

Moritz Arnold

CD-aktive Metabolite aus Streptomyceten

sowie

**Untersuchung der Biosyntheseleistungen des
Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Gö C4/4**



Cuvillier Verlag Göttingen

CD-aktive Metabolite aus Streptomyceten
sowie
Untersuchung der Biosyntheseleistungen des
Mensacarcin-Bildners *Streptomyces* sp. Gö C4/4

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Moritz Arnold
aus
Wolfenbüttel

Göttingen 2002

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2002
Zugl.: Göttingen, Univ., Diss., 2002
ISBN 3-89873-606-7

D7

Referent: Prof. Dr. A. Zeeck
Korreferent: Prof. Dr. U. Diederichsen
Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2002

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2002
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2002
Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89873-606-7

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Zeeck in der Zeit von November 1998 bis September 2002 am Institut für Organische Chemie der Georg-August-Universität zu Göttingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Axel Zeeck danke ich für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit, für viele wertvolle Anregungen und für sein Vertrauen.

Meinen Eltern

Die logische Einfachheit ist der
einzige Weg, auf dem wir zu tiefen
Erkenntnissen geführt werden.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

A. Theoretischer Teil

I.	Einleitung	1
1.	Suche nach neuen Wirkstoffen	1
2.	Screeningmethoden	6
3.	Der Naturstoff Mensacarcin aus dem Stamm <i>Streptomyces</i> sp. Gö C4/4	6
4.	Aufgabenstellung	7
II.	Durchführung eines modifizierten CD-Screenings	9
1.	Zur CD-Spektroskopie	9
2.	CD-Screening	9
2.1.	Kultivierung der Stämme und Generierung der Extrakte	9
2.1.1.	Herkunft der K-Stämme	9
2.1.2.	Kultivierung der K-Stämme	9
2.1.3.	Generierung der Extrakte	10
2.2.	Probenvorbereitung und Vermessung	10
2.3.	Messergebnisse und Stammauswahl	10
3.	Isolierung und Charakterisierung der Substanzen aus dem CD-Screening	11
3.1.	Streptazolin aus dem Stamm K21/5	12
3.2.	Elasnin aus dem Stamm K23/4	15
4.	Die HPLC-CD-UV-Kopplung	18
5.	Bewertung des CD-Screenings	20
III.	Weiterführende Untersuchungen am Stamm <i>Streptomyces</i> sp. Gö C4/4	22
1.	Anwendung des OSMAC-Ansatzes	22

1.1.	Nährmedienvariation	22
1.2.	Kultivierungsgefäß und Sauerstoffpartialdruck	24
1.3.	Zusatz von Lösungsmitteln	25
1.4.	Zusatz von Enzyminhibitoren	26
2.	Isolierung und Charakterisierung der Sekundärmetabolite aus dem OSMAC-Ansatz	29
2.1.	Rishirilid A	29
2.2.	Aloesol	32
2.3.	Mensalon	34
3.	Untersuchungen zur Biosynthese von Mensacarcin	36
3.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Diplomarbeit	36
3.2.	Fütterungsexperimente	37
3.2.1.	Fütterungsexperimente mit L-[Methyl- ¹³ C]Methionin	37
3.2.2.	Fütterung von [¹⁸ O ₂]Gas	38
3.2.3.	Diskussion der Biogeneseuntersuchungen	40
3.3.	Versuche zur Isolierung von Vorläufermolekülen	41
3.3.1.	Isolierung von Mensacarcin und weiteren Metaboliten	41
3.3.2.	Untersuchung der Biosynthese mit der HPLC-UV-CD-Kopplung	42
3.3.3.	Abbruch einer Kultivierung zu Beginn der Biosynthese	43
3.3.4.	Zufütterung von Enzyminhibitoren	43
3.4.	Diskussion der Ergebnisse	44
3.5.	Überlegungen zur Biosynthese von Aloesol und Mensalon	48
IV.	Chemische Derivatisierung von Mensacarcin	50
1.	Mensacarcindiacetat	50
2.	Mensacarcinsäure	50
V.	Zur biologischen Aktivität der Naturstoffe und Naturstoffderivate	52
1.	Antibiotische Aktivität von Mensacarcin	52
2.	Antitumoraktivität der Naturstoffe und Naturstoffderivate	52

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse	55
VII. Ausblick	57
B. Experimenteller Teil	59
I. Allgemeines	60
1. Instrumentelle Analytik	60
2. Chromatographische Methoden	60
3. Mikrobiologische Methoden	60
4. Biologische Tests	62
5. Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Extraktgewinnung	62
5.1. Ethylacetatextraktion	62
5.2. Festphasenextraktion	62
6. Durchführung des chemischen Screenings	63
II. CD-Screening	63
1. Stammhaltung und Kultivierung der K-Stämme	63
2. Probenvorbereitung und Durchführung des CD-Screenings	64
3. Kultivierung der ausgewählten Stämme und Isolierung der CD-aktiven Komponente	64
3.1. Streptazolin aus dem Stamm <i>Streptomyces</i> sp. K21/5	65
3.2. Elasinin aus dem Stamm <i>Streptomyces</i> sp. K23/4	66
III. Der Stamm <i>Streptomyces</i> sp. Gö C4/4	67
1. Stammhaltung und Kultivierung	67
2. Variation der Kultivierungsbedingungen	67
2.1. Nährmedienvariation	67
2.2. Kultivierung unter Variation des Kultivierungsgefäßes und des Sauerstoffpartialdrucks	68

2.3. Kultivierung unter Zusatz von Lösungsmitteln	69
2.4. Kultivierung unter Zusatz von Enzyminhibitoren	70
3. Isolierung und Charakterisierung der Naturstoffe und Biotransformationsprodukte	70
3.1. Mensacarcin	70
3.2. Desmethylenacarcin	71
3.3. Didesmethylenacarcin	72
3.4. Didesmethyldihydromensacarcin	74
3.5. Rishirilid A	75
3.6. Aloesol	77
3.7. Mensalon	78
3.8. Metyrapol	79
IV. Untersuchungen zur Biosynthese von Mensacarcin	80
1. Kultivierung unter Zusatz von L-[Methyl- ¹³ C]Methionin	80
2. Kultivierung in einer [¹⁸ O ₂]Atmosphäre	81
2.1. Anfertigung einer Wachstumskurve	81
2.2. Durchführung der Kultivierung	82
3. Analytik mit der HPLC-UV-CD-Kopplung	82
V. Derivatisierung von Mensacarcin	82
1. Mensacarcindiacetat	82
2. Mensacarcinsäure	84
C. Literaturverzeichnis	86

A. Theoretischer Teil

I. Einleitung

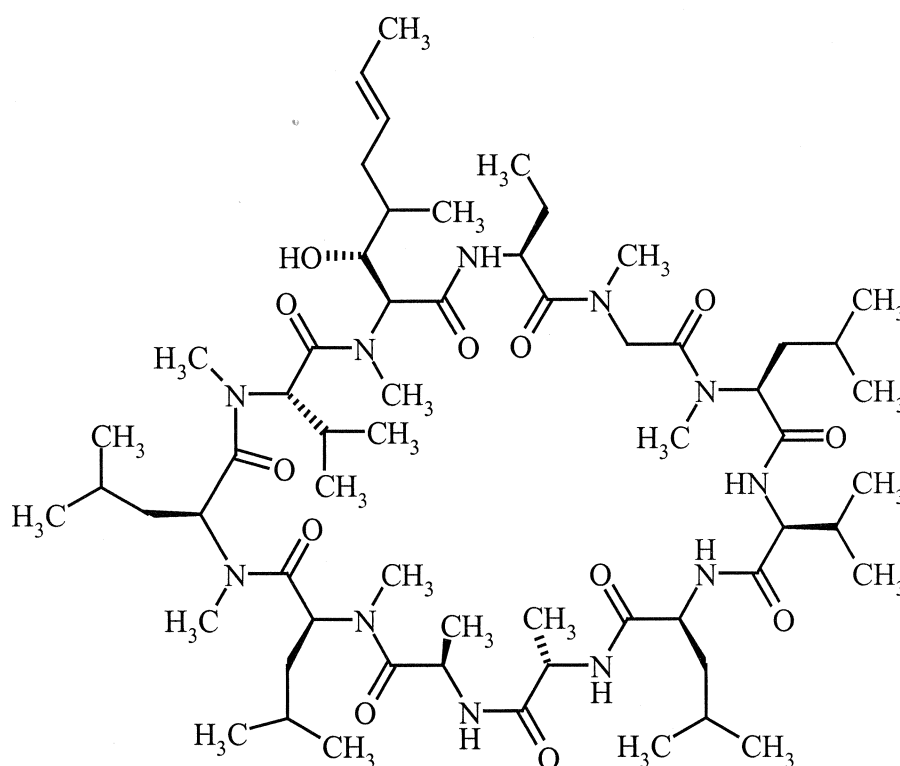
1. Suche nach neuen Wirkstoffen

Bei der Therapie von Krankheiten und dem Schutz von Mensch, Tier und Nutzpflanzen vor Krankheitserregern, Parasiten und anderen Schädlingen spielen niedermolekulare Wirkstoffe eine große Rolle. Trotz zahlreicher Erfolge ist der Bedarf an neuen Wirkstoffen hoch, da von ca. 30.000 bekannten Krankheiten heute nur weniger als 10% kausal therapierbar sind¹, die Resistenz von Krankheitserregern gegen bekannte Wirkstoffe stetig zunimmt und neue Krankheitserreger, wie z.B. das HI-Virus auftreten. Die zur Zeit bekannten und genutzten Wirkstoffe sind noch nicht optimal. Grundlage für die Wirkung dieser Moleküle ist die Wechselwirkung mit Biomolekülen wie DNA, RNA und Proteinen in einem Organismus. Die Art, Funktion und Menge der Proteine, die unter bestimmten Bedingungen in einer Zelle exprimiert werden (Proteom), ihr Zusammenspiel und ihre Wechselwirkung mit supramolekularen Strukturen wie Membranen oder dem Cytoskelett sind die Grundfunktionen des Lebens. Ein Ziel der Forschung ist es, die Funktion aller Proteine durch kleine Moleküle (niedermolekulare Wirkstoffe) zu beeinflussen, welche ein spezifisches Protein entweder selektiv inhibieren oder aktivieren². Quellen für diese kleinen Moleküle sind die kombinatorische Chemie³, das rationale Wirkstoff-Design⁴ und die Naturstoffchemie⁵.

Für die Behandlung von Krankheiten nutzten viele Kulturen schon früh Arzneipflanzen. Die ersten schriftlichen Zeugnisse darüber stammen von 2600 v. Chr. aus Mesopotamien. Um 1100 v. Chr. entstanden die „Vorschriften gegen 52 Krankheiten“ (Wu Shi Er Bing Fang) mit Beschreibungen von 52 Krankheiten und 283 Rezepturen aus der traditionellen chinesischen Volksmedizin⁶. 1806 wurde mit dem Morphin aus dem Schlafmohn erstmals ein einzelner Wirkstoff aus einer Pflanze isoliert. Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen werden hingegen erst seit kurzer Zeit untersucht. 1877 wurde der Begriff Antibiose für die gegenseitige Beeinflussung von Mikroorganismen eingeführt⁷. 1929 veröffentlichte der Bakteriologe Alexander Fleming seine Beobachtung, dass sich um einen Pilz der Gattung *Penicillium* sp., der als Konterminante auf einer Kultur von *Staphylokokken* wuchs, ein Hemmhof gebildet hatte. Der zweite Weltkrieg beschleunigte

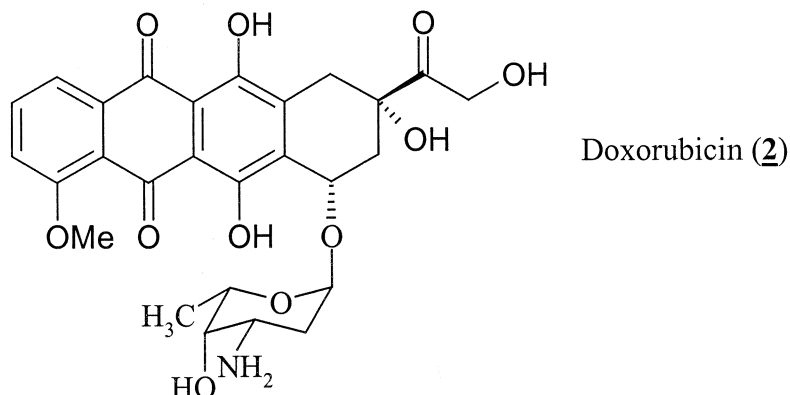
die Arbeiten von Raistrick, Florey und Chain in Oxford zur Isolierung des wirksamen Prinzips aus *Penicillium notatum*. Der große Erfolg des Penicillins führte zu einem stetig wachsenden Interesse an Naturstoffen aus Mikroorganismen. Im Jahr 2002 befinden sich in der Naturstoffdatenbank Antibase⁸ 28.428 Einträge von Naturstoffen aus Mikroorganismen und in der Naturstoffdatenbank Chapman & Hall⁹ 173.000 Einträge von Naturstoffen aus Mikroorganismen und Pflanzen.

Das medizinische Potential von Naturstoffen ist groß¹⁰. Etwa 40% der in den letzten Jahren zugelassenen Arzneimittel sind Naturstoffe, Naturstoffderivate oder Naturstoffanaloga, entsprechend entfällt auch etwa die Hälfte des weltweiten Arzneimittelmarktes von ca. 300 Mrd. DM (ca. 150 Mrd. Euro) pro Jahr auf diese Stoffklasse¹⁰. Z.B. wird das Immunsuppressivum Cyclosporin A¹¹ (**1**) (Sandimmun[®]), das seit 1983 die Entwicklung der Organtransplantationen überhaupt erst ermöglichte, von dem Pilz *Trichoderma inflatum* produziert und biotechnologisch gewonnen.



Cyclosporin A (**1**)

Das cytostatisch wirksame Doxorubicin¹² (2) wird als Chemotherapeutikum bei Tumorerkrankungen breit eingesetzt und von dem Bakterium *Streptomyces peucetius* produziert.



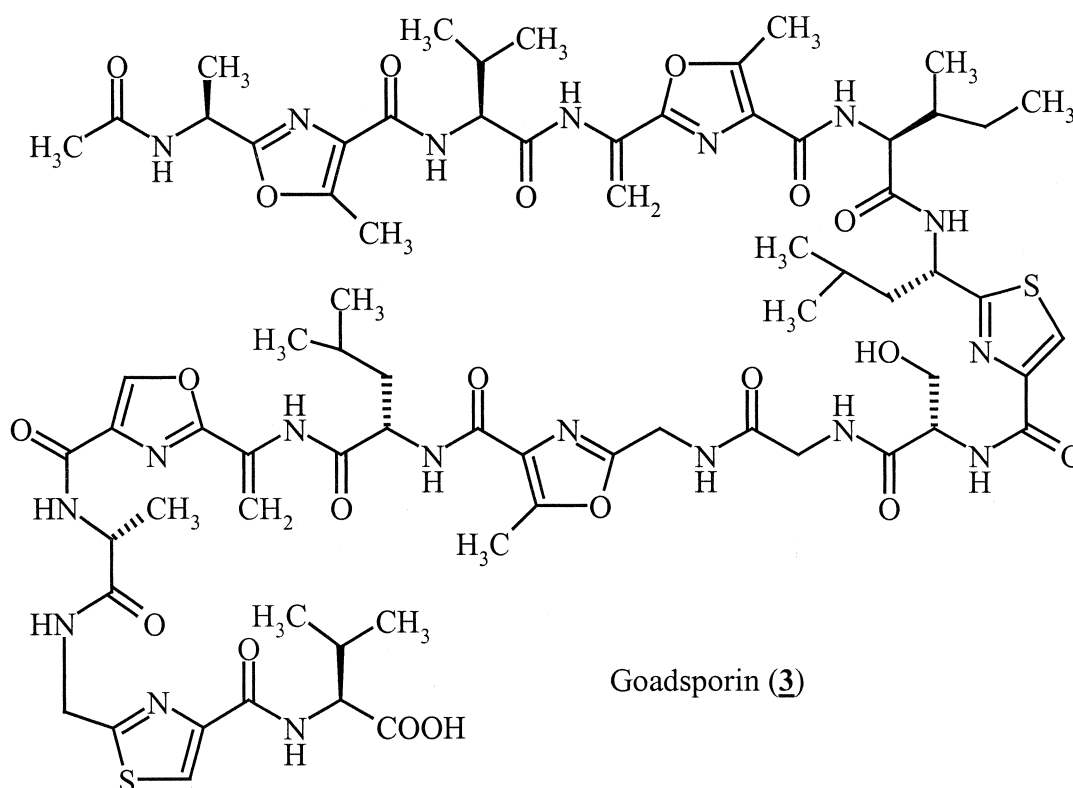
Die Sekundärstoffe aus Mikroorganismen wirken nicht nur antibiotisch, sondern zeigen auch cytostatische, immunsuppressive, antiinfektive, analgetische, entzündungshemmende, antihypercholesterolemische und antidiabetische Wirkungen. Diese sind auf die Wechselwirkung der Naturstoffe mit Proteinen zurückzuführen. Mikrobielle und humane Proteine zeigen große Übereinstimmungen. In Anbetracht der engen Verwandtschaft der Genome aller Organismen kann man auch von einer engen Verwandtschaft der Biomoleküle ausgehen². Naturstoffe wurden in der Evolution darauf selektioniert, an Proteine zu binden, die den menschlichen Proteinen ähnlich sind, da sie von verschiedenen Proteinen synthetisiert oder modifiziert werden und an diese Proteine binden müssen. Zudem schließt ihre eigentliche biologische Funktion oft das Binden an weitere Proteine ein.

Bei der Suche nach neuen mikrobiellen Wirkstoffen bedient man sich Screeningmethoden, mit denen man die Extrakte von Mikroorganismen untersucht. Um neue Naturstoffe finden zu können, untersucht man zunehmend neue Organismen wie z.B. schwer kultivierbare Organismen¹³ oder solche aus ungewöhnlichen Habitaten wie z.B. Meeresorganismen¹⁴. Ein anderer Ansatz besteht darin, die direkt aus Proben isolierte DNA abschnittsweise in Cosmide einzufügen und in *E. coli* oder *Streptomyces* zu klonieren. So veränderte Produzenten werden dann kultiviert und die Kulturen auf die gewünschte biologische Aktivität hin geprüft¹³. Zum anderen gibt es Ansätze, das Produktspektrum eines bekannten Stammes oder die Struktur einzelner Metabolite zu verändern und so neue

Naturstoffe oder Naturstoffderivate zu erzeugen¹⁵. Dabei kann man zwischen genetischen Methoden wie Mutagenese¹⁶ oder kombinatorischer Biosynthese¹⁷ und nicht genetischen Methoden wie dem OSMAC-Ansatz¹⁸ (One Strain/MANy Compounds), der Vorläufer-dirigierten Biosynthese¹⁹, der Biotransformation²⁰, der Biokatalyse²¹ sowie der chemischen Derivatisierung unterscheiden. Der OSMAC-Ansatz basiert auf der intensiven Bearbeitung eines einzelnen Produzenten. Nicht erst seitdem ganze Genome von Mikroorganismen sequenziert wurden, ist bekannt, dass die meisten Actinomyceten und Pilze das Potential haben, mehr als einen Sekundärstoff zu produzieren. Ein Beispiel ist der Stamm *S. coelicolor* A(3)/2. Obwohl dieser Stamm zu den best untersuchten Produzenten zählt, wurden bei der Sequenzierung des Genoms²² Gencluster von Typ-I und Typ-II Polyketiden und nicht-ribosomalen Peptiden gefunden, deren Produkte bisher unbekannt sind. Es ist bei den für die Sekundärstoffbildung besonders begabten Actinomyceten und Pilzen leicht, auch bei gut untersuchten Stämmen neue Naturstoffe zu entdecken, deren Biosynthese letztlich durch eine Variation der Kultivierungsparameter induziert oder verändert wird. Dabei gibt es einen fließenden Übergang zwischen der Ausbeutesteigerung einzelner im Prinzip vorhandener und dem erstmaligen Auftreten vorher nicht nachweisbarer Metabolite. Wirkungsvoll variieren lassen sich beim OSMAC-Ansatz neben Nährmedium und Kultivierungsgefäß unter anderem Temperatur, Belüftung, pH-Wert oder Belichtung. Im Nährmedium spielen die Auswahl der C- und der N-Quelle sowie die Zugabe von anorganischen Salzen, Enzyminhibitoren und Signalstoffen²³ oder Adsorbentmaterialien eine große Rolle. Ziel des OSMAC-Ansatzes ist die Erzeugung von Variabilität bei der Stoffbildung und von chemischer Diversität in der Gerüstbildung.

Es ist bekannt, dass bei Actinomyceten die Sekundärstoffproduktion und die Sporulation eine Antwort auf die Umweltbedingungen darstellen. Der Prozess der Differenzierung von Luft- und Substratmycel erweckt sowohl bei Mikrobiologen als auch bei Naturstoffchemikern großes Interesse, da bei vielen Actinomyceten gezeigt wurde, dass es einen engen Zusammenhang zwischen dieser Differenzierung und dem Einsetzen der Sekundärstoffproduktion gibt. Dies deutet auf eine enge Verknüpfung dieser beiden physiologischen Phänomene durch ein komplexes Regulationssystem hin. In der Vergangenheit ist es gelungen einige Signalstoffe zu isolieren, die die Luftmycelbildung und/oder die Sekundärstoffproduktion induzieren. Der A-Faktor²⁴, ein Butyrolacton, induziert die Streptomycin Produktion, Streptomycin Resistenz, die Produktion eines gelben Pigments und die Luftmycelbildung in *S. griseus*. Virginia Butanolid induziert die

Produktion von Virginiamycin in *S. virginiae* und von Showdomycin und Minimycin in *S. lavendula*. Weitere Substanzen wie Hormaomycin²⁵ oder Goadsporin²⁶ (3) sind in der Lage, in bestimmten Konzentrationen die Sporulation und Pigmentproduktion in anderen Stämmen zu induzieren. Mit diesen Substanzen kann das Regulationssystem der Sekundärstoffbildung untersucht werden.



Bei der kombinatorischen Biosynthese werden verschiedene Strategien zur Nutzung rekombinanter DNA-Techniken für die Herstellung neuer Sekundärstoffe genutzt. Im Gencluster der Biosynthesegene eines Produzenten werden einzelne Abschnitte entfernt, in der Reihenfolge versetzt oder einzelne Genabschnitte eines Produzenten in das Genom eines anderen Produzenten eingebaut. Diese Abschnitte tauchen dann zusätzlich auf oder ersetzen dort ähnliche Genabschnitte. Hierdurch werden Enzymqualitäten verschiedener Herkunft während der Biosynthese vermischt, was im Erfolgsfall größere Veränderungen in der Struktur der Sekundärmetabolite bewirkt. Die Hybrid-Bildung kann die Größe des Polyketid-Grundgerüsts, die Stereochemie oder die Funktionalität betreffen, aber auch Enzymsysteme der späten Biosynthese wie z.B. Oxygenasen oder Glykosyltransferasen. Ziel dieser Arbeiten ist es, durch die Kombination von Enzymen aus verschiedenen

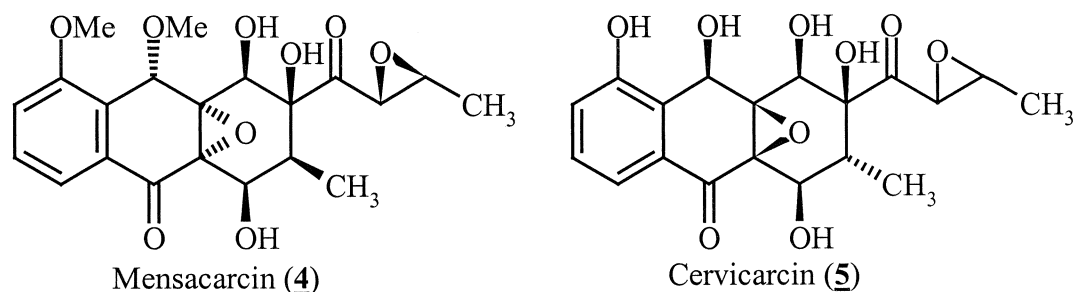
Produzenten eine Möglichst große Vielfalt an Grundgerüsten aufzubauen und diese durch den Einsatz von verschiedenen Enzymen der späten Biosynthese beliebig zu variieren.

2. Screeningmethoden

Unter Screening versteht man das Durchsuchen von Substanzgemischen (z.B. Rohextrakten aus biologischen Quellen) und Substanzbibliotheken mit Hilfe unterschiedlicher Detektionssysteme. Je nach Detektionssystem kann man die Methoden in biologisches-, physikalisch-chemisches- oder chemisches Screening einteilen²⁷. Bei dem biologischen Screening handelt es sich um einen wirkungsorientierten Ansatz, bei dem die Suche nach neuen Leit- und Wirkstoffen mit definierten biologisch-pharmakologischen Wirkungen im Vordergrund steht. Bedingt durch die Fortschritte in der Aufklärung der pathobiochemischen Prozesse können mit Hilfe angewandter Molekularbiologie, Zellbiologie und Biochemie Mechanismus-orientierte molekulare Zielstrukturen (Targets) für Screeningsysteme konzipiert und entwickelt werden. Die Zielvorstellung bei diesem pharmakologisch orientierten Screening besteht darin die kausale Verknüpfung zwischen dem molekularen Target und dem klinischen Krankheitsbild herzustellen. Bei den physikalisch-chemischen Screeningansätzen werden Stoffgemische mit spektroskopischen Methoden auf bestimmte physikalisch-chemische Eigenschaften untersucht wie z.B. UV-, NMR-Absorption²⁸ oder Massenverteilungen²⁹. Oft findet als erster Schritt eine chromatographische Trennung des Substanzgemisches statt, so dass man die physikalisch-chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten untersuchen kann. In der Regel wird dafür die HPLC-Technologie gekoppelt mit verschiedenen Detektionssystemen eingesetzt. In jüngster Zeit versucht man, mehrere Detektionsmethoden zu koppeln. Beim chemischen Screening werden die Substanzen nach DC-Auftrennung mit Hilfe der UV-Absorption und der spezifischen Anfärbbarkeit mit Sprühreagenzien sichtbar gemacht. Potentielle biologische Anwendungsgebiete werden beim physikalisch-chemischen und beim chemischen Screening erst nach der Isolierung und Strukturaufklärung gesucht. In der industriellen Wirkstoffforschung findet das „high-throughput“-Screening (HTS) Anwendung³⁰. Hier werden mit biologischen Assays 100.000 Test am Tag unter Verwendung von Substanzbibliotheken aus der kombinatorischen Chemie oder aus der Naturstoffchemie durchgeführt. Es kommen sowohl Reinsubstanzen als auch Substanzgemische zum Einsatz.

3. Der Naturstoff Mensacarcin aus dem Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4

Der Streptomyceten-Stamm Gö C4/4 wurde aus einer Erdprobe isoliert, die neben der Göttingen Nordmensa gesammelt worden war. Im CD-Screening fiel der Stamm durch die Produktion eines signifikant CD-aktiven Metaboliten auf. Es handelt sich hierbei um einen neuen Naturstoff, der aufgrund seines Ursprungs sowie seiner cytostatischen und cytotoxischen Wirkung Mensacarcin (**4**) genannt wurde.



Neben der vollständigen spektroskopischen Charakterisierung von Mensacarcin (**4**) gelang auch die Kristallisation aus Ethylacetat/n-Pentan. Die Röntgenstrukturanalyse führte zur relativen, die Anwendung der Helmchen-Methode³¹ (selektive Acylierung an 4-OH) zur absoluten Konfiguration der Stereozentren. Erste Fütterungsversuche mit [1-¹³C]- und [1,2-¹³C₂]Acetat zeigten, dass Mensacarcin (**4**) ein Polyketid ist, das vermutlich mit einer iterativen Typ II-Polyketidsynthese aus einem Decaketid-Vorläufer über aromatische Zwischenstufen aufgebaut wird. 1962 wurde das antitumor wirksame Cervicarcin³² (**5**) aus *Streptomyces ogaensis* beschrieben, das im Gegensatz zu Mensacarcin (**4**) keine O-Methyl-Gruppen enthält und sich in der 1971 mitgeteilten Stereochemie deutlich von diesem unterscheidet³³.

4. Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit besteht aus zwei Teilen, in denen unterschiedliche Richtungen der Naturstoffchemie verfolgt werden. Der erste Teil befasst sich mit der Screening-Problematik, also dem gezielten Auffinden von Naturstoffen aus Extrakten von Mikroorganismen. Im zweiten Teil wird die vertiefte Untersuchung eines einzelnen Produzentenstammes beschrieben.

Im Arbeitskreis von A. Zeeck sind bereits 1997 Voruntersuchungen zum Einsatz von CD-spektroskopischen Methoden im Naturstoff-Screening durchgeführt worden. Auf dieser Basis wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit³⁴ „Neue mikrobielle Sekundärmetabolite aus einem modifizierten CD-Screening sowie Strukturaufklärung und Biogenese des Antitumor-Wirkstoffes Mensacarcin“ eine Screening-Methode entwickelt, mit der mikrobielle Metabolite anhand ihrer CD-Daten isoliert werden können. In der vorliegenden Doktorarbeit sollte diese Methode auf eine größere Anzahl von Extrakten verschiedenster Streptomycesen-Stämme angewendet werden. Die CD-aktiven Komponenten waren zu isolieren und in ihrer Struktur aufzuklären.

Im zweiten Teil sollten weiterführende Untersuchungen am Streptomycesen-Stamm Gö C4/4 durchgeführt werden. Die Idee war, mit Hilfe des OSMAC-Ansatzes stille Biosynthesegene zu aktivieren und das Biosynthesepotential von Gö C4/4 auszuloten. Neue Metabolite sollten isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Durch weitere Fütterungsexperimente mit isotopen markierten Vorläufern sollten weitere Erkenntnisse zur Biogenese und Biosynthese des Mensacarcins gewonnen werden.

Mit den verbliebenen Naturstoffen sollten weitere Untersuchungen zur chemischen Reaktivität (Derivatisierung) und zur biologischen Aktivität (Plattendiffusionstests, Einschleusung in Testsysteme) durchgeführt werden.

II. Durchführung eines modifizierten CD-Screenings

1. Zur CD-Spektroskopie

Unter Circular dichroismus (CD) versteht man die unterschiedliche Absorption von links und rechts circular polarisiertem Licht. Die Absorptionsbanden, welche positiv und negativ sein können, werden als Cotton-Effekte bezeichnet. Die CD-Spektroskopie ist eine chiroptische Methode, d.h. sie liefert für zwei Enantiomere jeweils Messwerte entgegengesetzten Vorzeichens. Deswegen wird sie zur Bestimmung von relativen und absoluten Konfigurationen von Molekülen und zur Konformationsanalyse von Biopolymeren genutzt³⁵. Zur Ableitung der Stereochemie benutzt man empirische oder semi-empirische Methoden³⁶ wie Helizitätsregeln oder Sektorregeln, z.B. die Oktandenregel für Ketone. Die CD-Spektren einiger Moleküle können ab initio berechnet werden³⁷. Die Exciton-Chiralitäts-Methode (ECCD) nach Nakanishi³⁸ ist eine nicht empirische Methode, die oft zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Naturstoffen verwendet wird.

2. CD-Screening

2.1. Kultivierung der Stämme und Generierung der Extrakte

2.1.1. Herkunft der K-Stämme

Die K-Stämme (Kilimanjaro-Stämme) sind aus Erdproben isoliert worden, die in Tansania (Mramba Forest Reservat; Kilimanjaro-Nationalpark, Mwanga-Distrikt) in einer Höhe von 820 m über NN gesammelt worden waren. Die Bodenprobe der K21-Stämme stammt aus der Nähe des Baumes *Vepris glomerata* (Rutacea), die der K22- und K23-Stämme aus der Nähe des Baumes *Maerua angolensis* (Capparidaceae).

2.1.2. Kultivierung der K-Stämme

Die Kultivierung der K-Stämme erfolgte in 300 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen. Die Kolben wurden mit 50 ml Nährmedium gefüllt, autoklaviert und mit ca. 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft. Man ließ 72 h bei 28 °C und 180 rpm kultivieren. Jeder Stamm wurde in den Nährmedien SM, M2 und Haferkleie fermentiert.

2.1.3. Generierung der Extrakte

Die Kulturbrühe wurde über Celite filtriert. Das Mycel wurde mit Aceton extrahiert, das Kulturfiltrat an Amberlite® XAD-2 absorbiert und mit Methanol eluiert.

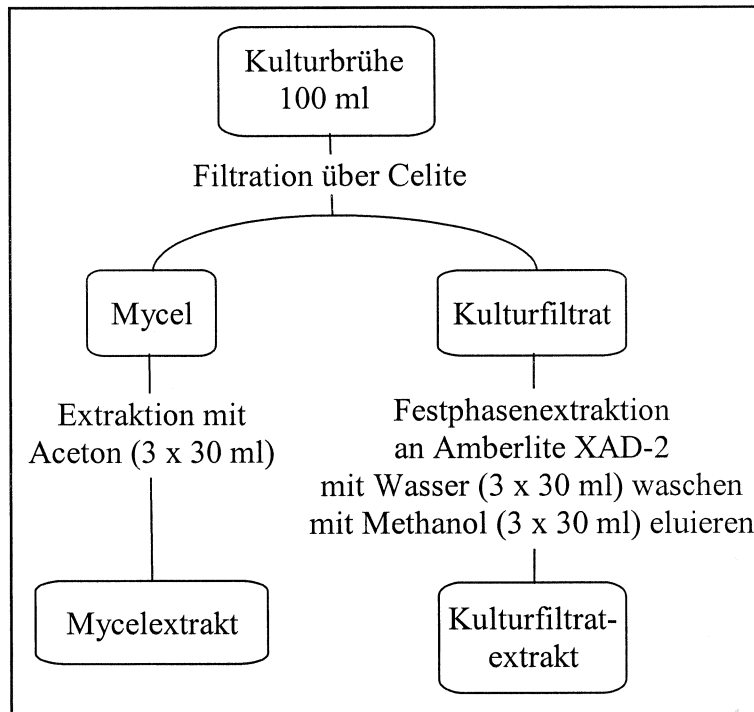


Abbildung 1: Aufarbeitung der Kulturbrühen nach der Festphasen-Extraktionsmethode

2.2. Probenvorbereitung und Vermessung

Die Extrakte wurden in 1 ml Methanol/Wasser (9:1) gelöst, filtriert und die optische Dichte der Probe am UV-Spektrometer im Bereich von 230-300 nm durch Verdünnen auf 3.0 eingestellt. Die so vorbereitete Probe wurde dann im CD-Spektralpolarimeter von 210-400 nm vermessen.

2.3. Messergebnisse und Stammauswahl

Es wurden 192 Extrakte von 32 Stämmen im CD-Screening untersucht. 50 Extrakte von 20 Stämmen zeigten CD-Aktivität. Bei der Stammauswahl wurden zwei Kriterien berücksichtigt: Es sollten möglichst viele Absorptionsbanden auftreten, wobei besonders auf bisignate Signale geachtet wurde, und die Cotton-Effekte sollten möglichst intensiv sein.

Stamm	Medium	Extrakt	Cotton-Effekte [nm (ΔA)]	Bemerkung
K21/2	SM	My	281 (-39.2), 313 (22.6)	bisignat, intensiv
K21/5	SM	Kf	235 (6.1), 268 (-4.0)	bisignat
K22/1	SM	Kf	230 (+62.0), 312 (-12.4)	bisignat, intensiv
K22/8	SM	Kf	225 (16.0), 232 (16.9), 268 (-6.0),	bisignat
K23/4	Ha	My	233 (8.0), 249 (2.9), 280 (-22.9), 314 (14.7)	bisignat
K23/6	Ha	My	263 (1.6), 274 (3.7), 285 (5.5), 357 (1.6), 376 (2.2)	viele Cotton-Effekte
K23/7	Ha	My	241 (6.0), 320 (-4.7), 334 (-5.7), 353 (-4.8)	viele Cotton-Effekte
K23/10	Ha	Kf	253 (12.2), 269 (-18.6)	bisignat

Tabelle 1: Im CD-Screening ausgewählte Stämme mit Angabe der Extrakte, Cotton-Effekte und Bemerkungen zum CD-Spektrum

Die Ergebnisse des Stammes K21/2 konnten nicht reproduziert werden. Die Absorptionsbanden der Extrakte der Stämme K23/6 und K23/7 sind charakteristisch für Polyene³⁹. Da die Extrakte von Polyenproduzenten im UV-Spektrum die gleichen Absorptionsbanden zeigen und auch im biologischen Screening sehr auffällig sind, wurden diese Stämme bei der Bearbeitung zurückgestellt. Die Stämme K21/5 und K23/4 wurden zur Bearbeitung ausgewählt, da die Extrakte intensive bisignate Cotton-Effekte zeigten.

3. Isolierung und Charakterisierung der Substanzen aus dem CD-Screening

Die Kultivierung der ausgewählten Stämme erfolgte im 1 L-Maßstab unter den Standardbedingungen. Die Extrakte wurden mit Ethylacetat generiert. Man chromatographierte Rohprodukte an Kieselgel und überprüfte die Fraktionen auf CD-Aktivität. Fraktionen gleicher CD-Aktivität wurden vereinigt und an Sephadex LH-20 chromatographiert bis ein Reinstoff vorlag.

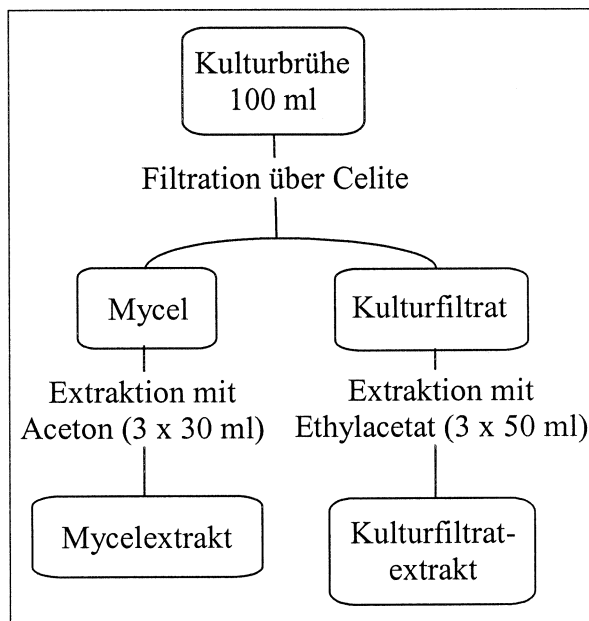


Abbildung 2: Aufarbeitungsschema der Ethylacetat-Extraktionsmethode

3.1. Streptazolin (6) aus dem Stamm K21/5

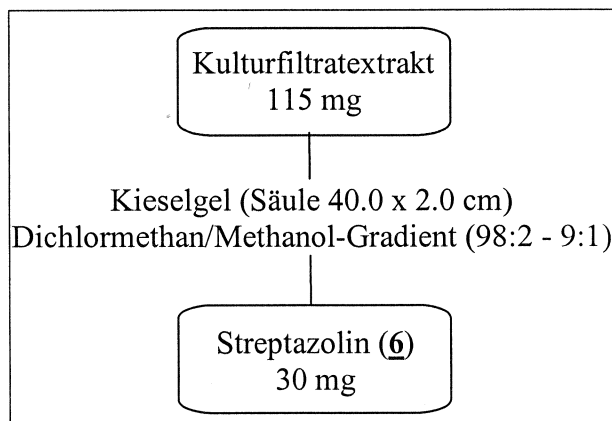


Abbildung 3: Isolierung von Streptazolin (6)

Der Stamm K21/5 wurde unter Standardbedingungen im 1 L-Maßstab kultiviert. Durch Extraktion des Kulturfiltrats mit Ethylacetat erhielt man 115 mg Extrakt. Dieser wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1; Säule 40.0 × 2.0 cm) gereinigt und man erhielt 30 mg/L Streptazolin (6) als farbloses Öl.

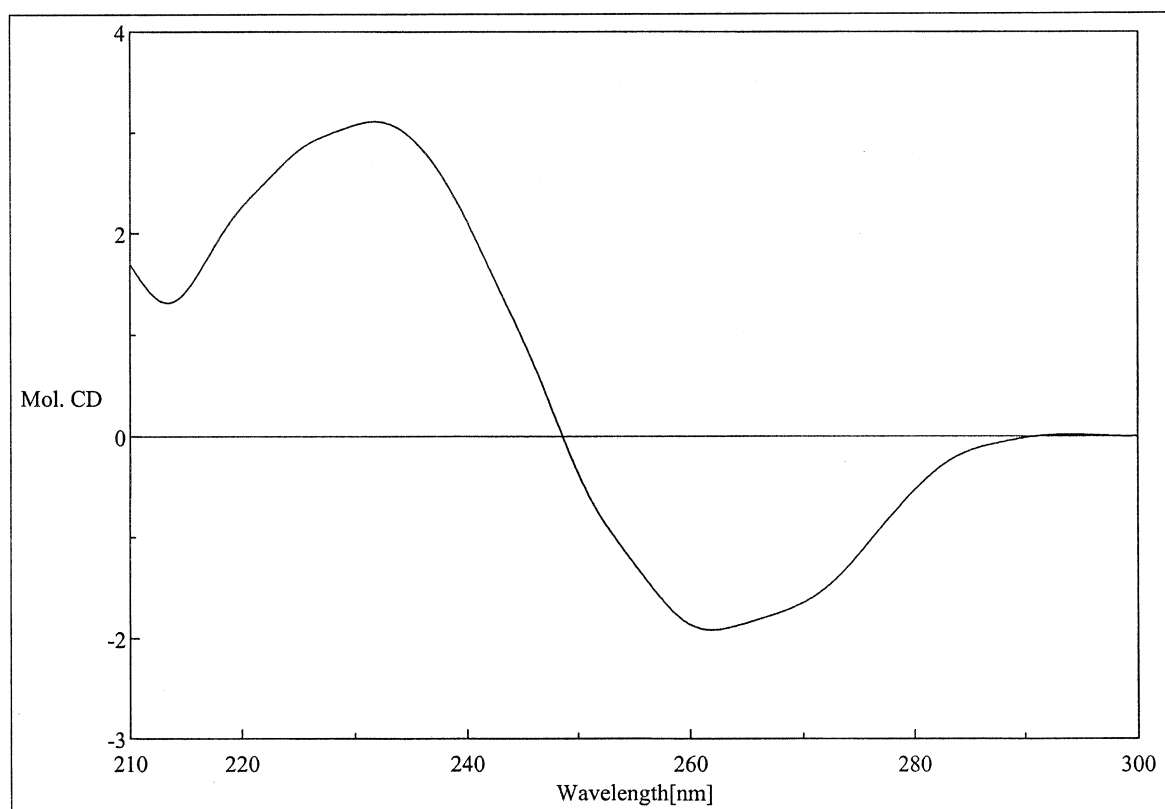
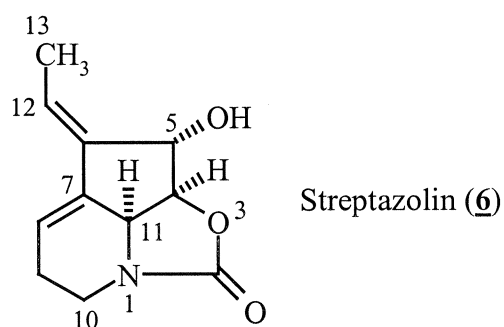


Abbildung 4: CD-Spektrum (Methanol) von Streptazolin (6)

Streptazolin (6) zeigt eine negative bisignate CD-Kurve mit Absorptionsbanden bei 262 und 232 nm. Die Verbindung ist bei 254 nm UV-aktiv und färbt sich mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 braun an. Im EI-Massenspektrum wird der Molpeak bei $m/z = 207$ angezeigt. Ein Abgleich des EI-Massenspektrums mit der Datenbank führte zum Streptazolin⁴⁰ (6).



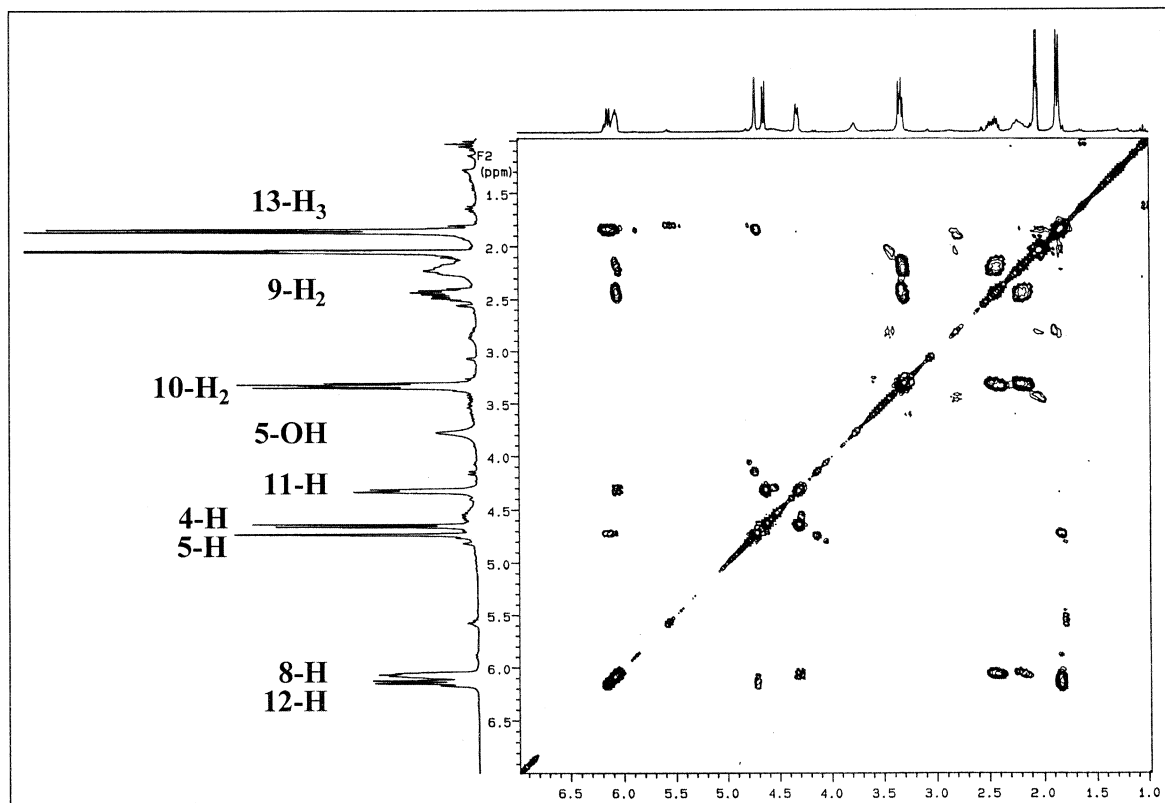


Abbildung 5: COSY-Korrelationen (300 MHz, CDCl₃) von Streptazolin (**6**)

Streptazolin (**6**) wurde erstmals 1981 in einem chemischen Screening entdeckt. Der Strukturvorschlag konnte durch eine Röntgenstrukturanalyse von 5-O-Acetyldihydrostreptazolin bestätigt werden⁴¹. Die absolute Konfiguration ließ sich an einem Streptazolin-Abbauprodukt CD-spektroskopisch mit Hilfe der Dibenzoat-Regel ableiten. Die (*Z*)-Konfiguration der exocyclischen Doppelbindung wurde durch Totalsynthese des Naturstoffs ermittelt⁴². Trotz intensiver Bemühungen ist die Biogenese von Streptazolin (**6**) nicht vollständig geklärt⁴³. Es handelt sich um ein Pentaketid, jedoch ist die Herkunft des Stickstoffatoms und von C-2 noch nicht bewiesen.

3.2. Elasinin (7) aus dem Stamm K23/4

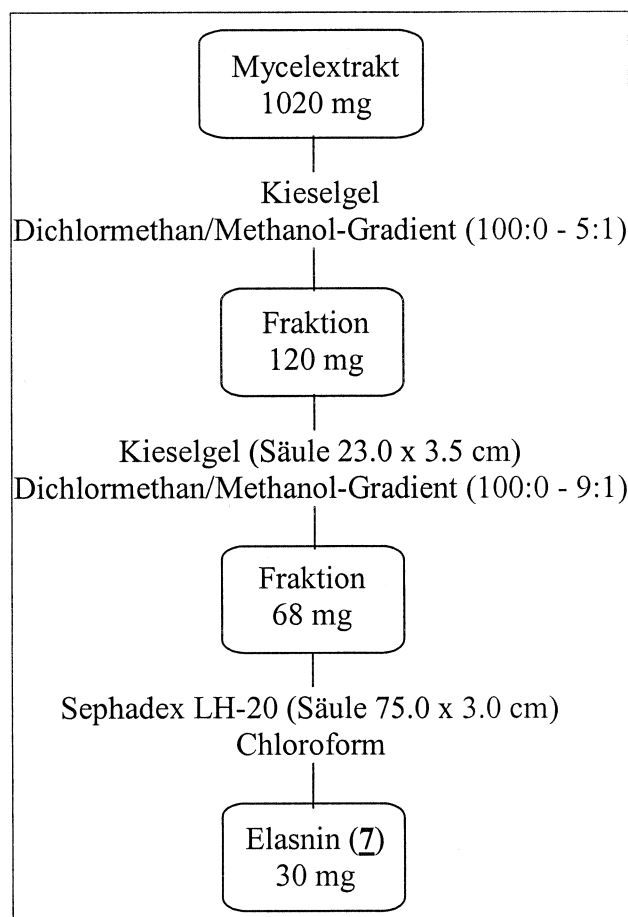


Abbildung 6: Isolierung von Elasinin (7)

Der Stamm K23/4 wurde unter Standardbedingungen im 1 L-Maßstab kultiviert und die Kulturbrühe nach der Ethylacetat-Extraktionsmethode aufgearbeitet. Elasinin (7) ließ sich aus 1.02 g Mycelextrakt durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1 und Dichlormethan/Methanol-Gradient, 100:0 – 9:1) und Sephadex LH-20 (Chloroform) aufreinigen. Man erhielt 30 mg/L Elasinin (7) als farbloses Öl.

Das CD-Spektrum von Elasinin (7) zeigt zwei positive bisignate CD-Couplets, deren Cotton-Effekte bei 314, 281 und 234 nm liegen. Elasinin (7) hat den R_f -Wert 0.60 (Chloroform/Methanol, 9:1) und zeigt keine Farbreaktion mit Ehrlichs Reagenz, Orcin-Sprühreagenz und Anisaldehyd. Die Substanz ist bei 254 nm UV-aktiv.

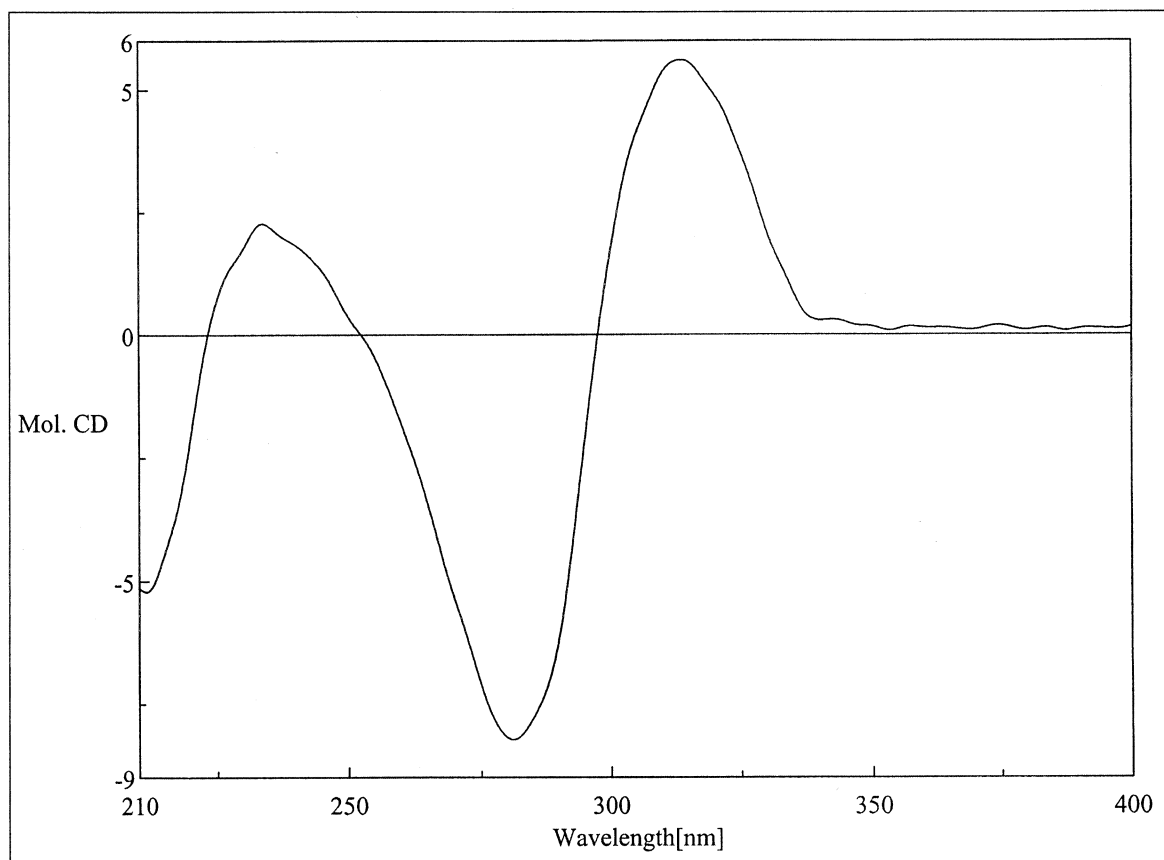


Abbildung 7: CD-Spektrum (Methanol) von Elasin (**7**)

Eine Hochauflösung des Molpeaks bei $m/z = 392$ im EI-Massenspektrum ergibt die Summenformel $C_{24}H_{40}O_4$. Im IR-Spektrum fallen zwei Absorptionsbanden auf, bei 1715 cm^{-1} für ein Keton und bei 1665 cm^{-1} für einen konjugierten Ester. Dem Protonenspektrum ($CDCl_3$) kann man 40 Signale entnehmen. Ein breites Singulett bei $\delta_H = 7.40$ lässt sich einem Hydroxylproton zuordnen. Die beiden intensiven Multipletts bei $\delta_H = 1.12 - 1.57$ und $\delta_H = 0.81 - 0.96$ sind Signale für 18 Methylen- bzw. 12 Methylprotonen, was auf ein verzweigtes Alkylsystem hindeutet. Das ^{13}C -NMR-Spektrum ($CDCl_3$) zeigt in Übereinstimmung mit der Summenformel 24 Signale, die man laut APT vier Methyl-, 12 Methylen-, einer Methingruppe und sechs quartären Kohlenstoffatomen zuordnen kann. Bei $\delta_C = 207$ und 165 handelt es sich um zwei Carbonylsignale. Insbesondere anhand des charakteristischen Alkylgruppen-Strukturelements lässt sich die Verbindung mit Hilfe der Naturstoffdatenbank AntiBase eindeutig identifizieren.

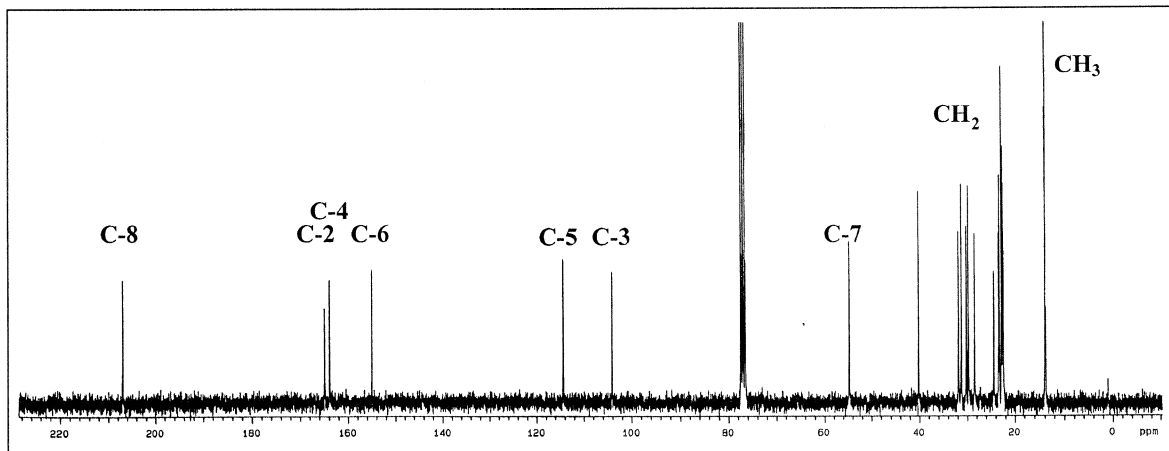
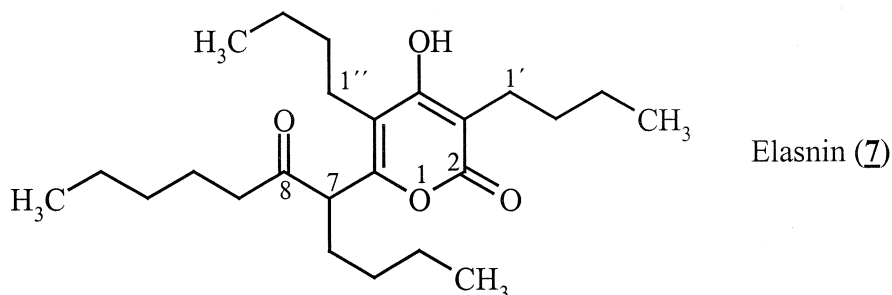


Abbildung 8: ¹³C-NMR-Spektrum (300 MHz, CDCl₃) von Elasin (7)

Elasin (7) ist erstmals 1978 aus dem Stamm *S. noboritoensis* KM-2753 isoliert worden⁴⁴, nachdem es bei einem Screening auf Inhibitoren der humanen Granulozyt Elastase aufgefallen war. Die Biosynthese erfolgt aus zwölf intakten Acetateinheiten⁴⁵. Einige Arbeiten zur Totalsynthese dieser Verbindung sind bereits durchgeführt worden⁴⁶. Elasin (7) hemmt die humane Leukozyten Elastase, die Pancreas Elastase und Chymotrypsin⁴⁷. Es existiert ein japanisches Patent für die Nutzung von Elasin (7) zur Gütesicherung von Sake und Wein⁴⁸.



4. Die HPLC-CD-UV-Kopplung

In jüngster Zeit ist erfolgreich versucht worden, Geräte wie NMR⁴⁹ oder Massenspektrometer⁵⁰ an eine HPLC-Anlage zu koppeln. Mit Hilfe dieser Kopplungen gelingt es, die spektroskopischen Daten einzelner Substanzen aus komplexen Mischungen zu erhalten, ohne zuvor diese als Reinsubstanz zu isolieren. Durch Nutzung von on-line HPLC-NMR-, HPLC-MS/MS- und HPLC-CD-UV-Kopplung ist die Strukturaufklärung

eines neuen Metaboliten mitsamt der absoluten Stereochemie aus einem Extrakt gelungen⁵¹.

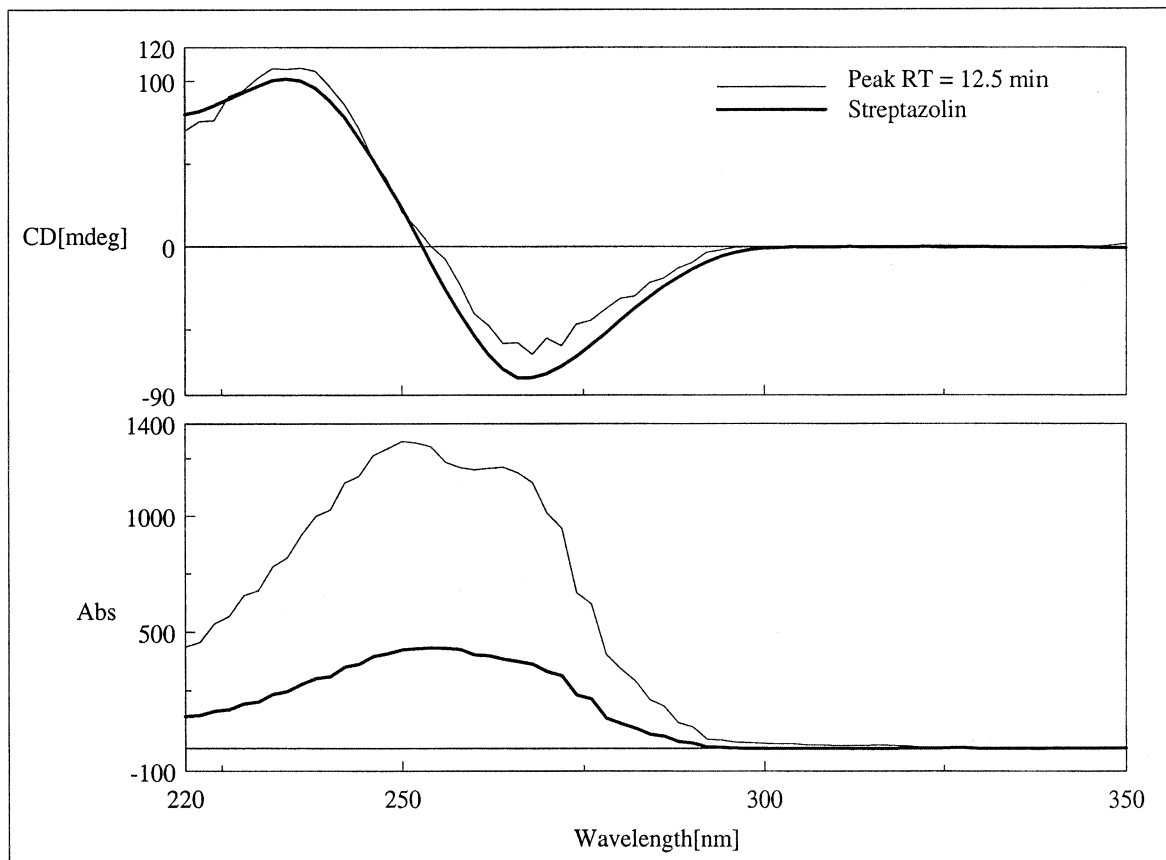
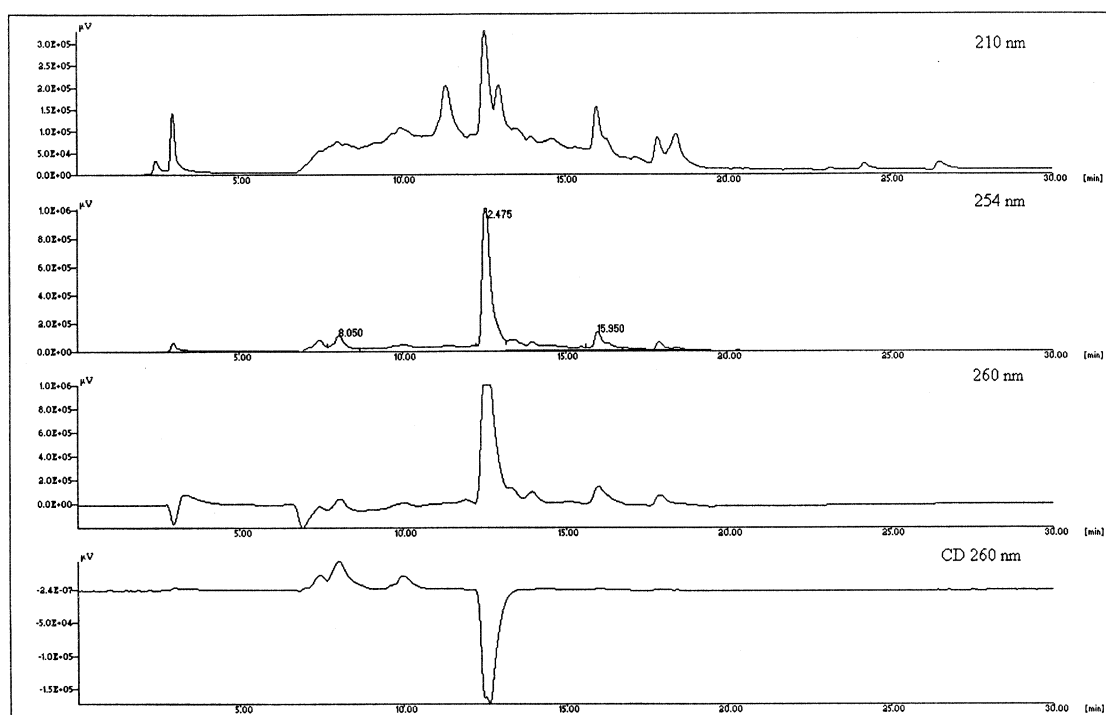


Abbildung 9: CD- und UV-Spektren von Streptazolin (**6**) und dem Peak RT = 12.5 min des Extrakts des Stammes K22/8

Bei der HPLC-CD-UV-Kopplung steht zusätzlich zu einem vier-Kanal UV-Detektor der CD-Detektor CD-1595 der Firma Jasco⁵² zur Verfügung. Dieser ermöglicht im on-line Betrieb die Messung der Absorption (UV-Signal) und der differentiellen Absorbanz (CD-Signal) bei einer Wellenlänge nach Wahl zwischen 220 – 420 nm. Alternativ kann über einen Kanal der g-Faktor bestimmt werden. Dies ist ein intensiver also konzentrations unabhängiger Parameter, den man durch Division der CD- durch die UV-Absorption erhält. Der Quotient ist charakteristisch für eine Substanz. Im stop-flow Betrieb ist die Messung von UV- und CD-Spektren über den Bereich von 220 – 420 nm möglich. In einer Messung lässt sich so feststellen, ob in einem Extrakt CD-aktive Substanzen vorhanden sind, und in einer zweiten Messung lassen sich die UV- und CD-Spektren oder der g-Faktor dieser Substanzen im stop-flow Betrieb ermitteln.

Die CD-Spektren der Extrakte der Stämme K21/5 und K22/8 zeigten große Ähnlichkeit. Da bereits bekannt war, dass es sich bei der CD-aktiven Komponente des Stammes K21/5 um Streptazolin (**6**) handelte, verglich man das HPLC-Chromatogramm des Extrakts des Stammes K22/8 mit dem Chromatogramm von Streptazolin (**6**) und nahm im stop-flow Betrieb das UV-, CD-Spektrum und den g-Faktor des Peaks mit der Retentionszeit $RT = 12.5$ min auf. Da sämtliche Werte übereinstimmten, wurde auf eine Fermentation und Isolierung dieser CD-aktiven Komponente verzichtet.

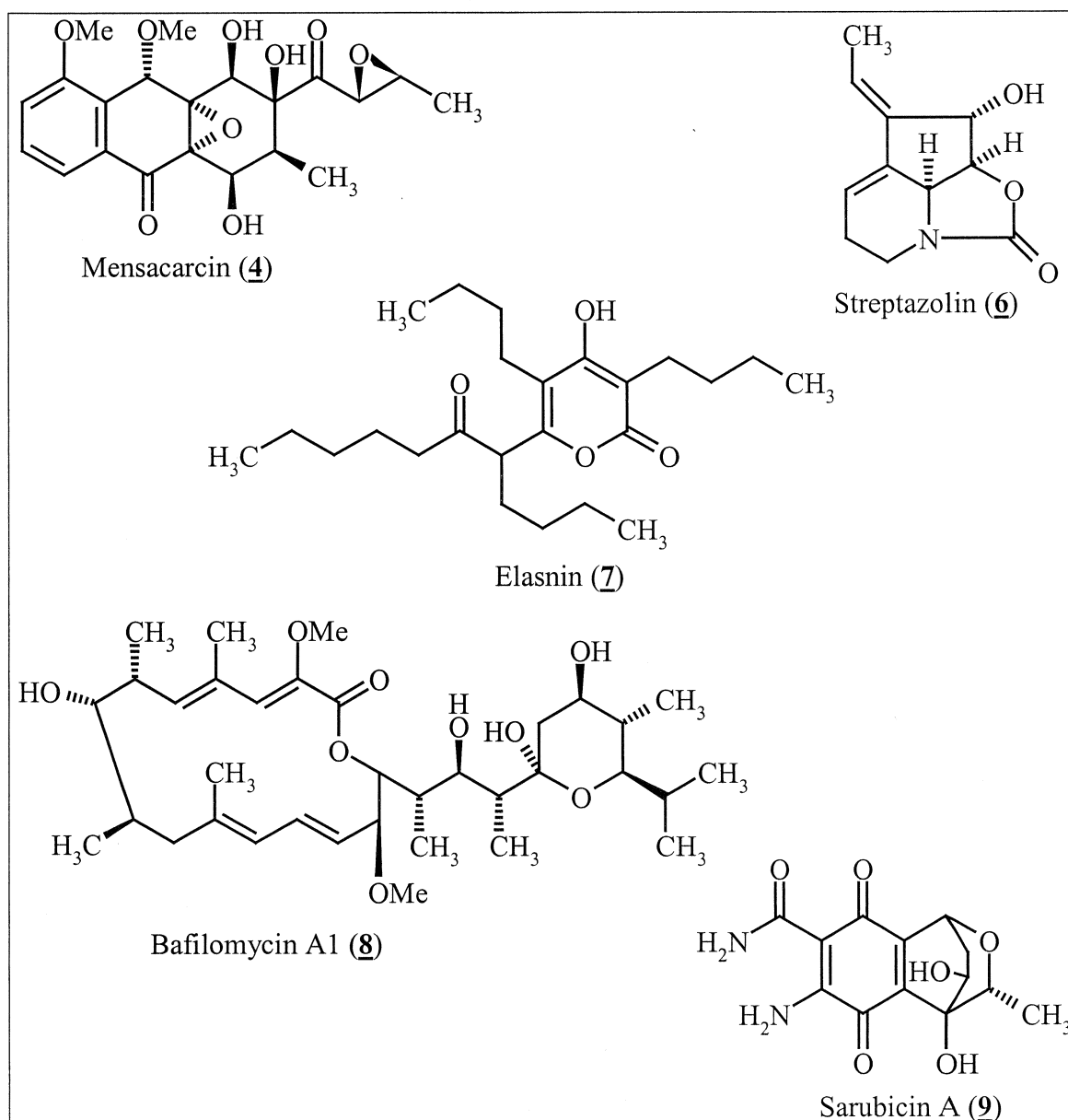


Acetonitril/Wasser-Gradient 15:75 – 100:0 in 30 min.

Abbildung 10: HPLC-Chromatogramm des Extrakts des Stammes K22/8

5. Bewertung des CD-Screenings

Aufgrund der interessanten CD-Spektren der Extrakte sind bisher fünf Stämme untersucht und die CD-aktiven Komponenten isoliert worden. Es handelt es sich um, Mensacarcin (**4**), Streptazolin (**6**), Elasin (**7**), Bafilomycin A1^{53,54} (**8**) und Sarubicin A⁵⁵ (**9**).



Die Substanzen stammen aus unterschiedlichen Stoffklassen und zeigen eine hohe strukturelle Diversität. Ein chiraler Chromophor oder ein Chromophor, in dessen Nähe sich ein konformativ fixiertes Stereozentrum befindet, ist allen Verbindungen gemeinsam. Dies ist die notwendige Voraussetzung, damit eine Substanz CD-Aktivität besitzt und somit im

CD-Screening auffällt. Diese Bedingung führt zu einer gewollten Auswahl unter einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten und wird auch als „Screening-Fenster“ bezeichnet.

Produzent	Substanz	Stoffklasse	Biol. Aktivität
<i>Streptomyces</i> sp. Gö C4/4	Mensacarcin (4)	Typ II-Decaketid	antitumor
<i>Streptomyces</i> sp. Gö F1/6	Bafilomycin A1 (8)	Makrolid, Typ I-Polyketid	antibiotisch
<i>Streptomyces</i> sp. K21/5	Streptazolin (6)	-	-
<i>Streptomyces</i> sp. K23/4	Elasnin (7)	α -Pyrone, Typ I-Polyketid	Elastase- Inhibitor
<i>Streptomyces</i> sp. LAM 14	Sarubicin A (9)	Isochromanchinon	antibiotisch

Tabelle 2: Substanzen, die im CD-Screening isoliert worden sind, mit Angabe des Produzenten, der Stoffklasse und der biologischen Aktivität

Ein Screening auf CD-Aktivität hat den Vorteil, dass Sekundärmetabolite mit komplexen Strukturen auffallen. Die Ergebnisse des Screenings können in einer Datenbank gespeichert werden, was für die Wiedererkennung bekannter Verbindungen Bedeutung hat. Eine Kopplung mit einem HPLC-Gerät und anderen Spektrometern ist möglich. Gerade die Selektivität der Methode birgt auch Nachteile, denn nur ein geringer Teil aller Sekundärmetabolite ist CD-aktiv. Wenn weitere Informationen, wie z.B. HPLC-UV-Chromatogramme der Extrakte nicht vorliegen, erhält man keine Aussagen zum Biosynthesepotential der Stämme. Das Screening-Fenster ist also sehr viel enger als beim Chemischen Screening. Eine direkte Korrelation zur Struktur oder zur biologischen Aktivität der Verbindungen ist sowohl beim CD-Screening wie auch beim chemischen Screening nicht möglich.

III. Weiterführende Untersuchungen am Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4

1. Anwendung des OSMAC-Ansatzes

1.1. Nährmedienvariation

Der Variation des Nährmediums kommt bei Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen eine große Bedeutung zu. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten von Nährmedien⁵⁶. Lässt sich eine Nährlösung aus definierten chemischen Verbindungen zusammensetzen, so spricht man von synthetischen oder definierten Nährmedien. Setzt man hingegen komplexe Stoffe ein, deren Zusammensetzung nicht bekannt ist, wie z.B. Hefe-, Sojabohnen-, Fleischextrakt oder Pepton, bezeichnet man diese als komplexe oder undefinierte Nährböden. Zu Beginn der Untersuchung eines neuen Stammes setzt man zunächst komplexe oder chemisch nicht definierte Nährmedien ein, um ein möglichst breites Nährstoffangebot zu garantieren. Möchte man den Einfluss von bestimmten Nährmedienbestandteilen oder Zusätzen, wie z.B. Enzyminhibitoren, auf die Produktivität eines Stammes untersuchen, so ist die Verwendung von synthetischen oder chemisch definierten Nährböden von Vorteil.

Jedes Medium muss eine Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sowie Schwefel-, Phosphor-, Kalium-, Natrium-, Calcium-, Magnesium- und Eisen-Bestandteile aufweisen. Für das Wachstum von Streptomyceten haben sich ferner die Spurenelemente Mangan, Zink, Kobalt, Kupfer und Molybdän als essentiell herausgestellt⁵⁷. Der Einfluss der Nährbestandteile auf den Sekundärmetabolismus ist sehr komplex und im Detail kaum untersucht. Glucose, Ammonium- und Phosphat-Ionen können die Bildung von Sekundärmetaboliten reprimieren⁵⁸. Bei einer Untersuchung der biologischen Aktivität der Extrakte von insgesamt 760 Mikroorganismen, die jeweils in vier verschiedenen Nährmedien kultiviert worden waren, stellte sich heraus, dass 75% der Organismen das aktive Prinzip nur in einem Nährmedium produzierten⁵⁹. Der Stamm *Streptomyces* sp. A1 produziert bei einer Kultivierung in Soja/Mannit die Metabolite Streptazolin, Streptazon A und Streptazon B, bei der Verwendung von Haferkleie, Hirse, Quinoa oder Linsen als ausschließlicher Nährstoffquelle β -, γ - und δ -Rubromycin sowie 3'-Hydroxy- β -rubromycin⁶⁰.

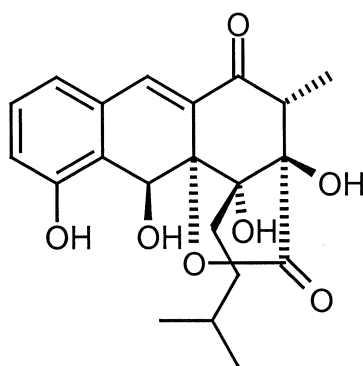
Der Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4 zeigte auf Hafermedium sowohl gutes Wachstum als auch eine ausreichende Mensacarcinproduktion (121 mg/L). Für geplante Biosyntheseuntersuchungen sollte aber ein definiertes Medium gefunden werden. Die Produktivität des Stammes Gö C4/4 wurde in vier unterschiedlichen definierten Nährmedien mit variiertem Kohlenstoff- und Stickstoffquelle getestet.

Nährmedium	Mycel- produktion	Mensacarcin -produktion ^a	neue Metabolite ^a
<u>Nährlösung Nr. 1153</u>			
12.5 g/L Glycerin	+++	-	±
1.0 g/L Arginin			
1.0 g/L Dikaliumhydrogenphosphat			
1.0 g/L Natriumchlorid			
0.5 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat			
5.0 ml/L Spur 11			
<u>Nährlösung Nr. 1187</u>			
10.0 g/L Stärke	+++	-	±
2.0 g/L Ammoniumsulfat			
2.0 g/L Calciumcarbonat			
1.0 g/L Dikaliumhydrogenphosphat			
1.0 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat			
1.0 g/L Eisensulfat-Heptahydrat			
5.0 ml/L Spur 11			
<u>Minimal-Medium</u>			
10.00 g/L Glucose	-	-	±
0.50 g/L L-Asparagin			
0.50 g/L Dikaliumhydrogenphosphat			
0.20 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat			
0.01 g/L Eisensulfat-Heptahydrat			
<u>Medium zur Anthracyclin Produktion nach W.R. Strohl et al. (modifiziert)⁶¹</u>			
22.50 g/L Glucose	-	-	-
0.86 g/L Natriumnitrat			
0.17 g/L Dikaliumhydrogenphosphat			
0.12 g/L Magnesiumsulfat-Heptahydrat			

+++/- sehr gutes/kein Wachstum, ± schwache Zonenbildung, a) DC-Kontrolle

Tabelle 3: Nährmedienvariation mit Beurteilung des Wachstums und der Metabolitenbildung des Stammes Gö C4/4

Bei der ersten Versuchsreihe wurde 72 h unter Standardbedingungen kultiviert. Im chemischen Screening konnten jedoch keine Metabolite nachgewiesen werden. Daher wurde die Versuchsreihe mit einer Kultivierungsdauer von 120 h wiederholt. Bei zwei Nährmedien war zwar ein gutes Mycelwachstum zu beobachten, die Produktion von Sekundärstoffen blieb allerdings aus. Da der Stamm bei einer Kultivierung in dem Nährmedium Nr. 1153 durch ein interessantes Metabolitenmuster im chemischen Screening auffiel, wurde ein Scale-up im 3 L-Maßstab über 113 h in diesem Medium durchgeführt. Im Kulturfiltratextrakt konnte dünn-schichtchromatographisch kein Mensacarin (4) nachgewiesen werden, wohl aber eine neue Zone (R_f -Wert 0.30 in Chloroform/Methanol (9:1)), die sich mit Ehrlichs Reagenz braun anfärben ließ. Die entsprechende Substanz konnte durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol, 95:5) und Sephadex LH-20 (Methanol) isoliert und als Rishirilid A⁶² (10) identifiziert werden. Die Ausbeute betrug 5 mg/L. Dieses Ergebnis ließ sich bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht mehr reproduzieren.



Rishirilid A (10)

1.2. Kultivierungsgefäß und Sauerstoffpartialdruck

Der Sauerstoffpartialdruck in einer Kulturlösung bestimmt das Wachstum und die Produktbildung eines Stammes. Intensität der Belüftung, Rührgeschwindigkeit und Form des Kultivierungsgefäßes sind Parameter, deren Variation zu Änderungen im Sekundärstoffwechsel führen können. So gelangt z.B. bei der Kultivierung im P-Kolben der Sauerstoff nur durch Diffusion in die Nährlösung, während im Airliftfermenter der Sauerstoff mit 5.0 bar Überdruck die Nährlösung durchflutet. Der Manumycin A Produzent *Streptomyces parvulus* bildete unter Überdruck im Airliftfermenter vier neue Metabolite⁶³.

Bei dem Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4 konnte eine Beeinflussung der Mensacarcinproduktion durch die Variation der Belüftungsverhältnisse beobachtet werden. Bei der Kultivierung im P-Kolben wurde bei der HPLC-Kontrolle kein Mensacarcin (4) nachgewiesen, allerdings zeigten sich neue Peaks. Da die entsprechenden Verbindungen nur in sehr geringer Konzentration auftraten, waren Isolierung und Strukturaufklärung nicht möglich.

Kultivierungsgefäß (Belüftung)	Mensacarcinproduktion [mg/L] ^a	neue Metabolite ^a
Airliftfermenter, 10 L (5.0 bar Überdruck)	76	nein
Airliftfermenter, 10 L (0.3 bar Überdruck)	156	nein
Schüttelkolben, Standardbedingungen	46	nein
P-Kolben, 1 L	-	ja

Nährmedium bei allen Fermentationen: 20 g/L Hafermehl, 2.5 ml/L Spur 11

a) HPLC-Kontrolle

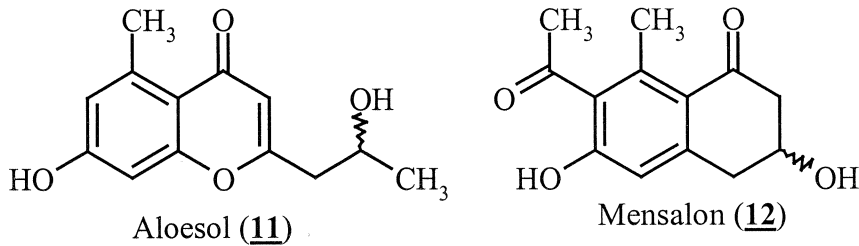
Tabelle 4: Auswirkung von Kultivierungsgefäß und Sauerstoffpartialdruck auf die Produktbildung des Stammes Gö C4/4

1.3. Zusatz von Lösungsmitteln

Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln während der Fermentation kann zur Bildung neuer Sekundärmetabolite oder zur Steigerung von Ausbeuten führen. So bewirkte z.B. die Zugabe von 3% DMSO zum Nährmedium eine Verdreifachung der Ausbeute von Chloramphenicol und Tetracenomycin C⁶⁴. Dieser Effekt kann damit begründet werden, dass DMSO P₄₅₀-Monooxygenasen hemmt⁶⁵.

Bei der Zugabe von 2 – 5% DMSO zur Kulturlösung nach dem Autoklavieren, bleibt die Mensacarcinproduktion in etwa unbeeinflusst, es konnten jedoch zwei neue Metabolite dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen werden. Die Sekundärstoffe besitzen R_F-Werte von 0.24 und 0.22 (Chloroform/Methanol, 9:1), zeigen UV-Aktivität bei 254 nm und eine braune Farbreaktion nach dem Ansprühen mit Orcin-Sprühareagenz, beziehungsweise eine violette mit Anisaldehyd/H₂SO₄. Sie konnten durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und

Sephadex LH-20 (Aceton) isoliert und als die Heptaketide Aloesol⁶⁶ (**11**) (2.3 mg/L) bzw. Mensalon⁶⁷ (**12**) (2.0 mg/L) identifiziert werden.



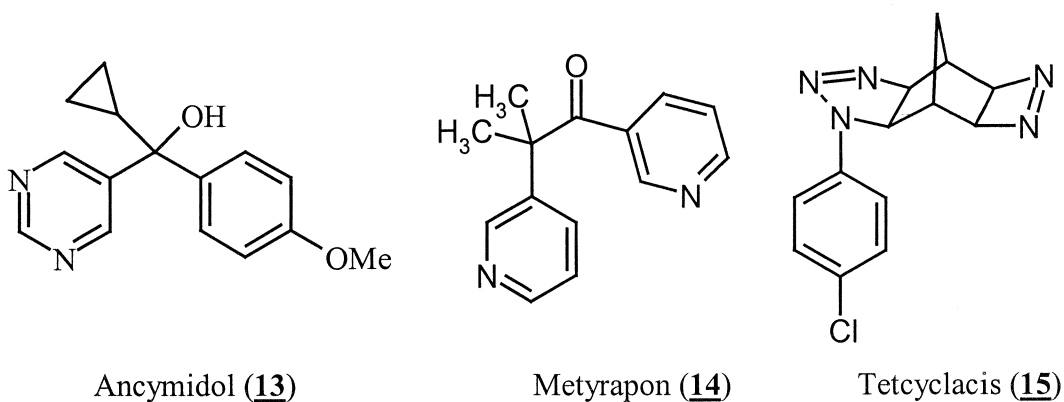
Kultivierungsgefäß	Mensacarcinproduktion [mg/L] ^a
Braun Biostat B, 2 L, 40 ml DMSO und 900 mg NaAc, 2.5 vvm	61
Braun Biostat E, 10 L, 200 ml DMSO, 1.0 vvm	93
Schüttelkolben, Standardbedingungen	46

Nährmedium bei allen Fermentationen: 20 g/L Hafermehl, 2.5 ml/L Spur 11

a) HPLC-Kontrolle

Tabelle 5: Auswirkung von Kultivierungsgefäß und Zugabe von DMSO auf die Mensacarcinproduktion

1.4. Zusatz von Enzyminhibitoren



Der Einsatz von Enzyminhibitoren kann das Metabolitenspektrum von Mikroorganismen stark verändern. Setzt man Inhibitoren für Enzyme der frühen Biosynthese ein, so wird die

Bildung dieser Metabolite verhindert. Das kann zu einer Vereinfachung des Produktspektrums führen mit dem Vorteil, dass man Produkte, die auf anderen Biosynthesewegen gebildet werden, leichter isolieren kann. Darüber hinaus ist es aber auch möglich, dass stille Biosynthesegene aktiviert werden. Cerulenin, ein Inhibitor der Fettsäure-, Polyketid- und Steroidbiosynthese, wird bei Fütterungsexperimenten mit artifiziellen Vorläufermolekülen eingesetzt, um die Konkurrenz mit den natürlichen Vorläufermolekülen zu unterbinden⁶⁸. Bei dem Pilz F-24'707y führte die Hemmung der 1,8-Dihydroxynaphthalen (DHN)-Biosynthese durch den Inhibitor Tricyclazol zu dem vollständigen Verlust des unter Standardbedingungen gebildeten Hauptmetaboliten Cladospironbisepoxid und zur Produktion des neuen Makrolids Mutolid⁶⁹. Arbeitet man mit Inhibitoren der späten Biosynthese, kommt es entweder zu einer Akkumulation von Vorläufermolekülen oder zu einer Bildung von Derivaten dieser Vorläufermoleküle durch nicht-enzymatische Reaktionen oder Enzyme, die in der Biosynthesesequenz nachfolgen.

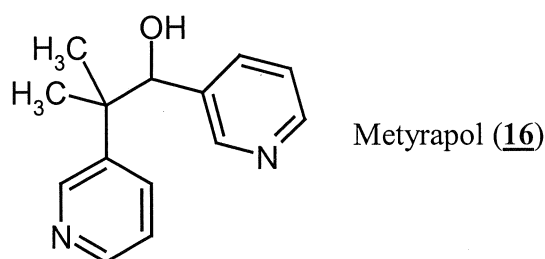
Inhibitor	zugegebene Menge		Mensacarcin- produktion ^a
	[mM]	[mg/L]	
Ancymidol (13)	0.200	51.20	+++
	0.400	102.40	+++
	1.000	256.00	++
Metyrapon (14)	10 ⁻⁵	2.3·10 ⁻⁴	+++
	10 ⁻⁴	2.3·10 ⁻³	+++
	0.010	0.23	++
	0.014	3.20	++
	0.100	23.50	++
	0.130	29.40	-
	0.460	104.50	-
Tetcyclacis (15)	1.000	226.00	-
	0.130	35.50	-
	1.000	273.00	-

(+++ / ++ / +/- sehr gute / gute / keine Produktion, a) DC-Kontrolle

Tabelle 6: Ergebnisse der Kultivierung des Stammes Gö C4/4 in Gegenwart verschiedener Enzyminhibitoren

Mit dieser Methode erhaltene Vorläufer geben möglicherweise Hinweise auf die Biosynthese der Sekundärmetaboliten und sind für die Ableitung von Struktur-Wirkungsbeziehungen von Bedeutung, denn die biologische Aktivität der Metabolite wird erst durch die Schritte der späten Biosynthese induziert. Hierbei handelt es sich vor allem um Glykosilierungen, Methylierungen und Oxygenierungen. Methylierungen, die über S-Adenosylmethionin (SAM) verlaufen, lassen sich durch L-Ethionin⁷⁰ in Abwesenheit von Methionin hemmen. Sinefungin⁷¹ hemmt selektiv O-Metylierungen neben C-Methylierungen. Als Hemmstoffe von P₄₅₀-Monooxygenasen sind Ancymidol⁷² (**13**), Metyrapon⁷³ (**14**) und Tetcyclacis (**15**) bekannt. Die Zufütterung von Metyrapon (**14**) zu *S. cinnamonensis* führte zur Akkumulation von 26-Deoxymonensin A und B.

Um die Reihenfolge des Sauerstoffeinbaus und den Einfluß der Oxygenierungen auf die biologische Aktivität untersuchen zu können, wurden Fütterungsexperimente mit den oben aufgeführten Oxygenaseinhibitoren durchgeführt. Ancymidol (**13**) hat keinen Einfluss auf die Biosynthese von Mensacarcin (**4**), während Tetcyclacis (**15**) diese komplett inhibiert. Bei Metyrapon (**14**) konnte eine direkte Beziehung zwischen der Konzentration des Inhibitors und der Mensacarcinproduktion beobachtet werden. Darüber hinaus wurde auf dem Dünnschichtchromatogramm eine neue Zone sichtbar. Daher führte man eine Kultivierung im 1.1 L-Maßstab im Hafermedium unter Standardbedingungen in Schüttelkolben durch. Nach 20 h wurden insgesamt 124.3 mg Metyrapon (**14**) (0.5 mmol) in je 1 ml sterilem Wasser dem Kultivierungsansatz zugefügt und weitere 22 h fermentiert.



Aus dem Kulturfiltratextrakt (110 mg) konnten durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol-Gradient, 98:2 – 9:1) Mensacarcin (**4**) (1 mg), Metyrapon (**14**) (42 mg) und 7 mg der neuen Verbindung isoliert werden. Diese Substanz (R_f -Wert 0.22 in Chloroform/Methanol (9:1)) zeigt eine braune Farbreaktion mit Vanillin-Schwefelsäure und konnte als das Biotransformationsprodukt Metyrapol (**16**) identifiziert werden.

2. Isolierung und Charakterisierung der Sekundärmetabolite aus dem OSMAC-Ansatz

Alle Ansätze wurden nach der Ethylacetat-Extraktionsmethode aufgearbeitet. Dabei wird die Kulturbrühe über Celite filtriert und in Mycel und Kulturfiltrat getrennt. Das Mycel wird dreimal mit Aceton im Ultraschallbad extrahiert. Das Kulturfiltrat extrahiert man dreimal mit der Hälfte des Volumens Ethylacetat. Die vereinigten organischen Phasen werden im Vakuum eingengt. So erhält man den Mycel- und Kulturfiltratextrakt.

2.1. Rishirilid A (10)

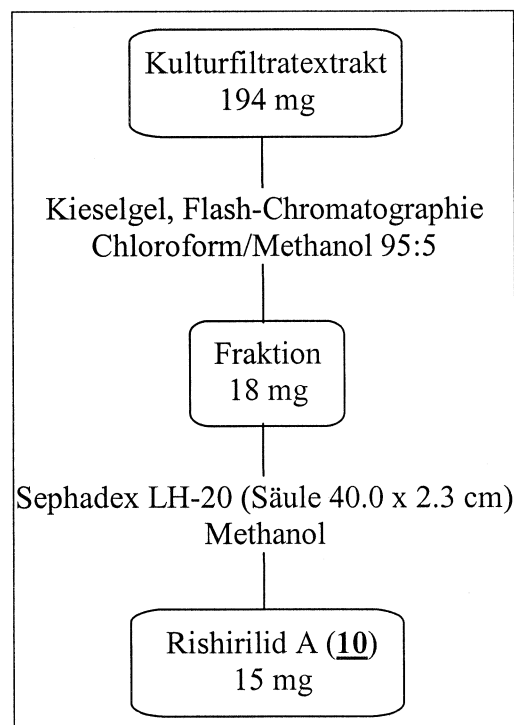


Abbildung 11: Isolierung von Rishirilid A (10)

Rishirilid A (10) wird bei der Fermentation im Nährmedium Nr. 1153 gebildet. Der Metabolit konnte aus dem Kulturfiltratextrakt (194 mg) durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol, 95:5) und Chromatographie an Sephadex LH-20 (Methanol) in einer Ausbeute von 5 mg/L isoliert werden.

Rishirilid A (10) besitzt den R_f -Wert 0.30 (Chloroform/Methanol, 9:1), zeigt eine braune Farbreaktion mit Ehrlichs Reagenz und ist in Methanol und DMSO gut, in Aceton und Chloroform mäßig löslich. Das ESI-Massenspektrum zeigt eine Molmasse von $m/z = 388$

an. Da bei der EI-Massenspektroskopie kein Molpeak auftritt, kann eine Hochauflösung nicht durchgeführt werden. Im IR-Spektrum sind neben charakteristischen OH-Streckschwingungen bei 3510 cm^{-1} zwei Carbonylbanden bei 1740 cm^{-1} (CO-Ester) und 1680 cm^{-1} (α, β -ungesättigtes Keton) zu sehen. Die Intensitäten der Signale im Protonenspektrum (CD_3OD) lassen auf 20 Protonen schließen. Darüber hinaus werden das Spinsystem eines 1,2,3-trisubstituierten Aromaten und Signale für drei Methylgruppen angezeigt. Das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 1.41$ (Septett) ist charakteristisch für ein Methinproton und deutet auf eine Isopropylgruppe hin.

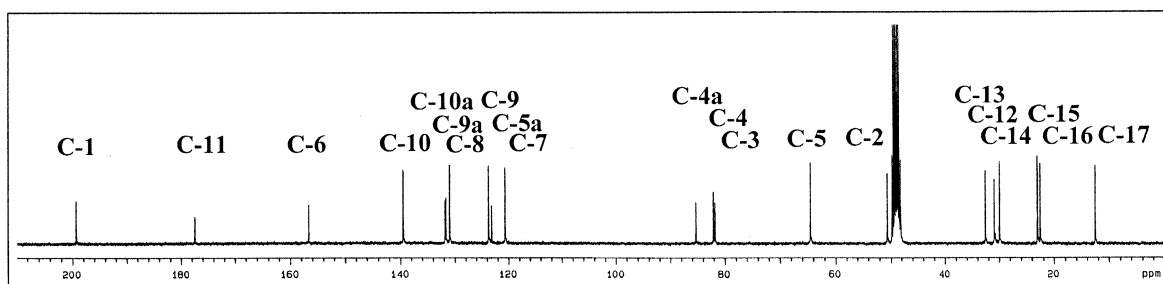


Abbildung 12: ^{13}C -NMR-Spektrum (75.5 MHz, CD_3OD) von Rishirilid A (**10**)

Dem ^{13}C -Spektrum (CD_3OD) lassen sich 21 Signale entnehmen, die sich laut APT drei Methyl-, zwei Methylen- und sieben Methingruppen sowie neun quartären Kohlenstoffatomen zuordnen lassen. Dabei handelt es sich bei $\delta_{\text{C}} = 199$ und 178 um Carbonylkohlenstoffe. In dem Bereich bis $\delta_{\text{C}} = 120$ finden sich acht weitere Signale, von denen sechs einem aromatischen Molekülfragment angehören. Die Verschiebung bei $\delta_{\text{C}} = 157$ ist charakteristisch für ein Phenylkohlenstoffatom aus Sauerstoff. Im Bereich von $\delta_{\text{C}} = 60 - 100$ weisen vier Signale auf Heteroatom-substituierte Kohlenstoffe hin. Aus den Korrelationen im $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY-NMR-Spektrum (CD_3OD) lassen sich vier Strukturelemente ableiten.

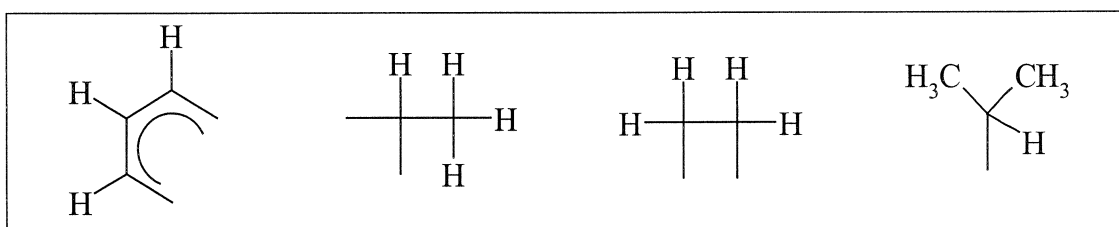


Abbildung 13: COSY-Konnektivitäten von Rishirilid A (**10**)

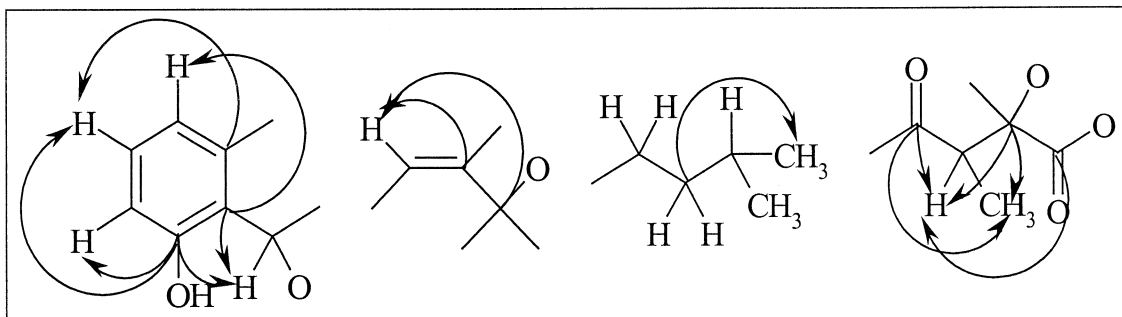
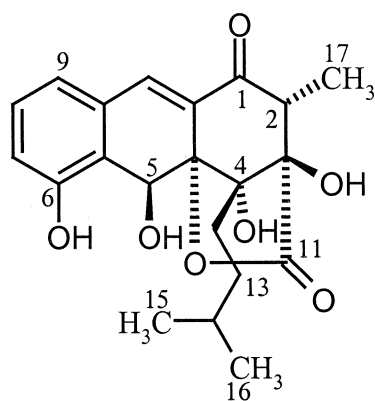


Abbildung 14: Ausgesuchte HMBC-Korrelationen von Rishirilid A (**10**)

Über das HMQC-Experiment konnten die Protonen den Kohlenstoffatomen zugeordnet werden und durch die HMBC-Korrelationen weitere Konnektivitäten abgeleitet werden. Mit den Partialstrukturen wurde eine Struktursuche in der Naturstoff-Datenbank AntiBase⁸ durchgeführt. Dabei erhält man einen Treffer.

Rishirilid A (**10**) ist 1984 bei einem Screening auf α_2 -Macroglobulin-Inhibitoren aufgefallen und aus Extrakten des Stammes *Streptomyces rishiriensis* OFR-1056 isoliert worden. Die Struktur⁷⁴ ist durch eine Röntgenstrukturanalyse abgesichert. Basierend auf den Daten aus den HMQC- und HMBC-Experimenten wird für die Kohlenstoffatome C-10a und C-9a sowie C-4 und C-4a eine abweichende Zuordnung vorgeschlagen. Die absolute Stereochemie und die Biosynthese dieser Verbindung sind nicht bekannt.



Rishirilid A (**10**)

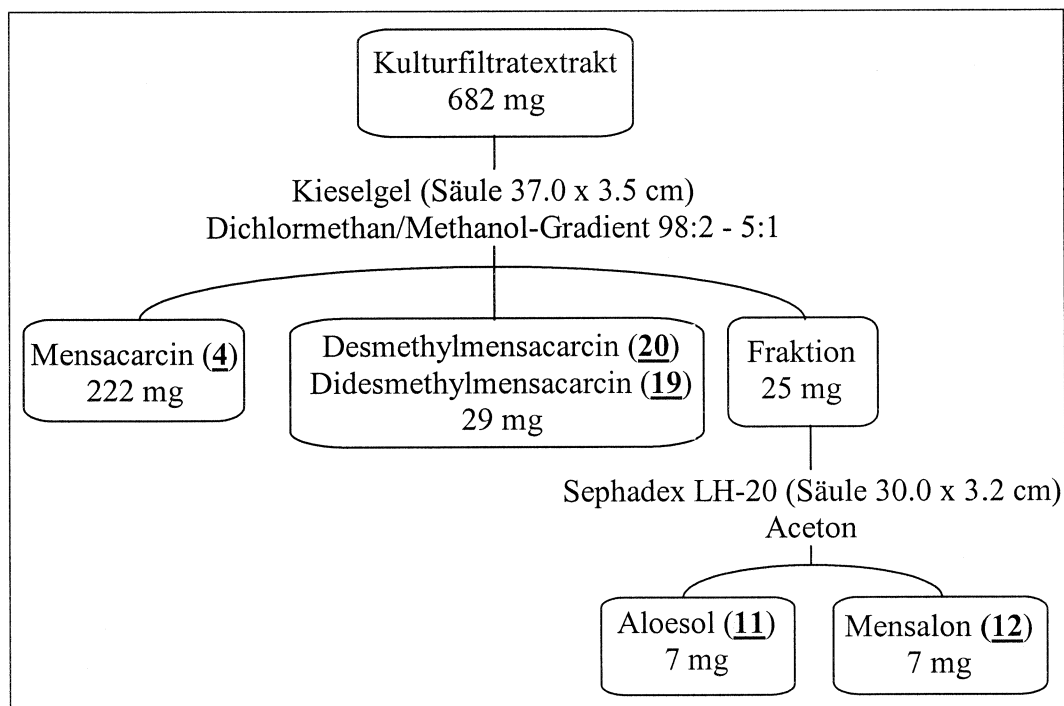
2.2. Aloesol (**11**)

Abbildung 15: Isolierung von Aloesol (**11**) und Mensalon (**12**)

Nach der Zugabe von 2 Vol.-% DMSO zum Nährmedium lässt sich Aloesol (**11**) als neue Verbindung nachweisen. Diese wird aus dem Kulturfiltratextrakt durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und Sephadex LH-20 (Aceton) in einer Ausbeute von 2.3 mg/L isoliert.

Aloesol (**11**) besitzt den R_f -Wert 0.24 (Chloroform/Methanol, 9:1). Die Verbindung ist bei 254 nm UV-aktiv, zeigt bei 366 nm eine intensive blaue Fluoreszenz und eine braune Farbreaktion mit Orcin-Sprühreagenz. Es ist gut in DMSO und Methanol, aber gering in Aceton und Chloroform löslich. Die Hochauflösung des Molpeaks bei $m/z = 234$ im EI-Massenspektrum führt zur Summenformel $C_{13}H_{14}O_4$. Im IR-Spektrum ist bei 1646 cm^{-1} eine Carbonylbande zu sehen. Die Intensitäten der Signale im Protonenspektrum (CD_3OD) lassen auf 12 Protonen schließen, von denen sechs zwei Methylgruppen zugeordnet werden können. Das Signal bei $\delta_H = 4.17$ (Sextett) ist für ein Methinproton charakteristisch und weist auf eine Heteroatom-substituierte Seitenkette hin.

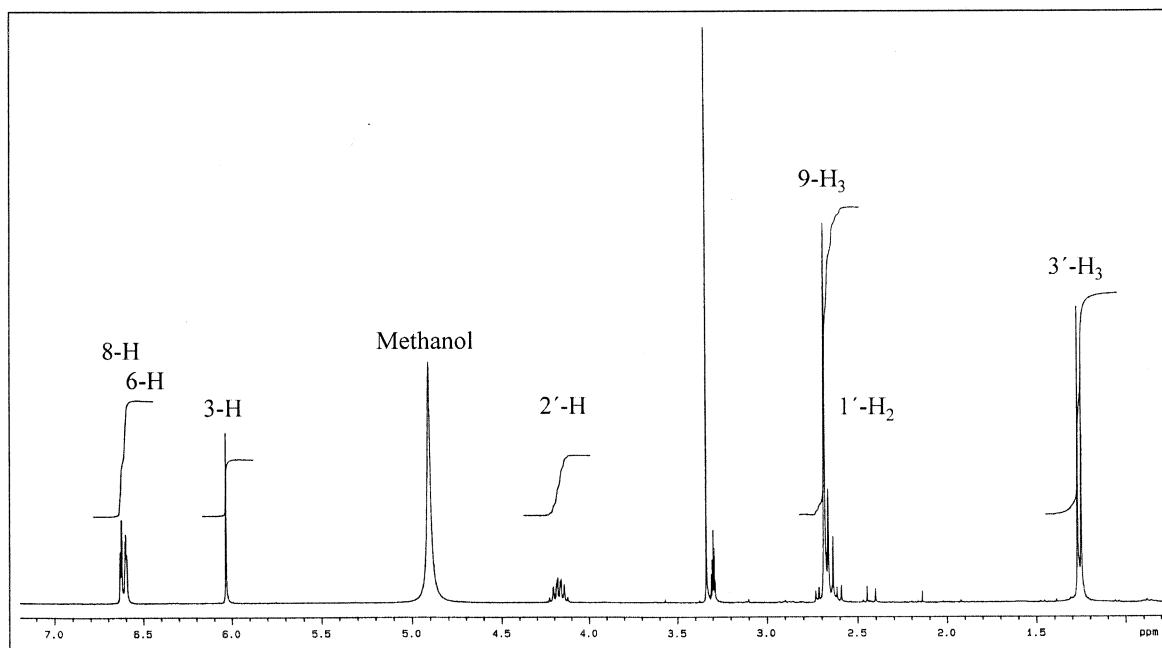
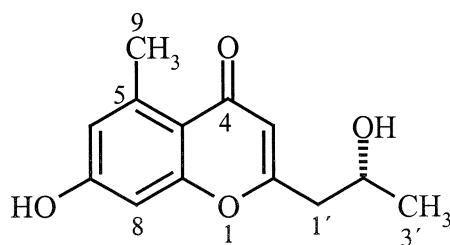


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, CD_3OD) von Aloesol (**11**)

Dem ^{13}C -NMR-Spektrum (CD_3OD) lassen sich 13 Signale entnehmen, die laut APT zwei Methyl-, eine Methylen- und vier Methingruppen sowie sechs quartären Kohlenstoffatomen entsprechen. Das Signal bei $\delta_{\text{C}} = 182$ ist typisch für ein Carbonylkohlenstoffatom. Bei den folgenden acht Signalen im Tieffeldbereich gehören sechs zu einem aromatischen System und zwei zu einer Doppelbindung. Ein Signal bei $\delta_{\text{C}} = 66$ weist auf ein Heteroatom-substituierten Kohlenstoff und die zwei Signale bei $\delta_{\text{C}} = 23$ auf zwei Methylgruppen hin. Aus den Konnektivitäten im ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrum lässt sich eine 2-Hydroxypropyl-Seitenkette ableiten. Berücksichtigt man bei einer Struktursuche in der Naturstoffdatenbank Chapman & Hall⁹ die oben abgeleiteten Fragmente erhält man einen Treffer.



Aloesol (**11**)

Aloesol⁶⁶ (**11**) ist ein in Pflanzen weit verbreiteter Inhaltsstoff. Es handelt sich dabei um das in der Seitenkette reduzierte Aglykon des Aloesins⁷⁵. Eine Isolierung dieser Substanz aus Bakterien ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Im Unterschied zu dem Literaturwert (Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = 38.4^\circ$, Methanol)⁷⁶ ist für die isolierte Verbindung der Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -13^\circ$ (Methanol) bestimmt worden. Es handelt sich daher vermutlich um die enantiomere Verbindung. Abweichungen im Drehwert könnten auf eine nicht enantiomerenreine Bildung von **11** zurückzuführen sein.

2.3. Mensalon (**12**)

Neben Aloesol (**11**) entsteht auch Mensalon (**12**) als neue Verbindung nach Zugabe von 2 Vol.-% DMSO zum Nährmedium. **12** wird durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und Sephadex LH-20 (Aceton) aus dem Kulturfiltratextrakt in einer Ausbeute von 2.0 mg/L isoliert.

Mensalon (**12**) hat einen R_f -Wert von 0.22 (Chloroform/Methanol, 9:1), zeigt bei 254 nm UV-Aktivität und mit Anisaldehyd/ H_2SO_4 eine violette Farbreaktion. Mensalon (**12**) löst sich gut in Methanol und DMSO, und mäßig in Aceton. Eine Hochauflösung des Molpeaks im EI-Massenspektrum bei $m/z = 234$ führt zu der Summenformel $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_4$. Die Banden bei 1689 und 1653 cm^{-1} im IR-Spektrum stammen von α,β -ungesättigten Ketonen. Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV-Spektrum von 273 auf 325 nm beim Wechsel von neutraler zu basischer methanolischer Lösung deutet auf die Anwesenheit einer phenolischen Hydroxylgruppe hin. Die Intensitäten der Signale im Protonenspektrum (d_6 -Aceton) lassen auf zwölf Wasserstoffatome schließen. Ein Quintett bei $\delta_{\text{H}} = 4.28$ kann einem Heteroatom-substituierten Methinproton mit zwei Methylengruppen zugeordnet werden. Die Signale der diastereotopen Methylengruppen finden sich als Doppeldublett-Signal bei $\delta_{\text{H}} = 2.55/2.79$ und $2.90/3.10$. Zwei Signale bei $\delta_{\text{H}} = 2.40$ (Singulett) und 2.45 (Singulett) sind für Methylgruppen charakteristisch.

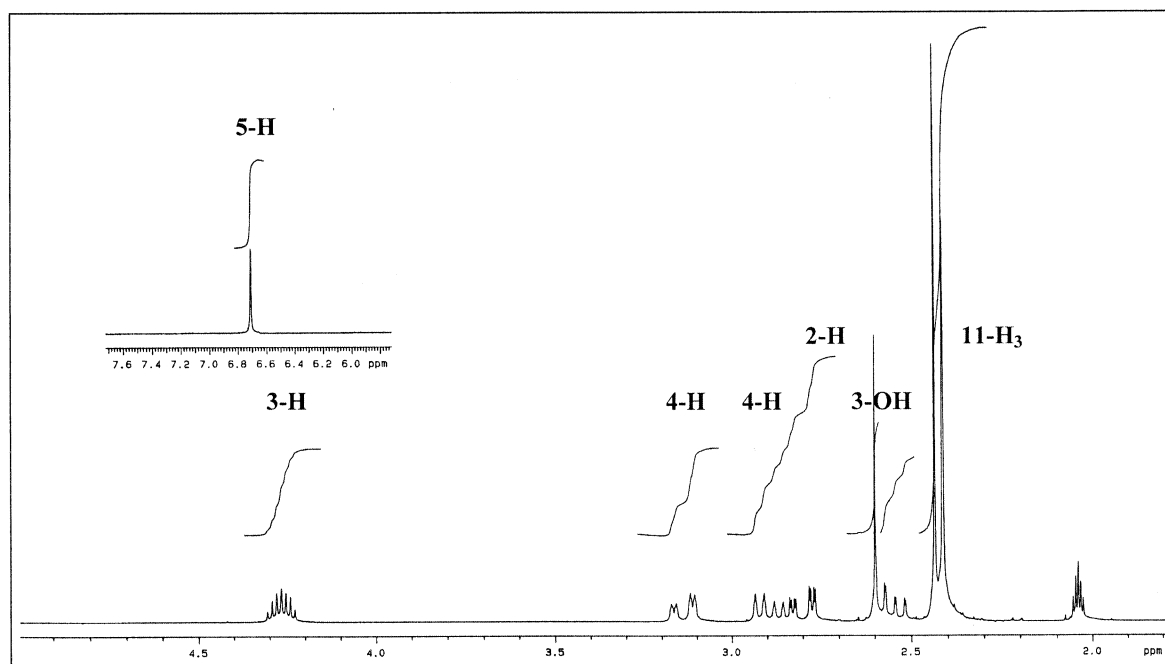
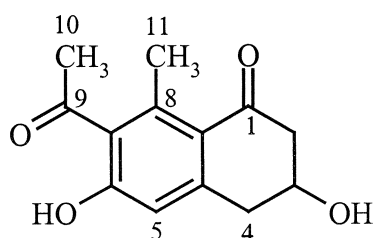


Abbildung 17: ^1H -NMR-Spektrum (300 MHz, Aceton- d_6) von Mensalon (**12**)

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (d_6 -Aceton) findet man 13 Signale, von denen jeweils zwei Signale Methyl-, Methylen- sowie Methingruppen zugeordnet werden können. Von den sieben übrigen Signalen für quartäre Kohlenstoffatome sind die bei $\delta_{\text{C}} = 208$ und 199 für Keton-Carbonyl-Kohlenstoffatome typisch. Es ergibt sich ein tetra-substituierter Phenyrling mit anelliertem Sechsring, also ein Tetralongerüst.

Die hier als Mensalon (**12**) bezeichnete Substanz ist 1998 unter dem Kürzel GTRI-02⁶⁷ veröffentlicht worden. Sie fiel bei einem Screening auf Radikalfänger auf und wird von einer *Micromonospora* sp. produziert.

Der Drehwert $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -10^\circ$ (Methanol) ist für beide Verbindungen identisch, die Stereochemie an C-3 ist bisher nicht geklärt.



Mensalon (**12**)

3. Untersuchungen zur Biosynthese von Mensacarcin (4)

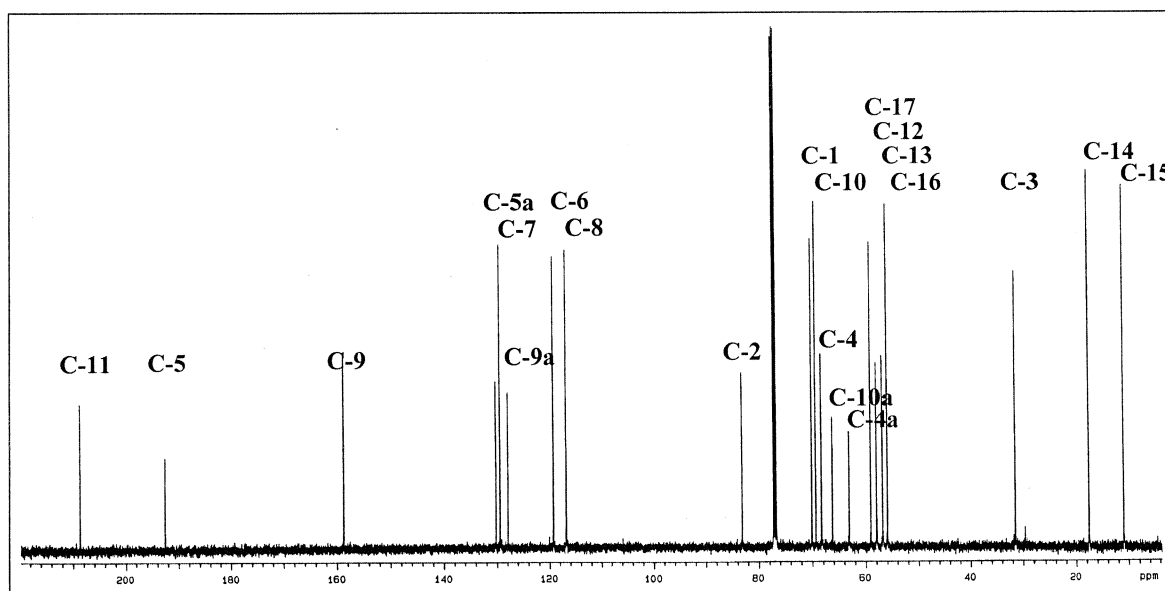
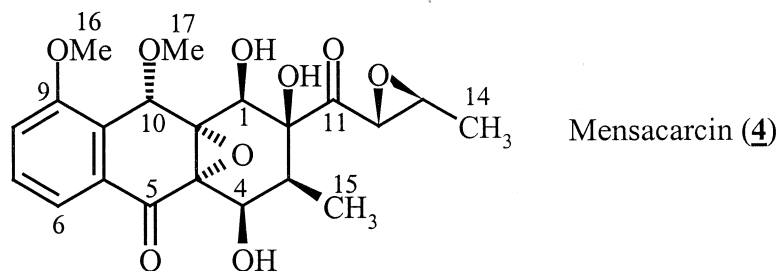


Abbildung 18: ^{13}C -NMR-Spektrum (125.7 MHz, CDCl_3) von Mensacarcin (4)

3.1. Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Diplomarbeit

Die Experimente mit $[1-^{13}\text{C}]$ - und $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat erbrachten folgende Erkenntnisse. Das Grundgerüst von Mensacarcin wird aus neun intakten Acetateinheiten und einem weiteren Kohlenstoffatom C-15 aufgebaut. Letzteres weist nach dem Experiment mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat eine spezifische Anreicherung von 7.0% mit C-16 als Referenzatom auf. Daher stammt C-15 aus einer Acetateinheit und verbleibt nach Decarboxylierung im Grundgerüst. C-13/C-14 ist die Startereinheit. Bei **4** handelt es sich demnach um ein Decaketid, das von einer Typ II-Polyketidsynthese gebildet wird⁷⁷.

3.2. Fütterungsexperimente⁷⁸

3.2.1. Fütterungsexperimente mit L-[Methyl-¹³C]Methionin

S-Adenosylmethionin (SAM) ist das bedeutendste biochemische Methylierungsmittel. Wenn man nach einem Fütterungsexperiment mit L-[Methyl-¹³C]Methionin im Zielmolekül ¹³C-angereicherte Methylgruppen findet, ist dies ein Beweis, dass diese Biosyntheseschritte über S-Adenosylmethionin (SAM) verlaufen.

380 mg (2.6 mmol) L-[Methyl-¹³C]Methionin wurden in 100 ml sterilem Wasser gelöst und von der 20. bis zur 40. Stunde kontinuierlich zur Kulturbrühe des Stammes Gö C4/4 zugefüttert. Die Kultivierung beendete man nach 44 h und isolierte 130 mg ¹³C-markiertes Mensacarcin (**4**).

C-Atom	Mensacarcin (4) δ_C (ppm)	spezifische Einbau	C-Atom	Mensacarcin (4) δ_C (ppm)	spezifische Einbau
C-1	70.0	0	C-9a	127.9	-0.4
C-2	83.2	0.1	C-10	69.3	-0.2
C-3	31.4	0	C-10a	66.2	0.1
C-4	68.0	0	C-11	208.6	0.1
C-4a	63.2	0.1	C-12	58.0	0
C-5	192.7	0.3	C-13	56.9	0
C-5a	130.3	-0.1	C-14	17.6	-0.1
C-6	119.4	0	C-15	11.0	0
C-7	129.5	0	C-16	55.9	49.1
C-8	116.9	-0.5	C-17	59.3	54.3
C-9	158.8	-0.4			

Tabelle 7: ¹³C-NMR-Daten (75.5 MHz, CDCl₃) von Mensacarcin (**4**) nach Einbau von L-[Methyl-¹³C]Methionin

Der Einbau von ¹³C-Kohlenstoff wird mit NMR-spektroskopischen Methoden überprüft. Die Signale der mit den ¹³C-Vorläufern angereicherten Atome haben eine höhere Intensität als die Signale in einem Referenzspektrum. Die Signalintensitäten der markierten Verbindung wurden auf das Kohlenstoffatom C-1 der Referenzverbindung normiert, bei

dem kein Einbau zu erwarten war. Bei der Auswertung der Spektren wurden die Intensitäten und nicht die Integrale der Signale herangezogen. Diese übliche Vereinfachung der Auswertung führt teilweise zu einem geringen negativen spezifischen Einbau. Der spezifische Einbau für die zwei Methoxyl-Kohlenstoffatome C-16 und C-17 ist sehr hoch, womit bewiesen ist, dass S-Adenosylmethionin (SAM) das Methylierungsmittel ist.

3.2.2. Fütterung von [$^{18}\text{O}_2$]Gas

Die Sauerstoffatome in Polyketiden können von den Acetatsauerstoffatomen, aus dem Wasser des Nährmediums oder aus der Luft stammen. Um zu zeigen, welche Sauerstoffatome aus Luft- O_2 hervorgehen, führt man Kultivierungen in einer mit [$^{18}\text{O}_2$]Gas angereicherten Atmosphäre durch.

C-Atom	δ_{C} (ppm)	$\Delta\delta$ (ppb)	$^{16}\text{O}:^{18}\text{O}$ (%)
C-2	83.2	27	58:42
C-4	68.3	21	54:46
C-4a	63.2	25	51:49
C-5	192.7	42	87:13
C-10a	66.3	38	53:47
C-12	58.0	28	53:47
C-13	56.9	34	51:49

Tabelle 8: α -Isotopenshift und Anreicherung nach [$^{18}\text{O}_2$]Fütterung

Für dieses Experiment benutzt man eine geschlossene Apparatur. Da die Kultivierungsbedingungen, insbesondere die Belüftung, sich von den Standardbedingungen unterscheiden, muss mit einer Wachstumskurve der zeitliche Ablauf der Metabolitenproduktion überprüft und der Sauerstoffverbrauch festgestellt werden. Dabei stellte sich heraus, dass unter den gewählten Bedingungen (28 °C, 250 rpm, 5.0 vvm) die Biosynthese von Mensacarcin (**4**) anstelle nach 20 h erst nach 35 h einsetzt. Das Fütterungsexperiment wurde mit vier Erlenmeyerkolben durchgeführt, die je 100 ml Nährmedium enthielten. Nach 35 h spülte man die Apparatur drei Minuten mit Stickstoff,

füllte 750 ml [$^{18}\text{O}_2$]Gas ein und ließ bis zur 45. Stunde fermentieren. Es konnten 16 mg Mensacarin (**4**) isoliert werden.

Im ESI-Massenspektrum für positive Ionen liegt der Peak höchster Masse bei $m/z = 452$ [$M + \text{Na}^+ + 10$], was dem Einbau von fünf Sauerstoffatomen entspricht. Der Einbau von ^{18}O wird mit einem ^{13}C -NMR-Experiment bewiesen, weil das Signal des α -Kohlenstoffatoms bei höherem Feld erscheint. Dieses Phänomen wird als α -Isotopenshift bezeichnet. Man gibt diesen in $\Delta\delta$ (ppb) an. Vergleicht man das Integral des Restsignals in normaler Lage mit dem des verschobenen, erhält man das Einbauverhältnis von ^{18}O zu ^{16}O . Im ^{13}C -NMR-Spektrum (125.5 MHz, CDCl_3) findet man zu den Signalen der Kohlenstoffatome C-2, C-4, C-4a, C-5, C-10a, C-12 und C-13 einen α -Isotopenshift. Damit ist für die Sauerstoffe an diesen Atomen der Einbau aus der Atmosphäre bewiesen.

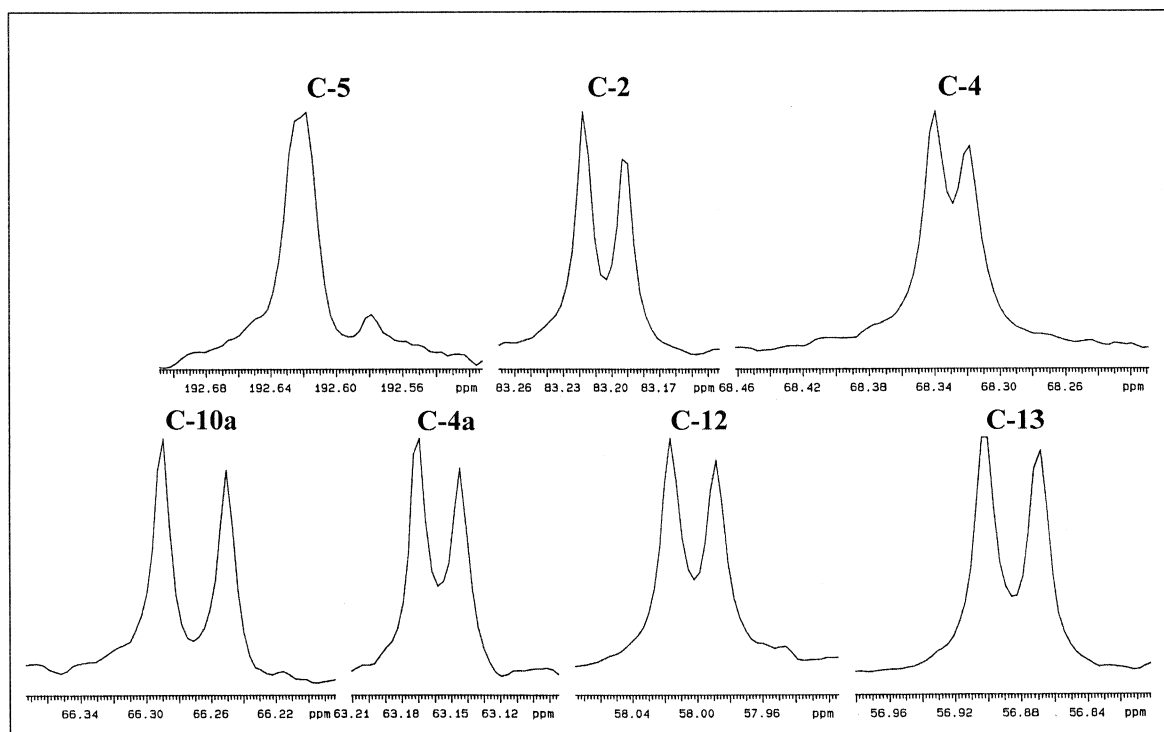


Abbildung 19: Spreizungen der Kohlenstoffsignale und α -Isotopenshifts aus dem ^{13}C -NMR-Spektrum von Mensacarin (**4**), dessen Kohlenstoffatome ^{18}O -Einbau tragen

Es fällt auf, dass der Carbonylkohlenstoff C-5 einen besonders geringen Einbau zeigt. Dies könnte auf einen Austausch mit Wasser in der Kulturbrühe hindeuten.

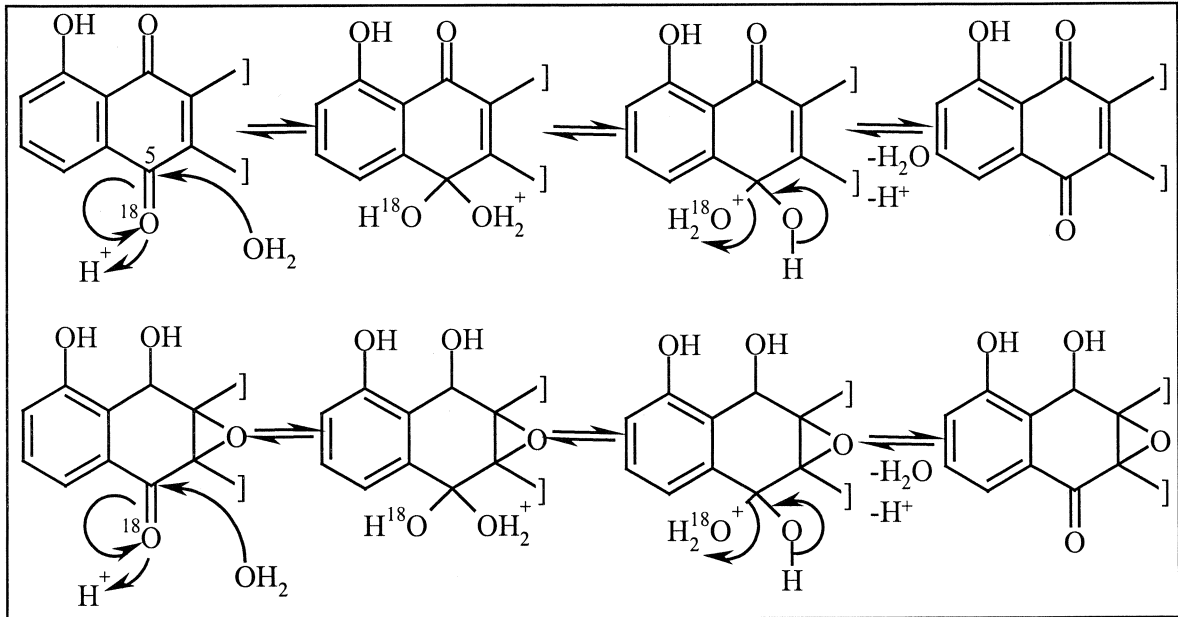


Abbildung 20: Hypothetischer Mechanismus für den Sauerstoffaustausch an dem Kohlenstoffatom C-5 ausgehend vom Chinon- (oben) oder Tetralonvorläufer (unten)

3.2.3. Diskussion der Biogeneseuntersuchungen

Nach den Fütterungsexperimenten mit [1-¹³C]Acetat, [1,2-¹³C₂]Acetat, L-[Methyl-¹³C]Methionin und [¹⁸O₂]Gas ist die Biogenese der meisten Atome des Mensacarcins (**4**) geklärt. Durch ein Fütterungsexperiment mit [1-¹³C, ¹⁸O₂]Acetat könnte die Herkunft der Sauerstoffatome an C-1, C-9, C-10 und C-11 aus Acetat noch bewiesen werden. Da bei Typ II-Polyketiden bekannt ist, dass die Biogenesequelle dieser Sauerstoffatome Acetat ist, wurde auf einen Beweis verzichtet. Die Biogenese des Mensacarcins (**4**) stellt sich demnach wie folgt da:

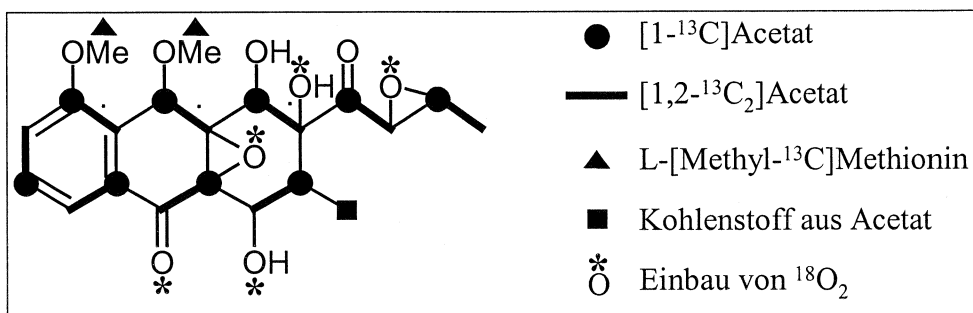


Abbildung 21: Biogenese von Mensacarcin (**4**)

3.3. Versuche zur Isolierung von Vorläufermolekülen

Eine Möglichkeit, Hinweise auf den Verlauf der Biosynthese einer Verbindung zu erhalten, ist die Isolierung von Vorläufermolekülen. Durch ungezielte Mutationen können Mutanten eines Stammes erhalten werden, die z.B. Vorläufermoleküle akkumulieren, weil Enzyme der folgenden Biosyntheseschritte fehlen. Wenn es gelingt, den Biosynthesecluster einer Verbindung zu isolieren und zu sequenzieren, kann man durch Manipulation des Genoms gezielt Enzyme ausschalten und so die Akkumulation von Vorläufermolekülen herbeiführen. Im Folgenden werden einige nicht-genetische Experimente beschrieben, die zur Isolierung von Vorläufermolekülen führten oder hätten führen können.

3.3.1. Isolierung von Mensacarcin (**4**) und weiteren Metaboliten (aus 10 L-Fermenter)

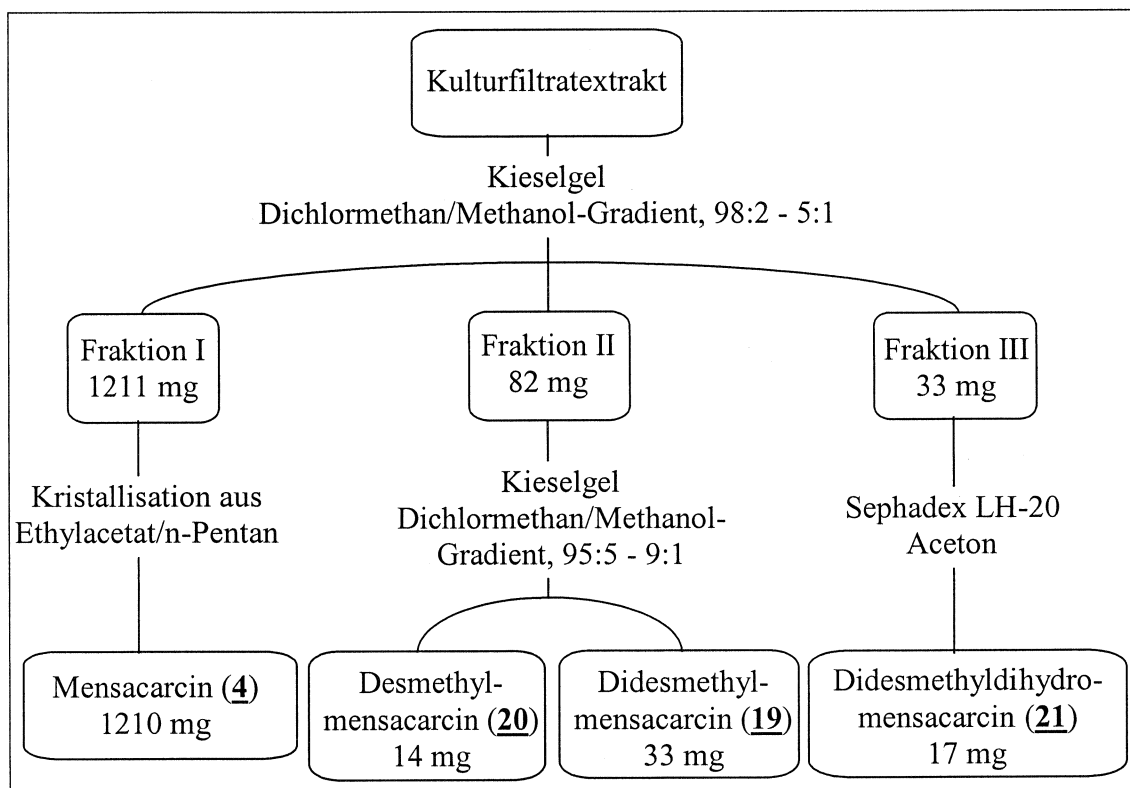
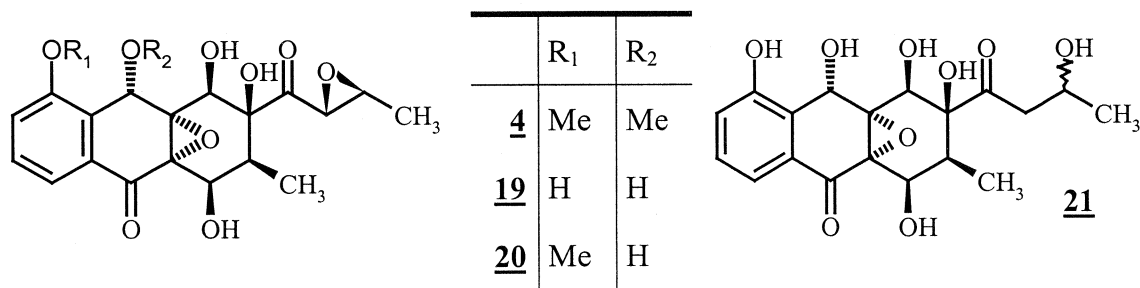


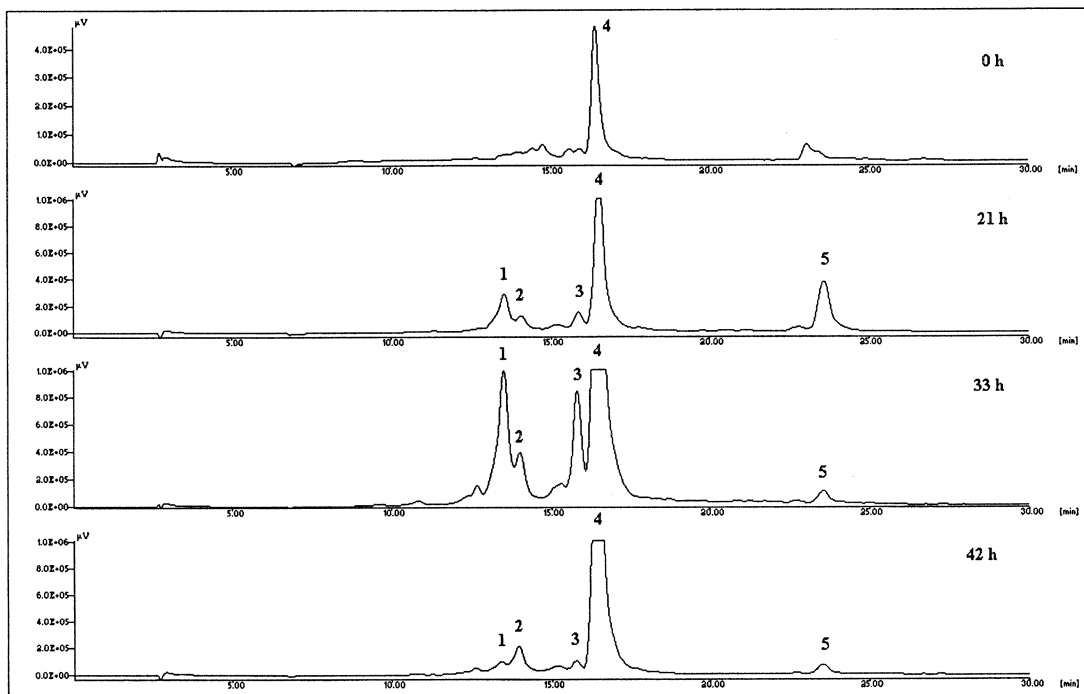
Abbildung 22: Isolierung von Mensacarcin (**4**), Desmethyl- (**20**), Didesmethyl- (**19**) und Didesmethyldihydromensacarcin (**21**)



Nach einer Kultivierung von Gö C4/4 (**4**) im 10 L-Maßstab im Fermenter Biostat E unter Standardbedingungen gelang die Isolierung weiterer Metabolite aus der Mensacarcinreihe. Bei Didesmethylmensacarcin (**19**) sind die Sauerstoffatome an C-9 und C-10, bei Desmethylmensacarcin (**20**) nur an C-10 nicht methyliert. Bei Didesmethyldihydro-mensacarcin (**21**) sind beide Sauerstoffatome nicht methyliert, und in der Seitenkette befindet sich anstelle der α -Epoxy- ein β -Hydroxyketon.

3.3.2. Untersuchung der Biosynthese mit der HPLC-UV-CD-Kopplung

Um festzustellen, ob im Verlauf einer Fermentation mit Stamm Gö C4/4 Vorläufermoleküle gebildet werden, wurden fortlaufend 100 ml-Proben aus einer Fermentation (Fermenter Braun Biostat B) entnommen und mit der HPLC-UV-CD-Kopplung untersucht. Dabei zeigen die Peaks für Didesmethyl- (**19**, Peak 1), Desmethylmensacarcin (**20**, Peak 2), sowie zwei weitere Peaks 3 und 5 einen Verlauf, wie sie für Biosynthesevorläufermoleküle zu erwarten sind: Die Intensität nimmt zunächst kontinuierlich zu und nach Durchlaufen eines Maximums wieder ab. Die maximale Intensität wird bei Peak 5 nach 21 h, und den anderen Peaks nach 33 h erreicht.



Acetonitril/Wasser-Gradient 15:75 – 100:0 in 30 min, $\lambda = 280$ nm

Abbildung 23: Chromatogramme von Proben einer Kultivierung von Stamm Gö C4/4 nach 0, 21, 33 und 42 h

Die Konzentration des Mensacarcins (**4**) (Peaks 4) nimmt nach 21 h bis zum Abbruch der Fermentation nach 42 h kontinuierlich zu. Aufgrund der geringen Stoffmenge gelang es nicht, die Substanzen zu isolieren, die den Peaks 3 und 5 zuzuordnen sind.

3.3.3. Abbruch einer Kultivierung zu Beginn der Biosynthese

Eine Kultivierung von Stamm Gö C4/4 im 3 L-Maßstab im Fermenter Braun Biostat B wurde kurz nach Beginn der Biosynthese nach 22 h abgebrochen und der Mycel- und Kulturfiltratextrakt im chemischen Screening untersucht und durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Es konnten keine neuen Biosynthesevorläufer nachgewiesen werden.

3.3.4. Zufütterung von Enzyminhibitoren

Durch Zufütterung von P_{450} -Monooxygenaseinhibitoren zu Beginn der Biosynthese sollten weniger oxygenierte Vorläufermoleküle zugänglich sein. Diese Versuche sind unter III.1.5.

genauer beschrieben. Eine Akkumulation von Vorläufermolekülen konnte nicht erreicht werden.

3.4. Diskussion der Ergebnisse

Die Fütterungsversuche mit $[1-^{13}\text{C}]$ - und $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat haben gezeigt, dass Mensacarcin (**4**) ein Decaketid ist, das von einem Multienzymkomplex einer Typ II-Polyketidsynthase gebildet wird⁷⁷. Als erstes nachweisbares Produkt tritt Didesmethylmensacarcin (**19**) auf. Bei den O-Methylierungen durch S-Adenosylmethionin (SAM) handelt es sich vermutlich um die letzten beiden Biosyntheseschritte.

Je nach Regioselektivität der Cyclisierung und dem Auftreten einer Ketoreduktion an C-9 der Polyketidkette am Multienzymkomplex (die Nummerierung der Kohlenstoffatome beginnt an der Thioesterbindung am Multienzymkomplex), unterteilt man die Typ II-Decaketide in Gruppen: Tetracenomycine⁷⁹ (9,14-Decaketide), Aureolsäuren⁸⁰ (7,12-Decaketide), Angucycline⁸¹ (7,9,12-Decaketide) und Anthracycline⁸² (7,9,12-Decaketide). In der frühen Biosynthese wird an einem Multienzymkomplex über iterative Schritte die Polyketidkette aufgebaut, regioselektiv cyclisiert und aromatisiert. Ein stabiles Zwischenprodukt wird dann vom Multienzymkomplex abgespalten und in den Schritten der späten Biosynthese zu den Sekundärmetaboliten modifiziert. Die Schritte der späten Biosynthese bestehen aus Reduktionen, Oxidationen, Methylierungen, Glykosylierungen und Umlagerungen. Bei Mensacarcin (**4**) handelt es sich um ein 7,9,12-Decaketid mit einer neuen Grundstruktur, die keine der oben genannten Gruppen zugeordnet werden kann. Analog zu den Anthracyclinen wird Mensacarcin (**4**) vermutlich von einer Typ II-Polyketidsynthase gebildet, wobei die frühe Biosynthese über ein Anthrachinonderivat (**17**) als Zwischenprodukt verläuft. Die Schritte der späten Biosynthese unterscheiden sich jedoch erheblich von der Biosynthese der Anthracycline.

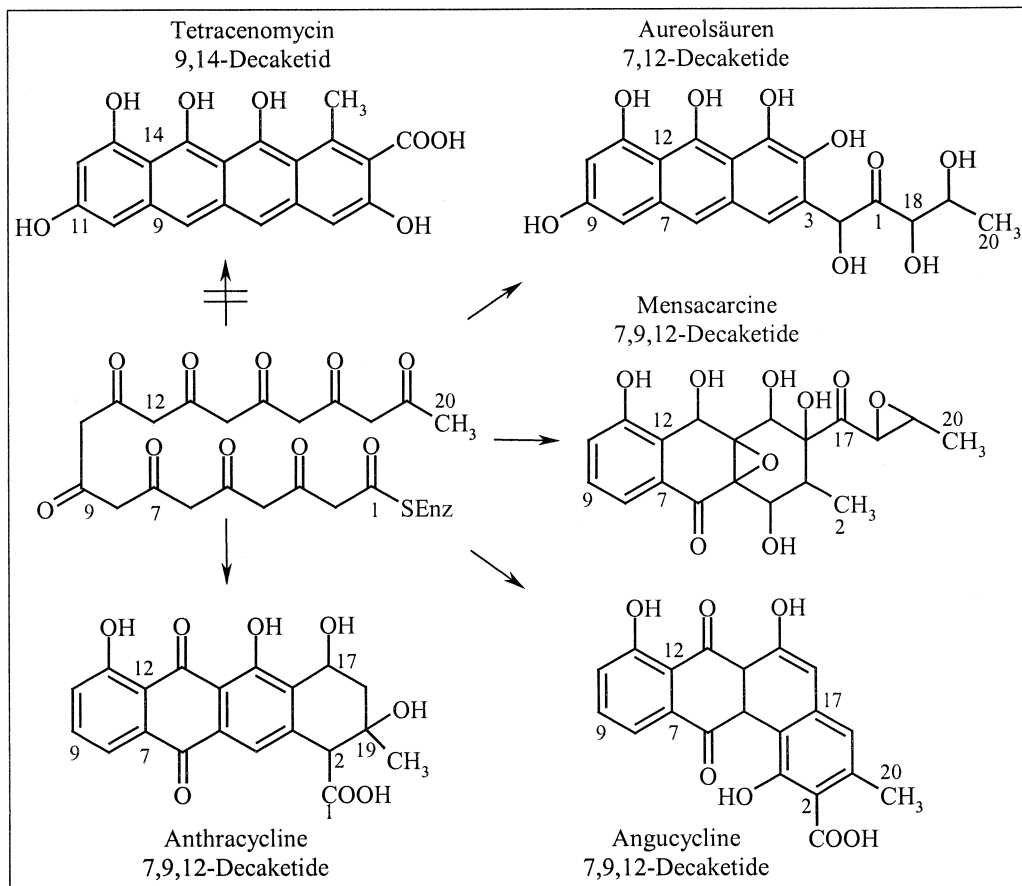
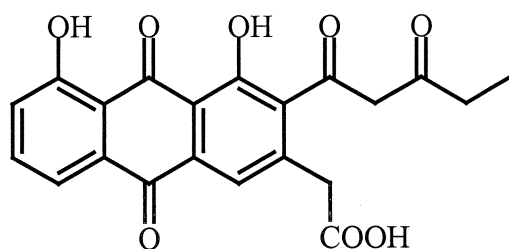


Abbildung 24: Unterschiedliche Faltungsmodi von Typ II-Decaketiden

Die Biosynthese von Doxorubicin (**2**) ist gut untersucht und dient als Vorlage für die Biosyntheseüberlegungen. Am Multienzymkomplex einer Typ II-Polyketidsynthase wird aus einer Acetyl-Coenzym A-Startereinheit und neun Malonyl-Coenzym A-Verlängerungseinheiten⁸³ die Decaketidkette aufgebaut, an C-9 regioselektiv reduziert, zwischen den Kohlenstoffatomen C-7/C-12, C-5/C-14 und C-3/C-16 cyclisiert sowie durch Dehydrierung aromatisiert. Nach Oxidation an C-6 wird ein Anthrachinonderivat (**17**) freigesetzt. Der Multienzymkomplex besteht vermutlich aus den Enzymen holo-Acylcarrierprotein (holo-ACP), zwei Ketosynthasen (KS_{α} , KS_{β}), einer Ketoreduktase (KR1(9)), einer Aromatase (ARO1) und einer Cyclase (CYC2/3). Die minimal PKS, bestehend aus holo-ACP, KS_{α} und KS_{β} , bildet durch iterative Nutzung der Komponenten die Polyketidkette und determiniert die Anzahl der Ketideinheiten. Zusammen mit der Ketoreduktase KR1(9) erfolgt nach der Reduktion an C-9 regioselektiv die erste Cyclisierung zwischen C-7/C-12. Dieses wird durch die Aromatase (ARO1) unterstützt, die auch die Aromatisierung dieses und des zweiten Ringes bewirkt. Unter der Einwirkung

der Cyclase CYC2/3 werden die Ringe zwei und drei gebildet. Die Oxidation an C-6 wird durch eine Oxidase (OOX(6)) katalysiert. Das stabile Anthrachinonderivat (**17**) wird vom Multienzymkomplex abgespalten. Aklanonsäure⁸⁴ (**18**), das Homologe Intermediat in der Doxorubicin (**2**) Biosynthese, konnte isoliert⁸⁵ und durch Fütterungsversuche mit markierten Verbindungen als Vorläufermolekül zweifelsfrei identifiziert werden⁸⁶.

Aklanonsäure (**18**)

Die späte Biosynthese von Doxorubicin (**2**) wird durch eine Methylierung der Säuregruppe und die Ausbildung des vierten Ringes eingeleitet. In der Biosynthese von Mensacarcin (**4**) wird die tricyclische Grundstruktur beibehalten, die Säuregruppierung abgespalten und das Anthrachinonderivat (**17**) durch Oxidoreduktasen sowie Oxygenasen modifiziert und durch SAM methyliert. Als Oxygenasen kommen sowohl Monooxygenasen⁸⁷ als auch Dioxygenasen⁸⁸ in Frage. Da aus dieser Phase der Biosynthese keine Vorläufermoleküle akkumuliert oder isoliert werden konnten, sind die Reihenfolge der enzymatischen Schritte und die beteiligten Enzyme unbekannt. Durch den Einsatz von sechs Reduktionsäquivalenten und den Einbau von vier Sauerstoffatomen kommt es zur Ausbildung des Didesmethylenmensacarcins (**19**) das sukzessive durch O-Methylierung zu Mensacarcin (**4**) modifiziert wird.

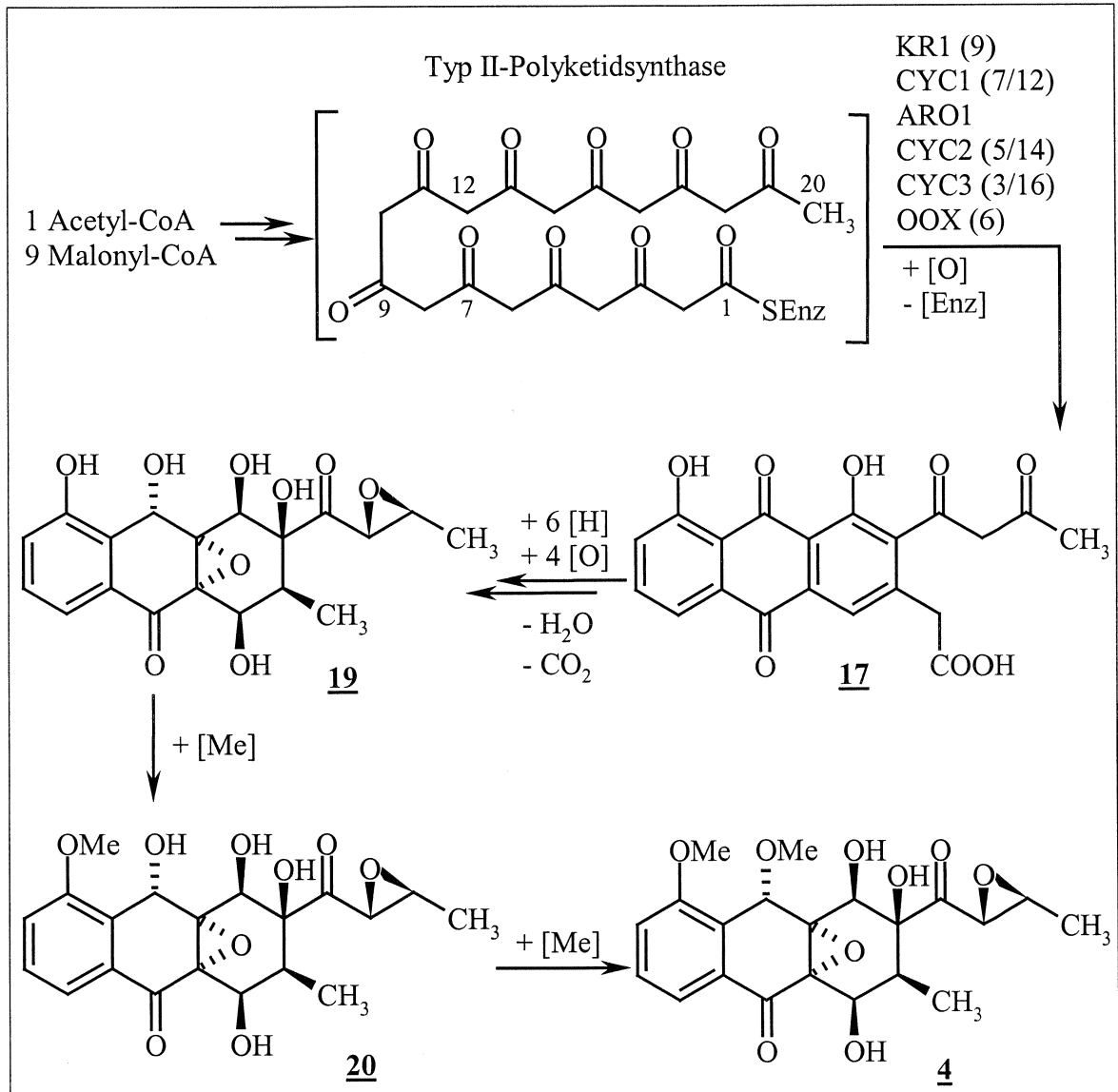


Abbildung 25: Postulierter Biosyntheseweg für Mensacarcin (**4**)

3.5. Überlegungen zur Biosynthese von Aloesol (**11**) und Mensalon (**12**)

Bei Aloesol (**11**) und Mensalon (**12**) handelt es sich vermutlich um Heptaketide. Für beide Verbindungen sind zwei verschiedene Faltungsmodi denkbar.

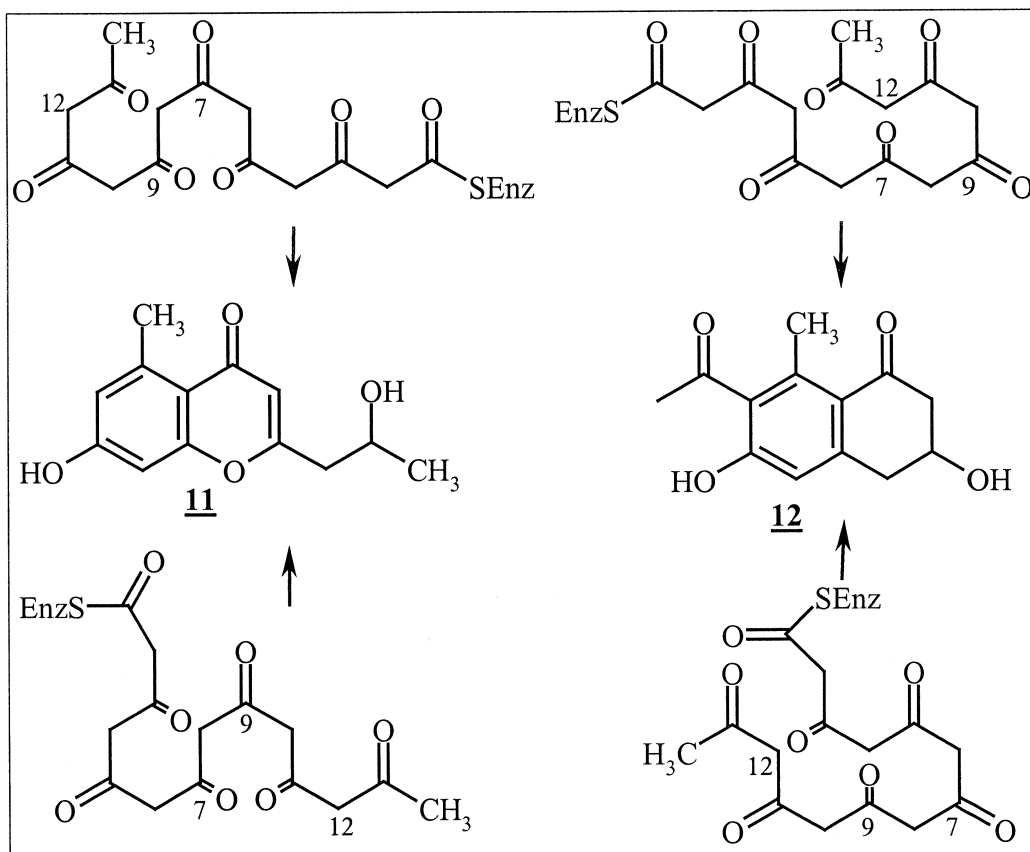
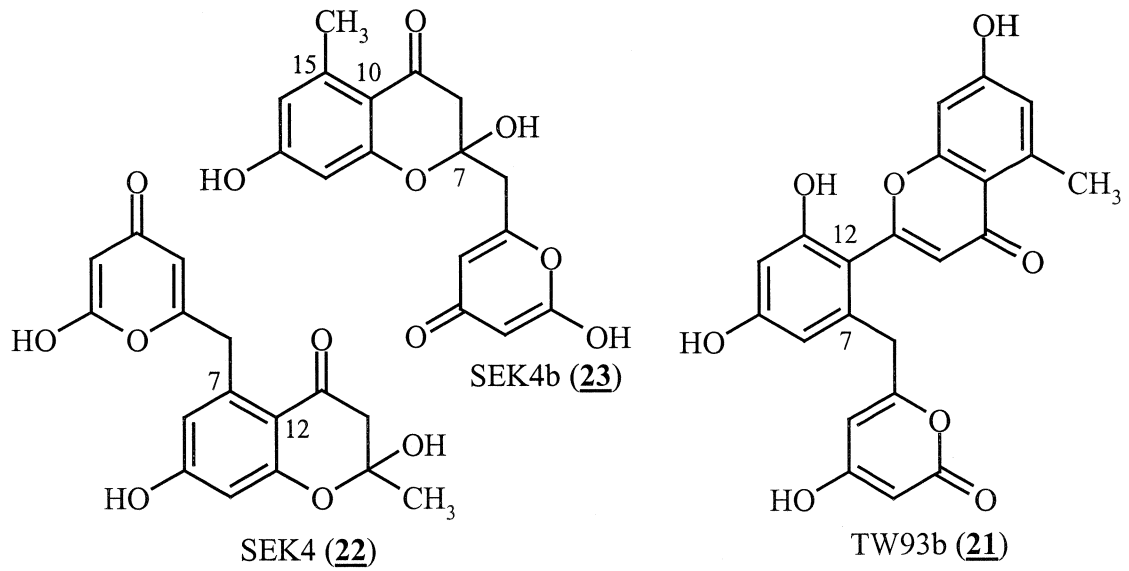


Abbildung 26: Hypothesen zur Biosynthese von Aloesol (**11**) und Mensalon (**12**)

Beide Verbindungen enthalten typische Strukturelemente spontaner Cyclisierungen von Polyketidketten. Die Chromonstruktur findet sich in den PKS-Shuntprodukten TW93b (**22**) und als 3-Hydroxy-Chromanon in SEK4 (**23**) und SEK4b (**24**). Vermutlich handelt es sich bei den Verbindungen um Shuntprodukte aus der Biosynthese von Mensacarcin (**4**), wobei der Aufbau der Polyketidkette nach dem siebten Verlängerungsschritt abgebrochen wird und die Heptaketidketten spontan cyclisieren. Da beide Verbindungen einen Drehwert aufweisen, ist eine enzymatische Umsetzung wahrscheinlich. Dies kann jedoch nach spontaner Cyclisierung durch Katalyse einer Oxidoreduktase geschehen sein und ist kein Beweis für eine Bildung an einer PKS. Eine Beteiligung der Mensacarcin-

Polyketidsynthese ist nur im Fall von Mensalon (**12**) denkbar, wo eine Cyclisierung zwischen den Kohlenstoffatomen C-7/C-12 stattfindet.



IV. Chemische Derivatisierung von Mensacarcin (4)

1. Mensacarcindiacetat (25)

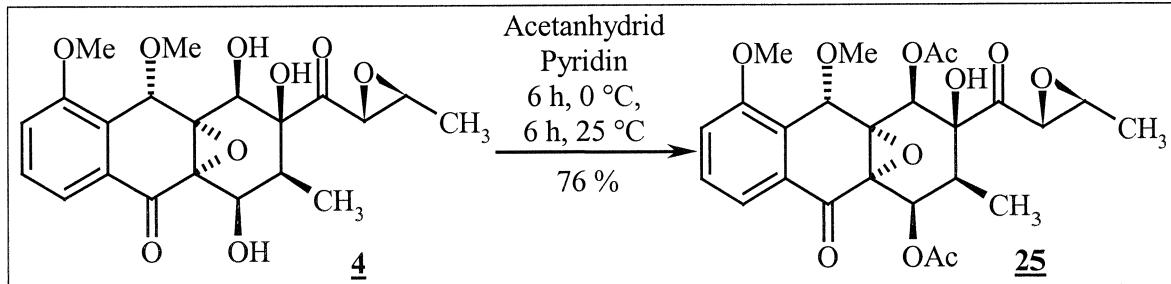


Abbildung 27: Acetylierung von Mensacarcin (4)

Mensacarcin (4) wurde in Pyridin mit Acetanhydrid in einer Ausbeute von 96% acetyliert (Abbildung 27). Eine Hochauflösung des Peaks höchster Masse im EI-Massenspektrum bei $m/z = 504$ ergibt die Summenformel $C_{25}H_{28}O_{11}$, was dem Einbau von zwei Acetylgruppen entspricht. Die Estercarbonyle weisen im IR-Spektrum eine intensive Absorptionsbande bei 1748 cm^{-1} und im ^{13}C -NMR-Spektrum (CDCl_3 , 75.5 MHz) Resonanzen bei $\delta_{\text{C}} = 170$ und 169 auf. Im Protonenspektrum (CDCl_3 , 300 MHz) liegen die Signale der Acetyl-Methylgruppen bei $\delta_{\text{H}} = 2.05$ und 2.17. Die Protonen an C-1 und C-4 zeigen einen starken Tieffeldshift, was die erwartete regioselektive Acetylierung der sekundären Hydroxylgruppen an C-1 und C-4 bestätigt.

Mensacarcinsäure (26)

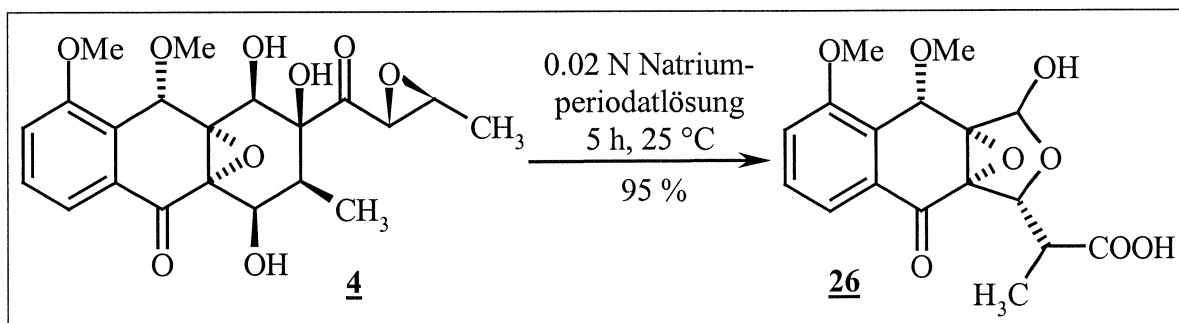


Abbildung 28: Darstellung von Mensacarcinsäure (26)

Durch Umsetzung von Mensacarcin (4) mit 0.02 N Natriummetaperiodat-Lösung bei Raumtemperatur erhielt man Mensacarcinsäure⁸⁹ (26) in 95% Ausbeute (Abbildung 28).

Eine Hochauflösung des Peaks höchster Masse im EI-Massenspektrum bei $m/z = 350$ ergibt die Summenformel $C_{17}H_{18}O_8$. Im IR-Spektrum erkennt man zwei Carbonyl-Absorptionsbanden bei 1736 cm^{-1} für eine Carbonsäure und bei 1693 für ein aromatisches Keton. Im Protonenspektrum (CD_3OD , 300 MHz) sind die Signalgruppen für den 1,2,3-trisubstituierten Aromaten bei $\delta_H = 7.31, 7.46$ sowie 7.52 (jeweils Doppeldublett) und die Methoxylgruppen bei $\delta_H = 3.94$ und 3.68 (jeweils Singuldt) zu erkennen. Im Hochfeldbereich befindet sich ein Methylsignal bei $\delta_H = 1.32$ (Singulett) und das Quintett eines Methinprotons bei $\delta_H = 2.74$. Das ^{13}C -NMR-Spektrum (CD_3OD , 75.5 MHz) zeigt in Übereinstimmung mit der Hochauflösung 17 Signale, denen laut APT eine Methyl- und zwei Methoxylgruppen, neun Methingruppen und sieben quartären Kohlenstoffatomen zuzuordnen sind. Darunter sind zwei Carbonylsignale bei $\delta_C = 192$ und 180 und sechs aromatische Signale des trisubstituierten Methoxyphenolfragments. Aus den COSY- und HMBC-Korrelationen erhält man zwei Fragmente, die sich zu Mensacarcinsäure (**26**) verknüpfen lassen.

V. Zur biologischen Aktivität der Naturstoffe und Naturstoffderivate

1. Antibiotische Aktivität von Mensacarcin (4)

Bei Plattendiffusionstests zeigte Mensacarcin (4) bei einer Konzentration von 1 mg/ml keine biologische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus*, *Mucor hiemalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Candida albicans*.

2. Antitumoraktivität der Naturstoffe und Naturstoffderivate

Tests auf Antitumoraktivität wurden von Prof. Beil an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) gemäß den NCI-Richtlinien⁹⁰ an den Tumorzelllinien HMO2 (Magenadenocarcinom), MCF7 (Mammacarcinom), Kato III (Koloncarcinom), HEP G2 (Lebercarcinom) und Jurkat (T-Zell-Leukämie) durchgeführt.

Substanz	GI ₅₀ (µmol/L)	TGI (µmol/L)	LC ₅₀ (µmol/L)
Aloesol (11)	5.8	>10	>10
Doxorubicin (2)	<0.1	0.14	0.4
Desmethylnensacarcin (20)	<0.1	0.2	0.65
Didesmethyldihydromensacarcin (21)	0.24	1.0	>10
Didesmethylnensacarcin (19)	0.14	0.38	1.1
Mensacarcin (4)	0.17	0.64	0.90
Mensacarcindiacetat (25)	0.8	3.8	10.0
Mensacarcinsäure (26)	9.6	>10	>10

Tabelle 9: Inhibitorische Wirkstärke ausgewählter Substanzen auf die Tumorzelllinie HMO2 (Magencarcinom)

Aloesol (11) ist schwach aktiv, Mensalon (12) zeigt keine Wirkung. Die Substanzen aus der Mensacarcinreihe hemmen das Wachstum aller Zelllinien im mikromolaren Bereich. Die inhibitorische Wirkstärke der Substanzen entspricht der von Doxorubicin (2) und liegt deutlich über der von 5-Fluoruracil. Während die Desmethylderivate eine ähnliche Aktivität wie Mensacarcin (4) aufweisen, ist die Wirkstärke des Derivates (21) mit der β -

Hydroxyketon-Struktur um den Faktor zehn geringer. Auch das acetylierte Derivat zeigt eine deutlich reduzierte Wirkung. Die Mensacarcinsäure (**26**) ist in den Tests unwirksam.

Substanz	GI ₅₀ (µmol/L)	TGI (µmol/L)	LC ₅₀ (µmol/L)
Aloesol (11)	9.8	>10	>10
Doxorubicin (2)	0.25	1.0	>50
Desmethylnensacarcin (20)	0.26	0.98	>10
Didesmethyldihydromensacarcin (21)	0.95	9.8	>10
Didesmethylnensacarcin (19)	0.89	5.1	>10
Mensacarcin (4)	0.72	1.1	>10
Mensacarcindiacetat (25)	0.55	2.2	>10
Mensacarcinsäure (26)	>10	>10	>10

Tabelle 10: Inhibitorische Wirkstärke ausgewählter Substanzen auf die Tumorzelllinie Hep G2 (Lebercarcinom)

Aufgrund der guten inhibitorischen Wirkstärke von Mensacarcin (**4**) wurde am National Cancer Institut (NCI), Bethesda, Maryland, weitere Tests an 60 humanen Tumorzelllinien durchgeführt. Die Wirkstärke der Substanz wurde in allen Tests bestätigt (Tabelle 11, Tabelle 12, Tabelle 13). Die ASTA Medica AG testete Mensacarcin (**4**) an drei ausgewählten Zelllinien im Hohlfaser-Assay und stellte an der Zelllinie L1210 mit 39% Hemmung des Wachstums bei 4 x i.p. Gabe und 10 mg/kg Dosierung den besten Wert fest. Die orientierende toxikologische Prüfung ergab einen LD₅₀-Wert von ca. 100 mg/kg an der Maus. Die Freiburger Oncotest GmbH testete Mensacarcin (**4**) *in vivo* an Tumorzelllinien in Mäusen. Bei einer Dosis von 30 mg/kg/Tag i.p. wurde mit einer Tumorreduktion des Tumors MAXF 401 von 39.5% der Kontrolle das beste Ergebnis erzielt. Dieser stellte mit einer Körpergewichtsabnahme von 15% die maximal tolerable Dosis dar.

Substanz	GI ₅₀ (µmol/L)	TGI (µmol/L)	LC ₅₀ (µmol/L)
Doxorubicin (2)	0.03	1.70	23
Mensacarcin (4)	0.14	0.53	>100

Tabelle 11: Inhibitorische Wirkstärke auf die humane Tumorzelllinie CCRF-CEM (Leukemia) im Vergleich mit Doxorubicin (**2**)

Substanz	GI ₅₀ (µmol/L)	TGI (µmol/L)	LC ₅₀ (µmol/L)
Doxorubicin (2)	0.64	1.00	24
Mensacarcin (4)	1.73	7.70	>100

Tabelle 12: Inhibitorische Wirkstärke auf die humane Tumorzelllinie A549/ATCC (Non-Small Cell Lung Cancer) im Vergleich mit Doxorubicin (2)

Substanz	GI ₅₀ (µmol/L)	TGI (µmol/L)	LC ₅₀ (µmol/L)
Doxorubicin (2)	0.12	1.94	14
Mensacarcin (4)	0.21	1.32	35

Tabelle 13: Mittlere inhibitorische Wirkstärke auf 60 humane Tumorzelllinien im Vergleich mit Doxorubicin (2)

VI. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. CD-Screening

- 1) Im CD-Screening wurden 192 Extrakte von 32 Stämmen untersucht. Zwei Stämme wurden intensiv bearbeitet und die CD-aktiven Komponenten isoliert. Es wurde ein Screening-Protokoll ausgearbeitet, das die effiziente Anwendung des CD-Screenings auf eine große Zahl von Extrakten erlaubt.
- 2) Aus dem Stamm K21/5 wurde die CD-aktive Komponente isoliert und durch spektroskopische Methoden als Streptazolin (**6**) identifiziert.
- 3) Aus dem Stamm K23/4 wurde als CD-aktive Komponente das Elasin (**7**) isoliert und anhand der Spektren identifiziert.
- 4) Für die HPLC-CD-UV-Kopplung wurde ein Screening-Protokoll ausgearbeitet, das die effiziente Anwendung auf eine große Zahl von Extrakten erlaubt.
- 5) Mit der HPLC-CD-UV-Kopplung konnte für den Stamm K22/8 Streptazolin (**6**) als CD-aktive Komponente direkt durch Untersuchung des Extrakts ohne vorangehende Isolierung nachgewiesen werden.
- 6) Die Ergebnisse aus dem CD-Screening wurden zusammengestellt und bewertet.

2. Weiterführende Untersuchungen am Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4

- 1) Eine Variation der Nährmedien unter Einbeziehung von synthetischen Nährmedien führte zu der Produktion eines neuen Sekundärmetaboliten. Dieser konnte isoliert und durch spektroskopische Methoden zweifelsfrei in der Struktur aufgeklärt werden. Es handelt sich um Rishirilid A (**10**).
- 2) Durch Zusatz von 2% DMSO zum Nährmedium nach der Autoklavierung kam es zur Bildung zwei neuer Verbindungen. Diese konnten isoliert und die Strukturen aufgeklärt werden. Es handelt sich um die Verbindungen Aloesol (**11**) und Mensalon (**12**).
- 3) Durch Fütterung von L-[Methyl-¹³C]Methionin und [¹⁸O₂]Gas konnte die Biogenese von Mensacarcin (**4**) vervollständigt werden.
- 4) Aus Kultivierungen im 10 L-Maßstab konnten weitere Sekundärmetabolite der Mensacarcinreihe isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden. Es handelt sich um Desmethyl- (**19**), Didesmethyl- (**19**) und Didesmethyldihydromensacarcin (**21**).

- 5) Die Biosynthese von Mensacarcin (**4**) wird diskutiert und anhand der Ergebnisse aus den Untersuchungen und der Biosynthese ähnlicher Metabolite ein möglicher Biosyntheseweg vorgeschlagen.

3. Ergebnisse der chemischen Derivatisierung von Mensacarcin (**4**)

- 1) Derivatisierung von Mensacarcin (**4**) mit Acetanhydrid in Pyridin führte zur Bildung von Mensacarcindiacetat (**25**).
- 2) Umsetzung von Mensacarcin (**4**) mit 0.02 N Natriummetaperiodat-Lösung führte zur Bildung von Mensacarcinsäure (**26**).

4. Ergebnisse aus den Untersuchungen der biologischen Aktivität der isolierten Naturstoffe

- 1) Mensacarcin (**4**) ist antibakteriell nicht wirksam.
- 2) Bei *in vitro* Untersuchungen an Tumorzelllinien nach den Richtlinien des NCI zeigen Desmethyl- (**20**), Didesmethyl- (**19**) und Mensacarcin (**4**) ähnliche cytostatische und cytotoxische Aktivitäten im mikromolaren Bereich. Die Wirkstärke liegt in der Größenordnung des Doxorubicins (**2**). Mensacarcindiacetat (**25**) und Didesmethyl-dihydromensacarcin (**21**) sind um den Faktor zehn schwächer wirksam, Mensacarcinsäure (**26**), Aloesol (**11**) und Mensalon (**12**) zeigen in den Tests keine Antitumoraktivität.
- 3) Mensacarcin (**4**) zeigt bei Untersuchungen am NCI gegen 60 Tumorzelllinien *in vitro* eine mittlere cytotoxische Aktivität von 0.21 $\mu\text{mol/L}$ und eine mittlere cytostatische Aktivität von 1.32 $\mu\text{mol/L}$.
- 4) Bei *in vivo* Untersuchungen an Mäusen stellte sich eine Gabe von 30 mg/kg/Tag i.p. als maximal tolerable Dosis von Mensacarcin (**4**) heraus.

VII. Ausblick

1. CD-Screening

Das HPLC-CD-UV-Screening kann an einer großen Anzahl von Stämmen durchgeführt werden. Um die Treffer besser evaluieren zu können und mehrmalige Isolierung der gleichen Substanz zu verhindern, ist der Aufbau einer CD- und UV-Datenbank sinnvoll. Ein erstrebenswertes Ziel wäre die Kopplung der HPLC-CD-UV-Anlage mit anderen spektroskopischen Geräten wie MS- und NMR-Spektroskopie. Eine solche Kombination würde es bei einem einfachen Screening ermöglichen, einen Überblick über das Biosynthesepotential eines Stammes zu erhalten und detaillierte Informationen zu den Metaboliten liefern, so dass begabte Produzenten und neue Sekundärstoffe schneller als heute entdeckt werden können.

2. Weiterführende Untersuchungen am Mensacarcin-Produzenten

Die Bedingungen unter denen der Stamm Gö C4/4 Rishirilid A (**10**) produziert müssen ausgearbeitet werden. Sobald eine reproduzierbare und stabile Produktion gewährleistet ist, kann die Biogenese und Biosynthese untersucht werden.

Nach der Aufklärung der Biogenese von Mensacarcin (**4**) ist nun die genaue Klärung der einzelnen Biosyntheseschritte in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Dabei soll mit Hilfe des OSMAC-Ansatzes versucht werden, Vorläufermoleküle zu akkumulieren. Ein Schwerpunkt kann dabei weiterhin der Einsatz von Enzyminhibitoren (Oxygenase- und Methylierungsinhibitoren) sein. Durch Zufütterung markierter potentieller Vorläufermoleküle (aus der Synthese) und deren Einbau in das Zielmolekül könnte sowohl der vorgeschlagene Biosyntheseweg verifiziert als auch die Möglichkeit zur Generierung von Derivaten über vorläuferdirigierte Biosynthesen geschaffen werden. Parallel wird in der Arbeitsgruppe Prof. W. Bechthold (Freiburg) der Biosynthesegencluster des Mensacarcins (**4**) isoliert und auf den Einsatz in der kombinatorischen Biosynthese überprüft. Blockmutanten können erzeugt werden, bei denen einzelne Enzyme, wie z.B. Oxygenasen, der Biosynthese blockiert sind und daher Vorläufermoleküle akkumulieren. Weitere Mensacarcinderivate sollen mit Hilfe chemischer Derivatisierungsmethoden unter Einsatz von Reagenzien durchgeführt werden, die effizient und hochselektiv arbeiten.

Sämtliche Derivate werden auf Antitumoraktivität getestet und aus den Ergebnissen Struktur-Wirkungsbeziehungen abgeleitet.

Mit dem OSMAC-Ansatz kann das Biosynthesepotential des Stammes Gö C4/4 weiterhin untersucht werden. Dabei steht der Einsatz von Signalstoffen besonders im Vordergrund. Die Sequenzierung des gesamten Genoms von Gö C4/4 würde diesen Ansatz unterstützen und komplementieren.

B. Experimenteller Teil

I. Allgemeines

1. Instrumentelle Analytik

Schmelzpunkte: Alle Schmelz- bzw. Zersetzungspunkte wurden mit einem Heiztischmikroskop der Firma Reichert bestimmt und sind nicht korrigiert.

Drehwerte: Polarimeter Perkin-Elmer Modell 343, die Drehwerte sind in [10^{-1} deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$] und die Konzentration in [g/100 ml] angegeben.

Circulardichroismus-Spektren: Jasco J 500 A mit Jasco IF 500 A/D-Wandler und BMC IF 800 Personalcomputer als Prozessor. Der Circulardichroismus ($\Delta\epsilon$) ist in [$\text{deg cm}^2 10^{-1} \text{mol}^{-1}$] angegeben.

Massenspektren: Finnigan MAT 95: Alpha AXP DECstation 3000-300 LX, **EI-MS:** Elektronenenergie 70 eV, Hochauflösungen mit Perfluorkerosin als Vergleichssubstanz, **FAB-MS:** Cäsiumkanone, Matrix: α -Nitrobenzylalkohol, Glycerin, **DCI-MS:** Elektronenenergie 200 eV; Reaktandgas: NH_3 , **ESI-MS:** Finnigan LCQ.

Infrarotspektren: Alle IR-Spektren wurden als KBr-Preßlinge mit einem FT-IR-Spektrometer der Firma Perkin-Elmer Modell 1600 gemessen.

Elektronenspektren: Kontron Uvikon 860 oder Varian Cary 3E; Methanol/HCl bzw. Methanol/NaOH: Zu 2 ml methanolischer Lösung wurde ein Tropfen 1 N HCl bzw. 1 N NaOH gegeben.

$^1\text{H-NMR-Spektren:}$ Bruker AMX 300 (300 MHz), Varian Unity 300 (300 MHz), Varian Inova 500 (500 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ zum Lösungsmittel als internem Standard; Kopplungskonstanten (J) in [Hz]. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Doppeldublett, t = Triplett, dt = Dublett vom Triplett, q = Quartett, dq = Dublett vom Quartett, m = Multiplett, b = breit. Alle $^1\text{H-NMR-Spektren}$ wurden näherungsweise als Spektren erster Ordnung interpretiert.

$^{13}\text{C-NMR-Spektren:}$ Bruker AMX 300 (75.5 MHz), Varian Unity 300 (75.5 MHz), Varian Inova 500 (125.7 MHz). Chemische Verschiebungen in δ -Werten (ppm) relativ

zum Lösungsmittel als internem Standard. Abkürzungen: APT (Attached Proton Test), CH (d) und CH₃ (q) stehen nach oben, C (s) und CH₂ (t) stehen nach unten. Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett.

Verwendete 2D-NMR-Pulssequenzen: COSY (Correlated Spectroscopy), HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity), HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy).

2. Chromatographische Methoden

Lösungsmittel: Die Lösungsmittel für die Dünnschicht- und Säulenchromatographie wurden zuvor destilliert, für die HPLC wurde bidestilliertes Wasser verwendet; für alle anderen Zwecke fanden analysenreine Lösungsmittel Anwendung.

Adsorberharze: Serva Amberlite[®] XAD-2.

Dünnschichtchromatographie (DC): DC-Fertigplatten KG 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm, Merck): Schichtdicke 0.25 mm; DC-Alufolien KG 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm, Merck): Schichtdicke 0.25 mm; HPTLC-Nano-Fertigplatten KG 60 F₂₅₄ (Merck): Schichtdicke: 0.20 mm; DC-Alufolien RP-18 F_{254s} (20 × 20 cm, Merck).

Säulenchromatographie: Kieselgel 60 32-63 µm (ICN Biomedicals GmbH); Kieselgel 60 0.04-0.063 mm (Machery-Nagel); Kieselgel < 0.063 mm für die Flash-Chromatographie nach W.C. Still⁹¹ (Machery-Nagel); Sephadex LH-20 (Fluka).

High Performance Liquid Chromatographie (HPLC): Pumpe: Jasco PU-1580; Autosampler: Jasco AS-1555; Detektor: Jasco UV-1570 M; Mischkammer: Jasco LG-1580-02, Degaser: Jasco DG 1580-53; Datensystem: Jasco Borwin 1.5; Säule: Knauer Nucleosil 100 C18, 3 × 250 mm.

3. Mikrobiologische Methoden

Schüttler: Braun Inkubationsschüttelschrank BS4; Braun Certomat[®] RM; Braun Certomat[®] BS-1.

Fermenter: Braun Biostat B (2 L/5 L), Braun Biostat E (15 L), 10 L-Airliftfermenter, gebaut: Universität Dortmund, Fischer & Porter Gasflowmeter (45711 M), The Analytical Development Co Ltd. Kohlendioxid-Analysator, Ingold Sauerstoffelektrode.

Verwendete Nährmedien:

Allgemeines: Die Nährmedien wurden 30 min bei 121 °C autoklaviert. Alle Angaben beziehen sich auf einen Liter Medium. Für komplexe Medien wurde Leitungswasser und für synthetische Medien demineralisiertes Wasser verwendet. Die pH-Werte wurden mit 0.5 N NaOH bzw. mit 1 N oder konzentrierte HCl vor der Sterilisation eingestellt. Festen Medien wurde 1.5% Agar hinzugefügt.

Nährmedienbestandteile: Arginin: Janssen Chimica, Asparagin: Fluka, Bacto Nutrient Broth Difco, Bitek™ Agar: Difco, Calciumcarbonat: Merck, Dikaliumhydrogenphosphat: Merck, Eisensulfat-Heptahydrat: Fluka, Glucose: Merck, Hafermehl: Hologold, Hefeextrakt: Gibco BRL, Kaliumdihydrogenphosphat: Merck, Magnesiumsulfat-Heptahydrat: Fluka, Malzextrakt: Difco, Mannit: Fluka, Natriumchlorid: Baker, Natriumnitrat: Grüssig, Sojamehl (entfettet): Hensel.

SM: Sojamehl (entfettet) 20.0 g, Mannit 20.0 g, pH = 7.0.

M2: Glucose 4.0 g, Hefeextrakt 4.0 g, Malzextrakt 4.0 g, CaCO₃ (Festmedium) 0.2 g, pH = 7.0.

Hafermedium: Hafermehl 20.0 g, Spur 11 2.5 ml, pH = 7.8.

Nährlösung Nr.1153: Glycerin 12.5 g, Arginin, 1.0 g, Dikaliumhydrogenphosphat 1.0 g, Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0.5 g, Natriumchlorid 1.0 g, Spur 11 5.0 ml, pH = 7.3.

Nährlösung Nr.1187: Stärke 10.0 g, Ammoniumsulfat 2.0 g, Dikaliumhydrogenphosphat 1.0 g, Magnesiumsulfat-Heptahydrat 1.0 g, Natriumchlorid 1.0 g, Calciumcarbonat 2.0 g, Spur 11 5.0 g, pH = 7.3.

Minimal-Medium: Glucose 10.0 g, L-Asparagin 0.5 g, Dikaliumhydrogen-phosphat 0.5 g, Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0.2 g, Eisensulfat-Heptahydrat 0.01 g, pH = 7.6.

Medium zur Anthracyclin Produktion nach W.R. Strohl (modifiziert): Natriumnitrat 0.9 g, Dikaliumhydrogenphosphat 0.2 g, Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0.1 g, Glucose 22.5 g, Spur 11 5.0 ml.

Medium für *Staphylococcus aureus* und *E. Coli*: Bacto Nutrient Broth 8.0 g, NaCl 5.0 g, Agar 15.0 g.

Medium für *Bacillus subtilis*: Glucose 5.0 g, Natriumcitrat-Hydrat 0.5 g, Kaliumdihydrogenphosphat 3.0 g, Dikaliumhydrogenphosphat 7.0 g, Magnesiumsulfat-Heptahydrat 0.1 g, Ammoniumsulfat 1.0 g, Agar 15.0 g.

Medium für *Candida albicans*: Hefeextrakt 4.0 g, Malzextrakt 10.0 g, Glucose 4.0 g, Agar 15.0 g, pH = 5.5.

Spurenelementlösung (Spur 11): Zinksulfat 0.1 g, Kupfersulfat-Pentahydrat 25 mg, Natriumtetraborat-Decahydrat 20 mg, Natriummolybdat-Dihydrat 10 mg, Kobaltchlorid 4 mg, Calciumchlorid-Dihydrat 3.0 g, Eisen(III)-citrat 1.0 g, Mangansulfat 0.2 g, pH = 6.8.

4. Biologische Tests

Plattendiffusionstest: Auf die Agarschicht der mit *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oder *Candida albicans* angeimpften Agarplatte legte man Filterplättchen (Durchmesser: 9.0 mm, Dicke: 0.5 mm), die mit Lösungen der Substanzen in Methanol (1 mg/ml) getränkt und vor dem Auflegen getrocknet wurden. Die Testplatten wurden bei *Candida albicans* bei 28 °C und für die anderen Testorganismen bei 37 °C für 48 h inkubiert. (Die verwendeten Nährmedien findet man unter B I.3.).

5. Allgemeine Arbeitsvorschriften zur Extraktgewinnung

5.1. Ethylacetat-Extraktion

Die Kulturbrühen filtrierte man unter Zugabe von 20 g/L Celite. Das Mycel wurde dreimal mit je 30 ml Aceton pro 100 ml Kulturlösung 15 min im Ultraschallbad aufgeschlossen und filtriert. Das Filtrat wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum eingengt und lyophilisiert. Das Kulturfiltrat extrahierte man dreimal mit je 50 ml Ethylacetat pro 100 ml Kulturfiltrat. Die organische Phase wurde bei 40 °C im Vakuum eingengt und lyophilisiert.

5.2. Festphasen-Extraktion

Die Kulturbrühen filtrierte man unter Zugabe von 20 g/L Celite. Das Mycel schloß man dreimal mit je 30 ml Aceton pro 100 ml Kulturlösung 15 min. im Ultraschallbad auf und filtrierte. Das Filtrat wurde bei Zimmertemperatur im Vakuum eingengt und lyophilisiert.

1 L des Kulturfiltrats wurde an 500 g Amberlite® XAD-2 adsorbiert, mit 500 ml Wasser gewaschen, mit 500 ml Methanol eluiert, im Vakuum eingeengt und lyophilisiert.

6. Durchführung des chemischen Screenings

Die Kulturfiltrat- bzw. Mycelextrakte wurden je aus 100 ml Kulturlösung erhalten, in 1.0 ml MeOH/H₂O (9:1) gelöst und 10 µl auf eine 10 × 10 cm DC-Fertigplatte aufgetragen. Das Dünnschichtchromatogramm wurde in den Lösungsmittelgemischen Chloroform/Methanol (9:1) und Butanol/Eisessig/H₂O (5:1:4) entwickelt und mit den Sprühreagenzien Anisaldehyd, Vanillin-Schwefelsäure, Ehrlichs Reagenz und Orcin-Sprühreagenz angefärbt.

Sprühreagenzien: Nach Merck, Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie⁹². Die DC-Platten wurden nach dem Ansprühen mit einem Fön auf ca. 100 °C erwärmt.

Anisaldehyd (Nr. 21): 1.0 ml Anisaldehyd in einer Lösung aus 85 ml Methanol, 10 ml Eisessig und 0.5 ml konzentrierte Schwefelsäure.

Vanillin-Schwefelsäure (Nr. 322): 1 g Vanillin in 100 ml konzentrierter Schwefelsäure.

Ehrlichs Reagenz (Nr. 91): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in einer Mischung von 25 ml konzentrierter Salzsäure und 75 ml Methanol.

Orcin-Sprühreagenz (Nr. 250): 1 g Eisen(III)-chlorid in 100 ml Schwefelsäure und 100 ml Orcinlösung (6% in Ethanol).

II. CD-Screening

1. Stammhaltung und Kultivierung der K-Stämme

Zur Langzeitlagerung der Stämme wurden Proben der Stämme von gut bewachsenen Agarplatten ausgestochen, in einen Polypropylen-Halm eingeschweißt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Agarplatten wurden mit diesen Proben beimpft und bei 28 °C sieben Tage inkubiert. Bewachsene Agarplatten bewahrte man bei 6 °C im Kühlschrank auf und benutzte sie bis maximal drei Monate nach der Inkubation zum Animpfen von Schüttelkulturen. Die Standardkultivierung der Stämme erfolgte in 250 ml Erlen-

meyerkolben mit drei Schikanen und 50 ml Nährmedium. Diese wurden 30 min bei 121 °C sterilisiert, mit einem ca. 1 cm² Stück einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft und bei 28 °C und 180 rpm für 72 h kultiviert. Die Extraktproben für das CD-Screening wurden durch die Festphasenextraktion-Methode generiert.

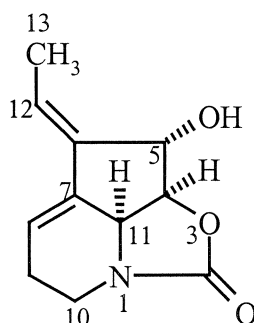
2. Probenvorbereitung und Durchführung des CD-Screenings

Die Extraktproben wurden in Methanol/H₂O (9:1) gelöst und die Absorbanz der Probe am UV-Spektrometer im Bereich von 230-300 nm durch Verdünnen auf 3.0 eingestellt. Diese wurde am CD-Spektralpolarimeter über den Wellenlängenbereich von 210-400 nm vermessen. Die Meßparameter wurden wie folgt eingestellt:

Range:	210-500 nm
Sensitivity:	50 mdeg
Resolution:	0.2 nm
Accumulation:	1
Band width:	1.0 nm
Response:	1 sec.
Scan Speed:	20 nm/min

3. Kultivierung der ausgewählten Stämme und Isolierung der CD-aktiven Komponente

Die CD-aktiven Stämme wurden unter Standardbedingungen (50 ml Nährmedium, 28 °C, 180 rpm, 72 h) im 1 L-Maßstab fermentiert und die Kulturbrühe durch Ethylacetatextraktion aufgearbeitet. Die Extrakte wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel chromatographiert (300 ml Kieselgel/g Extrakt, Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 4:1) und jede fünfte Fraktion am CD-Spektrometer auf CD-Aktivität überprüft. Fraktionen gleicher CD-Aktivität wurden vereinigt und an Sephadex LH-20 chromatographiert (1 cm Säule/1 mg Fraktion) bis man einen Reinstoff erhielt.

3.1. Streptazolin (**6**) aus dem Stamm *Streptomyces* sp. K21/5

Aus einer 1 L-Fermentation, die in Schüttelkolben unter Standardbedingungen (50 ml Nährmedium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, 28 °C, 180 rpm, 72 h) im Soja/Mannit-Nährmedium vorgenommen wurde, erhielt man nach Ethylacetatextraktion des Kulturfiltrats 115 mg Extakt. Dieser wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1; Säule 40 × 2 cm) gereinigt. Man erhielt 30 mg Streptazolin (**6**) als farbloses Öl.

C₁₁H₁₃NO₃ (207.29)

R_F-Wert: 0.41 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.44 (Aceton/Cyclohexan, 2:1)

Anfärbeverhalten: braun (Anisaldehyd)

EI-MS: m/z (%) = 207 (100), 206 (16), 180 (6), 178 (8), 162 (13), 154 (6), 134 (320), 119 (16), 95 (12), 91 (20), 77 (14), 67 (8), 41 (12).

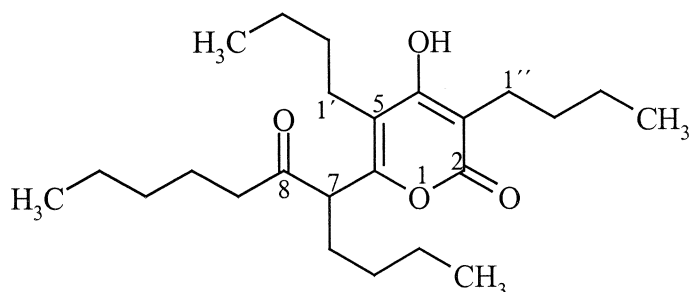
UV (MeOH): λ_{max} (ε) = 256 nm (4650).

Drehwert: [α]_D²⁰ = + 43° (c = 1.38, Chloroform)

CD (MeOH/H₂O): λ_{extr} (Δε) = 232 nm (3.1), 262 (-1.9).

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆): δ = 1.86 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 13-H₃), 2.08-2.30 und 2.37-2.52 (m, 2H, 9-H₂), 3.28-3.38 (m, 2H, 10-H₂), 3.77 (bs, 1H, 5-OH), 4.32 (m, 1H, 11-H), 4.64 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 4-H), 4.73 (s, 1H, 5-H), 6.06 (m, 1H, 8-H), 6.13 (q, J = 7.0 Hz, 1H, 12-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, Aceton-d₆): δ = 14.9 (q, C-13), 23.1 (t, C-9), 40.6 (t, C-10), 59.6 (d, C-11), 74.6 (d, C-5), 82.5 (d, C-4), 118.7 (d, C-8), 123.2 (d, C-12), 140.1 (s, C-6), 144.4 (s, C-7), 159.7 (s, C-2).

3.2. Elasinin (7) aus *Streptomyces* sp. K23/4

Aus einem 1 L-Fermentation, die in Schüttelkolben mit Haferkleie als Nährmedium unter Standardbedingungen (50 ml Nährmedium in 250 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, 28 °C, 180 rpm, 72 h) durchgeführt wurde, erhielt man 1.02 g Mycel-Extrakt. Dieser wurde durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient 98:2 – 5:1 und Dichlormethan/Methanol-Gradient, 100:0 – 9:1; Säule 23 × 3.5 cm) und Sephadex LH-20 (Chloroform, Säule 75 × 3 cm) aufgereinigt. Man erhielt 30 mg Elasinin (7) als farbloses Öl.

C₂₄H₄₀O₄ (392.58)

R_f-Wert: 0.60 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.55 (Petrolether/Ethylacetat/Methanol, 8:6:1)

Anfärbeverhalten: Keine Farbreaktionen mit Ehrlichs Reagenz, Orcin-Sprühreagenz und Anisaldehyd

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 808 (100) [2M + Na⁺], 395 (39) [M + H⁺].

EI-MS: m/z (%) = 392 (6), 294 (100), 251 (35), 223 (8), 178 (4), 125 (2), 99 (9), 71 (5), 43 (10).

HREI-MS: 392.2919 gefunden wie berechnet für C₂₄H₄₀O₄.

IR (CCl₄): $\tilde{\nu}$ = 3580 cm⁻¹, 1715, 1665, 1635.

UV (MeOH): λ_{\max} (ϵ) = 215 nm (19100), 392 (7080).

(MeOH/HCl): λ_{\max} (ϵ) = 216 nm (21800), 292 (7000).

(MeOH/NaOH): λ_{\max} (ϵ) = 290 nm (7380).

Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = - 0.9° (c = 1.0, Ethanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 234 nm (2.3), 281 (-8.2), 314 (5.6).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 0.81 – 0.96 (m, 12H, 4 × CH₃), 1.12 – 1.57 (m, 18H, 9 × CH₂), 1.80 - 2.06 (m, 2H, 14-H₂), 2.36 – 2.52 (m, 6H, 1'-H₂, 1''-H₂, 9-H₂), 3.60 (t, J = 0.6 Hz, 1H, 7-H), 7.40 (bs, 1H, OH).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CDCl₃): δ = 13.9 (q), 14.0 (q), 22.4 (t), 22.5 (t), 22.8 (t), 23.2 (t), 23.4 (t), 24.4 (t), 28.4 (t), 29.7 (t), 30.2 (t), 31.2 (t), 31.8 (t), 40.1 (t), 54.8 (d, C-7), 104.2 (s, C-3), 114.4 (s, C-5), 155.0 (s, C-6), 163.9 (s, C-4), 165.0 (s, C-2), 207.0 (s, C-8).

III. Der Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4

1. Stammhaltung und Kultivierung

Der Stamm *Streptomyces* sp. Gö C4/4 wurde aus einer Erdprobe isoliert, die man in der Nähe der Göttinger Nordmensa entnommen hatte. Zur Langzeitlagerung des Stammes wurden Proben aus gut bewachsenen Agarplatten ausgestochen, in Polypropylen-Halme eingeschweißt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Kultivierung wurden Agarplatten mit diesen Proben beimpft und bei 28 °C sieben Tage lang inkubiert. Anschließend wurden diese bei 6 °C im Kühlschrank aufbewahrt und bis maximal drei Monate nach der Inkubation zum Animpfen von Schüttelkulturen verwendet.

Die Kultivierung des Stammes unter Standardbedingungen erfolgte in 250 ml Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen, die man mit jeweils 100 ml Hafermedium befüllte, 30 min bei 121 °C sterilisierte, mit einem 1 cm² großes Stück einer gut bewachsenen Agarplatte animpfte und bei 28 °C und 250 rpm über 72 h kultivierte.

2. Variation der Kultivierungsbedingungen

2.1. Nährmedienvariation

Für jede Variation setzte man zwei Schüttelkolben mit jeweils 100 ml Nährmedium an und kultivierte zunächst 72 h und beim der zweiten Versuchsreihe 120 h unter Standardbedingungen kultivieren. Die Aufarbeitung erfolgte durch Festphasenextraktion. Die erhaltenen Extrakte wurden im chemischen Screening untersucht. Die Nährmedienvariation wurde mit vier verschiedenen Nährmedien durchgeführt: Nährlösung

Nr. 1153, Nährlösung Nr. 1187, Minimal Medium nach Hopwood und Medium zur Anthracyclin Produktion nach M.L. Dekleva (modifiziert).

2.2. Kultivierungen unter Variation des Kultivierungsgefäßes und des Sauerstoffpartialdrucks

Bei allen Kultivierungen verwendete man Hafermedium, dem man vor dem Autoklavieren Niax als Entschäumer zusetzte. Die Fermenter wurden mit 10 Volumenprozent von 48 h alten Vorkulturen angeimpft, bei denen das gleiche Nährmedium verwendet wurde und bei 28 °C betrieben. Die pH-Werte wurden mit 2.0 N Citronensäure und 0.5 N NaOH eingestellt. Sämtliche Ansätze wurden durch Extraktion mit Ethylacetat aufgearbeitet.

2.2.1. Kultivierung im Fermenter Braun Biostat B

Die Fermentationen wurden im 1 – 3 L-Maßstab durchgeführt. Man ließ 72 h bei 1 vvm und 500 rpm fermentieren.

2.2.2. Kultivierungen im Fermenter Braun Biostat E

Die Fermentationen wurden im 10 L-Maßstab durchgeführt und das Nährmedium mit 5 Volumenprozent der Vorkultur angeimpft. Man ließ 92 h bei 2.0 vvm und 250 rpm mit einer pH-Sperre von pH: 5.5 ± 1.5 fermentieren.

2.2.3. Kultivierungen im Airlift-Fermenter

Die Fermentationen wurden im 10 L-Maßstab durchgeführt und das Nährmedium mit 5 Volumenprozent der Vorkultur angeimpft:

1. Man ließ 64 h bei 0.3 bar Überdruck und einer Belüftung von 4.0 vvm (3.0/16) fermentieren.
2. Man ließ 64 h bei 5.0 bar Überdruck und 1.0 bar Belüftung (= 4.0 vvm) fermentieren.

2.2.4. Kultivierung im P-Kolben

Die P-Kolben wurden mit 1 L des Nährmediums ohne Zusatz von Niax gefüllt und die Kulturen mit einer 5 cm² großen gut bewachsenen Agarplatte angeimpft. Nach 11 Tagen durchmischte man kräftig und arbeitete nach 29 Tagen auf.

2.3. Kultivierung unter Zusatz von Lösungsmitteln

Für jede Variation setzte man zwei Schüttelkolben mit 100 ml Hafermedium an, dem nach Autoklavieren 2-5 Volumenprozent DMSO zugesetzt wurden. Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen und die Aufarbeitung durch Festphasenextraktion. Die Extrakte wurden im chemischen Screening untersucht.

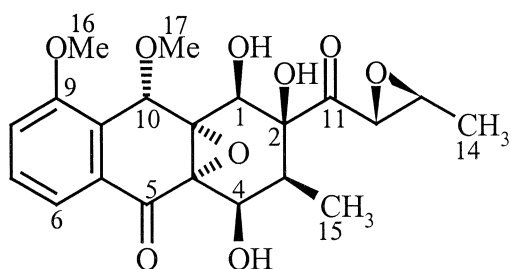
Die Kultivierung in Fermentern erfolgte bei 28 °C im Hafermedium, dem nach Autoklavieren 2 Volumenprozent DMSO zugesetzt wurde. Die Kultivierung im Fermenter Braun Biostat B erfolgte im 2-3 L-Maßstab. Angeimpft wurde mit 10 Volumenprozent 48 h alter Vorkulturen desselben Nährmediums. Man ließ 40 h bei einer Belüftung von 2.5 vvm und 500 rpm fermentieren. Die Kultivierung im Fermenter Braun Biostat E erfolgte im 10 L-Maßstab. Angeimpft wurde mit 5 Volumenprozent 48 h alter Vorkulturen desselben Nährmediums. Man ließ 64 h bei 1.0 vvm und 300 rpm fermentieren. Die Kulturbrühen arbeitete man nach der Ethylacetatextraktions-Methode auf.

2.4. Kultivierung unter Zusatz von Enzyminhibitoren

Für jede Variation setzte man jeweils zwei Schüttelkolben mit 100 ml Hafermedium an und ließ 42 h unter Standardbedingungen fermentieren. Nach 20 h gab man die Enzyminhibitoren in DMSO oder demineralisiertem sowie sterilisiertem Wasser hinzu. Es wurden die P₄₅₀-Monoxygenaseinhibitoren Ancymidol (**13**) (DMSO), Metyrapon (**14**) (H₂O) und Tetcyclacis (**15**) (H₂O) eingesetzt. Die Kulturbrühen wurden durch Festphasenextraktion aufgearbeitet und die Extrakte im chemischen Screening untersucht.

3. Isolierung und Charakterisierung der Naturstoffe und Biotransformationsprodukte

3.1. Mensacarcin (4)



Mensacarcin (**4**) wird von dem Stamm Gö C4/4 unter Standardbedingungen im Schüttelkolben als Hauptprodukt gebildet. Die Isolierung erfolgt aus dem Kulturfiltratextrakt durch Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und Kristallisation aus Ethylacetat/n-Pentan. Man erhält **1** als weiße Kristalle in Ausbeuten von 60 mg/L.

C₂₁H₂₄O₉ (420.2)

Smp.: 192 – 195 °C

R_f-Wert: 0.11 (Dichlormethan/Aceton, 93:7), 0.55 (Chloroform/Methanol, 9:1)

Anfärbeverhalten: schwarz (Orcin-Sprühragenz)

EI-MS: m/z (%) = 420 (2), 373 (4), 353 (2), 335 (4), 334 (16), 303 (72), 285 (62), 257 (36), 229 (22), 218 (32), 189 (100), 187 (24), 173 (10), 131 (6), 115 (8), 91 (6), 69 (20), 57 (6), 41 (4).

HREI-MS: 420.1420 gefunden und berechnet für C₂₁H₂₄O₉.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3438 cm⁻¹, 3297, 2940, 2842, 1710, 1682, 1582.

UV (MeOH): λ_{\max} (ϵ) = 226 nm (16400), 263 (8820), 319 (2940).

(MeOH/HCl): λ_{\max} (ϵ) = 226 nm (16300), 262 (7260), 320 (2870).

(MeOH/NaOH): λ_{\max} (ϵ) = 226 nm (1530), 261 (6440), 320 (2310).

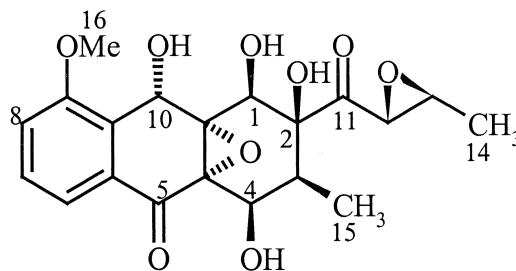
Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = - 55 (c = 2.1, Methanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 219 nm (-4.8), 258 (3.7), 336 (-2.4).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 1.07$ (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, 15- H_3), 1.44 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, 14- H_3), 2.28 (dq, $J = 7.5, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 3.04 (dq, $J = 5.0, 2.0$ Hz, 1H, 13-H), 3.57 (d, $J = 10$ Hz, 1H, 1-OH), 3.64 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 4-OH), 3.70 (s, 3H, 17- H_3), 3.92 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 12-H), 3.92 (s, 3H, 16- H_3), 4.43 (d, $J = 10.0$ Hz, 1H, 1-H), 4.70 (dd, $J = 4.5, 3.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.02 (s, 1H, 2-OH), 5.48 (s, 1H, 10-H), 7.18 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 6-H), 7.40 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.62 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, 8-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, CDCl_3): $\delta = 11.0$ (q, C-15), 17.7 (q, C-14), 31.5 (d, C-3), 56.0 (d, C-16), 56.9 (d, C-13), 58.0 (d, C-12), 59.2 (q, C-17), 63.2 (s, C-4a), 66.3 (s, C-10a), 68.3 (d, C-4), 69.4 (d, C-10), 70.1 (d, C-1), 83.2 (s, C-2), 116.8 (d, C-8), 119.3 (d, C-6), 127.9 (s, C-9a), 129.5 (d, C-7), 130.2 (q, C-5a), 158.8 (q, C-9), 192.6 (q, C-5), 208.8 (q, C-11).

3.2. Desmethylen-sacarin (**20**)



Die Fermentation erfolgte im 10 L-Maßstab im Fermenter Braun Biostat E (Hafermedium, 28 °C, 250 rpm, 2.0 vvm, 92 h, pH-Sperre: 5.5 ± 1.5), der mit 5 Volumenprozent 48 h alter Vorkulturen desselben Nährmediums angeimpft worden war. Die Kulturbrühe wurde durch Ethylacetatextraktion aufgearbeitet. Aus dem Kulturfiltratextrakt isolierte man **20** durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 - 5:1 und 95:5 - 9:1) als gelblicher Feststoff in 1.4 mg/L Ausbeute.

$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_9$ (406.39)

Smp.: 188 – 190 °C

R_f -Wert: 0.49 (Cyclohexan/Aceton, 1:2), 0.55 (Chloroform/Methanol, 9:1)

Anfärbeverhalten: schwarz (Vanillin-Schwefelsäure)

EI-MS: m/z (%) = 406 (4), 373 (6), 341 (2), 322 (4), 320 (12), 303 (70), 285 (50), 257 (40), 218 (44), 189 (100), 163 (33), 135 (12), 85 (8), 77 (10), 69 (32), 57 (13), 43 (12).

HREI-MS: 406.1264 gefunden wie berechnet für $C_{20}H_{22}O_9$.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3433 cm^{-1} (br), 1720, 1689, 1632, 1594, 1459, 1415, 1261, 1087, 1020, 966, 756, 629, 565.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 225 nm (14500), 261 (6630), 318 (2480).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 225 nm (14400), 261 (6690), 318 (2570).

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 224 nm (14500), 257 (7520), 317 (2930).

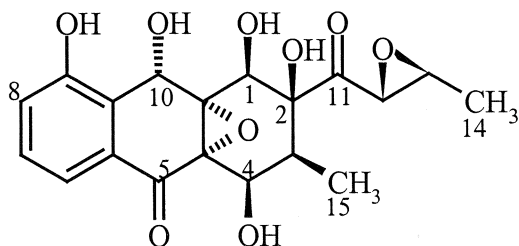
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = - 58° (c = 0.19, Methanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 259 nm (3.7), 337 (-2.1).

1H -NMR (300 MHz, CD_3OD): δ = 1.03 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 15-H), 1.41 (d, J = 5.0 Hz, 3H, 14-H), 2.12 (dq, J = 7.0, 3.0 Hz, 1H, 3-H), 3.00 (dq, J = 5.0, 2.0 Hz, 1H, 13-H), 3.94 (s, 3H, 16-H), 4.05 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 12-H), 4.32 (s, 1H, 1-H), 4.64 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4-H), 7.33 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 8-H), 7.45 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 7-H), 7.65 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H).

^{13}C -NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ = 11.6 (q, C-15), 17.9 (q, C-14), 33.2 (d, C-3), 56.5 (d, C-13), 57.9 (d, C-12), 59.7 (q, C-16), 61.5 (s, C-4a), 65.5 (s, C-10a), 67.9 (d, C-10), 68.4 (d, C-4), 72.2 (d, C-1), 85.2 (s, C-2), 117.6 (d, C-8), 119.8 (d, C-6), 130.4 (s, C-9a), 130.7 (d, C-7), 131.0 (s, C-5a), 159.9 (s, C-9), 191.2 (s, C-5), 212.0 (s, C-11).

3.3. Didesmethylmensacarcin (19)



Die Fermentation erfolgte im 10 L-Maßstab im Fermenter Braun Biostat E (Hafermedium, 28 °C, 250 rpm, 2.0 vvm, 92 h, pH-Sperre 5.5 ± 1.5), der mit 5 Volumenprozent 48 h alter Vorkulturen desselben Nährmediums angeimpft worden war. Die Kulturbrühe wurde durch

Ethylacetatextraktion aufgearbeitet. Aus dem Kulturfiltratextrakt isolierte man **19** durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 –5:1 und 95:5 – 9:1) als gelblichen Feststoff in einer Ausbeute von 3.3 mg/L.

C₁₉H₂₀O₉ (392.36)

R_f-Wert: 0.49 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.51 (Cyclohexan/Aceton, 1:2)

Anfärbeverhalten: braun (Orcin-Sprühreagenz)

EI-MS: m/z (%) = 392 (18), 338 (4), 322 (4), 306 (16), 289 (28), 271 (44), 243 (32), 187 (28), 175 (100), 149 (24), 121 (16), 84 (19), 69 (32), 45 (40).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3429 cm⁻¹ (br), 1721, 1687, 1607, 1463, 1415, 1380, 1288.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 225 nm (12500), 263 (6800), 321 (2960).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 224 nm (12500), 264 (6780), 320 (2840).

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 247 nm (13300), 362 (2420).

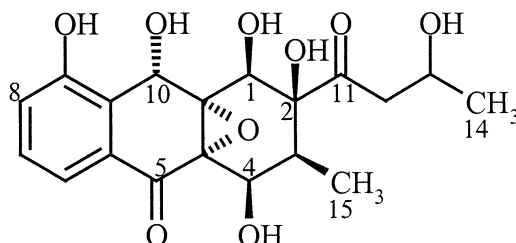
Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = - 24° (c = 0.21, Ethanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 263 nm (3.3), 338 (-1.9).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.04 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 15-H), 1.42 (d, J = 5.0 Hz, 3H, 14-H), 2.11 (dq, J = 7.0, 3.0 Hz, 1H, 3-H), 2.98 (dq, J = 5.0, 2.0 Hz, 1H, 13-H), 4.06 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 12-H), 4.34 (s, 1H, 1-H), 4.63 (d, J = 3.0 Hz, 1H, 4-H), 5.79 (s, 1H, 10-H), 7.12 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 8-H), 7.32 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, 1H, 7-H), 7.55 (dd, J = 8.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 11.6 (q, C-15), 17.9 (q, C-14), 33.1 (d, C-3), 57.9 (d, C-13), 59.6 (d, C-12), 64.3 (s, C-4a), 65.4 (s, C-10a), 66.6 (d, C-10), 68.5 (d, C-4), 72.0 (d, C-1), 85.0 (s, C-2), 119.4 (d, C-6), 122.7 (d, C-8), 127.4 (s, C-9a), 130.3 (d, C-9), 130.5 (s, C-5a), 158.2 (s, C-9), 191.5 (s, C-5), 212.0 (s, C-11).

3.4. Didesmethyldihydromensacarcin (**21**)



Die Fermentation erfolgte im 10 L-Maßstab im Fermenter Braun Biostat E (Hafermedium, 28 °C, 250 rpm, 2.0 vvm, 92 h, pH-Sperre 5.5 ± 1.5), der mit 5 Volumenprozent 48 h alter Vorkulturen desselben Nährmediums angeimpft worden war. Die Kulturbrühe wurde durch Ethylacetatextraktion aufgearbeitet. Aus dem Kulturfiltratextrakt isolierte man **21** durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und Sephadex LH-20 (Aceton) als roten Feststoff in einer Ausbeute von 1.7 mg/L.

C₁₉H₂₂O₉ (394.15)

Smp.: > 188 °C tritt Zersetzung ein.

R_f-Wert: 0.36 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.44 (Aceton/Cyclohexan, 2:1)

Anfärbeverhalten: rot (Orcin-Sprühreagenz)

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 811 (50) [$2M + Na^+$], 418 (100) [$M + Na^+$].

(negative Ionen): m/z (%) = 394 (100) [$M - H^-$], 350 (20), 232 (42), 204 (56).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3429 cm^{-1} (br), 3972, 2929, 1690, 1606, 1462, 1379, 1288, 1096.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 224 nm (7250), 262 (3390), 320 (903).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 224 nm (7540), 262 (3530), 322 (1030).

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 246 nm (10100), 348 (1790).

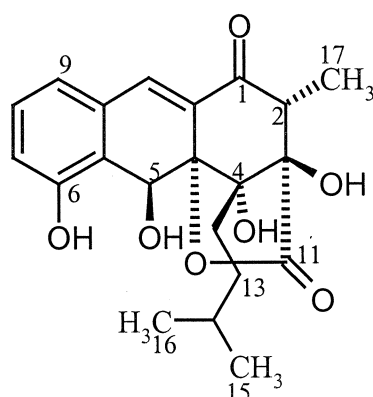
Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -62^\circ$ ($c = 0.15$, Methanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 262 nm (2.2), 339 (-1.5).

¹H-NMR (500 MHz, Aceton- d_6): δ = 1.07 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 15-H₃), 1.16 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H, 14-H₃), 2.04 (dq, $J = 7.0, 3.0$ Hz, 1H, 3-H), 2.75 (dd, $J = 19.0, 5.0$ Hz, 1H, 12-H), 2.94 (dd, $J = 19.0, 7.0$ Hz, 1H, 12-H), 4.24 (m, 1H, 13-H), 4.37 (s, 1H, 1-H), 4.57 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, 4-H), 5.76 (s, 1H, 10-H/9), 7.11 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.30 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.54 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, 6-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (125.7 MHz, Aceton- d_6): $\delta = 11.3$ (q, C-15), 23.5 (q, C-14), 33.1 (d, C-3), 50.0 (t, C-12), 63.6 (d, C-13), 64.6 (s, C-4a), 65.5 (s, C-10a), 65.7 (d, C-10), 68.2 (d, C-4), 71.2 (d, C-1), 83.7 (s, C-2), 118.9 (d, C-6), 122.9 (d, C-8), 126.1 (s, C-9a), 130.0 (d, C-7), 130.2 (s, C-5a), 158.4 (s, C-9), 191.2 (s, C-5), 215.5 (s, C-11).

3.5. Rishirilid A (**10**)



Die Kultivierung erfolgte im 3 L-Maßstab im Fermenter Braun Biostat B in dem Nährmedium Nr. 1153. Angeimpft wurde mit 10 Volumenprozent 48 h alter Vorkulturen desselben Nährmediums. Man ließ 113 h bei 1.0 vvm und 500 rpm fermentieren. Sobald nach dem Anwachsen des Stammes der pH-Wert von 6.50 unterschritten wurde, legte man eine pH-Sperre von $\text{pH} = 6.0 \pm 0.5$ an. Die Kulturbrühe wurde durch Ethylacetatextraktion aufgearbeitet und **10** aus dem Kulturfiltratextrakt (194 mg) durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Chloroform/Methanol, 95:5) und Sephadex LH-20 (Methanol, Säule 40.0×2.3 cm) in einer Ausbeute von 5 mg/L als weißer Feststoff isoliert.

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ (388.41)

Smp.: 122 – 124 °C

R_f -Wert: 0.30 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.50 (Dichlormethan/Methanol, 5:1)

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin-Schwefelsäure), braun (Ehrlichs Reagenz)

DCI-MS: m/z (%) = 344 (52) $[\text{M} + \text{NH}_4^+]$, 327 (100) $[\text{M} + \text{H}^+]$, 323 (11), 311 (6), 248 (8), 222 (20), 184 (6), 166 (30), 158 (12), 121 (16).

ESI-MS (positive Ionen): m/z (%) = 799 (100) $[2\text{M} + \text{Na}^+]$, 411 (42) $[\text{M} + \text{Na}^+]$, 367 (6) $[\text{M} - 44 + \text{Na}^+]$.

(negative Ionen): m/z (%) = 387 (72) $[M - H^-]$, 369 (12) $[M - H_2O^-]$, 325 (100) $[M - 62 - H^-]$, 310 (6) $[M - 77 - H^-]$.

EI-MS: m/z (%) = 326 (100), 283 (75), 269 (77), 255 (26), 241 (6), 197 (2), 157 (1), 83 (3), 44 (16).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3510 cm^{-1} , 1740, 1680, 1610, 1575.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 222 nm (10400), 320 (12700), 350 (7640).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 222 nm (16100), 320 (17400).

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 224 nm (17100), 275 (15500), 341 (2670), 420 (2710).

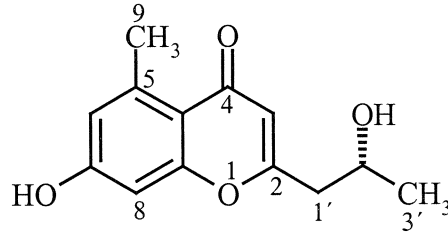
Drehwert: $[\alpha]_D^{20}$ = - 411° (c = 1.04, Ethanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 220 nm (9.5), 253 (-2.0), 269 (-1.4), 313 (-7.0).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 0.86 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 16- H_3), 0.89 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 15- H_3), 1.21 (d, J = 8.0 Hz, 3H, 17- H_3), 1.41 (m, 1H, 14-H), 1.49 – 1.70 (m, 3H, 12-H, 13- H_2), 2.52 (m, 1H, 12-H), 2.77 (q, J = 8.0 Hz, 1H, 2-H), 5.49 (s, 1H, 5-H), 6.89 (m, 2H, 7-H, 9-H), 7.24 (t, J = 8.0 Hz, 1H, 8-H), 7.57 (s, 1H, 10-H).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): 0.79 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 16- H_3), 0.83 (d, J = 6.0 Hz, 3H, 15- H_3), 1.08 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 17- H_3), 1.27 – 1.60 (m, 3H, 12-H, 13- H_2), 2.42 (m, 1H, 12-H), 2.67 (q, J = 7.0 Hz, 1H, 2-H), 5.30 (s, 1H, 5-H), 5.55 (bs, 1H, OH), 5.87 (s, 1H, OH), 7.00 (t, J = 7.0 Hz, 2H, 7-H, 9-H), 7.20 (t, J = 7.0 Hz, 1H, 8-H), 7.50 (s, 1H, 10-H), 9.90 (bs, 1H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CD_3OD): δ = 12.6 (q, C-17), 22.7 (q, C-16), 23.1 (q, C-15), 30.0 (d, C-14), 31.0 (t, C-12), 32.6 (t, C-13), 50.7 (d, C-2), 64.6 (d, C-5), 81.8 (s, C-3), 82.1 (s, C-4), 85.4 (s, C-4a), 120.7 (d, C-7), 123.2 (s, C-5a), 123.8 (d, C-9), 131.0 (d, C-8), 131.7 (s, C-9a), 131.9 (s, C-10a), 139.6 (d, C-10), 156.8 (s, C-6), 177.5 (s, C-11), 199.4 (s, C-1).

3.6. Aloesol (**11**)

Die Kultivierung erfolgte im Fermenter Braun Biostat B (Hafermedium, 28 °C, 500 rpm, 2.5 vvm) im 3 L-Maßstab unter Zusatz von 2 Volumenprozent DMSO nach Autoklavieren. Man isolierte **11** aus dem Kulturfiltratextrakt durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Menthanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und Sephadex LH-20 (Aceton) in einer Ausbeute von 2.3 mg/L als weißen Feststoff.

C₁₃H₁₄O₄ (234.09)

Smp.: 187 – 189 °C

R_f-Wert: 0.24 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.13 (Petrolether/Ethylacetat/Methanol, 8:6:1)

Anfärbeverhalten: braun (Orcin-Sprühreagenz)

EI-MS: m/z (%) = 234 (100), 190 (90), 161 (32), 124 (6), 57 (5), 45 (10).

HREI-MS: 234.0883 gefunden und berechnet für C₁₃H₁₄O₄.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3428 cm⁻¹, 1646, 1613, 1558, 1454, 1372, 1280, 1211, 1160, 1110, 1060, 1009, 952, 850, 764, 652, 603, 544.

UV (MeOH): λ_{\max} (ϵ) = 211 nm (19600), 242 (16100), 250 (17000), 291 (11000).

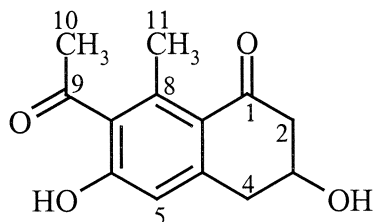
(MeOH/HCl): λ_{\max} (ϵ) = 218 nm (21000), 256 (20800), 327 (12200).

(MeOH/NaOH): λ_{\max} (ϵ) = 212 nm (19000), 242 (15900), 250 (16600), 291 (10800).

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = - 13° (c = 0.19, Methanol)

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.24 (d, J = 6.5 Hz, 3H, 3'-H₃), 2.68 (m, 2H, 1'-H₂), 2.69 (s, 3H, 9-H₃), 4.18 (m, 1H, 2-H'), 6.04 (s, 1H, 3-H), 6.60 (dd, J = 2.0, 1.0 Hz, 1H, 6-H), 6.63 (d, J = 2.0 Hz, 1H, 8-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): δ = 23.2 (q, C-3'), 23.5 (q, C-9), 44.2 (t, C-1'), 66.3 (d, C-2'), 101.7 (d, C-8), 112.5 (d, C-3), 115.8 (s, C-4a), 118.1 (d, C-6), 143.6 (s, C-5), 161.5 bzw. 163.18 (s, C-7 bzw. C-8a), 167.1 (s, C-2), 181.9 (s, C-4).

3.7. Mensalon (**12**)

Die Kultivierung erfolgte im 3 L-Maßstab im Fermenter Braun Biostat B (Hafermedium, 28 °C, 500 rpm, 2.5 vvm) unter Zusatz von 2 Volumenprozent DMSO nach dem Autoklavieren. Man isolierte **12** aus dem Kulturfiltratextrakt durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 5:1) und Sephadex LH-20 (Aceton) als weißen Feststoff in einer Ausbeute von 2.0 mg/L.

C₁₃H₁₄O₄ (234.09)

Smp.: 186 – 188 °C

R_f-Wert: 0.22 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.11 (Petrolether/Ethylacetat/Methanol, 8:6:1)

Anfärbeverhalten: grau (Orcin-Sprühreagenz), violett (Anisaldehyd)

EI-MS: m/z (%) = 234 (100), 219 (90), 201 (10), 190 (40), 175 (10), 162 (16), 147 (10), 128 (2), 119 (5), 115 (7), 105 (5), 91 (8), 65 (5), 51 (2), 43 (18).

HREI-MS: 234.0880 gefunden und berechnet für C₁₃H₁₄O₄.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3469 cm⁻¹, 2926, 1689, 1653, 1597, 1573, 1435, 1316, 1277, 1123, 1064, 847, 563.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 212 nm (10000), 273 (9340), 321 (1650).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 212 nm (10300), 274 (10200).

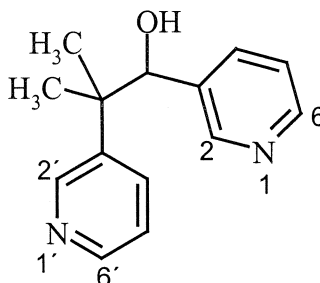
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 239 nm (6990), 325 (18000).

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = - 10° (c = 0.22, Methanol)

¹H-NMR (300 MHz, Aceton-d₆): δ = 2.40 (s, 3H, 11-H₃), 2.45 (s, 3H, 10-H₃), 2.55 (dd, J = 17.0, 8.0 Hz, 1H, 2-H), 2.60 (s, 1H, 3-OH), 2.79 (dd, J = 17.0, 4.0 Hz, 1H, 2-H), 2.90 (dd, J = 17.0, 8.0 Hz, 1H, 4-H), 3.10 (dd, J = 17.0, 4.0 Hz, 1H, 4-H), 4.28 (m, 1H, 3-H), 6.69 (s, 1H, 5-H). **¹³C-NMR** (75.5 MHz, Aceton-d₆): δ = 18.8 (q, C-11), 32.5 (q, C-10), 39.4 (t, C-4), 49.2 (t, C-2), 65.7 (d, C-3), 114.7 (d, C-5), 123.9 (s,

C-8a), 131.4 (s, C-7), 139.1 (s, C-8), 146.5 (s, C-4a), 157.9 (s, C-6), 199.0 (s, C-1), 207.5 (s, C-9).

3.8. Metyrapol (16)



Die Kultivierung erfolgte in elf Schüttelkolben mit Hafermedium unter Standardbedingungen. Nach 20 h wurde je 11.3 mg Metyrapon (14) (0.05 mmol) in 1 ml sterilem Wasser zugefügt und weitere 22 h fermentiert. Die Kulturbrühe wurde nach der Ethylacetatextraktions-Methode aufgearbeitet und 16 aus dem Kulturfiltratextrakt (110 mg) durch Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 98:2 – 9:1) als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 6 mg/L isoliert.

C₁₄H₁₆N₂O (228.29)

R_F-Wert: 0.22 (Chloroform/Methanol, 9:1)

Anfärbeverhalten: braun (Vanillin-Schwefelsäure)

EI-MS: m/z (%) = 121 (100), 120 (71), 109 (13), 108 (17), 106 (21), 93 (3), 92 (17), 80 (13), 78 (7), 65 (4), 53 (8), 41 (5).

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃/Cd₃OD 3:1): δ = 1.14 (s, 3H, CH₃), 1.18 (s, 3H, CH₃), 4.50 (s, 1H, CHOH), 6.93 – 7.13 (m, 3H, 4-H, 5-H, 5'-H), 7.46 (m, 1H, 4'-H), 7.90 (bs, 1H, 2-H), 8.08 – 8.18 (m, 2H, 6-H, 6'-H), 8.20 (bs, 1H, 2'-H).

¹³C-NMR (125.7 MHz, CDCl₃): δ = 23.2 (q, CH₃), 24.9 (q, CH₃), 42.0 (s), 79.0 (d, COH), 122.6 (d), 122.8 (d), 135.1 (d), 135.4 (d), 137.1 (d), 141.2 (d), 147.0 (d), 148.3 (d), 148.5 (d), 148.8 (d).

IV. Untersuchungen zur Biosynthese von Mensacarcin

1. Kultivierung unter Zusatz von L-[Methyl-¹³C]Methionin

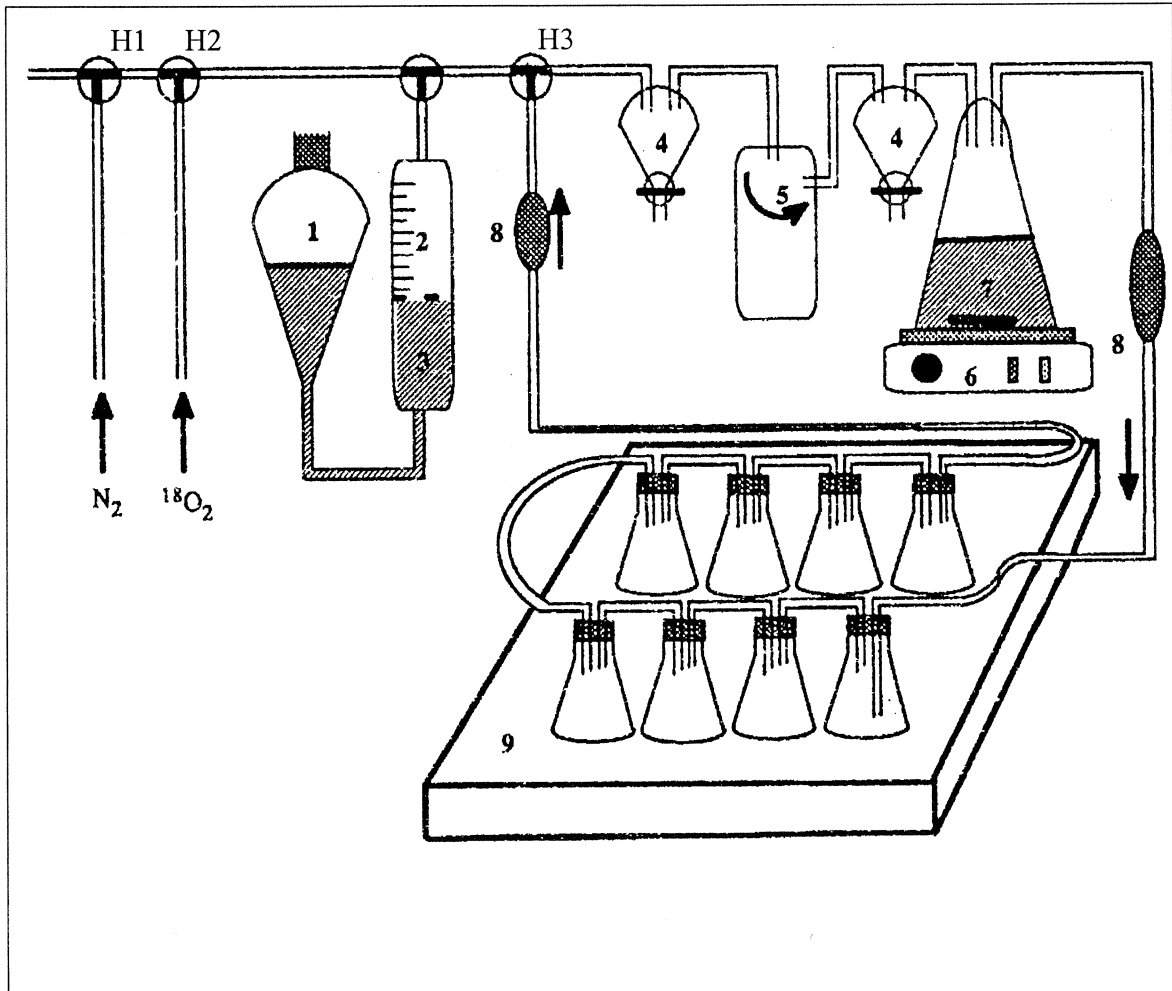
Das Fütterungsexperiment mit L-[Methyl-¹³C]Methionin wurde im Fermenter Braun Biostat B im 1 L-Maßstab im Hafermedium durchgeführt. Man impfte mit 10 Volumenprozent einer 48 h alten Vorkultur desselben Nährmediums an und kultivierte bei 28 °C, 500 rpm und 3.0 vvm. Nach 20 h pumpte man kontinuierlich über 20 h das L-[Methyl-¹³C]Methionin (380 mg, 2.6 mmol) zu, das in 100 ml sterilen Wasser vorgelegt worden war. Zugleich wurde eine pH-Sperre von $\text{pH} = 6.0 \pm 1.0$ angelegt und zur Regulation des pH-Wertes 2.0 N Citronensäure und 0.5 N NaOH vorgelegt. Nach weiteren 4 h arbeitete man die Kulturbrühe nach der Ethylacetatextraktions-Methode auf und erhielt 237 mg Kulturfiltratextrakt. Die Isolierung der ¹³C-markierten Verbindung erfolgte über Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol-Gradient, 99:1 – 5:1; Säule 35.0 × 3.5 cm) und Kristallisation aus Ethylacetat/n-Pentan in einer Ausbeute von 130 mg/L in Form eines weißen Feststoffes.

Die prozentuale Anreicherung und der spezifische Einbau wurden nach Scott⁹³ et al. bestimmt:

$$\text{prozentuale Anreicherung} = 1.1\% \times \frac{(\text{Intensität Signal markierte Verbindung})}{(\text{Intensität Signal Referenzverbindung})} - 1.1\%$$

$$\text{spezifischer Einbau} = \frac{(\text{prozentuale Anreicherung}) \times 100}{(\text{prozentuale Anreicherung der Vorstufe})}$$

2. Kultivierung in einer [$^{18}\text{O}_2$]Atmosphäre



1 = Ausgleichsgefäß, 2 = Gas-Vorratsbehälter, 3 = CuSO_4 -Lösung, 4 = Wasserfalle, 5 = Umluftpumpe, 6 = Magnetrührer, 7 = 5 N KOH-Lösung, 8 = Sterilfilter, 9 = Schüttler

2.1. Anfertigung einer Wachstumskurve

Die Kultivierung erfolgte in einer geschlossenen Apparatur in Schüttelkolben unter Sauerstoffüberdruck. Es wurden sechs Kolben eingesetzt, wobei der erste mit sterilem Wasser, die restlichen mit je 100 ml Hafermedium befüllt wurden. Die Kultivierung erfolgte bei 28 °C, 250 rpm und 5.0 vvm. Die Kolben erntete man nach 22, 25, 30, 34 sowie 47 h, filtrierte und extrahierte das Kulturfiltrat mit 100 ml Ethylacetat. Der Extrakt wurde in 5 ml Ethylacetat gelöst, je 20 μl auf eine DC-Platte aufgetragen und diese im Laufmittelsystem entwickelt (Chloroform/Methanol, 9:1).

2.2. Durchführung der Kultivierung

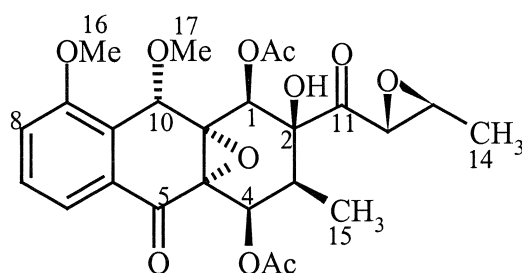
Die Kultivierung in einer [$^{18}\text{O}_2$]Atmosphäre erfolgte in einer geschlossenen Apparatur. Der erste Kolben wurde mit 100 ml sterilem Wasser, die folgenden vier mit je 100 ml Hafermedium befüllt, sterilisiert und mit 1 cm² einer gut bewachsenen Agarplatte angeimpft. Man ließ bei 28 °C, 250 rpm und 5.0 vvm fermentieren. Nach 35 h wurde die Apparatur 3 min mit Stickstoff gespült, dann wurde der Stickstoff herausgepumpt und das [$^{18}\text{O}_2$]Gas eingeleitet. Man ließ bis zur 45. Stunde fermentieren. Die Kulturbrühe wurde nach der Ethylacetatextraktions-Methode aufgearbeitet. Die Isolierung der [^{18}O]markierten Verbindung aus dem Kulturfiltratextrakt (120 mg) erfolgte durch Flash-Chromatographie an Kieselgel (Dichlormethan/Methanol, 97:3; Säule 30 × 2 cm) und Kristallisation aus Ethylacetat/n-Pentan. Man erhielt 12 mg von **4** als weiße Kristalle.

3. Analytik mit der HPLC-UV-CD-Kopplung

100 ml der Kulturbrühe wurden über Celite filtriert, das Kulturfiltrat zweimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Das Mycel wurde zweimal mit je 50 ml Aceton im Ultraschallbad aufgeschlossen, filtriert und die vereinigten organischen Phasen im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Die Extrakte wurden in 2 ml Acetonitril gelöst und 5 min bei 11000 Umdrehungen pro min zentrifugiert.

V. Derivatisierung von Mensacarcin

1. Mensacarcindiacetat (**25**)



Eine Lösung von 97 mg Mensacarcin (**4**) (0.23 mmol, 1.0 eq.) in 1 ml Pyridin wurde bei 0 °C mit 0.2 ml Acetanhydrid (2.12 mmol, 9.2 eq.) versetzt. Die Lösung wurde 8 h unter Kühlung und anschließend 8 h bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktionsmischung

wurde vorsichtig mit 20 ml Eiswasser hydrolisiert und dreimal mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 ml Wasser gereinigt, über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde zweimal mit Toluol versetzt und erneut im Vakuum eingeengt. Das Gemisch (98 mg) wurde an Kieselgel (Dichlormethan/Aceton, 93:7; Säule 35×2.5 cm) gereinigt. Man erhielt 73 mg (0.17 mmol, 76 %) Mensacarcindiacetat (**25**) als gelblichen Feststoff.

$\text{C}_{25}\text{H}_{28}\text{O}_{11}$ (504.49)

Smp.: 208 – 214 °C

R_f -Wert: 0.20 (Dichlormethan/Aceton, 93:7), 0.58 (Chloroform/Methanol, 9:1)

Anfärbeverhalten: braun (Orcin-Sprühreagenz), schwarz (Vanillin-Schwefelsäure)

EI-MS: m/z (%) = 504 (12), 462 (8), 444 (2), 419 (8), 387 (100), 345 (6), 316 (6), 303 (8), 285 (12), 257 (20), 229 (16), 201 (10), 163 (6), 146 (2), 120 (6), 91 (22), 69 (6), 43 (24).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3438$ cm^{-1} (br), 2924, 2854, 1748, 1695, 1591, 1461, 1375, 1264, 1224, 1080, 1031.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 227 nm (15200), 262 (6700), 322 (2800).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 228 nm (14900), 263 (6500), 323 (2620).

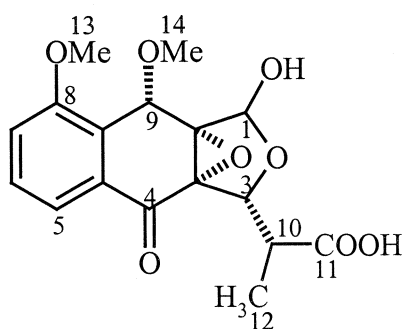
(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 224 nm (16100), 261 (6990), 318 (3210).

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -46^\circ$ ($c = 0.29$, Chloroform)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 260 nm (4.15), 331 (-2.15).

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.92$ (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, 15- H_3), 1.45 (d, $J = 5.0$ Hz, 3H, 14- H_3), 2.05 (s, 3H, OCOCH_3), 2.17 (s, 3H, OCOCH_3), 2.56 (dq, $J = 7.0, 4.0$ Hz, 1H, 3-H), 3.09 (dq, $J = 5.0, 2.0$ Hz, 1H, 13-H), 3.32 (s, 3H, 17-H), 3.47 (s, 1H, 2-OH), 3.64 (d, $J = 2.0$ Hz, 12-H), 3.90 (s, 3H, 16- H_3), 5.47 (s, 1H, 10-H), 5.66 (s, 1H, 1-H), 6.15 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 4-H), 7.16 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, 8-H), 7.40 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.66 (dd, $J = 8.0, 1.0$ Hz, 1H, 6-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3): $\delta = 10.2$ (q, C-15), 17.3 (q, C-14), 20.8 (q, $2 \times \text{OCOCH}_3$), 32.6 (d, C-3), 55.6 und 56.1 (q, C-16 bzw. C-17), 56.1 (d, C-13), 58.2 (d, C-12), 60.6 (s, C-4a), 65.2 (s, C-10a), 65.9 (d), 68.4 (d), 68.8 (d), 80.2 (s, C-2), 116.5 (d, C-8), 119.8 (d, C-6), 125.6 (s, C-9a), 129.8 (d, C-7), 130.8 (s, C-5a), 158.4 (s, C-9), 169.3 bzw. 169.7 (s, OCOCH_3), 188.1 (s, C-5), 205.8 (s, C-11).

2. Mensacarcinsäure (**26**)

30 mg Mensacarcin (**4**) (71 μmol , 1.0 eq.) wurden in 30 ml 0.02 N Natriummetaperiodat-Lösung suspendiert und 5 h bei Raumtemperatur gerührt. Das Gemisch wurde viermal mit je 70 ml Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 30 ml Wasser extrahiert und im Vakuum eingengt. Die Aufreinigung erfolgte an Sephadex LH-20 (Methanol, Säule 35.0 \times 3.0 cm). Man erhielt 21.4 mg (67 μmol , 95 %) Mensacarcinsäure (**26**) als gelblichen Feststoff.

C₁₇H₁₈O₈ (350.10)

Smp.: 164 – 166 °C

R_f-Wert: 0.13 (Chloroform/Methanol, 9:1), 0.23 (Dichlormethan/Methanol, 5:1)

Anfärbeverhalten: schwarz (Vanillin-Schwefelsäure)

EI-MS: m/z (%) = 350.2 (19), 318.2 (14), 290.2 (22), 272.1 (24), 234.1 (23), 218.1 (100), 206.1 (76), 205.1 (38), 175.1 (32), 163.1 (42), 149.1 (12), 119.1 (26), 91.1 (28), 77.0 (16), 58.0 (36), 44.0 (100), 41.0 (8).

HREI-MS: 350.1001 gefunden wie berechnet für C₁₇H₁₈O₈.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3348 cm^{-1} , 2935, 1736, 1693, 1588, 1473, 1405, 1270, 1184, 1090, 1031.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 214 nm (14900), 260 (5200), 317 (2100).

(MeOH/HCl): λ_{max} (ϵ) = 214 nm (14000), 261 (5590), 315 (2020).

(MeOH/NaOH): λ_{max} (ϵ) = 214 nm (14900), 259 (5520), 316 (2360).

Drehwert: $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ = -40° (c = 0.21, Methanol)

CD (MeOH): λ_{extr} ($\Delta\epsilon$) = 233 nm (-2.42), 259 (4.97), 320 (-3.08).

¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD): δ = 1.32 (d, J = 7.0 Hz, 3H, 12-H₃), 2.74 (dq, J = 7.5 Hz, 1H, 10-H), 3.68 (s, 3H, 14-H₃), 3.94 (s, 3H, 13-H₃), 4.70 (d, J = 7.0 Hz, 1H, 3-H),

5.27 (s, 1H, 1-H), 5.56 (s, 1H, 9-H), 7.31 (dd, $J = 7.0, 1.0$ Hz, 1H, 7-H), 7.46 (dd, $J = 7.0$ Hz, 1H, 6-H), 7.52 (dd, $J = 7.0, 1.0$ Hz, 1H, 5-H).

¹³C-NMR (75.5 MHz, CD₃OD): $\delta = 15.0$ (q, C-12), 44.2 (d, C-10), 56.8 (q, C-13), 59.4 (q, C-14), 65.9 (s, C-3a), 71.4 (d, C-9), 72.6 (s, C-9a), 78.0 (d, C-3), 96.1 (d, C-1), 118.1 (d, C-7), 120.3 (d, C-5), 128.4 (s, C-8a), 131.1 (d, C-6), 133.1 (s, C-4a), 160.5 (s, C-8), 180.0 (s, C-11), 191.8 (s, C-4).

C. Literaturverzeichnis

- 1 H.-J. Quadbeck-Seeger, *Nachr. Chem. Tech. Lab*, **1998**, *46*, 111.
- 2 R. Breinbauer, I.R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002.
- 3 N.K. Terrett, *Kombinatorische Chemie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1998**.
- 4 H. Kubinyi, *Pharmazie in unserer Zeit* **1998**, *27*, 92; 158.
- 5 Sir D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, **1999**.
- 6 V. Hellwig, *Chemie in unserer Zeit* **2002**, *36*, 22.
- 7 a) U. Gräfe, *Biochemie der Antibiotika*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, **1992**; b) K. Nakanishi in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Editor: Sir D. Barton, K. Nakanishi, O. Meth-Cohn), *An Historical Perspective of Natural Products Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, New York, **1999**.
- 8 H. Laatsch, *Naturstoffdatenbank AntiBase*, Chemical Concepts, Weinheim, **2002**.
- 9 Autorenkollektiv, *Chapman & Hall Dictionary of Natural Products on CD-ROM*, Hampden Data Services Ltd., **2002**, Version 10:2.
- 10 A. Zeeck, G. Bach, H. Terlau, *Der Internist* **2001**, *42*, 1422.
- 11 a) A. Rügger et al., *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1480; b) C.J. Dunn et al. *Drugs* **2001**, *61*, 1957.
- 12 a) F. Arcamone et al., *Tetrahedron Lett.* **1969**, 1007; b) A.J. Coukell et al., *Drugs* **1997**, *53*, 453; 520.
- 13 J. Rheinheimer, *Nachrichten aus der Chemie* **2000**, *48*, 1070.
- 14 D.J. Faulkner, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 1.
- 15 S. Grabley, R. Thiericke, *Drug Discovery from Nature*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1999**.
- 16 M. Gerlitz, G. Udvarnoki, J. Rohr, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1757.
- 17 C.R. Hutchinson in *Drug Discovery from Nature* (Editor: S. Grabley, R. Thiericke), *Combinatorial Biosynthesis of Antibiotics*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1999**, 233.
- 18 H.B. Bode, B. Bethe, R. Höfs, A. Zeeck, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 619.

-
- 19 B.S. Moore, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 70.
- 20 C. Wagner, K. Eckardt, G. Schumann, W. Ihn, D. Tresselt, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 691.
- 21 M.L. Dickens, N.D. Priestley, W.S. Strohl, *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2641.
- 22 S.D. Bentley, D.A. Hopwood et al., *Nature* **2002**, *417*, 141.
- 23 a) K. Ueda, S. Kawai, H.-O. Ogaswa, A. Kiyama, T. Kubota, H. Kawanobe, T. Beppu, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 979; b) B. Waters, G. Saxena, Y. Wanggui, D. Kau, S. Wrigley, R. Stokes, J. Davies, *J. Antibiot.* **2002**, *55*, 407.
- 24 Y Yamada, T. Nihira in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Editor: Sir D. Barton, K. Nakanishi), *Microbial Hormones and Microbial Chemical Ecology*, Elsevier, Amsterdam, Lausanne, New York, **1999**, 377.
- 25 P. Alvermann, Dissertation, Universität Göttingen, **2001**.
- 26 H. Onaska, H. Tabazta, Y. Igarashi, Y. Sato, T. Furumai, *J. Antibiot.* **2001**, *54*, 1036.
- 27 S. Grabley, R. Thiericke, A. Zeeck in *Drug Discovery from Nature* (Editor: S. Grabley, R. Thiericke), *The Chemical Screening Approach*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1999**, 124.
- 28 G. Bringmann, M. Rückert, C. Günther in *Natural Product Analysis* (Editor: P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab), *Identification of Naphthylisoquinoline Alkaloids by LC-NMR on-line Coupling*, Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden, **1998**.
- 29 S. Heinze, H. Hülsmann, R. Schlegel, U. Gräfe in *Natural Product Analysis* (Editor: P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab), *Advances of Screening for Natural Compounds using Mass Spectrometric Tools*, Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden, **1998**.
- 30 A. Smith, *Nature* **2002**, *418*, 453.
- 31 G. Helmchen, *Tetrahedron Lett.* **1974**, *16*, 1527.
- 32 a) K. Ohkuma, J. Nagatsu, C. Itakura, S. Suzuki, *J. Antibiot., Ser. A* **1962**, *15*, 152; b) K. Ohkuma, S. Suzuki, C. Itakura, T. Sega, Y. Sumiki, *J. Antibiot., Ser. A* **1962**, *15*, 247; c) J. Nagatsu, S. Suzuki, *J. Antibiot. Ser. A* **1963**, *16*, 203; d) C. Itakura, T. Sega, S. Suzuki, Y. Sumiki, *J. Antibiot. Ser. A* **1963**, *16*, 231;

- e) S. Marumo, K. Sasaki, K. Ohkuma, K. Anzai, S. Suzuki, *Agr. Biol. Chem.* **1968**, 32, 209.
- 33 S. Marumo, K. Sasaki, S. Suzuki, *Agr. Biol. Chem.* **1971**, 35, 1931.
- 34 M. Arnold, Diplomarbeit, Universität Göttingen, **1998**
- 35 a) G. Snatzke, *Chemie in unserer Zeit* **1981**, 15, 78; **1982**, 16, 160; b) K. Nakanishi, N. Berova, R.W. Woody, *Circular Dichroism Principles and Applications*, VCH, New York, **1994**; c) S.G. Allenmark, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, 17, 145.
- 36 G. Snatzke, F. Snatzke in *Analytiker-Taschenbuch Band 1* (Editor: H. Kienitz, R. Bock, W. Fresenius, W. Huber, G. Tölg), Springer, Berlin, **1980**, 217.
- 37 a) G. Bringmann, S. Busemann in *Natural Produkt Analysis* (Editor: P. Schreier, M. Herderich, M.-U. Humpf, W. Schwab), Vieweg, Braunschweig, Wiesbaden, **1998**, 195; b) G. Bringmann, J. Kraus, U. Schmitt, C. Puder, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 2729.
- 38 N. Harada, K.I. Nakanishi, *Circular Dichroic Spectroscopy – Exciton Coupling in Organic Stereochemistry*, University Science Books, Mill Vally, CA, **1983**;
b) K. Hör, M. Hasrtl, B. Walford, B. Gutsche, H.-U. Humpf in *Natural Product Analysis* (Editor: P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab), Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden, **1998**, 223.
- 39 R. Bortolo, S. Spera, G. Guglielmetti, G. Cassani, *J. Antibiot.* **1993**, 46, 255.
- 40 H. Drautz, H. Zähler, E. Kupfer, W. Keller-Schierlein, *Helv. Chim. Acta* **1981**, 64, 1752.
- 41 A. Karrer, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1982**, 65, 1432.
- 42 a) A.P. Kozikowski, P. Park, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 1763; **1990**, 55, 4668.
- 43 a) M. Mayer, R. Thiericke, *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 3486; b) C. Puder, Dissertation, Universität Göttingen, **1998**; c) C. Puder, S. Loya, A. Hizi, A. Zeeck, *J. Nat. Prod.* **2001**, 64, 43.
- 44 H. Ohno, T. Saheki, J. Awaya, A. Nakagawa, S. Ōmura, *J. Antibiot.* **1978**, 31, 116.
- 45 A. Nakagawa, H. Ohno, K. Miyano, S. Ōmura, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 3268.
- 46 R.L. Swhone, J.R. Deason, M. Miyano, *J. Org. Chem.* **1986**, 51, 268.
- 47 a) R.W. Spencer, L.J. Copp, J.R. Pfister, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1828;
b) C.W. Groutas, M.A. Stanga, M.J. Brubaker, T.L. Tien, M.K. Moi, R.T. Carroll, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1106.

-
- 48 S. Murao, T. Yada, S. Nagata, *Jap. Pat. 08056643* [A2 19960305], **1996**, 9.
- 49 K. Hostettmann, O. Potterat, J.-L. Wolfender, *Pharm. Ind.* **1997**, 59, 339.
- 50 a) S. Rodriguez, J.-L. Wolfender, K. Hostettmann, G. Odontuya, O. Purev, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 363. b) Z.-M. Gu, D. Zhou, J. Wu, G. Shi, L. Zeng, J.L. McLaughlin, *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 242.
- 51 G. Brinkmann, K. Messer, M. Wohlfarth, J. Kraus, K. Dumbuya, M. Rückert, *Analytical Chemistry* **1999**, 71, 2678.
- 52 F. Brandl, N. Pustet, A. Mannschreck, *Internat. Lab.* **1999**, 29, 10C.
- 53 M. Thorwest, *Diplomarbeit*, Universität Göttingen, **1998**.
- 54 a) O.D. Heusers et al. *J. A. C. S.* **1983**, 105, 3672; b) K. Toshima et al. *J. O. C.* **1997**, 62, 3271.
- 55 a) G. Reinhardt et al. *J. Antibiot.* **1980**, 33, 787; b) S.J. Gould et al. *J. O. C.* **1991**, 56, 6666.
- 56 H.G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1992**.
- 57 F.G. Bader in *The Bacteria* (Editor: I.C. Gunsalus, J.R. Sokatch, L.N. Ornston) Band 9, *Antibiotic-producing Streptomyces* (Editor: S.W. Queener, L.E. Day), Academic Press, London, **1986**, 281.
- 58 J.F. Martin, A.L. Demain, *Microbiological Reviews* **1980**, 230.
- 59 G.G. Yarbrough, D.P. Taylor, R.T. Rowlands, M.S. Crawford, L.L. Lasure, *J. Antibiot.* **1992**, 4, 535.
- 60 C. Puder, *Dissertation*, Universität Göttingen, **1998**.
- 61 M.L. Dekleva, J.A. Titus, W.R. Strohl, *Can. J. Microbiol.* **1985**, 31, 287.
- 62 H. Iwaki, Y. Nakayama, M. Takahashi, S. Uetsuki, M. Kido, Y. Fukuyama, *J. Antibiot.* **1984**, 37, 1091.
- 63 I. Sattler, R. Thiericke, A. Zeeck, *Nat. Prod. Rep.* **1998**, 15, 221.
- 64 G. Chen, G.-Y.-S. Wang, X. Li, B. Waters, J. Davies, *J. Antibiot.* **2000**, 53, 1145.
- 65 N. Chauret, A. Gauthier, D.A. Nicoll-Griffith, *Drug Metabolism and Disposition* **1998**, 2.
- 66 a) D.K. Holdsworth, *Planta Med.* **1972**, 22, 54; b) Q.M. Che, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, 39, 704.

- 67 W.-H. Yeo, B.-S. Yun, S.-S. Kim, E.-K. Park, Y.-H. Kim, I.-D. Yoo, S.-H. Yu, *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 952.
- 68 S. Omura, H. Ikeda, H. Matsubara, N. Sadakane, *J. Antibiot.* **1980**, *33*, 1570.
- 69 H.B. Bode, M. Walker, A. Zeeck, *Eur. J. Org. Chem.* **2000**, 1451.
- 70 P.A. Miller, A. Saturnelli, J.H. Martin, L.A. Mitscher, N. Bohonos, *Biochem. Biophys. Com.* **1964**, *16*, 285.
- 71 C.J. Pearce, R.R. West, G.T. Carter, *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 1809.
- 72 H. Oikawa, A. Ichihara, S. Saksmura, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 908.
- 73 S. Pospíšil, P. Sedmera, V. Havlíček, J. Tax, *Applied and Environmental Microbiology* **1994**, *60*, 1561.
- 74 H. Iwaki, Y. Nakayama, M. Takahashi, S. Uetsuki, M. Kido, Y. Fukuyama, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 1091.
- 75 a) L.J. Haynes, *J. C. S. (C)* **1970**, 2581; b) T. Blitzke, *Nat. Prod. Lett.* **2001**, *15*, 27.
- 76 Y. Kashiwada, G.-I. Nonaka, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bull.* **1984**, *32*, 3493.
- 77 a) B.J. Rawlings, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 425; b) B. Shen in *Topics in Current Chemistry, Vol 209: Biosynthesis* (Editor: F.J. Leeper, J.C. Vederas), *Biosynthesis of Aromatic Polyketids*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **2000**, 3; c) M. Richardson, C. Khosla in *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Editor: Sir D. Barton, K. Nakanishi), *Structure, Function, Engineering of Bacterial Aromatic Polyketide Synthases*, Elsevier, Amsterdam, New York, **1999**, 474; d) D.A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465.
- 78 T.J. Simpson in *Topics in Current Chemistry, Vol. 195: Biosynthesis, Polyketids and Vitamins* (Editor: F.J. Leeper, J.C. Vederas) *Application of isotopic methods to secondary metabolic pathways*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**, 1.
- 79 C.R. Hutchinson, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2525.
- 80 J. Rohr, C. Mendez, J.A. Salas, *Bioorg. Chem.* **1999**, *27*, 41.
- 81 K. Krohn, J. Rohr in *Topics in Current Chemistry, Vol. 188: Bioorganic Chemistry, Deoxysugars, Polyketids and Related Classes: Synthesis, Biosynthesis, Enzymes* (Editor: J. Rohr), *Angucyclines: TotalSyntheses, New Structures, and Biosynthetic Studies of an Emerging New Class of Antibiotics*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**, 127.

-
- 82 I. Fujii, Y. Ebizuka, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2511.
- 83 C. Bisang, P.F. Long, J. Cortés, J. Westcott, J. Crosby, A.-L. Matharu, R.J. Cox, T.J. Simpson, J. Staunton, P.F. Leadlay, *Nature* **1999**, *401*, 502.
- 84 a) K. Eckardt, G. Schumann, D. Tresselt, W. Ihn, *J. Antibiot.* **1988**, *41*, 788;
b) K. Eckardt, G. Schumann, U. Gräfe, W. Ihn, C. Wagner, W.F. Fleck, H. Thrum, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1096.
- 85 K. Eckardt, D. Tresselt, G. Schumann, W. Ihn, C. Wagner, *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1034.
- 86 C. Wagner, K. Eckardt, G. Schumann, W. Ihn, D. Tresselt, *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 691.
- 87 P.R. Ortiz de Montellano, J.J. De Voss, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 477.
- 88 A.G. Prescott, M.D. Lloyd, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 367.
- 89 S. Marumo, K. Sasaki, K. Ohkuma, K. Anzai, S. Suzuki, *Agr. Biol. Chem.* **1968**, *32*, 209.
- 90 Grever et al., *Seminars in Oncology* **1992**, *19*, 622.
- 91 W.C. Still, M. Kahn, A. Mitra, *J. Org. Chem.*, **1978**, *43*, 2923-2925.
- 92 Merck, *Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromathographie*, Darmstadt, **1980**.
- 93 A.I. Scott, C.A. Townsend, K. Okada, *J. Am. Chem. Soc.*, **1974**, *96*, 8069.

Danksagung

Für die guten fachlichen Anregungen sowie für viele interessante Gespräche und Diskussionen möchte ich mich herzlichst bei Frau Dr. G. Bach, Herrn Dr. M. Thorwest, Herrn Dr. C. Puder, Herrn Dr. M. Brüning, Herrn Dr. H.-B. Bode, Herrn T. Schuhmann, Frau L. Liang und Frau N. Pöhlmann bedanken.

Frau Dr. S. Grond, Frau Dr. M. Holzenkämpfer, Frau Dr. P. Alvermann, Frau A. Schulze, Herrn K. Ströch, Frau B. Girmann, Frau L. Hoffmann und Herrn G. Thormann und möchte ich für die gute Atmosphäre bei der Zusammenarbeit im Medizinerpraktikum danken. Frau G. Gastrock und Frau M. Wagener danke ich für die Hilfe beim Erstellen von Skripten, Arbeiten und Tests. Für die Unterstützung meiner Arbeit im Labor und die vielen logistischen und praktischen Tipps möchte ich Frau M. Klingebiel und Herrn H.-P. Kroll danken. Herr H.-J. Langer hat mich bei der Durchführung von Fermentationen tatkräftig unterstützt, wofür ich ihm sehr dankbar bin. J. Bitzer und Herrn G. Thormann möchte ich für Installation und Pflege der Computernetzwerke sowie die Installation zahlreicher Computer-Programme danken. Für die Anleitung zur Durchführung von NMR-Experimenten möchte ich Herrn Dr. P. Krastel und Frau Dr. I. Papastavrou sowie Herrn R. Machinek danken. Für logistische und praktische Tipps bei der NMR-Spektroskopie danke ich Frau C. Zolke, Frau C. Siebert sowie Herrn M. Weitemeyer. Ich danke D. Wolff, Herrn J. Bitzer und Herrn S. Meyer für die Messung von NMR-Spektren. Für die Messung von zahlreichen CD-Spektren für das CD-Screening möchte ich mich bei Frau L. Liang bedanken. Frau G. Udvarnoki, Herrn Dr. G. Remberg und Herrn Dr. Frauendorf danke ich für die Aufnahme von Massenspektren und ihre große Hilfsbereitschaft. Bei allen Mitgliedern der Abteilung möchte ich mich für das gute Arbeitsklima sowie für viele angenehme und fröhliche Stunden bei Kaffee, Kuchen und den traditionellen Abteilungsausflügen sehr herzlich bedanken. Bei Frau A. Schulze und Herrn Dr. M. Thorwest möchte ich mich für ihr sorgfältiges Korrekturlesen sowie für viele wertvolle Anregungen bei der Erstellung dieses Manuskripts bedanken.

In ganz besonderem Maße danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich auf meinem Weg in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

Am 9. Mai 1973 wurde ich als zweiter Sohn des Oberstudienrates Frank Arnold und seiner Ehefrau Heide Arnold, geb. Rademacher, in der Lessingstadt Wolfenbüttel geboren.

Von August 1979 bis Juni 1983 besuchte ich die Grundschule, von August 1983 bis Juni 1985 die Orientierungsstufe Cranachstraße und wechselte im August 1985 auf das Gymnasium „Große Schule“ in Wolfenbüttel. Dort beendete ich im Juni 1992 meine Schullaufbahn mit der Allgemeinen Hochschulreife.

Von August 1992 bis Oktober 1993 arbeitete ich als Zivildienstleistender im Altenwohnheim „Im Kamp“.

Zum Wintersemester 1993/1994 begann ich das Studium der Chemie an der Georg-August-Universität zu Göttingen. April 1996 legte ich die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab. von August bis November 1997 beteiligte ich mich im Rahmen des ERASMUS Austausch-Programmes an Forschungsarbeiten zu dem Mechanismus der Mangan(salen)-katalysierten Epoxidierung von Alkenen bei Prof. B. Åkermark an der Kungliga Tekniska Högskolan in Stockholm/Schweden.

Von Januar bis September 1998 fertigte ich unter der Leitung von Prof. Dr. A. Zeeck meine Diplomarbeit mit dem Titel „Neue mikrobielle Sekundärmetabolite aus einem modifizierten CD-Screening sowie Strukturaufklärung und Biogenese des Antitumor-Wirkstoffes Mensacarcin“ an und bestand im Oktober 1998 die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung.

Seit November 1998 arbeite ich unter Anleitung von Prof. Dr. A. Zeeck an der vorliegenden Dissertation.

