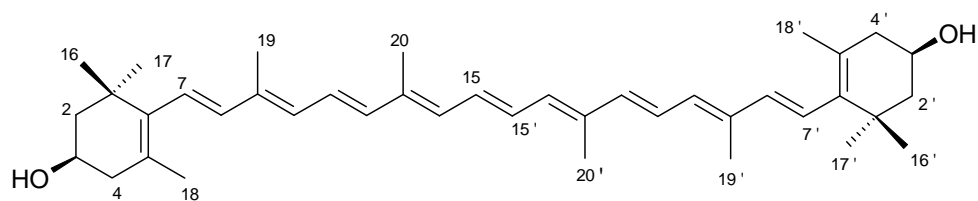
44

Der Rohextrakt des Nordseestammes Fpep1 (Pic95) fiel nach Kultivierung auf Cytophaga-Medium durch eine sehr hohe Cytotoxizität gegen *Leishmania donovani* und eine hohe Aktivität im Cytotoxizitätstest mit RAW-Makrophagen sowie der Bildung eines gelben Farbstoffes auf. Da jedoch das Wachstum des Stammes auf diesem Medium nicht zufriedenstellend war, wurde Fpep1 nach einer Testreihe verschiedener Kulturmedien erneut unter Verwendung der Medien „Fischmehl“ und LB50% (+ Glucose) fermentiert. Dabei wurde aus dem Rohextrakt nach Kultivierung auf Fischmehl die Verbindung N^β-Acetyltryptamin (45) isoliert.



45

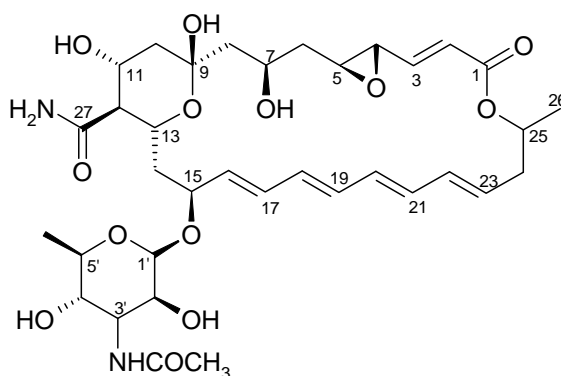
Der nach Fermentation mit LB 50% (+ Glucose)-Medium erhaltene Rohextrakt enthielt das gelbe Carotinoid Zeaxanthin (46). Eine Verbindung, die für die hohen Aktivitäten im pharmakologischen Screening verantwortlich war, konnte nicht gefunden werden.



46

Sämtliche Verbindungen der Nordseebakterien waren in den eingesetzten biologischen bzw. pharmakologischen Tests inaktiv, obwohl im biologischen sowie pharmakologischen Screening Aktivitäten für die Rohextrakte oder Fraktionen festgestellt worden waren. Dies konnte unter Umständen auf nicht isolierbare Substanzmengen der für die Aktivitäten verantwortlichen Metabolite zurückzuführen sein.

Aus Stamm Pico II 5.3 lag eine beige Substanz vor, die von *Malpartida* isoliert worden war. Die Strukturaufklärung erfolgte unter Verwendung von ESI- und EI-Massenspektren sowie von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren mit anschließender Substrukturrecherche in Antibase[®]. Hierbei wurde die vorliegende Verbindung als das Pimaricin-Derivat AB-400 (47) identifiziert. Da weder ^{13}C -NMR-Daten noch ^1H -NMR-Daten von AB-400 veröffentlicht waren, wurden 2D-NMR-Spektren zur Strukturbestätigung gemessen sowie zusätzlich die ^{13}C -NMR-Werte der isolierten Verbindung 47 mit denen von N-Acetyl AB-400 verglichen. Die Auswertung dieser Daten bestätigte die Struktur von AB-400 (47).



47

2. Experimenteller Teil

2.1. Material und Methoden

Drehwerte: CD-Polarimeter (Perkin-Elmer, Modell 241). – **IR-Spektren:** Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR; Perkin-Elmer 297 Infrared Spectrophotometer; Beckman DU-640; Shimadzu FT-IR; (KBr-Presslinge und Film). – **UV/VIS-Spektren:** Perkin-Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrometer. – **¹H-NMR-Spektren:** Varian Unity 300 (300 MHz), Bruker AMX 300 (300 MHz), Varian INOVA 500 (500 MHz), Varian Inova 600 (600 MHz). Tetramethylsilan als interner Standard. – **¹³C-NMR-Spektren:** Varian Mercury 300 (75.5 MHz), Varian Unity 300 (75.5 MHz), Bruker AMX 300 (75.5 MHz), Varian INOVA 500 (125.7 MHz), Varian Inova 600 (150.8 MHz). – **Massenspektren:** EI-MS: Finnigan MAT 95 (70 eV). Hochauflösung: Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz. DCI-MS: Finnigan MAT 95 (200 eV), Reaktandgas: NH₃. ESI-MS: Finnigan LCQ. HR-ESI-MS: Bruker Apex-Q III, 7 Tesla. – **HPLC-MS:** Massenspektrometer: Finnigan LCQ; UV/VIS-Detektor: Finnigan Surveyor PDA Detector (Thermo Electron Corporation); HPLC-Pumpe: Rheos 4000 (Flux Instrument); Entgaser: ERC-3415 α (Flux Instruments); Autosampler: Jasco 851-AS Intelligent Sampler (Jasco); Steuersoftware HPLC: Janeiro (Flux Instruments); Datensystem: Xcalibur (Finnigan); Datenbanksoftware: MS-Manager (ACDLabs); Säulen: EC 125/2 Nucleosil 100-5 C18 (Macherey-Nagel), Synergi 4 μ MAX-RP 80A, 150 \times 2.00 mm 4 μ micron (Phenomenex); Lösungsmittel: Methanol gradient grade für die Flüssigkeitschromatographie (Merck und Fluka). Programm: von 10 % Methanol auf 100 % Methanol in 20 min, 10 min 100 % Methanol, von 100 % Methanol auf 10 % Methanol in 2 min.; Flussrate: 300 μ l/min.

Materialien

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Folien Polygram SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel & Co., Düren). – **Präparative Dickschichtchromatographie (PDC):** Kieselgel P/UV₂₅₄ (55 g/100 ml Wasser, Macherey-Nagel & Co.) goß man auf waagrecht liegende Glasplatten (20 \times 20 cm), ließ an der Luft trocknen und aktivierte 4 h bei 130 °C. – **Säulenchromatographie (SC):** MN Kieselgel 60, 0.05-0.2 mm (Ma-

cherey-Nagel & Co.); Kieselgel 60, 0.063-0.100 mm (Merck). – **Ausschlußchromatographie:** Sephadex LH-20 (Fluka). – Vakuum-Säulenchromatographie (= Vakuum-Liquid-Chromatographie, VLC): Bei Anwendung der Vakuum-Säulenchromatographie wurde die Probe (Rohextrakt oder Rohextraktfraktion) in Dichlormethan bzw. einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol aufgenommen und mit dem Sorbens (Kieselgel: 30-60 µm; J. T. Baker) vermengt. Das Lösungsmittel dieser Suspension wurde im Vakuum entfernt und der erhaltene Rückstand im Mörser verrieben. Die hiernach vorliegende homogene Extrakt-Kieselgel-Mischung wurde gleichmäßig auf eine Nutsche (Porzellan, Füllhöhe: 6 cm, Durchmesser: 15.5 cm) mit Saugflasche aufgetragen. Die Nutsche wurde zuvor mit der stationären Phase (Kieselgel: 30-60 µm; J. T. Baker, 640 g) trocken gefüllt und vor dem Auftragen der Probe mit dem vorgesehenen Fließmittel äquilibriert. Zur Durchführung der VLC wurde unter Vakuum mit einem Lösungsmittelgradienten steigender Polarität eluiert. Hierzu wurden die Lösungsmittel Cyclohexan, Dichlormethan, Ethylacetat und Methanol in unterschiedlichen Verhältnissen miteinander kombiniert.

Sprühreagenzien

Mit *konzentrierter Schwefelsäure* wurden v.a. gelbe Verbindungen betüpfelt, um durch Schwarzfärbung Polyene und durch Grün- oder Blaufärbung Carotinoide zu erkennen. Gelbe oder rötliche Verbindungen wurden zusätzlich mit *Natronlauge* betüpfelt, um bei roter oder violetter Farbänderung auf das Vorliegen von *peri*-Hydroxychinonen schließen zu können.

Anisaldehyd/Schwefelsäure: Zu 100 ml einer Stammlösung aus 85 ml Methanol, 14 ml Eisessig und 1 ml Schwefelsäure fügte man 1 ml Anisaldehyd hinzu.

Universielles Sprühreagenz: Makrolide, Phenole, Sapogenine und höhere Alkohole verfärben sich grau, Glycoside braun und Steroide meist violett.

Ehrlichs Reagenz: 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung aus 25 ml Salzsäure (36 %) und 75 ml Methanol gelöst.

Indole verfärben sich nach Besprühen rosa/violett. Harnstoffe, Pyrrole und Fura-
ne zeigen eine braune, N-Heterocyclen eine graue Farbreaktion.

Zinn(II)-chlorid-Salzsäure/4-Dimethylaminobenzaldehyd: Sprühlösung I:
3 ml Zinn(II)-chlorid-Lösung (15 %) werden mit 15 ml Salzsäure (37 %) gemischt
und mit 180 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wurde frisch zubereitet.

Sprühlösung II: 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einer Mischung aus
30 ml Ethanol, 3 ml Salzsäure (37 %) und 180 ml 1-Butanol gelöst.

Vorgang: Mit I sprühen, an der Luft trocknen und mit II nachsprühen.

**INPTC (2-(*p*-Iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyl-2*H*-tetrazoliumchlo-
rid):** Sprühlösung I: 0.5 g INPTC wird in 100 ml Methanol gelöst.

Sprühlösung II: 5 g in 10 ml Wasser gelöstes KOH werden mit Methanol auf 100
ml aufgefüllt.

Vorgang: Die mit Lösung I besprühte DC-Folie wird 5 min bei Raumtemperatur
stehen gelassen und dann 5 min auf 75 °C erwärmt. Anschließend wird mit Lösung II
besprüht.

Carbonyl- und Thiocarbonylverbindungen geben gelbe bis orange Flecken auf
dem Dünnschichtchromatogramm.

Palladiumchlorid-Sprühreagenz: 0,5 g Palladiumchlorid wird in einer 100 ml
demin. Wasser gelöst und mit vier Tropfen Salzsäure (36 %) versetzt.

Verbindungen mit organisch gebundenem Schwefel verfärben sich gelb.

Eisen(III)-chlorid-Sprühreagenz: Frisch hergestellte 2proz. wässrige Lösung
von Eisen(III)-chlorid.

Hydroxamsäuren und deren Derivate werden durch Komplexbildung mit Ei-
sen(III)-Ionen rot gefärbt, Phenole zeigen eine grünblaue oder violette Farbreaktion,
Brenzcatechine geben eine grüne Farbreaktion.

Fluorescein-Natrium Reagenz: Sprühlösung I: 0.1g Fluorescein-Natrium wer-
den mit 50 ml Ethanol (96 %) gemischt und mit 50 ml Wasser verdünnt.

Sprühlösung II: 50 ml Wasserstoffperoxid (30 %) werden mit 50 ml Essigsäure versetzt.

Vorgang: Nacheinander mit I und II besprühen, anschließend 20 min bei 100 °C trocknen lassen.

Verbindungen mit organisch gebundenem Halogen zeigen eine rosa Farbreaktion.

Mikrobiologische Materialien

Fermenter: 20-l-Fermenter (Merodos GmbH, Göttingen) bestehend aus Kulturgefäß, Magnetgekuppeltem Propellerrührer, Kühlschlange mit Thermostat, Steuereinheit mit pH-Regler, Antischaum-Regler (Merodos GmbH, Göttingen). – **Schüttler:** Infors AG (CH 4103 Einbach) Typ ITE. – **Autoklav:** Albert Dargatz Autoklav, Volumen 119 l, Betriebstemperatur 121 °C, Betriebsdruck 1.2 kg/cm². – **Stammhaltung:** Tiefkühlagerung in Dewargefäß Typ BT 37 Air liquide. – **Kapillaren zur Tiefkühlagerung:** Durchmesser 1.75 mm, Länge 80 mm (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt).

Erde für Erdkultur: Luvos Heilerde (Lu-Vosjust GmbH & Co., Friedrichshof)

Ultraturrax: Janke & Munkel KG

Testplättchen: 9 mm Durchmesser, Schleicher & Schüll No. 321 261

Nährbodenbestandteile: Glucose, Hefeextrakt und Malzextrakt (Merck, Darmstadt), Bacto Agar (Difco)

Antischaum-Lösung: Niox PPG 2025 (Union Carbide Belgium N. V., Zwijndrecht)

Petrischalen: Durchmesser 94 mm, Höhe 16 mm (Greiner Labortechnik, Nürtingen)

Celite: Celite France S. A., Rueil-Malmaison Cedex

Rezepturen

Alle Kultur-Medien wurden bei 1.2 bar und 121 °C autoklaviert. Die Verweildauer im Autoklav betrug für 1-l-Schüttelkulturen 33 min, für Fermenter-Medien in Form eines 2 l-Konzentrats 50 min und für den mit 16 l Wasser gefüllten Fermentationsbehälter 82 min.

Künstliches Seewasser (A)

Eisencitrat (vorher zermörsert)	2 g
NaCl	389 g
MgCl ₂ ·6 H ₂ O	176 g
Na ₂ SO ₄ (vorher in 2 l Wasser aufgelöst)	68.8 g
CaCl ₂	36 g
Na ₂ HPO ₄	0.16 g
SiO ₂	0.3 g
Spurenelement-Lösung	20 ml
Stamm-Lösung	200 ml

Die Lösungen wurden mit Leitungswasser auf 20 l aufgefüllt.

Spurenelement-Lösung nach Hoagland (1993)

H ₃ BO ₃	0.611 g
MnCl ₂	0.389 g
CuSO ₄	0.056 g
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	0.056 g
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·18 H ₂ O	0.056 g
NiSO ₄ ·6 H ₂ O	0.056 g
Co(NO ₃) ₃ ·6 H ₂ O	0.056 g
TiO ₂	0.056 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4 H ₂ O	0.056 g
LiCl	0.028 g
SnCl ₂	0.028 g
KI	0.028 g

Die Spurenelementsalze wurden in 1 l Leitungswasser gelöst.

Stamm-Lösung

KCl	110 g
NaHCO ₃	32 g
KBr	16 g
SrCl ₂ ·6 H ₂ O (getrennt aufgelöst)	6.8 g
H ₃ BO ₃	4.4 g
NaF	0.48 g
NH ₄ NO ₃	0.32 g

Die Salze wurden mit Leitungswasser auf 2 l aufgefüllt.

Künstliches Seewasser (B)

NaCl	24 g
MgCl ₂	5 g
MgSO ₄	5 g
CaCl ₂	0.5 g
KCl	0.5 g
KBr	0.1 g
FePO ₄ ·H ₂ O	10 mg
demineralisiertes Wasser	1000 ml

M₁-Medium

Pepton	5 g
Hefe-Extrakt	1 g
KBr	1 g
Seewasser	750 ml
demineralisiertes Wasser	250 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 8.0 eingestellt.

M₂-Medium ohne Seewasser (= M₂-Medium)

Malz-Extrakt	10 g
Glucose	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
Leitungswasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.8 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

M₂-Medium mit Seewasser (= M₂⁺-Medium)

Malz-Extrakt	10 g
Glucose	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
künstliches Seewasser	500 ml
Leitungswasser	500 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.8 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefe-Extrakt	5 g
NaCl	10 g
künstliches Seewasser (B)	500 ml
demineralisiertes Wasser	500 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.6 ± 0.2 eingestellt.

Fischmehl-Medium

Glucose	21 g
Fischmehl	5 g
Mehl (Typ 405)	10 g
Hefeextrakt (Difco)	1 g
MgSO ₄	0,5 g
NaCl	1 g
CaCl ₂	0,5 g
Spurenelementlösung nach Helogoland, s.o.	10 ml
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.8 eingestellt.

Cytophaga-Medium

Sojamehl (Sojamin 50T)	20 g
Mannit	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.8 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 18 g Bacto Agar zugegeben.

SM 50%-Medium

Künstliches Seewasser (B) s.o.	10 g
Hefeextrakt (Difco)	1 g
Trypton	1 g
Cycloheximid	0,02 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Fleischextrakt-Medium

Pepton	2 g
Glucose	10 g
Hefe-Extrakt	1 g
Fleischextrakt	1 g
Leitungswasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.8 eingestellt.

Malz-Extrakt	10 g
Glucose·H ₂ O	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
CaCO ₃	0.5 g
13.2 % Seewasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.3 eingestellt.

LB-Medium

Trypton	5 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.2 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 20 g Bacto Agar zugegeben.

LBm-Medium (= LB 50%)

Trypton	5 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
demineralisiertes Wasser	500 ml
Seewasser	500 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.2 eingestellt. Bei festem Medium wurden zusätzlich 20 g Bacto Agar zugegeben.

Nutrient-broth-Agar

Nutrient broth (Difco)	8 g
Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde auf pH 7.6 eingestellt.

M-Test-Agar

(für die Testkeime *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Staphylococcus aureus*, *Mucor miehei* (Tü 284))

Malz-Extrakt	10 g
Glucose	4 g
Hefe-Extrakt	4 g
Bacto Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.3 eingestellt.

Sabouraud-Agar

(für den Testkeim *Candida albicans*)

Glucose	40 g
Bacto Pepton	10 g
Bacto Agar	20 g
demineralisiertes Wasser	1000 ml

Die Lösung wurde mit 2 N NaOH auf pH 7.3 eingestellt.

Bolds Basal Medium (BBM):

Medium für die Algenstämme *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris* und *Scenedesmus subspicatus*

NaNO ₃	250 mg
KH ₂ PO ₄	175 mg
K ₂ HPO ₄	75 mg
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	75 mg
NaCl	25 mg
CaCl ₂ ·2 H ₂ O	25 mg
Fe-EDTA	1.0 ml
Spurenelementlösung II	1.0 ml

Die Salze wurden jeweils in 10 ml H₂O gelöst. Diese Lösungen vereinigte man mit der Fe-EDTA-Lösung und der Spurenelementlösung II und füllte auf 1000 ml mit demineralisiertem Wasser auf. Bei festem Medium 15 g Agar-Zusatz.

Fe-EDTA-Lösung

Man löste 0.7 g FeSO₄·7 H₂O und 0.93 g EDTA (Titriplex III) in 80 ml H₂O unter Erwärmen. Diese Lösung wurde mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Spurenelementlösung II

Lösung A:

MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9 mg
Na ₂ MoO ₄ ·2 H ₂ O	13.0 mg
Co(NO ₃) ₂ ·6 H ₂ O	10.0 mg

Die Salze wurden jeweils in 10 ml demineralisiertem Wasser gelöst. Diese Lösungen wurden vereinigt.

Lösung B:

CuSO ₄ ·5 H ₂ O	5.0 mg
H ₃ BO ₃	10.0 mg
ZnSO ₄ ·7 H ₂ O	10.0 mg

Die Salze wurden in 10 ml demineralisiertem Wasser gelöst.

Lösung A und B wurden vereinigt und mit demineralisiertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Untersuchung ausgewählter Bakterienstämme

Terrestrische Streptomycceten

Die terrestrischen Streptomycceten stammen aus der Sammlung des Institutes für Bodenkunde von Grün-Wollny in Lohra-Kirchvers und werden dort in Reinkultur gehalten.

Stamm GW 13/580

Der Stamm GW 13/580 bildete nach dreitägigem Wachstum auf Agarplatte mit M₂-Nährmedium ein weißlich grünes Luftmycel, während die Kolonieunterseite gelb gefärbt war. Der Agar war blaßgelb verfärbt.

Primärscreening

Der Stamm GW 13/580 wurde auf M₂-Schrägagar, dann auf Agarplatten (M₂-Medium) jeweils 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden vier mit je 200 ml gefüllte 1 l-Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit 95 Upm inkubiert. Die Bakterienpellets waren beigegrünlich, das Nährmedium grüngelb gefärbt. Das Lyophilisat der Schüttelkultur wurde mit Ethylacetat extrahiert. Dabei erhielt man 310 mg eines ockerfarbenen Rohextraktes, welcher für das biologische, pharmakologische sowie chemische Screening verwendet wurde. Das Dünnschichtchromatogramm (CHCl₃/20 % CH₃OH) zeigte bei Tageslicht eine gelbe Zone ($R_f = 0.72$) und eine stark schleifende gelbe Zone, die sich mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ schwarz verfärbte ($R_f = 0.01 - 0.56$) sowie zwei Fluoreszenz löschende Zonen ($R_f = 0.81$, $R_f =$

0.83), die sich mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ orange bzw. grauviolett verfärbten. Der Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* ergab eine Mortalitätsrate von 25 %.

Tabelle 17: Aktivität des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. GW 13/580.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Bacillus subtilis</i>	22
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	30
<i>Candida albicans</i>	20
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	17
<i>Chlorella sorokiniana</i>	13
<i>Chlorella vulgaris</i>	15
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	20

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm GW 13/580 wurde als 15 l-Schüttelkultur fermentiert. Hierzu wurde er zunächst durch Überimpfen von der Erdkultur auf acht Agarplatten von M₂-Medium mit einer Inkubationsdauer von 72 h bei 28 °C kultiviert. Mit diesen Kulturen wurden 30 mit je 250 ml M₂⁺-Nährmedium gefüllte 1 l-Erlenmeyerkolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit ca. 120 Upm auf dem Linearschüttler inkubiert. Der Stamm wuchs unter Bildung von grauem Substrat-Mycel. Das Nährmedium war grüngelb gefärbt. Zum Aufbereiten der Bakterienkultur wurde die Kulturbrühe mit Celite vermischt und mit der Filterpresse filtriert. Das wäßrige Filtrat extrahierte man dreimal mit Ethylacetat. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal mit je 2 l Ethylacetat digeriert, 15 min mit Ultraschall behandelt und anschließend filtriert. Die Lösungsmittel der organischen Phasen wurden jeweils unter Vakuum entfernt und die so erhaltenen Extrakte durch Dünnschichtchromatographie (CHCl₃/10 % CH₃OH) miteinander verglichen. Da keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren, wurden die Extrakte vereinigt. Der Gesamtextrakt wurde in 250 ml Methanol aufgenommen und zweimal mit 200 ml Cyclohexan extrahiert. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum erhielt man einen gelbbraunen Methanolextrakt von 1.53 g. Die Aktivitäten dieses Extraktes zeigten nur geringe Abweichungen von den im Primärscreening erzielten Ergebnissen.

Isolierung

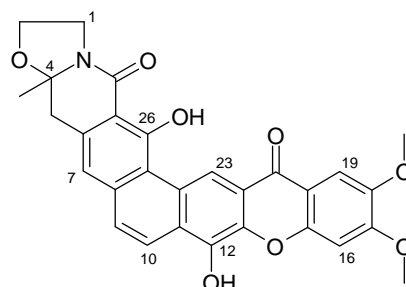
Der Methanolextrakt wurde durch Mitteldruck-Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Chloroform/Methanol-Gradienten (1.0 l CHCl₃, 500 ml CHCl₃/1 % CH₃OH, 800 ml CHCl₃/3 % CH₃OH, 1.5 l CHCl₃/5 % CH₃OH, 1.0 l CHCl₃/10 % CH₃OH) unter DC-Kontrolle (CHCl₃/10 % CH₃OH) nach ihrer Farbe sowie Fluoreszenz löschenden Eigenschaften bei 254 nm in acht Fraktionen getrennt: Fraktion 3: gelborange bei Tageslicht, $R_f = 0.55 - 0.79$, 29 mg; Fraktion 5: gelb und rot bei Tageslicht, $R_f = 0.30 - 0.70$, 30.2 mg; 7: gelbbraun bei Tageslicht, rötlich mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, $R_f = 0.15 - 0.61$, 505 mg; Fraktion 8: gelb und rot bei Tageslicht, Fluoreszenz löschend, Schwarzfärbung der gelben Zonen mit konzentrierter H₂SO₄, $R_f = 0.03 - 0.51$, 812 mg. Die Fraktionen 1, 2, 4 und 6 zeigten bei DC keine Auffälligkeiten. Das biologische Screening gab Hinweise auf aktive Verbindungen, insbesondere in den Fraktionen 3, 5, 7 und 8 (siehe Tabelle 18). Fraktion 3 wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 700 mm, CHCl₃/40 % CH₃OH) gereinigt, wodurch man 8.5 mg Acetamid (**10**) erhielt, welches bei Entfernen des Lösungsmittels von der Sephadex-Fraktion unter Vakuum im Rotationsverdampfer sublimierte. Aus Fraktion 5 konnte durch Säulenchromatographie an Sephadex (Säule 15 × 500 mm, CHCl₃/40 % CH₃OH) 3.0 mg 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) isoliert werden. Fraktion 7 wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex getrennt. Man erhielt fünf Unterfraktionen die nach DC-Kontrolle noch komplexe Substanzgemische enthielten und keine biologische Aktivität mehr aufwiesen. Fraktion 8 wurde durch PDC an Kieselgel (drei Platten 20 × 20 cm, CHCl₃/20 % CH₃OH, dreimaliges Entwickeln) aufgearbeitet. Da die Zonen stark schleiften (auch unter Zugabe einiger Tropfen konzentrierter Essigsäure), wurden sämtliche gelben Fraktionen vereinigt und eine Acetylierung des Substanzgemisches vorgenommen, da auch die Schwarzfärbung mit konzentrierter H₂SO₄ einen Hinweis auf Polyene lieferte. Dennoch konnte auch das Acetylierungsgemisch weder durch PDC an Kieselgel noch durch RP-HPLC erfolgreich getrennt werden

Tabelle 18: Aktivitäten ausgewählter Fraktionen des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. GW 13/580.

Testkeim	Fraktion 3	Fraktion 5	Fraktion 7	Fraktion 8
<i>Escherichia coli</i>	11	14	17	19
<i>Bacillus subtilis</i>	15	25	11	10
<i>Streptomyces viri- dochromogenes</i> (Tü 57)	23	34	25	21
<i>Candida albicans</i>	17	9	20	27
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	14	11	20	23
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	27	20	22
<i>Chlorella sorokiniana</i>	11	11	15	20
<i>Chlorella vulgaris</i>	11	10	7	13
<i>Scenedesmus subspi- catus</i>	11	12	12	14

Acetamid (10): C₂H₅NO (59), nadelförmiger Kristall, farblose Verbindung, löslich in MeOH, Wasser, Dichlormethan, $R_f = 0.85$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - EI-MS (70 eV): m/z (%) = 59 [M⁺] (100), 44 (86), 43 (57).

23-Desoxycervinomycin A₁ (13): C₂₉H₂₃NO₈ (513.1), gelber Feststoff, schwach rötlich mit konzentrierter H₂SO₄, kaum löslich in MeOH, CHCl₃, CH₂Cl₂, Aceton und Pyridin, schwach löslich in DMSO bei 50 °C, $R_f = 0.59$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - UV (CH₃Cl₃/50 % MeOH): $\lambda_{max} = 239$ nm, 277, 303, 381. - IR (KBr): $\nu = 3428, 1616, 1496, 1439, 1274, 1155, 1032$ cm⁻¹. - ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz, 50 °C): $\delta = 14.74$ (s, 1 H, 26-OH), 10.07 (s, 1 H, 23-H), 8.37 (d, ³J = 9 Hz, 1 H, 10-H), 7.81 (d, 9 Hz, 1 H, 9-H), 7.59 (s, 1 H, 19-H), 7.40 (s, 1 H, 7-H), 7.17 (s, 1 H, 16-H), 4.23 (m, 2 H, 2-H₂), 3.99 (s, 3 H, 17-OCH₃), 3.91 (s, 3 H, 18-OCH₃), 3.95 (m, 1 H, 1-H_A), 3.74 (m, 1 H, 1-H_B), 3.37 (d, ²J = 15, 1 H, 5-H_A), 3.27 (d, ²J = 15, 1 H, 5-H_B), 1.35 (s, 3 H, 30-H₃). - ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz, 50 °C): $\delta = 175.3$ (C-21), 164.8 (C-28), 161.0 (C-26), 155.5 (C-17), 151.7 (C-15), 146.3 (C-18), 140.9



(C-12, C-13), 136.3 (C-8), 133.4 (C-6), 127.8 (C-9), 125.9 (C-24), 125.5 (C-11), 123.5 (C-10), 120.2 (C-22), 118.5 (C-7), 117.9 (C-25), 115.9 (C-23), 113.5 (C-20), 107.2 (C-27), 105.3 (C-19), 100.0 (C-16), 92.0 (C-4), 63.8 (C-2), 56.2 (17-OCH₃), 55.8 (18-OCH₃), 41.7 (C-1), 39.9 (C-5), 22.1 (C-30). - H,H-COSY ([D₆]DMSO, 500 MHz) (H ↔ H): 1-H ↔ 2-H; 9-H ↔ 10-H. - HMBC-NMR (inverses COLOC, [D₆]DMSO, 50 °C, GHMQC_DA, F1 126 MHz, F2 500 MHz) (H → C): 1-H ²J → C-2; 1-H, 5-H, 30-H ²J → C-4; 1-H ²J → C-28; 5-H ²J → C-6; 5-H, 7-H ³J → C-27; 5-H ³J → C-7; 5-H ³J → C-30; 5-H ⁴J → C-8; 7-H, 9-H ²J → C-8; 7-H, 30-H ³J → C-5; 7-H, 9-H, 23-H ³J → C-25; 7-H ³J → C-9; 7-H ⁴J → C-28; 9-H, 23-H ³J → C-11; 10-H ³J → C-8; 10-H ³J → C-12; 10-H ³J → C-24; 10-H ⁴J → C-25; 16-H ²J → C-15; 16-H, 17-OCH₃ ²J → C-17; 16-H ³J → C-18; 16-H ³J → C-20; 17-OCH₃ ³J → C-16; 18-OCH₃, 19-H ²J → C-18; 18-OCH₃ ³J → C-19; 19-H ²J → C-20; 19-H ³J → C-15; 19-H ³J → C-17; 19-H, 23-H ³J → C-21; 19-H ⁴J → C-16; 23-H ³J → C-13; 26-OH ²J → C-25; 26-OH ²J → C-27. - EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 513 [M⁺] (100), 498 (13), 428 (95), 400 (6), 249 (7), 86 (45), 55 (30), 44 (68); CI-MS (NH₃): *m/z* (%) = 531 [M + NH₄]⁺ (72) 514 [M + H]⁺ (100).

Fermentation im 50 l-Maßstab

Der Stamm GW 13/580 im Maßstab einer 50 l-Fermenter-Kultur angezüchtet. Zunächst wurde er von der Erdkultur auf vier Agarplatten mit M₂-Medium überimpft und 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden 12 mit je 250 ml M₂-Nährmedien gefüllte 1 l-Schikanenkolben beimpft und 72 h bei 28 °C und 95 Upm inkubiert. Der Ansatz wurde schließlich bei einem Belüftungsvordruck von 0.5 atm, einem pH-Wert von 7.00 ± 1.25 (reguliert über 2 N NaOH, 2 N HCl) und einer Rührgeschwindigkeit von 200 Upm 72 h bei 28 °C fermentiert. Die Schaumbildung wurde durch regulierte Zugabe von Niax (zehnprozentige ethanolische Lösung) verhindert. Das Mycel lag in Form von graugelben Pellets vor, das Nährmedium war intensiv grüngelb gefärbt. Die Kultur wurde mit dem Ultraturax behandelt, über Celite filtriert und das Filtrat wurde viermal mit je zwei l Ethylacetat extrahiert. Der Filterrückstand wurde viermal mit Ethylacetat digeriert, 15 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Die organischen Phasen wurden vereinigt. Nach Entfernen des Lö-

sungsmittels im Vakuum resultierten 3 g eines schwerlöslichen Rohextraktes. Der Rohextrakt dieser Fermenterkultivierung enthielt im Wesentlichen Verbindungen, die in Chloroform, Dichlormethan, Methanol, DMSO, Aceton, Ethylacetat oder Gemischen aus diesen Lösungsmitteln schwerlöslich waren. Daher wurde der Extrakt durch Zentrifugieren mit jeweils einem Gemisch aus $\text{CH}_2\text{Cl}_2/50\% \text{CH}_3\text{OH}$ in zwei Fraktionen getrennt. Fraktion 1: Zentrifugat, gelbe, orange und rote Zonen bei DC bei Tageslicht ($\text{CHCl}_3/10\% \text{CH}_3\text{OH}$), löslich im Gemisch aus $\text{CHCl}_3/50\% \text{CH}_3\text{OH}$, Fluoreszenz löschende Zonen, 1.1 g. Fraktion 2: schwerlöslicher, gelbgrüner Rückstand, 2.7 g. Fraktion 1 wurde ohne vorausgehende Extraktion mit Cyclohexan durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel (Säule 40×750 mm) mit einem Stufengradienten aus Chloroform und Methanol (1 l CHCl_3 , 500 ml $\text{CHCl}_3/1\% \text{CH}_3\text{OH}$, 800 ml $\text{CHCl}_3/3\% \text{CH}_3\text{OH}$, 1 l $\text{CHCl}_3/5\% \text{CH}_3\text{OH}$, 500 ml $\text{CHCl}_3/10\% \text{CH}_3\text{OH}$) in sechs Fraktionen (a-f) getrennt. Die Trennkriterien waren Farbigkeit und Fluoreszenzlöschung bei DC bei 254 nm ($\text{CHCl}_3/10\% \text{CH}_3\text{OH}$): Die Fraktionen 1a-1d stellten bei jeweils relativ geringer Fraktionsmenge noch sehr komplexe Substanzgemische dar und zeigten keine herausragenden Auffälligkeiten bei DC. Fraktion 1e: gelbbraune und rote Zone bei Tageslicht, fluoreszierende Zone bei 366 nm, $R_f = 0.26 - 0.96$ ($\text{CHCl}_3/10\% \text{CH}_3\text{OH}$), 130 mg; Fraktion 1f: gelbe, schleifende Zone bei Tageslicht mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$ schwarz, Fluoreszenz löschende Zone bei 254 nm, $R_f = 0.09 - 0.70$, 180 mg. Die Fraktion 1e wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (Säule 30×800 mm, $\text{CHCl}_3/40\% \text{CH}_3\text{OH}$) unter DC-Kontrolle in fünf Unterfraktionen getrennt, die noch immer komplexe Gemische mit Fluoreszenz löschenden und bei Tageslicht gelben Verbindungen darstellten. Hierbei erhielt man aus der Unterfraktion 3 nach Trennung mit RP-HPLC (mit $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-Azeotrop/H}_2\text{O} = 10/90$ beginnen, für 10 min halten, Anstieg auf $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-Azeotrop/H}_2\text{O} = 100/0$ in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) 0.5 mg einer bei Tageslicht gelben Verbindung ($R_f = 0.58$, $\text{CHCl}_3/10\% \text{CH}_3\text{OH}$), die sich mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$ zunächst grün, nach ca. 1-2 h orange verfärbt. Jedoch war die Substanzmenge für weitere Untersuchungen nicht ausreichend. Fraktion 1f wurde durch präparative RP-HPLC (mit $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-Azeotrop/H}_2\text{O} = 10/90$ beginnen, für 10 min halten, Anstieg auf $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-Azeotrop/H}_2\text{O} = 100/0$ in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) gereinigt. Dabei erhielt man 1 mg einer Verbindung

mit $m/z = 527$ (**14**; $t_R = 22.1$ min). Aufgrund des schlechten Lösungsverhaltens von **15** konnten keine zufriedenstellenden $^1\text{H-NMR}$ - oder $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren erhalten werden. - Bei der Untersuchung von Fraktion 2 konnten nach dreimaligem Waschen der schwerlöslichen Verbindungen mit CH_3OH und anschließender Reinigung mit PDC ($\text{CHCl}_3/20\% \text{CH}_3\text{OH}$) zwei Verbindungen mit den molaren Massen $m/z = 527$ (**14**) ($R_f = 0.70$, $\text{CHCl}_3/20\% \text{CH}_3\text{OH}$, 20 mg) und $m/z = 529$ (**15**) ($R_f = 0.80$, $\text{CHCl}_3/20\% \text{CH}_3\text{OH}$, 13.3 mg) isoliert werden. Da von **15** aufgrund der schlechten Löslichkeit in diversen Lösungsmitteln kein auswertbares $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum erhalten werden konnte, wurde die Verbindung acetyliert. Die gesuchte Verbindung 23-Desoxycervinomycin A_1 (**13**) konnte in keiner Fraktion nachgewiesen werden.

Cervinomycin A₁ (15): $\text{C}_{29}\text{H}_{23}\text{NO}_9$ (529.1),

gelber Feststoff, sehr schwer löslich in Methanol, Aceton, Pyridin; schwer löslich in Chloroform und Dichlormethan, $R_f = 0.68$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\% \text{CH}_3\text{OH}$).

- UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 250$ nm, 271, 280, 289. - IR

(KBr): $\nu = 3436, 2927, 1622, 1508, 1472, 1432,$

$1385, 1275, 1236, 1110, 1030, 866, 759, 699 \text{ cm}^{-1}$. - $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): δ^*

$= 15.35$ (s, 1 H, 23-OH), 14.36 (s, 1 H, 26-OH) 8.36 (d, $^3J = 9.7$ Hz, 1 H, 10-H), 7.79

(d, $^3J = 9.7$ Hz, 1 H, 9-H), 7.62 (s, 1 H, 19-H), 7.25-7.20 (s, unter Lösungsmittelsig-

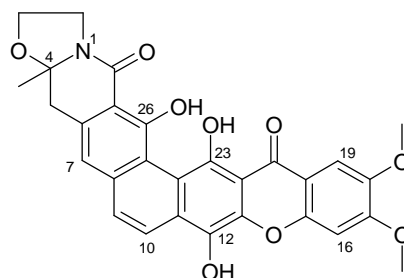
nal, 1 H, 16-H), 7.15 (s, 1 H, 7-H), 4.30-4.23 (m, 2 H, 2- H_2), 4.02, 4.01 (2s, 6 H, 2

OCH_3), 4.03-4.09 (m, 2 H, 2- H_2), 4.02-3.99, 3.75-3.69 (2m, 2 H, 1- H_2), 3.25, 2.56

(2m, 2 H, 5- H_2), 1.39 (s, 3 H, 30- H_3). - EI-MS (70 eV): m/z (%) = 529 [M] $^+$ (100),

513 (33) 444 (38).

* vorläufige Zuordnungen

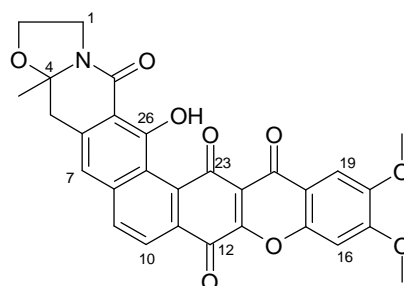


Cervinomycin A₂ (14): $\text{C}_{29}\text{H}_{21}\text{NO}_9$ (527.6),

gelber Feststoff, schwer löslich in Methanol, Aceton, Pyridin; mäßig löslich in Chloroform und

Dichlormethan, $R_f = 0.75$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\% \text{CH}_3\text{OH}$). -

UV (CHCl_3): $\lambda_{\text{max}} = 303$ nm, 336, 382. - IR (KBr):

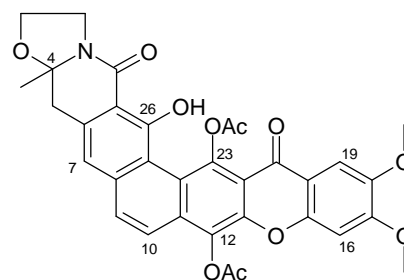


$\nu = 3430, 2928, 1623, 1507, 1474, 1432, 1385, 1276, 1227, 1122, 1028, 993, 866, 759, 620 \text{ cm}^{-1}$. - $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): $\delta = 13.76$ (s, 1 H, 26-OH), 8.20 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 10-H), 7.90 (d, $^3J = 8.3$ Hz, 1 H, 9-H), 7.65 (s, 1 H, 19-H), 7.15 (s, 1 H, 7-H), 7.13 (s, 1 H, 16-H), 4.25 (t, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, 2-H₂), 4.05 (m, 1 H, 1-H_A)*, 3.79-3.75 (m, 1 H, 1-H_B), 3.30-3.20 (m, 2 H, 5-H₂), 1.39 (s, 3 H, 30-H). - $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): $\delta = 181.8$ (C_q, C-23), 178.6 (C_q, C-12), 172.5 (C_q, C-21), 164.6 (C_q, C-28), 161.5 (C_q, C-26). 155.6 (C_q, C-17), 153.8 (C_q, C-13), 151.1 (C_q, C-15), 148.8 (C_q, C-18), 140.8 (C_q, C-8), 138.2 (C_q, C-24), 136.6 (C_q, C-6), 132.2 (CH, C-9), 129.6 (C_q, C-11), 123.8 (CH, C-10), 121.0 (2 C_q, C-22, C-25), 119.8 (C_q, C-20), 117.3 (CH, C-7), 107.2 (C_q, C-27), 104.7 (CH, C-19), 100.5 (CH, C-16), 92.2 (C_q, C-4), 64.3 (CH₂, C-2), 56.6 (CH₃, 17-OCH₃), 56.5 (CH₃, 18-OCH₃), 42.1 (CH₂, C-1), 41.1 (CH₂, C-5), 22.9 (CH₃, C-30). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1077.1 [2M+Na]⁺ (100); 550.6 [M+Na]⁺ (31).

* vorläufige Zuordnung

Acetylierung von Cervinomycin A₁ (15): Zu 2.5 mg Cervinomycin A₁ gab man je 4 ml Acetanhydrid, 1.0 ml Pyridin und ca. 0.1 mg DMAP. Die Lösung wurde 24 h bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wurde im Vakuum eingedunstet und anschließend in etwas CH₃CN aufgenommen. Durch semipräparative RP-HPLC (mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10/90 beginnen, für 10 min halten, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) wurde das Reaktionsgemisch gereinigt, wobei man 1.0 mg der Verbindung (**41**; $t_R = 12.5$ min) erhielt. Der R_f -Wert ($R_f = 0.96$) von **41** unterschied sich von dem R_f -Wert von Cervinomycin A₁ (**15**) ($R_f = 0.68$) (CHCl₃/10 % CH₃OH).

Cervinomycin A₁-diacetat (16): C₃₃H₂₇O₁₁N (613.4), gelber Feststoff, rötlich mit konzentrierter H₂SO₄; $R_f = 0.96$ (CHCl₃/10 % CH₃OH). - UV (MeOH): $\lambda_{\text{max}} = 228, 258, 279, 304, 355, 371, 440$. - $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 MHz): $\delta = 14.98$ (s, 1 H, 26-



OH), 7.69 (s, 1 H, 7-H), 7.66 (s, 1 H, 19-H), 7.63 (d, $^3J = 3.9$ Hz, 1 H, 9-H), 7.58 (d, $^3J = 3.9$ Hz, 1 H, 10-H), 6.89 (s, 1 H, 16-H), 4.26–4.18 (m, 2 H, 2-H), 4.04–4.01 (m, 1 H, 1-H_A), 4.00 (s, 6 H, 17-OCH₃, 18-OCH₃), 3.76–3.64 (m, 1 H, 1-H_B), 3.31 (s, 2 H, 5-H), 2.60 (s, 3 H, 23-COCH₃), 2.10 (s, 3 H, 12-COCH₃), 1.50 (s durch m überlagert, 3 H, 4-CH₃). – ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 181.4$ (C-21), 174.5 (C-28), 168.8 (23-COCH₃*), 168.3 (12-COCH₃*), 159.5 (C-26), 156.4 (C-17), 155.6 (C-12), 155.6 (C-23), 152.3 (C-15), 147.0 (C-18), 144.6 (C-13), 135.5 (C-6), 132.4 (C-8), 130.6 (C-11**), 130.1 (C-24**), 129.9 (C-9), 123.7 (C-10), 121.1 (C-7), 118.0 (C-22), 112.8 (C-20), 112.3 (C-25), 105.7 (C-27), 104.6 (C-19), 99.5 (C-16), 92.2 (C-4), 64.4 (C-2), 56.3 (17-OCH₃), 56.3 (18-OCH₃), 43.2 (C-1), 41.2 (C-5), 23.1 (C-30), 20.52 (12-COCH₃), 20.47 (23-COCH₃). – H,H-COSY (CDCl₃, 500 MHz) (H \leftrightarrow H): 1-H \leftrightarrow 2-H; 9-H \leftrightarrow 10-H. – HMBC-NMR (inverses COLOC, CDCl₃, GHMQC_DA, F1 125 MHz, F2 500 MHz) (H \rightarrow C): 2-H, 5-H, 30-H $^2J \rightarrow$ C-4; 5-H, 7-H $^2J \rightarrow$ C-6; 5-H, 9-H $^3J \rightarrow$ C-7; 5-H $^3J \rightarrow$ C-30; 7-H $^2J \rightarrow$ C-8; 7-H $^3J \rightarrow$ C-9; 7-H $^3J \rightarrow$ C-25; 7-H $^4J \rightarrow$ C-28; 9-H $^3J \rightarrow$ C-11; 16-H $^2J \rightarrow$ C-15; 16-H $^2J \rightarrow$ C-17; 16-H $^3J \rightarrow$ C-18; 16-H $^3J \rightarrow$ C-20; 16-H $^4J \rightarrow$ C-21; 17-OCH₃ $^2J \rightarrow$ C-17; 18-OCH₃ $^2J \rightarrow$ C-18; 19-H $^2J \rightarrow$ C-18; 19-H $^2J \rightarrow$ C-20; 19-H $^3J \rightarrow$ C-15; 19-H $^3J \rightarrow$ C-17; 19-H $^3J \rightarrow$ C-21; 26-OH $^2J \rightarrow$ C-25; 26-OH $^3J \rightarrow$ C-27; 30-H $^3J \rightarrow$ C-1. – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1249 [2M+Na]⁺ (30), 636 [M+Na]⁺ (29); (-)-ESI-MS: m/z (%) = 612 [M-H]⁻ (100); EI-MS (70 eV): m/z (%) = 613 [M]⁺ (22), 571 [M-COCH₃]⁺ (88), 529 [M-2COCH₃]⁺ (100).

*, **Signale sind jeweils gegeneinander austauschbar

Stamm GW 13/1783

Der Stamm GW 13/1783 bildete auf Agar (M₂-Nährmedium) nach drei Tagen ein weißgraues Luftmycel, während die Kolonieunterseite grau gefärbt war. Der Agar war gelb verfärbt.

Primärscreening

Der Stamm GW 13/1783 wurde von M₂-Schrägagar auf Agarplatten (M₂-Medium) überimpft und für 72 h bei 28 °C kultiviert. Mit den Agarplatten wurde

eine 1 l-Schüttelkultur hergestellt (fünf 1 l-Schikanekolben mit je 200 ml M₂-Nährmedium) und diese für 72 h bei 28 °C und 95 Upm inkubiert. Der Stamm wuchs unter Bildung eines beigen Substratmycels, die Nährlösung war dunkelbraun gefärbt. Die Kulturbrühe wurde lyophilisiert und dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Man erhielt 310 mg eines braungelben Rohextraktes, der für das chemische und biologische Screening verwendet wurde. Das Dünnschichtchromatogramm (CHCl₃/10 % CH₃OH) zeigte bei Tageslicht eine intensiv gelbe Zone mit $R_f = 0.90$ sowie verschiedene Fluoreszenz löschende und fluoreszierende Zonen mit R_f -Werten im Bereich von 0.06-0.41. Die bei Tageslicht farblosen Zonen mit den R_f -Werten von 0.38 und 0.32 färbten sich nach Ansprühen mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ orange bzw. gelb. Das biologische Screening (Plattendiffusionstest) zeigte die in Tabelle 19 wiedergegebenen Aktivitäten.

Tabelle 19: Aktivität des Rohextraktes aus *Streptomyces* sp. GW 13/1783.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	27
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	25 (reduziertes Wachstum)
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0

Fermentation und Aufarbeitung

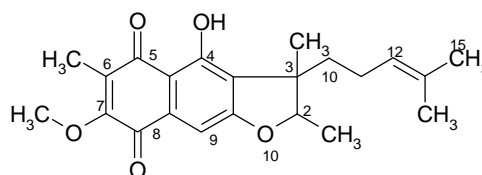
Der Stamm GW 13/1783 wurde von Erdkultur auf zehn Agarplatten (M₂-Medium) überimpft und 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden 96 1 l-Erlenmeyerkolben mit je 250 ml M₂-Nährlösung beimpft und diese für einen Zeitraum von 5 d bei 28 °C auf dem Linearschüttler inkubiert. Nach 4 d färbte sich die Nährlösung intensiv gelb. Die Kulturbrühe wurde zum Aufarbeiten mit Celite vermischt und mit der Filterpresse filtriert. Das so erhaltene wäßrige Filtrat wurde fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal in Ethylacetat und dreimal in Aceton digeriert, 15 min im Ultraschall behandelt

und anschließend filtriert. Die organischen Phasen wurden durch DC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ CH_3OH) miteinander verglichen und hieraufhin vereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum erhielt man einen braungelben Rohextrakt (1.8 g), der Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* (Hemmhof Ø 29 mm) und *Mucor miehei* (Tü 284) (Hemmhof Ø 20 mm) aufwies. Gegen *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57) konnte im Gegensatz zum Primärscreening keine Wachstumshemmung beobachtet werden.

Isolierung

Der Extrakt wurde durch Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten (500 ml Cyclohexan, 500 ml CH_2Cl_2 , je 250 ml beginnend bei $\text{CH}_2\text{Cl}_2/2\%$ CH_3OH in Stufen von 2 % CH_3OH bis 10 % CH_3OH , 250 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/20\%$ CH_3OH , 250 ml $\text{CH}_2\text{Cl}_2/30\%$ CH_3OH) getrennt. Nach DC-Kontrolle ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ CH_3OH , Farbigkeit der DC-Zonen bei Tageslicht, Reaktion mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 -Sprühreagenz, Fluoreszenzlöschung) wurde der Rohextrakt in vier Fraktionen unterteilt. Fraktion 1: farblos, violette Zone mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$ $R_f = 0.98$, 400.5 mg; Fraktion 2: blaßgelb, bei Tageslicht schwach gelbe Zone, $R_f = 0.86$; Fluoreszenz löschende Zone, violett mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$, $R_f = 0.95$, 204.3 mg; Fraktion 3: gelbe Zone bei Tageslicht, rot mit NaOH, $R_f = 0.80$, 132.6 mg; Fraktion 4: bei Tageslicht farblose Zonen, graubraun mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$, $R_f = 0.62-0.10$, 721.0 mg. Im Plattendiffusionstest fiel allein die Fraktion 3 mit einer Aktivität gegen *Bacillus subtilis* (Hemmhof Ø 28 mm) auf. Die Fraktion 3 wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (Säule 30×800 mm, ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/40\%$ CH_3OH) in acht Unterfraktionen getrennt, wobei die Unterfraktionen 3a-3f noch sehr komplexe Substanzgemische enthielten und keine Aktivitäten im Plattendiffusionstest mehr aufwiesen. Die Unterfraktionen 3g-3h wiesen neben fluoreszenzlöschenden Zonen die gesuchte gelbe Zone mit $R_f = 0.80$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ CH_3OH) auf. Die Unterfraktionen 3g und 3h wurden durch semipräparative HPLC (mit $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ -Azeotrop/ $\text{H}_2\text{O} = 10/90$ beginnen, für 10 min halten, Anstieg auf $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ -Azeotrop/ $\text{H}_2\text{O} = 100/0$ in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) gereinigt. Aus ihnen wurde das Furanonaphthochinon **17**; ($R_t = 19.0$ min)⁴¹ isoliert.

4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dion



(17): C₂₂H₂₆O₅ (370.2), gelber Feststoff, rot mit NaOH; $R_f = 0.8$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). – ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 9.85$ (s, 1 H, 4-OH), 6.69 (s, 1 H, 9-H), 4.62 (t, ³J = 5.9 Hz, 1 H, 12-H), 4.35 (q, ³J = 6.4 Hz, 1 H, 2-H), 3.53 (s, 3 H, 7-OCH₃), 1.56 (s, 3 H, 6-CH₃), 1.54-1.46 (m, 4 H, 10-H₂, 11-H₂), 1.20 (s, 3 H, 15-H₃), 1.10 (s, 3 H, 14-H), 0.98 (d, ³J = 6.4 Hz, 3 H, 2-CH₃), 0.79 (s, 3 H, 3-CH₃) – ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 184.2$ (C_q, C-5), 181.3 (C_q, C-8), 161.2 (C_q, C-4), 157.4 (C_q, C-9a), 156.9 (C_q, C-7), 134.1 (C_q, C-6), 133.2 (C_q, C-8a), 132.0 (C_q, C-13), 127.9 (C_q, C-3a), 123.8 (CH, C-12), 109.4 (C_q, C-9), 109.3 (C_q, C-4a), 88.1 (CH, C-2), 60.7 (CH₃, 7-OCH₃), 46.8 (C_q, C-3), 37.7 (CH₂, C-10), 25.7 (CH₃, C-15), 23.7 (CH₂, C-11), 19.6 (CH₃, 3-CH₃), 17.6 (CH₃, C-14), 15.4 (CH₃, 2-CH₃), 9.4 (CH₃, 6-CH₃). – (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1133 [3M+Na]⁺ (4); 763 [2M+Na]⁺ (100). – (-)-ESI-MS: m/z (%) = 369 [M-H]⁺. – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 370 [M⁺] (55), 287 (100), 259 (20), 189 (18), 55 (15), 41 (23).

Stamm GW 16/3993

Der Stamm GW 16/3993 bildete auf Agarplatte (M₂-Nährmedium) nach drei Tagen ein schwarzes Luftmycel, während der Agar dunkelgelb gefärbt war.

Primärscreening

Der Stamm GW 16/3993 wurde von M₂-Schrägagar auf Agarplatten (M₂-Medium) überimpft und für 72 h bei 28 °C kultiviert. Diese Kulturen dienten zum Beimpfen von vier mit je 200 ml M₂-Nährmedium gefüllten 1 l-Schikanekolben. Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 28 °C mit 95 Upm lagen ein dunkelbraunes Substrat-Mycel sowie eine gelb gefärbte Nährlösung vor. Die Kulturbrühe wurde lyophilisiert und im Anschluß dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Man erhielt 130 mg eines dunkelbraunen Rohextraktes, der für das biologische und chemische Screening verwendet wurde. Im Dünnschichtchromatogramm waren neben Fluoreszenz löschenden Zonen zwei bei Tageslicht gelbe Zonen ($R_f = 0.38$ und 0.58) auffällig.

Tabelle 20: Aktivitäten des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. GW 16/3993 im Plattendiffusionstest.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	0
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	22
<i>Staphylococcus aureus</i>	19
<i>Chlorella sorokiniana</i>	10
<i>Chlorella vulgaris</i>	12
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	12

Im Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* wurde eine Mortalitätsrate von 55 % beobachtet.

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm GW 16/3993 wurde von Erdkultur auf Agarplatten mit M₂-Nährmedium überimpft und 72 h bei 28 °C kultiviert. Mit diesen Kulturen wurden 80 mit je 250 ml M₂-Nährmedium gefüllte Erlenmeyerkolben beimpft und 5 d bei 28 °C auf dem Linearschüttler inkubiert. Der Stamm bildete ein feines dunkelbraunes Substratmycel, nach 3 d war die Nährlösung schwach gelb, nach 5 d intensiv gelb gefärbt. Die Kulturbrühe wurde mit Celite vermengt und mit der Filterpresse filtriert. Das hieraus resultierende wäßrige Filtrat extrahierte man viermal mit Ethylacetat, der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde viermal mit Ethylacetat und dreimal mit Aceton digeriert, 20 min im Ultraschall belassen und anschließend filtriert. Sämtliche organische Phasen wurden vereinigt, da nach DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH; Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ) keine Unterschiede festzustellen waren. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum entfernt, wodurch man 2.2 g eines dunkelbraunen Rohextrakts erhielt. Zur weiteren Bearbeitung wurde der Rohextrakt in Methanol aufgenommen und durch zweimalige Extraktion mit Cyclohexan von den sehr unpolaren Verbindungen befreit. Das Volumen der Methanolphase wurde im Vakuum reduziert. Man überprüfte die Aktivität der Methanolphase durch Bioautographie (DC-Bedingungen wie bei DC-Kontrolle, s.o.). Dabei konnten Aktivitäten gegen die gleichen Testkeime wie im Primärscreening festgestellt werden. Diese Aktivitäten konzentrierten sich

auf eine bei Tageslicht gelbe Zone, $R_f = 0.85$. Schließlich wurde die Methanolphase durch Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem Stufengradienten (300 ml Cyclohexan, 500 ml CH_2Cl_2 , je 250 ml beginnend bei $\text{CH}_2\text{Cl}_2/5\%$ EtOAc in Stufen von 5 % EtOAc bis 40 % EtOAc, je 250 ml beginnend bei $\text{CH}_2\text{Cl}_2/40\%$ EtOAc in Stufen von 10 % EtOAc bis 100 % EtOAc, je 250 ml beginnend bei EtOAc/2 % CH_3OH in Stufen von 2 % CH_3OH bis 10 % CH_3OH , je 250 ml beginnend bei EtOAc/10 % CH_3OH in Stufen von 10 % bis 100 % CH_3OH) unter DC- und Bioaktivitätskontrolle in fünf Fraktionen getrennt. Fraktion 1: farblos bei Tageslicht, dunkelbraun mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$, $R_f = 0.8-0.96$, Fluoreszenz löschende Zonen (254 nm), $R_f = 0.36-0.60$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ CH_3OH), 523.0 mg; Fraktion 2: Fluoreszenz löschende, stark schleifende Zonen, $R_f = 0.01-0.96$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/10\%$ CH_3OH), 392.4 mg; Fraktion 3: Fluoreszenz löschende Zone, gelb mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$, $R_f = 0.43$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/20\%$ CH_3OH), 15.4 mg; Fraktion 4: gelbe Zone bei Tageslicht, grün mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$, $R_f = 0.57$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/20\%$ CH_3OH), 231.5 mg; Fraktion 5: stark schleifende, bei Tageslicht gelbe Zone, grün mit Anisaldehyd/ $\text{H}_2\text{SO}_4/\Delta$, $R_f = 0.43-0.67$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/20\%$ CH_3OH), 282.4 mg.

Tabelle 21: Aktivitäten der fünf Hauptfraktionen von GW 16/3993, (Hemmhof Ø [mm])

Testkeim	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4*	Fraktion 5
<i>Escherichia coli</i>	0	0	13	17	18
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	16	20
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0	0	10	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	8	8	16	24

* die hier aufgeführten Aktivitäten ließen sich auch im Bioautogramm nachweisen.

Dabei konnte in Fraktion 4 die im Bioautogramm aktive Verbindung wiedergefunden werden. Fraktion 4 wurde durch PDC an Kieselgel (4 Platten, 20 × 20 cm, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/20\%$ CH_3OH) und anschließender SC an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 800 mm, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/40\%$ CH_3OH) gereinigt. Man erhielt 5.6 mg Mithramycin (**20**).

Mithramycin (20):C₅₂H₇₆O₂₄ (1084.6),

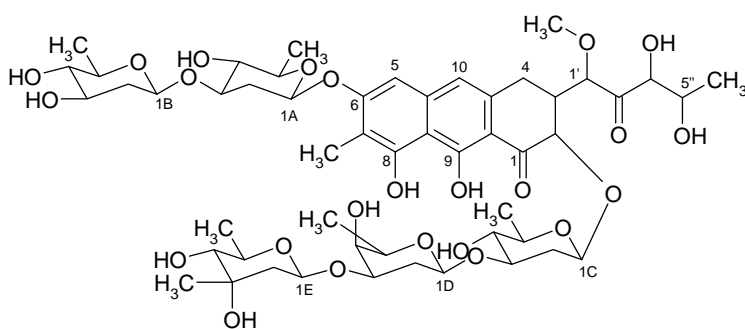
gelbgrüner Feststoff;

schwer löslich in CHCl₃,

Aceton; löslich in Me-

thanol, DMSO; graugrün

mit Anisalde-



hyd/H₂SO₄/Δ, $R_f = 0.16$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - ¹H-NMR (CD₃OH, 600 MHz): δ^* = 6.61 (s, 1 H, C-5), 6.43 (s, 1 H, C-10), 5.20 (d, ³J = 9.6 Hz, 1 H, 1A-H), 5.17 (d, ³J = 9.6 Hz, 1 H, OCH), 4.75 (s, 1 H, 1'-H), 4.72-4.70 (m, 3 H, 3 × OCH), 4.44 (d, ³J = 11.6 Hz, 1 H, 2-H), 4.22 (dq, ³J = 2.8 Hz, ³J = 6.7 Hz, 1 H, 4'-H), 4.16 (d, ³J = 2.8 Hz, 1 H, 3'-H), 3.83-3.79 (m, 1 H, OCH), 3.79-3.74 (m, 1 H, OCH), 3.71-3.69 (m, 2 H, 2 × OCH), 3.56-3.49 (m, 4 H, 4 × OCH), 3.41 (s, 3 H, 1'-OCH₃), 3.35-3.32 (m, 2 H, 2 × OCH), 3.13 (t, ³J = 8.8 Hz, 1 H, OCH), 3.02-2.91 (m, überlagert durch Lösungsmittelsignal, 3 H, 2 × OCH, 4-H_A), 2.84-2.79 (m, 1 H, OCH), 2.74-2.68 (m, 1 H, 3-H), 2.60 (dd, ³J = 4.3 Hz, ³J = 16.8 Hz, 1 H, 4-H_B), 2.40 (dd, ³J = 4.3 Hz, ³J = 12.0 Hz, 1 H, H_A-CH₂), 2.18 (m, 3 H, CH₂, H_B-CH₂), 2.15 (s, 3 H, 7-CH₃), 2.12 (m, 3 H, H_A'-CH₂, CH₂), 1.92 (dd, ³J = 1.5 Hz, 13.7 Hz, 1 H, H_A''-CH₂), 1.60-1.54 (m, 2 H, H_B'-CH₂, H_A'''-CH₂), 1.44 (m, 1 H, H_B''-CH₂), 1.39 (d, ³J = 6.0 Hz, 3 H, CH₃), 1.27 (m, 1 H, H_B'''-CH₂), 1.31 (d, ³J = 6.0 Hz, 6 H, 2 × CH₃), 1.26 (s, 3 H, CH₃), 1.25-1.23 (m, 6 H, 2 × CH₃), 1.21 (d, ³J = 6.0 Hz, 3 H, CH₃). - ¹³C-NMR (CD₃OH, 125 MHz): δ = 213.7 (C_q, C-2'), 197.7 (C_q, C-1), 177.3 (C_q, C-8), 162.0 (C_q, C-9), 160.8 (C_q, C-6), 140.4 (C_q, C-10a), 139.4 (C_q, C-4a), 113.4 (C_q, C-10), 113.0 (CH, C-9a), 111.7 (C_q, C-8a), 108.7 (C_q, C-7), 101.7 (OCH), 101.3 (OCH), 100.9 (OCH), 100.0 (OCH), 99.8 (OCH), 99.7 (OCH), 84.3 (OCH), 83.5 (CH, C-1'), 81.1 (OCH), 80.0 (CH, C-3'), 78.3 (CH, C-2), 78.2 (OCH), 77.9 (OCH), 77.5 (OCH), 76.9 (OCH), 76.3 (OCH), 73.6 (OCH), 73.5 (OCH), 72.7 (OCH), 72.0 (OCH), 71.9 (OCH), 71.7 (OCH), 71.2 (OCH), 69.6 (OCH), 69.2 (CH, C-4'), 59.6 (CH₃, OCH₃-

1'), 45.4 (CH₂), 43.7 (CH, C-3), 40.6 (CH₂), 38.4 (CH₂), 38.2 (CH₂), 33.4 (CH₂), 29.4 (CH₂, C-4), 27.3 (CH₃), 19.8 (CH₃), 19.2 (CH₃), 19.1 (CH₃), 18.4 (CH₃), 18.1 (CH₃), 17.0 (CH₃), 8.3 (CH₃, CH₃-7). - (+)-ESI-MS: $m/z = 1107 [M+Na]^+$ (100). - (-)-ESI-MS: $m/z = 1083 [M-H]^-$, (100).

*Die Bezifferung der C-Atome für **20** wurde von S. E. Wohlert *et al.*⁴⁴ übernommen.

Stamm GW 44/1571

Der Stamm GW 44/1571 aus Teneriffa bildete nach dreitägiger Kultivierung auf Agar (M₂-Nährmedium) ein weißes Luftmycel, während die Kolonieunterseite dunkelrot gefärbt war. Der Agar war rötlichbraun verfärbt.

Primärscreening

Der Stamm GW 44/1571 wurde auf M₂-Schrägagar, dann auf Agarplatten jeweils 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden vier mit je 200 ml M₂-Nährmedium gefüllte 1 l-Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit 95 Upm inkubiert. Das Substrat-Mycel sowie die Nährlösung waren dunkelrot gefärbt. Das Lyophilisat der Schüttelkultur wurde mit Ethylacetat extrahiert, wobei man einen Rohextrakt von 97.8 mg erhielt, der in das chemische und biologische Screening eingesetzt wurde. Bei dem chemischen Screening fielen bei DC (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) vier interessante, bei Tageslicht rote Zonen auf ($R_f = 0.70$ und $R_f = 0.64$, gelb mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ; $R_f = 0.48$, orange mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, $R_f = 0.01 - 0.33$, stark schleifend). Im biologischen Screening konnten die in Tabelle 22 dargestellten Aktivitäten gemessen werden.

Tabelle 22: Aktivität des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. GW 44/1571.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Bacillus subtilis</i>	21
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	18
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18
<i>Chlorella sorokiniana</i>	11
<i>Chlorella vulgaris</i>	11
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0

Im Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* wurde eine Mortalitätsrate von 93 % beobachtet.

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm GW 44/1571 wurde von Erdkultur auf sechs Agarplatten (M₂-Nährmedium) überimpft, mit welchen anschließend (nach einer Wachstumsdauer von 72 h bei 28 °C) 60 mit je 250 ml M₂-Nährmedium gefüllte 1 l-Schikanekolben beimpft wurden. Nach dreitägigem Wachstum wurde die Fermentation beendet. Sowohl das Substrat-Myzel als auch die Nährlösung waren dunkelrot gefärbt. Das Nährmedium wurde vom Zellmaterial getrennt, indem man die Kulturbrühe mit Celite versetzte und durch die Filterpresse filtrierte. Das wäßrige Filtrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal in Ethylacetat digeriert, 15 min mit Ultraschall behandelt und anschließend filtriert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, da bei DC keine Unterschiede festzustellen waren. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum lag ein dunkelroter Rohextrakt von 2.8 g vor.

Isolierung

Der Rohextrakt wurde in Methanol gelöst und zweimal mit Cyclohexan extrahiert. Die resultierende Methanolphase wurde durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel getrennt (Säule 25 × 330 mm; Fließmittelgradient: 300 ml

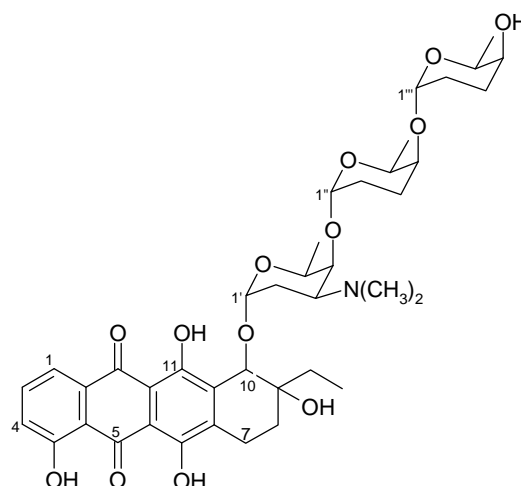
CH₂Cl₂, 250 ml CH₂Cl₂/5 % EtOAc, 500 ml CH₂Cl₂/20 % EtOAc, 100 ml CH₂Cl₂/30 % EtOAc, 200 ml CH₂Cl₂/60 % EtOAc, 100 ml EtOAc, 250 ml EtOAc/5 % CH₃OH, 750 ml EtOAc/10 % CH₃OH, 200 ml EtOAc/20 % CH₃OH). Durch DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, Beurteilung des DC bei Tageslicht und nach Reaktion mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ-Sprühreagenz) unterteilte man in sechs Fraktionen. Fraktion 1: gelblich bei Tageslicht, Fluoreszenz löschend bei 254 nm, gelb mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, $R_f = 0.94$, 107.8 mg; Fraktionen 2 - 4 und 6: rot, komplexe Substanzgemische bei geringer Fraktionsmenge, stark schleifende Zonen bei DC. Fraktion 5: stark schleifende, bei Tageslicht rote Zone, blaue Farbreaktion mit NaOH, $R_f = 0.01 - 0.40$, Fluoreszenz löschende Zone, $R_f = 0.42$, 442.7 mg;

Tabelle 23: Aktivität ausgewählter Fraktionen des Rohextraktes des Stammes GW 44/1571 (Hemmhof Ø [mm]).

Testkeim	Fraktion 1	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5
<i>Escherichia coli</i>	28	23	25	20	25
<i>Bacillus subtilis</i>	27	23	21	20	25
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	20	17	11	17	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	23	21	18	18	23
<i>Chlorella sorokiniana</i>	17	12	0	0	18
<i>Chlorella vulgaris</i>	15	12	0	0	16
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	13	0	0	0	12

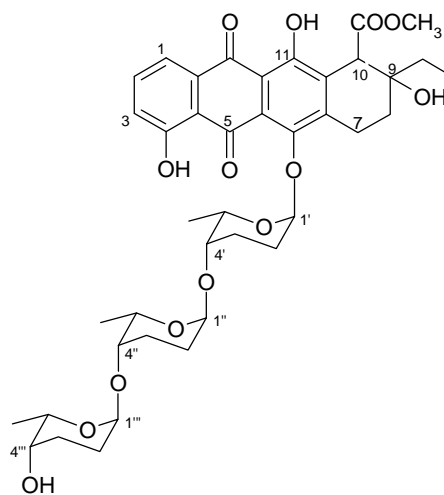
Die Fraktion 5 wurde durch PDC an Kieselgel (fünf Platten, 20 × 20 cm, CH₂Cl₂/Aceton/CH₃OH = 9: 0.5: 0.5) in drei Unterfraktionen, 5a-5c geteilt, die jeweils noch Substanzgemische enthielten. Die Fraktion 5c trennte man durch SC an Sephadex LH-20 (Säule 25 × 85 cm, CH₂Cl₂/40 % CH₃OH). Man erhielt dabei mehrere rote Fraktionen, von welchen durch Reinigung mit PDC an Kieselgel CH₂Cl₂/5 % CH₃OH) 15.5 mg Cosmomycin A (**22**) und 4.5 mg Cytorhodin J (**25**) erhalten wurden.

Cosmomycin A (22): C₄₀H₅₃NO₁₃ (755.6), roter Feststoff, blaue Verfärbung mit NaOH, $R_f = 0.25$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): $\delta = 13.83$ (s, 1 H, C-OH), 12.63 (s, 1 H, C-OH), 12.08 (s, 1 H, C-OH), 7.77 (d, ³J = 7.4 Hz, 1 H, 1-H), 7.66-7.59 (m, 1 H, 2-H), 7.22-7.18 (m, 1 H, 3-H), 5.48 (s, 1 H, 1'-H), 5.02 (s, 1 H, CH), 4.91 (s, 1 H, 10-H), 4.79 (s, 1 H, CH), 4.21-4.15 (m, 1 H, CH), 4.02-4.00 (m, 1 H, 4'-H), 3.99-3.97 (m, 2 H, CH), 3.96-3.92 (m, 1 H, 5'-H), 3.63-3.59 (m, 1 H, CH), 3.58-3.54 (m, 1 H, CH), 3.23-3.13 (m, 1 H, 3'-H), 2.95-2.90 (m, 1 H, 7-H_A), 2.85-2.75 (m, 1 H, 7-H_B), 2.67 (s, 3 H, NCH₃), 2.53 (s, 3 H, NCH₃), 2.30-2.19 (m, 2 H, 2'-H₂), 2.09-1.57 (m, 8 H, 4 × CH₂), 2.09-1.95 (m, 1 H, 8-H_A), 1.80-1.62 (m, 3 H, 8-H_B, 13-CH₂), 1.28 (d, ³J = 6.7 Hz, 3 H, 6'-H₃), 1.13 (d, ³J = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.10 (d, ³J = 6.7 Hz, 3 H, CH₃), 1.06-1.04 (m, 3 H, 14-H₃). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 190.8$ (C_q, C-5), 185.7 (C_q, C-12), 162.5 (C_q, C-4), 158.0 (C_q, C-11), 156.3 (C_q, C-6), 141.0 (C_q, C-10a), 136.9 (C_q, C-6a), 136.1 (CH, C-2), 133.5 (C_q, C-12a), 124.5 (CH, C-3), 119.4 (CH, C-1), 116.0 (C_q, C-4a), 110.8 (C_q, C-5a)*, 110.3 (C_q, C-11a)*, 98.6 (CH), 98.3 (CH), 96.3 (CH, C-1'), 74.0 (CH), 72.6 (CH, C-4'), 71.6 (C_q, C-9), 70.7 (CH, C-10), 68.4 (CH, C-5'), 68.3 (CH), 67.4 (CH), 66.7 (CH), 61.0 (CH, C-3'), 41.9 (CH₃, NCH₃), 41.2 (CH₃, NCH₃), 31.0 (CH₂, C-13), 29.7 (CH₂, C-2'), 26.8 (CH₂, C-8), 25.8 (CH₂), 24.0 (CH₂), 23.9 (CH₂), 23.6 (CH₂), 20.9 (CH₂, C-7), 18.1 (CH₃, C-6'), 17.1 (CH₃), 16.9 (CH₃), 6.6 (CH₃, C-14). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 756 [M+H]⁺ (100), 528 [M- C₁₂H₂₀O₄+H]⁺ (45), 353 [M- C₂₀H₃₆NO₇+H]⁺ (10). - (+)-ESI-MS Tochterionenspektrum (757.1): m/z (%) = 757 ([M+H]⁺, 1), 643 ([M-Rhodinose+H]⁺, 12), 528 ([M-Rhodinose-Rhodinose+H]⁺, 100); (+)-ESI-Enklelionen-MS (757→528): m/z (%) = 528 ([M-Rhodinose-Rhodinose+H]⁺, 2), 353 (M-Rhodinose-Rhodinose-Rhodosamin+H)⁺, 100).



*Signale sind austauschbar

Cytorhodin J (25): C₄₀H₅₀O₁₅ (770.5), roter Feststoff, blau mit NaOH, $R_f = 0.79$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): $\delta = 13.53$ (s, 1 H, 6-OH), 12.86 (s, 1 H, 4-OH), 12.18 (s, 1 H, 11-OH), 7.87 (d, ³*J* = 6.5 Hz, 1 H, 1-H), 7.69 (dd, ³*J* = 8.6, ³*J* = 6.5 Hz, 1 H, 2-H), 7.30 (d, ³*J* = 8.6 Hz, 1 H, 3-H), 5.43 (s, 1 H, 1'-H), 5.27 (s br, 1 H, 7-H), 4.86-4.82 (m, 2 H, 1''-H, 1'''-H), 4.28 (s, 1 H, 10-H), 4.15-4.03 (m, 2 H, 5'-H*, 5''-H*), 3.95 (m, 1H, 5'''-H*), 3.70 (s, 3 H, 10-COOCH₃), 3.58 (s, 1 H, 4'-H**), 3.54 (s, 1 H, 4''-H**), 3.50 (s, 1 H, 4'''-H**) 2.39-2.29 (m, 2 H, 8-H), 2.20-2.15 (m, 2 H, CH₂), 2.10-2.02 (m, 2 H, CH₂), 1.83-1.70 (m, 6 H, 13-CH₂, CH₂, CH₂), 1.72-1.53 (m, 4 H, 2 x CH₂), 1.21 (d, ³*J* = 6.8 Hz, 3 H, CH₃), 1.16 (d, ³*J* = 7.0 Hz, 3 H, CH₃), 1.13-1.08 (m, 6 H, 14-CH₃, CH₃). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 190.9$ (C_q, C-5), 186.2 (C_q, C-12), 171.5 (C_q, 10-COOCH₃), 162.8 (C_q, C-4), 157.1 (C_q, C-6), 157.0 (C_q, C-11), 137.0 (CH, C-2), 136.3 (C_q, C-10a), 135.7 (C_q, C-6a), 133.6 (C_q, C-12a), 124.8 (CH, C-3), 119.6 (CH, C-1), 116.2 (C_q, C-4a), 111.6 (C_q, C-6a/11a), 111.3 (C_q, C-6a/11a), 101.5 (CH), 99.6 (CH), 99.5 (CH), 75.0 (CH), 74.3 (CH), 71.3 (CH, C-7), 70.6 (CH), 67.7 (CH), 67.6 (CH), 67.1 (CH), 66.8 (CH), 52.3 (CH₃, COOCH₃), 52.3 (CH₂, C-9), 33.5 (CH₂, C-8), 33.4 (CH₂), 32.4 (CH_q, C-13), 26.0 (CH₂), 24.8 (CH₂), 24.7 (CH₂), 24.5 (2xCH₂), 17.19 (CH₃), 17.15 (CH₃), 17.1 (CH₃), 6.8 (CH₃, C-14). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 793 [M + Na]⁺ (100), 413 [M - C₁₈H₃₁O₇ + H]⁺ (87).



*Signale sind austauschbar; **Signale sind austauschbar.

Marine Streptomyceten

Die marinen Streptomyceten wurden von E. Helmke zur Verfügung gestellt und stammen aus der Sammlung mariner Actinomyceten des Alfred-Wegener-Instituts für Polar- und Meeresforschung in Bremerhaven.

Stamm B 5546

Der Stamm bildete nach dreitägiger Kultivierung auf Agarplatte (M_2^+ -Nährmedium) ein weißes Luftmycel, während die Kolonieunterseite grau gefärbt war. Der Agar war gelblich verfärbt.

Primärscreening

Der Stamm B 5546 wurde von M_2^+ -Schrägagar auf Agarplatten mit dem gleichen Nährmedium 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden vier mit je 200 ml M_2^+ /50 %-Seewasser-Nährmedium gefüllte 1 l-Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit 95 Upm inkubiert. Das Substrat-Mycel war beige, das Nährmedium war gelbbraun gefärbt. Das Lyophilisat der Kulturbrühe wurde mit Ethylacetat extrahiert. Man erhielt einen öligen gelbbraunen Rohextrakt, der für das biologische und chemische Screening verwendet wurde. Bei DC ($CH_2Cl_2/10\% CH_3OH$) fielen neben zwei bei Tageslicht gelben Zonen mit $R_f = 0.92$ und 0.54 (orange mit Anisaldehyd/ H_2SO_4/Δ , nach einigen Minuten violett) zwei Fluoreszenz löschende Zonen auf ($R_f = 0.80$, $R_f = 0.38$).

Tabelle 24: Aktivität des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. B 5546 im Plattendiffusionstest des biologischen Screenings.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	0
<i>Candida albicans</i>	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	31
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Chlorella sorokiniana</i>	10
<i>Chlorella vulgaris</i>	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm B 5546 wurde von der Erdkultur auf Agarplatten mit M_2^+ /50 %-Seewassernährmedium überimpft. Mit diesen Kulturen wurden 96 mit je 250 ml

M₂⁺-Nährmedium gefüllte 1 l-Erlenmeyerkolben beimpft und 4 d bei 28 °C mit 95 Upm auf dem Linearschüttler inkubiert. Der Stamm wuchs unter Bildung von beigem Substrat-Mycel, das Nährmedium war nach drei Tagen braungelb gefärbt. Die Schüttelkultur wurde mit der Filterpresse über Celite filtriert. Der so erhaltene Zellrückstand wurde dreimal mit Ethylacetat und zweimal mit Aceton digeriert, jeweils 15 min im Ultraschallbad behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde fünfmal mit Ethylacetat extrahiert. Sämtlich organischen Phasen wurden nach DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) vereinigt. Nach Entfernen der Lösungsmittel im Vakuum lag ein gelbbrauner Rohextrakt (1.87 g) vor.

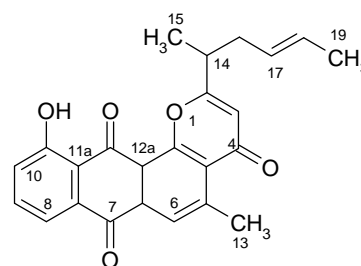
Isolierung

Der Rohextrakt (1.87 g) wurde in einem Gemisch von CH₂Cl₂/CH₃OH (200 ml) gelöst und durch Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem CH₂Cl₂/CH₃OH-Gradienten (1.0 l CH₂Cl₂, 250 ml CH₂Cl₂/1 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/2 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/4 % CH₃OH, 1 l CH₂Cl₂/8 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/20 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/50 % CH₃OH unter DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, Sprühreagenz Anisaldehyd/H₂SO₄, Farbigekeit bei Tageslicht, Fluoreszenzlöschung) in vier Fraktionen getrennt: Die Fraktionen 1 und 2 zeigten keine Auffälligkeiten bei DC bzw. bestanden aus sehr komplexen Substanzgemischen mit hierzu sehr geringer Fraktionsmenge. Fraktion 3, gelb und orange bei Tageslicht, Fluoreszenz löschend, $R_f = 0.54 - 0.96$, 210 mg. Fraktion 4: braun, blau und orange mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, Fluoreszenz löschend, $R_f = 0.12-0.71$, 390 mg. Die Aktivitätsprüfung der Fraktionen 3 und 4 zeigten die in Tabelle 25 angegebenen Werte. Fraktion 3 wurde durch PDC an Kieselgel (zwei Platten 20 × 20 cm, CH₂Cl₂/5 % CH₃OH/5 % Ethylacetat) getrennt. Man erhielt die zwei Unterfraktionen 3a und 3b. Dabei zeigte Fraktion 3a bei DC eine bei Tageslicht gelbe Zone mit $R_f = 0.96$ und zwei Fluoreszenz löschende Zonen, $R_f = 0.78$, $R_f = 0.48$. Die Fraktion 3a wurde durch präparative RP-HPLC (mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10/90 beginnen, für 5 min halten, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) gereinigt. Aus 3a wurden 3.1 mg 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**; $t_R = 2.5$ min) isoliert. Fraktion 4 wurde durch SC an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 800 mm, CH₂Cl₂/CH₃OH = 6: 4) getrennt. Dabei erhielt man nach DC-Kontrolle neben weiteren Unterfraktionen komplexer Zusammensetzung 6.7 mg Collismycin A (**32**).

Tabelle 25: Aktivität des Rohextraktes des Stammes B 5546 der 24 l-Schüttelkultur sowie ausgewählter Fraktionen (Hemmhof Ø [mm]).

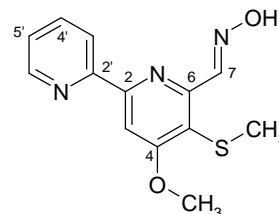
Testkeim	Rohextrakt	Fraktion 3	Fraktion 4
<i>Escherichia coli</i>	15	12	15
<i>Bacillus subtilis</i>	12	12	12
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	20	24	18
<i>Candida albicans</i>	14	12	12
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	20	15	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	15	10
<i>Chlorella sorokiniana</i>	12	11	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	11	10	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	14	11	0

14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (27): C₂₄H₂₀O₅ (388.1), gelber Feststoff, rot mit NaOH, $R_f = 0.96$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). UV (MeOH): $\lambda_{\max} = 239$ nm, 267, 415. - ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz): $\delta = 12.94$ (s, 1 H, 12-OH), 8.03 (s, 1 H, 6-H), 7.80 (dd, ³J = 7.3 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, 8-H), 7.66 (dd, ³J = 7.3 Hz, ³J = 8.6 Hz, 1 H, 9-H), 7.34 (dd, ³J = 8.6 Hz, ⁴J = 1.2 Hz, 1 H, 10-H), 6.22 (s, 1 H, 3-H), 5.56-5.51 (m, 1 H, 18-H), 5.41-5.36 (m, 1 H, 17-H), 3.00 (s, 3 H, 13-H₃), 2.84 (q, ³J = 7.0 Hz, 1 H, 14-H), 2.74-2.69 (m, 1 H, 16-H_A), 2.52-2.47 (m, 1 H, 16-H_B), 1.58 (d, ³J = 6.7 Hz, 3 H, 19-H), 1.42 (d, ³J = 7.0 Hz, 3 H, 15-H). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): $\delta = 187.3$ (C-12), 182.0 (C-7), 179.3 (C-4), 172.4 (C-2), 162.6 (C-11), 156.7 (C-12b), 149.7 (C-4a), 136.3 (C-9), 135.9 (C-12a), 132.3 (C-7a), 126.7 (C-18), 126.6 (C-17), 126.5 (C-6a), 125.5 (C-6), 125.3 (C-10), 119.7 (C-5), 119.3 (C-8), 116.8 (C-11a), 111.3 (C-3), 39.0 (C-14), 31.5 (C-16), 24.2 (C-13), 17.7 (C-15), 12.9 (C-19). - H,H-COSY (CDCl₃, 599.7 MHz) (H ↔ H): 8-H ↔ 9-H; 9-H ↔ 10-H; 15-H ↔ 14-H; 14-H ↔ 16-H; 16-H ↔ 17-H; 17-H ↔ 18-H; 18-H ↔ 19-H. - HMBC-NMR (inverses COLOC, CDCl₃, GHMQC_DA, F1 125 MHz, F2 600 MHz) (H → C): 3-H, 14-H ²J → C-2; 3-H, 13-H ³J → C-4a; 13-H, 6-H ²J → C-5; 13-H ³J → C-6; 13-H ⁴J → C-6a; 13-H ⁴J → C-12b, 6-H ²J → C-6a; 6-H, 8-H ³J → C-7; 6-H ³J → C-13; 6-H ⁴J → C-12; 8-H ³J → C-10; 8-H, 10-H ³J → C-11a; 9-H ²J → C-8; 9-H, 11-OH ²J → C-10; 9-H ³J → C-7a; 10-H ²J → C-9; 10-H ³J → C-8; 11-OH ²J → C-11a; 14-H ³J



→ C-3; 14-H 3J → C-17; 15-H, 16-H 2J → C-14; 15-H, 16-H 3J → C-2; 15-H 3J → C-16; 16-H 3J → C-15. – (-) ESI-MS: m/z (%) = 797 [2M-2H+Na]⁻ (100), 387 [M-H]⁻, 14. – EI-MS (70 eV): m/z (%) = 388 [M]⁺ (39), 334 (52), 281 (100), 197 (9), 139 (11), 72 (41), 59 (80), 43 (42).

Collismycin A (32): C₁₃H₁₃N₃O₂S (275.1), farblose, nadelförmige Kristalle, nicht löslich in CH₃OH, rot mit FeCl₃-Sprühreagenz, gelb mit PdCl₂-Sprühreagenz bereits in der Kälte, bei Erhitzen für 10-20 min bei 110 °C unverändert, violett mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, weiß fluoreszierend bei 366 nm, Fluoreszenz löschend bei 254 nm, R_f = 0.82, schleifend (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). – ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 9.71 (s br, 1 H, NOH), 9.09 (s, 1 H, 7-H), 8.65 (dd, 3J = 4.9 Hz, 3J = 1.1 Hz, 6'-H), 8.52 (d, 3J = 7.9 Hz, 1 H, 3'-H), 8.03 (s, 1 H, 3-H), 7.84 (ddd, 2 x 3J = 7.9 Hz, 4J = 1.9 Hz, 1 H, 4'-H), 7.32 (ddd, 3J = 7.6 Hz, 4J = 4.8 Hz, 5J = 1.1 Hz, 1 H, 5'-H), 4.11 (s, 3 H, 8-OCH₃), 2.36 (s, 3 H, 9-SCH₃). – ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 167.3 (C_q, C-4), 157.4 (C_q, C-2), 155.1 (C_q, C-2'), 152.5 (C_q, C-6), 148.9 (CH, C-6'), 147.8 (CH, C-7), 137.2 (CH, C-4'), 124.3 (CH, C-5'), 122.1 (C_q, C-5), 121.8 (CH, C-3'), 103.7 (CH, C-3), 56.4 (CH₃, C-8), 18.5 (CH₃, C-9). – (+)-ESI-MS m/z (%) = 573 [2M+Na]⁺ (63), 298 [M+Na]⁺ (16), 276 [M+H]⁺ (100).



Stamm B 6278

Der marine Streptomycet bildete nach dreitägiger Kultivierung auf Agarplatte (M₂⁺-Nährmedium) ein weißes Luftmycel, während die Kolonieunterseite orangebraun gefärbt war. Der Agar war dunkelbraun verfärbt.

Primärscreening

Der Stamm B 6278 wurde auf M₂-/50 % Seewasser-Schrägagar, dann auf Agarplatten jeweils 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden vier mit je 200 ml M₂-Nährmedium (50 % Seewasser) gefüllte 1 l-Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit 95 Upm inkubiert. Das Substrat-Mycel war blaßrosa gefärbt, die Nährlösung war dunkelbraun. Die Schüttelkultur wurde lyophilisiert und anschließend mit Ethylacetat extrahiert. Man erhielt 220 mg eines dunkelbraunen Rohextraktes, der für das biologische, pharmakologische sowie chemische Screening verwendet wurde.

Bei DC (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) fielen verschiedene gelbe und orange Zonen bei Tageslicht auf ($R_f = 0.30$, $R_f = 0.47$, $R_f = 0.77$, $R_f = 0.8$; alle braun mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ und rotviolett nach Behandlung mit Natronlauge), eine bei Tageslicht rote Zone ($R_f = 0.73$) sowie Fluoreszenz löschende Zonen (254 nm) ($R_f = 0.23$, $R_f = 0.67$). Im Cytotoxizitätstest mit *Artemia salina* wurde eine Mortalitätsrate von 11 % ermittelt.

Tabelle 26: Aktivität des Rohextraktes von *Streptomyces* sp. B 6278

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	13
<i>Bacillus subtilis</i>	12
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	20
<i>Candida albicans</i>	13
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	11
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	20

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm B 6278 wurde auf drei Agarplatten (M₂⁺-Nährmedium, 50 % Seewasser) 72 h bei 28 °C inkubiert. Mit diesen Kulturen wurden acht mit je 250 ml M₂⁺-Nährmedium gefüllte 1 l Schikanekolben beimpft und 72 h bei 28 °C mit 95 Upm inkubiert. Der Stamm bildete ein weißes Substrat-Mycel, das Medium war braun-orange gefärbt. Mit dieser Vorkultur erfolgte eine 20 l-Fermenteranzucht für 3 d bei 28 °C mit einer Rührgeschwindigkeit von 200 Upm, einem Belüftungsvordruck von 0.5 atm und einem pH-Wert von 7.00 ± 1.25 (reguliert über 2 N NaOH, 2 N HCl). Eine Schaumbildung wurde durch regulierte Zugabe von ca. 10 ml Niax (10proz. ethanolische Lösung) verhindert. Im Anschluß wurde die Kulturbrühe über Celite filtriert. Das wäßrige Filtrat wurde dreimal mit Ethylacetat extrahiert, der mit Celite vermischte Zellrückstand dreimal in Ethylacetat digeriert und jeweils für 15 min im Ultraschall belassen und anschließend filtriert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum bei 40 °C abgedampft. Man erhielt 9.0 g eines orangebraunen Rohextraktes.

Isolierung

Der Rohextrakt wurde durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel (Säule 25 × 400 mm) mit einem Cyclohexan/ Ethylacetat/ Methanol-Gradienten (1.0 l cHexan /10 % EtOAc, 500 ml cHexan/15 % EtOAc, 1.0 l cHexan /25 % EtOAc, 500 ml cHexan /40 % EtOAc, 500 ml cHexan /50 % EtOAc, 1.5 l cHexan /60 % EtOAc, 500 ml cHexan /80 % EtOAc, 500 ml EtOAc, 700 ml EtOAc/7 % CH₃OH, 400 ml EtOAc/50 % CH₃OH) in sechs Fraktionen getrennt. Die Trennung erfolgte unter DC-Kontrolle (Fraktionen 1-4: (CHCl₃/10 % CH₃OH; Fraktionen 5-7: (CHCl₃/20 % CH₃OH), wobei als Trennkriterien neben der Farbigkeit der DC-Zonen bei Tageslicht auch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm und das Anfärbeverhalten mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ diente. Fraktion 1: farblos bei Tageslicht, violette und braune Zonen nach Reaktion mit Anisaldehyd/H₂SO₄-Sprühreagenz, R_f = 0.53 – 0.97, 3.5 g; Fraktion 2: gelb, komplexes Substanzgemisch; Fraktion 3: Fluoreszenz löschende Zonen, rötliche und gelborange Zonen bei Tageslicht, mit Natronlauge rötlichviolette Farbreaktion (R_f = 0.13), braun mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, R_f = 0.03 – 0.33, 2.2 g; Fraktionen 4-6: gelborange Zonen bei Tageslicht, braun mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, schleifend, komplexe Substanzgemische. Hiernach ausgewählte Fraktionen wurden zudem durch biologisches Screening bewertet (siehe Tabelle 27).

Tabelle 27: Aktivitäten der Fraktionen 2 – 5 des Rohextraktes (I) von *Streptomyces* sp. B 6278

Testkeim	Fraktion 2	Fraktion 3	Fraktion 4	Fraktion 5
<i>Escherichia coli</i>	17	20	20	19
<i>Bacillus subtilis</i>	18	20	17	16
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	0	20	0	0
<i>Candida albicans</i>	0	11	0	0
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	0	11	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	20	15	16
<i>Chlorella sorokiniana</i>	0	0	0	0
<i>Chlorella vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	0	0	0	0

Aus der Sephadex-Fraktion 3 der Fraktion 1 wurde das Disaccharid (**41**) erhalten. Die Kieselgel-Fraktion 3 wurde durch PDC an Kieselgel (sechs Platten, 20 × 40 mm, CHCl₃/5 % CH₃OH) in drei Unterfraktionen getrennt. Die Fraktionen 3a-c wurden jeweils durch präparative RP-HPLC gereinigt bzw. in weitere Fraktionen getrennt. (HPLC-Gradient 3a: CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10/90 beginnen, für 10 min halten, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min; 3b: mit mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 5/95 beginnen, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 20/80 in 25 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 0,1 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min 3c: mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10/90 beginnen, für 10 min halten, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min). Dabei konnten aus Fraktion 3a 25.4 mg der Verbindung A-7884 (**35**; t_R = 13.7 min) isoliert werden. Fraktion 3b enthielt 3.2 mg Fridamycin D (**37**; t_R = 23.2 min). Fraktion 3c ergab zwei Unterfraktionen: 3c' und 3c'' sowie 9.6 mg Rabelomycin (**38**; t_R = 24.3 min). Die Fraktion 3c' wurde durch RP-HPLC (mit CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 30/70 beginnen, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 50/50 in 25 min, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 0,1 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) gereinigt, wodurch man 17.1 mg Vineomycin C (**36**; t_R = 15.4 min) erhielt. Die Trennung der Fraktion 3c'' durch SC an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 700 mm, CHCl₃/40 % CH₃OH) lieferte 6.0 mg Mutabahamycin (**40**; t_R = 22.1 min).

A-7884 (35): C₃₇H₄₂O₁₄

(710.5), gelboranger Feststoff, rote

Farbreaktion mit NaOH, R_f = 0.53

(CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). – ¹H-

NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ =

12.27 (s, 1 H, 8-OH), 7.88 (d, ³J =

7.9 Hz, 1 H, 10-H), 7.61 (d, ³J = 7.9 Hz, 1 H, 11-H), 6.89 (d, ³J = 9.8 Hz, 1 H, 6-H),

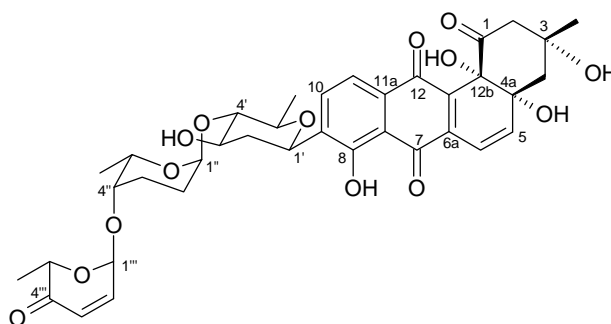
6.88 (dd, ³J = 10.2 Hz, ³J = 3.4 Hz, 1 H, 2'''-H), 6.40 (d, ³J = 9.8 Hz, 1 H, 5-H), 6.11

(d, ³J = 10.2 Hz, 1 H, 3'''-H), 5.27 (d, ³J = 3.4 Hz, 1 H, 1'''-H), 4.99 (s, 1 H, 1'''-H),

4.86 (d, ³J = 10.1 Hz, 1 H, 1'-H), 4.58 (q, ³J = 6.6 Hz, 1 H, 5'''-H), 4.24 (dq, ³J = 6.8

Hz, ³J = 1.1 Hz, 1 H, 5'-H), 3.81 (ddd, ³J = 13.2 Hz, ³J = 7.9 Hz, ³J = 5.2 Hz, 1 H,

3'-H), 3.55 (s, 1 H, 4''-H), 3.72 (dd, ³J = 9.0 Hz, ³J = 6.0 Hz, 1 H, 5''-H), 3.06 (t, ³J

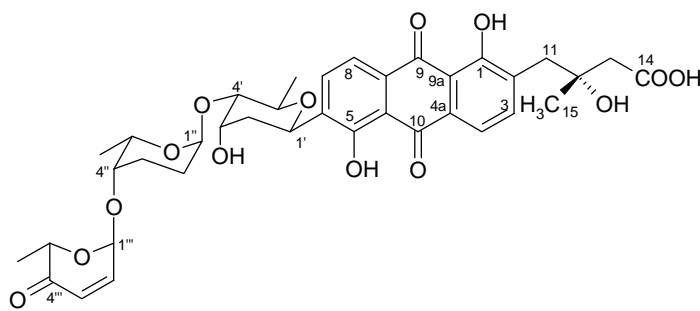


= 8.7 Hz, 1 H, 4'-H), 2.94 (dd, $^3J = 13.2$ Hz, $^3J = 3.1$ Hz, 1 H, 2-H_A), 2.62 (d, $^3J = 13.2$ Hz, 1 H, 2-H_B), 2.51 (ddd, $^3J = 13.2$ Hz, $^3J = 5.3$ Hz, $^3J = 1.5$ Hz, 1 H, 2'-H), 2.26 (dd, $^3J = 15.1$ Hz, $^3J = 2.6$ Hz, 1 H, 4-H_A), 2.11 (d br, $^3J = 9.4$ Hz, 2 H, 2''-H₂), 1.96 (m, 2 H, 3''-H₂), 1.84 (d, $^3J = 15.1$ Hz, 1 H, 4-H_B), 1.39 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 6'''-H₃), 1.37 (d, $^3J = 6.0$ Hz, 3 H, 6''-H₃), 1.29 (s, 3 H, 13-H₃), 1.27 (d, $^3J = 6.8$ Hz, 3 H, 6'-H₃). – ^{13}C -NMR (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 204.9$ (C_q, C-1), 196.6 (C_q, C-4'''), 187.9 (C_q, C-7), 182.0 (C_q, C-12), 158.1 (C_q, C-8), 144.3 (CH, C-5), 142.7 (CH, C-2'''), 138.72 (C_q, C-12a)*, 138.67 (C_q, C-9)*, 138.1 (C_q, C-6a), 133.7 (CH, C-10), 130.2 (C_q, C-11a), 127.5 (CH, C-3'''), 119.8 (CH, C-11), 117.5 (CH, C-6), 113.9 (C_q, C-7a). 99.5 (CH, C-1''), 95.3 (CH, C-1'''), 88.9 (CH, C-4'), 80.5 (C_q, C-4a), 76.2 (C_q, C-12b)*, 76.1 (C_q, CH, C-3, C-4'')*, 74.4 (CH, C-5''), 71.4 (CH, C-3'), 71.0 (CH, C-1'), 70.6 (CH, C-5'''), 67.8 (CH, C-5'), 52.1 (CH₂, C-2), 43.2 (CH₂, C-4), 38.7 (CH₂, C-2'), 30.2 (CH₃, C-13), 25.1 (CH₂, C-2''), 24.3 (CH₂, C-3''), 18.4 (CH₃, C-6''), 17.0 (CH₃, C-6'), 15.1 (CH₃, C-6'''). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1443 [2M + Na]⁺ (45), 1123 (50)**, 733 [M + Na]⁺ (100), 413 (48)**.

*Signale sind austauschbar, ** Verunreinigung?

Vineomycin C (36):

C₃₇H₄₂O₁₄ (710.4), gelber Feststoff, rote Farbreaktion mit NaOH, $R_f = 0.55$ (CH₂Cl₂/10 % MeOH). – ^1H -NMR (CDCl₃, 500

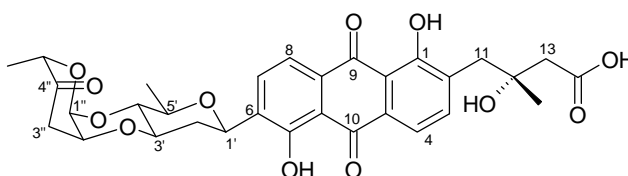


MHz): $\delta = 12.91$ (s, 1 H, 1-OH), 12.86 (s, 1 H, 5-OH), 7.82 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 7-H), 7.67 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 8-H), 7.53 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, 4-H), 7.47 (d, $^3J = 7.8$ Hz, 1 H, 3-H), 6.87 (dd, $^3J = 10.0$ Hz, $^3J = 3.4$ Hz, 1 H, 2'''-H), 6.10 (d, $^3J = 10.0$ Hz, 1 H, 3'''-H), 5.24 (d, $^3J = 3.4$ Hz, 1 H, 1'''-H), 4.99 (s, 1 H, 1''-H), 4.82 (d, $^3J = 11.5$ Hz, 1 H, 1'-H), 4.55 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, 5'''-H), 4.25 (q, $^3J = 6.3$ Hz, 1 H, 5''-H), 3.89 (ddd, $^3J = 11.5$ Hz, $^3J = 8.3$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, 1 H, 3'-H), 3.70 (s br, 1 H, 4''-H), 3.54 (dq, $^3J = 9.1$ Hz, $^3J = 6.1$ Hz, 1 H, 5'-H), 3.11 (m, 2 H, 11-H_A, 4'-H), 2.76 (m, 1 H, 11-H_B), 2.64 (m, 2 H, 2'-H_A), 2.56 (d_{AB}, $^2J = 15.7$ Hz, 1 H, 13-H_A), 2.52

(d_{AB} , $^2J = 15.7$ Hz, 1 H, 13- H_B), 2.09 (m, 2 H, 2''- H_A , 3''- H_A), 1.94 (m, 1 H, 3''- H_B), 1.68 (m, 1 H, 2''- H_B), 1.47 (dd, $^3J = 11.5$ Hz, $^2J = 14.5$ Hz, 1 H, 2'- H_B), 1.36 (d, $^3J = 6.1$ Hz, 3 H, 6'- H_3), 1.39 (d, $^3J = 6.7$ Hz, 3 H, 6'''- H_3), 1.26 (d, $^3J = 6.3$ Hz, 3 H, 6''- H_3), 1.21 (s, 3 H, 15- H_3). - ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz): $\delta = 196.6$ (C_q , C-4'''), 187.5 (C_q , C-9), 187.3 (C_q , C-10), 174.7 (C_q , C-14), 161.1 (C_q , C-1), 158.7 (C_q , C-5), 142.8 (CH, C-2'''), 139.2 (CH, C-3), 138.3 (C_q , C-6), 134.3 (C_q , C-2), 133.1 (CH, C-7), 131.4 (2 C_q , C-4a, C-8a), 127.4 (CH, C-3'''), 119.4 (CH, C-8), 118.6 (CH, C-4), 115.0 (C_q , C-10a), 115.3 (C-9a), 99.4 (CH, C-1''), 95.2 (CH, C-1'''), 88.5 (CH, C-4'), 76.1 (CH, C-4''), 74.4 (CH, C-5'), 71.8 (C_q , C-12), 71.6 (CH, C-3'), 71.0 (CH, C-1'), 70.6 (CH, C-5'''), 67.9 (CH, C-5''), 45.2 (CH_2 , C-13), 40.1 (CH_2 , C-11), 38.1 (CH_2 , C-2'), 26.9 (CH_3 , C-15), 25.0 (CH_2 , C-2''), 24.3 (CH_2 , C-3''), 18.4 (CH_3 , C-6'), 16.9 (CH_3 , C-6''), 15.1 (CH_3 , C-6'''). - (-)-ESI-MS: m/z (%) = 710 [M] (94). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1443 [$2M+Na$] $^+$ (51), 733 [$M+Na$] $^+$ (100).

Fridamycin D (37):

$C_{31}H_{32}O_{12}$ (596.5), gelber Feststoff, rote Farbreaktion mit NaOH, $R_f = 0.79$ ($CH_2Cl_2/10\%$

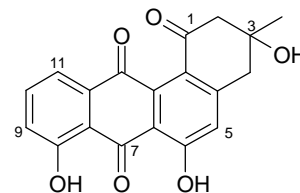


MeOH). - 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): $\delta = 13.27$ (s, 1 H, 1-OH), 13.04 (s, 1 H, 5-OH), 7.88 (d, $^3J = 7.6$ Hz, 1 H, 3-H), 7.81 (d, $^3J = 7.6$, 1 H, 8-H), 7.76 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 1 H, 4-H), 7.62 (d, $^3J = 7.1$ Hz, 1 H, 3-H), 5.17 (d, $^3J = 2.6$ Hz, 1 H, 1''-H), 4.97 (d, $^3J = 11.2$ Hz, 1 H, 1'-H), 4.72 (q, $^3J = 6.6$ Hz, 1 H, 5''-H), 4.33 (d, $^3J = 2.6$ Hz, 1 H, 2''-H), 3.81 (m, 1 H, 3'-H), 3.56 (m, 1 H, 5'-H), 3.49 (dd, $^3J = 9.5$ Hz, $^3J = 8.8$ Hz, 1 H, 4'-H), 3.09, 3.01 (2d, $^2J_{A,B} = 13.5$ Hz, 2 H, 11- H_2), 2.63 (d br, $^3J = 2.6$ Hz, 2 H, 3''- H_2), 2.58 (s, 2 H, 13- H_2), 2.46 (m, 1 H, 2'- H_{2a}), 1.50 (m, 1 H, 2'- H_{2b}), 1.40 (d, $^3J = 5.9$ Hz, 3 H, 6'- H_3), 1.36 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3 H, 6''- H_3), 1.31 (s, 3 H, 15- H_3). - ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 75 MHz): $\delta = 207.7$ (C_q , C-4''), 187.9 (C_q , C-9), 187.9 (C_q , C-10), 175.9 (C_q , C-14), 161.1 (C_q , C-1), 158.9 (C_q , C-5), 139.5 (CH, C-3), 137.9 (C_q , C-6), 134.1 (C_q , C-2), 133.3 (CH, C-7), 131.9 (C_q , C-8a)*, 131.8 (C_q , C-4a)*, 119.4 (CH, C-8), 119.1 (CH, C-4), 115.4 (C_q , C-10a), 115.4 (C_q , C-9a), 91.4 (CH, C-1''), 77.7 (CH, C-5''), 76.8 (CH, C-3'), 74.6 (CH, C-5'), 74.5 (CH, C-4'), 72.0 (C_q , C-12), 71.5 (CH, C-1'), 71.1 (CH, C-2''), 44.7 (CH_2 , C-13), 40.9 (CH_2 , C-11), 40.0

(CH₂, C-3''), 36.6 (CH₂, C-2'), 27.2 (CH₃, C-15), 17.5 (CH₃, C-6'), 16.1 (CH₃, C-6''). - (-)-ESI-MS: *m/z* (%) = 1192.5 [2M-H]⁻ (2), 595.5 [M-H]⁻ (27).

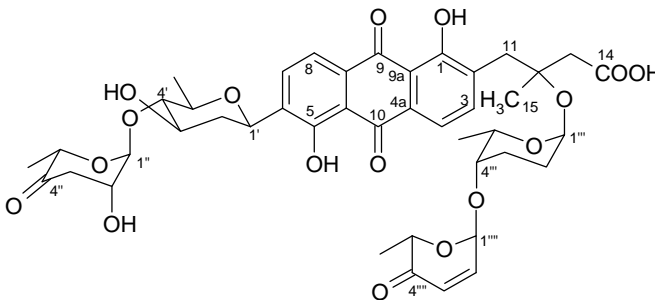
*Signale sind austauschbar

Rabelomycin (38): C₁₉H₁₄O₆ (338.1), gelber Feststoff, grau mit Anisaldehyd/Schwefelsäure, rote Farbreaktion mit NaOH, *R_f* = 0.55 (CH₂Cl₂/10 % MeOH). - ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 12.26 (s, 1 H, 6-OH), 11.62 (s, 1 H, 8-OH), 7.70-7.60 (m, 2 H, 9-H, 10-H), 7.27-7.23 (m, 1 H, 11-H), 6.97 (s, 1 H, 5-H), 3.07 (s, 2 H, 2-CH₂), 2.98 (d, ²*J* = 7.9 Hz, 2 H, 2-CH₂), 1.48 (s, 3 H, CH₃). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 196.2 (C_q, C-1), 192.5 (C_q, C-7), 183.2 (C_q, C-12), 163.7 (C_q, C-6), 162.0 (C_q, C-6), 150.7 (C_q, C-4a), 137.8 (C_q, C-11a), 137.8 (CH, C-10), 135.4 (C_q, C-12a), 128.9 (C_q, C-12b), 124.0 (CH, C-9), 122.0 (CH, C-11), 120.0 (CH, C-5), 116.8 (C_q, C-7a), 115.0 (C_q, C-6a), 72.1 (C_q, C-3), 53.8 (CH₂, C-2), 44.2 (CH₂, C-4), 30.0 (CH₃). - EI-MS (70 eV): *m/z* (%) = 338 [M]⁺ (10), 320 [M-H₂O]⁺ (100), 310 (41), 280 (79), 91 (23), 57 (16). - DCI-MS (NH₃): *m/z* (%) = 373 [M+NH₄+NH₃]⁺ (3), 356 [M+NH₄]⁺ (17), 339 [M+H]⁺ (100).



Mutabahamycin (40):

C₄₃H₅₀O₁₇ (838.0), oranger Feststoff, rote Farbreaktion mit NaOH, *R_f* = 0.79 (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) - UV (CH₃Cl₃): λ_{max} = 230 nm, 259, 294, 439.- IR

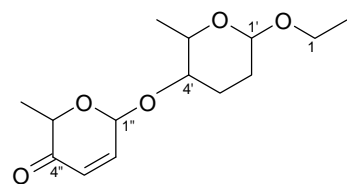


(KBr): ν = 3427, 2925, 2855, 2362, 1734, 1629, 1431, 1374, 1259, 1077, 806, 470 cm⁻¹. - ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 13.24 (s, 1 H, 1-OH), 13.03 (s, 1 H, 5-OH), 7.87 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1 H, 7-H), 7.80 (d, ³*J* = 8.0 Hz, 1 H, 8-H), 7.75 (d, ³*J* = 6.8, 1 H, 4-H), 7.62 (d, ³*J* = 6.8 Hz, 1 H, 3-H), 6.86 (dd, ³*J* = 10.0 Hz, ³*J* = 3.2 Hz, 1 H, 2''''-H), 6.07 (d, ³*J* = 10.0 Hz, 1 H, 3''''-H), 5.21 (d, ³*J* = 3.2 Hz, 1 H, 1''''-H), 5.17 (d, ³*J* = 2.2 Hz, 1 H, 1''-H), 4.96 (d, ³*J* = 1.5 Hz, 1 H, 1'-H), 4.82 (s, 1 H, 1'''-H), 4.72 (q, ³*J* = 6.7 Hz, 1 H, 5''-H), 4.56 (q, ³*J* = 6.6, 1 H, 5''''-H), 4.32 (d, ³*J* = 2.2 Hz, 1 H,

2''-H), 3.93 (q, $^3J = 6.7$ Hz, 1 H, 5''''-H), 3.80 (m, 1 H, 3'-H), 3.59 (m, 1 H, 4''''-H), 3.55 (m, 1 H, 5'-H), 3.46 (m, 1 H, 4'-H), 3.09 (d, $^2J = 3.00$ Hz, 1 H, 11-H_A), 3.01 (d, $^2J = 3.0$ Hz, 1 H, 11-H_B), 2.64 (m, 2 H, 3''-H₂), 2.69-2.60 (m, 2 H, 4''-H₂), 2.58 (s, 2 H, 13-H₂), 2.47 (d br, $^2J = 12.4$ Hz 1 H, 2'-H_A), 2.10-1.80 (m, 2 H, 3''''-H₂), 1.60-1.45 (m, 2 H, 2''''-H; 1 H, 2'-H_B), 1.39 (d, $^3J = 5.9$, 3 H, 6'-H₃), 1.36 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3 H, 6''-H₃), 1.35 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3 H, 6''''-H₃), 1.23 (s, 3 H, 15-H₃), 1.16 (d, $^3J = 6.6$ Hz, 3 H, 6''''-H₃). - $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl₃, 75 MHz): $\delta = 207.8$ (C-4''), 197.2 (C-4''''), 189.0 (C-9), 188.2 (C-10), 161.0 (C-1), 158.9 (C-5), 143.1 (C-2''''), 139.5 (C-3), 138.0 (C-6), 134.1 (C-2), 133.4 (C-7), 132.0 (C-4a), 131.9 (C-8a), 127.4 (C-3''''), 119.5 (C-8), 119.1 (C-4), 115.8 (C-9a), 115.5 (C-10a), 96.6 (C-1'''), 95.4 (C-1''''), 91.4 (C-1''), 77.7 (C-5''), 76.79 (C-3'), 76.76 (C-4'''), 74.6 (C-4'), 74.7 (C-5'), 72.1 (C-12), 71.5 (C-1'), 71.2 (C-2''), 70.5 (C-5''''), 65.8 (C-5'''), 44.7 (C-13), 41.1 (C-11, C-3''), 36.6 (C-2'), 29.7 (C-15), 24.7 (C-3'''), 24.4 (C-2'''), 17.5 (C-6'), 17.2 (C-6'''), 16.1 (C-6''), 15.1 (C-6''''), (COOH, C-14, Signal ist nicht sichtbar). - H,H-COSY (CDCl₃, 500 MHz) (H \leftrightarrow H): 3-H \leftrightarrow 4-H; 7-H \leftrightarrow 8-H; 1'-H \leftrightarrow 2'-H_b; 2'-H_b \leftrightarrow 3'-H; 3'-H \leftrightarrow 4'-H; 4'-H \leftrightarrow 5'-H; 5'-H \leftrightarrow 6'-H; 1''-H \leftrightarrow 2''-H; 2''-H \leftrightarrow 3''-H, 5''-H \leftrightarrow 6''-H; 1''''-H \leftrightarrow 2''''-H; 2''''-H \leftrightarrow 3''''-H; 3''''-H \leftrightarrow 4''''-H; 5''''-H \leftrightarrow 6''''-H; 1''''''-H \leftrightarrow 2''''''-H; 2''''''-H \leftrightarrow 3''''''-H; 5''''''-H \leftrightarrow 6''''''-H. - HMBC-NMR (inverses COLOC, CDCl₃, GHMQC_DA, F1 75 MHz, F2 500 MHz) (H \rightarrow C): 1-OH $^2J \rightarrow$ C-2; 1-OH $^2J \rightarrow$ C-9a; 3-H, 11-H $^3J \rightarrow$ C-1; 3-H $^3J \rightarrow$ C-4a; 4-H $^3J \rightarrow$ C-2; 4-H $^3J \rightarrow$ C-9a; 4-H $^3J \rightarrow$ C-10; 5-OH $^2J \rightarrow$ C-10a; 5-OH, 1'-H $^2J \rightarrow$ C-6; 7-H $^3J \rightarrow$ C-5; 7-H $^3J \rightarrow$ C-8a; 7-H $^4J \rightarrow$ C-10a; 8-H $^3J \rightarrow$ C-6; 8-H $^3J \rightarrow$ C-9; 8-H $^3J \rightarrow$ C-10a; 11-H, 13-H $^2J \rightarrow$ C-12; 11-H $^3J \rightarrow$ C-3; 13-H, 3''''-H $^3J \rightarrow$ C-1''''; 1'-H $^3J \rightarrow$ C-7; 2'-H_a, 2'-H_b, 4'-H $^2J \rightarrow$ C-3'; 2'-H_a, 2'-H_b $^3J \rightarrow$ C-4'; 4'-H $^2J \rightarrow$ C-5'; 4'-H $^3J \rightarrow$ C-6', 5'-H, 1''-H $^2J \rightarrow$ C-4'; 5'-H $^3J \rightarrow$ C-3'; 1''-H, 3''-H $^2J \rightarrow$ C-2''; 1''-H $^2J \rightarrow$ C-5'; 2''-H $^3J \rightarrow$ C-4''; 3''-H, 2''-H $^2J \rightarrow$ C-4''; 3''-H $^3J \rightarrow$ C-1''; 5''-H $^2J \rightarrow$ C-1''; 1''''-H, 6''''-H $^2J \rightarrow$ C-5''''; 2''''-H $^4J \rightarrow$ C-6''''; 3''''-H $^2J \rightarrow$ 2''''-H; 5''''-H, 1''''-H $^2J \rightarrow$ C-4''''; 5''''-H $^2J \rightarrow$ C-6''''; 6''''-H $^2J \rightarrow$ C-5''''; 6''''-H $^3J \rightarrow$ C-4''''; 1''''''-H $^2J \rightarrow$ C-2''''''; 1''''''-H, 6''''''-H $^2J \rightarrow$ C-5''''''; 1''''''-H $^3J \rightarrow$ C-3''''''; 2''''''-H $^2J \rightarrow$ C-1''''''; 2''''''-H, 6''''''-H $^3J \rightarrow$ C-4''''''; 3''''''-H, 6''''''-H $^3J \rightarrow$ C-1''''''; 3''''''-H $^3J \rightarrow$ C-5''''''; 5''''''-H $^2J \rightarrow$ C-4''''''; 5''''''-H $^2J \rightarrow$ C-6''''''). - (-)ESI-MS: m/z (%) = 838.0 [M-H]⁻ (12).

6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on (41):

C₁₄H₂₂O₅ (270), weißer Feststoff – ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ = 6.88 (dd, ³J = 3.5 Hz, ³J = 10.2 Hz, 1 H, 2-H), 6.09 (d, ³J = 10.2 Hz, 1 H, 3-H), 5.23 (d, ³J = 3.4 Hz, 1 H, 1-H), 4.84 (br s, 1 H, 1'-H), 4.59 (q, ³J = 6.8 Hz, 1 H, 5'-H), 3.94 (dq, ³J = 1.3 Hz, ³J = 6.6 Hz, 1 H, 5''-H), 3.69-3.74 (m, 1 H, 1''-H_A), 3.68 (s br, 1 H, 4'-H), 3.44-3.58 (m, 1 H, 1''-H_B), 1.82-2.17 (m, 4 H, 2'-H₂, 3'-H₂), 1.38 (d, ³J = 6.8 Hz, 3 H, 6-H₃), 1.28 (t, ³J = 6.8 Hz, 3 H, 2''-H₃), 1.17 (d, ³J = 6.6 Hz, 3 H, 6'-H₃). – ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ = 196.9 (C_q, C-4), 143.1 (CH, C-2), 127.3 (CH, C-3), 96.6 (CH, C-1'), 95.4 (CH, C-1), 77.2 (CH, C-4'), 70.5 (CH, C-5), 65.7 (CH, C-5'), 62.6 (CH, C-1''), 24.7 (CH₂, C-2'), 24.4 (CH₂, C-3'), 17.2 (CH₃, C-6'), 15.1 (CH₃, C-6)*, 14.9 (CH₃, C-2'')*. – H,H-COSY (CDCl₃, 400 MHz) (H ↔ H): 1-H ↔ 2-H; 2-H ↔ 3-H; 1'-H ↔ 2'-H; 2'-H ↔ 3'-H; 4'-H ↔ 5'-H; 5'-H ↔ 6'-H; 1''-H ↔ 2''-H; 2''-H ↔ 3''-H, 5''-H ↔ 6''-H. – HMBC-NMR (inverses COLOC, CDCl₃, GHMQC_DA, F1 100 MHz, F2 400MHz) (H → C): 2-H ²J → C-1; 1'-H ³J → C-5'; 2'-H ²J → C-3; 5'-H ²J → C-4'; 6'-H ²J → C-5'; 6'-H ³J → C-4'; 1''-H ³J → C-4'; 1''-H ³J → C-3''; 1''-H ³J → C-5''; 2''-H ³J → C-4''; 2''-H ⁴J → C-4'; 3''-H ³J → C-1''; 3''-H ³J → C-5''; 6''-H ³J → C-4''; 6''-H ²J → C-5''. – EI-MS: *m/z* (%) = 225 (10), 143 (11), 115 (100), 112 (12), 111 (86), 87, (99), 85 (26), 83 (19), 69 (24), 67 (10), 57 (14), 55 (16), 43 (23).



* Signale sind austauschbar; ** Die ¹H-NMR-Werte sowie die ¹³C-NMR-Werte wurden mit denen in der Dissertation von K. Stritzke⁷⁶ veröffentlichten Werte abgeglichen, die Daten des EI-MS wurden von K. Stritzke übernommen.

Der Stamm B 6278 wurde erneut unter vergleichbaren Bedingungen wie zuvor fermentiert und die resultierende Kulturbrühe sowie das Zellmaterial entsprechend extrahiert. Dabei erhielt man 2,3 g eines braungelben Rohextraktes. Dieser wurde ohne vorausgehende Extraktion mit Cyclohexan durch Vakuum-Säulenchromatographie an Kieselgel mit einem CH₂Cl₂/ CH₃OH Gradienten (500 ml CH₂Cl₂, 250 ml CH₂Cl₂/1 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/2 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/4 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/6 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/7 % CH₃OH, 750 ml CH₂Cl₂/8 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, 100 ml CH₂Cl₂/20 % CH₃OH,

100 ml CH₂Cl₂/30 % CH₃OH, 250 ml CH₃OH unter DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, Sprühreagenz Anisaldehyd/konz. H₂SO₄, Farbigeit bei Tageslicht, Fluoreszenzlöschung) in fünf Fraktionen getrennt: Die Fraktionen 1, 4 und 5 zeigten keine Auffälligkeiten unter DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH; mit Mutabahamycin (40) als Vergleichsubstanz); Fraktion 2 ergab durch Reinigung über Sephadex LH-20 (Säule 30 × 800 mm, CH₂Cl₂/40 % CH₃OH) 2.1 mg Rabelomycin (38) sowie 5.1 mg Fridamycin D (37).

Die Fraktion 3 wurde durch PDC an Kieselgel (vier Platten, 20 × 20 mm, (CH₂Cl₂/5 % CH₃OH) gereinigt. Man erhielt 14.4 mg Vineomycin A₁ (42). Die gesuchte Verbindung Mutabahamycin konnte nicht gefunden werden.

Vineomycin A₁

(42): C₄₉H₅₈O₁₈

(934), orangegelber

Feststoff, rotviolette

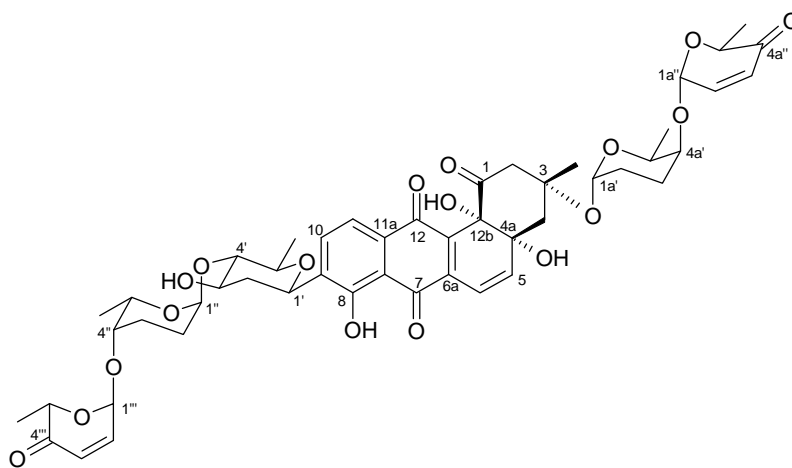
Farbreaktion mit

NaOH, $R_f = 0.60$

(CH₂Cl₂/10 %

CH₃OH). – ¹H-NMR

(CDCl₃, 500 MHz):



$\delta = 12.26$ (s, 1 H, 8-OH), 7.85 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 10-H), 7.57 (d, $^3J = 7.9$ Hz, 1 H, 11-H), 6.87 (d, $^3J = 9.7$ Hz, 1 H, 6-H), 6.85 (m, 2 H, 2''''-H, 2a''-H), 6.41 (d, $^3J = 9.7$ Hz, 1 H, 5-H), 6.08 (d, $^3J = 10.7$ Hz, 1 H, 3''''-H) 6.02 (d, $^3J = 10.7$ Hz, 1 H, 3a''-H), 5.24 (s, 1 H, 1''''-H), 5.23 (s, 2 H, 1''-H, 1a''-H), 4.96 (s br, 1 H, 1a'-H), 4.83 (q überlagert durch s bei 4.96, $^3J = 10.8$ Hz, 1 H, 5''''-H), 4.58-4.50 (2 q, $^3J = 6.8$ Hz, 2 H, 5''-H, 5a'-H), 4.21 (m, 2 H, 4''-H, 4a'-H), 3.78 (m, 2 H, 5a''-H, 2-H_A), 3.69 (s br, 1 H, 3'-H) 3.66 (s br, 1 H, 5'-H), 3.54-3.48 (m, 1 H, 2'-H), 3.14 (dd, $^3J = 3.1$ Hz, $^2J = 13.5$ Hz, 1 H, 2-H_A), 3.03 (t, $J = 8.2$ Hz, 1 H, 4'-H), 2.50-2.44 (m, 2 H, 2'-H₂), 2.47 (dd, $^3J = 6.3$ Hz, $^2J = 13.5$ Hz, 1 H, 2-H_B) 2.23 (dt, $^2J = 15.3$ Hz, $^3J = 3.1$ Hz, 1 H, 4-H_A), 2.10-2.05 (m, 4 H, 3''-H₂, 2a'-H₂), 1.88 (m, 2 H, 2''-H₂), 1.81 (dd, $^3J = 5.5$ Hz, $^2J = 15.3$ Hz, 1 H, 4-H_B), 1.67-1.64 (m, 2 H, 3a'-H₂), 1.36 (d, $^3J = 5.8$ Hz, 3 H, 13-H₃), 1.34-1.32 (m, 6 H, 6''''-H₃, 6a''-H₃), 1.26-1.22 (m, 9 H, 6'-H, 6''-H₃, 6a'-

H₃). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 204.8 (C_q, C-1), 196.8 (C_q, C-4a''), 196.5 (C_q, C-4'''), 188.1 (C_q, C-7), 182.1 (C_q, C-12), 158.0 (C_q, C-8), 145.4 (CH, C-5), 143.0 (CH, C-2a''), 142.7 (CH, C-2'''), 138.73 (C_q, C-12a), 138.68 (C_q, C-9), 138.5 (C_q, C-6a), 133.5 (CH, C-10), 130.3 (C_q, C-11a), 127.4 (CH, C-3a''), 127.2 (CH, C-3'''), 119.6 (CH, C-11), 117.4 (CH, C-6), 113.8 (C_q, C-7a), 99.4 (CH, C-1a'), 95.19 (CH, C-1a''), 95.20 (CH, C-1'''), 92.3 (CH, C-1''), 88.8 (CH, C-4'), 82.4 (C_q, C-4a), 79.9 (C_q, C-12b), 77.3 (C_q, C-3), 76.1 (CH, C-3'), 76.0 (CH, C-5'), 74.4 (CH, C-1'), 71.3 (CH, C-5a''), 70.9 (CH, C-5'''), 70.53 (CH, C-5a'), 70.50 (CH, C-5''), 67.7 (CH, C-4a'), 66.8 (CH, C-4''), 50.2 (CH₂, C-2), 44.4 (CH₂, C-4), 38.6 (CH₂, C-2''), 25.4 (CH₃, C-13), 25.0 (CH₂, C-3a'), 24.6 (CH₂, C-3''), 24.4 (CH₂, C-2a'), 24.2 (CH₂, C-2'), 18.4 (CH₃, C-6'), 17.1 (CH₃, C-6a'), 16.9 (CH₃, C-6''), 15.07 (CH₃, C-6'''), 15.05 (CH₃, C-6a''). - (+)-ESI-MS: *m/z* (%) = 1891 [2M+Na]⁺ (42), 957 [M+Na]⁺ (100).

Bakterienstämme aus der Nordsee

Die Bakterienstämme aus der Nordsee werden von I. Wagner-Doebler (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig) aus Nordseewasserproben isoliert und in Reinkultur aufbewahrt. Die Bearbeitung der Stämme erfolgte im Rahmen des Niedersächsischen Verbundprojektes "Marine Biotechnologie", Teilprojekt „Sekundärmetabolite mariner Mikroorganismen aus der Nordsee in Abhängigkeit von ihrer Stellung im Phylogenetischen System“.

Hel 38

Der Stamm Hel 38 bildete nach drei Tagen orangegelbe Kolonien, die Agarplatte war gelb gefärbt. Wie eine 16S-rDNA Analyse Wagner-Döbler⁸³ zeigte, gehört der Stamm Hel 38 der α-Unterklasse der Proteobakterien an.

Primärscreening

Im chemischen Screening erkannte man bei DC (CH₃Cl/10 % CH₃OH) orange und gelbe Zonen (Tageslicht, *R_f* = 0.89 *R_f* = 0.68, *R_f* = 0.42 - blau mit Ehrlichs Sprühreagenz, *R_f* = 0.36 - blau mit Ehrlichs Sprühreagenz, *R_f* = 0.15, alle blauviolett mit Anisaldehyd/H₂SO₄-Sprühreagenz). Ferner waren im Zytotoxizitätstest mit

RAW-Makrophagen mittlere Aktivitäten festzustellen sowie eine sehr hohe Aktivität gegen *Leishmania donovani*. Im Zytotoxizitätstest mit *Artemia salina* wurde eine Mortalitätsrate von 0 % ermittelt

Tabelle 28: Aktivität des Rohextraktes von α -*Proteobacter* sp. Hel 38.

Testkeim	Hemmhof Ø [mm]
<i>Escherichia coli</i>	15
<i>Bacillus subtilis</i>	16
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> (Tü 57)	0
<i>Candida albicans</i>	13
<i>Mucor miehei</i> (Tü 284)	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Chlorella sorokiniana</i>	24
<i>Chlorella vulgaris</i>	30
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	19

Isolierung

Von der Arbeitsgruppe Lang⁸⁰ wurden 10.4 g eines Ethylacetatextraktes des Zellrückstandes aus einer 40 l-Fermenterkultur erhalten. Der gesamte Rohextrakt wurde in einem Gemisch von CH₂Cl₂/CH₃OH gelöst und durch Vakuum-Säulenchromatographie mit einem CH₂Cl₂/CH₃OH Gradienten (1.0 l CH₂Cl₂, 500 ml CH₂Cl₂/2 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/4 % CH₃OH, 500 ml CH₂Cl₂/6 % CH₃OH, 500 ml CH₂Cl₂/7 % CH₃OH, 1250 ml CH₂Cl₂/8 % CH₃OH, 750 ml CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, 500 ml CH₂Cl₂/20 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/30 % CH₃OH unter DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, Sprühreagenz Anisaldehyd/konz. H₂SO₄, Farbigkeit bei Tageslicht, Fluoreszenzlöschung) in fünf Fraktionen getrennt: Die Fraktionen 1, 4 und 5 zeigten keine Auffälligkeiten bei DC und bestanden aus komplexen Substanzgemischen; Fraktion 2: orangegelb bei Tageslicht, braun mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, R_f = 0.93; Fraktion 3: orangegelb bei Tageslicht, zitronengelbe (R_f = 0.56) und braune (R_f = 0.30-0.41) Zonen mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ. Die Fraktion 2 wurde durch SC an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 800 mm, CH₂Cl₂/40 % CH₃OH) gereinigt, wodurch man 9.3 mg Ubichinon-10 (**43**) erhielt. Die Fraktion 3 wurde durch PDC an Kieselgel (drei Platten 20 × 40 cm, CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) getrennt. Man erhielt die vier Unterfraktionen 3a -d, wobei die Unterfraktion 3b nach Reinigung durch RP-HPLC (: CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 10/90 beginnen, für 10 min

halten, Anstieg auf CH₃CN-H₂O-Azeotrop/H₂O = 100/0 in 15 min, halten für 10 min, Durchfluß 10.0 ml/min) 2.5 mg Nostoxanthin (**44**; t_R = 11.6 min) ergab.

Ubichinon-10 (43): C₅₉H₉₀O₄ (863), oranger Feststoff, blauviolett mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, R_f = 0.90 (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 5.09 (m, 10 H, CH=C), 3.96 (s, 3 H, OCH₃), 3.95 (s, 3 H, OCH₃), 3.15 (d, ³J = 7.3 Hz, 2 H, 1'-H₂), 2.08-1.99 (m, 36 H, 9 CH₂CH₂), 1.71 (s, 3 H, 5-CH₃), 1.65 (s, 3 H, 39'-CH₃), 1.57 (s, 30 H, 10 CH=CCH₃). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 184.7 (C_q), 183.8 (C_q), 144.3 (C_q), 144.1 (C_q), 141.6 (C_q), 138.8 (C_q), 137.5 (C_q), 135.1 (C_q), 134.9 (C_q), 134.82 (2×C_q), 134.79 (2×C_q), 134.76 (C_q), 131.1 (C_q), 124.3 (CH), 124.2 (CH), 124.1 (CH), 123.8 (CH), 118.8 (CH), 61.0 (OCH₃), 39.67 (CH₂), 39.65 (CH₂), 26.69 (CH₂), 26.62 (CH₂), 26.42 (CH₂), 25.63 (CH₂), 25.22 (CH₂), 17.6 (CH₃), 16.3 (CH₃), 16.0 (CH₃), 11.9 (CH₃). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 886 [M+Na]⁺ (16), 1748 [2M+Na]⁺ (100). - (-)-ESI-MS*: m/z (%) = 864 [M-H]⁻ (20). - EI-MS (70 eV)*: m/z (%) = 864 [M]⁺ (70), 235 (63), 197 (74), 81 (71), 69 (100).

*Werte entsprechen dem Dihydroprodukt von Ubichinon-10, welches wahrscheinlich als Verunreinigung bzw. als Reduktionsprodukt von Ubichinon-10 vorlag.

Nostoxanthin (44): C₄₀H₅₆O₄ (600.0), oranger Feststoff, blauschwarze Verfärbung mit konzentrierter H₂SO₄, R_f = 0.56 (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). - ¹H-NMR ([D₆]DMSO, 500 MHz): δ = 6.73 (m, 2 H, CH=C), 6.67 (m, 2 H, CH=C), 6.41 (d, ³J = 15.1 Hz, 2 H, CH=C), 6.35 (d, ³J = 11.4 Hz, 2 H, CH=C), 6.24 (d, ³J = 11.4 Hz, 2 H, CH=C), 6.16 (d, ³J_{AB} = 15.9 Hz, 2 H, CH=C), 6.10 (d, ³J_{AB} = 15.9, 2 H, CH=C), 4.57 (s br, 2 H, OCH), 4.51 (s br, 2 H, OCH), 2.34 – 2.29 (dd, ³J = 5.9 Hz, ²J = 17.6 Hz, 2 H, 4-CH_A, 4'-CH_A), 2.04-1.96 (m, 2 H, 4-CH_B, 4'-CH_B), 1.99 (s, 6 H, 2 CH₃), 1.95 (s, 6 H, 2 CH₃), 1.68 (s, 6 H, 2 CH₃), 1.06 (s, 6 H, 2 CH₃), 1.05 (s, 6 H, 2 CH₃), OH nicht sichtbar. - ¹³C-NMR ([D₆]DMSO, 125 MHz): δ = 137.8 (CH), 137.4 (CH), 137.1 (C_q), 136.2 (C_q), 135.3 (C_q), 132.6 (CH), 131.3 (CH), 130.3 (CH), 125.7 (CH), 125.5 (C_q), 125.1 (CH), 78.5 (OCH), 66.1 (OCH), 72.4 (C_q), 40.1 (C_q), 26.2 (CH₃), 21.8 (CH₃), 21.0 (CH₃), 17.2 (CH₃), 12.4 (CH₃). - (+)-ESI-MS: m/z (%) = 1223 [2M+Na]⁺ (80), 600. [M+H]⁺ (100).

Stamm Fpep1 (Pic 95)

Der Stamm Fpep 1 (Pic 95) bildete nach drei Tagen gelbe Kolonien, die Agarplatte war gelborange gefärbt. Wie Wagner Döbler⁸³ durch eine 16S-rDNA Analyse zeigte, gehört der Stamm Fpep1 (Pic 95) dem Cytophaga/Flexibakterium-Cluster an.

Primärscreening

Der Stamm Fpep1 wurde auf Cytophaga-Medium-Schrägagar, dann auf acht Agarplatten (Cytophaga-Medium) jeweils 72 h bei 28 °C kultiviert. Diese Kulturen wurden zur Herstellung von jeweils 1 l-Schüttelkultur (je vier 1 l-Schikanekolben zu je 200 ml, 72 h Fermentation bei 28 °C mit 95 Upm; Rundschüttler) mit verschiedenen Medien: Cytophaga-Medium, SM 50 %, ANT 50 %, LB 50 %, Fischmehl verwendet. Dabei wuchs der Stamm bei allen Kulturen unter Bildung von beigem Zellmaterial, die Nährmedien waren orange gefärbt. Die Schüttelkulturen wurden lyophilisiert und jeweils mit Ethylacetat extrahiert. Bei DC (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Extrakten beobachtet werden. Neben orangen Zonen bei Tageslicht ($R_f = 0.62$ und 0.79) fielen Fluoreszenz löschende Zonen auf ($R_f = 0.24 - 0.69$).

Tabelle 29: Aktivitäten und Auswaagen der EtOAc-Extrakte verschiedener Schüttelkulturen des Stammes Fpep1

Nährmedien	Testkeime / Hemmhof Ø [mm] *					
Medium (EtOAc-Extrakt: mg/l)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Mucor miehei</i>	<i>Chorella sorokiniana</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Scenedesmus subspicatus</i>
Cytophaga-Medium (31)	12	11	0	0	0	0
SM 50 % (51.1)	12	11	0	0	0	14
ANT 50 % (17.4)	14	0	0	0	0	0
Fischmehl (80)	0	0	12	25	20	0
LB 50 % (33.6)	13	11	0	11	46	0

*Keine Aktivitäten gegen: *Streptomyces viridochromogenes* (Tü 57), *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*

Tabelle 30: Aktivität des Stammes Fpеп1 im pharmakologischen Screening (EtOAc-Extrakt)

Medium	Zytotoxizität (RAW-Makrophagen)	Antileishmania-Aktivität (<i>Leishmania donovani</i>)
Cytophaga-Medium	5 – 2.5 µg/ ml; hohe Aktivität	< 2.5 µg/ ml; sehr hohe Aktivität

Fermentation und Aufarbeitung

Der Stamm Fpеп1 (Pic 95) wurde von Fischmehl-Agar auf acht Agarplatten (Fischmehlmedium) subkultiviert (72 h bei 28 °C). Mit diesen Kulturen wurden 96 mit je 250 ml Fischmehlmedium gefüllte 1 l-Erlenmeyerkolben beimpft und 4 d bei 28 °C mit ca. 120 Upm auf dem Linearschüttler inkubiert. Das Nährmedium war nach ca. 4 d schwach orange, die Zellmasse war beige gefärbt. Die Kulturbrühe wurde über Celite filtriert und das hierbei erhaltene wäßrige Filtrat dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal in Ethylacetat digeriert, 15 min mit Ultraschall behandelt und anschließend filtriert. Die organischen Phasen wurden vereinigt und ergaben nach dem Entfetten mit Cyclohexan einen Eindampfrückstand von 750.5 mg.

Isolierung

Der Rohextrakt wurde in Methanol aufgenommen und durch Mitteldrucksäulenchromatographie an Kieselgel getrennt (Säule 25 × 330 mm; Fließmittelgradient: 300 ml CH₂Cl₂, 250 ml CH₂Cl₂/1 % CH₃OH, 500 ml CH₂Cl₂/2 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/3 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/4 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/5 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/6 % CH₃OH, 300 ml CH₂Cl₂/7 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/8 % CH₃OH, 350 ml CH₂Cl₂/9 % CH₃OH, 400 ml CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, 150 ml CH₂Cl₂/20 % CH₃OH, 100 ml CH₂Cl₂/30 % CH₃OH, 100 ml CH₃OH. Durch DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, Beurteilung des DC bei Tageslicht und nach Reaktion mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ-Sprühreagenz) unterteilte man in vier Fraktionen (keine davon mit auffälliger Bioaktivität). Fraktion 1: gelblich bei Tageslicht, Fluoreszenz löschend bei 254 nm, ölig; Fraktionen 2: schwach gelb, komplexe Substanzgemische bei geringer Fraktionsmenge; Fraktion 3: gelblich bei Tageslicht, intensiv rote Zone nach Ansprühen mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, R_f = 0.55; Fraktion 4: braungelb, mehrere Fluoreszenz löschende Zonen bei 254 nm, R_f = 0.12-35. Die Fraktion 3 wurde durch Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 800 mm, CH₂Cl₂/40 % CH₃OH) gereinigt und ergab 1.4 mg N^B-Acetyltryptamin (**45**).

N^β-Acetyltryptamin (45): C₁₂H₁₄N₂O (202.4), farbloser Feststoff, intensiv rot mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, nach 3 min blaue Verfärbung, *R_f* = 0.55 (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH). – ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 8.54 (s br, 1 H, NH), 7.57 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.35 (d, ³*J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.18 (dd, ³*J* = 7.7 Hz, ³*J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.10 (dd, ³*J* = 7.7 Hz, ³*J* = 7.7 Hz), 6.99 (s, 1 H), 5.77 (s br, NH), 3.59 (q, ³*J* = 6.7 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH), 2.94 (t, ³*J* = 6.6 Hz, 2 H, CH₂CH₂NH), 1.89 (s, 3 H, CH₃). – ¹³C-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 170.5 (C_q), 136.4 (C_q), 127.9 (C_q), 122.1 (CH), 122.0 (CH), 119.3 (CH), 118.5 (CH), 112.6 (C_q), 111.3 (CH), 39.9 (CH₂), 25.1 (CH₂), 23.2 (CH₃). – (-)-ESI-MS: *m/z* (%) = 201 [M-1]⁻ (50). – (+)-ESI-MS: *m/z* (%) = 427 [2M+Na]⁺ (100), 225 [M+Na]⁺ (48).

Eine erneute Fermentation des Stammes erfolgte unter Verwendung des LB 50 % -Mediums + Glucose. Hierzu wurde er auf acht Agarplatten subkultiviert (72 h bei 28 °C), mit denen man 96 mit je 250 ml mit LB 50 % -Mediums + Glucose gefüllte 1 l-Erlenmeyerkolben beimpfte und 4 d bei 28 °C mit ca. 120 Upm auf dem Linear-schüttler inkubierte. Das Nährmedium war bereits nach 2.5 d intensiv orange, die Zellmasse war beige gefärbt. Das Nährmedium wurde über Celite filtriert und das wäßrige Filtrat dreimal mit Ethylacetat extrahiert. Der mit Celite vermischte Zellrückstand wurde dreimal in Ethylacetat und zweimal in Aceton digeriert, 15 min im Ultraschall belassen und filtriert. Die Ethylacetatphasen wurden vereinigt, die Lösungsmittel jeweils im Vakuum entfernt. Man erhielt so einen EtOAc-Extrakt von 2.1 g und einen Acetonextrakt von 1.3 g, die nach DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) miteinander vereinigt wurden.

Isolierung

Der gesamte Rohextrakt wurde in einem Gemisch von CH₂Cl₂/CH₃OH gelöst und durch Vakuum-Säulenchromatographie mit einem CH₂Cl₂/CH₃OH Gradienten (250 ml CH₂Cl₂, 250 ml CH₂Cl₂/1 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/2 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/3 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/4 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/5 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/6 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/7 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/8 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/9 % CH₃OH, 250 ml CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/20 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/30 % CH₃OH, 200 ml CH₂Cl₂/50 % CH₃OH, 250 ml CH₃OH) unter DC-Kontrolle (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH, Sprühreagenz Anisaldehyd/konz. H₂SO₄, Farbigkeit bei Tageslicht, Fluoreszenzlöschung) in sechs Fraktionen getrennt: Die Fraktionen 1-6 waren im biologischen Screening nur noch schwach

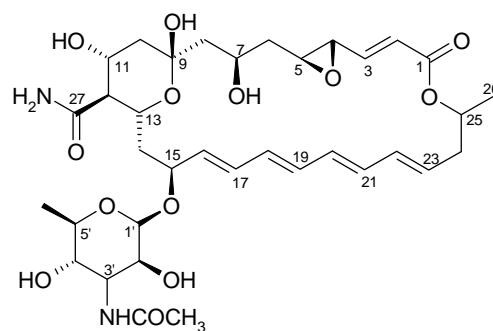
aktiv. Die Fraktionen 1, 2, 5 und 6 zeigten keine Auffälligkeiten bei DC und bestanden aus komplexen Substanzgemischen; Fraktion 3: gelborange bei Tageslicht, braun mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, $R_f = 0.72-0.67$; Fraktion 4: gelborange bei Tageslicht, gelborange ($R_f = 0.66$) und braune ($R_f = 0.26-0.34$) Zonen mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ. Die Fraktion 3 wurde durch PDC an Kieselgel (drei Platten 20 × 40 cm, CH₂Cl₂/10 % CH₃OH) und anschließende Säulenchromatographie an Sephadex LH-20 (Säule 30 × 800 mm, CH₂Cl₂/40 % CH₃OH) gereinigt, wodurch man 3.6 mg Zeaxanthin (**46**) erhielt. Die Fraktion 4 wurde durch SC an Sephadex 20 (Säule 30 × 800 mm, CH₂Cl₂/40 % CH₃OH) getrennt, wodurch man ebenfalls die Verbindung Zeaxanthin erhielt (4.1 mg).

Zeaxanthin (46): C₄₀H₅₆O₂ (568.5), gelboranger Feststoff, $R_f = 0.65$ (CH₂Cl₂/10 % CH₃OH), blau mit Anisaldehyd/H₂SO₄/Δ, dunkelblau mit konzentrierter Schwefelsäure. - ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 6.66-6.60 (m, 4 H), 6.35 (d, ³J = 15.3 Hz, 2 H), 6.24 (m, 2 H), 6.16-6.07 (m, 6 H), 3.99 (m, 2 H), 2.37 (dd, ²J = 16.6 Hz, ³J = 5.0 Hz, 2 H), 2.06-1.98 (m, 2 H), 1.95 (s, 12 H), 1.77-1.73 (m, 2 H), 1.72 (s, 6 H), 1.46 (dd, ²J = 10.6 Hz, ³J = 10.6 Hz, 2 H), 1.06 (s, 12 H), (OH nicht sichtbar). - ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ = 138.5 (CH), 137.8 (C_q), 137.6 (CH), 136.5 (C_q), 135.7 (C_q), 132.6 (CH), 131.3 (CH), 130.1 (CH), 126.2 (C_q), 125.6 (CH), 124.9 (CH), 65.1 (CH), 48.4 (CH₂/C_q), 42.6 (CH₂/C_q), 37.1 (CH₂/C_q), 30.3 (CH₃), 28.7 (CH₃), 21.6 (CH₃), 12.82 (CH₃), 12.75 (CH₃). - EI-MS (70 eV): m/z (%) = 568 (M, 100), 476 (16), 410 (11), 209 (12), 159 (13), 119 (16), 57 (13).

Stamm Pico II 5.3

Der Streptomycet Pico II 5.3 und verschiedene andere Isolate wurden von Francisco Malpartida (Centro Nacional de Biotecnología, Campus de la U.A.M., Madrid) auf SYM2 oder YEME Medium kultiviert. Die Polyene wurden dem lyophilisierten Medium mit Methanol entzogen, an einer Omnifit-Säule (250 × 25 mm, Supelco Kat. Nr. 56010) mit SP-Sepharose gebunden und mit 300 mM Ammoniumacetat pH5 in 20% Methanol eluiert. Die Fraktionen wurden schließlich durch HPLC mit einem Ammoniumacetat/Methanol Gradienten nachgereinigt. Aus einer entsprechenden Aufarbeitung wurden uns 18 mg AB-400 (**47**) als beiges Lyophilisat übergeben.

AB-400 (47): C₃₃H₄₈N₂O₁₂ (664.6),
beiger Feststoff, $R_f = 0.05$ (CH₂Cl₂/10 %
CH₃OH), nicht löslich in CHCl₃, Aceton;
gut löslich in DMSO, Pyridin. – ¹H-NMR
([D₅]Pyridin, 500 MHz): $\delta = 9.04$ (s br, 1 H,
OH), 8.90 (s, 1 H, OH), 8.72 (s, 1 H, OH),
durch Lösungsmittelsignal überlagert), 8.43



(s, 1 H, OH), 6.67-6.60 (m, 2 H, 3-H), 6.48-6.43 (m, 1 H, H-16), 6.33-6.11 (m, 6 H,
17-H, 2-H, 20-H, 21-H, 19-H, 22-H), 5.63-5.57 (m, 1 H, 23-H), 5.19-5.09 (m, 3 H,
11-H, 13-H, 1'-H), 4.93-4.85 (m, 2 H, 15-H, 2'-H), 4.87 (m, 1 H, 25-H), 4.70 (t, ³J =
10.3 Hz, 1 H, 7-H), 4.10-4.06 (m, 1 H, 4'-H), 3.81 (m, 2 H, 5'-H, 3'-H), 3.28 (d, ³J =
7.7 Hz, 1 H, 4-H), 3.15 (d, ³J = 7.7 Hz, 1 H, 5-H), 2.82-2.78 (m, 2 H, 12-H, 14-H_A),
2.54-2.47 (m, 1 H, 10-H_A), 2.27-2.23 (m, 1 H, 24-H_A), 2.20-2.13 (m, 1 H, 24-H_B),
2.05-2.00 (m, 2 H, 6-H_A, 14-H_B), 1.96-1.91 (m, 1 H, 8-H_A), 1.80-1.75 (m, 2 H, 10-
H_B, 8-H_B), 1.52 (d, ³J = 5.7 Hz, 3 H, 6'-H), 1.45-1.38 (m, 1 H, 6-H), 1.27 (d, ³J = 6.4
Hz, 3 H, 26-H). – ¹³C-NMR ([D₅]Pyridin, 125 MHz): $\delta = 176.7$ (C_q, C-27), 165.3
(C_q, C-1), 145.1 (CH, C-3), 137.0 (CH, C-16), 136.3 (CH, C-22), 134.2 (CH, C-18),
132.5 (CH, C-20), 132.1 (CH, C-19), 132.3 (CH, C-21), 129.5 (CH, C-17), 129.0
(CH, C-23), 125.2 (CH, C-2), 98.3 (CH, C-9), 97.9 (CH, C-1'), 76.0 (CH, C-15),
74.3 (CH, C-5'), 71.7 (CH, C-4'), 70.1 (CH, C-25), 69.9 (CH, C-2'), 67.5 (CH, C-7),
66.4 (CH, C-11), 66.2 (CH, C-13), 59.2 (CH, C-12), 59.1 (CH, C-5), 57.8 (CH, C-
3'), 54.6 (CH, C-4), 47.7 (CH₂, C-8), 45.7 (CH₂, C-24), 41.8 (CH₂, C-6), 39.9 (CH₂,
C-10), 38.1 (CH₂, C-14), 20.5 (CH₃, C-26), 18.5 (CH₃, C-6'). - (+)-ESI m/z (%): 687
[M+Na]⁺ (100), 665 [M+H]⁺ (10).

Literatur

- ¹ K. Nakanishi, *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol. 1*, Elsevier, New York, **1999**.
- ² V. Schulz, R. Hänsel, *Rationale Phytotherapie*, Springer-Verlag, Berlin, **1996**.
- ³ G. Habermehl, P. Hammann, *Naturstoffchemie*, Springer-Verlag, Berlin, **1992**.
- ⁴ P. Nuhn, *Naturstoffchemie*, S. Hirzel Verlag, Stuttgart, **1997**.

- ⁵ A. Fleming, *Brit. J. Exptl. Pathol.* **1929**, *10*, 226-236.
- ⁶ H. Mau, *Charité-Annalen*, Vol. 13, Akademie Verlag, Berlin, **1995**.
- ⁷ E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatly, M. A. Jennings, J. Orr-Erwin, A. G. Sanders, *Lancet* **1940**, *2*, 226-228.
- ⁸ A. Schatz, E. Bugie, S. A. Waksman, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1944**, *55*, 66.
- ⁹ World Health Organization (WHO), *Removing Obstacles to Healthy Development*, Report on infectious-diseases, Kap. 1-16, **1999**.
- ¹⁰ H. Blasius, *Deutsche Apothekerzeitung* **2003**, *11*, 32.
- ¹¹ World Health Organization (WHO), *Infectious-Disease-Report* **2000**, Kap. 3.
- ¹² Robert Koch-Institut, *Epidemiol. Bull.* **2004**, *42*, 358-361.
- ¹³ MarinLit, Department of Chemistry, University of Canterbury, New Zealand.
- ¹⁴ H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase*[®], Chemical Concepts, Weinheim **2000**; siehe <http://www.gwdg.de/~ucoc/laatsch/>.
- ¹⁵ H. Laatsch, Databases for the Identification of Natural Products, in *Linking and Interpreting Spectra through Molecular Structures*, IM Publications, Chichester, **1997**.
- ¹⁶ J. Fuchser, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1997**, 87-95.
- ¹⁷ J. Nosek, R. Radzio, U. Kück, *Chemie i. u. Zeit* **1997**, *4*, 172-182.
- ¹⁸ W. Fenical, P.R. Jensen, *Marine Biotechnology, Pharmaceutical and Bioactive Natural Products*, Vol. 1, New York, **1993**.
- ¹⁹ O. J. McConnell, R. E. Longley, F. E. Koehn, *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential*, Butterworth-Heinemann-Verlag, Boston, **1994**.
- ²⁰ M. L. Tamplin, *Marine Toxins*, American Chemical Society, Washington DC, **1990**.
- ²¹ G. M. König, A. D. Wright, *Pharm. Z.* **1998**, *48*, 4153-4160.
- ²² D. J. Faulkner, *Antonie van Leeuwenhoek, Marine Pharmacology* **2000**, *77*, 135-145.
- ²³ I. Wagner-Döbler, W. Beil, S. Lang, M. Meiners, H. Laatsch, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, special ed. "Tools and Applications of Biochemical Engineering"* **2002**, *74*, 207-238.
- ²⁴ N. Fusetani, *Drugs from the Sea*, Karger-Verlag, Basel, **2000**.
- ²⁵ A. Kelecom, *An. Acad. Bras. Cienc.* **2002**, *74*, 151-170.
- ²⁶ W. D. Rosenfeld, C. E. Zobell, *J. Bacteriol.* **1947**, *54*, 393-398.
- ²⁷ A. Grein, S. P. Meyers, *J. Bacteriol.* **1958**, *76*, 457-463.
- ²⁸ W. Fenical, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1673-1683.
- ²⁹ R. N. Asolkar, D. Schröder, R. Heckmann, S. Lang, I. Wagner-Döbler, H. Laatsch, *J. Antibiot.* **2004**, *57*, 17-23.
- ³⁰ A. D. Wright, C. Osterhage, G. M. König, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 507-510.
- ³¹ D. J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 155-198.

- ³² M. S. Rappe, K. Virgin, S. J. Giovannoni, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2000**, *33*, 219.
- ³³ H. Laatsch, *Marine Bacterial Metabolites*, **2005**, Institut für Organische und Biomolekulare Chemie, Göttingen.
- ³⁴ Oncotest GmbH, Prof. H. H. Fiebig, Am Flughafen 8-10, 79110 Freiburg.
- ³⁵ Prof. Dr. med. W. Beil, medizinische Hochschule Hannover, Institut für Pharmakologie, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover.
- ³⁶ Dr. O. Kayser, Institut für Pharmazeutische Technologie, Kelchstraße 31, 12169 Berlin.
- ³⁷ A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 301-308.
- ³⁸ S. Ōmura, Y. Iwai, K. Hinotozawa, Y. Takahashi, J. Kato, A. Nakagawa, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 645-652.
- ³⁹ S. Ōmura, A. Nakagawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 6088-6089.
- ⁴⁰ A. Nakawaga, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1636-1638.
- ⁴¹ P. Sedmera, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 870-872.
- ⁴² M. Ishibashi, S. Funayama, Y. Anraku, K. Komiyama, S. Ōmura, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 390-395.
- ⁴³ J. Thiem, B. Meyer, *Tetrahedron* **1981**, *37*, 551-558.
- ⁴⁴ S. E. Wohlert, E. Künzel, R. Machinek, C. Méndez, J. A. Salas, J. Rohr, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 119-121.
- ⁴⁵ N. R. Krishna, D. M. Miller, T. T. Sakai, *J. Antibiot.* **1990**, *43*, 1543-1552.
- ⁴⁶ M.-H. Hou, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, 1352-1361.
- ⁴⁷ G. P. Bakhaeva, Yu. A. Berlin, E. F. Boldyreva, O. A. Chupronova, M. N. Kolosov, V. S. Soifer, T. E. Vasijeva, I. V. Yartseva, *Tetrahedron Lett.* **1968**, *32*, 3595-3598.
- ⁴⁸ M. Sastry, D.J. Patel, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6588-6604.
- ⁴⁹ M. Speitling, *Dissertation*, Universität Göttingen 1998.
- ⁵⁰ T. Ando, K. Hirayama, R. Takahashi, I. Horino, Y. Etho, H. Morioka, H. Shibai, A. Murai, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 1207-1209.
- ⁵¹ H.-W. Fehlhaber, H. P. Kraemer, C. M. M. Franco, T. Mukhopadhyay, K. R. Desikan, B. N. Ganguli (Hoechst AG), DE 3446052 A1, **1986**, [Chem. Abstr. **1986**, 104, 17414].
- ⁵² G. C. S. Reddy, R. Sahai, H.-W. Fehlhaber, B.N. Ganguli, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1423-1425.
- ⁵³ O. Johdo, T. Ishikura, A. Yoshimoto, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 1110-1120.
- ⁵⁴ H. Nadig, U. Séquin, *Helv. Chim. Acta* **1987**, *70*, 1217-1225.
- ⁵⁵ R. W. Schuhmacher, B. S. Davidson, D. A. Montenegro, V. S. Bernan, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 613-617.
- ⁵⁶ U. Séquin, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **1986**, *50*, 57.
- ⁵⁷ M. R. Hansen, L. H. Hurley, *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 249-258.

-
- ⁵⁸ M. A. Farooq Biabani, H. Laatsch, E. Helmke, H. Weyland, *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 8457-877.
- ⁵⁹ T. Takao, F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi, K. Sakata, *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 1780-1783.
- ⁶⁰ K. Maeda, T. Takeuchi, K. Nitta, K. Yagishita, R. Utahara, T. Ōsato, M. Ueda, S. Kondō, Y. Okami, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1956**, *9*, Ser. A, 75-81.
- ⁶¹ S. Kondo, M. Miyamoto, H. Naganawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 1143-1145.
- ⁶² K. Shindo, Y. Yamagashi, Y. Okada, H. Kawai, *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 1072-1074.
- ⁶³ M. Stadler, F. Bauch, T. Henkel, A. Muhlbauer, H. Muller, F. Spaltmann, K. Weber, *Arch. Pharm.* **2001**, *334*, 143-147.
- ⁶⁴ H. Drautz, H. Zähler, J. Rohr, A. Zeeck, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 1657-1669.
- ⁶⁵ M. P. Kunstmann, L. A. Mitscher, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 2920-2925.
- ⁶⁶ J. Rohr, R. Thiericke, *Nat. Prod. Rep.* **1992**, 103-137.
- ⁶⁷ N. Imamura, K. Kakinuma, N. Ikekawa, *J. Antibiot.* **1982**, *35*, 602-607.
- ⁶⁸ K. A. Alvi, D. D. Baker, V. Stienecker, M. Hosken, B. G. Nair, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 496-501.
- ⁶⁹ K. Akira, H. Takuya, A. Tomoko, H. Kazunori (Taisho Pharmaceut CO LTD), JP 4178379A2, **1992**, [Chem. Abstr. **1990**, *113*, 34491].
- ⁷⁰ P. Kricke, *Dissertation*, Universität Göttingen, 1984.
- ⁷¹ M. Schiebel, *Dissertation*, Universität Göttingen, 2002.
- ⁷² W.-C. Liu, W. L. Parker, D. S. Slusarchyk, G. L. Greenwood, S. F. Graham, E. Meyers, *J. Antibiot.* **1970**, *23*, 437-441.
- ⁷³ M. L. Giplin, J. Balchin, S.J. Box, J.W. Tyler, *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 627-628.
- ⁷⁴ T. Uchida, M. Imoto, Y. Watanabe, K. Miura, T. Dobashi, N. Matsuda, T. Sawa, H. Naganawa, M. Hamada, T. Takeuchi, H. Umezawa, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1171-1181.
- ⁷⁵ Prof. Dr. S. Schulz, Institut für Organische Chemie, TU Braunschweig, Hagenring 30, 38106 Braunschweig.
- ⁷⁶ K. Stritzke, *Dissertation*, Technische Universität Braunschweig, 2003.
- ⁷⁷ K. Ohta, E. Mizuta, H. Okazaki, T. Kishi, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 4350-4359.
- ⁷⁸ S. Omura, H. Tanaka, R. Ōiwa, J. Awaya, R. Rokuro, K. Tanaka, *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 908-916.
- ⁷⁹ H. Okazaki, K. Ohta, T. Kanamaru, T. Ishimaru, T. Kishi, *J. Antibiot.* **1981**, *34*, 1355-1356.
- ⁸⁰ Dr. Siegmud Lang, Technische Universität Braunschweig, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Spielmannstr. 7, 38106 Braunschweig.

-
- ⁸¹ S. Terao, K. Kato, M. Shiraishi, H. Morimoto, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, **1978**, 1101-1110.
- ⁸² I. Wagner-Döbler, H. Rheims, A. Felske, R. Pukall, B. J. Tindall, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2003**, *53*, 731-738.
- ⁸³ I. Wagner-Döbler, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Mascheroder Weg 1, 38104 Braunschweig.
- ⁸⁴ F. L. Crane, Y. Hatefi, R. I. Lester, C. Widmer, *Biophys. Acta* **1957**, *25*, 220-221.
- ⁸⁵ R. A. Morton, U. Gloor, O. Schindler, G. M. Wilson, L. H. Chopard-dit-Jean, F. W. Hemming, O. Isler, W. M. F. Leat, J. F. Pennock, R. Rugg, U. Schwieter, O. Wiss, *Helv. Chim. Acta* **1958**, *4*, 2343-2357.
- ⁸⁶ E. Baggio, R. Gandini, A. C. Plancher, M. Passeri, G. Carmosino, *Mol. Asp. Med.* **1994**, *15*, 287-94.
- ⁸⁷ V. V. Yurkov, J.T. Beatty, *Microbiol. and Mol. Biol. Reviews*, **1998**, *62*, 695-724.
- ⁸⁸ G. Armstrong, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier Science Ltd., Oxford, United Kingdom, **1999**.
- ⁸⁹ A. Yokoyama, G. Sandmann, T. Hoshino, K. Adachi, M. Sakai, Y. Shizuri, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4901-4904.
- ⁹⁰ Prof. Dr. F. Malpartida, Centro Nacional de Biotecnología, Campus de la U.A.M., 28049 Canto Blanco, SP Madrid.
- ⁹¹ L. M. Cañedo, L. Costa, L. M. Criado, J. L. Fernandez Puentes, M. A. Moreno, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 623-626.
- ⁹² H. Rimpler, *Biogene Arzneistoffe*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, **1999**.
- ⁹³ R. R. Colwell, *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20*, 215-228.

3. Anhang

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Aus marinen Makroorganismen isolierte Wirkstoffe.	9
Tabelle 2: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von 23-Desoxycervinomycin A ₁ (13), Cervinomycin A ₁ -Diacetat (16) und Cervinomycin A ₂ (14) ³⁵ .	43
Tabelle 3: Aktivitäten der Cervinomycin-Derivate 14 , 14 , 16 und 13 im Agardiffusionstest (Hemmhofdurchmesser in mm)	45
Tabelle 4-Hydroxy-7-methoxy-2,3,6-trimethyl-3-(4-methyl-pent-3-enyl)-2,3-dihydro-naphtho[2,3-b]furan-5,8-dion (17) ³⁹ .	50
Tabelle 5: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von Mithramycin (20) mit Literaturwerten ^{41, 42} .	58
Tabelle 6: Vergleich der ^{13}C -NMR-Literaturwerte für Cosmomycin A (22) ⁴⁸ mit den experimentellen Werten.	70
Tabelle 7: Vergleich der ^1H -NMR-Daten von Cytorhodin J (25) exp. Mit den Literaturwerten ⁵⁰ .	74
Tabelle 8: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von Cytorhodin J (25) (exp.) mit den Literaturwerten für ϵ -Rhodomycinon (24) ⁵¹ (gemessen in CDCl_3).	76
Tabelle 9: HSQC-Korrelationen des Trisaccharid-Teils von Cytorhodin J (25).	77
Tabelle 10: Bioaktivitäten des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. GW 44/1571, der Kieselgelfraktion 5 des entsprechenden Rohextraktes sowie von Cosmomycin B und Cytorhodin J (25) im Vergleich.	78

Tabelle 11: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten (δ -Werte) von β -Indomycinone ⁵³ (30), 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (27) und Rubiflavinon C-1 ⁵³ (29).	89
Tabelle 12: Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte von Collismycin A (32) _{exp.} mit den Literaturwerten von Collismycin A (32) und Collismycin B (33) ⁵⁹ .	94
Tabelle 13: Vergleich der ^{13}C -NMR-Werte von Mutabahamycin (40) mit denen von Saquayamycin A ⁷¹ (39) und dem Aglykon des Vineomycin C (36).	123
Tabelle 14: Bioaktivitäten der aus <i>Streptomyces</i> sp. Stamm B 6278 isolierten Anthrachinon- bzw. Angucyclinantibiotika.	136
Tabelle 15: Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten von AB-400 (47) mit den entsprechenden Literaturwerten für N-Acetyl AB-400 (48).	156
Tabelle 16: Tendenzen des Auftretens chemischer Substanzklassen in marinen Bakterien (nach Kelecom ²⁵).	158
Tabelle 17: Aktivität des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. GW 13/580.	183
Tabelle 18: Aktivitäten ausgewählter Fraktionen des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. GW 13/580.	185
Tabelle 19: Aktivität des Rohextraktes aus <i>Streptomyces</i> sp. GW 13/1783.	191
Tabelle 20: Aktivitäten des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. GW 16/3993 im Plattendiffusionstest.	194
Tabelle 21: Aktivitäten der fünf Hauptfraktionen von GW 16/3993, (Hemmhof Ø [mm])	195
Tabelle 22: Aktivität des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. GW 44/1571.	198
Tabelle 23: Aktivität ausgewählter Fraktionen des Rohextraktes des Stammes GW 44/1571 (Hemmhof Ø [mm]).	199

Tabelle 24: Aktivität des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. B 5546 im Plattendiffusionstest des biologischen Screenings.	202
Tabelle 25: Aktivität des Rohextraktes des Stammes B 5546 der 24 l-Schüttelkultur sowie ausgewählter Fraktionen (Hemmhof Ø [mm]).	204
Tabelle 26: Aktivität des Rohextraktes von <i>Streptomyces</i> sp. B 6278	206
Tabelle 27: Aktivitäten der Fraktionen 2 – 5 des Rohextraktes (I) von <i>Streptomyces</i> sp. B 6278	207
Tabelle 28: Aktivität des Rohextraktes von <i>Alpha-Proteobacter</i> sp. Hel 38.	216
Tabelle 29: Aktivitäten und Auswaagen der EtOAc-Extrakte verschiedener Schüttelkulturen des Stammes Fpep1	218
Tabelle 30: Aktivität des Stammes Fpep1 im pharmakologischen Screening (EtOAc-Extrakt)	219

Ausgewählte NMR-Spektren

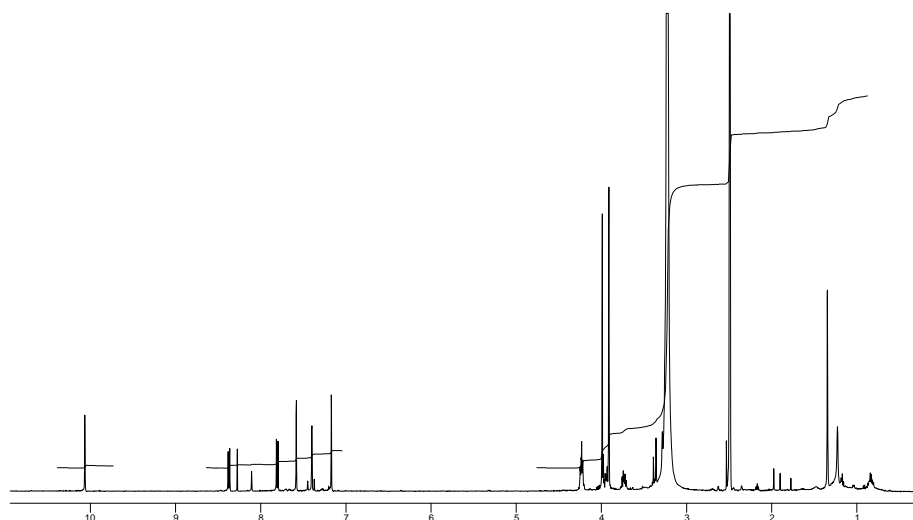


Abbildung 1: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei 50 °C.

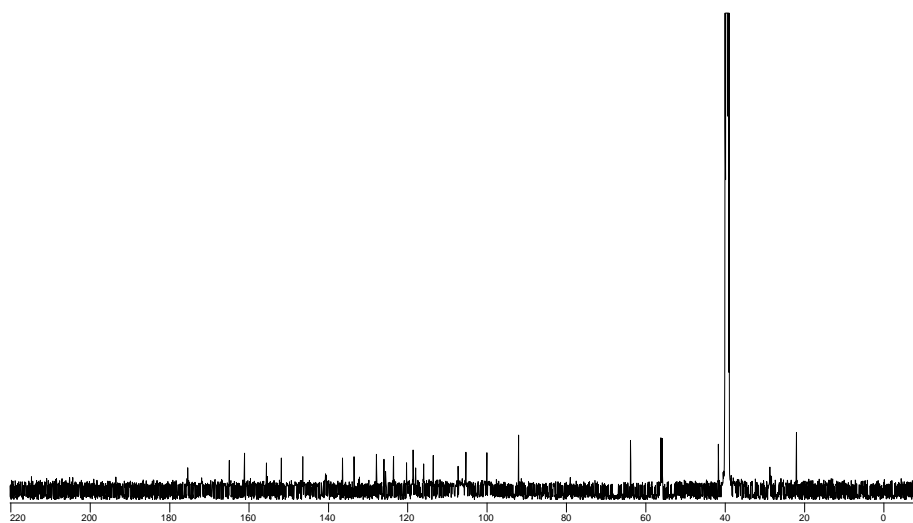


Abbildung 108: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von 23-Desoxycervinomycin A₁ (**13**) in $[\text{D}_6]\text{DMSO}$ bei 50 °C.

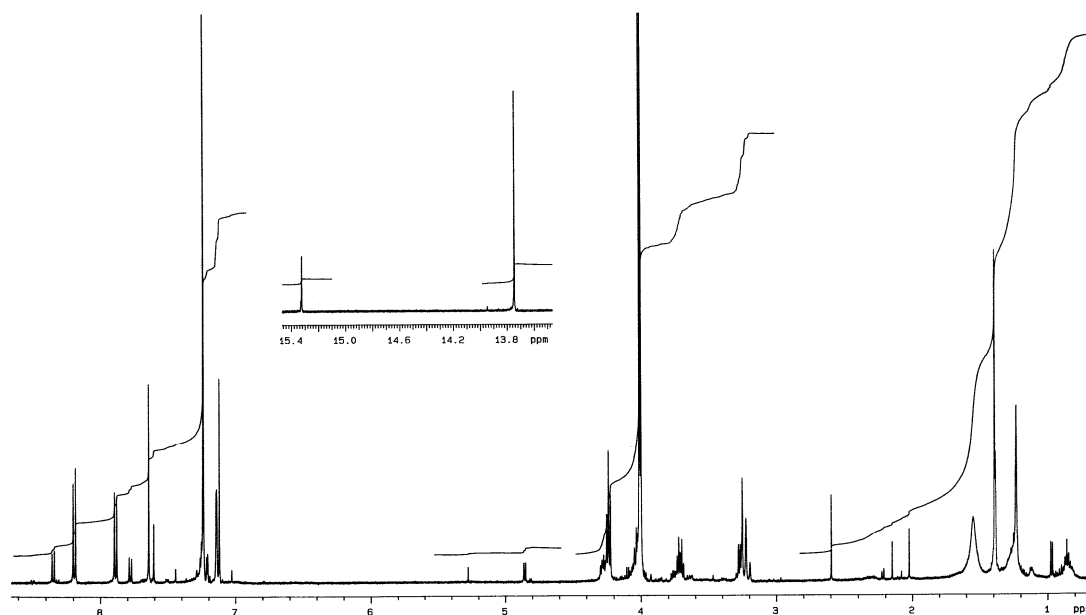


Abbildung 109: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cervinomycin A₂ (**14**) in CDCl_3 .

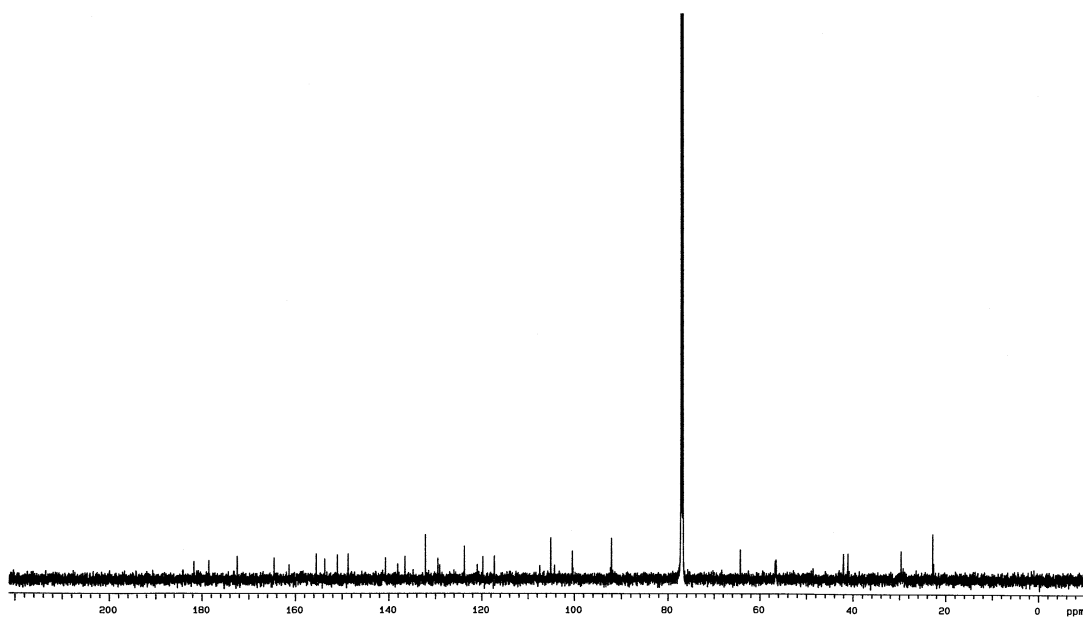


Abbildung 110: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von Cervinomycin A_2 (**14**) in CDCl_3 .

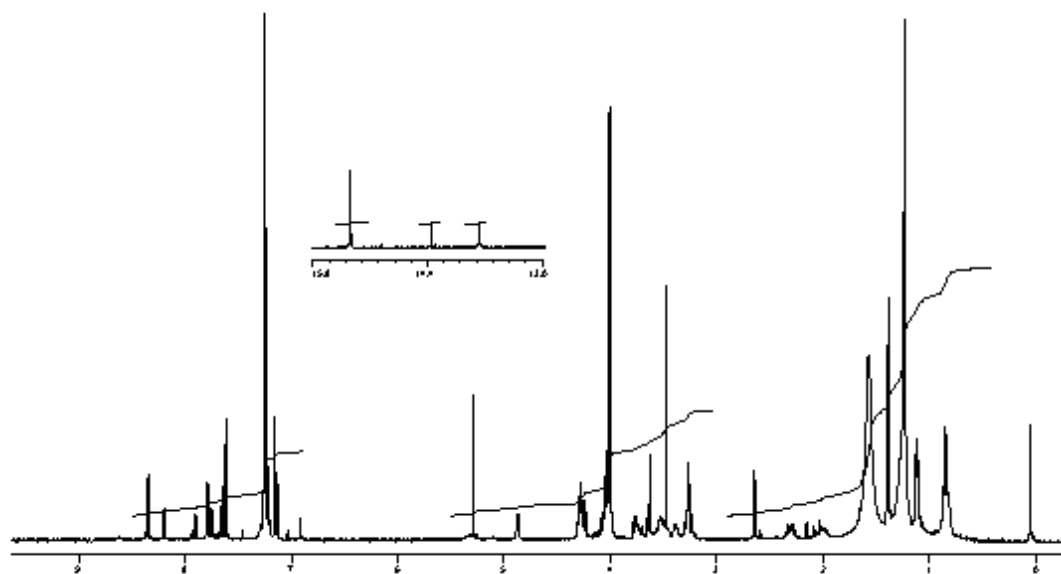


Abbildung 111: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cervinomycin A_1 (**15**).

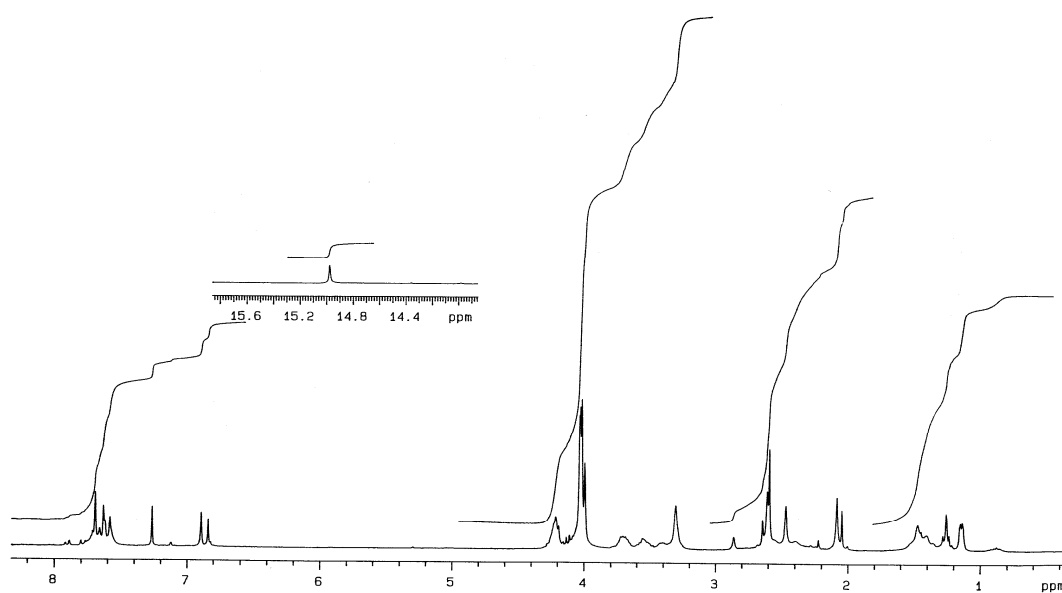


Abbildung 112: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Cervinomycin A_1 -diacetat (**16**).

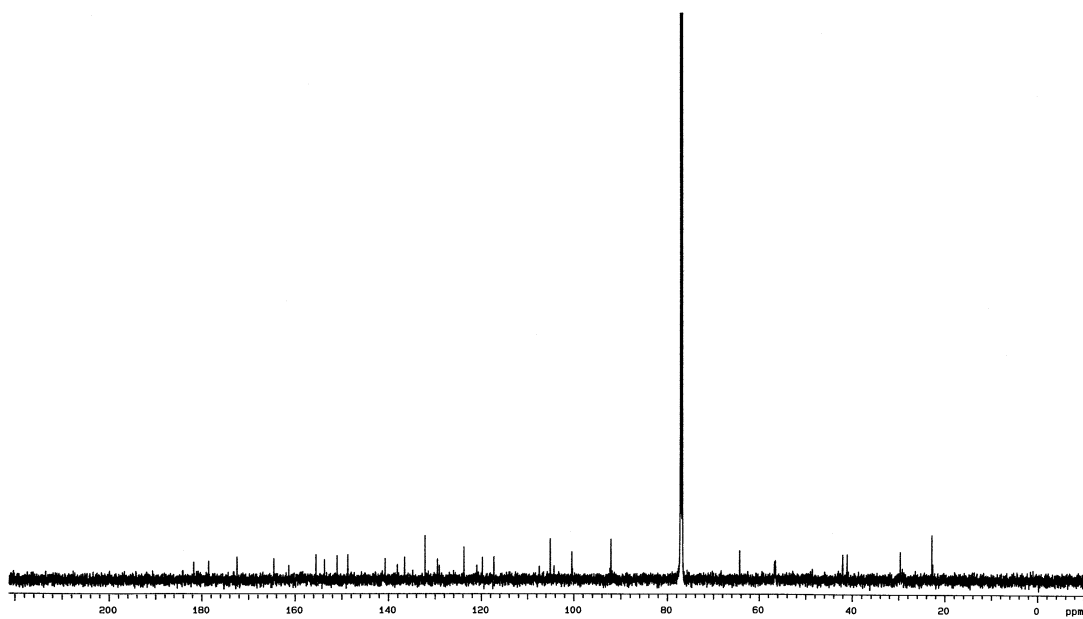


Abbildung 113: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von Cervinomycin A_2 (**14**) in CDCl_3 .

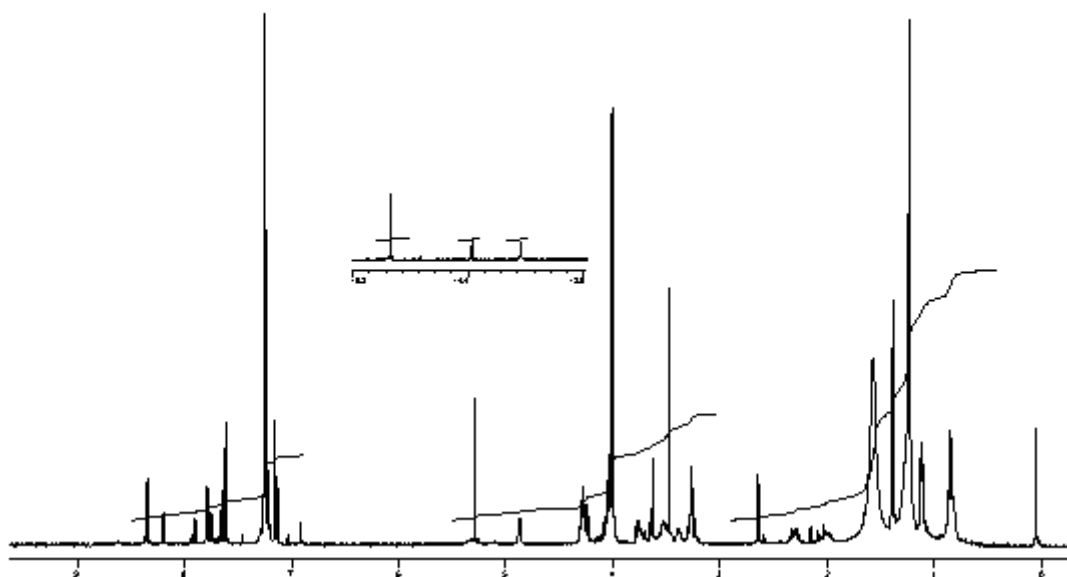


Abbildung 114: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cervinomycin A₁ (15).

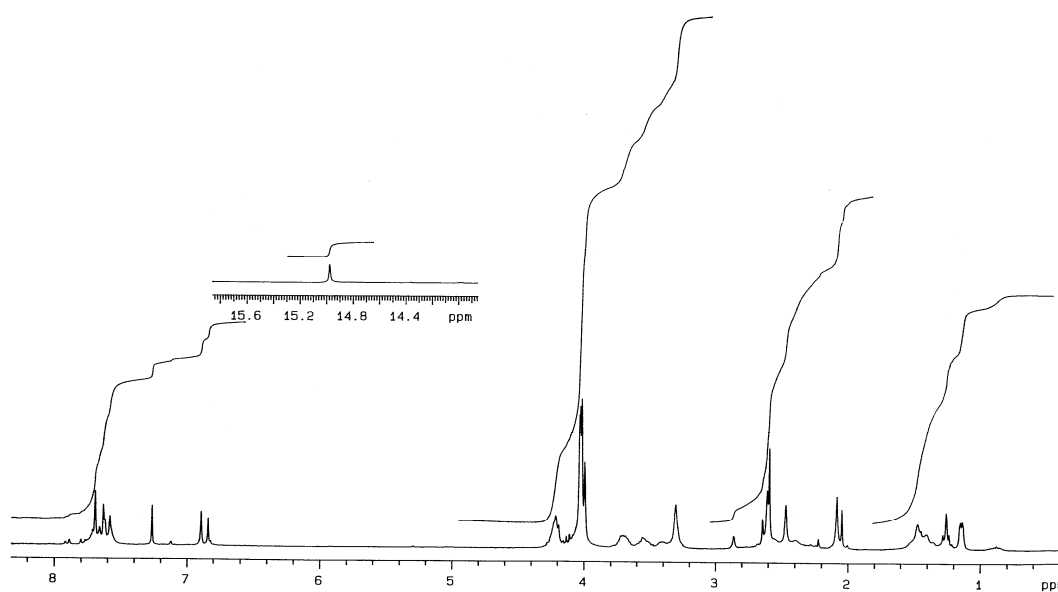


Abbildung 115: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Cervinomycin A₁-diacetat (16).

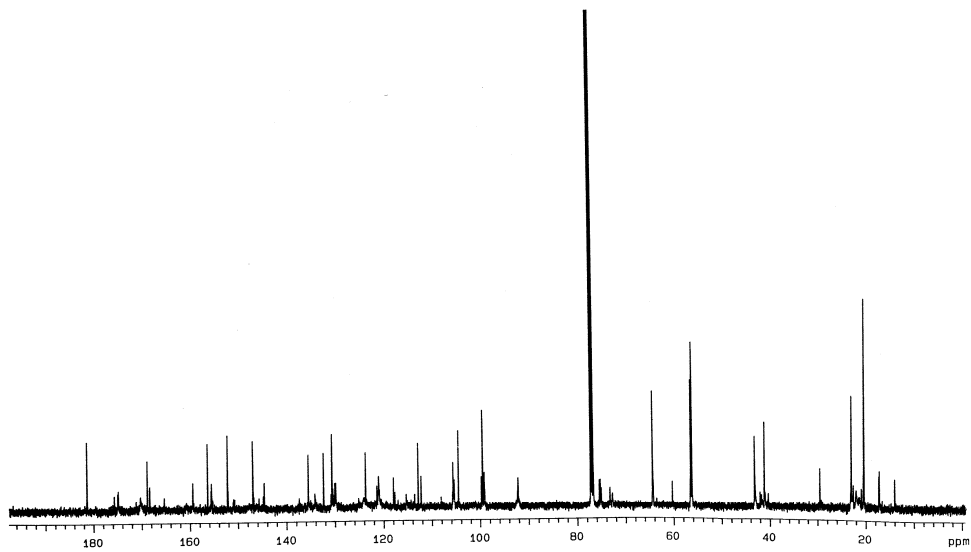


Abbildung 116: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Cervinomycin A_1 -diacetat (16).

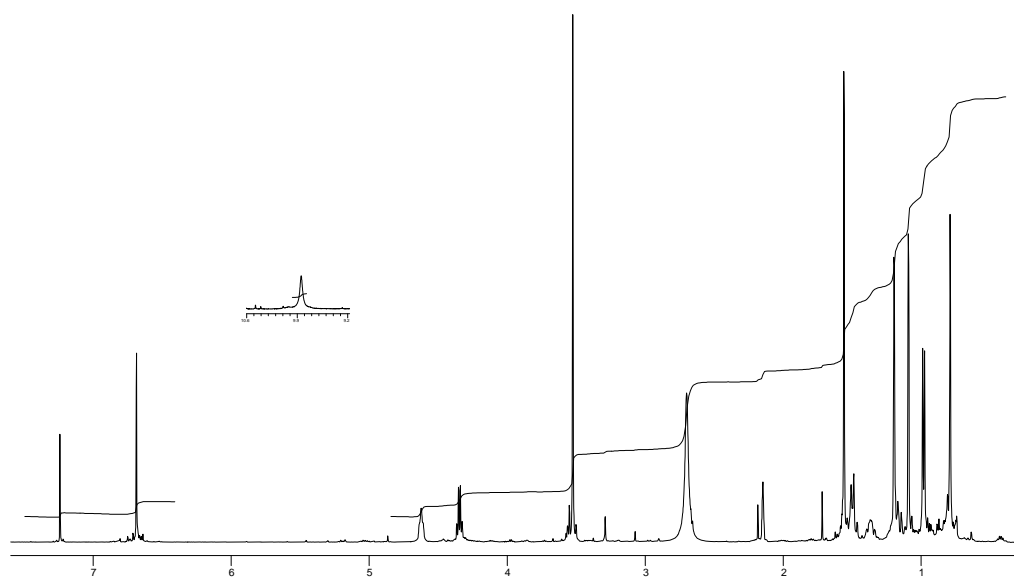


Abbildung 117: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von **17** in CDCl_3 .

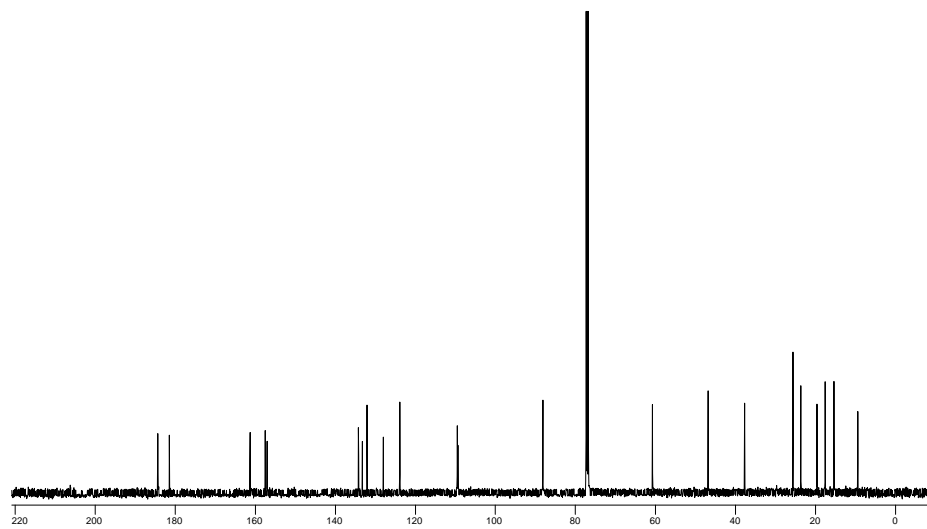


Abbildung 118: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von **17** in CDCl_3 .

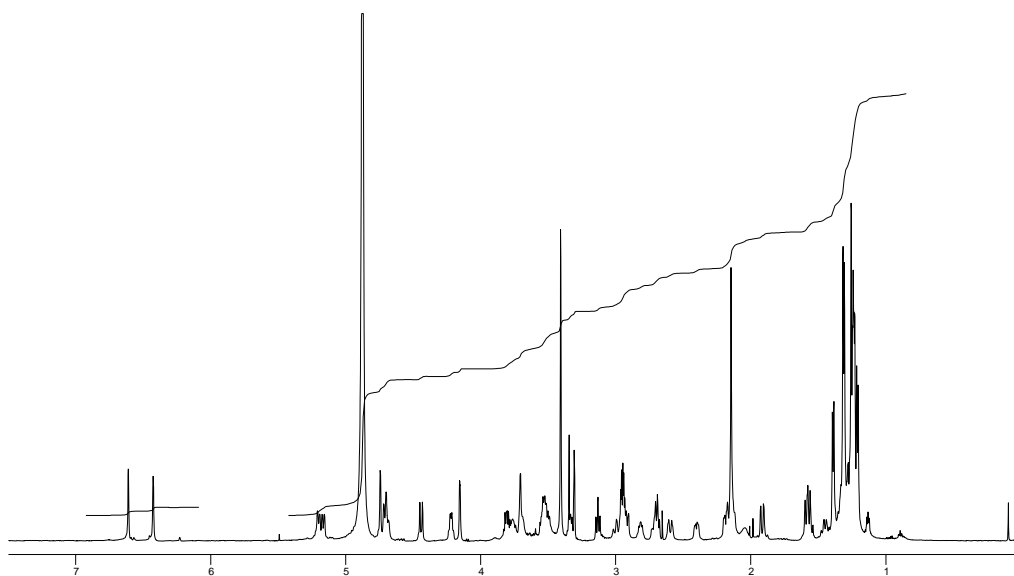


Abbildung 119: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Mithramycin (**20**) in CD_3OD .

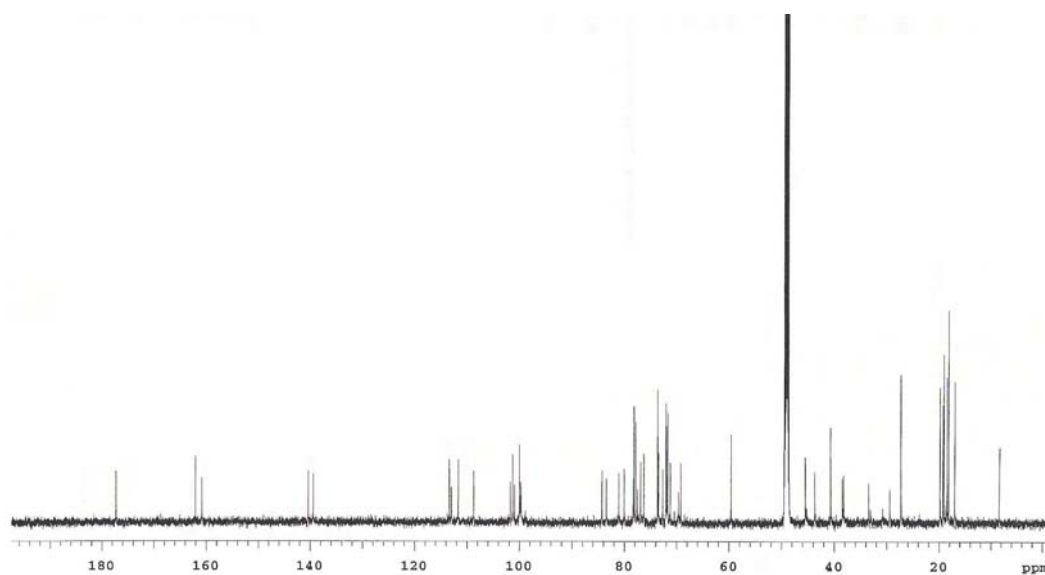


Abbildung 120: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von Mithramycin (**20**) in CD_3OD .

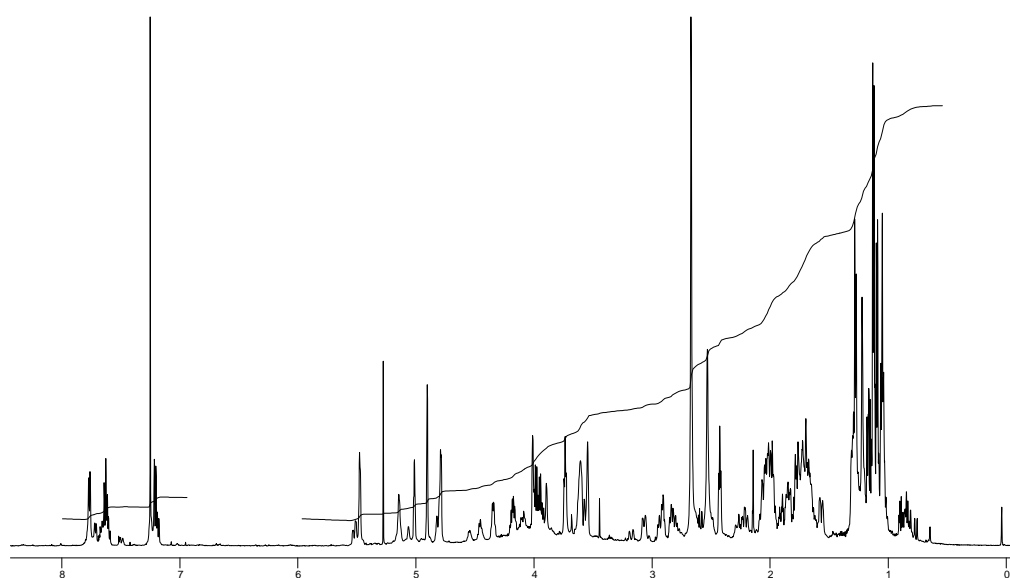


Abbildung 121: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Cosmomycin A (**22**) in CDCl_3 .

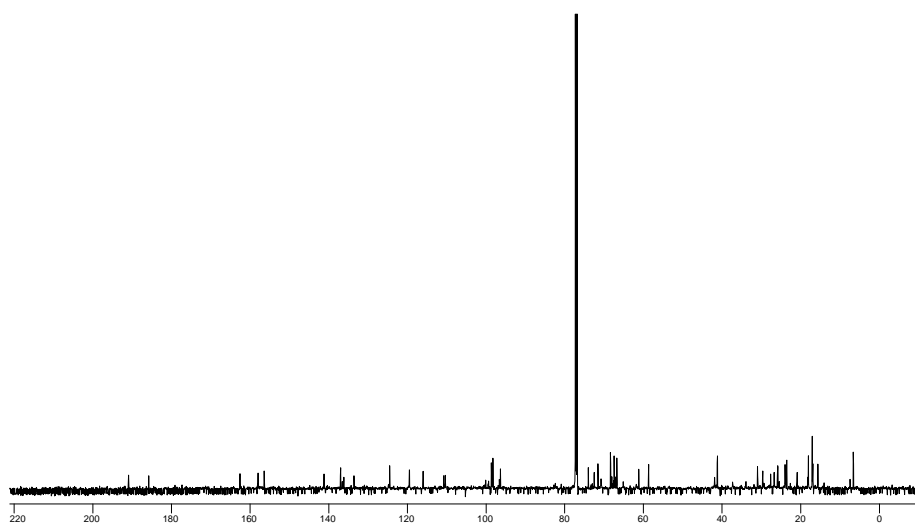


Abbildung 122: ^{13}C -NMR-Spektrum (50 MHz) von Cosmomycin A (**22**) in CDCl_3 .

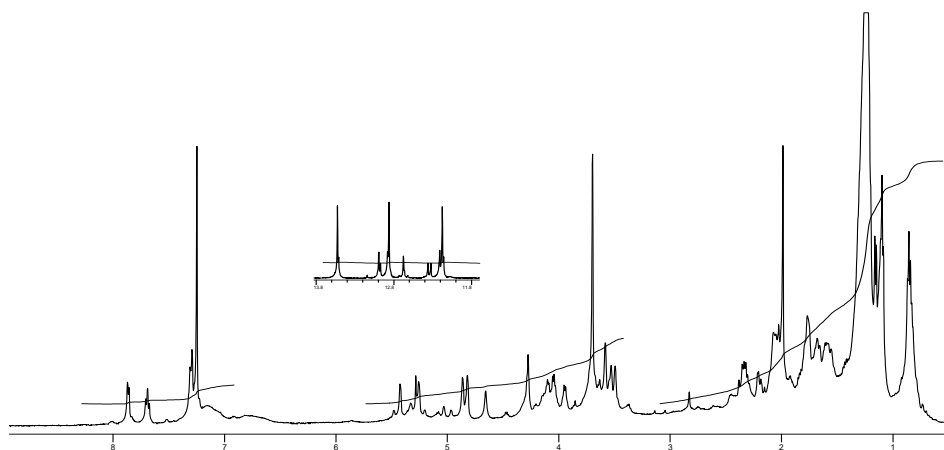


Abbildung 123: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Cytorhodin J (**25**) in CDCl_3 .

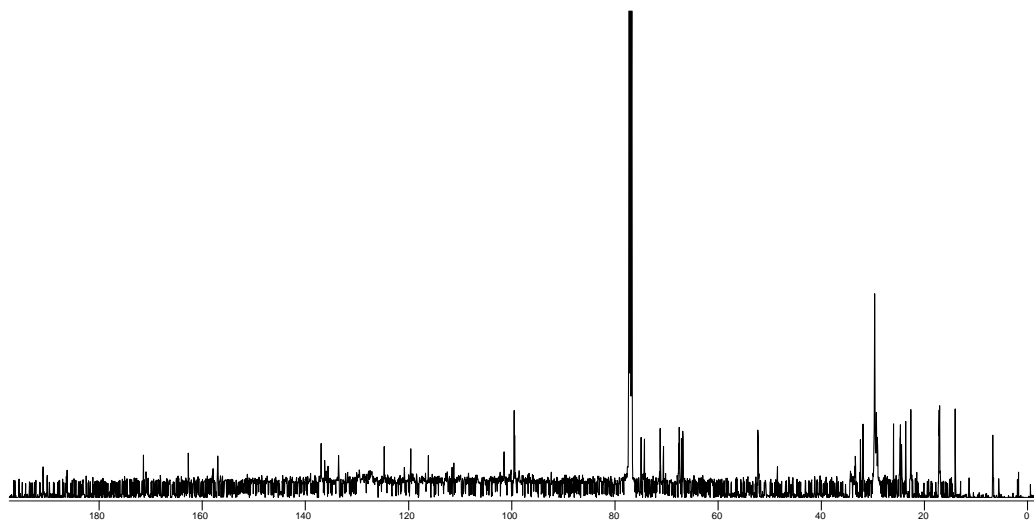


Abbildung 124: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Cytorhodin J (**25**) in CDCl_3 .

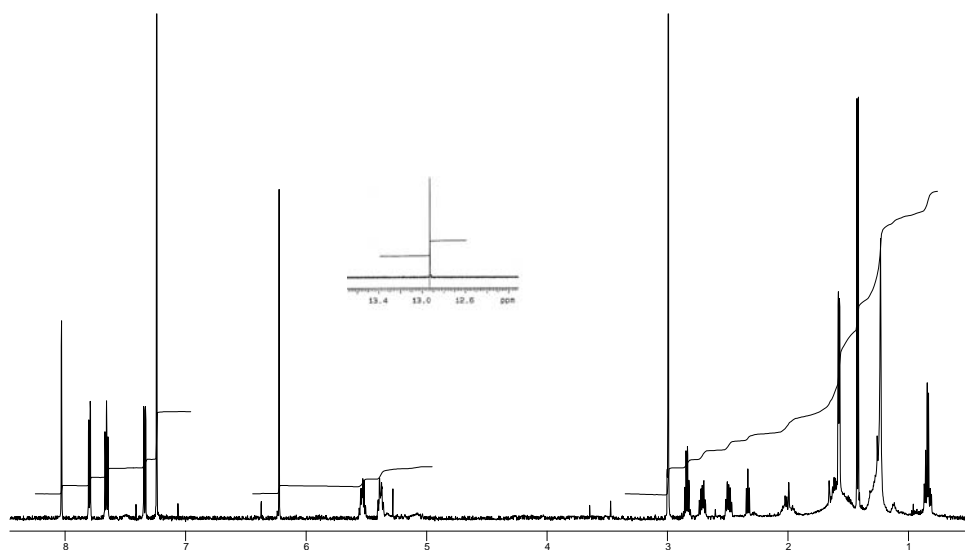


Abbildung 125: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz) von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) in CDCl_3 .

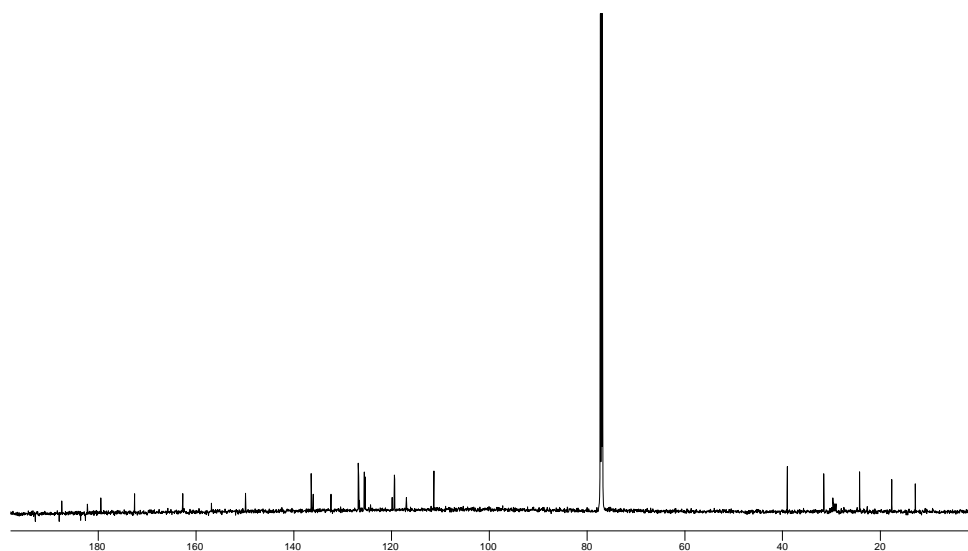


Abbildung 126: ^{13}C -NMR-Spektrum (150 MHz) von 14,15-Dihydro-rubiflavinon C-2 (**27**) in CDCl_3 .

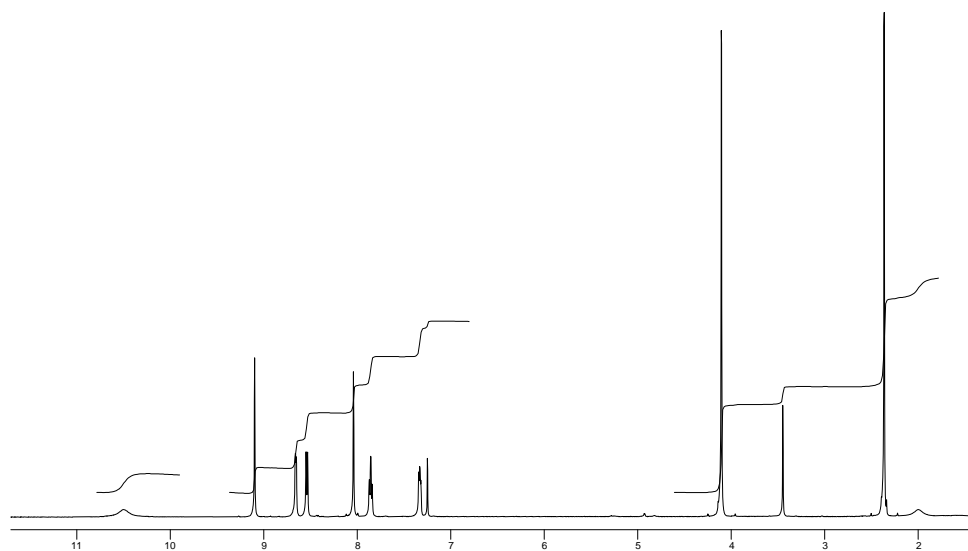


Abbildung 127: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Collismycin A (**32**) in CDCl_3 .

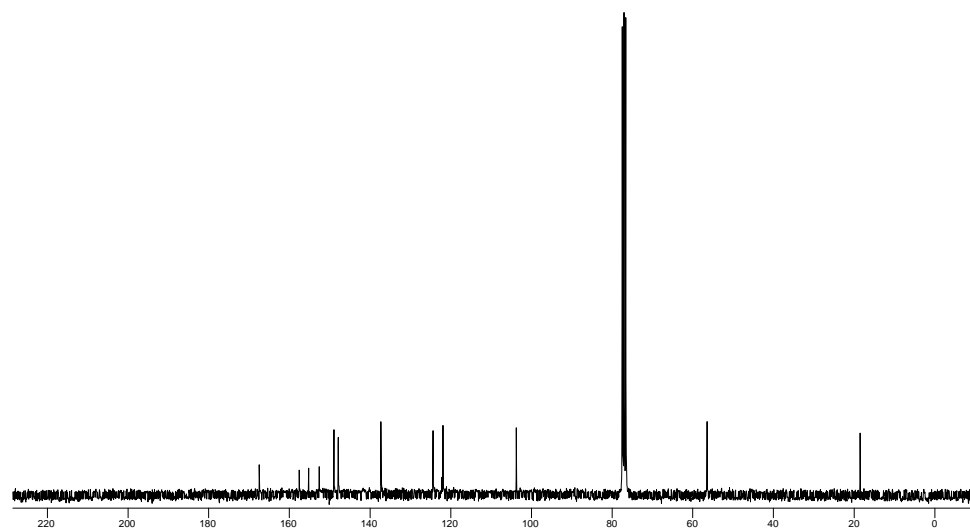


Abbildung 128: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Collismycin A (**32**) in CDCl_3 .

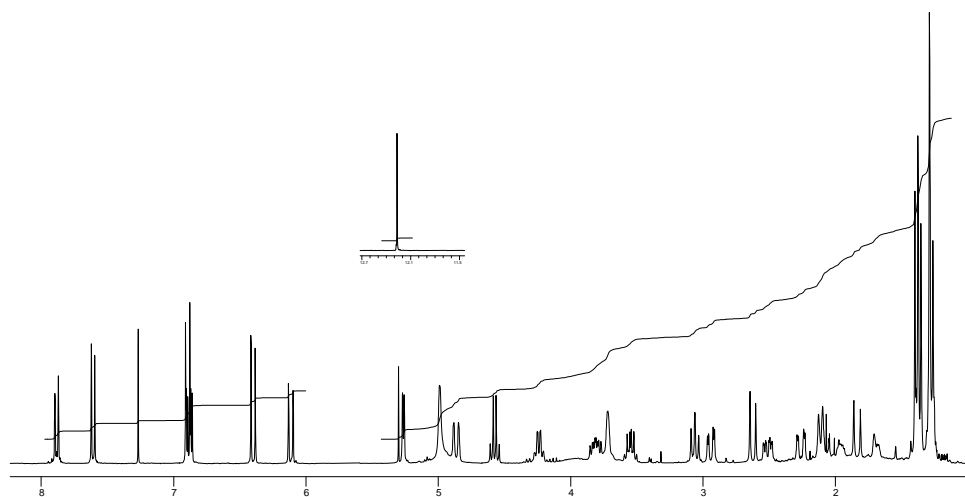


Abbildung 129: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von A-7884 (**35**) in CDCl_3 .

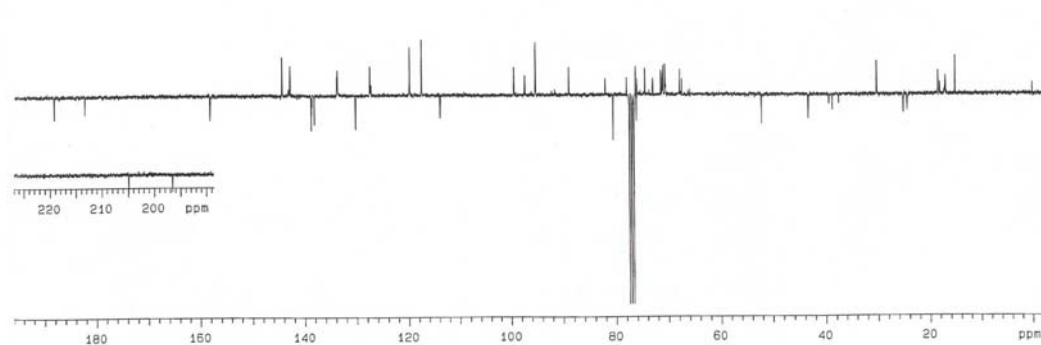


Abbildung 130: ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (75 MHz) von A-7884 (**35**) in CDCl_3 .

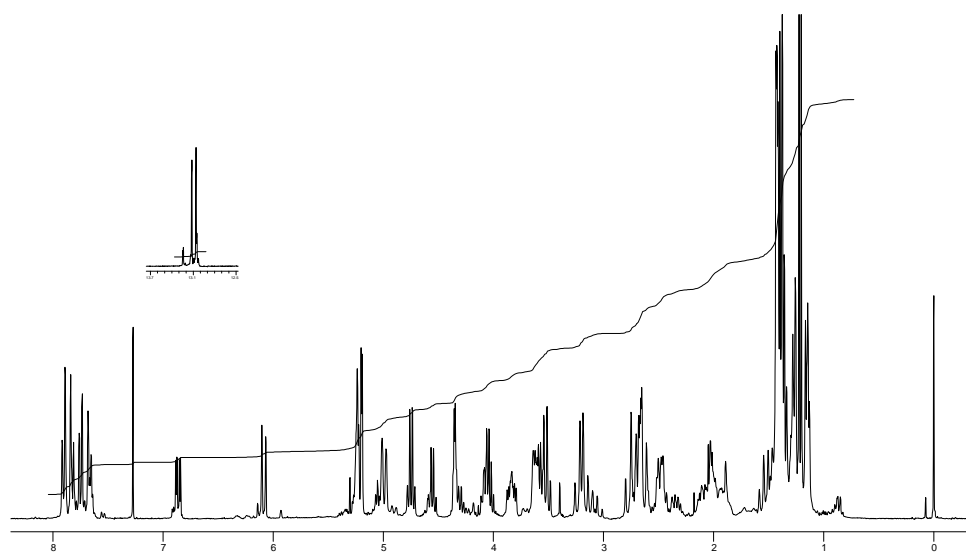


Abbildung 131: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Vineomycin C (**36**) in CDCl_3 .

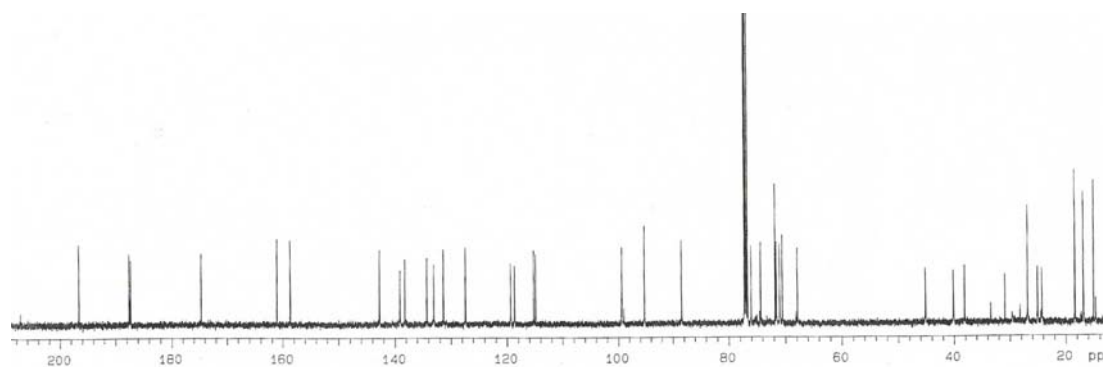


Abbildung 132: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Vineomycin C (**36**) in CDCl_3 .

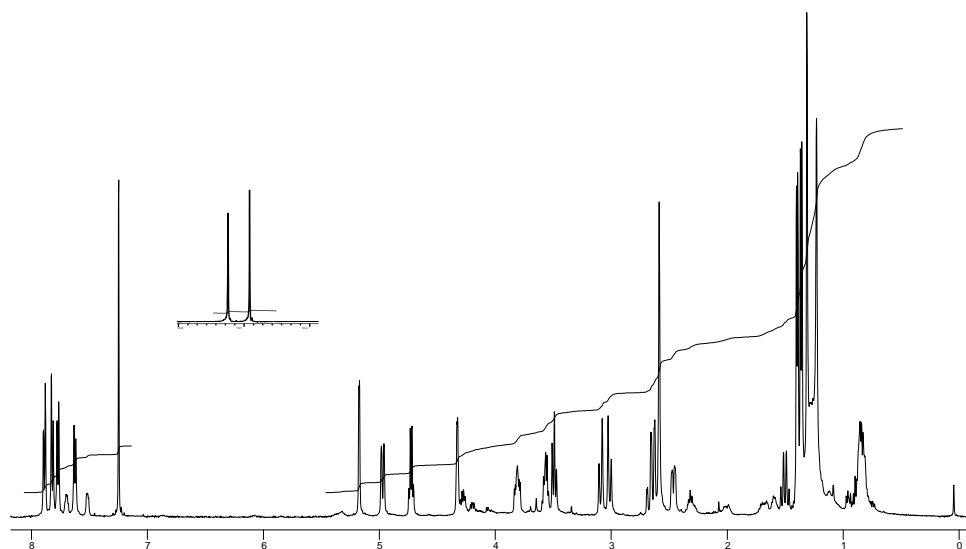


Abbildung 133: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Fridamycin D (**37**) in CDCl_3 .

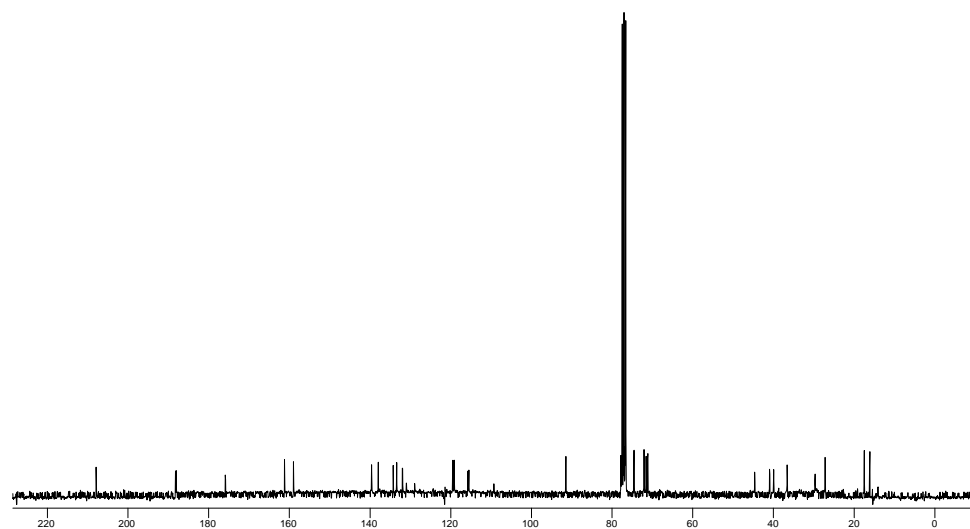


Abbildung 134: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Fridamycin D (**37**) in CDCl_3 .

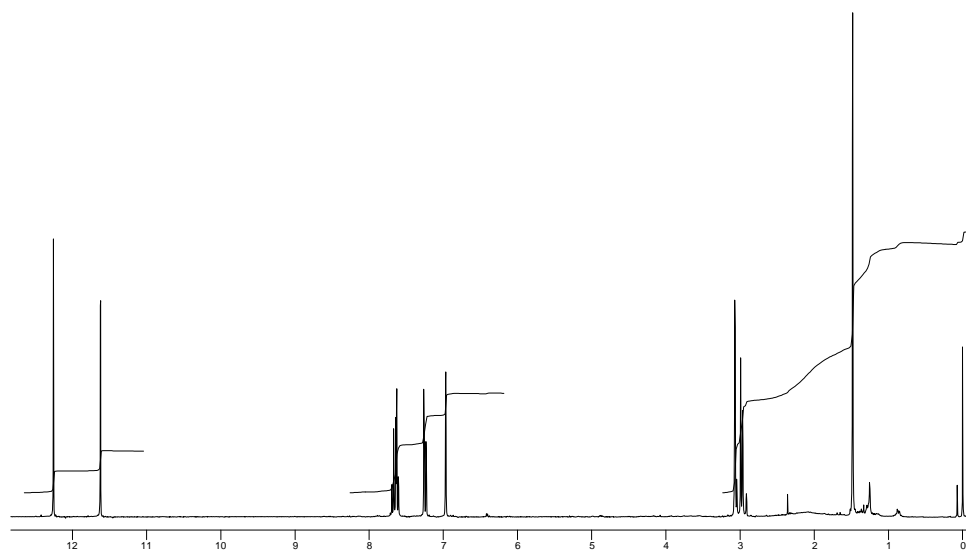


Abbildung 135: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Rabelomycin (**38**) in CDCl_3 .

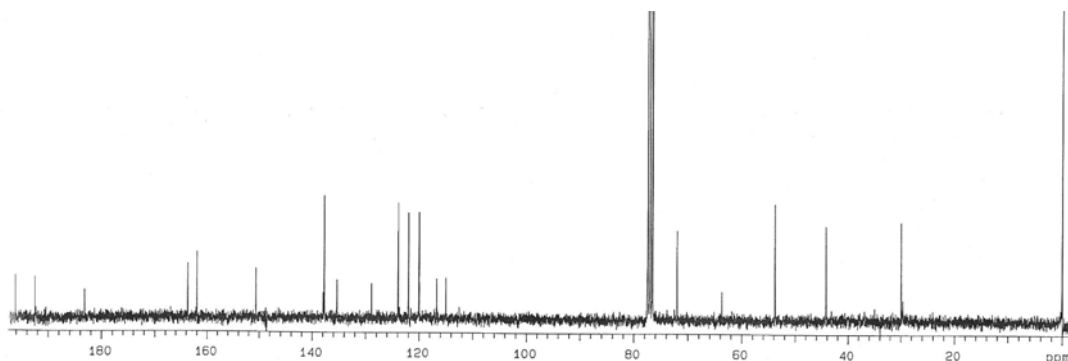


Abbildung 136: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Rabelomycin (**38**) in CDCl_3 .

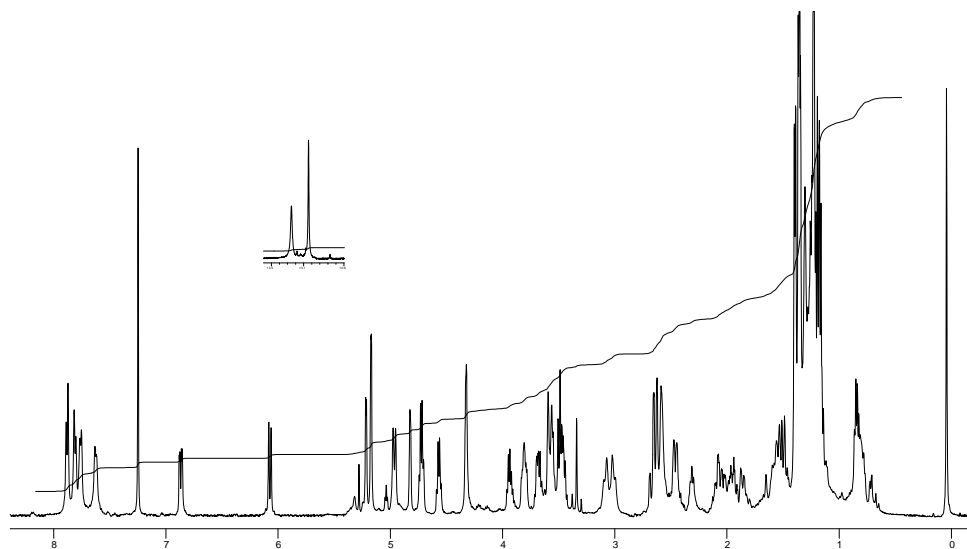


Abbildung 137: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Mutabahamycin (**40**) in CDCl_3 .

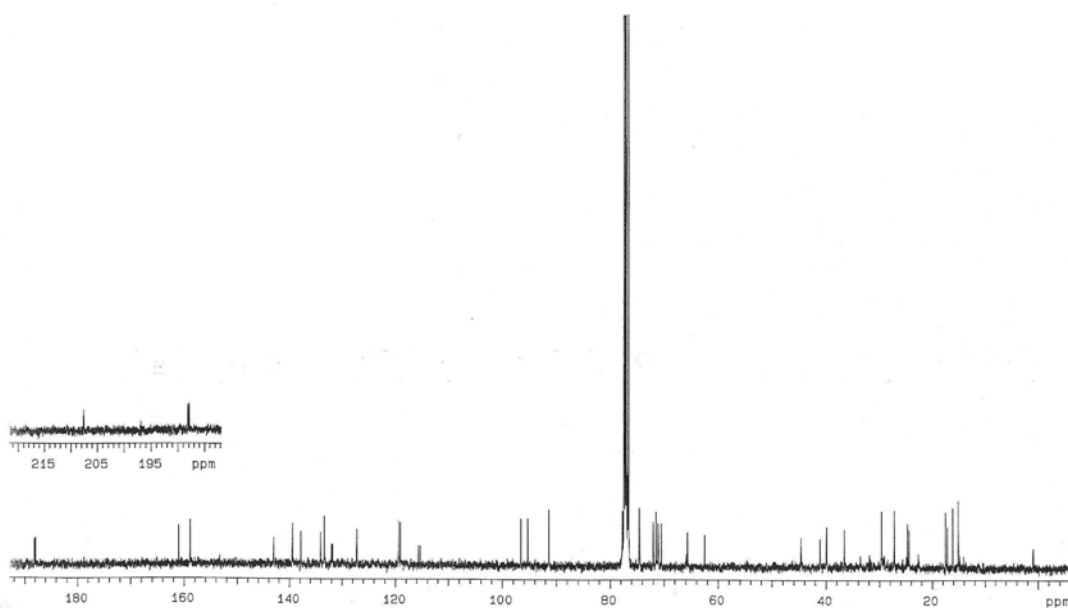


Abbildung 138: ^{13}C -NMR-Spektrum (75 MHz) von Mutabahamycin (**40**) in CDCl_3 .

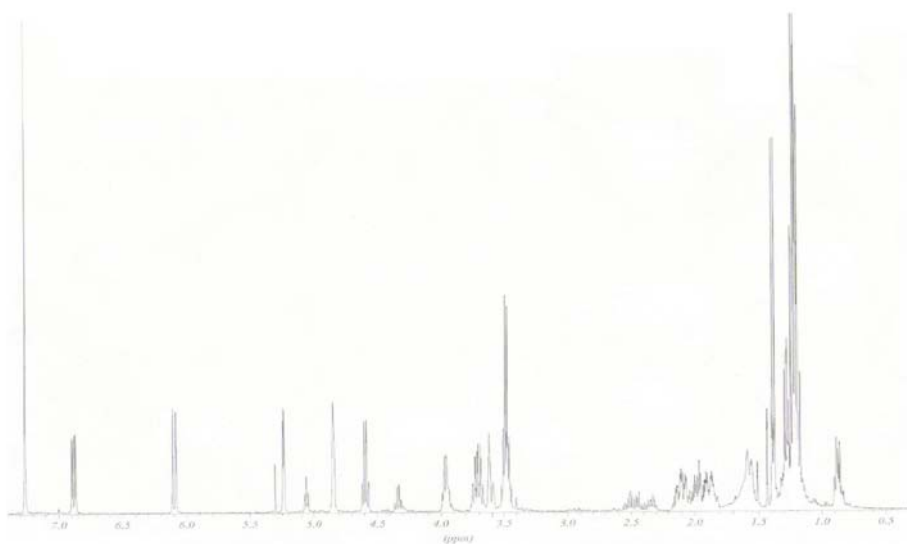


Abbildung 139: ^1H -NMR-Spektrum (400 MHz) von 6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on (**41**) in CDCl_3 .

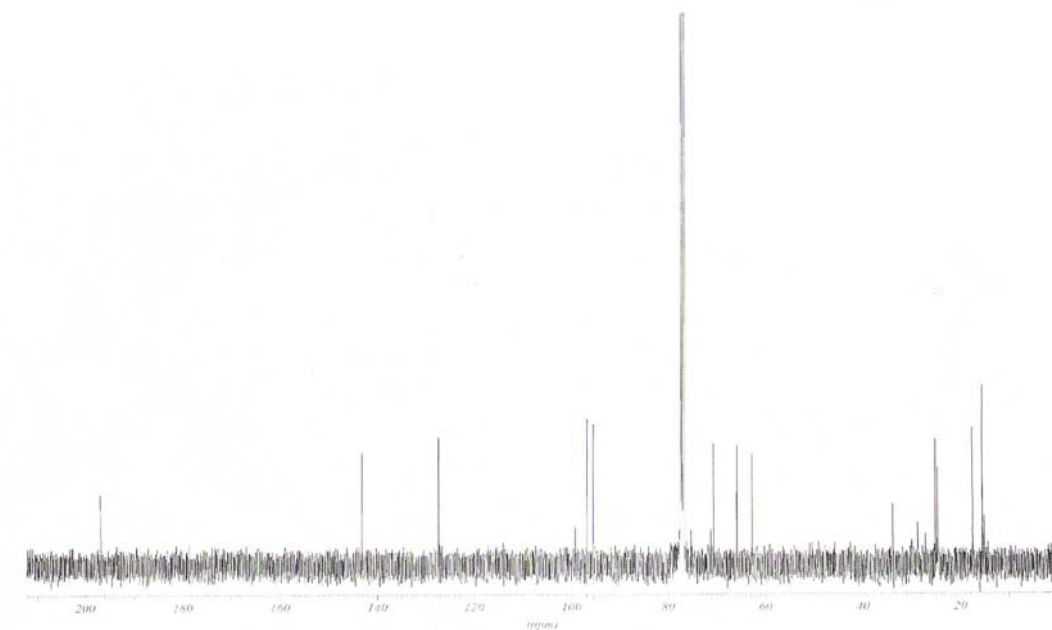


Abbildung 140: ^{13}C -NMR-Spektrum (100 MHz) von 6-(6-Ethoxy-2-methyltetrahydropyran-3-yloxy)-6H-pyran-3-on (**41**) in CDCl_3 .

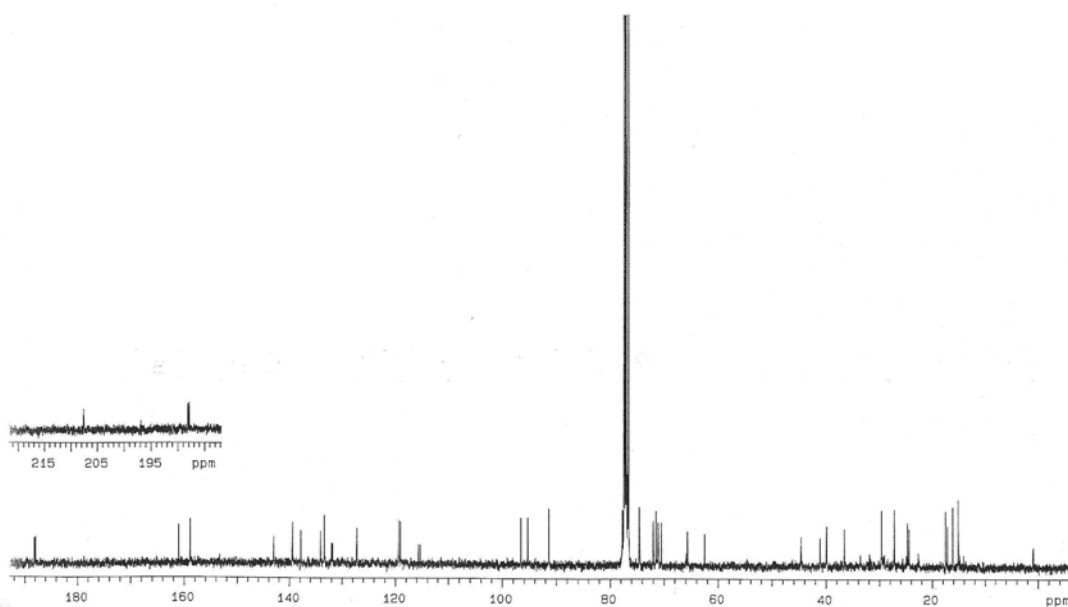


Abbildung 141: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) des Methylierungsproduktes von Mutabahamycin in CDCl_3 .

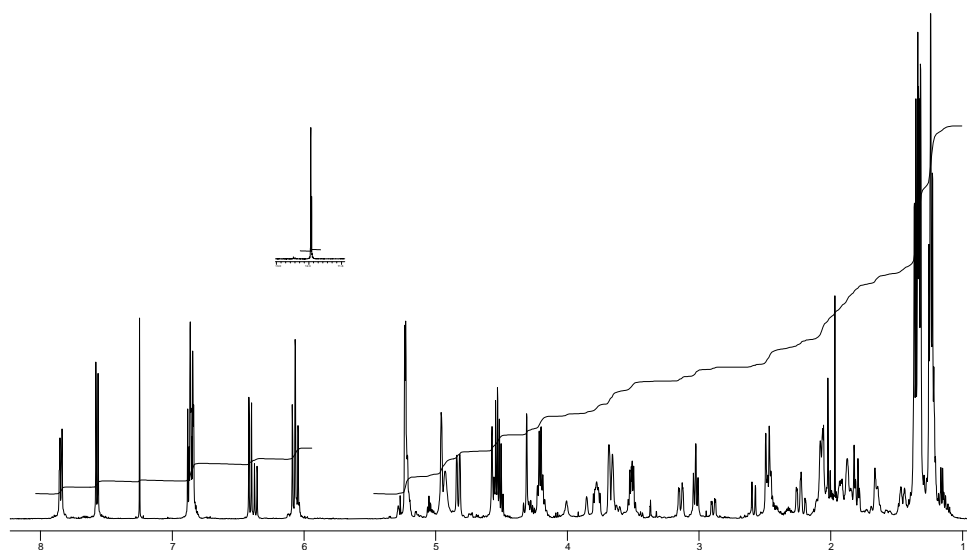


Abbildung 142: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Vineomycin A₁ (42) in CDCl_3 .

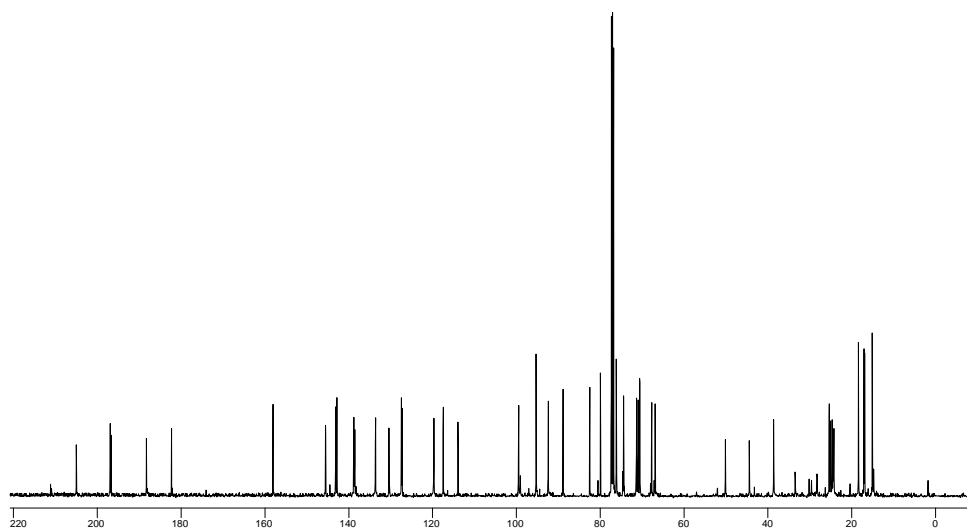


Abbildung 143: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Vineomycin A₁ (42) in CDCl_3 .

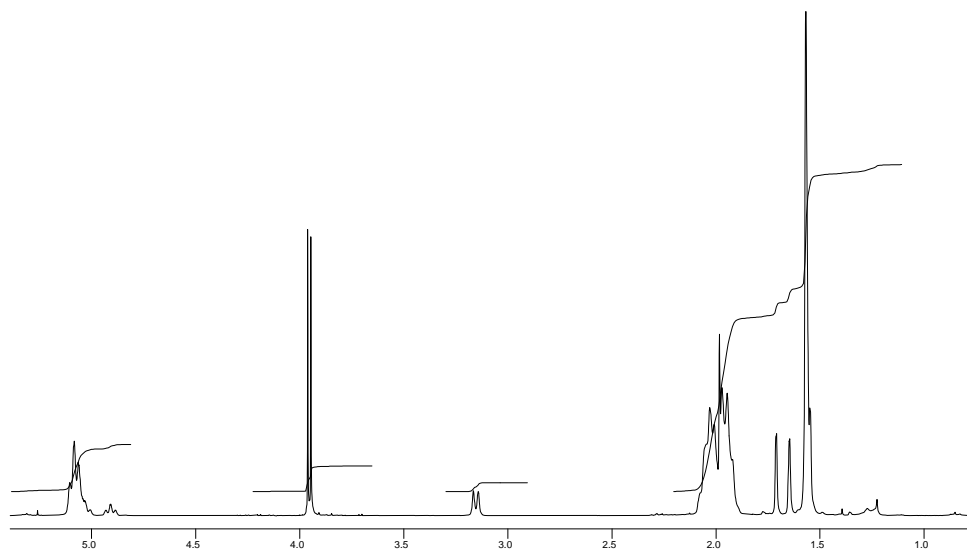


Abbildung 144: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz) von Ubichinon-10 (**43**) in CDCl_3 .

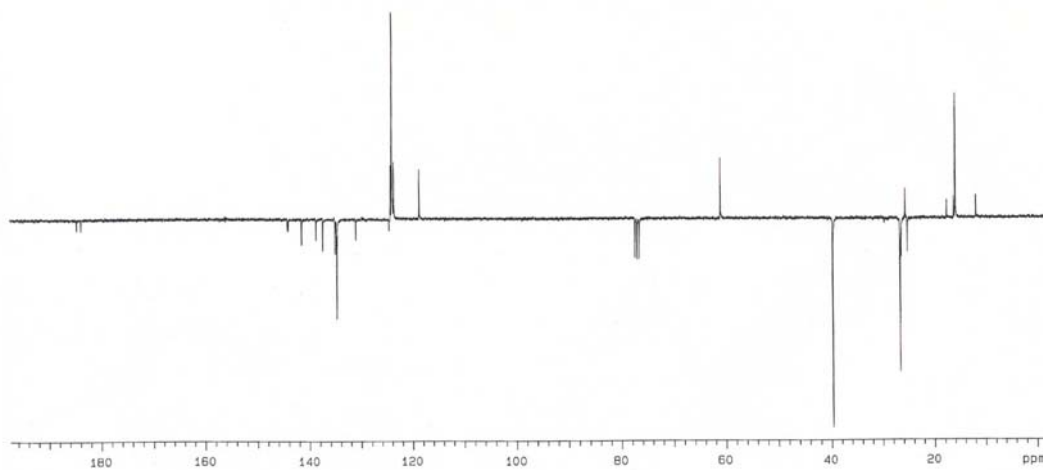


Abbildung 145: ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (75 MHz) von Ubichinon-10 (**43**) in CDCl_3 .

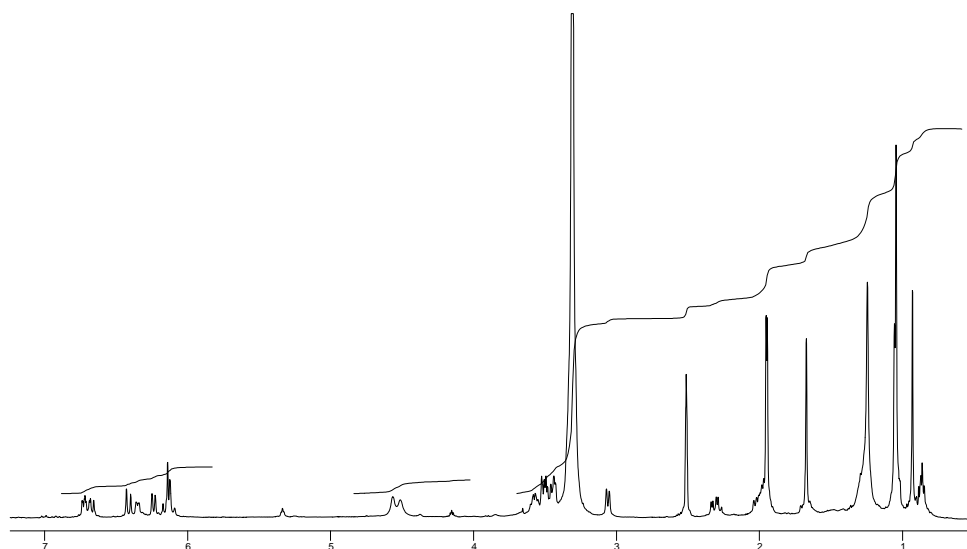


Abbildung 146: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Nostoxanthin (**44**) in DMSO.

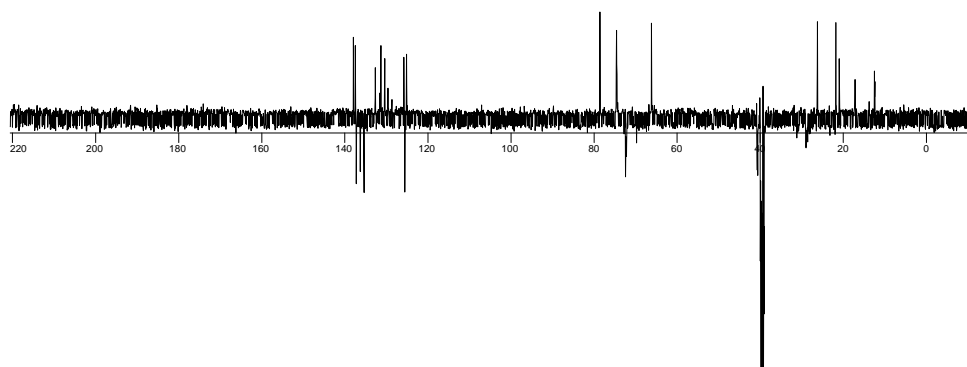


Abbildung 147: ^{13}C /APT-NMR-Spektrum (150 MHz) von Nostoxanthin (**44**) in DMSO.

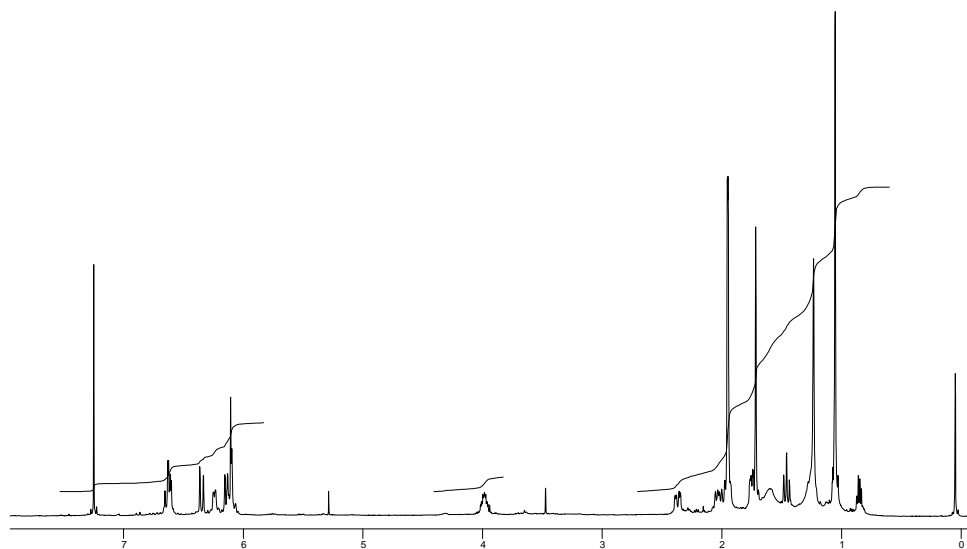


Abbildung 148: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von Zeaxanthin (**46**) in CDCl_3 .

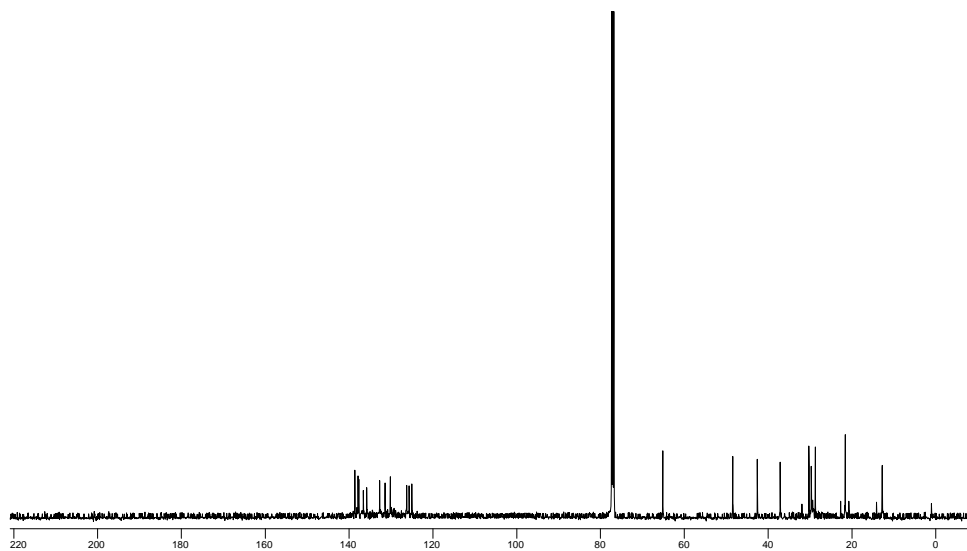


Abbildung 149: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von Zeaxanthin (**46**) in CDCl_3 .

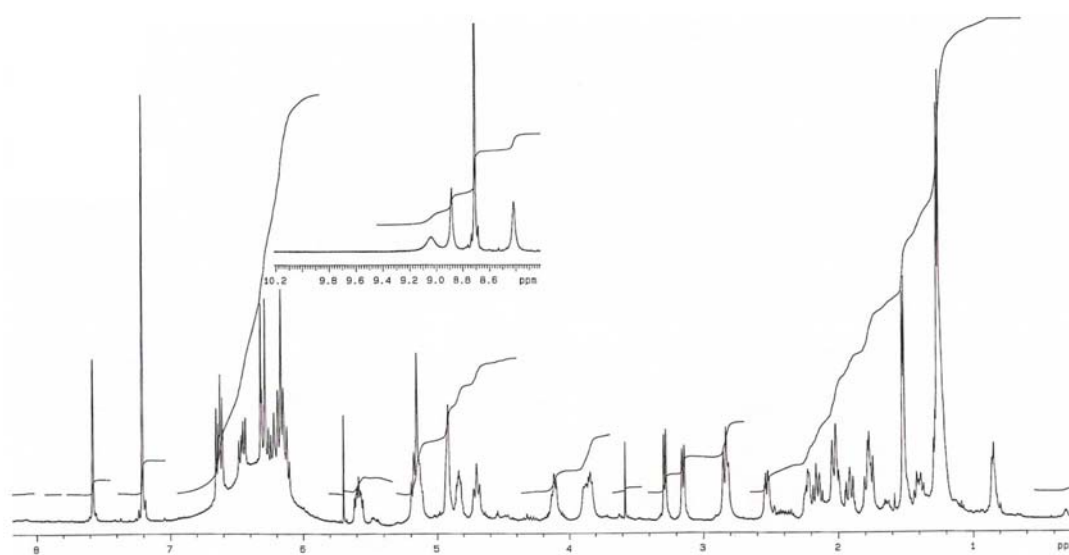


Abbildung 150: ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz) von AB-400 (47) in Pyridin.

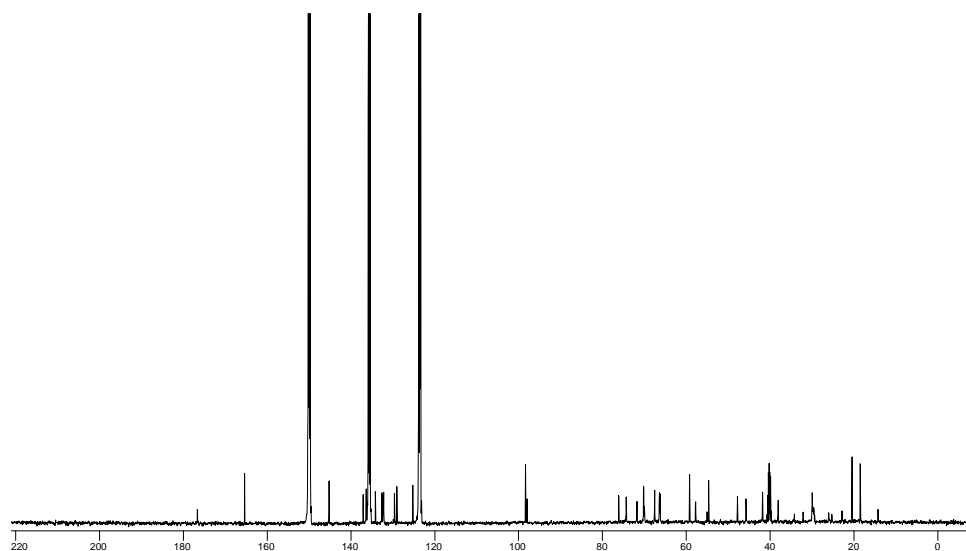


Abbildung 151: ^{13}C -NMR-Spektrum (125 MHz) von AB-400 (47) in Pyridin.

Danksagung

Der NMR-Abteilung unseres Instituts, insbesondere Frau C. Zolke und Herrn Dipl.-Chem. R. Machinek danke ich für die sorgfältige Aufnahme zahlreicher NMR-Spektren. Für die ebenso sorgfältige Aufnahme der Massenspektren danke ich Frau G. Udvarnoki, Herrn Dr. G. Remberg und Herrn Dr. H. Frauendorf.

Für die Bereitstellung der Bakterienstämme danke ich Frau Dr. I. Grün-Wollny (terrestrische Streptomycceten), Frau Dr. E. Helmke (marine Streptomycceten), Frau Dr. I. Wagner-Döbler (Bakterienstämme aus der Nordsee) und Frau M. Lackner (Testkeime).

Bei Herrn Prof. Dr. med. W. Beil und der Firma Oncotest bedanke ich mich für die pharmakologischen Tests.

Allen Kollegen des Arbeitskreises Laatsch möchte ich für das einzigartige Arbeitsklima danken. Besonders bedanke ich mich bei Frau K. Vogel für die gewissenhafte Unterstützung bei mikrobiologischen Arbeiten sowie Herrn S. Höfner für die kompetente Unterstützung bei sämtlichen technischen Arbeiten.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Frau Dipl.-Geol. F. Lissy für ihre umfassende Hilfe im mikrobiologischen Bereich (v.a. mit zahllosen Hemmtestplatten) sowie für unsere zahlreichen, anregenden Diskussionen und für ihre liebevolle, moralische Unterstützung in schwierigen Phasen.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. P. Monecke und Herrn Dr. M. Schiebel für eine fröhliche Arbeitsatmosphäre sowie für ihre ausführlichen Erklärungen zur Synthesechemie.

Herrn H.-J. Nolte danke ich sehr herzlich für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Meinem Sohn Yacin, der an der Vollendung dieser Dissertation unmittelbar beteiligt war, danke ich für die Kraft, die er mir gab und ich danke ihm für seine wertvollen Lektionen in den Bereichen Organisation und Flexibilität, welche eine besondere Herausforderung darstellten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann Nizar für die liebevolle Unterstützung in sämtlichen Phasen meiner Promotion, für die fachliche Hilfe und fruchtbaren Diskussionen sowie für die jährliche Erdbeeranalyse im Freifeldversuch.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, durch deren Unterstützung mein Studium und meine Promotion nicht möglich gewesen wären, die mich stets moralisch wieder aufbauten, wenn es schwierig wurde und die mir auch vor allem in den Bereichen Organisation und Flexibilität tatkräftig beistanden.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren und Dozenten: F. Bracher, H.- O. Burmeister, R. Daniels, U. Eilert, K. Görlitzer, J. Grünefeld, W. Heuer, A. Kaiser, W. Kliegel, G. M. König, H. Laatsch, M. Lorke, D. Moderhack, C. Müller-Goyman, U. Panten, V. Ruthe, M. Schwanstecher, T. Vieregge, L. Witte.

Lebenslauf

Am 7. Dezember 1973 wurde ich, Katja El-Hachach, geb. Vossler, als Tochter von Waldemar Vossler und seiner Ehefrau Marie-Luise Vossler, geb. Haeder, in Göttingen geboren.

Von August 1980 bis Juli 1984 besuchte ich die Grundschule „Doppeltes Lottchen“ und anschließend von August 1984 bis Juni 1986 die Orientierungsstufe „Leinebergschule“ in Göttingen. Ab August 1986 besuchte ich das Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen und erlangte im Mai 1993 die allgemeine Hochschulreife.

Zum Sommersemester 1993 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Carolus-Wilhelmina-Universität in Braunschweig auf. Im Mai 1998 bestand ich die Staatsexamensprüfung zur approbierten Apothekerin.

Am 10. Mai 2003 heiratete ich den Diplom-Chemiker Dr. Nizar El-Hachach. Am 11. April 2004 wurde unser gemeinsamer Sohn Yacin El-Hachach geboren.

Von Oktober 1999 bis 2006 fertigte ich die vorliegende Dissertation, neben der Ausübung meines Berufes als Apothekerin in der Malteserapotheke zu Göttingen, im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. H. Laatsch im Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität in Göttingen unter Zusammenarbeit mit der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität zu Bonn unter der Leitung von Frau Prof. Dr. G. M. König und Herrn Prof. H. Laatsch an.

Ich besitze die deutsche Staatsbürgerschaft.

