

Naturstoffe aus endophytischen Pilzen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

vorgelegt von

Sebastian Maschke (geb. Gohlke)
geboren in Bad Saarow-Pieskow

Bielefeld, Juli 2019

1. Gutachter: Prof. Dr. Norbert Sewald

Lehrstuhl für Organische und Bioorganische Chemie

Fakultät für Chemie

Universität Bielefeld

2. Gutachter: Prof.in Dr. Caroline Müller

Lehrstuhl für Chemische Ökologie

Fakultät für Biologie

Universität Bielefeld

Eingereicht am: 31.07.2019

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2019

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Sebastian Maschke (geb. Gohlke), an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel "Naturstoffe aus endophytischen Pilzen" selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, sowie die den Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Informationen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit ist weder in gleicher noch in ähnlicher Form komplett oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung vorgelegt worden.

Bielefeld, den 31.07.2019

Sebastian Maschke (geb. Gohlke)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Arbeitskreis Organische und Bioorganische Chemie der Fakultät für Chemie an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert Sewald angefertigt, dem ich ganz herzlich für die Möglichkeit an diesem spannenden Thema Arbeiten zu können und für die gute Betreuung danken möchte.

Frau Prof.in Dr. Caroline Müller danke ich sehr für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei Anke Nieß für Bestellungen, Organisation und Hilfe rund ums Labor, bei Marco Wißbrock für die hervorragende Instandhaltung der Laborgeräte, schnelle Reparaturen und Spezial-NMR-Messungen, bei Carmela Michalek für die Durchführung von Bioaktivitätstests und die Einweisung in molekular-biologische Methoden und bei Peter Mester für extra lange NMR-Messungen, sowie bei Iris Dopheide für die Hilfe bei der Unibürokratie und ebenfalls Dr. Marcel Frese für die Klärung organisatorischer Angelegenheiten und der Hilfe bei wissenschaftlichen Fragestellungen bedanken.

Zudem danke ich meinem Labornachbarn Nils G. Janson für die Hilfe bei chemischen Synthesearbeiten, geduldige Erklärungen für ein tieferes chemisches Verständnis und das Korrekturlesen, Dr. Pia Neubauer und Dr. Daniel Wibberg für die Einführung in Bioinformatik und phylogenetischen Analysen, dem Chemikalienlager für die immer freundliche Versorgung mit Chemikalien und Glasgeräten, der Massenspektrometrie-Abteilung für die Messung schwieriger Proben, sowie Jannik Paulus für Drehwert-Notfallmessungen und die Korrekturlesung und den vielen internationalen Naturstoff-Gastwissenschaftlern (Prof. Dr. Bruno Ndjakou Lenta, Prof. Dr. Mohamed Shaaban, Dr. Negera Abdissa Ayana, Dr. Abdelaaty Hamed Mona etc.) für die Einführung in das spannende Feld der Naturstoffforschung und die fruchtbaren Diskussionen von NMR-Spektren.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern, Doktoranden und Studierenden der OCIII für die vielen positiven Erfahrungen und Erlebnisse im und abseits des Labors bedanken. Ebenfalls danke ich meinen Eltern für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Des Weiteren danke ich meiner Tochter Johanna, welche die größte Motivation war diese Arbeit abzuschließen.

Abschließend danke ich besonders meiner Frau Juliane Maschke für das sorgfältige Korrekturlesen, aufmerksames Zuhören bei Vorträgen und fachlichen Ausführungen und nicht zuletzt für die Liebe, aufmunternde Worte und Zuspruch, welche zum Gelingen der Arbeit wesentlich beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	i
Danksagung.....	ii
Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	xvii
Symbolverzeichnis.....	xix
Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis	xx
Abstract (Englisch).....	xxiv
Abstract (Deutsch)	xxv
1. Einführung.....	1
1.1. Einleitung.....	1
1.2. Aufgaben und Ziel der Arbeit.....	2
2. Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1. Naturstoffe	3
2.1.1. Der Begriff Naturstoff.....	3
2.1.2. Naturstoffe als Quelle von Wirkstoffen.....	4
2.1.3. Bioaktive Inhaltsstoffe aus Pilzen	6
2.1.4. Das Potenzial zur Entdeckung neuer Arten, Produktion bioaktiver Naturstoffe und biotechnologischen Nutzung endophytischer Pilze	8
2.2. Endophyten.....	11
2.2.1. Der Begriff Endophyt	11
2.2.2. Verbreitung und Vorkommen von Endophyten	12
2.2.3. Klassifizierung endophytischer Pilze.....	12
2.2.4. Funktion der Pflanzen-Endophyt Wechselwirkung.....	13
2.2.5. Besiedlung und Lebenszyklus von Endophyten.....	15
2.2.6. Nachweis und Isolierung endophytischer Pilze	18
2.2.7. Identifizierung und taxonomische Einordnung von endophytischen Pilzen.....	20
2.2.8. Rationale Pflanzenwahl, Aspekte der Beprobung und Diversität der Endophyten-gemeinschaft.....	23
2.3. Trenntechniken	26
2.3.1. Chromatographische Trenntechniken	26
2.3.2. Flüssigkeits-Adsorptionschromatographie	28
2.3.3. Größenausschlusschromatographie	32
2.4. Analytik zur Strukturaufklärung von Naturstoffen.....	34
2.4.1. Massenspektrometrie	34

2.4.2. NMR-Spektroskopie	36
2.4.3. Erstellung der Molekülstruktur	38
2.4.4. Dereplikationsstrategien	39
3. Material und Methoden	43
3.1. Pflanzenproben.....	43
3.2. Isolierung endophytischer Pilze.....	44
3.3. Stammhaltung und Kultivierung	46
3.3.1. Submers-Fermentation.....	46
3.3.2. Kryokonservierung.....	47
3.3.3. Solid-State-Fermentation.....	48
3.4. Stammidentifizierung.....	49
3.4.1. Gewinnung und Aufreinigung der DNA.....	49
3.4.2. Amplifizierung der DNA-Barcode Region.....	49
3.4.3. Sequenzierung und Sequenzabgleich	52
3.4.4. Phylogenie.....	53
3.5. Extraktion der Pilzmetaboliten.....	54
3.6. Bioaktivitätstests	55
3.6.1. Agardiffusionstest.....	55
3.6.2. Inhibitorkonzentrationen (IC ₅₀ , MIC).....	57
3.6.3. Zytotoxizitäts Test.....	60
3.7. Substanzisolierung.....	61
3.7.1. Flüssig-Flüssig- Extraktion.....	61
3.7.2. Flüssigkeitssäulenchromatographie.....	62
3.7.3. Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC).....	64
3.7.4. Größenausschlusschromatographie	65
3.7.5. Präparative-Dünnschichtchromatographie.....	65
3.7.6. Kristallisation	66
3.8. Analytik.....	67
3.8.1. Dünnschichtchromatographie	67
3.8.2. RP-HPLC-(MS).....	68
3.8.3. MS-Analytik	71
3.8.4. NMR-Analytik	72
3.8.5. Kristallstrukturanalyse	72
3.8.6. Computer und Datenbank assistierte Strukturidentifizierung.....	73
3.9. Synthesearbeiten.....	74
3.9.1. Methylierung von Auranticin A	74

3.10. Sonstige Materialien und Geräte.....	75
4. Ergebnisse und Diskussion	77
4.1. Isolierte endophytische Pilze.....	77
4.1.1. Kultivierte und identifizierte Endophytenstämme	78
4.1.2. Diversität der isolierten Endophyten	81
4.1.2.1. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Abteilung	81
4.1.2.3. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Ordnung	83
4.1.2.4. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Familie.....	85
4.2. T26B (<i>Purpureocillium lilacinum</i>).....	89
4.2.1. Stammidentifizierung und Auswahl.....	90
4.2.2. Extraktbearbeitung	92
4.2.3. Isolierte und charakterisierte Verbindungen aus Stamm T26B.....	95
4.2.3.1. Leucinostatine.....	95
4.2.3.2. Leucinostatinderivate und deren Produktionsorganismen	99
4.2.3.3. Biologische Aktivität der Leucinostatine	100
4.2.3.4. Alternariol (T26B2-203a).....	102
4.2.3.5. Lilacinolid (T26B2-205)	105
4.2.3.6. Weitere aus Stamm T26B isolierte Verbindungen	111
4.2.4. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm T26B und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von <i>Purpureocillium</i> -Arten.....	112
4.3. Stamm TS7 (<i>Xylaria cubensis</i>).....	115
4.3.1. Stammidentifizierung und Auswahl.....	116
4.3.2. Extraktbearbeitung	118
4.3.3. Isolierte und charakterisierte Verbindung aus Stamm TS7	120
4.3.3.1. (<i>R</i>)-5-Methoxycarbonylmellein (TS7-202).....	120
4.3.3.2. Akolitserin (TS7-230-1)	123
4.3.3.3. (+)-Griseofulvin (TS7-207).....	125
4.3.3.4. Cytochalasin C (TS7-218).....	129
4.3.3.5. Cytochalasin D (TS7-232-2).....	132
4.3.3.6. 19,20-Epoxycytochalasin D (TS7-235)	135
4.3.3.7. Hirsutatin (TS7-232a).....	137
4.3.4. Vergleichende Diskussion der Cytochalasine	141
4.3.4.1. Die Struktur der Cytochalasine und Cytochalasane.....	141
4.3.4.2. Biologische Aktivität von Cytochalasinen und zytotoxischen TS7 Metaboliten	145
4.3.4.3. Produktionsorganismen und ökologische Funktion von Cytochalasinen.....	148

4.3.5. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm TS7 und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von <i>Xylaria</i> -Arten.....	150
4.4. Stamm SG1 (<i>Daldinia</i> sp.).....	153
4.4.1. Stammidentifizierung und Auswahl.....	154
4.4.2. Extraktbearbeitung	158
4.4.3. Isolierte und charakterisierte Verbindung aus Stamm SG1.....	160
4.4.3.1. (+)-Orthosporin (SG1-202).....	160
4.4.3.2. 1,8-Dimethoxynaphthalen (SG1-203).....	164
4.4.3.3. Hept-6-en-2,4,5-triol (SG1-212a).....	167
4.4.3.4. Daldiniapyron (SG1-219).....	171
4.4.3.5. <i>N</i> -Acetylphenylalanin (SG1-230).....	174
4.4.3.6. Weitere aus Stamm SG1 isolierte Verbindungen.....	177
4.4.4. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm SG1 und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von <i>Daldinia</i> -Arten.....	179
4.5. Stamm SG8c (cf. <i>Tremateia</i> sp.).....	181
4.5.1. Stamm Identifizierung und Auswahl.....	182
4.5.2. Extraktbearbeitung	185
4.5.3. Isolierte Depsidon- und Depsidverbindungen	187
4.5.3.1. Auranticin A (SG8c-102)	187
4.5.3.2. Tremateiasidon A (SG8c-106).....	191
4.5.3.3. Piloboluson C (SG8c-107).....	195
4.5.3.4. Auranticin B (SG8c-108)	197
4.5.3.5. SG8c-110a.....	199
4.5.3.6. Tremateiasidon B (SG8c-122).....	201
4.5.3.7. SG8c-128.....	204
4.5.3.8. Tremateiasidon C (SG8c-132).....	206
4.5.3.9. SG8c-149.....	209
4.5.3.10. Tremateiasid A (SG8c-105).....	211
4.5.4. Vergleichende Diskussion der Depsidone und Depside.....	214
4.5.4.1. Isolierungsquellen von Depsidonen und Depsiden.....	214
4.5.4.2. Pharmakologische Eigenschaften der Depsidone und Depside.....	215
4.5.4.3. Antibakterielle und antiproliferative Eigenschaften der isolierten Depside und Depsidone	217
4.5.5. Neue Verbindungen aus Stamm SG8c.....	220
4.5.5.1. Tremateiajulin A (SG8c-114).....	220
4.5.5.2. ³ S-Norgliovictin (SG8c-140)	226
4.5.5.3. Tremachroman A (SG8c-143)	231

4.5.5.4. Tremaquin A (SG8c-146a)	235
4.5.6. Weitere aus Stamm SG8c isolierte Verbindungen	239
4.5.6.1.: (-)-Gliovictin (SG8c-141)	239
4.5.6.2. Riparin C (SG8c-126a).....	241
4.5.6.3. SG8c-133.....	244
4.5.6.4. Gymnoascolid A (SG8c-148).....	246
4.5.6.5. Häufig isolierte Metabolite	249
4.5.7. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm SG8c	250
4.6. Stamm SG25 (<i>Biscogniauxia</i> sp.).....	251
4.6.1. Stammidentifizierung und Auswahl.....	252
4.6.2. Extraktbearbeitung	255
4.6.3. Isolierte und charakterisierte Verbindungen aus Stamm SG25	257
4.6.3.1. (<i>R</i>)-5-Methylmellein (SG25-105)	257
4.6.3.2. Methyltriaceticlacton (SG25-110a)	260
4.6.3.3. SG25-112	262
4.6.3.4. 5-O-Acetylmevalonsäure (SG25-116a)	265
4.6.3.5. (+)- <i>trans</i> -4-Hydroxyscytalon (SG25-119).....	267
4.6.3.6. SG25-136	270
4.6.3.7. Weitere isolierte Metaboliten aus Stamm SG25	274
4.6.4. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm SG25 und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von <i>Biscogniauxia</i> -Arten.....	275
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	277
5.1. Zusammenfassung	277
5.2. Ausblick	280
Quellen und Literaturnachweise	283

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1.: Antibakteriell wirksame Naturstoffe aus Pilzen: a) Benzylpenicillin, b) Cephalosporin C, c) Fusidinsäure (eigene Darstellung).....	6
Abbildung 2.2.: In der Humanmedizin eingesetzte Wirkstoffe aus Pilzen: a) Cyclosporin A, b) Griseofulvin, c) Lovastatin (eigene Darstellung).....	7
Abbildung 2.3.: Beispiele für industriell wichtige pflanzliche Metaboliten welche auch von Endophyten produziert werden: a) Paclitaxal (Taxol) b) Diosgenin c) Hypericin (eigene Darstellung).....	9
Abbildung. 2.4.: Lebenszyklus und Transmission von Endophyten zum und vom Wirt (eigene Darstellung).....	15
Abbildung 2.5: Schema zur Anordnung der nrDNA Gene und der ITS-Region mit Position der Primer (eigene Darstellung modifiziert nach Toju <i>et al.</i> 2012).	20
Abbildung: 2.6.: Prinzipskizze eines chromatographischen Trennungsvorgangs mittels Adsorption an der stationären Phase und Lösemittel-elution: a) Auftragung des Komponentengemisches b) Unterschiedliche Retention der Komponenten und Transport mit der mobilen Phase c) Elution der Komponente mit der geringsten Wechselwirkung zur stationären Phase. ↓ Flussrichtung, - - - stationären Phase (eigene Darstellung).....	28
Abbildung 2.7.: Schematische Darstellung von beteiligten Wechselwirkungen zwischen Eluent und stationären Phase am Beispiel von RP-Materialtyp als stationäre Phase, → Flussrichtung, ↓ Phasenwechsel, - - - sorbierter Lösemittelfilm: a) Adsorption und Desorption b) Verteilung am Flüssigkeitsfilm und sorbierten Lösemittelmolekülen c) solvophobe-Interaktion (eigene Darstellung).	30
Abbildung 2.8.: Fließdiagramm zur Trennung mittels Säulenchromatographie (eigene Darstellung).	31
Abbildung 2.9.: Schema zur Größenausschlusschromatographie, ↓ Flussrichtung: a) Beginn des Trennvorgangs b) Unterschiedliche Retention der Gemischkomponenten c) Elution der Verbindung mit dem größten hydrodynamischen Volumen (eigene Darstellung, angelehnt an Wu <i>et al.</i> 1995).	32
Abbildung 2.10.: Prinzipskizze zu Bestandteilen von Massenspektrometern (eigene Darstellung, angelehnt an Gross 2013).....	34
Abbildung 3.1.: Isolierung von Endophyten: a) Pflanzenmaterial (Blätter, <i>Carpobrotus rossii</i>) nach Oberflächensterilisierung b) Kultivierung auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit Zusatz von Chloramphenicol c) Transferierung von auftretendem Mycelgeflecht d) separierte Kultivierung als axenische Kultur (eigene Darstellung).....	45
Abbildung 3.2.: Submers-Fermentation am Beispiel von: a) SG14ba (<i>Umbelopsis</i> sp.), b) SG18e (<i>Penicillium</i> sp.), c) SG16 (<i>Gelasinospora</i> sp.), d) SG21 (<i>Peziza</i> sp.) (eigene Darstellung).....	46
Abbildung 3.3.: Festphasen-Fermentation am Beispiel von: a) SG10 (<i>Coniothyrium</i> sp.), b) SG14c (<i>Mucor</i> sp.), c) SG17a (<i>Biscogniauxia</i> sp.), d) SG18d (<i>Pseudoplectania</i> sp.) (eigene Darstellung).....	48
Abbildung 3.4.: Visualisierung amplifizierter ITS-nrDNA aus genomischer DNA nach Trennung durch Gelelektrophorese am Beispiel verschiedener Stämme der SG-Reihe (eigene Darstellung).....	51

Abbildung 3.5.: Phylogenetischer Baum erstellt durch Maximum-Likelihood Methode und 1000 Bootstrap-Replikationen am Beispiel von SG25 zur Absicherung der Klassifizierung als <i>Biscogniauxia</i> sp. mit ITS-Vergleichssequenzen aus der Familie Xylariaceae (eigene Darstellung).....	53
Abbildung 3.6.: Farbvariation von Extrakten am Beispiel von: a) SG1 (<i>Daldinia</i> sp.), b) SG3 (<i>Penicillium</i> sp.), c) TS5 (<i>Khuskia</i> sp.), d) SG8c (cf. <i>Tremateia</i> sp.) (eigene Darstellung).	54
Abbildung 3.7.: Beispiel eines Agar-Diffusions-Assay gegen <i>Staphylococcus warneri</i> (eigene Darstellung).....	56
Abbildung 3.8.: Farbentwicklung einer Testreihe zur MIC-Bestimmung nach Resazurinzugabe am Beispiel isolierter Depsidone aus Stamm SG8c gegen <i>Bacillus subtilis</i> (eigene Darstellung).....	58
Abbildung 3.9.: Dose-Response Kurve und Messwerte aus einer Verdünnungsreihe zur Bestimmung der IC ₅₀ - und MIC-Konzentration am Beispiel von Verbindung SG8c-105 gegenüber <i>B. subtilis</i> (eigene Darstellung).....	59
Abbildung 3.10.: Flüssig-Flüssig-Extraktion: a) Vorbehandlungsschema, b) Phasentrennung im Scheidetrichter (eigene Darstellung).....	61
Abbildung 3.11.: Säulenchromatographische Auftrennung am Beispiel von EtOAc Rohextrakt des Stammes SG25 (eigene Darstellung).	62
Abbildung 3.12.: Aufreinigung durch Kristallisation am Beispiel einer Unterfraktion des EtOAc Extraktes von Stamm SG25 (<i>Biscogniauxia</i> sp.) (eigene Darstellung).....	66
Abbildung 4.1.1.: Abbildungszusammenstellung einiger isolierter Endophytenstämme auf Kartoffel-Dextrose-Agar (von links): 1. Reihe: <i>Dothiorella</i> sp. (SG4), <i>Stemphylium</i> sp. (SG6), <i>Pestalotiopsis</i> sp. (SG7); 2. Reihe: <i>Verrucoconiothyrium</i> sp. (SG10), <i>Preussisia</i> sp. (SG11), <i>Waydora</i> sp. (SG12); Reihe 3: <i>Khusia</i> sp.(SG14a), <i>Pyronema</i> sp. (SG15b), <i>Gelasinospora</i> sp. (SG16); Reihe 4: <i>Biscogniauxia</i> sp. (SG17a), <i>Pseudoplectania</i> sp. (SG18d), <i>Xylariaceae</i> sp. (SG19); Reihe 5: <i>Daldinia</i> sp. (SG22), <i>Valsa</i> sp. (SG23), <i>Penicillium</i> sp. (SG24) (eigene Darstellung).	77
Abbildung 4.1.2.: Verteilung der Endophytenisolate nach taxonomischem Rank Klasse (eigene Darstellung).....	82
Abbildung 4.1.3.: Verteilung der Endophytenisolate nach taxonomischem Rank Ordnung (eigene Darstellung).....	83
Abbildung 4.1.4.: Verteilung der Endophytenisolate nach taxonomischem Rank Familie (eigene Darstellung).....	85
Abbildung 4.2.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm T26B (<i>Purpureocillium lilacinum</i>): Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (oben links), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (oben rechts), Initiale Säulenchromatographie (unten links) DCM-H ₂ O Flüssig-Flüssig-Extraktion (unten), nach RP-HPLC isolierte Verbindung T26B2-203a (unten rechts) (eigene Darstellung).	89
Abbildung 4.2.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit ITS-Sequenz des Stammes T26B und Vergleichsreferenzen aus der Ordnung Hypocreales mit 1000 Bootstrap Replikationen und <i>Aspergillus nidulans</i> als Outgroup (eigene Darstellung).	90
Abbildung 4.2.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm T26B (eigene Darstellung).....	94

Abbildung 4.2.4.: Struktur von Verbindung T26BI-106 (Leucinostatin B2, R ¹ = H, R ² = -, R ³ = -), T26BI-107 (Leucinostatin B, R ¹ = H, R ² = OH, R ³ = H), T26BI-108 (Leucinostatin A, R ¹ = CH ₃ , R ² = OH, R ³ = H), T26BI-110 (Leucinostatin A2, R ¹ = CH ₃ , R ² = -, R ³ = -) (eigene Darstellung).....	95
Abbildung 4.2.5.: Vergleich des ¹ H-NMR von T26BI-109 (oben, putatives neues Leucinostatin) und T26BI-106 (unten, Leucinostatin B2) im Bereich der amidischen und olefinischen Protonen	97
Abbildung 4.2.6.: Chromatographisches Profil der Leucinostatinfraktion (eigene Darstellung).	98
Abbildung 4.2.7.: Struktur von Verbindung T26B2-203a (eigene Darstellung).	102
Abbildung 4.2.8.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von T26B2-203a in DMSO-D ₆ (eigene Darstellung).	103
Abbildung 4.2.9.: Struktur von Verbindung T26B2-205 (eigene Darstellung).	105
Abbildung 4.2.10.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von T26B2-205 in MeOH-D ₄ (eigene Darstellung).....	107
Abbildung 4.2.11.: CD-Spektrum von Lilacinolid A (T26B2-205) in MeOH und ACN bei c = 1 mM (eigene Darstellung).	108
Abbildung 4.2.12.: Derivate und Strukturanaloga von T26B2-205: a) 3-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-on, b) (-)-Loliolid, c) N-Acetylhomoserinlacton (R = C ₄ -C ₁₄ -Kette, Substitution an Position 3 der Kette möglich) (eigene Darstellung).....	109
Abbildung 4.2.13.: Struktur von den häufig isolierten Verbindungen: a) 1-Linolyglycerol, b) Hexadecansäure, c) Ergosterolperoxid (eigene Darstellung).....	111
Abbildung 4.2.14.: In der Literatur neu isolierte Metabolite aus <i>P. lilacinum</i> (<i>P. lilacinus</i>): a) Paecilomid, b) Paecilopyron A, c) Phomaligol B, d) Purpureon (eigene Darstellung)....	113
Abbildung 4.3.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm TS7 (<i>Xylaria</i> sp.): Axenische Kultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (oben), Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (mitte links), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (mitte rechts), Rohextrakte nach EtOAc-H ₂ O Flüssig-Flüssig-Extraktion (EtOAc-Fraktion unten links, H ₂ O-Fraktion unten rechts) (eigene Darstellung).	115
Abbildung 4.3.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit ITS-Sequenz des Stammes TS7 und Vergleichsreferenzen aus der Ordnung Xylariales mit 1000 Bootstrap Replikationen und <i>Aspergillus nidulans</i> als Outgroup (eigene Darstellung).	117
Abbildung 4.3.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm TS7 (eigene Darstellung).....	119
Abbildung 4.3.4.: Struktur von Verbindung TS7-202 (eigene Darstellung).	120
Abbildung 4.3.5.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-202 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	121
Abbildung 4.3.6.: Struktur von Verbindung TS7-230 (eigene Darstellung).	123
Abbildung 4.3.7.: Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-230-1 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	124

Abbildung 4.3.8.: Struktur von Verbindung TS7-207 (eigene Darstellung).	125
Abbildung 4.3.9.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-207 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	126
Abbildung 4.3.10.: Kristallstruktur von Griseofulvin (C - grau, H - weiß, O - rot, Cl - grün) (eigene Darstellung).	127
Abbildung 4.3.11.: Struktur von Verbindung TS7-218 (eigene Darstellung).	129
Abbildung 4.3.12.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-218 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	131
Abbildung 4.3.13.: Struktur von Verbindung TS7-223-2 (eigene Darstellung).	132
Abbildung 4.3.14.: Kristallstruktur von Cytochalasin D (TS7-223-2): a) Pyrrolring in Zeichenebene (oben), b) Cyclohexanring in Zeichenebene (unten), (C - grau, H - weiß, O - rot, N - blau) (eigene Darstellung).	133
Abbildung 4.3.15.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-223-2 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	134
Abbildung 4.3.16.: Struktur von Verbindung TS7-235 (eigene Darstellung).	135
Abbildung 4.3.17.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-235 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	136
Abbildung 4.3.18.: Struktur von Verbindung TS7-232a (eigene Darstellung).	137
Abbildung 4.3.19.: COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-232a in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	139
Abbildung 4.3.20.: Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen von TS7-232a in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	140
Abbildung 4.3.21.: a) Strukturvielfalt der Cytochalasansubgruppen: a) Cytochalasin B, b) Aspochalasin A, c) Chaetoglobosin A, d) Alachalasin C, e) Cytochalasin E (eigene Darstellung, angelehnt an Scherlach <i>et al.</i> 2010).	142
Abbildung 4.3.22.: Beispiele für Cytochalasane mit Ersatz für den Makrozyklus: a) Cytochalasin Z10, b) Spicochalasin A, c) Phomopsichalasin, d) Penochalasin B (eigene Darstellung, angelehnt an Scherlach <i>et al.</i> 2010).	143
Abbildung 4.3.23.: Struktur von kürzlich neu isolierten Cytochalasinderivaten: a) Cytochalasin P, b) 18-Methoxy-Cytochalasin J, c) Xylochalasin, d) Cytochalasin J ₃ (eigene Darstellung).	144
Abbildung 4.3.24.: Kürzlich in der Literatur neu beschriebene Naturstoffe aus <i>Xylaria</i> -Arten: a) Cubentriol, b) Aminoamidinderivat, c) Xylaritriol, d) Xylarianin A, e) Hydroxyldecandrin G, f) Xylaridin A (eigene Darstellung).	151
Abbildung 4.4.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm SG1 (<i>Daldinia</i> sp.): Stamm der Wirtspflanze (<i>Sequoiadendron giganteum</i> , oben), axenische Kultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (mitte oben), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (mitte unten), Rohextrakt nach Extraktion mit Essigsäureethylester (eigene Darstellung).	153
Abbildung 4.4.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit LSU-Sequenz des Stammes SG1 und Vergleichsreferenzen aus der Xylariaceae-Familie mit 1000 Bootstrap-Replikationen und <i>Aspergillus nidulans</i> als Outgroup (eigene Darstellung).	155

Abbildung 4.4.3.: Maximum-Likelihood-Baum mit ITS-Sequenz des Stammes SG1 und Vergleichsreferenzen aus Xylariaceae-Familie mit 1000 Bootstrap-Replikationen und <i>Aspergillus nidulans</i> als Outgroup (eigene Darstellung).	156
Abbildung 4.4.4.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm SG1 (eigene Darstellung).....	159
Abbildung 4.4.5.: Struktur von Verbindung SG1-202 (eigene Darstellung).....	160
Abbildung 4.5.6.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von SG1-202 in MeOH-D ₄ (eigene Darstellung). .	161
Abbildung 4.4.7. Struktur von Verbindung SG1-203 (eigene Darstellung).....	164
Abbildung 4.4.8.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für eine Seite der Symmetrieebene von SG1-203 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	165
Abbildung 4.4.9. Struktur von Verbindung SG1-212a (eigene Darstellung).....	167
Abbildung 4.4.10.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für SG1-212a in CDCl ₃ bzw. c) und d) in MeOH-D ₃ (eigene Darstellung).....	168
Abbildung 4.4.11. Struktur von Verbindung SG1-219 (eigene Darstellung).....	171
Abbildung 4.4.12.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für SG1-219 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).	172
Abbildung 4.4.13.: Strukturell ähnliche Verbindungen zu Daldiniapyron (SG1-219): a) Annularin B, b) Annularin F, c) Pestalotin, d) Scipyrone D (eigene Darstellung).	173
Abbildung 4.4.14. Struktur von Verbindung SG1-230 (eigene Darstellung).....	174
Abbildung 4.4.15.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (→) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für SG1-230 in MeOH-D ₄ (eigene Darstellung). ...	175
Abbildung 4.4.16.: Weitere isolierte Verbindungen aus <i>Daldinia</i> -Stamm SG1: a) <i>N</i> -2-Hydroxylignoceroylphytosphingosin, b) Hexadecansäure (Palmitinsäure), c) Ergosterolperoxid, d) 5-Campestenon (eigene Darstellung).	178
Abbildung 4.4.17.: Bekannte chemotaxonomische Marker für <i>Daldinia</i> -Arten: a) Daldinon A, b) Concentricol A, c) 1,1'-Binaphthalene-4,4'-5,5'-tetrol und in der Literatur neu isolierte Metaboliten, d) (+)-Selesconol, e) Daldionin, f) Childinin B, g) Daldinan C (eigene Darstellung).....	180
Abbildung 4.5.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm SG8c: Wirtspflanze (<i>Carpobrotus</i> sp., oben links), Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (oben rechts), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (unten links), Rohextrakt mit Essigsäureethylester (unten rechts) (eigene Darstellung).....	181
Abbildung 4.5.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit: a) LSU- und b) ITS-Sequenz des Stammes SG8c und Vergleichsreferenzen aus Didymosphaeriaceae Familie mit 1000 Bootstrap Replikationen (eigene Darstellung).	183
Abbildung 4.5.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm SG8c (eigene Darstellung).....	186
Abbildung 4.5.4.: Struktur von Verbindung SG8c-102 (eigene Darstellung).....	187
Abbildung 4.5.5.: COSY (→) und HMBC (→) Korrelation für die beiden etablierten Untereinheiten a) und b) (eigene Darstellung).	188

Abbildung 4.5.6.: Zuordnung der chemischen Verschiebung der ^1H - und ^{13}C -Signale von SG8c-102 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	189
Abbildung 4.5.7.: COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von Auranticin A (SG8c-102) in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).	189
Abbildung 4.5.8.: Kristallstruktur von Auranticin A (C - grau, H - weiß, O - rot) (eigene Darstellung.).....	190
Abbildung 4.5.9.: Struktur von Verbindung SG8c-106 (eigene Darstellung).....	191
Abbildung 4.5.10.: HMBC (→) Korrelationen der etablierten Substrukturen a) und b) für Verbindung SG8c-106 mit Zuordnung der chemischen Verschiebung für ^1H - und ^{13}C -Kerne in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	193
Abbildung 4.5.11.: COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-106 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	194
Abbildung 4.5.12.: Struktur von Verbindung SG8c-107 (eigene Darstellung).....	195
Abbildung 4.5.13.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-107 in MeOH- D_4 (eigene Darstellung).....	196
Abbildung 4.5.14.: Struktur von Verbindung SG8c-108 (eigene Darstellung).....	197
Abbildung 4.5.15.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-108 (Auranticin B) in CDCl_3 (eigene Darstellung).	198
Abbildung 4.5.16.: Struktur von Verbindung SG8c-110a (eigene Darstellung).....	199
Abbildung 4.5.17.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-110a in MeOH- D_4 (eigene Darstellung).....	200
Abbildung 4.5.18.: Struktur von Verbindung SG8c-122 (eigene Darstellung).....	201
Tabelle 4.5.3.: Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Signale von SG8c-122 in DMSO- D_6 und MeOH- D_4 . ^1S ignalzuzuordnung uneindeutig.....	202
Abbildung 4.5.19.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-122 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	203
Abbildung 4.5.20.: Struktur von Verbindung SG8c-128 (eigene Darstellung).....	204
Abbildung 4.5.21.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC-(→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-128 in CDCl_3 (eigene Darstellung).....	205
Abbildung 4.5.22.: Struktur von Verbindung SG8c-132 (eigene Darstellung).....	206
Abbildung 4.5.23.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-132 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	208
Abbildung 4.5.24.: Struktur von Verbindung SG8c-149 (eigene Darstellung).....	209
Abbildung 4.5.25.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-149 in CDCl_3 (eigene Darstellung).....	210

Abbildung 4.5.26.: Struktur von Verbindung SG8c-105 (eigene Darstellung).....	211
Abbildung 4.5.27.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-105 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	213
Abbildung 4.5.28.: Strukturell zur Verbindung SG8c-105 verwandte Depsidderivate: a) Ago- nodepside B, b) Aspergicide B/ Aspergillusidone G (eigene Darstellung).....	216
Abbildung 4.5.29.: Grundgerüst der für die Bioaktivitätstests untersuchten Depsidone und Depside (eigene Darstellung).....	217
Abbildung 4.5.30.: Struktur von a) L-Usninsäure, b) Chrysophaentin A (eigene Darstellung).	219
Abbildung 4.5.31.: Struktur von Verbindung SG8c-114 (eigene Darstellung).....	220
Abbildung 4.5.32.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG8c-114 in MeOH- D_4 (eig- ene Darstellung).....	223
Abbildung 4.5.33.: Strukturelle Vielfalt der Furano- und Pyranocoumarine: a) Psoralen, b) Angelicin, c) Xanthyletin, d) Seselin, e) Bothrioclinin, f) Monankarin F (eigene Darstell- ung).....	224
Abbildung 4.5.34.: Verbindung von Verbindung SG8c-140 (eigene Darstellung).	226
Abbildung 4.5.35.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-140 in DMSO- D_6 (eigene Da- rstellung).	228
Abbildung 4.5.36.: Bekannte, strukturell verwandte Vertreter der Verbindung SG8c-140: a) (+)-Hyalodendrin (3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>), b) (-)-Gliovictin (3 <i>R</i> ,6 <i>R</i>), c) Gliotoxin (eigene Darstellung)..	230
Abbildung 4.5.37.: Struktur von Verbindung SG8c-143 (eigene Darstellung).....	231
Abbildung 4.5.38.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-143 in CDCl_3 (eigene Dar- stellung).	233
Abbildung 4.5.39.: Isochroman Vergleichsverbindungen: a) Annulohypoxyloman, b) Colle- tobredin A (R = αRha), c) Pseudoanullosporin A (R = H), B (R = COOH) (eigene Dar- stellung).	234
Abbildung 4.5.40.: Struktur von Verbindung SG8c-146a (eigene Darstellung).....	235
Abbildung 4.5.41.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-146a in CDCl_3 (eigene Darstellung).	237
Abbildung 4.5.42.: Struktur von Verbindung SG8c-141 (eigene Darstellung).....	239
Abbildung 4.5.42.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-141 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).....	240
Abbildung 4.5.43.: Struktur von SG8c-126a (eigene Darstellung).....	241
Abbildung 4.5.44.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-126a in CDCl_3 (eigene Darstellung).....	242

Abbildung 4.5.45.: Struktur von Verbindung SG8c-133 (eigene Darstellung).....	244
Abbildung 4.5.46.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-133 in DMSO-D ₆ (eigene Darstellung).....	245
Abbildung 4.5.47.: Struktur von Verbindung (eigene Darstellung).....	246
Abbildung 4.5.48.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (–), HMBC- (→), und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-148 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).....	247
Abbildung 4.5.49.: Weitere Butenolide mit Strukturmotiv von SG8c-149: a) Eutypoid, b) Microperfuranon, c) Carbonarin H (eigene Darstellung).....	248
Abbildung 4.5.50.: Häufig ebenfalls aus anderen Quellen berichtet Metaboliten aus Stamm SG8c: a) Vanillinsäure, b) 4-Hydroxyzimtsäure, c) Ferulasäure, d) Monocaprin e) Linolsäure (eigene Darstellung).....	249
Abbildung 4.6.1: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm SG25 (<i>Biscogniauxia</i> sp.): Wirtspflanze (<i>Eucalyptus</i> sp., oben links), Rindenproben (oben rechts), Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (unten links), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (unten rechts) (eigene Darstellung).....	251
Abbildung 4.2.2: Maximum-Likelihood-Baum mit LSU (a) und ITS (b)-Sequenz des Stammes SG25 und Vergleichsreferenzen aus Xylariaceae Familie mit 1000 Bootstrap Replikationen und <i>Aspergillus nidulans</i> als Outgroup (eigene Darstellung).....	253
Abbildung 4.6.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm SG25 (eigene Darstellung).....	256
Abbildung 4.6.4.: Struktur von Verbindung SG25-105 (eigene Darstellung).....	257
Abbildung 4.6.5.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von SG25-105 in CDCl ₃ (eigene Darstellung).....	258
Abbildung 4.6.6.: Struktur von Verbindung SG25-110a (eigene Darstellung).....	260
Abbildung 4.6.7.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY, (–) und HMBC, (→) Schlüsselkorrelationen von SG25-110a in DMSO-D ₆ (eigene Darstellung).....	261
Abbildung 4.6.8.: Struktur von Verbindung SG25-112 (eigene Darstellung).....	262
Abbildung 4.6.9.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von SG25-112 in DMSO-D ₆ (eigene Darstellung).....	263
Abbildung 4.6.10.: Struktur von Vergleichsverbindung a) Asperlon B und b) RF 3192C.	264
Abbildung 4.6.11.: Struktur von SG25-116a (eigene Darstellung).....	265
Abbildung 4.6.12.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von SG25-116a in CDCl ₃ (eigene Darstellung)....	265
Abbildung 4.6.13.: Struktur von SG25-119 (eigene Darstellung).....	267
Abbildung 4.6.14.: a) Chemische Verschiebung von ¹ H- und ¹³ C-Signalen, b) COSY- (–), HMBC- (→) und NOESY- (- ->) Schlüsselkorrelationen von SG25-119 in DMSO-D ₆ (eigene Darstellung).....	268
Abbildung 4.6.15. Struktur von Verbindung SG25-136 (eigene Darstellung).....	270

Abbildung 4.6.16.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) HMBC- (\rightarrow) und NOESY- (\dashrightarrow) Schlüsselkorrelationen von SG25-119 in CDCl_3 (eigene Darstellung).	271
Abbildung 4.6.17.: Weitere diskutierte aber verworfene Strukturisomere von SG25-136 (eigene Darstellung).	272
Abbildung 4.6.18.: Struktur von Mycophenolsäure (eigene Darstellung).	273
Abbildung 4.6.19.: Struktur von: a) SG25-107 (4-Hydroxybenzoesäure), b) SG25-124 (3,4-Hydroxybenzoesäure) (eigene Darstellung).	274
Abbildung 4.6.20.: In der Literatur neu beschriebene bioaktive Naturstoffe aus <i>Biscogniauxia</i> -Arten: a) Biscogniauxon, b) Xylaranon, c) Dimericbiscognienyn A, d) Biscognienyn B, e) Biscopyran (eigene Darstellung).	276
Abbildung 5.1.: Neu isolierte Naturstoffe: a) Tremateiasidon A, b) Tremateiasidon B, c) Tremateiasidon C, d) ^3S -Norgliovictin, e) Lilacinolid, f) Tremateiajulin A, g) Tremateiasid A, h) Tremachroman A, i) Tremaquin A.	279

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.: Zur Isolierung verwendetes Pflanzenmaterial.....	43
Tabelle 3.2.: Standardprozedur der Oberflächensterilisierung.	44
Tabelle 3.3.: Verwendetes Material bei der Stammsisolierung.	45
Tabelle 3.4.: Verwendetes Material bei der Submers-Fermentation.....	46
Tabelle 3.4.: Zusammensetzung des Kryomediums.	47
Tabelle 3.5.: Zusammensetzung des Reismediums.	48
Tabelle 3.6.: Verwendete PCR-Primer.....	49
Tabelle 3.7.: Reaktionsmischung PCR.	50
Tabelle 3.8.: PCR Bedingungen bei der Amplifizierung der ITS-Region.....	50
Tabelle 3.9.: PCR Bedingungen bei der Amplifizierung der LSU-Region.	50
Tabelle 3.10.: Zusammensetzung des TAE-Gelelektrophorese-Puffers.....	51
Tabelle 3.11.: Verwendete Stämme für antimikrobiellen Tests.	55
Tabelle 3.12.: Zusammensetzung des Mediums für antibakterielle Test.	55
Tabelle 3.13.: Präparative RP-HPLC Methodik (Hitachi-Gerät).....	64
Tabelle 3.14.: Zusammensetzung der Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.....	67
Tabelle 3.15.: HPLC-MS Methodik (Agilent-Gerät).	68
Tabelle 3.16.: HPLC-Methodik (Shimadzu-Gerät).....	69
Tabelle 3.17.: HPLC-Methodik (Thermo Scientific-Gerät).	70
Tabelle 3.18.: Auflistung von Material und Geräten.	75
Tabelle 3.18.: Auflistung von Material und Geräten (Fortsetzung).	76
Tabelle 4.1.1: Endophyten Stammsammlung und taxonomische Klassifizierung.....	79
Tabelle 4.1.1.: Endophyten Stammsammlung und taxonomische Klassifizierung (Fortsetzung).....	80
Tabelle 4.1.2: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Abteilung ...	81
Tabelle 4.1.3.: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Klasse.....	82
Tabelle 4.1.4.: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Ordnung....	84
Tabelle 4.1.5.: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Familie.....	86
Tabelle 4.2.1.: Antiparasitäre und zytotoxische Ergebnisse des T26B2-Rohextrakts.....	91
Tabelle 4.2.2.: Massenspektrometrische Daten der isolierten Leucinostatine.	96
Tabelle 4.2.3.: Antiplasmodiale und zytotoxische Aktivität der isolierten Leucinostatine aus Stamm T26B.	100
Tabelle 4.2.4.: Zuordnung der ¹ H, ¹³ C und HMBC-Signale von T26B2 in MeOH-D ₄	105
Tabelle 4.2.5.: Vergleich der ¹³ C NMR Daten von T26B2-205 und 3-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-on.	107

Tabelle 4.3.1.: Vergleich der NMR-Daten von TS7-230-1, Akolitserin und Xylarellein.....	124
Tabelle 4.3.2.: IC ₅₀ -Werte Cytochalasin-haltiger Fraktionen des Pilzstammes TS7 gegen die KB-3-1 Zelllinie.....	146
Tabelle 4.4.1.: Chemische Verschiebung der ¹³ C-Signale von Verbindung SG1-212a im Vergleich zu Literaturwerten natürlicher und synthetischer Hept-6-en-2,4,5-triole in CDCl ₃	169
Tabelle 4.5.1.: Ergebnis der SG8c-Rohextrakte im Agardiffusionstest.....	184
Tabelle 4.5.2.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signale von SG8c-106 in DMSO-D ₆ und MeOH-D ₄	192
Tabelle 4.5.3.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signale von SG8c-122 in DMSO-D ₆ und MeOH-D ₄	202
Tabelle 4.5.4.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signale von SG8c-132 in DMSO-D ₆	206
Tabelle 4.5.5.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signale von SG8c-105 in DMSO-D ₆ , CDCl ₃ , und MeOH-D ₄ . ¹ Signalüberlagerung zweier als Quartett aufgespaltener ¹ H, erscheint hier als pentett	212
Tabelle 4.5.6.: Antibakterielle und zytotoxische Kennwerte (MIC, IC ₅₀) isolierter Depsidone und Depside gegenüber <i>B. subtilis</i> , <i>P. agarici</i> und der Zervix-Karzinom Zelllinie KB-3-1. ¹ Butenylgruppe (1-Methyl-prop-enyl) an C-4 ersetzt durch Methylgruppe; ² Depside: 6a-OH, 4a-COOH.....	217
Tabelle 4.5.7.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signale von SG8c-114 in DMSO-D ₆ und MeOH-D ₄	221
Tabelle 4.5.8.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität von Verbindung SG8c-114.	225
Tabelle 4.5.9.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signale von SG8c-140 in DMSO-D ₆ und MeOH-D ₄	226
Tabelle 4.5.10.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität von ³ S-Norgliovictin (SG8c-140).	230
Tabelle 4.5.11.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signalen von SG8c-143 in CDCl ₃	231
Tabelle 4.5.12.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität des Isochromans SG8c-143a.	234
Tabelle 4.5.13.: Zuordnung der ¹ H-, ¹³ C- und HMBC-Signalen von SG8c-146a.....	235
Tabelle 4.5.14.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität von des Benzochinons SG8c-146a.	238
Tabelle 4.6.1.: Ergebnis der SG25 Rohextrakte im Agardiffusionstest.....	254
Tabelle 4.6.2.: Vergleich der chemischen ¹³ C-Verschiebungen (CDCl ₃) mit Literatur (¹ Schneider <i>et al.</i> 1997, CDCl ₃ /MeOH-D ₄ , 95/5, %v/v).....	272

Symbolverzeichnis

Symbol	Bedeutung
°C	Grad Celsius
∅	Durchmesser
δ	chemische Verschiebung
A ₁	untere Asymptote
A ₂	obere Asymptote
Da	Dalton
J	Kopplungskonstante
g	Fallbeschleunigung
h	Höhe
K	Kelvin
m	Gewicht
M	Multiplizität
M	Molmasse
n	Stoffmenge
N	Anzahl, Menge
p	Steigung Wendepunkt
t	Zeit
T	Temperatur
u	atomare Masseneinheiten
V	Volt
Ṃ	Volumenstrom/Durchflussrate
w	Massenanteil
z	Ladung

Abkürzungs- und Begriffsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACN	Acetonitril
ADCs	Antibody Drug Conjugates
ATCC	American Type Culture Collection
AUS	Australien (Iso 3166-1, Alpha 3)
BCC	BIOTEC Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
ca.	circa
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
CD	Circulardichroismus
CHE	Schweiz (Iso 3166-1, Alpha 3)
CI	chemische Ionisation
CITES	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
cm	Zentimeter
CO1	Cytochrom C Oxidase 1
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dublett
dd	Doppeldublett bzw. Dublett von Dublett
ddd	Dublett von Dublett von Dublett
ddt	Dublett von Dublett von Triplet
dq	Dublett von Quartett
dt	Dublett von Triplet
DAD	Dioden Array Detektor
DART	Direct Analysis in Real Time
DC	Dünschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DESI	Desorption Electrospray Ionization
dest.	destilliert
DEU	Deutschland (Iso 3166-1, Alpha 3)
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure/ Deoxyribonucleic acid
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EH	Enghals
engl.	englisch
EtOAc	Ethylacetat/Essigsäureethylester
EI	E lectron (impact) i onization
ESI	E lectron S pray I onization
ESP	Spanien (Iso 3166-1, Alpha 3)
etc.	<i>et cetera</i> (lat. und weitere)
et al.	<i>et alia</i> (lat., und andere)
FAB	F ast A tom B ombardment
FBS	F etal B ovine S erum
FDA	F ood and D rug A dministration (USA)
FID	F ree I nduction D ecay/ freier Induktionsabfall
FtsZ	F ilamenting T emperature- S ensitive M utant Z
HILIC	H ydrophilic I nteraction C hromatography
HMQC	H eteronuclear S ingle Q uantum C oherence S pectroscopy
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography
HR-MS	H igh R esolution M ass S pectrometry
HSQC	H eteronuclear Q uantum C oherence S pectroscopy
JPN	Japan (Iso 3166-1, Alpha 3)
g	Gramm
GBR	Vereinigtes Königreich Großbritannien und Nordirland (Iso 3166-1, Alpha 3)
Grad.	Gradienten
GRAS	G enerally R ecognized A s S afe
gr.	griechisch
h	Stunde
H	Höhe
HPLC	H igh P erformance L iquid C hromatography
IC ₅₀	I nhibitory C oncentration 50% (Konzentration bei 50% des maximalen Effektes)
i.d.R.	I n d er R egel
ITS	I nternal T ranscribed S pacer
IR	I nfrarot
INADEQUATE	I ncredibly N atural A bundance D ouble Q uantum T ransfer
INSDC	I nternational N ucleotide S equences D atabase C ollaboration
KNAW	K oninklijke N ederlandse A kademie van W etenschappen

lat.	lateinisch (ISO 639-2)
LC	L iquid C hromatography
LC ₅₀	L etal C oncentration 50% (Umgebungskonzentration die für 50% der Organismen einer Population tödlich ist)
LR-MS	L ow R esolution M ass S pectrometry
LVA	Lettland (Iso 3166-1, Alpha 3)
MAO	M ono a mino o xidase
MALDI	M atrix assistierte L aser D esorption Ionisierung
MCM	M in i chromosome M aintenance
ml	ml
MIC	M inimum I nhibitory C oncentration
min	Minute
MRSA	M ethicillin/ M ulti resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	M assenspektrometrie
nat.	national
NARP	N on A queous R eversed P hase
NCBI	N ational C enter for B io t echnology I nformation
NMR	N uclear M agnetic R esonance
nrDNA	n uclear ribosomal D eoxyribonucleic A cid
NOESY	N uclear O verhauser E nhancement S pectroscopy
NRPS	N ichtribosomale P eptid s ynthase
MeOH	Methanol
OD	O ptische D ichte
org.	organisch
OSMAC	O ne S train M any C ompounds
OTU	O perational T axonomic U nit
p.a.	p ro a nalyse
PCR	P olymerase C hain R eaction
PDA	P otato- D extrose- A gar
PD	P otato- D extrose
PE	P etro l e t her
PI	P hotoionisation
PKS	P olyketid s ynthase
PTLC	P reparative T hin L ayer C hromatography
ppm	p arts p er m illion
q	Quartett
RDP	R ibosomal D atabase P roject

RefSeq	Reference Sequence Database
RP	Reversed Phase
RPB	RNA Polymerase
rpm	rotation per minute
ROS	Reactive Oxygen Species
ROU	Rumänien (Iso 3166-1, Alpha 3)
ROESY	Rotating Frame Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAR	Structure Activity Relationship
SEC	Size Exclusion Chromatography
SM	Submers-Fermentation
SMDCs	Small Molecule Drug Conjugates
SSF	Solid-State-Fermentation
SSU	Small Subunit
Syn.	Synonym
t	Triplett
techn.	technisch
TMS	Tetramethylsilan
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEF	Translation Elongation Factor
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TOF	Time of Flight
TRBA	Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UNITE	User-friendly Nordic ITS Ectomycorrhiza Database
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (Iso 3166-1, Alpha 3)
UV-VIS	Ultraviolet-Visible
VE	vollentsalztes (Wasser)
VIC	Victoria
vs.	<i>versus</i> (lat. gegen)
z.B.	zum Beispiel

Abstract (English)

Surface sterilisation of plant material from various host species and tissue types, collected from different habitats, with subsequent cultivation of the arising fungal mycelia as axenic cultures resulted in the isolation of 55 fungal endophytes. The strains were identified via nrITS-DNA (ITS-barcoding). A broad taxonomical distribution within these strains was observed with a focus on ascomycotous fungi and an emphasis on members of the Sordariomycetes und Dothideomycetes classes. Some of the cultivated fungal strains showed low sequence identity to the reference species in the databases. Therefore they were recognized as potential new or underexplored species.

Antibacterial and cytotoxic activities were observed in crude extracts of ethyl acetate after cultivation through solid-state-fermentation on rice. Due to phylogenetic considerations and bioactive properties five strains, were chosen for a detailed mycochemical investigation, *Purpleocillium lilacinum* (T26B), *Xylaria cubensis* (TS7), *Daldinia* sp. (SG1), *Didymosphaeria*-*ceae* sp. (SG8c, cf. *Tremateia* sp.), *Biscogniauxia* sp. (SG25).

These mycochemical investigation of endophytic fungal crude extracts resulted in the isolation, identification and characterisation of nine new, previously undescribed and 55 already literature known compounds. The new described molecules were comprised of three depsidones (Tremateiasidon A - C), one depside (Tremateiasid A), one pyranocoumarin (Tremateiajulin A) with an unusual molecular scaffold, one monosulfated diketopiperazine (³S-Norgliovictin), one quinone (Tremaquin A) und one isochromane (Tremachroman), as well as a butenolide (Lilacinolid A). Some of the new molecules show strong antibacterial activity, comparable or exceeding the potency of the reference drug (Gentamicin). The previously published metabolites, some of which were ascertained in their respective fungal species or genera for the first time, represent different compound classes (depsidones, isocoumarines, cytochalasines, linear, non-ribosomal peptides, cyclic depsipeptides, butenolides, lipids, etc.), which underlined the biosynthetic potential of endophytic fungi. In addition, various fractions and pure isolated compounds showed bioactive properties. These mycochemical investigations were able to prove that endophytic fungi are a good source for new and bioactive natural products.

Abstract (Deutsch)

Die Behandlung von Pflanzenmaterial unterschiedlicher Wirtspflanzen und Gewebetypen durch Oberflächensterilisierung und die anschließende Kultivierung der entstehenden Myzelien resultierte in der Isolierung von 55 endophytischen Pilzen, welche mittels nrITS-DNA (ITS-Barcoding) klassifiziert wurden. Feststellbar war eine breite Verteilung auf viele verschiedene Taxa mit dem Fokus auf Ascomycota, insbesondere innerhalb der Klasse der Sordariomyceten und Dothideomyceten. Einige der isolierten Stämme zeigten bei der Klassifizierung wenig Übereinstimmung zu den Arten der Referenzsequenzen. Diese Stämme stellen potenziell neue Pilzarten oder wenig studierte Stämme dar.

Bei der Erstellung von Essigsäureethylester-Rohextrakten aus den Pilzkulturen nach Solid-State-Fermentation auf Reis konnten unter anderem antibakterielle und zytotoxische Eigenschaften der Extrakte festgestellt werden. Fünf Stämme, identifiziert als *Purpureocillium lilacinum* (T26B), *Xylaria cubensis* (TS7), *Daldinia* sp. (SG1), *Didymosphaeriaceae* sp. (SG8c, cf. *Tremateia* sp.), *Biscogniauxia* sp. (SG25), wurden anhand phylogenetischer Erwägungen und bioaktiver Eigenschaften der Rohextrakte für eine detaillierte Untersuchung des Metabolitprofils ausgewählt.

Diese detaillierten mykochemischen Untersuchungen von Extrakten aus endophytischen Pilzen resultierten in der Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von neun neuen, zuvor unbeschriebenen und 55 bereits literaturbekannten Metaboliten. Neu entdeckt wurden drei Depsidone (Tremateiasidon A - C), ein Depsid (Tremateiasid A), ein Pyranocoumarin (Tremateiajulin A) mit ungewöhnlichem Grundgerüst, ein monosulphatiertes Diketopiperazin (³S-Norgliovictin), ein Chinon (Tremaquin A) und ein Isochroman (Tremachroman A), sowie ein Butenolid (Lilacinolid A). Einige der neuen Verbindungen zeigten starke antibakterielle Aktivität, welche vergleichbar mit dem Referenzantibiotikum (Gentamicin) war oder dessen Wirksamkeit sogar überstieg. Die bereits bekannten Verbindungen, von denen einige zudem erstmalig für die entsprechende Pilzart bzw. Pilzgattung nachgewiesen wurden, repräsentierten unterschiedliche Strukturklassen (Depsidone, Isocoumarine, Cytochalasine, lineare, nicht ribosomale Peptide, zyklische Depsipeptide, Butenolide, Lipide, etc.) und unterstreichen somit die Biosyntheseleistung endophytischer Pilze. Viele der Fraktionen und isolierten Reinstoffe verfügten zudem über bioaktive Eigenschaften. Diese Arbeit konnte zeigen, dass endophytische Pilze eine gute Quelle neuer und bioaktiver Naturstoffe darstellen.

1. Einführung

1.1. Einleitung

Sekundärmetaboliten aus Mikroorganismen, insbesondere Pilzen, waren und sind für einige der bekanntesten Erfolgsgeschichten der Wirkstoffentdeckung verantwortlich. Dies zeigt sich nicht nur an der verbreiteten Nutzung des Antibiotikums Penicillin, des Immunsuppressivums Cyclosporin, des Antimykotikums Griseofulvin und des Lipidsenkers Lovastatin. Gerade vor dem Hintergrund vermehrter Resistenzbildung bei der Antibiotikanutzung, steigender Krebsinzidenzen und starker Verbreitung von parasitären Infektionserkrankungen (Malaria, Leishmaniasis, Chagas-Krankheit, etc.) in einigen Teilen der Welt ist der Wunsch nach Entdeckung neuer Wirkstoffe groß. Bioaktive Komponenten aus natürlichen Quellen sind entweder als Einzelverbindungen bzw. in Kombination mit anderen Verbindungen in Extraktformulierungen interessant oder können als Leitstruktur bei der Wirkstoffentwicklung dienen. Das Interesse an Naturstoffen ist nicht nur in der pharmazeutischen Industrie für den humanmedizinischen Einsatz, sondern auch in anderen Bereichen der chemischen Industrie zum Beispiel bei Agrarchemikalien, Kosmezeutika und Nutraceuticals evident. Im weiteren Sinne ist ebenfalls das Interesse an Naturstoffen zur Bereitstellung von Plattformchemikalien im Rahmen von Bio-Raffineriekonzepten vorhanden. Aufgrund von langwierigen Isolierungs- und Strukturaufklärungsprozessen haben viele pharmazeutische Betriebe ihren Naturstoffforschungsbereich zugunsten synthetischer Substanzbibliotheken zurückgefahren. Dennoch sind ein hoher Anteil der neu zugelassen und bestehenden Wirkstoffpräparate kleiner Moleküle entweder direkte Naturstoffe oder von diesen abgeleitet. Teilweise ist wieder eine Rückbesinnung auf Verbindungsdatenbanken mit erhöhtem Anteil an Naturstoffen, deren strukturelle Vielfalt und Komplexität nach wie vor unerreicht ist, für Wirkstoffssuchen feststellbar. Zudem werden viele Verbindungen (β -Lactam-Antibiotika, Taxane, Echinocandine, Cyclosporine, Statine, etc.) aufgrund ihrer anspruchsvollen Struktur weiterhin aus natürlichen Quellen gewonnen oder partialsynthetisch hergestellt.

Unbeschriebene Arten und Organismen aus einzigartigen oder extremen Habitaten sind mit der Produktion von neuen und aktiven Verbindungen assoziiert. Dies trifft besonders auf endophytische Pilze zu, welche symptomlos, wenigstens in einem Teil ihres Lebenszyklusses, das inter- und intrazellulären Geweben von Pflanzen besiedeln können. Die Vielfalt und die Interaktionen von Endophyten mit ihren Wirtspflanzen sind vielfach noch unerforscht. Die Verbindung zwischen Endophyt und Wirt ist in der Regel mit erhöhtem Biomassewachstum und der Vermittlung von abiotischer und biotischer Stresstoleranz verknüpft. Der generierte Vorteil für die Wirtspflanze wird unter anderem durch die vom Pilz produzierten Moleküle erhalten. Pilz-Endophyten erscheinen demnach als interessante Studienobjekte für mykochemische Untersuchungen.

1.2. Aufgaben und Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es neue, bisher unbekannte, möglicherweise bioaktive Verbindungen aus endophytischen Pilzen zu isolieren, zu charakterisieren und gegebenenfalls bereits bekannte Verbindung für die Beschreibung des Metabolitprofils für den jeweiligen Pilzstamm aufzunehmen.

Dies beinhaltet die Aufgaben der Isolierung des Pilzmycels aus behandeltem Pflanzenmaterial (Oberflächensterilisierung), Vereinzelung und axenische Kultivierung der Stämme, sowie die Identifizierung und taxonomische Klassifizierung anhand DNA-basierter Methoden (ITS-Barcoding). Die Beachtung taxonomischer Gesichtspunkte, die Ergebnisse der Literaturrecherche zu bestehenden Naturstoffstudien verwandter Taxa und die Bioaktivitäten der Rohextrakten aus der Kultivierung im kleinem Maßstab sollten für die Auswahl der Stämme in Betracht gezogen werden. Eine Auswahl von fünf Stämmen ist für eine detaillierte mykochemische Untersuchung vorzubereiten. Das weitere Vorgehen umfasst die Kultivierung der ausgewählten Stämme als Solid-State-Fermentation (Reis) in größerem Maßstab und die Festphasenextraktion des besiedelten Substrats mit organischem Lösemittel (Ethylacetat). Die Aufgabe der Metabolitenreinigung und -isolierung ist in der Regel durch verschiedene chromatographische Trennverfahren (RP-HPLC, Säulenchromatographie, Größenausschlusschromatographie, etc.), Kristallisation und extraktive Verfahren (flüssig-flüssig, fest-flüssig) zu erzielen. Die Überprüfung der biologischen Aktivität von Extraktfraktionen während des Isolierungsprozesses ist unter anderem zur zielgerichteten Isolierung der effektbestimmten (antibakteriell, zytotoxisch, etc.) Verbindungen einzusetzen (bioaktivitätsgeführte Isolierung). Die Charakterisierung der isolierten Moleküle ist durch eine Kombination von spektrometrischen (ESI-MS, EI-MS, MALDI-MS) und spektroskopischen Methoden (NMR: ^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC, NOESY, etc.; UV/VIS, CD, IR) zu erreichen. Abschließend ist für die Charakterisierung ebenfalls die Erhebung von Bioaktivitätskennzahlen (IC_{50} , MIC) gegen verschiedene Ziele (Zervixkarzinom Zelllinie KB-3-1, gram-positive und gram-negative Bakterien z.B. *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas agarici*) vorzunehmen.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1. Naturstoffe

2.1.1. Der Begriff Naturstoff

Für den Begriff Naturstoff existiert keine scharfe abgegrenzte Definition. Im allgemeinen Sinne können Produkte und Inhaltsstoffe aus natürlichen Quellen als Naturstoffe bezeichnet werden. Dies kann entweder ganze Organismen (Pflanze, Tier oder Mikroorganismus), Teile eines Organismus (z.B. Fruchtkörper von Pflanzen oder Pilzen, Organ eines Tieres), Extrakte (Lösemittelauszug aus z.B. Blättern), Exsudate/Exometaboliten oder isolierte Substanzen (z.B. Terpene, Polysaccharide, Alkaloide) aus Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen umfassen. Im engeren Sinne werden in der Naturstoffforschung darunter aber meist kleinere Moleküle mit einer Molekularmasse im Bereich bis ca. 2000 u bezeichnet, welche dem sekundären Stoffwechsel (Sekundärmetaboliten) entstammen (Sarker *et al.* 2006). Der Begriff Naturstoff und Sekundärmetabolit wird meist synonym verwendet.

Sekundärmetaboliten kommen im Gegensatz zu Primärmetaboliten nicht ubiquitär in allen Lebensformen vor, meist sind sie sogar spezifisch für eine Art oder Gruppe von Organismen. Sie werden nicht unmittelbar zum Überleben benötigt, die Organismen können aber Selektionsvorteile durch deren Produktion (z.B. Antibiotika, Allelochemikalien) erlangen. Die biologische Funktion der produzierten Substanz ist allerdings oftmals nicht genau geklärt, unbekannt oder auch nicht vorhanden, weshalb hierbei manchmal auch von der "Spielwiese der Evolution" gesprochen wird (Cannell 1998, Sticher & Hänsel 2010).

Die generierten Substanzen können vom Menschen isoliert und genutzt werden, wobei einige Naturstoffe große gesellschaftliche und ökonomische Bedeutung (siehe Kapitel 2.1.2) erlangt haben.

2.1.2. Naturstoffe als Quelle von Wirkstoffen

Naturstoffe sind weiterhin eine wichtige Quelle bei der Suche nach Wirkstoffen (Li & Vederas 2009, Newman & Cragg 2012). Die Erfolgsgeschichte von Substanzen wie Morphin (Analgetikum), Penicillin (Antibiotikum), Cyclosporin (Immunsuppressivum), Taxol (Zytostatikum), Artemisin (Antihelminthikum) etc. ist allgemein bekannt und unterstreichen die Bedeutsamkeit von bioaktiven Naturstoffen aus den verschiedensten Quellen.

In vielen Teilen der Welt sind Extrakte aus Pflanzen und Formulierungen der "traditionellen Medizin" nach wie vor die wichtigste bzw. alleinige Quelle für den Zugang zu Wirkstoffen gegen verschiedenste Krankheiten (DeCorte 2016). Je nach Region (z.B. China 40%, Japan 60-70%, Chile 71%) wird "traditionelle Medizin" trotz Verfügbarkeit von "westlicher Medizin" oftmals komplementär verwendet. In Afrika stellt sie für bis zu 80% der Bevölkerung sogar die primäre Gesundheitsversorgung dar (Bussman 2013).

Auch wenn das Interesse der pharmazeutischen Industrie an bioaktiven Substanzen aus natürlichen Quellen durch die Verfügbarkeit von High-Throuput-Screening Techniken und kombinatorischer Chemie, welche zur Generierung riesiger synthetischer Substanzbibliotheken führte, abgenommen hat, so bleiben die Möglichkeiten der Naturstoffe als Ideengeber für Leitsubstanzen weiterhin unbegrenzt (Li & Vederas 2009, Shen 2015).

Teilweise ist beim Screening nach Wirkstoffen bereits wieder eine Rückbesinnung zu kleineren spezialisierten Stoffbibliotheken mit erhöhter, Naturstoff-ähnlicher, struktureller Variabilität festzustellen (Newmann & Cragg 2012). Dies soll den möglichen "biological-relevant-chemical-space" bessere abdecken (Bohlin *et al.* 2010, Harvey *et al.* 2015).

Der substanzielle Rückgang von zum Beispiel in den USA zugelassenen Medikamenten zwischen 1981 bis 2010, welche neu chemische Entitäten darstellen (exkludiert Kombinationen von bereits früher zugelassenen Medikamenten und zugelassenen Medikamenten mit neuer Indikation) im Bereich der "kleinen Moleküle" (exkludiert Proteine und Impfstoffe) lässt sich mit dem abnehmenden Interesse der pharmazeutischen Industrie an Naturstoffen korrelieren (Li & Vederas 2009, Newann & Cragg 2012, Shen 2015).

Allerdings ist, nach den genannten Rahmenbedingungen, der Anteil an zugelassenen Medikamenten, welche entweder modifizierte oder unmodifizierte Naturstoffe sind, mit 25 bis 50% pro Jahr, nach wie vor hoch (Newmann & Cragg 2012). Je nach Kategorisierung (Antiinfektiva, Antitumor, etc.), Zeitraum, Definition (semisynthetisches Naturstoffderivat vs. von Naturstoff "inspiriert") und Autor werden sogar 70 bis 80% der zugelassenen Medikamente zu den von Naturstoffen abgeleiteten bzw. nicht synthetischen Substanzen gezählt (Li & Vederas 2009, Newmann & Cragg 2012).

Das vorhandene Potenzial zur Nutzung von Naturstoffen oder Naturstoffanaloga aus verschiedensten Organismen ist nicht nur bei den Therapeutika für die Humanmedizin, sondern auch bei Erzeugnissen aus anderen Bereichen der chemischen Industrie, wie Kosmezeutika

(z.B. Davis & Perez 2009, Hyde *et al.* 2010, Agatonovic-Kustrin 2013), Nutrazeutika (z.B. Dillard & German 2000, Alesani *et al.* 2015) und Agrochemikalien (z.B. Pillmore *et al.* 1993, Cantrell *et al.* 2012) zu finden.

Es sind allgemein einige Nachteile bei der Wirkstoffsuche aus natürlichen Quellen im Vergleich zur Suche in synthetischen Substanzbibliotheken evident. Zu den Herausforderungen zählen unter anderem der restriktive Zugang durch gesetzliche Beschränkung (z.B. Convention of Biodiversity, Nagoya Protokoll), umwelt- und zeitabhängige Variabilität der biologischen Matrix bzw. Zusammensetzung der Extraktkomponenten, Inkompatibilität von Extrakten mit Hoch-Durchsatz-Screening-Systemen (HTS-Systemen) und Bioassays, synergistische oder antagonistische Effekte verschiedener Substanzen in Mischungen, Schwierigkeiten bei der Strukturaufklärung sowie die Reisolierung von bekannten Substanzen (Li & Vederas 2009). Dennoch wird doch eine signifikante Anzahl an Leitstrukturen von Mikroorganismen produziert (Newmann & Cragg 2012), die zudem oftmals einzigartig sind und Eigenschaften vereinen, welche mit der synthetischen Chemie nur schwer zugänglich sind (Bohlin *et al.* 2010). Demnach sollte das Feld der Naturstoffforschung erheblich ausgebaut werden (Newmann & Cragg 2012).

2.1.3. Bioaktive Inhaltsstoffe aus Pilzen

Während die ältesten Aufzeichnungen zur Nutzung von Pflanzen in der traditionellen Medizin ca. 4600 Jahre zurückreichen, kann die zufällige Entdeckung des Penicillins in den späten 1920er Jahren als Startsignal für die intensive Untersuchung mikrobieller Naturstoffe angesehen werden (Butler 2004, Cragg & Newmann 2013).

Die allgemeine Nutzung von antibakteriellen Substanzen, wie zum Beispiel Penicilline und Cephalosporine (β -Lactam-Antibiotika) oder Fusidinsäure (tetrazyklische Triterpene) pilzlichen Ursprungs (Abbildung 2.1.) wird als einer der großen Durchbrüche in der Medizin bezeichnet und setzt den Rahmen für die Ära der Antibiotika (DeCorte 2016, Aly *et al.* 2011b), welche trotz verstärkt beobachteter Resistenzbildung bis heute andauert.

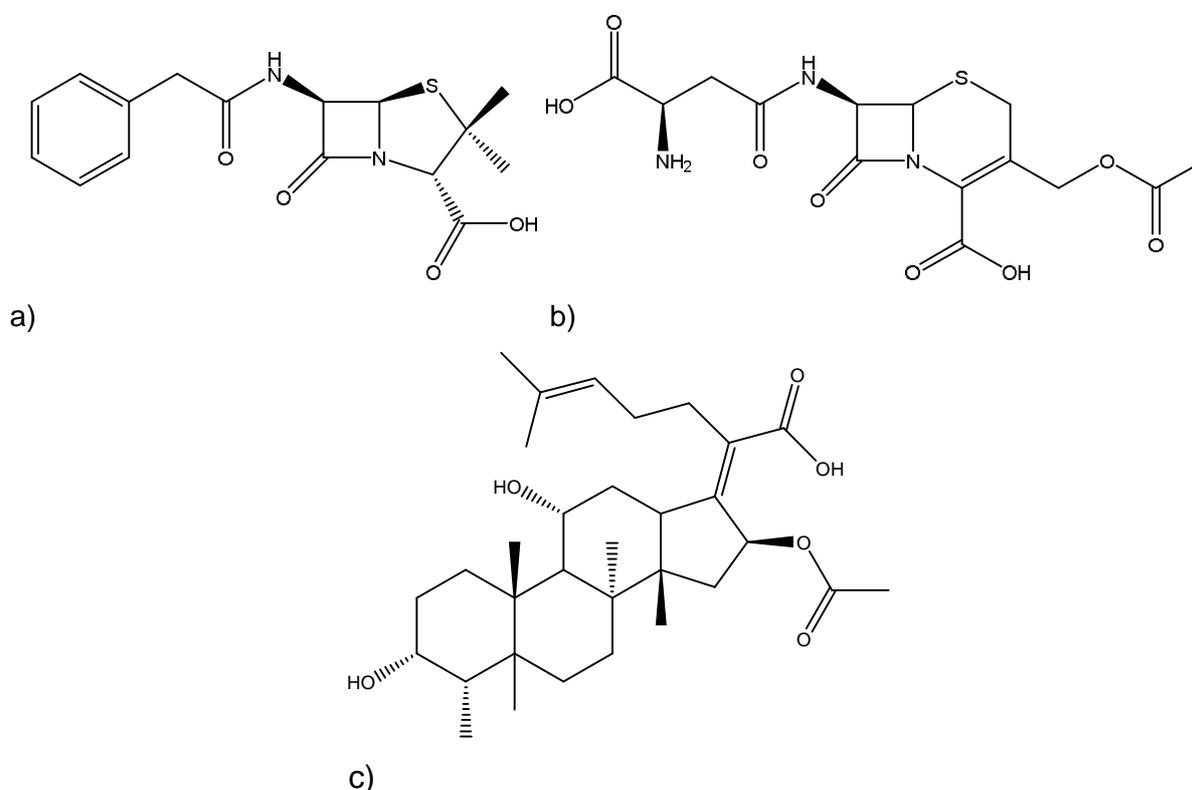


Abbildung 2.1.: Antibakteriell wirksame Naturstoffe aus Pilzen: a) Benzylpenicillin, b) Cephalosporin C, c) Fusidinsäure (eigene Darstellung).

Eine weitere wichtige Entdeckung im Bereich der Mykometaboliten wurde durch die Isolierung der Cyclosporine erreicht, welche neue Möglichkeiten in der Immunpharmakologie und Organtransplantation zur Verfügung stellte (Aly *et al.* 2011b).

Pilze sind allgemein als Produzenten vielfältiger Naturstoffe bekannt. Als weitere Beispiele für interessante Wirkstoffe mit ebenfalls ökonomischer Bedeutung kann das Antimykotikum Griseofulvin und Lipid modulierende Statine (Mevastatin, Lovastatin) aufgezählt werden (Abbildung 2.2.). Daneben unterstreicht auch die Möglichkeit der Biotransformation von Sterolen

zu Steroidhormonen durch Pilzstämmen für verschiedenste Indikationen (Antiphlogistika, Contraceptiva, etc.) das Potenzial zur Produktion und Modifikation von wichtigen Naturstoffen (Aly *et al.* 2011b).

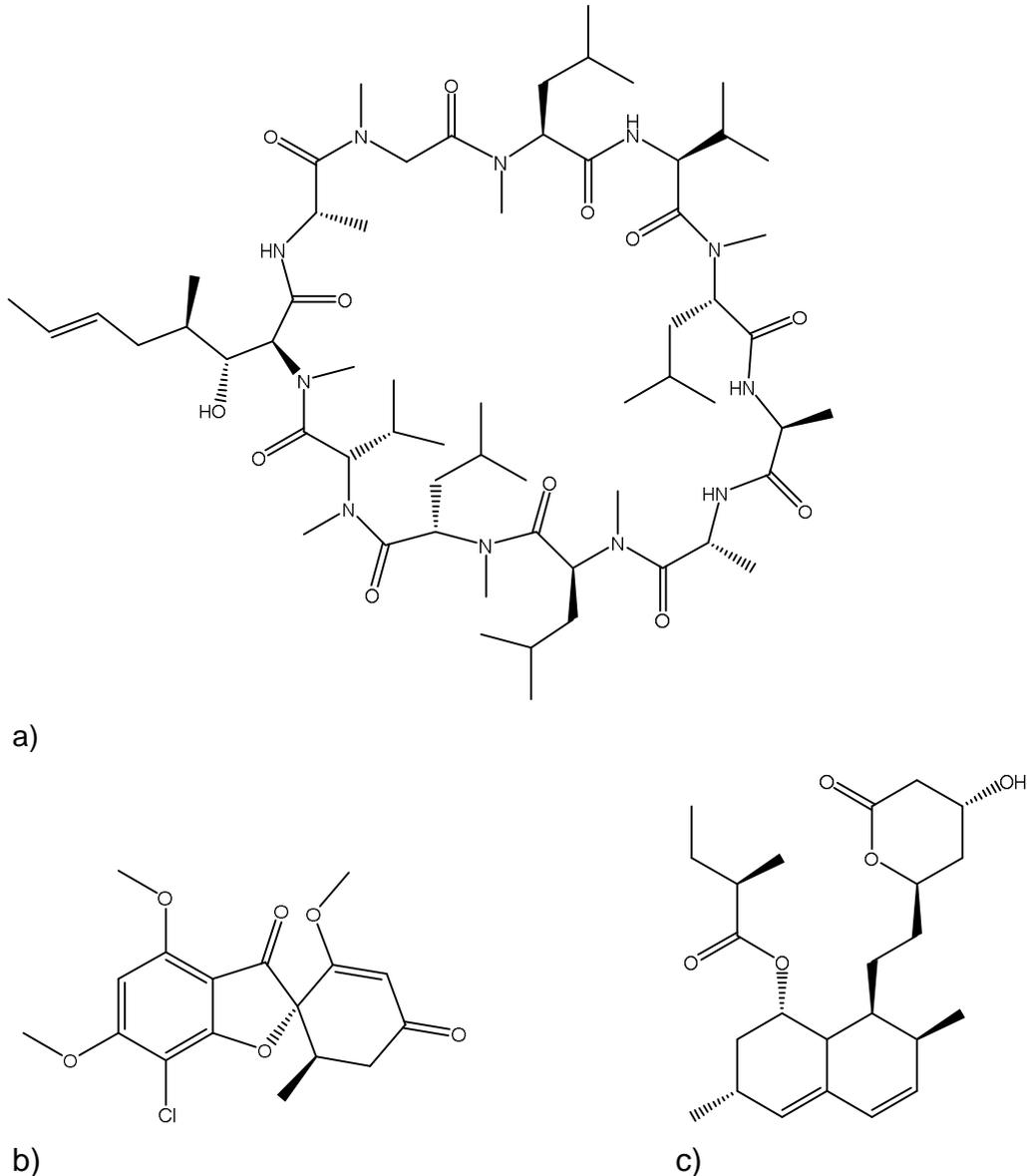


Abbildung 2.2.: In der Humanmedizin eingesetzte Wirkstoffe aus Pilzen: a) Cyclosporin A, b) Griseofulvin, c) Lovastatin (eigene Darstellung).

Die Erforschung von Naturstoffen aus Pilzen hat ebenfalls weitere wertvolle Substanzen in anderen Industriebereichen hervorgebracht. Dies reicht von Agrochemikalien (z.B. Strobilurin-Fungizide), über Kosmetika und Kosmezeutika bis hin zu Nutraceuticals und „Functional Foods“ (Aly *et al.* 2011b, Hyde *et al.* 2010, Chang & Buswell 2009, Giavasis 2014).

Dadurch, dass viele Pilze noch unentdeckt, ungetestet oder noch nicht kultivierbar sind, wird ihnen großes Potential beigemessen (siehe Kapitel 2.1.4.). Demnach sind weitere Entdeckungen in der Naturstoffforschung zu erwarten (Aly *et al.* 2011b, Hyde *et al.* 2010).

2.1.4. Das Potenzial zur Entdeckung neuer Arten, Produktion bioaktiver Naturstoffe und biotechnologischen Nutzung endophytischer Pilze

In Anbetracht neuer Schätzungen zur potenziellen Artenzahl von Pilzen im Vergleich zu der tatsächlich wissenschaftlich beschriebenen Anzahl von ca. 100.000 Arten (Blackwell 2011), kann ihnen ein großes Potenzial bei der Produktion und somit auch der Entdeckung von bioaktiven Naturstoffen zugesprochen werden (Gond *et al.* 2010). So werden je nach Autor Schätzungen von wenigstens 0.7 Millionen, als unter Grenze der Artenvielfalt (Schmit & Mueller 2007), über 1.5 Millionen (Hawksworth 2001) bis hin zu 5.1 Million (O'Brien *et al.* 2005) existierende Pilzarten weltweit postuliert.

Generell sollte sich die Suche nach neuen und bioaktiven Naturstoffen vorwiegend auf Organismen konzentrieren, die einzigartige Habitats bewohnen (Schulz *et al.* 2002, Strobel & Daisy 2003, Strobel *et al.* 2004, Pye *et al.* 2017). Das innere von Pflanzengewebe kann als ein solches, spezielles Habitat angesehen werden (Gond *et al.* 2010). Zusätzlich gilt, dass die besiedelten Pflanzen wiederum einzigartige Lebensräume bewohnen und extremen Umweltbedingungen ausgesetzt sein können. Als Beispiel für die Anpassung an extreme Umweltbedingung gelten unter anderem thermo-, halo-, psychrophile bzw. -tolerante Pflanzen aber auch Pflanzen, die erhöhtem Nährstoff- und Konkurrenzdruck ausgesetzt sind, wie es zum Beispiel in Regenwäldern der Fall ist. Da das Überleben von Organismen in speziellen Lebensräumen durch Selektionsdruck und konstanter Umweltinteraktion mit speziellen Eigenschaften assoziiert ist, wird wiederum von der verstärkten Produktion von Naturstoffen, sowohl quantitativ als auch qualitativ, ausgegangen (Strobel *et al.* 2004). Endophytische Pilze sind allgemein eine Gruppe von Organismen, die wenig erforscht sind und zudem eine reichhaltige Quelle genetischer Vielfalt und unbeschriebener Arten darstellen (Strobel & Daisy 2003). Diese unbekanntes Pilzarten wiederum sind oftmals mit neuartigen Naturstoffen assoziiert (Strobel and Daisy 2003, Strobel *et al.* 2004), weshalb die Chance neue und bioaktive Substanzen aus ihnen isolieren zu können vergleichsweise groß und vielversprechend ist (Aly *et al.* 2011a).

Nach Schulz *et al.* (2002) konnte bei einem Vergleich der Bioaktivität (antibakteriell, antimykotisch, etc.) von Kulturextrakten, welche aus Organismen verschiedener Isolierungsquellen (endophytischen Pilze aus Landpflanzen (N = 6300), endophytische Pilze aus Algen (N = 300), Bodenpilze (N = 2800)) gewonnen wurden gezeigt werden, dass ein signifikant höherer Anteil (80-83% vs. 64%) an aktiven Extrakten bei endophytischen Pilzen gefunden werden konnte. Weiterhin wurden hierbei die isolierten und strukturaufgeklärten Metaboliten (N = 135) verglichen, wobei sich ein höherer Prozentsatz (51% vs. 38%) an neuen Strukturen, gegenüber bereits in der Literatur bekannten Verbindungen, bei den aus Endophyten isolierten Metaboliten zeigte. Die betrachtete Basis der Verbindungen aus dieser Studie ist relativ klein im Vergleich zur unglaublichen Anzahl an 300000 dokumentierten Naturstoffen (Hubert *et al.*

2017) bzw. im Vergleich zu den jährlich neu beschriebenen Metaboliten. In den Jahren letzten 20 Jahren (1995-2015) wurden etwa 32000 neue Naturstoffe allein aus mikrobiellen Quellen publiziert (Pye *et al.* 2017). Dennoch lässt sich aus der Studie von Schulz *et al.* (2002) der Trend ableiten, dass Endophyten ein interessantes und vielversprechendes Forschungsobjekt zur Entdeckung vielfältiger Naturstoffe darstellen.

Die Vielzahl weltweit vorhandener Studien zu neuen, aus Endophyten isolierten Verbindungen unterstreicht die Bedeutung dieses Themas (Dissertationen: z.B. Root 2001, Teuscher 2005, Schlörke 2005, Gentzsch 2007, Khan 2007, Riebe 2009, Abdou 2011, Freitas-Richard 2011, Marmann 2014, El Amrani 2016; Reviews: (z.B. Tan & Zou 2001, Schulz *et al.* 2002, Strobel & Daisy 2003, Gou *et al.* 2008, Suryanarayanan *et al.* 2009, Jalgaonwala *et al.* 2011, El-Khayat *et al.* 2012, Nisa *et al.* 2015, Gouda *et al.* 2016). Bei den beschriebenen Strukturen aus Endophyten handelt es sich häufig um neue und wirksame Metaboliten unterschiedlichster Strukturklassen, wie zum Beispiel Alkaloide (Zhang *et al.* 2012a), Peptide (Abdalla & Matasyoh 2014), Terpenoide (Souza *et al.* 2011) und Polyketide (Shi *et al.* 2017) mit nachgewiesenen Bioaktivitäten. Diese umfassen unter anderem antiproliferative (Kharwar *et al.* 2011, Chandra 2012), antiplasmodiale (Ibrahim *et al.* 2018a), antimikrobielle (Martinez-Klimova *et al.* 2017) und antivirale (Selim *et al.* 2012) Eigenschaften.

Ein nicht zu unterschätzender Fakt ist, dass einige Endophyten in der Lage sind, dieselben Substanzen wie die Wirtspflanze bzw. andere Verbindungen, welche ursprünglich von Pflanzen bekannt sind, zu produzieren (Zhao *et al.* 2010, Aly *et al.* 2013, Jia *et al.* 2016). Dies lässt Pilzendophyten als ein alternatives Produktionssystem für in der Industrie gefragte Komponenten, wie zum Beispiel Paclitaxel (Taxol) (Strobel *et al.* 1996), eines der bekanntesten Präparate zur Behandlung von Tumoren, Diosgenin (Zhou *et al.* 2004), ein Präkursor zur Produktion von Steroidhormonen (z.B. Cortison), oder Hypericin (Kusari *et al.* 2008), einer der postulierten Wirkstoffe des als Antidepressivum eingesetzten Johanniskrautes, interessant erscheinen (Abbildung 2.3.).

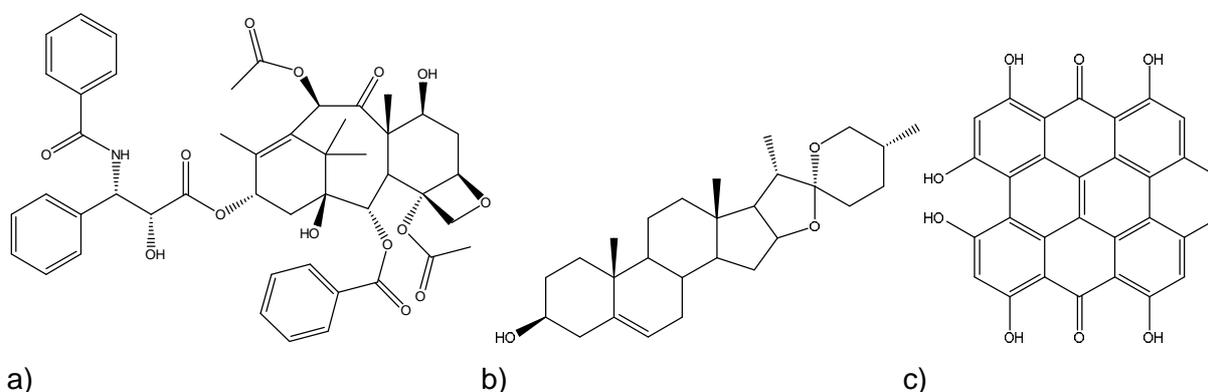


Abbildung 2.3.: Beispiele für industriell wichtige pflanzliche Metaboliten, welche auch von Endophyten produziert werden: a) Paclitaxel (Taxol) b) Diosgenin c) Hypericin (eigene Darstellung).

Mitunter ist der eigentliche Produzent einer aktiven Verbindung oder beschriebener Wirkung aus einer natürlichen Quelle nicht immer klar, wie sich dies zum Beispiel bei den ethnobotanisch beschriebenen Effekten von *Kennedia nigricans* zeigt (Strobel *et al.* 2004). Teilweise sind beschriebene Effekte und Verbindungen sogar in erster Linie dem Mykobionten, wie bei den Lolinalkaloiden in Süßgräsern (Poaceae) (Schardl *et al.* 2007) oder den assoziierten Mikroorganismen in Schwämmen (Mehbub *et al.* 2014) zu zurechnen.

Nicht nur die Verwendung der Extrakte oder isolierter Metaboliten aus Endophyten sind interessant, sondern auch der Einsatz des ganzen, lebenden Organismus als "Biokontrollstamm" in der Agrartechnik zum Pflanzenschutz. In der Literatur beschriebene Beispiele hierfür sind unter anderem der entomopathogene Pilz *Beauveria bassiana* (McKinnon *et al.* 2017, Lohse *et al.* 2017), die mykopathogenen Stämmen von *Trichoderma harzianum* (Chaverri *et al.* 2015) oder nematizidale Formulierung mit *Purpureocillium lilacinum* (Wang *et al.* 2016). Des Weiteren sind andere Endophyten zur Pflanzenstärkung bekannt, welche das Biomassewachstum erhöhen oder abiotische und biotische Stresstoleranz vermitteln (Haggag 2010, Jia *et al.* 2016, Lugtenberg *et al.* 2016).

Von einigen Autoren hingegen wird das Potenzial für die biotechnologische Nutzung von Endophyten weniger optimistisch gesehen, da die Stämme und deren Produkte noch nicht, über den Labormaßstab hinaus, in der Industrie angekommen sind (Priti *et al.* 2009, Kusari *et al.* 2014). Neuere Publikationen wiederum berichten von einigen Metaboliten und Endophytenstämmen, die bereits kommerzialisiert sind oder kurz vor dem Markteintritt stehen (Lugtenberg *et al.* 2016). Allerdings sind noch viele Fragen bei der biotechnologischen Nutzung von Endophyten ungeklärt und bedürfen weiterer, insbesondere interdisziplinärer, Forschung (Kusari *et al.* 2014). Unabhängig von der dargelegten Entwicklung wird allgemein das Sammeln und Kultivieren von Pilzen aus Umweltproben weiterhin wichtig bleiben, um neue Stämme für die industrielle Gewinnung von Wirkstoffen, die Modifikation von Metaboliten (Biotransformation), Biokontrollorganismen für den Pflanzenschutz und Rekultivierungsmaßnahmen, sowie allgemein für die Forschung zur Klärung von biologischen Funktionen und taxonomischen Fragestellungen, bereitzustellen (Blackwell 2011).

Abschließend kann konstatiert werden, dass endophytische Pilze als eine vielversprechende Quelle neuer, bioaktiver Metaboliten und nützlicher Stämme angesehen werden kann, die einen wichtigen Beitrag in verschiedenen Bereichen der Biotechnologie leisten können.

2.2. Endophyten

2.2.1. Der Begriff Endophyt

Je nach Autor und Quelle existieren enger und weiter gefasste Definitionen des Begriffes Endophyt (Hyde & Soytong 2008). Die ursprüngliche Definition geht allerdings auf den deutschen Botaniker und Mykologen Heinrich Anton De Bary zurück (De Bary 1866), welcher den Begriff Endophyt einführte und ihn auf jegliche Organismen, die in Pflanzen gefunden werden können, bezieht (Wilson 1995). Nicht verwechselt werden sollte der Begriff mit der Definition nach Ainsworth & Bisby (1971), welcher Endophyten als Pflanzen versteht, welche in anderen Organismen leben (Wilson 1995).

Eine weit verbreitete Definition bezeichnet Endophyten als Organismen (Bakterien oder Pilze), die in der Lage sind, in wenigstens einem Teil ihres Lebenszyklusses, das innere Gewebe (inter- oder intrazellulär) von lebenden Pflanzen zu besiedeln und dabei keine offensichtlichen Krankheitssymptome beim Wirt (Pflanze) auszulösen (Petrini 1991, Wilson 1995). Eine Übersicht über die Definition des Begriffes Endophyt nach verschiedenen Autoren liefern Hyde & Soytong (2008).

Bezogen auf einen Pilz wäre zum Beispiel der Nachweis von Hyphen in lebenden Pflanzengewebe die Voraussetzung für die Bezeichnung als Endophyt (Nisa *et al.* 2015). Diese weit gefasste Definition des Begriffes Endophyt beinhaltet alle Arten von möglichen Pflanzen-Mikroorganismen Interaktionen von Mutualismus (Interaktion beider Partner zum gegenseitigen Vorteil), über Kommensalismus (ein Partner profitiert, der andere wird nicht beeinflusst) bis hin zu Parasitismus (Schädigung eines Partners zum Vorteil des anderen). Die oben genannte Definition schließt ebenfalls Organismen mit epiphytischer Phase sowie latente Pathogene ein (Petrini 1991, Wilson 1995, Schulz *et al.* 1998, Schulz *et al.* 1999). Im engeren Sinne, als "wahre Endophyten" (Mostert 2000), werden allerdings von einigen Autoren nur symbiotisch bzw. mutualistisch lebende Pilze dazugerechnet, was Pathogene ausschließt (Grimire & Hyde 2004, Schulz & Boyle 2005).

Diese funktionelle Abgrenzung erweist sich allerdings als schwierig, da sich die Interaktion zwischen Pflanze und besiedelndem Organismus mit der Zeit der Kolonisierung, wechselnden Umweltbedingungen oder Seneszenz der Pflanze verändern kann. So kann derselbe Pilz je nach Autor bzw. Beobachtungsfokus als Saprophyt, Pathogen oder als Endophyt beschrieben werden (Hammon & Faeth 1992, Wilson 1995, Ghimire & Hyde 2008).

2.2.2. Verbreitung und Vorkommen von Endophyten

Endophyten konnten bisher in nahezu allen studierten Pflanzengruppen (z.B. Bäume, Gräser, Farne, Moose, Algen) nachgewiesen werden und sind damit weltweit verbreitet (Ghimire & Hyde 2008, Haggag 2010). Dabei sind sie in der Lage, jegliches Pflanzengewebe (Stamm, Blätter, Wurzeln, Samen, etc.), sowohl inter- als auch intrazellulär (Schulz & Boyle 2005), unabhängig von der Klimazone (Tundra bis Tropen) zu kolonisieren (Nisa *et al.* 2016). Pilze sind neben heterotrophen Bakterien die dominierenden Endophyten in höheren Pflanzen, wobei aber auch phototrophe Mikroorganismen (Algen) als Endophyten nachgewiesen wurden (z.B. Trémouillaux-Guiller 2002) und weitere Mikrobenformen (z.B. Archaeen) vorstellbar sind (Strobel *et al.* 2004, Gond *et al.* 2010, Haggag 2010).

2.2.3. Klassifizierung endophytischer Pilze

Formal lassen sich Endophyten nach Wirt (z.B. Grasendophyten) oder Pflanzengewebe (z.B. Wurzel-, Rinden- oder Blätterendophyten) einteilen (Nisa *et al.* 2015). Ebenfalls können sie nach taxonomischen bzw. ökologischen Gesichtspunkten in zwei verschiedene Hauptgruppen („Clavicipitaceen-, Balansiaceen- bzw. Grasendophyten“ oder „Non-clavicipitaceen-Endophyten, Nicht-Balansiaceen, bzw. Nicht-Grasendophyten“) unterschieden werden (Schulz & Boyle 2005, Rodriguez *et al.* 2009, Mishra *et al.* 2014). Nicht verwechselt werden sollten endophytische Pilze mit Mykorrhizapilzen. Auf diese trifft die unter Kapitel 2.2.1. genannte Definition ebenfalls zu, allerdings unterscheiden sie sich generell durch die synchronisierte Pflanzen-Pilz-Entwicklung und dem Nährstofftransfer über spezialisierte Schnittstellen (Schulz & Boyle 2005).

Die beiden genannten Hauptgruppen lassen sich noch weiter (Klasse 1 bis 4) nach Besiedlungsstrategie (Wirtsbreite und -gewebe), Transmissionsmechanismus zwischen den Wirtsgenerationen (vertikal vs. horizontal), Biodiversität (ein bis wenige vs. hunderte Stämme) und Verbreitung innerhalb des Wirts (lokal vs. systemisch) oder der ökologischen Funktion (generierter Vorteil für den Wirt) klassifizieren (Rodriguez *et al.* 2009, Mishra *et al.* 2014). Weitere Kategorisierungen innerhalb der Endophytenklassen sind möglich, zum Beispiel Klasse 1 Type 1 bis 3 (Clay & Chardl 2002). Allerdings sind die genannten Einteilungen teilweise nicht konsistent oder von allen Autoren akzeptiert (Nisa *et al.* 2015).

2.2.4. Funktion der Pflanzen-Endophyt Wechselwirkung

Die Pflanzen-Endophyten-Assoziation kann sowohl für den Wirt als auch für den Gast von Vorteil sein. Der besiedelnde Mikroorganismus erhält physischen Schutz, Nährstoffe und hat eine größere Wirtsabdeckung im Vergleich zur nekrotrophen Infektion. Für die besiedelten Pflanzen wurde, abhängig von der Endophytenart, erhöhte abiotische und biotische Stresstoleranz beobachtet (Rodriguez *et al.* 2004, Schardl *et al.* 2004, Ghimire & Hyde 2008, Rodriguez *et al.* 2009). Abiotische Stresstoleranz umfasst zum Beispiel Protektion vor Stress aufgrund von Trockenheit, Temperatur, Salzkonzentration, pH-Wert, Schwermetallbelastung und Nährstoffmangel (z.B. Stickstoff). Ebenfalls wurde im Vergleich zu nicht besiedelten Pflanzen ein erhöhtes Biomassewachstum festgestellt. Endophyten können biotische Stresstoleranz vermitteln, was sich in erhöhter Resistenz gegen Nematoden, Viren, phytopathogene Bakterien und Pilze, sowie herbivore Insekten und Säugetiere äußern kann.

Als Mechanismus dieser Effekte werden vor allem die von den Endophyten produzierten Metaboliten, welche entweder als Induktoren für das Pflanzendefensivsystem, Wachstumsfaktoren, Radikalfänger (ROS) oder als toxische Wirkstoffe gegen Pathogene bzw. Herbivoren fungieren, diskutiert (Rodriguez *et al.* 2009, Gond *et al.* 2010). Bekannt sind hierbei vor allem weltweite Beispiele von Alkaloide produzierenden Endophyten aus Gräsern (z.B. *Epichloë* sp. bzw. *Neotyphodium* sp.), welche toxisch für Insekten (z.B. Peramin, Lolinalkaloide) und Säugetieren (z.B. Lolitrem B, Ergovalin) sind (Schulz & Boyle 2005, Schardl *et al.* 2007, Rodriguez *et al.* 2009). Einige Beziehungen zwischen Endophyten und Pflanzen sind so eng und spezifisch, dass sie sogar für die normale Entwicklung und das Überleben in bestimmten Habitaten des Pilzes oder der Pflanze benötigt werden. Als Beispiel hierfür lässt sich die fehlende Halotoleranz beim amerikanischen Dünengrass (*Leymus mollis*) ohne die Kolonisierung durch den Pilz *Fusarium culmorum* (Rodriguez *et al.* 2008) oder die vornehmliche Verbreitung bestimmter Pilze (*Epichloë* sp. bzw. *Neotyphodium* sp.) durch Pflanzensamen (Schardl *et al.* 2004) anführen. Ein weiteres Beispiel zeigt sich in der verlorenen Thermotoleranz, sowohl des Endophyten als auch des Wirts, im nativen Habitat der geothermalen Pflanze *Dichanthelium lanuginosum*, wenn diese nicht symbiotisch bzw. nicht zusammen mit dem Endophyt *Curvularia protuberata* kultiviert wurde (Redman *et al.* 2002). Die genauen Mechanismen und Steuerungsmöglichkeiten bei der Kommunikation zwischen Wirt und Endophyt, welche zur Stresstoleranz führen sind größtenteils noch ungeklärt (Rodriguez *et al.* 2004). Ein weiterer Vorteil, der sich für Pilze aus der Endophyt-Wirt-Beziehung ergibt, ist die Nutzung der Nährstoffe von abgestorbenem Pflanzengewebe bei Seneszenz oder Tod des Pflanzengewebes als Saprophyt.

Die Interaktion zwischen Endophyt und Pflanze ist allerdings keinesfalls statisch und kann sich je nach Umweltbedingungen, Alterung der Pflanze, sowie weiteren Faktoren verändern (Wilson 1995). Die funktionelle Einteilung von Endophyten in Mutualisten, Kommensalisten

und Parasiten ist daher, wie bereits in Kapitel 2.2.1 aufgezeigt, schwierig. Einige Autoren beschreiben die Endophyt-Pflanzen-Interaktion daher als "ausgeglichene Antagonismus" (Schulz *et al.* 1999) bzw. als Netzwerk multipler, ausgeglichener Antagonismen zwischen Pathogenen, Wirtspflanzen und anderen Endophyten (Schulz *et al.* 2015).

Durch Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Pathogenität einer Art durch Mutation in einem einzigen Genlocus verändern kann (Freeman & Rodriguez 1993). Einige Autoren vermuten deshalb, dass sich mutualistische Endophyten aus Pflanzenpathogenen entwickelt haben könnten. Weiter wird vermutet, dass eine Evolution auch von Pilzen, welche als Insekten und Säugetierparasiten lebten, stattgefunden hat (Spatafora *et al.* 2004, Rodriguez *et al.* 2009). Fest steht allerdings, dass Pflanzen und Pilze eine lang andauernde gemeinsame Evolution vorweisen können. Fossilienfunde zeigen bereits eine Endophyten-Pflanzen-Interaktion, die mehr als 400 Millionen Jahre zurückreicht (Krings *et al.* 2007). Dies lässt vermuten, dass Pilze eine große Rolle bei der terrestrischen Kolonisierung durch die ersten Landpflanzen gespielt haben (Redecker *et al.* 2000)

2.2.5. Besiedlung und Lebenszyklus von Endophyten

Die Kolonisation des Pflanzengewebes kann intra- oder interzellulär, lokal begrenzt, (teilweise nur in oder um eine einzelne Pflanzenzelle) oder systemisch sein (Schulz & Boxyle 2005, Ghimire & Hyde 2008). Die Transmission zur Pflanze kann hierbei über Sporen, Insekten oder den Pflanzensamen, wobei die Besiedlung hierbei bereits über die Samenanlage der Elternpflanzen stattgefunden hat, erfolgen (Petrini 1991, Rodriguez *et al.* 2009). Die Besiedlungen, welche bereits über Samen erfolgte, werden zudem mit einer größeren Wahrscheinlichkeit assoziiert, dass es sich dabei um eine Kolonisation mit einem mutualistischen Endophyten handelt, da die Weiterverbreitung des Pilzes hierbei direkt mit dem Überleben des Keimlings verbunden ist (Ghimire & Hyde 2008).

Einige Wirt-Endophyten-Interaktionen sind so eng, dass sich Wirt und Endophyt den kompletten Lebenszyklus teilen (Abbildung 2.4.).

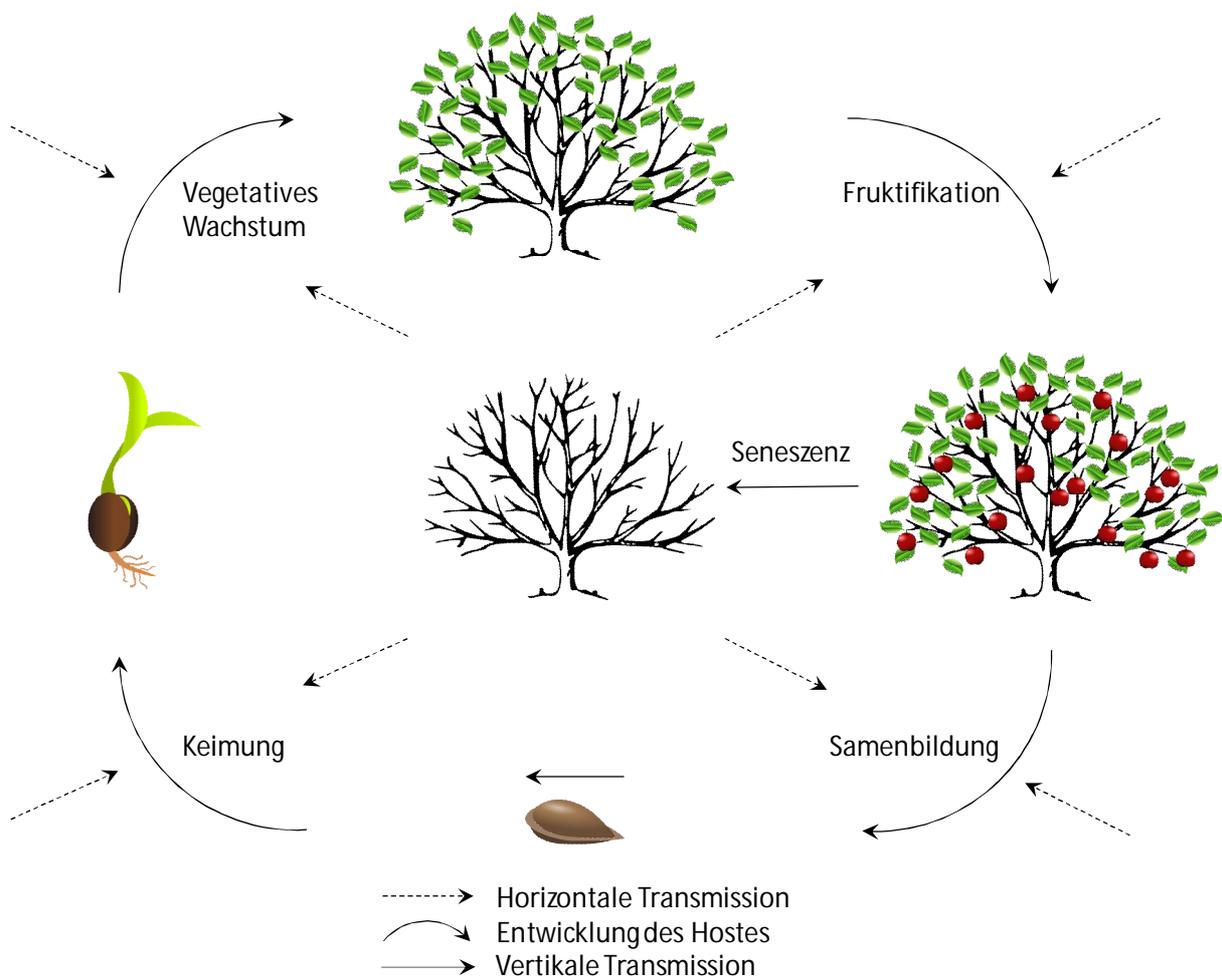


Abbildung. 2.4.: Lebenszyklus und Transmission von Endophyten zum und vom Wirt (eigene Darstellung).

Die Endophyten-Pflanzen-Interaktion kann mit der Keimung des Samens beginnen und sich von der vegetativen Wachstumsphase über die Fruktifikation bis hin zur Seneszenz und dem Tod der Pflanze (Apoptose/Nekrose) erstrecken. Dabei kann der Endophyt entweder über die Infektion der Samenanlage der Pflanzen über eine neue Samengeneration verbreitet werden (Jalgaonwala *et al.* 2011) oder bei abgestorbenen Pflanzengewebe als primärer Destruent (Saprophyt) am Abbau des Pflanzengewebes beteiligt sein (Hyde 2008, Zhou & Hyde 2001, Ghimire & Hyde 2008). Beim Abbau des Pflanzenmaterials wiederum können die Pilze sporulieren und so als Ausgangspunkt an der Transmission zu neuen Wirtspflanzen beteiligt sein.

Mit der Alterung der Pflanze können viele Infektionsereignisse auftreten, weshalb häufig viele verschiedene Endophyten isoliert werden können. Einigen Autoren berichten, dass oft, zumindest für Grass- bzw. Mutterkornpilzverwandte-Endophyten (Clavicipitaceae), eine dominante Endophytenspezies im Wirt vorhanden ist (Wille 1999). Bei Endophyten die allein oder sehr extensiv vorkommen wird eine größere Wahrscheinlichkeit angenommen, dass es sich um einen mutualistischen Endophyten handelt (Hammon & Faeth 1992). Aus Nicht-Clavicipitaceen-Wirten hingegen können häufig viele verschiedene Endophyten isoliert werden, die taxonomisch sehr divers sind (Schulz & Boyle 2005, Rodriguez *et al.* 2009). Die dominanten Endophyten eines Wirts können je nach Pflanzenspezies, Standort und Zeitpunkt der Untersuchung variieren. Die Zusammensetzung der Endophytengemeinschaft ist zudem starken räumlichen (Wirtsorgan und -standort) und temporalen (saisonale) Variationen unterworfen (Mishra *et al.* 2012, Ek-Ramos *et al.* 2013, Rather *et al.* 2018). Der dominante Endophyt, daher das häufigste Pilzisolat einer Beprobung, kann zu einem späteren Zeitpunkt sogar bei derselben Wirtspflanze eventuell nicht mehr nachweisbar sein (Suryanarayanan & Thennarasan 2004, Thongsandee *et al.* 2012). Meist lassen sich einige dominant vertretene Geno- bzw. Morphospezies identifizieren, während die Hauptdiversität durch Einzelisolate ("singeltons") repräsentiert ist (Arnold & Lutzoni 2007). Diese Beobachtung ist mit zunehmenden Alter des Pflanzengewebes ausgeprägter, da sich Infektionsereignisse anhäufen können (Arnold *et al.* 2000). Im Extremfall kann sich die Endophytenzusammensetzung sogar signifikant von Wirtsindividuum zu Wirtsindividuum am gleichen Standort oder sogar von Blatt zu Blatt desselben Wirtes unterscheiden (Arnold *et al.* 2003, Rodriguez *et al.* 2009). Allgemein ist bei der Beprobung von Pflanzen aus artenreichen Habitaten (z.B. tropischen Regenwälder) beobachtet worden, dass pro Pflanzenspezies generell mehr als zehn bis mehrere hundert unterscheidbare Endophytentaxa je Pflanzenart isoliert werden konnten. Aus diesem Grund ist postuliert worden, dass tropische Pilzendophyten hyperdivers sind (Arnold *et al.* 2000, Rodriguez *et al.* 2009). Die Inzidenz bzw. Kolonisierungshäufigkeit, Diversität und Wirtsbreite der Endophyten nimmt dabei von den arktischen über die gemäßigten zu den tropischen Habitaten zu (Arnold & Lutzoni 2007). Teilweise wird berichtet,

dass die Variation in der Endophytengemeinschaft durch saisonale Effekte und den Gewebetyp stärker beeinflusst ist als durch Standortfaktoren der Wirtspopulationen (Mishra et al. 2012). Diese Ausführungen verdeutlichen erneut die komplexe Interaktion von Endophyt und Wirt und implizieren ebenfalls die Probleme, die bei der Reisolierung bzw. Reproduzierbarkeit der Isolierung eines Produktionsstammes bioaktiver Metaboliten auftreten können.

Trotz der zeitlichen und räumlichen Variabilität in der Endophytenzusammensetzung innerhalb von Individuen einer Pflanzenart wurden signifikante Unterschiede bei den dominanten Endophyten bei zusammen auftretenden Pflanzenarten entdeckt. Diese Ungleichverteilung der Endophytendiversität innerhalb verschiedener Wirtsarten und Gewebetypen lässt auf Wirtsspezifität bzw. Gewebespezifität oder zumindest Wirtspräferenz bzw. Gewebepräferenz schließen (Arnold & Lutzoni 2007). Einige Endophyten werden als wirtsspezifisch angesehen, beispielsweise *Rhizoctonia* sp. als Endophyten von Orchideen (Orchidaceae) (Jia et al. 2016) oder *Epichloë* sp. und *Balansia* sp. als Endophyten von Gräsern (*Poales* sp.) (Schulz & Boyle 2005). Andere wiederum weisen ein breites Wirtsspektrum auf und sind ubiquitär vorhanden, wie beispielsweise verschiedene *Fusarium*-, *Xylaria*-, *Colleotrichium*-, *Phomopsis*- und *Pestalotiopsis*-Arten (Strobel & Daisy 2003, Arnold & Lutzoni 2007, Hyde & Soyong 2008). Trotz des Vorkommens von Generalisten sind die meisten Endophyten einzigartig für ihre biogeographische Region (Arnold & Lutzoni 2007). Problematisch bleibt jedoch, dass die Endophytenisolierung (siehe Kapitel 2.2.6.) und die daraus abgeleitete Diversität generell ein methodenabhängiger Prozess ist (Gou et al. 2000, Hyde & Soyong 2008). Dies lässt vermuten, dass die interessanten Endophyten, insbesondere mit Blick auf neue und bioaktive Naturstoffe, mit hoher Wirtsspezifität und potenziell großer Diversität eben nicht diejenigen Endophyten sind, welche sich problemlos kultivieren lassen (Arnold & Lutzoni 2007).

2.2.6. Nachweis und Isolierung endophytischer Pilze

Für die Identifizierung von Endophyten in Pflanzengewebe lassen sich verschiedene Methoden nutzen (Stone *et al.* 2004, Schulze & Boyle 2005).

Bei der histologischen Untersuchung des Pflanzengewebes lassen sich die Kolonisierung und das Ausmaß der Besiedlung durch Pilzhypen mit Mikroskopietechniken und Anfärbung nachweisen. Allerdings ist die taxonomische Einstufung der Pilze insbesondere bei (morphologisch) ähnlichen Arten nicht bzw. nur schwer möglich. Zusätzlich können Pilzstrukturen im Pflanzengewebe leicht übersehen werden, da die Besiedlung häufig lokal begrenzt ist.

Eine weitere Methode zum Nachweis von Endophyten ist die direkte Amplifizierung von Pilz-DNA aus homogenisierten, oberflächensterilisierten Pflanzengewebe. Diese Art der Untersuchung bietet eher generelle Informationen zur Zusammensetzung der Endophytengemeinschaft und taxonomischer Komposition (Stone *et al.* 2004). Allerdings kann hierbei die Unterscheidung zwischen Endo- und Epiphyten problematisch sein, da unklar ist, ob die DNA der Epiphyten bei den generell angewendeten Oberflächensterilisierungstechniken dennoch intakt bleibt (Schulze & Boyle 2005).

Die Standardmethode beim Studium von Endophyten beinhaltet die Eliminierung von Epiphyten mittels Oberflächensterilisierung, Auslegen des behandelten Pflanzengewebes auf geeignetem Agar-Nährmedium und die anschließende Subkultivierung als axenisches Isolat bei Raumtemperatur. Die am häufigsten genutzten Methoden zur Oberflächensterilisierung bestehen aus einer Kombinationsbehandlung chemischer und physikalischer Sterilisation mit wässriger Natriumhypochloritlösung (NaOCl) als starkes Oxidationsmittel und wässriger Ethanollösung (70-100%), welche zusätzlich als Benetzungsmittel wirkt, sowie die abschließenden Spülungen mit sterilem Wasser zur Entfernung von zurückbleibenden Desinfektionsmittel (Hallmann *et al.* 2006). Je nach zu behandelndem Pflanzengewebe und Autorenpräferenz werden variierende Einwirkzeiten und Konzentration genutzt. Darüber hinaus sind noch weitere, weniger gebräuchliche desinfizierende Agenzien in der Literatur beschrieben, unter anderem Silbernitrat, Formaldehyd, Quecksilberchlorid und Wasserstoffperoxid, sowie der Zusatz von Detergenzien (z.B. Tween 20, Tween 80, Triton-X-100) (Stone *et al.* 2004, Hallmann *et al.* 2006).

Einen Überblick gebräuchlicher Methoden, Agenzienkonzentration und Einwirkungszeit der Oberflächensterilisierung zur Endophytenisolierung bieten Schulz *et al.* (1993), Stone *et al.* (2004), Hallmann *et al.* 2006, sowie Jalgaonwala *et al.* (2011). Eine Erstellung des Pflanzenabdrucks nach der Oberflächensterilisierung wird nach Schulz & Boyle (2005) zur Überprüfung der Elimination von Epiphyten empfohlen. Ebenfalls sollten nach Bacon & White (1994), je nach Pflanzengewebe, verschiedene Einwirkzeiten getestet werden. Oberflächensterilisationen mit der Kombination von Ethanol und Natriumhypochlorid zur Eliminierung von E-

Endophyten bzw. Isolierung von Endophyten werden als geeignet angesehen (Schulz *et al.* 1993) und wurden daher für die Isolierungsprozedur der vorliegenden Arbeit verwendet.

Ein weiterer Aspekt bei der Isolierung von Endophyten ist die Medienwahl. Es sind definierte bzw. synthetische oder minimal Medien für die Isolierung spezifischer Organismengruppen beschrieben (z.B. Bacon & White 1994). Um Restriktionen bei der Anzahl der isolierten Arten zu minimieren, werden hingegen Komplex- oder Vollmedien verwendet. Am gebräuchlichsten für Pilze sind Kartoffel-Dextrose-Agar oder Malzextrakt-Agar (Stone *et al.* 2004, Hallmann *et al.* 2006). Um das Überwachsen der Kolonien durch sich rasch ausbreitende Pilze oder die generelle Kontaminationsgefahr zu verringern, verwenden einige Autoren Minimal-Medien, Wasser-Agar (Strobel & Daisy 2003) oder Komplexmedien mit reduziertem Nährstoffgehalt (Stone *et al.* 2004).

Eine weitere Möglichkeit zur Restriktion bzw. Beeinflussung der isolierbaren Endophytenarten ist die Zugabe von Additive in Form von antibakteriellen Substanzen (Chloramphenicol, Ampicillin, etc.), welche zur Vermeidung des Wachstums endophytischer Bakterien bzw. zur Verringerung genereller Kontamination beitragen. Ebenfalls beschrieben ist die Zugabe von Antimykotika (Cyclosporin A, Rose-Bengal, etc.) in geringer Konzentrationen, um schnellwachsende Pilzspezies an der Ausbreitung zu hindern. Auf ein generelles Verwerfen dieser zeitig isolierbaren Pilze indem zum Beispiel alle Pilze, die sich bereits nach unter 14 Tagen Inkubationszeit mit dem oberflächensterilisierten Pflanzenmaterial isolieren ließen, eliminiert werden (Stone *et al.* 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

2.2.7. Identifizierung und taxonomische Einordnung von endophytischen Pilzen

Die klassische Methode zur Identifizierung von Pilzendophyten ist, wie bei anderen Mikroorganismen auch, die morphologische Beschreibung und Klassifizierung anhand von Zellmerkmalen und Zelldifferenzierung (Müller & Löffler 1992, Aly *et al.* 2011a). Pilze verfügen über komplexe Erscheinungsformen und Entwicklungsstadien (Anamorphe- vs. Teleomorpheform). Die taxonomische Einordnung anhand von Morphologie erfolgt in erster Linie durch die Fruchtkörpermerkmale. Da gerade bei Endophytenstudien häufig Pilze ohne Fruchtkörpermerkmale (*mycelia sterilia*) isoliert werden bzw. die Bedingungen zur Induktion der Fruktifikation unbekannt sind und eine Unterschätzung der Endophytendiversität (Morphotyp vs. Genotyp) möglich ist, wird die morphologische Klassifizierungsmethodik zunehmend durch DNA-basierte Methoden komplementiert bzw. allmählich abgelöst (Sun & Guo 2012, Raja *et al.* 2017).

Etabliert ist die Sequenzierung und der Vergleich bestimmter, relativ kurzer (200 bis 1500Bp), Markerregionen, wie die ribosomalen Kern-DNA (nrDNA) Regionen ITS (Internal Transcript Spacer), LSU (Large Subunit), SSU (Small Subunit) oder Protein kodierenden Genen, wie RPB1 (Untereinheit von RNA Polymerase II), RPB2, CO1 (Cytochrom C Oxidase Untereinheit 1), MCM7 (Minichromosome Maintenance), β -Tubulin, welche als eine Art Barcode zur Speziesbestimmung dient. Bei diesem Barcoding-Ansatz hat sich unter den Mykologen die ITS-Region (ITS1, 5.8S, ITS2) als universelle Barcoderegion durchgesetzt (Schoch *et al.* 2012, Raja *et al.* 2017). Diese Region der ribosomalen Kern-DNA lässt sich in drei Bereiche einteilen, die jeweils von den Genen, LSU und SSU flankiert wird (siehe Abbildung 2.5.).

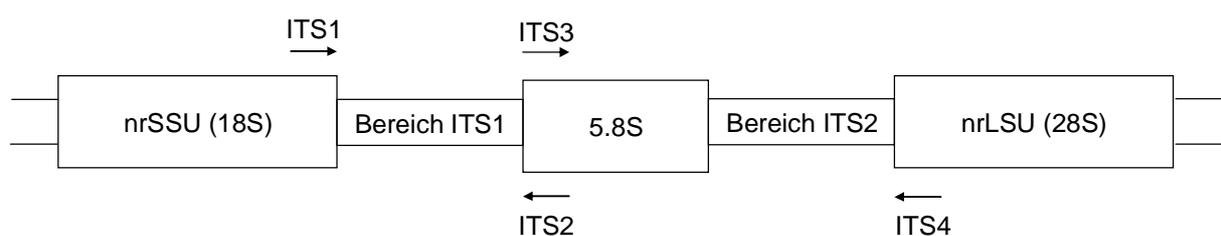


Abbildung 2.5: Schema zur Anordnung der nrDNA Gene und der ITS-Region mit Position der Primer (eigene Darstellung modifiziert nach Toju *et al.* 2012).

Je nach Autor, Sequenzieretechnik und Studie werden entweder ITS1, ITS2, der komplette ITS-Bereich, LSU oder SSU allein oder in Kombination für die Artbestimmung und phylogenetische Studien verwendet. SSU-, ITS- und LSU-Regionen haben dabei im Vergleich zueinander andere evolutionäre Veränderungsrate. Sie lassen sich demnach für verschiedene phylogenetische Fragestellungen nutzen. Dabei bietet der ITS-Bereich (schnellste evolutionäre Veränderungsrate) Auflösungen bis auf Arten- und Gattungsebene, der LSU-Bereich Vergleichsmöglichkeiten auf Gattungs- und Familienebene und der SSU-Bereich (geringste

evolutionäre Veränderungsrate) Informationen für Studien auf höheren taxonomischen Ebenen (Familie, Ordnung, Klasse, Phylum) (Raja *et al.* 2017)

Ebenfalls wichtig für eine DNA basierte Identifizierung, unabhängig von der verwendeten Region, ist die Nutzung universeller Primer mit breiter Phylumabdeckung. Die Forscher um White *et al.* (1990) publizierten bereits im Jahr 1990 mit den Primern ITS1 und ITS4 die bis heute am weitesten verbreiteten universellen Primer der ITS-Region (Stielow *et al.* 2015). Einige Autoren bevorzugten den Primer ITS5 über ITS1 wegen der besseren Phylumabdeckung (Eberhardt 2012). Mit der Zeit wurden Beiträge veröffentlicht, die Kombinationen von Primern evaluieren und neue Primer mit veränderter Phylumabdeckung vorstellen (z.B. Martin & Rygiewicz 2005, Bellemain *et al.* 2011, Toju *et al.* 2012, Bokulich & Mills 2013, Op De Beeck *et al.* 2014). Allerdings ist nach wie vor ein Bias über verschiedene taxonomische Gruppen beobachtbar, womit diese Gruppen entweder ausgeschlossen oder unterrepräsentiert sind. Dennoch kann die Nutzung unterschiedlicher Primerkombinationen bei gewissen Isolaten zu einer Identifizierung beitragen. Weiterhin ist der Barcodingansatz mit der ITS-Region interessant, da die für den Sequenzvergleich benötigte Informationen in öffentlichen Sequenzdatenbanken (z.B. INSDC) hinterlegt sind, welche in den letzten Jahren einen enormen Eintragszulauf erhalten haben (Begerow *et al.* 2010, Stielow *et al.* 2015). Problematisch bei der Spezieszuordnung anhand öffentlicher Datenbanken ist aber wiederum die hohe Anzahl an unbenannten oder falsch zugeordneten Sequenzen, häufige Revision bzw. unaktuelle taxonomische Zuordnung, sowie der hohen Synonymrate (etwa 2.5 zu 1) bei den akzeptierten Spezies (Hawksworth 2001, Raja *et al.* 2017). Bis zu 20% der eingetragenen Sequenzen könnten falsch zugeordnet (Bridge *et al.* 2003, Nilsson *et al.* 2006) bzw. unaktuell sein oder andere Probleme aufweisen (Hawksworth 2003, Holsten-Jensen *et al.* 2003). Verbesserungen stellen kuratierte und editierte Datenbanken dar (z.B. CBS-KNAW, UNITE, RDP Warcup training set V2, RefSeq), allerdings beinhalten diese deutlich weniger Vergleichsequenzen. Weiterhin bleibt die Identifizierung anhand von Vergleichsequenzen herausfordernd, da nur ein kleiner Teil der beschriebenen Pilze (ca. 30%) überhaupt über Referenzsequenzen verfügt (Vilgalys 2003, Raja *et al.* 2017).

Eine weitere Schwierigkeit der bei der Verwendung des Barcodeansatzes ist die Definition der Operational Taxonomical Unit (OTU). Daher besteht im Fall der Artenidentifizierung einer unbekanntes Pilzkultur die Problematik, bis zu welchem Anteil der Übereinstimmung einer Sequenz zu einer Typenspeziessequenz bzw. Referenzsequenz diese noch zur selben Art zugeordnet werden kann. In der Regel wird, wie auch bei Phylogeniestudien für Bakterien, die Übereinstimmung von 97% bzw. 3% Unterschied als Grenzwert für die OTU angewendet (Arnold & Lutzoni 2007, Sánchez Márquez *et al.* 2008, Begerow *et al.* 2010, Op De Beeck *et al.* 2014). Allerdings ist dieser feste Wert für verschiedene Pilzgenera unterschiedlich praktikabel. So kann die 97% Schwelle für Arten innerhalb einiger Gattungen zu hoch sein für an-

dere, besonders innerhalb der artenreichen Genera, wie *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* oder *Fusarium* mit Übereinstimmungen von über 99% für verschiedene Arten, zu niedrig (O'Brien *et al.* 2005, Begerow *et al.* 2010). Im Extremfall sind die ITS-Sequenzen sogar identisch und die Isolate auch morphologisch nicht voneinander unterscheidbar (Chaverri *et al.* 2015). Diese Isolate lassen sich gegebenenfalls nur mit Hilfe einer weiteren Markerregion (z.B. TEF für *Trichoderma* sp., CO1 für *Penicillium* sp.) unterscheiden. Eine weitere universell nutzbare Barcoderegion, welche komplementär neben der ITS-Sequenzierung zur Artbestimmung eingesetzt werden kann, ist im Moment Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion (Strielow *et al.* 2015). Allerdings kann diese zweite Barcoderegion ebenfalls, wie bei der ITS-Region auch, die Probleme der unterschiedlichen interspezifischen und intraspezifischen Sequenzvariabilität, der unvollständigen Primerabdeckung und der variierenden Länge der zu sequenzierenden Barcoderegion für verschiedene taxonomische Gruppen innerhalb des Pilzreiches, aufweisen. Die genannten Problematiken der Speziesidentifizierung mittels Markerregion werden eventuell erst gelöst sein, wenn komplette Genomsequenzierungen zum Standardrepertoire gehören. Auch wenn die Klassifizierung eines Stammes auf den ersten Blick eher eine biologisch interessante Fragestellung ist, hat diese ebenfalls Implikationen für die Naturstoffisolierung. Grund dafür ist, dass von den vielen verschiedenen Stämmen einer Morpho- oder Genospezies, die als Endophyten isoliert werden können, oftmals nur einige in der Lage sind bestimmte bioaktive Komponenten entweder überhaupt oder in ausreichender Menge während der Kultivierung zu produzieren (Li *et al.* 1996).

Beide genannte Methoden zur Artenidentifizierung, die morphologische und die DNA-basierte Methode, sollten nach Möglichkeit komplementär verwendet werden (Raja *et al.* 2017). Jedoch bleibt die morphologische Klassifizierung und das Involvieren aktueller taxonomischer Erkenntnisse aufgrund fehlender Spezialisten und begrenzter Verfügbarkeit von Typmaterial sowohl bei der morphologischen Identifizierung als auch bei der Überprüfung der Einträge aus Sequenzdatenbanken unpraktikabel (Bridge *et al.* 2004). Demnach wird der Barcodingansatz, trotz der genannten Einschränkungen, auf unabsehbare Zeit unverzichtbar für die Artenidentifizierung von Pilzendophyten bleiben.

2.2.8. Rationale Pflanzenwahl, Aspekte der Beprobung und Diversität der Endophytengemeinschaft

Trotz der komplexen Verteilung von Endophyten über Regionen, Wirte, Zeitpunkte und Gewebearten (siehe Kapitel 2.2.4. und 2.2.5.) und obwohl sich Endophyten generell aus jeder Pflanze und jedem Pflanzengewebe isolieren lassen (siehe Kapitel 2.2.2.), ist die Suche nach interessanten Naturstoffproduzenten dennoch kein "zufälliger Lauf durch einen zufälligen Wald" (Schulz et al. 2002). Durch eine geeignete Pflanzenwahl kann sich bereits eine verringerte Reisolierung bereits bekannter Naturstoffe aus Endophyten erreichen lassen (Strobel et al. 2004).

Die Autoren um Strobel et al. (2004) haben Leitlinien für die rationale Pflanzenwahl zur Isolierung von neuen Pilzarten und einzigartigen Stämmen/Biotypen beschrieben, welche in der Regel (siehe Kapitel 2.1.4.) als vielversprechenden Quellen neuer Sekundärmetaboliten gelten. Demnach sind Pflanzen mit besonderer Biologie, aus speziellen oder extremen Habitaten, sogenannte Extremophile, gute Ausgangsobjekte für Endophytenstudien mit dem Ziel der Isolierung neuer und bioaktiver Naturstoffe. Beispiele extremophiler Pflanzen sind Thermophyten (Pflanzen aus geologisch aktiven Quellen), Halophyten (Pflanzen aus hochsalinen Gebieten, z.B. Küstenstreifen, Salzseen) Acidophyten und Basiphyten bzw. Alkaliphyten (Pflanzen aus stark vom neutralem pH-Wert abweichenden pH-Bereichen, z.B. Moore, Bergbau- und Vulkanregion) oder Psycrophyten (Pflanzen von kalten Standorten, z.B. Tundra, Hochgebirge, Polarregionen). Ebenso sind Pflanzen mit ethnobotanischem Hintergrund bzw. in der traditionellen Medizin genutzte Gewächse oder bekannte Medizinalpflanzen als Auswahl interessant, da die endophytischen Mikroorganismen gegebenenfalls dieselben oder ähnliche Metaboliten wie die Pflanze produzieren (siehe Kapitel 2.1.4) und mitunter die eigentliche Quelle der wirksamen Komponenten darstellen. Des Weiteren sind Pflanzen aus Regionen früher evolutionsgeschichtlicher Trennung (z.B. Gondwana), abgetrennte und isolierte Regionen (Madagaskar, Australien, Neuseeland, Galapagos Inseln, etc.), sowie endemische Pflanzen mit eingeschränktem Verbreitungsgebiet und allgemein besonders langlebige Pflanzen vielversprechend. Hierbei wird angenommen, dass sich durch die räumlich getrennte Entwicklung der Pflanzen und des gemeinsamen evolutionären Prozesses mit den Endophyten eine eigene, spezialisierte Biologie entwickelte, die demnach auch einzigartige Mykobionten hervorbringt. Ebenfalls sind Pflanzen aus Regionen mit hoher Biodiversität und Konkurrenzdruck (z.B. Regenwälder) von Interesse, da hier ebenfalls von einer Korrelation zur Endophytenbiodiversität und der resultierenden Konkurrenzfähigkeit der mutualistischen Interaktion mit den Endophyten ausgegangen wird (Strobel et al. 2004).

Die beobachtete Artendiversität der isolierbaren Endophyten ist abhängig von der Wirtspflanze, Gewebetyp (Blätter, Wurzel, Rinde etc.), Gewebealter (Anzahl der Besiedlungsergebnisse steigt mit dem Expositionszeit), Probengröße (je kleiner das präparierte Gewe-

besegment desto mehr verschiedene Pilze lassen sich isolieren), Probenanzahl (z.B. Blätter verschiedener individueller Pflanzen der selben Art und vom selben Standort) und Pflanzenstandort (z.B. Hochebene vs. Tiefland, gemäßigte Region vs. Tropen), sowie weitere ortsspezifische Charakteristika (z.B. benachbarte Vegetation, Position in der Baumkrone) der individuellen Pflanze. Ebenfalls sind jahreszeitliche und räumliche Unterschiede innerhalb derselben Pflanze und desselben Gewebetyps bei der Kolonisierungshäufigkeit und Artenkomposition beschrieben (Stone *et al.* 2004). Einige Studien berichten zudem von Unterschieden in der Endophytengemeinschaft bei der Kultivierungs-basierten Identifizierung im Vergleich zur Identifizierung durch Metagenomstudien. Als Resultat ließen sich die Sequenzen von Organismen nachweisen, die nicht in den Kulturen wiedergefunden wurden oder umgekehrt Organismen, die als Endophytenkultur isoliert wurden aber nicht als Sequenz im Metagenomansatz nachgewiesen wurden (Arnold *et al.* 2007, Sun & Gou 2012). Dies kann durch die unterschiedlichen Isolierungs- und Kultivierungsbedingungen einerseits (siehe Kapitel 2.2.6.), sowie abweichende Primerabdeckung einzelner Taxa, unterschiedliche Sequenzier-techniken und deren Limitationen (siehe Kapitel 2.2.7.) andererseits, erklärt werden. Dies zeigt aber, dass die beobachtete Endophytendiversität ebenfalls durch die genutzten Techniken beeinflusst wird und somit ein weiterer zu beachtender Aspekt ist. Endophytenstudien sind daher generell als methodenabhängiger Prozess zu verstehen (Gou *et al.* 2001).

Der überwiegende Teil der isolierbaren Pilze kann verschiedenen Taxa innerhalb der Ascomyceten zugerechnet werden (Stone *et al.* 2004, Sun & Guo 2012) obwohl, wenn auch vergleichsweise selten, endophytische Basidiomyceten beschrieben sind, sowie Arten aus anderen "nicht Dikarya" Abteilungen (z.B. Gloeromycota) und Unterabteilungen (z.B. Mucoromycotina) der bestehenden Pilzsystematik (Hibbet *et al.* 2007) isoliert wurden. Verglichen mit den systemischen Endophyten aus Gräsern, welche sich hauptsächlich zwei Gattungen (*Epichloë* und *Balansia*) zuordnen lassen, sind Endophyten aus einjährigen und perennierende Pflanzen taxonomisch vielfältig und umfassen viele verschiedene Familien und Gattungen aus dem gesamten Reich der Pilze. Die meisten Arten lassen sich aus Blättern und Rinde isolieren, weniger artenreiche Pflanzenstrukturen sind Wurzeln und verholzte Pflanzenteile (Sprossachse, Leitbündel, Stamm, etc.). Allerdings ist dieser Befund nicht einheitlich und es lässt sich mitunter je nach Wirtspflanze eine andere Verteilung des Artenreichtums in den verschiedenen Pflanzengeweben ausmachen (z.B. Su *et al.* 2010, Nisa *et al.* 2015). Die Artenzusammensetzung der Endophytengemeinschaft in Blättern eines bestimmten Wirtes besteht in der Regel aus wenigen dominanten Spezies (Carrol 1995), die den Hauptteil der isolierten Endophyten stellen und viele verschiedene zufällige Arten, deren Varietät eher durch die Sammelstelle (Petrini 1986), Blattalter (Arnold & Herre 2003) und die Beprobungsintensität (Anzahl und Größe der Blattsegmente) bestimmt wird, als durch die Wirtspflanze (Stone *et al.* 2004, Arnold & Lutzoni 2007). Ebenfalls lässt sich die Gewebespezifität der be-

siedelnden Endophyten durch Unterschiede in der Artenzusammensetzung zum Beispiel Blatt vs. Zweig (z.B. Sieber & Dorworrth 1994); Rinde vs. Stamm (z.B. Fisher & Petrini 1990), Blatt vs. Stamm (z.B. Mishra *et al.* 2012), Blatt vs. Frucht (z.B. Ek-Ramos *et al.* 2013), oberirdische Pflanzenteile vs. Wurzeln (Comby *et al.* 2016) nachweisen. Jedoch sind hierbei ebenfalls Überschneidungen zu beobachten. Trotz der hohen Anzahl an verschiedenen Arten, die selbst von einer einzigen Wirtsspezies isoliert werden können (z.B. Arnold *et al.* 2000, Stone *et al.* 2000, Nisa *et al.* 2015) und Pilzarten, welche eine breites Wirtsspektrum und ubiquitärer Verbreitung haben, kann dennoch konstatiert werden, dass Wirtspräferenz bis hin zu Wirtsspezifität unter Endophyten verbreitet ist (Schulz & Boyle 2006, Arnold & Lutzoni 2007).

Die Diversität der isolierbaren Endophyten nimmt mit steigendem Breitengrad (Tropen zu Arktis) ab, wobei die Endophytengemeinschaft verschiedener Ökozonen (polare Zone, boreale Zone, etc.) allerdings einigartig ist (Arnold & Lutzoni 2007, Higgins *et al.* 2007). Daten aus verschiedenen Studien lassen annehmen, dass das Verhältnis von endemischen Endophyten zur Wirtspflanzenart, zumindest für Pflanzen aus gemäßigten Klimazonen, größer eins ist (Stone *et al.* 2004). In den Tropen ist dieses Verhältnis eventuell höher, auch wenn die Wirtspräferenz aufgrund von wenigen verfügbaren Studien, unterschiedlich zu interpretierende Ergebnissen und hohem Beprobungsaufwand schwerer nachweisbar ist (Arnold *et al.* 2000, Arnold & Lutzoni 2007). Auch wenn die Tropenregion als "Biodiversitätshotspots" angesehen werden, was ebenfalls auch auf Pilze aus diesen Gegenden zutrifft (Arnold & Lutzoni 2007), sind auch in gemäßigten Regionen noch viele unbeschriebene Pilz- bzw. Endophytenarten erwartbar. Zudem sind viele wirkstoffproduzierende Pilze in der Industrie Stämme aus gemäßigten Klimazonen (Blackwell 2011). Die Betrachtung der Endophytendiversität und deren Wirtsspezifität und hat nicht nur Implikationen für die Schätzungen zur weltweit insgesamt vorhandenen Anzahl an Pilzarten (Ghimire & Hyde 2004, Stone *et al.* 2004) und Beprobungsbetrachtungen allgemein, sondern auch für Suche nach vielversprechenden Naturstoffproduzenten, da neue Pilzarten, wie bereits dargelegt, oft mit neuen Sekundärmetaboliten assoziiert werden.

2.3. Trenntechniken

Naturstoffextrakte sind in der Regel komplexe Gemische aus hunderten verschiedener Komponenten (Latif 2006) von denen nur wenige über eine gesuchte bioaktive Eigenschaft verfügen oder neue Strukturen darstellen. Zudem sind diese oftmals, im Vergleich zu verbreitet vorkommenden Verbindungen (z.B. Fettsäuren), in geringer Konzentration vorhanden. Reinstoffe interessanter Verbindungen aus biologischen Extrakten lassen sich daher oft nur mit erheblichem Aufwand durch Kombination verschiedener Trenntechniken und der Variation der Trennbedingungen gewinnen (Sarker *et al.* 2006, Cannel 1998, Gibbons 1998). Im folgenden Kapitel werden einige Trenntechniken vorgestellt, die bei der Naturstoffisolierung relevant sind.

2.3.1. Chromatographische Trenntechniken

Chromatographie (gr. *chroma* - Farbe, *graphein* - schreiben) ist eine chemisch-physikalische Trenntechnik, die am Anfang der 1900er Jahre vom russischen Botaniker Mikhail Tswett (auch Tsvett, Tswet, Zwet, oder Cvet geschrieben) für die Trennung von Farbstoffen aus Pflanzenextrakten beschrieben und angewendet wurde. Diese Methode stellt die klassische Säulenchromatographie dar (Snyder *et al.* 2012). Seitdem wurden viele verschiedene Trenntechniken entwickelt, die unter dem Oberbegriff Chromatographie zusammengefasst werden können. Als Gemeinsamkeit lassen sich bei ihnen eine stationäre Phase definieren, die von einer mobilen Phase um und durchströmt wird. Dabei werden die einzelnen Komponenten des zu trennenden Stoffgemisches durch verschiedene Wechselwirkungen mit der stationären und der mobilen Phase unterschiedlich stark zurückgehalten und demnach unterschiedlich entlang der stationären Phase mit der mobilen Phase weiter transportiert. Die Komponenten können am Ende der Trennstrecke nach einer Retentionszeit (äußeres Chromatogramm) detektiert bzw. in Fraktionen aufgefangen oder anhand des Laufweges (inneres Chromatogramm) an der stationären Phase detektiert werden. Beide Varianten können sowohl analytisch als auch im präparativen Maßstab genutzt werden. Je nach Art der beteiligten Phase und daraus resultierenden Wechselwirkungen und Betriebsbedingungen, lassen sich die einzelnen Chromatographietechniken klassifizieren. So lassen sich die Techniken nach dem Aggregatzustand der mobilen Phase als Gas-, Flüssig- oder überkritische Fluid-Chromatographie oder nach dem Prinzip der Trennung, beispielsweise Adsorptions-, Verteilungs-, Größenausschluss-, Ionenaustausch- oder Affinitätschromatographie, unterteilen. Anhand weiterer Faktoren, wie Polarität des Säulenmaterials und des Laufmittels (Normal- und Umkehrphasen-Chromatographie), Form der stationären Phase (planare Chromatographie vs. Säulenchromatographie (gepackte und Kapillarsäulen), Partikelgröße und Betriebsdruck (Flash-Chromatographie, High Performance Liquid Chromatographie (HPLC), Ultra High Performance Liquid Chromatographie (UHPLC)), lassen sich die Chromatographie-

techniken noch weiter spezifizieren. Sämtliche Chromatographietechniken sind für die analytische und präparative Naturstofftrennung angewendet worden. Jedoch wird die Flüssigkeits-Adsorptionschromatographie (siehe Kapitel 2.3.1.) und die Größenausschlusschromatographie (siehe Kapitel 2.3.2.) mit flüssiger mobiler Phase wegen des weiten nutzbaren Polaritätsbereichs und der daraus resultierenden breiten Anwendbarkeit für viele Naturstoffklassen, sowie des geringen apparativen Aufwands und der Skalierbarkeit vorwiegend zur Isolierung von Sekundärmetaboliten aus komplexen Stoffgemischen genutzt.

Weitere chromatographische Methoden zur Trennung sind die Ionenaustauschchromatographie, welche geladene bzw. ionisierbare Moleküle trennt (Durham 2006) und die Gegenstromverteilungschromatographie (Flüssig-Flüssig-Chromatographie), welche Verbindungen aufgrund ihrer unterschiedlichen Verteilung in zwei nicht mischbaren Flüssigkeiten trennt (McAlpine & Morris 2006). Die Gegenstromverteilungschromatographie kann dabei als Multi-kaskaden-Variante der klassischen flüssig-flüssig-Extraktion gesehen werden. Wegen der Beschränkung auf Verbindungen mit ionisierbaren funktionellen Gruppen, vorwiegend solche, im Falle der Ionenaustauscherchromatographie, mit Carbonsäuren oder Aminen und des größeren apparatetechnischen Aufwands, bei der Gegenstromverteilungschromatographie, sind diese Methoden allerdings weniger verbreitet.

2.3.2. Flüssigkeits-Adsorptionschromatographie

Die Flüssigkeits-Adsorptionschromatographie (Flüssig-Fest-Chromatographie, LC), insbesondere in ihrer hochauflösenden Ausführung als „High Performance Liquid Chromatographie“ (HPLC) und mit dem Reversed-Phasen (RP-(HP)LC) Modus, stellt die am meisten verbreitete Technik zur Isolierung von Verbindungen aus komplexen Naturstoffextrakten dar (Latif 2006, Barrow 2006). Wie bei allen Chromatographietechniken lässt sich eine stationäre und mobile Phase, welche die stationäre Phase über bzw. durchströmt und die zu trennenden Verbindung weiter transportiert, definieren. Je nach Affinität der einzelnen Komponenten im Gemisch zur jeweiligen Phase weisen sie ein unterschiedliches Retentions- und Elutionsverhalten auf (Abbildung 2.6.).

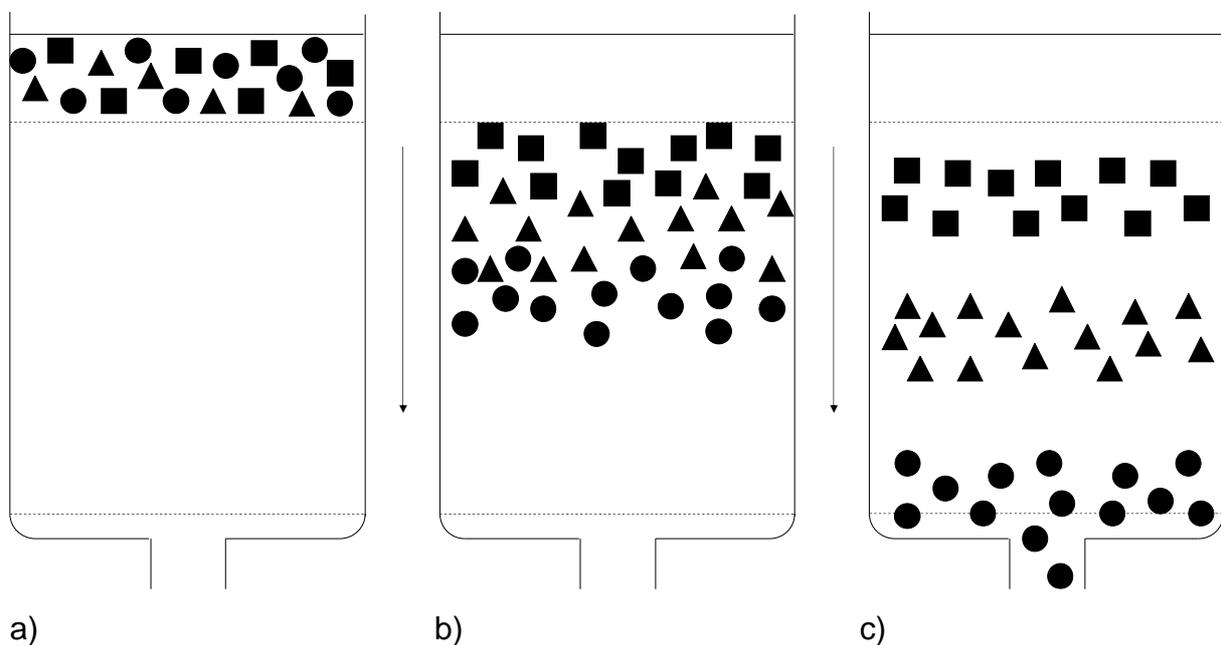


Abbildung: 2.6.: Prinzipskizze eines chromatographischen Trennungsvorgangs mittels Adsorption an der stationären Phase und Lösemittel-elution: a) Auftragung des Komponentengemisches b) Unterschiedliche Retention der Komponenten und Transport mit der mobilen Phase c) Elution der Komponente mit der geringsten Wechselwirkung zur stationären Phase. ↓ Flussrichtung, - - - stationären Phase (eigene Darstellung).

Die mobile Phase ist dabei eine Flüssigkeit, bei der sich Lösemittel über einen weiten Polariitätsbereich von unpolar (z.B. Hexan, Petrolether) über intermediär polar (z.B. Dichlormethan, Ethylacetat) bis hin zu polaren Lösemitteln (z.B. Methanol, Acetonitril, Wasser) einsetzen lassen. Als Zusatz zur pH-Einstellung für einen einheitlichen Ladungszustand der Eluenten werden Ameisensäure, Essigsäure, Trifluoressigsäure oder Trimethylamin verwendet. Die stationäre Phase besteht aus porösen, feinen Partikeln ($\varnothing = 10\text{-}200\ \mu\text{m}$) mit einer hohen spezifischen Oberfläche ($5\text{-}800\ \text{m}^2/\text{g}$) (Reid & Sarker 2006). Das Material liegt entweder gepackt als vollständig poröse Partikel, teilweise poröse Partikel mit festem Kern (Core-Shell-Partikel) oder als verbundener Block (Monolith) vor, wobei letztere jedoch nur in HPLC-

Systemen genutzt werden (Hayes *et al.* 2014). Überwiegend wird Kieselgel oder modifiziertes Kieselgel, zum Beispiel mit unpolarer Beschichtung C₈ bzw. C₁₈ oder polarer Beschichtung, unter anderem C₂, Amin oder Diol funktionalisiert, eingesetzt. Für spezielle Fragestellungen, aber weniger verbreitet genutzt, sind Aluminiumoxid- oder Polystyrenpartikel (Reid & Sarker 2006). Die Form der stationären Phase liegt dabei entweder gepackt, als Zylinder (Säulenchromatographie) oder planar, als dünne Schicht aufgebracht an einem Trägermaterial (Glas oder Aluminiumfolie), vor. Die Dünnschichtchromatographie (DC) findet dabei eher in der Analytik Anwendung, lässt sich aber auch präparativ im kleinen Maßstab (wenige Milligramm) für spezielle Trennproblematiken mit wenig apparativem Aufwand umsetzen (Gibbons 2006).

Durch Verfügbarkeit und apparattechnische Fortschritte verbreiteten sich seit den 1970er Jahren zunehmend HPLC-Systeme. Durch Reduktion der Partikelgröße (3-10µm) der stationären Phase ließ sich, bei gleichbleibender Säulenlänge, die Interaktion mit den Eluenten erhöhen und somit bessere Resolution erreichen und die Trennleistung erhöhen. Allerdings erfordert die damit verbundene Verringerung des Durchflusses erhöhte Betriebsdrücke, um die Retentionszeiten zu senken (Latif 2006, Stead 1998).

Als Betriebsmodus für die Trennung sind zum einen die Kombination von polarer stationärer Phase (meist Kieselgel) mit unpolarem bis semipolarem Laufmittel, in der Regel Petroether/Ethylacetat- oder Dichlormethan/Methanol-Mischungen, gebräuchlich. Dies wird als Normalphasen-Chromatographie (NP-Chromatographie) bezeichnet. Zum anderen werden unpolare stationäre Phasen (meist C₁₈-Kieselgel) mit semipolaren bis polaren Laufmitteln, in der Regel Wasser in Kombination mit organischen Laufmitteln (z.B. Acetonitril oder Methanol), für die chromatographische Trennung genutzt. Dies wird als Reversed-Phasen-Chromatographie (RP-Chromatographie) bezeichnet. Neben diesen beiden Techniken sind mit der "Non Aqueous Reversed Phase"-Chromatographie (NARP-Chromatographie) und der "Hydrophilic Interaction Chromatographie" (HILIC), sowie der "Aqueous Normal Phase"-Chromatographie (ANP-Chromatographie) ebenfalls Techniken bekannt, die sich zwischen den beiden zuvor genannten Methoden (NP- und RP-Chromatographie) einordnen lassen. Die NARP-Chromatographie verwendet typisches RP-Säulenmaterial als stationäre Phase (z.B. C₈- bis C₃₀-Kieselgel) mit nicht wässrigen, semipolaren Lösemittelsystemen (z.B. MeOH/DCM). Diese Trenntechnik eignet sich für komplexe Gemische unpolarer Naturstoffe (Fettsäuren, Triacylglyceride, Isoprenoide, etc.), die sich schwer unter NP-Chromatographie trennen oder sich nicht unter RP-Chromatographie Standardbedingungen eluieren lassen (Parris 1978, Pérez-Fernández *et al.* 2018). HILIC und ANP-Chromatographietechniken hingegen nutzen polare NP stationäre Phasen in Verbindung mit wässrig-organischen Lösemittelsystemen, die typischerweise in RP-Chromatographiesystemen Anwendung finden (Hemström & Irgum 2006, Pesek *et al.* 2013). Diese Techniken eignen sich zur Trennung

von polaren Metaboliten (z.B. Glykosiden), die auf RP-Säulen nur ungenügende Retention zeigen oder für Komponentengemische, welche in normalen RP-Lösemittelsystemen nicht löslich sind. Bei den zuletzt genannten Techniken NARP, HILIC und ANP werden allerdings neben der Adsorption verstärkt auch noch weitere Wechselwirkungs- und Trennmechanismen, wie solvophobe-Interaktion und Verteilung an zwei flüssigen Phasen, diskutiert (Abbildung 2.7.). So wird bei den HILIC- und ANP-Chromatographietechniken die Präsenz eines Wasserfilms, adsorbiert als Schicht um die stationäre Phase, an dem Verteilungsprozesse stattfinden können, diskutiert (Snyder *et al.* 2012).

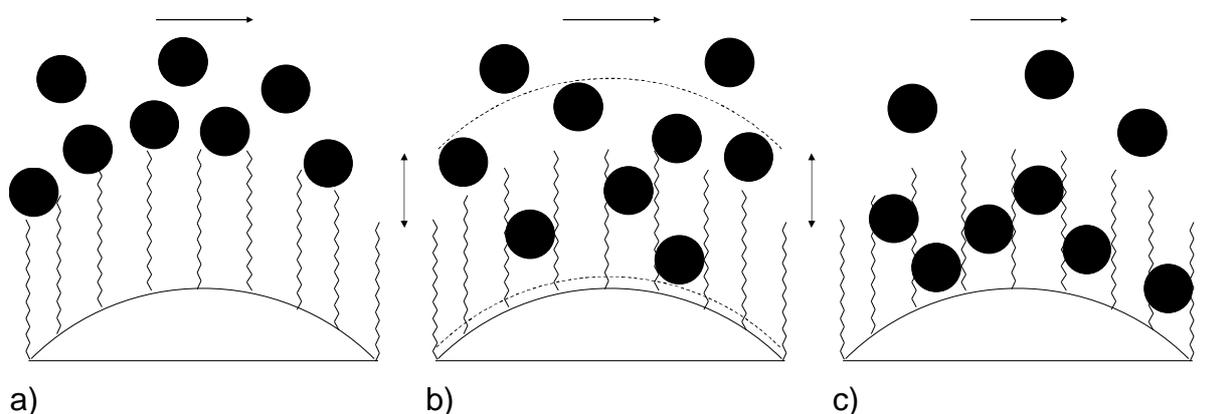


Abbildung 2.7.: Schematische Darstellung von beteiligten Wechselwirkungen zwischen Eluent und stationären Phase am Beispiel von RP-Materialtyp als stationäre Phase, → Flussrichtung, ⇕ Phasenwechsel, - - - sorbierter Lösemittelfilm: a) Adsorption und Desorption b) Verteilung am Flüssigkeitsfilm und sorbierten Lösemittelmolekülen c) solvophobe-Interaktion (eigene Darstellung).

Dies verdeutlicht die Vielseitigkeit der Flüssigchromatographie als Trenntechnik über einen weiten Polaritätsbereich und zeigt aber auch gleichzeitig die komplexen Interaktionen zwischen den Eluenten, sowie stationärer und mobiler Phase.

Die Elution bzw. die Retention einer Komponente an einer gegebenen stationären Phase lässt sich anhand der Polarität der Laufmittel und der Polarität der Eluenten mittels elutroper Reihen abschätzen. So eluieren bei der NP-Chromatographie unpolare Substanzen vor polaren Substanzen. Mit Erhöhung der Polarität des Lösungsmittelgemisches wird die Retention der Gemischkomponenten gegenüber der stationären Phase verringert, sodass diese ebenfalls von der stationären Phase gespült werden. Die Elutionsreihenfolge bei der RP-Chromatographie ist dabei entgegengesetzt. Hierbei zeigen polare Komponenten weniger Retention. Mit Erhöhung des unpolaren Lösungsmittelanteils im Laufmittelgemisch werden diese verstärkt entlang der Flussrichtung weiter transportiert und so ebenfalls aus der stationären Phase eluiert. Die Polarität des Lösungsmittelgemisches ist allerdings nur ein Aspekt bei der Retention der Gemischkomponenten.

Änderungen der Bestandteile des Laufmittelgemisches mit vergleichbarer Elutionsstärke können dennoch zu beachtlichen Retentionszeit bzw. R_f -Wert Unterschieden führen und so dennoch zum Trennerfolg zwischen verschiedenen Verbindungsklassen oder sogar zwischen strukturell ähnlichen Substanzen derselben Verbindungsklasse führen, welche sich im anderen Laufmittelsystem nicht trennen ließen. Der Begriff Polarität in Zusammenhang mit den zu eluierenden Substanzen ist demnach eine komplexe Funktion aus der Molekülstruktur und Arten der Interaktion mit der stationären und mobilen Phase (Snyder *et al.* 2012). Weitere Möglichkeiten zur Methodenentwicklung bestehen in der Fahrweise, entweder isokratisch (gleichbleibende) oder als Gradient (kontinuierlich oder stufenweise), der Laufmittelzusammensetzung.

Die Detektion der eluierenden Komponenten erfolgt bei der präparativen Säulenchromatographie entweder nachträglich außerhalb der Säule beispielsweise anhand fester Fraktionsgrößen mit analytischer DC und Färbereagenzien bzw. analytischer HPLC oder online während der Elution. Für Online-Monitoring sind die UV-VIS-, Brechungsindex- (RI) oder Lichtstreuendetektoren (ELS) als Hauptdetektortypen verfügbar (Latif 2006). Für die Nutzung der präparativen Dünnschichtchromatographie muss die Detektionsmethode allerdings zerstörungsfrei sein (in der Regel UV-VIS), weshalb gängige Färbereagenzien (z.B. Vanillin, Kaliumpermanganat) zur Visualisierung der Banden ausscheiden (Gibbons 2006). Abbildung 2.8. stellt die prinzipiellen Bestandteile einer säulenchromatographischen Trennung dar.

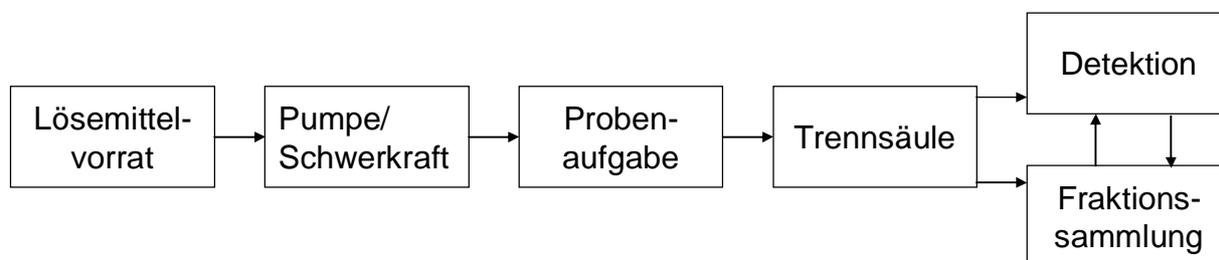


Abbildung 2.8.: Fließdiagramm zur Trennung mittels Säulenchromatographie (eigene Darstellung).

Die Probenauftragung erfolgt entweder gelöst in nach Möglichkeit minimaler Menge Laufmittel oder, bei ungenügender Löslichkeit, gebunden an einem Trägermaterial (z.B. Kieselgel, Kieselgur) direkt am Säulenkopf oder mittels separater Injektionsschleife bzw. Injektionskartusche. Versorgung mit und Transport des Laufmittels erfolgt durch entsprechende Lösemittelreservoirs und Pumpe bzw. Schwerkraft. Die Fraktionssammlung wird in festen Volumina mit anschließender Analytik und Zusammenführung von Fraktion ähnlicher Komposition oder anhand Online-Detektion vorgenommen.

2.3.3. Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC), auch als Gelpermeations- bzw. Gelfiltrationchromatographie bezeichnet, stellt eine weitere Chromatographie Trenntechnik dar. Das Trennprinzip basiert auf den unterschiedlichen hydrodynamischen Volumen, welche verschiedene Moleküle in Lösungen einnehmen (Reid & Sarker 2006). Diese Moleküle werden durch eine inerte feinporige Matrix (stationäre Phase) geführt. Dabei eluieren Moleküle mit einem großen hydrodynamischen Volumen zuerst, da diese durch ihre Größe von dem Zugang zu feineren Poren ausgeschlossen werden. Kleinere Moleküle eluieren hingegen verzögert, da diese in die kleineren Poren eindringen oder sie durchdringen können, womit diese einen längeren Weg bzw. eine längere Verweilzeit haben (Houssen & Jaspars 2006, Cannell 1998, Stead 1998) (Abbildung 2.9.).

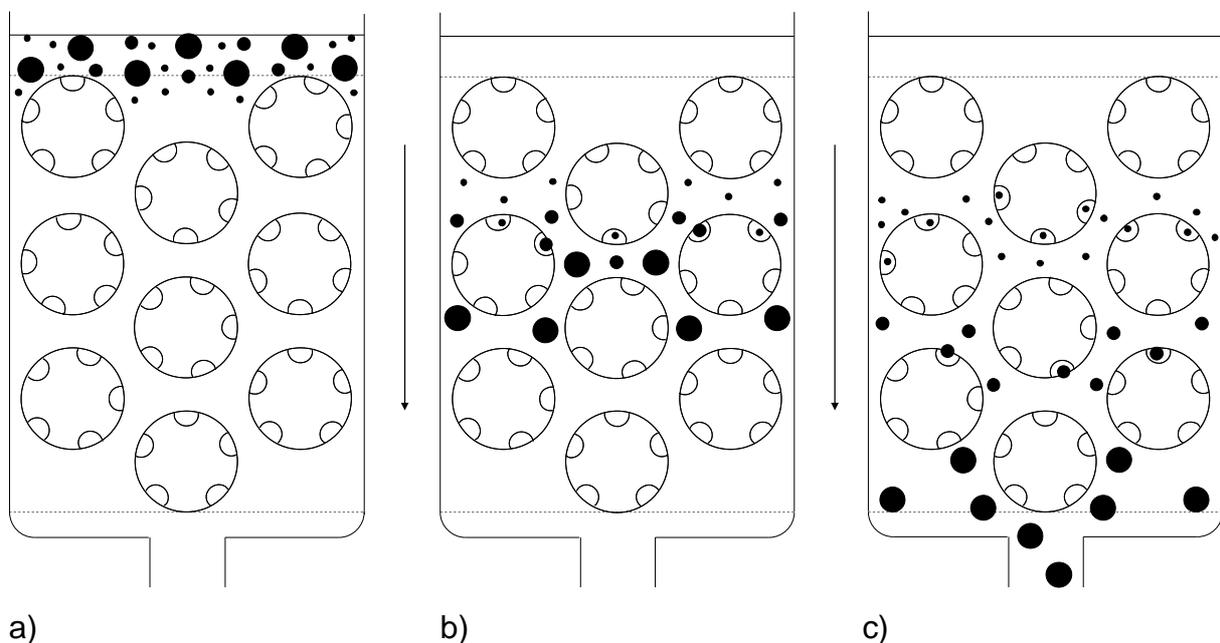


Abbildung 2.9.: Schema zur Größenausschlusschromatographie, ↓ Flussrichtung: a) Beginn des Trennvorgangs b) Unterschiedliche Retention der Gemischkomponenten c) Elution der Verbindung mit dem größten hydrodynamischen Volumen (eigene Darstellung, angelehnt an Wu et al. 1995).

Das hydrodynamische Volumen korreliert mit dem Molekulargewicht, weshalb bei dieser Methode häufig auch von einer Trennung nach Molekulargewicht gesprochen wird. Diese Technik wird daher ebenfalls zur Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren angewendet (Malwar 1995, Stead 1998).

Je nach Molmassenbereich und Polarität der zu trennenden Komponenten existieren verschiedene Typen von stationären Phasen in Form von quervernetzten Polymerkugeln (z.B. Dextrangele, Agarosegele, Polyacrylamidgele, Kieselgele, Styren-Divinylbenzencopolymere) (Cannell 1998, Stead 1998, Houssen & Jaspars 2006, Latif 2006). Diese Trenntechnik wird

häufig bei der Trennung von Proteinen, Peptiden, Poly- und Oligosacchariden, sowie anderen Polymere angewendet (Wu et al. 1995, Latif 2006, Houssen & Jaspars 2006). Für die Trennung niedermolekularer Naturstoffe ist die Nutzung von Sephadex LH-20 als stationäre Phase verbreitet (Reid & Sarker 2006, Cannell 1998). Diese Trennmatrix besteht aus hydroxypropyliertem mit Epichlorhydrin quervernetztem Dextran mit sowohl hydrophilem als auch hydrophobem Charakter, welches die Verwendung von organischen Lösemittelsystemen erlaubt (Houssen & Jaspars 2006).

Bei Stoffen mit vergleichsweise geringem Molekulargewicht werden, neben dem bereits oben beschriebenen Trennprinzip des Größenausschlusses, insbesondere bei der Verwendung von binären Lösungsmittelsystemen, des Weiteren das Trennprinzip der Verteilungschromatographie (Houssen & Jaspars 2006) und der Adsorption (Cannell 1998), sowie weitere Effekte (Stead 1998) diskutiert. Beim Verteilungseffekt wird angenommen, dass sich das Porenvolumen und das Außenvolumen in seiner Lösemittelzusammensetzung unterscheiden und sich Stoffe je nach Affinität unterschiedlich verteilen. Die anderen Trennprinzipien und Effekte hingegen können aus den zusätzlichen Wechselwirkungen der Substanzen mit der stationären Phase und dem Lösemittel einerseits und den Wechselwirkungen der zu trennenden Komponenten untereinander andererseits, resultieren. Die genannten Effekte stellen somit weitere Parameter zur Trennung und eröffnen demnach theoretisch die Trennung von Substanzen, welche dasselbe hydrodynamische Volumen aufweisen. Je nach Moleküleigenschaft und Lösemittelsystem sind die einzelnen Trenneffekte allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt.

Da Naturstoffextrakte in der Regel viele Komponenten mit ähnlichen Molekularmassen enthalten, ist diese Technik vor allem nützlich bei der Entfernung von unerwünschten hochmolekularen Stoffen (z.B. Chlorophylle, Zellwandfragmente) (Reid & Sarker 2006) oder bei Bestandteilen mit divergierenden Molekularmassen in späteren Phasen der Separation der Extraktkomponenten (Latif 2006). Zudem ist die Probenrückgewinnung durch das inerte Packungsmaterial in der Regel sehr hoch (Salituro & Dufresne 1998, Houssen & Jaspars 2006).

2.4. Analytik zur Strukturaufklärung von Naturstoffen

Für die Identifizierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen ist generell eine Kombination von analytischen Techniken notwendig. Die wichtigsten sind die NMR-Spektroskopie und die Massenspektrometrie (Bross-Walch *et al.* 2005). Bei speziellen Fragestellungen oder Abgleich mit bestehenden Referenzspektren sind ebenfalls weitere spektroskopische Methoden wie IR- oder UV-VIS Spektroskopie nützlich. Für die Aufklärung der Konfiguration eines Moleküls ist darüberhinaus die Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenstrahlung eine wertvolle Methode.

2.4.1. Massenspektrometrie

Im Bereich der Naturstoffcharakterisierung werden generell Information aus der Massenspektrometrie genutzt. Entweder werden diese zur Bestätigung des etablierten Strukturvorschlags mittels niedrig bzw. hochauflösenden Massespektren, als Teil der Dereplikationsstrategie (siehe Kapitel 2.4.4.) bei der Extraktbearbeitung oder zur Absicherung bzw. zum Erhalt zusätzlicher Strukturinformationen anhand von Fragmentierungsmustern oder prominenten Ionenaddukten verwendet (Bouslimani *et al.* 2014). Wegen der geringen benötigten Menge im Vergleich zu spektroskopischen Methoden wie der NMR-Spektroskopie und der Kombinationsmöglichkeit mit verbreiteten Trenntechniken (i.d.R. RP-HPLC) ist die Massenspektrometrie oftmals der erste Zugang zu Strukturinformationen in Naturstoffstudien (Hubert *et al.* 2017). Die Massenspektrometrie ist eine relativ alte Technik deren Wert für die Naturstoffaufklärung bereits früh erkannt und spätestens seit der Mitte der 1950er Jahre auf verschiedene Naturstoffklassen (z.B. Peptide und Alkaloide) angewendet wurde (Biemann 2015). Massenspektrometer bestehen prinzipiell aus den Bestandteilen eines Probenaufgabensystems, einer Ionenquelle, eines Massenseparators bzw. -analysators, eines Detektors sowie einem System zur Datenverarbeitung (Abbildung 2.10.). Die Ionisierung, Massenseparation und Detektion findet dabei im Hochvakuum statt.

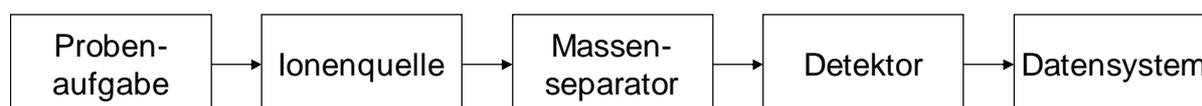


Abbildung 2.10.: Prinzipskizze zu Bestandteilen von Massenspektrometern (eigene Darstellung, angelehnt an Gross 2013).

Über die Jahre wurden verschiedene Massenseparationsprinzipien bzw. Massenanalytortypen (TOF-, Sektorfeld-, Quadrupol-, Ionenfallenanalysatoren) und Ionisierungstechniken (EI, ESI, MALDI, FAB, PI, CI etc.) entwickelt, welche den Anwendungsbereich für bestimmte Naturstoffklassen erweitern. Die gebräuchlichsten Ionisierungstechniken sind die ESI- und MALDI-Techniken. Gründe hierfür liegen in ihrer, im Vergleich zu anderen Ionisierungstechniken

niken (z.B. EI), schonenden Ionisierung und der Anwendbarkeit auch für große Moleküle (z.B. Proteine, Polysaccharide). Die Elektronenstoß-Ionisierung (EI) als klassische Ionisierungsmethode ist für kleine organische Moleküle weiterhin stark verbreitet. Entsprechend der genutzten Ionisierungstechnik und Massenseparation können die massenspektrometrischen Verfahren klassifiziert werden (z.B. ESI-TOF-MS, EI-IT-MS). In der Praxis sind Massenspektrometer häufig mit einem Chromatographie-Trennsystem (z.B. RP-HPLC-TOF-MS) gekoppelt. Durch Erweiterungen der Instrumentation können Tandem-MS- bzw. MS/MS-Experimente oder multiple Fragmentierungsuntersuchungen (MS^n) ausgeführt werden. Tandem-MS-Experimente können besonders für die Strukturaufklärung von Naturstoffen von Interesse sein. Hierbei wird die Probe zunächst durch eine weiche Ionisierungsmethode nach Masse/Ladungsverhältnis (m/z) selektierte Vorläuferionen getrennt. Dies liefert in der Regel die m/z -Werte der Molekül- bzw. Pseudomolekülionen. In einem zweiten MS-Experiment (räumlich oder zeitlich getrenntes Tandem-MS) werden aus den zuvor selektierten Vorläuferionen, Fraktionen generiert, die wiederum nach m/z -Werten selektiert werden. Dies wird entweder durch die spontane Dissoziation metastabiler Ionen oder durch den induzierten Zerfall mittels Kollision mit inertem Trägergas (CID - Collision Induced Dissociation) oder an einer Oberfläche (SID - Surface Induced Dissociation) erreicht (Gross 2013). Durch die Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen Ionisierungstechniken, Massenseparatoren und Dissoziationsaktivierungen existieren sehr viele Varianten und Parameter eines MS/MS-Experimentes. Die daraus resultierenden Spektren können anhand des Fragmentierungsmusters Rückschlüsse auf strukturelle Merkmale des Analyten geben oder die Unterscheidung von Substanzen mit derselben Summenformel bzw. ähnlicher Masse ermöglichen. Je nach Massengenauigkeit des Spektrometers (Low Resolution (LR-MS) bzw. High Resolution (HR-MS)), Ionisierungstechnik und Instrumentierung (Generierung von Fragmentierungsmustern entweder aus harter Ionisierung oder MS/MS-Experimenten), sowie dem Zugang zu Spektrendatenbanken (Verbindungs- (Antibase, SciFinder, etc.) bzw. Spektren-basiert (Massbank, LipidMAPS, etc.)) und Analyseprinzipien (Fragmentation Prediction, Molecular Networking) können MS-Experimente bereits in frühen Stadien der Extraktbearbeitung zur Dereplikation (siehe Kapitel 2.4.4.) genutzt werden (Bouslimani *et al.* 2014). Neuere MS-Techniken, welche unter anderem die Vermessung von Naturstoffen direkt aus Umweltproben und biologischen Material (z.B. Blättern, Mycel) mittels Atmosphärendruck-Ionisationstechniken (DART, DESI) ermöglichen oder komplexen Naturstoffextrakte mit hunderten von bekannten Verbindungen identifizieren bzw. die Strukturklasse bisher unbekannter Verbindungen anhand von Fragmentationsbäumen einordnen, sind in der Entwicklung (Bouslimani *et al.* 2014).

2.4.2. NMR-Spektroskopie

Die Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance) stellt die wichtigste Methode zur Strukturaufklärung organischer Moleküle dar. Bestimmte Isotope chemischer Elemente verfügen über einen Eigendrehimpuls, welche über eine Spinquantenzahl (I) abweichend von Null verfügen und somit in NMR-Experimenten zugänglich sind. Einige der am häufigsten vorkommenden Isotope, wie ^{12}C und ^{16}O ($I = 0$), sind hingegen NMR unempfindlich. Die wichtigsten NMR zugänglichen Kerne (^1H , ^{13}C) für die Strukturaufklärung verfügen über eine Spinquantenzahl von $I = 1/2$. Anhand der chemischen Verschiebung bekannter Strukturelemente aus Tabellenwerken lassen sich Rückschlüsse auf die Molekülstruktur, wie zum Beispiel das Vorhandensein und die Nähe bestimmter funktioneller Gruppen, ableiten. Nicht nur über die chemische Verschiebung, sondern auch über die Integrale der Signalgruppen, die Signalform (z.B. scharf/breit, Dacheffekt) und die Signalfinaufspaltung (Multiplizität, M) durch indirekte- bzw. skalare Spin-Spin-Kopplung und die zugehörigen Kopplungskonstanten (J) lassen sich im ^1H -NMR Aussagen über Struktur des vermessenen Moleküls erhalten. Der Betrag der Kopplungskonstante ist unabhängig vom äußeren Magnetfeld und nimmt in der Regel mit zunehmender Bindungsentfernung zum Kopplungspartner ab. Bestimmte Kopplungskonstanten sind darüber hinaus charakteristisch für beispielsweise Geometrien von Doppelbindungen (*cis*: $^3J_{\text{H,H}} = 6\text{-}11$ Hz, *trans*: $^3J_{\text{H,H}} = 12\text{-}19$ Hz) oder Substitutionsmuster am Aromaten (*ortho*: $^3J_{\text{H,H}} = 6\text{-}10$ Hz, *meta*: $^4J_{\text{H,H}} = 1\text{-}3$ Hz, *para*: $^5J_{\text{H,H}} = 0\text{-}1,5$ Hz) und liefern daher weitere wertvolle Strukturinformationen (Field *et al.* 2008).

In ^{13}C -NMR werden aufgrund der geringen natürlichen Häufigkeit im Vergleich zu ^{12}C -Kernen generell keine ^{13}C - ^{13}C -Kopplungen beobachtet. Die ^{13}C - ^1H -Kopplungen hingegen sind beobachtbar und folgen den Multiplizitätsregeln. Die Signale werden allerdings in der Regel mittels Breitbandentkopplung durch Einbringen von Strahlung im Resonanzbereich der ^1H -Kerne unterdrückt, weshalb die ^{13}C -Signale als Singulets erscheinen. Dies vereinfacht die Interpretation des ^{13}C -Spektrums und erhöht unter anderem durch die Unterdrückung der Aufspaltung die Intensität der beobachteten Signale, wobei die einzelnen Signale nach Entkopplung keine korrekten Integrale ausweisen (Field *et al.* 2008). Der Informationsverlust durch Entfallen der Kopplungsmuster, wie zum Beispiel die Anzahl der ^1H -Kopplungspartner durch $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplung oder Strukturinformationen durch weiterreichende ^{13}C - ^1H -Kopplungen (z.B. $^2J_{\text{C-C,H}}$, $^3J_{\text{C-C-C,H}}$), können durch andere NMR-Experimente (z.B. DEPT, Heteronukleare 2d-Spektren) oder durch redundante Informationen aus ^1H -Spektren gewonnen werden.

Die vorgestellten ^1H - und ^{13}C -Spektren liefern bereits wichtige Strukturinformationen. Neben den erweiterten technischen Entwicklungen, wie Kryomagnete, mit denen deutlich höhere Magnetfeldstärken generiert werden können oder gekühlte Probenköpfe bzw. Sender-/Empfängerspulen ("Cryoprobes"), welche das thermische Rauschen minimieren und damit die Sensitivität des Signals erhöhen, die Messzeit verkürzt bzw. die Anforderungen an Pro-

benmenge der oftmals substanzlimitierten Naturstoffproben verringert, wird ein deutlicher Fortschritt für die strukturelle Charakterisierung von Naturstoffen in den seit den 1970er Jahren entwickelten Homo- und Heteronuklearen 2d-Experimenten gesehen (Bross-Walch *et al.* 2006). Besonders für die Strukturaufklärung hervorzuheben ist das homonukleare ^1H - ^1H -NMR-Experiment COSY (Correlation Spectroscopy), welches Kopplungspartner, in der Regel in geminaler ($^2J_{\text{H,H}}$) und vicinaler ($^3J_{\text{H,H}}$) Position, in konjugierten oder rigiden Systemen auch über 4 ($^4J_{\text{H,H}}$) oder sehr selten 5 ($^5J_{\text{H,H}}$) Bindungen, aufzeigt. Weiterhin sind TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) Experimente, welche Kopplungen innerhalb eines kompletten Spinnsystems ansprechen, hervorzuheben. Zuletzt genanntes Experiment ist besonders nützlich bei Verbindungen mit vielen separaten Spinnsystemen, wie Peptiden oder Sacchariden. Ebenfalls zu den 2d-homonuklearen ^1H , ^1H -Spektren zählen NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) und ROESY (Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy). Diese NMR-Experimente visualisieren allerdings direkte Spin-Spin-Kopplung durch NOE-Differenzspektren. Die Kopplungen sind daher nicht bindungsvermittelt, sondern zeigen Korrelation durch den Raum ($\sim 5\text{\AA}$). Die Ausnutzung des Kern-Overhauser-Effektes (NOE) kann demnach hilfreich zur Aufklärung der Molekülkonfiguration, sowie der Verknüpfung getrennter Spinsysteme sein (Friebolin 1999, Mitchell & Costisella 2007).

Bei den heteronuklearen 2d-Korrelation sind vor allem HSQC- (Heteronuclear Quantum Correlation) bzw. HMQC-Experimente (Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), welche die $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplung, somit das direkt am Kohlenstoffatom gebundene Wasserstoffatom, identifiziert und HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) Experimente, welche $^2J_{\text{C,H}}$ - und $^3J_{\text{C,H}}$ -Korrelationen hervorheben, für die strukturelle Aufklärung von Naturstoffen relevant. Ähnlich zum H-H-COSY sind in konjugierten Systemen und bei besonderen Konformationen auch 4J -Kopplungen, seltener 5J -Kopplungen beobachtbar. Insbesondere HMBC-Experimente sind unerlässlich bei der Verknüpfung von separaten Spinnsystemen über quaternäre C-Atome und Heteroatome (N, O, S) hinweg (Bross-Walch *et al.* 2006).

Weiterhin existieren einige NMR-Experimente bzw. Kombination von Pulsfolgen, die für bestimmte Fragestellungen oder Naturstoffklassen relevant sein können. Als Beispiel lässt sich das Kombinationsexperiment HSQC-TOCSY für Moleküle (z.B. Steroide, Terpenoide) mit enger Dispersion der chemischen Verschiebung bzw. starker ^1H -NMR Signalüberlappung nennen. Des Weiteren lässt sich das 2d-INADEQUATE (Incredible Natural Abundance Double Quantum Transfer) Experiment mit Beobachtung der $^1J_{\text{C,C}}$ -Kopplungen aufzählen, welches für Verbindungen mit stark substituiertem Kohlenstoffgerüsten, zum Beispiel bei polyzyklischen Aromaten, wie Antracenen oder Flavonoiden, geeignet ist (Bross-Walch *et al.* 2006). Letzteres Experiment stellte durch die geringe Häufigkeit von benachbarten ^{13}C -Atomen (ca. 0,01% im Vergleich zu ^{12}C) allerdings besondere Anforderungen an Probenmenge und Messzeit (Friebolin 1999).

2.4.3. Erstellung der Molekülstruktur

Zur Erstellung eines Strukturvorschlages werden die Information aus den einzelnen vorgestellten NMR-Experimenten (Kapitel 2.4.2.) kombiniert und gegebenenfalls durch äquivalente Informationen aus verschiedenen NMR-Experimenten zusätzlich abgesichert. Die chemischen Verschiebungen aus den 1d-NMR-Experimenten (^1H -NMR und ^{13}C -NMR) liefern anhand von Tabellenvergleichswerken (z.B. Pretsch *et al.* 2010) typische Verschiebungsbereiche, die bereits auf das Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen oder Strukturelemente schließen lassen (z.B. ~6-9ppm - aromatisches Proton, ~50-60ppm - Methoxykohlenstoff). Die Verschiebungsbereiche vieler funktioneller Gruppen und Strukturelemente überlagern allerdings bzw. können je nach elektronischer Umgebung sehr breit sein, weshalb ergänzende Strukturinformationen aus 2d-NMR-Korrelationen unerlässlich sind. Ohne Vorwissen zur Naturstoffklasse der isolierten Verbindung bietet sich die fragmentbasierte Strukturerrstellungen an. Dazu werden Substrukturen anhand von vereinzelt Spin-Systemen durch ^1H -, COSY-, TOCSY- und HMQC-Spektren erstellt. Diese Substrukturen bzw. Molekülfragmente werden mittels ^{13}C -Spektren und HMBC-Korrelationen verknüpft. Die Bestimmung der funktionellen Gruppen und der verbundenen Heteroatome erfolgt über die chemische Verschiebung und anhand des Massenspektrums. Zur Bestimmung der relativen Konfiguration und zur Unterscheidung von Regioisomeren können NOESY- oder ROESY-Spektren herangezogen werden. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration hingegen sind Vergleichsdaten aus Drehwert- bzw. CD-Messungen oder die Kristallstruktur nötig.

Häufig lassen sich allein aus dem ^1H -NMR-Spektrum bereits Vorschläge zur Naturstoffklasse unterbreiten. Ist die Klasse des isolierten Naturstoffes entweder durch Literaturrecherchen zu den zu erwartenden Metaboliten in verwandten Organismen ableitbar oder bereits durch das ^1H -NMR offensichtlich, so kann mitunter das Kohlenstoffgerüst direkt bestimmt und das Substitutionsmuster bei reduziertem NMR-Spektrensatz etabliert werden (Bross-Walch *et al.* 2005).

2.4.4. Dereplikationsstrategien

Ein großes Problem in der Naturstoffforschung stellt die Reisolierung von bereits bekannten Metaboliten dar. Ansätze und Strategien zur Verhinderung dessen werden als Dereplikation bezeichnet und zielen darauf ab, bereits bekannte Verbindungen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Organismenauswahl und der Extraktbearbeitung zu identifizieren (El-Elimat *et al.* 2013, Hubert *et al.* 2017). Wie bereits in Kapitel 2.1.4. und 2.2.7. diskutiert, liegt eine generelle Möglichkeit zur Dereplikation in der Auswahl von Mikroorganismen aus speziellen Habitaten oder taxonomisch wenig erforschten Organismengruppen. Neue Mikroorganismen werden in der Regel mit neuen Metaboliten assoziiert (Strobel *et al.* 2005) bzw. es sind bei eng verwandten Arten für gewöhnlich ähnliche Naturstoffe zu erwarten (El-Elimat *et al.* 2013). Dieser Ansatz wird als Taxonomy- oder Gensequenz-basierte Dereplikation bezeichnet. Hierbei werden meist aus kurzen nrDNA-Sequenzen phylogenetische Bäume generiert, welche nach der Clusteranalyse die Auswahl eines vielversprechenden Stammes unterstützen können (Hubert *et al.* 2017). Einen alternativen Ansatz bietet das "genome mining", welches sich ebenfalls zur genbasierten Art der Dereplikationsstrategie zählen lässt und bei sequenzierten Genomen isolierter Organismen oder Metagenomen aus Umweltproben genutzt werden kann. Hierbei wird gezielt nach DNA-Bereichen gesucht, welche für Enzyme oder Multienzymkomplexe des Sekundärmetabolitstoffwechsels codieren (z.B. Polyketidsynthase (PKS), Nichtribosomale Peptidsynthase (NRPS)). Organismen, mit vielen verschiedenen oder ungewöhnlichen Kombinationen solcher Biosynthesegene, können als produktive oder privilegierte Stämme gesehen und bei der Auswahl bevorzugt werden. Ein bekanntes Programm zur Vorhersage von potenziell generierbaren Metaboliten anhand von DNA-Sequenzen der Mikroorganismen ist beispielsweise antiSMASH (Medema *et al.* 2011, Blin *et al.* 2019). Allerdings ist zu beachten, dass solche Betrachtungen vorwiegend für gut charakterisierte modulare Biosynthesysteme funktionieren. Hingegen können Metaboliten mit unbekanntem oder gemischtem biosynthetischem Ursprung übersehen werden und den Prognosen aus der Genomanalyse entgehen. Demnach sind für die Naturstoffforschung weiterhin Vorgehen nötig, welche auf Kultivierung des Produktionsstammes, Isolierung der Metaboliten und deren anschließender struktureller Aufklärung basieren (Bachmann *et al.* 2014).

Neben den Dereplikationsstrategien, welche auf taxonomischen (morphologisch- und DNA-basiert) Gesichtspunkten beruhen oder die auf der Analyse von Sekundärmetabolit-Biosynthesegenen aufbauen, existieren Strategien, welche unabhängig von der Quelle des Extrakts bleiben. Diese stützen sich auf Metabolitdatenbanken mit spektroskopischen und spektrometrischen Dateneinträgen. Je nach Ziel der Untersuchung lassen sich die Dereplikationsansätze, welche auf Verbindungsdatenbanken basieren, weiter in vier Kategorien untergliedern (Hubert *et al.* 2017). In einfachsten Fällen besteht die Dereplikationstechnik aus

einer Flüssigkeitschromatographie, als verbreitetste Trenntechnik für Rohextrakte und Subfraktionen, in Verbindung mit einem UV/VIS-Detektor. Die Kombination von Absorptionsspektren aus DAD (Dioden Array Detektor) und Retentionszeiten liefert einfache Parameter zur Identifizierung bekannter Metaboliten. Dies erfolgt im Vergleich zu mitgeführten Referenzverbindungen. Ebenfalls können UV/VIS-Profile und Retentionszeiten zur Erkennung von Verbindungen in ähnlichen Fraktionen desselben Extraktes verwendet werden. Die Aussagekraft zur Diskriminierung von Metaboliten, insbesondere bei struktureller Ähnlichkeit, ist bei UV-VIS-Signaturen allerdings sehr begrenzt. Die meisten Dereplikationsstrategien setzen demnach zusätzlich auf andere analytische Methoden wie MS oder NMR.

Durch Kopplung von LC und MS, der Schlüsseltechnik vieler Dereplikationsmethodiken, können Nominalmasse und exakte Masse, wovon sich wiederum die Summenformel bzw. Elementarzusammensetzung der Verbindung ableiten lässt, sowie Addukte und Fragmentierungsmuster, insbesondere bei MS/MS-Experimenten generiert, als Parameter zur Unterscheidung herangezogen werden. Ebenfalls genutzte Dereplikationstechniken sind auf Basis von ^1H - oder ^{13}C -Spektren vorhanden (Hubert *et al.* 2017). Allerdings ist die direkte Kopplung mit der Flüssigkeitschromatographie (LC-NMR) apparatetechnisch deutlich aufwendiger und erfordert je nach Ausführung (stop flow, LC-SPE-NMR, etc.) einen höheren Grad an Automatisierung (Bross Walch *et al.* 2005, Halabalaki *et al.* 2014).

Aufwendigere Dereplikationsansprüche nutzen eine Kombination von erfassten Parametern zur Unterscheidung von Metaboliten, wie zum Beispiel die Kombination von UV/VIS-Spektren und hochauflösenden Pseudomolekularionenmassen (ESI+/ESI-) und Adduktsignaturen (LC-DAD-TOFMS) in Abgleich mit einer "inhouse" Datenbank (Nielsen *et al.* 2011). Des Weiteren sind Kombinationen von Retentionszeiten, UV/VIS und hochauflösende MS/MS-Profile (UPLC-DAD-HRESIMS-MS/MS) mit einer Datenbank basierend auf zytotoxischen Metaboliten (EI-Elimat *et al.* 2013) beschrieben. Ebenfalls wurde die Kombination von Informationen aus UV/VIS-Spektren, Retentionszeiten, MS und ^1H -NMR Daten mit kommerziellen Datenbanken spezialisiert auf mikrobielle Naturstoffe (AntiBase) oder Verbindungen marinen Ursprungs (MarinLit) als Dereplikationsprotokoll genutzt (Lang *et al.* 2008). Ein weiterer Ansatz besteht in der Analyse von ^{13}C -NMR-Spektren aus Roh- oder semigereinigten Fraktionen mit hierarchischer Clusteranalyse im Vergleich zu einer beschränkten Auswahl von berechneten ^{13}C -Referenzsubstanzspektren (Hubert *et al.* 2014, Bakiri *et al.* 2017).

Je nach Zahl der erfassten Parameter, Möglichkeiten und Genauigkeit der Datenabfrage, sowie des Umfangs der genutzten Datenbank können die potenziellen Trefferzahlen sehr hoch sein. Die Molekularmasse bzw. die Elementarzusammensetzung ist der am leichtesten zugängliche und in den meisten Datenbanken (z.B. Chemical Abstract Service (CAS)/SciFinder, PubChem, Antibase, MarinLit, Spectral Database for Organic Compounds (SDBS), Dictionary of Natural Products (DNP)) abfragbare Parameter (Lang *et al.* 2008). Am

Beispiel des 5-Methylmellin, ein Pilzmetabolit mit der Summenformel $C_{11}H_{12}O_3$, generiert aus hochauflösender LC-MS-Messung, zeigen sich allerdings aus der Datenbankabfrage mittels SciFinder über 5900 Verbindungen ($N = 5975$) mit derselben Elementarzusammensetzung. An einem anderen Molekül mit der Summenformeln $C_{24}H_{24}O_8$ werden neben der isolierten Verbindung (Auranticin A) noch an die 500 weitere Treffer ($N = 499$) angezeigt. Eine eindeutige Diskriminierung und Festlegung auf ein zu erwartendes Molekül ist hierbei sehr schwierig und ohne weitere Parameter manuell kaum zu bewerkstelligen. Dies gilt umso mehr, da die aus hochauflösenden MS-Spektren abgeleiteten Molekularmassen und Summenformeln eine mögliche Falschzuweisung zulassen. Gründe liegen in der Unsicherheit bei der Zuordnung der gefundenen Ionenaddukte oder der Überlagerung durch gering konzentrierte Verbindungen, welche aber deutlich besser ionisierbar sind als die Zielverbindung (Lang *et al.* 2008). Ein weiterer Punkt in diesem Zusammenhang ist die erreichte Massengenauigkeit, die bei der Diskriminierung verschiedener Moleküle bzw. Elementarzusammensetzungen eine Rolle spielt (Nielson *et al.* 2011). Die Zahlen der möglichen Isotopenkombinationen aus den gemessenen m/z -Werten kann, je nach angesetzter Massengenauigkeit ($\Delta m < 10\text{ppm}$, $\Delta m < 5\text{ppm}$, etc.) und getroffener Einschränkungen, wie beispielsweise Ausschluss bestimmter Elemente, Beschränkung der Elementarzusammensetzung und Beachtung des Isotopenmusters, dennoch sehr hoch sein (Gross 2013).

Eine Möglichkeit die Anzahl potenzieller Strukturkandidaten zu reduzieren, ist die Verwendung von spezialisierten Datenbanken. Diese können zum Beispiel auf Organismen (z.B. Mikroorganismen (Datenbank: Antibase)), Stoffklassen (z.B. nicht ribosomale Peptide (Datenbank: Norine)) oder die Umwelt bzw. das Habitat (z.B. für Meereshabitate (Datenbank: MarinLit)) bezogen sein. Ebenfalls möglich ist die Kreation einer internen Datenbank bei speziellen Fragestellungen, wie die Beschränkung auf bekannte Metaboliten derselben Familie oder Gattung bei der Extraktbearbeitung eines Organismus oder die Erstellung von Einträgen mit häufigen Mykotoxinen bei der Suche nach neuen Zytostatika aus Pilzen. Eine andere Option, die Treffer an möglichen Verbindungen zu verringern, besteht in der Einbeziehung weiterer Parameter, wie bereits identifizierte funktionelle Gruppen und Strukturelemente aus den ^1H - oder ^{13}C -Spektren. Die Nutzung von NMR-Messungen kann allerdings, je nach vorhandener Gerätetechnik und Molekülgröße, die Isolierung von substantiellen Mengen ($\sim m > 1\text{mg}$ bei $MW < 500$, 500MHz NMR) erfordern. Dies steht jedoch dem Dereplikationsanspruch, daher der Erkennung von Substanzen zu einem möglichst frühen Zeitpunkt ohne aufwendige Isolierung, teilweise entgegen. Die NMR-Spektroskopie gilt als effizienteste Methode zur unzweifelhaften Molekülidentifizierung und erfuhr zudem bedeutende technische Fortschritte (cryoprobes, capillaryprobe, Magnetfeldstärke, etc.), welche unter anderem die nötigen Substanzenmengen reduzieren (Hubert *et al.* 2017). Aus diesen Gründen und da NMR-Spektren ohnehin integraler Bestandteil der Strukturaufklärung sind, können ^1H - oder

^{13}C -NMR-Messungen bei Naturstoffuntersuchungen routinemäßig ausgeführt werden. Demnach entfällt bei der Dereplikation anhand von ^1H - oder ^{13}C -Spektren zumindest die zeitaufwendige Generierung von 2d-NMR Spektren und die Strukturaufklärung über diese (siehe Kapitel 2.4.3.).

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenproben

Für die Isolierung von Pilzendendophyten wurden verschiedene Pflanzen und Gewebetypen (Rinde, Blätter, etc.) aus unterschiedlichen Regionen und Habitaten der Welt verwendet (Tabelle 3.1.). Das Pflanzenmaterial aus Kamerun wurde von Prof. Bruno Ndjakou Lenta (Universität Yaoundé I, Kamerun) zur Verfügung gestellt. Die Proben aus Schottland wurden im August 2015 genommen. Weiteres Material wurde in Victoria (VIC), Australien (AUS) im November/Dezember 2016 gesammelt. Die Pflanzen wurden mittels Fachliteratur und wenn möglich über Beschilderung vor Ort identifiziert. Des Weiteren wurden die Richtlinien des Nagoya-Protokolls für die Probenentnahme befolgt und nationale Bestimmungen nach besten Wissen und Gewissen beachtet. Australien war zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Verfassen der Arbeit nicht Mitglied des Nagoya-Protokolls. Es wurden keine seltenen und exotischen Arten oder Pflanzen nach CITES-Liste (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) beprobt. Zudem erfolgte die Beprobung ohne Schädigung der Pflanze bzw. Pflanzenpopulation vor Ort und nicht abseits von Wegen.

Tabelle 3.1.: Zur Isolierung verwendetes Pflanzenmaterial.

Art	Gewebe	Sammelort	Habitat	Datum
<i>Rauvolfia macrophylla</i>	Rinde	Kamerun	Regenwald, tropisch	-
<i>Sequoiadendron giganteum</i>	Rinde	Cawdor Castel, Cawdor, Nairn, Schottland	Wald	29.08.2015
<i>Carpobrotus rossii</i>	Blätter	Küste nahe Princetown, Great Ocean Rd., VIC, AUS	Küstendünen, Felsklippen	26.11.2016
<i>Atriplex cinerea</i>	Blätter	Reeves Beach, 90 Miles Beach, Gibbsland, VIC, AUS	Küstendünen	16.12.2016
<i>Lophozonia cunninghamii</i>	Blätter, Rinde	Tarra-Valley, VIC, AUS	Regenwald, kühl gemäßigt	03.12.2016
<i>Eucalyptus regnans</i>	Rinde	Tarra-Valley, VIC, AUS	Regenwald, kühl gemäßigt	03.12.2016
<i>Diksonia antarctica</i>	Wedel, Rhachis	Tarra-Valley, VIC, AUS	Regenwald, kühl gemäßigt	03.12.2016
<i>Dicksonia sp.</i>	Stamm (Caudex)	Tarra-Valley, VIC, AUS	Regenwald, kühl gemäßigt	03.12.2016
<i>Tristaniopsis laurina</i>	Rinde	McKenzie River/Bemm River, VIC, AUS	Regenwald, warm gemäßigt	06.12.2016
<i>Banksia serrata</i>	Blätter	Point Ricardo, Marlo, Vic, AUS	Dünenwald	10.12.2016
<i>Exocarpus cupressiformis</i>	Blätter, Rinde	Double Creek, Mallacoota, VIC, AUS	Regenwald, warm gemäßigt	06.12.2016
<i>Banksia sp.</i>	Blätter	Genoa River, Genoa, VIC, AUS	Flussbett	05.12.2016
<i>Allocasuarina verticillata</i>	Blätter	Küste nahe Yanakie, VIC, AUS	Küstenwald	30.11.2016
<i>Eucalyptus sp. I</i>	Rinde	Secret Beach, Mallacoota, VIC, AUS	Küstenwald	06.12.2016
<i>Eucalyptus sp. II</i>	Rinde	Wulgumerang East, Little River, VIC, AUS	Wald	08.12.2016

3.2. Isolierung endophytischer Pilze

Das gesammelte Pflanzenmaterial (Blätter, Rinde, etc.) wurde von oberflächlich gesund erscheinenden Individuen entnommen und nach Möglichkeit bis zur Bearbeitung dunkel, kühl und trocken gelagert. Die Oberflächen der so erhaltenen Pflanzenteile wurden nach einer modifizierten Methode nach Luginbühl & Müller (1980) bzw. nach Petrini & Dreyfuss (1981) sterilisiert. Diese adaptierte Methode (Tabelle 3.2.) umfasste das Einlegen der zu sterilisierenden Pflanzenteile in Ethanol (70%, v/v) für 30 Sekunden, weiteres Einwirken in Natriumhypochloritlösung (NaClO, 5.25%, v/v, 5% verfügbares Chlor), erneutes Einlegen in Ethanol (70% (v/v)) für weitere 30 Sekunden und abschließendem Waschen mit sterilem Wasser (3x1 ml).

Tabelle 3.2.: Standardprozedur der Oberflächensterilisierung.

Reihenfolge	Sterilisationslösung [%]	Einwirkzeit [min]
1.	Ethanol (70) (v/v)	0.5
2.	NaClO (5.25) (w/w)	3
3.	Ethanol (70) (v/v)	0.5
4.	VE-Wasser (100)	-

Das behandelte Pflanzenmaterial wurden auf sterilem Zellstofftuch für wenige Minuten (3-5 min) getrocknet, gegebenenfalls in kleinere Stücke (ca. 1 cm x 1 cm) geschnitten und auf Kartoffel-Dextrose-Agar Petrischalen ($\varnothing = 10$ cm, Sarstedt, DEU) gelegt und leicht ange-drückt. Die so präparierten Agarplatten wurden am Rand abgedichtet (Parafilm, Bemis, USA) und in Dunkelheit bei Raumtemperatur (25 °C) inkubiert.

Je nach Pflanzenmaterial und Pilzstamm konnte im Agar (Tabelle 3.3.), in der Regel nach ein bis 14 Tagen, vom behandelten Pflanzenmaterial ausgehend, Hyphenwachstum beobachtet werden. Makromorphologisch unterscheidbare Kolonien wurden subkultiviert. Hierzu wurde mittels sterilisiertem Pulverspatel an der Hyphenfront quadratische Blöcke (0.5 mm x 0.5 mm) ausgestochen und auf Petrischalen mit Kartoffel-Dextrose-Agar transferiert. Gegebenenfalls wurden die so transferierten Kolonien erneut umgesetzt und auf einer neuen Agarplatte weiter kultiviert. Das allgemeine Vorgehen bei der Endophytenisolierung und Kultivierung ist in Abbildung 3.1. am Beispiel von Blättern (*Carpobrotus* sp.) illustriert.

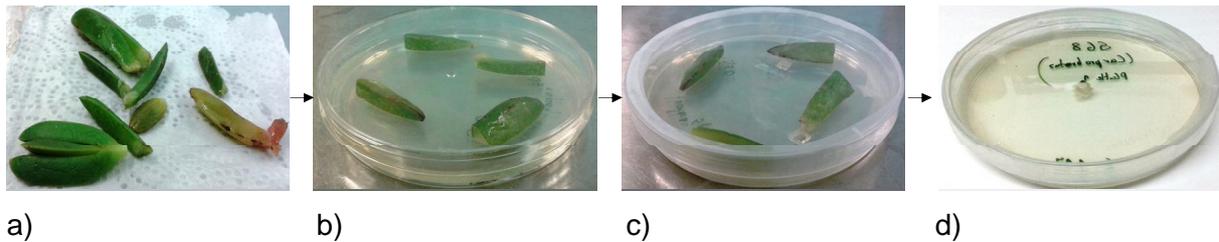


Abbildung 3.1.: Isolierung von Endophyten: a) Pflanzenmaterial (Blätter, *Carpobrotus rossii*) nach Oberflächensterilisierung b) Kultivierung auf Kartoffel-Dextrose-Agar mit Zusatz von Chloramphenicol c) Transferierung von auftretendem Mycelgeflecht d) separierte Kultivierung als axenische Kultur (eigene Darstellung).

Zur Kontrolle der Effektivität der Oberflächensterilisierung wurde stichprobenartig ein Abdruck des behandelten Materials auf Kartoffel-Dextrose-Agar erstellt und der Bewuchs kontrolliert. Chloramphenicol wurde zur Unterdrückung bakterieller Kontamination bzw. zur selektiven Isolierung von Pilzendophyten während der Inkubation des Pflanzenmaterials als Zusatz im Agarmedium mitgeführt. Die Zugabe des Antibiotikums zum Medium erfolgte dabei vor der Autoklavierung. Zur Reduzierung der thermischen Belastung von Chloramphenicol wurde die Sterilisierung des Mediums in kleine Volumina ($V < 250$ ml) vollzogen. Die Kultivierung der axenischen Kulturen wurde allerdings ohne Antibiotikum weitergeführt.

Tabelle 3.3.: Verwendetes Material bei der Stammissolierung.

Medium		
Material	Konzentration [g/l]	Produzent
Kartoffel-Dextrose Extrakt	24	Sigmar-Aldrich, USA
Agar (für Molekularbiologie)	15	AppliChem, DEU
Chloramphenicol	0.1	AppliChem, DEU
VE-Wasser	ad 1000 ml	Millipore, USA
Einstellung auf pH 7.0 mittels HCl (1M) bzw. NaOH (1M)		
Oberflächensterilisierung		
Material	Konzentration [%]	Produzent
Ethanol (techn.)	70 (v/v)	Stockmeier Chemie, DEU
NaClO (techn.)	5.25 (w/w)	Stockmeier Chemie, DEU
VE-Wasser	100	Millipore

3.3. Stammhaltung und Kultivierung

Sämtliche Kultivierungsarbeiten wurden unter Sterilbedingungen (Sterilbank: Uniflow, UVUB 1200 Biohazard, UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, DEU) durchgeführt. Medien und Geräte wurden vor der Benutzung autoklaviert (121 °C, 20 min; Vapour-Line 80-M, VWR International, USA).

3.3.1. Submers-Fermentation

Erfolgreich subkultivierte Isolate wurden in Kartoffel-Dextrose Flüssigmedium (Tabelle 3.4.) weiterkultiviert.

Tabelle 3.4.: Verwendetes Material bei der Submers-Fermentation.

Kartoffel-Dextrose-Flüssigmedium		
Material	Konzentration [g/l]	Produzent
Kartoffel-Dextrose Extrakt	24	Sigmar-Aldrich, USA
Wasser	ad 1000 ml	Millipore, USA
Einstellung auf pH 7.0 mittels HCl (1M) bzw. NaOH (1M)		

Wie zuvor in Kapitel 3.2. beschrieben, wurden diese Isolate unter Sterilbedingungen mittels Spatel direkt aus den Agarpetrischalen ausgeschnitten, in 50 ml Erlenmeyerkolben (Enghals und Weithals, ca. 20-30 ml Medium) transferiert und im Dunkeln kultiviert (25 °C). Die daraus resultierende Kultursuspension (Abbildung 3.2.) diente als Inokulum für die Solid-State-Fermentation (SSF) und das Anlegen der Kryokulturen.

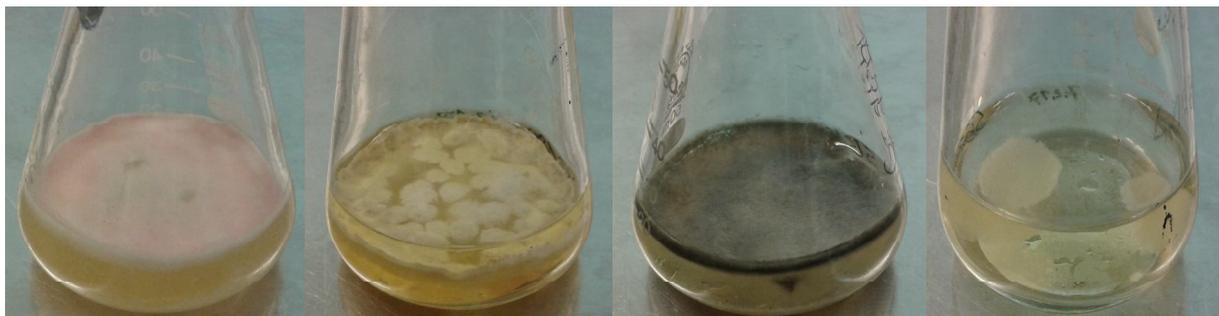


Abbildung 3.2.: Submers-Fermentation am Beispiel von: a) SG14ba (*Umbelopsis* sp.), b) SG18e (*Penicillium* sp.), c) SG16 (*Gelasinospora* sp.), d) SG21 (*Peziza* sp.) (eigene Darstellung).

3.3.2. Kryokonservierung

Für die dauerhafte Stammhaltung wurden Kryokulturen angelegt. Dies erfolgte in Anlehnung an die bei Marmann (2016) bzw. Kitamoto *et al.* (2002) beschriebenen Methoden.

Die Kultursuspension (0.75 ml) (siehe Kap. 3.3.1.) wurde mit 20%iger bzw. 30%iger (w/w) wässriger Glycerin-Lösung (0.75 ml) mit gleichem Volumenverhältnis in Reagiergefäßen (2 ml, Sarstedt, DEU) pipettiert und vermischt (Tabelle 3.4.). Wenn vorhanden wurden zusätzlich Oberflächen- bzw. Substratmyzel (0.5 cm x 0.5 cm) per Spatel abgetrennt und zur Lösung hinzugefügt. Die Kryokulturen wurden bei -80 °C (Tiefemperaturschrank, MDF-U5386F, Panasonic, JPN) ohne Temperaturkontrolle eingefroren und bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Vitalität der Kulturen wurde durch erneutes Animpfen auf Petrischalen (Kartoffel-Dextrose-Agar) oder in Erlenmeyer-Kolben (Reismedium) nach einer Mindestlagerungszeit ($t > 24$ h) getestet.

Tabelle 3.4.: Zusammensetzung des Kryomediums.

Kryomedium		
Material	Konzentration	Produzent
Glycerin	10-15% (w/w)	Carl Roth, DEU
VE-Wasser	35-40% (w/w)	Millipore, USA
Kultursuspension	50% (v/v)	-

3.3.3. Solid-State-Fermentation

Die Kultivierung der Stämme zur Produktion und Extraktion von Sekundärmetaboliten erfolgte als Festphasen-Fermentation auf Reismedium (*Oryza sativa* ssp. *indica*) (Tabelle 3.5.).

Tabelle 3.5.: Zusammensetzung des Reismediums.

Reismedium		
Material	Konzentration	Produzent
Reis	1 g/1.2 g Wasser	Bon-Ri, Euryza, DEU
Wasser	1.2 g/ g Reis	Millipore, USA

Für die Extraktgewinnung der Bioaktivitätstests wurde in kleinerem Maßstab in Enghals-Erlenmeyerkolben (100 ml, 10 g Substrat) kultiviert. Die Extraktgewinnung zur Isolierung der Sekundärmetaboliten wurde hingegen in Weithals-Erlenmeyerkolben (500 ml, 50 g Substrat bzw. 1000 ml, 100 g Substrat) ausgeführt. Für die Standardkultivierung wurde dem Substrat (parboiled Reis) Wasser (1.2 g je g Substrat) hinzugegeben und für mindestens 3 h bei Raumtemperatur quellen gelassen. Die Kolben wurden zum Schutz vor Kontamination mit Aluminiumfolie oder Watte und Aluminiumfolie verschlossen und autoklaviert. Das Inokulieren des Mediums erfolgte entweder von Agarpetrieschalen (Kapitel 3.2.), der Kultursuspension (Kapitel 3.3.1.) oder dem Kryomedium (Kap. 3.3.2.). Der jeweilige Stamm wurde bei Raumtemperatur (25 °C), in Dunkelheit lagernd, für mindestens 28 Tage bis zur Extraktion (Kapitel 3.5.) kultiviert (Abbildung 3.3.).



a)

b)

c)

d)

Abbildung 3.3.: Festphasen-Fermentation am Beispiel von: a) SG10 (*Coniothyrium* sp.), b) SG14c (*Mucor* sp.), c) SG17a (*Biscogniauxia* sp.), d) SG18d (*Pseudoplectania* sp.) (eigene Darstellung).

3.4. Stammidentifizierung

3.4.1. Gewinnung und Aufreinigung der DNA

Für die Identifizierung der isolierten Pilzendophyten wurde der Flüssigkultur (Kapitel 3.3.1.), je nach Bewuchscharakteristik, entweder Oberflächenmyzel (ca. 0.5 cm x 0.5 cm) per Spatel oder Kultursuspension (1.5 ml) entnommen und in Reagiergefäße (2 ml, Sarstedt, DEU) überführt. Diese wurden zentrifugiert (10 min, 12000 g (13400 rpm), MiniSpin, Eppendorf, DEU), der Überstand abpipettiert und das Pellet bis zur Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluss erfolgte durch Mörsern in flüssigem Stickstoff (Linde, DEU). Für die Extraktion und Reinigung der genomischen DNA wurde ein kommerziell erhältliches Kit (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen, DEU) verwendet. In Abweichung zum Protokoll wurde nach dem Waschschrift zusätzlich zentrifugiert und die Elution der DNA mit 2 x 25 µL H₂O statt 2 x 100 µL Elutionspuffer vollzogen.

3.4.2. Amplifizierung der DNA-Barcode Region

Als universelle Barcode Region (Schoch *et al.* 2012) wurde die gesamte „Internal Transskript Spacer“-Region (ITS-Region; ITS1, 5.8S, ITS2) der ribosomalen Kern-DNA (nrDNA) gewählt. Die ITS-Region wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus der isolierten genomischen DNS amplifiziert. Bei der Standardamplifikation wurde die korrekturlese Polymerase Pfu (Promega, USA) und das Primerpaar ITS5 und ITS4 (Eurofins Genomics, DEU) bzw. für den LSU-Bereich LR0R und LR5 verwendet. Die Details der genutzten Primer sind in Tabelle 3.6. beschrieben. Bei negativem Amplifizierungsergebnis wurden andere Primerkombinationen (z.B. ITS1-F_KYO1/ITS4), ITS5/ITS4_KYO2, etc.) getestet.

Tabelle 3.6.: Verwendete PCR-Primer.

Vorwärtsprimer		
Primerbezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Referenz
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> 1990
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White <i>et al.</i> 1990
ITS1-F_KYO1	CTHGGTCATTTAGAGGAASTAA	Toju <i>et al.</i> 2012
ITS1-F_KYO2	TAGAGGAAGTAAAAGTCGTAA	Toju <i>et al.</i> 2012
ITS9mun	TGTACACACCGCCCGTCG	Egger 1995
BITS	ACCTGCGGARGGATCA	Bokulich & Mills 2013
LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	Rehner & Samuels 1994
Rückwärtsprimer		
Primerbezeichnung	Sequenz 5'→ 3'	Referenz
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> 1990
ITS4_KYO2	RBTTTCTTTTCCTCCGCT	Toju <i>et al.</i> 2012
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG	Vilgalys & Hester 1990

Beim Screening nach geeigneten Primern wurde dabei entweder der Vorwärts- oder der Rückwärtsprimer variiert.

Die DNA-Amplifizierung wurde in Regiergefäßen (0.2 ml, Sarstedt, DEU) im Thermocycler (Primus 25 advanced, PEQLAB Biotechnologie, DEU) vorgenommen. Die Bedingungen während der PCR sind Tabelle 3.7. und 3.8. zu entnehmen.

Tabelle 3.7.: Reaktionsmischung PCR.

Komponente	V [μ l]	Produzent
Wasser	18.5	Millipore
10x Puffer (20 mM, MgSO ₄)	2.5	Promega, USA
Pfu-Polymerase	0.5	Promega, USA
Vorwärts-Primer (10 pmol/ μ l)	0.5	Eurofins Genomics, DEU
Rückwärts-Primer (10 pmol/ μ l)	0.5	Eurofins Genomics, DEU
dNTPs	0.5	Promega, USA
DNA-Lösung (genomische)	2.0	-

Tabelle 3.8.: PCR Bedingungen bei der Amplifizierung der ITS-Region.

T [$^{\circ}$ C]	t [min]	Zyklen
95	1.5	x1
95	0.75	x35
52	0.5	
72	2.5	
72	5.0	x1

Bei Stämmen, die sich anhand der ITS-Region phylogenetisch nicht ausreichend einordnen ließen, wurden eine zusätzliche Barcoding-Region (nrDNA large subunit (LSU); 28S) amplifiziert (Eberhardt 2012). Konzentration und Komponenten sind wie bei der ITS-Amplifikation (Tabelle 3.7.) identisch. Bis auf die reduzierte Primerhybridisierungstemperatur und die verlängerte Elongationszeit (Tabelle 3.9.) wurden für die LSU-Amplifizierung ebenfalls dieselben Bedingungen gewählt.

Tabelle 3.9.: PCR Bedingungen bei der Amplifizierung der LSU-Region.

T [$^{\circ}$ C]	t [min]	Zyklen
95	1.5	x1
95	0.75	x35
48	0.5	
72	3.5	
72	5	x1

Der Erfolg der DNA-Amplifikation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Für die Proben (5 μ l) versetzt mit Ladepuffer (1 μ l, Loading Dye Purple (6x), New England BioLabs, USA), wurden Agarosegele (1% bzw. 1.5% (w/v), Agarose Standard, low EEO, AppliChem, DEU) in TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer, Tabelle 3.10.) verwendet.

Tabelle 3.10.: Zusammensetzung des TAE-Gelelektrophorese-Puffers.

Komponente	c [mmol/l]	Produzent
TRIS	40	Fisher Chemical, USA
Essigsäure	20	VWR, USA
EDTA x 2Na x 2H ₂ O	1	Karl Roth, DEU

Diese wurden für 30 bis 45 min (150 V, 110 mA, 20 W) unter Spannung (EPS601, Amersham Bioscience, GBR) entwickelt. Die Visualisierung der Banden erfolgte entweder über Ethidiumbromid-Lösung (Karl Roth, DEU) oder über In-Gel-Staining (5 µl / 25 ml Agarose) mit einem Benzimidazol-derivat (1,1',3,3',5,5',6,6'-Octamethyl-2,2'-spiro(2,3-dihydro-1*H*-Benzimidazol) (Roti-GelStain, Karl Roth, DEU) unter UV-Licht (Transilluminator TI4, Biometra, DEU). Die Visualisierung nach Anfärbung der Banden im Gel unter UV-Licht ist beispielhaft in Abbildung 3.4. dargestellt. Die Proben, bei denen, im Vergleich zum Bandenstandard (100 bp DNA ladder, New England BioLabs, USA), einzelne Banden im Bereich von 500-700 Basenpaaren (bei LSU-Region 800-1000 bp) beobachtet werden konnten, wurden aufgereinigt (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, DEU), aliquotiert (2 x 20 µl) und gelagert (-20 °C). In Abweichung zum Aufreinigungsprotokoll wurde die DNA in H₂O eluiert (2 x 20 µL). Der eine Teil der Probe wurde zur Bestimmung der DNA-Konzentration und DNA-Qualität photometrisch vermessen (NanoDrop Spectrophotometer, ND-1000, PEQLAB Biotechnologie, DEU), der andere zur Sequenzierung verschickt.

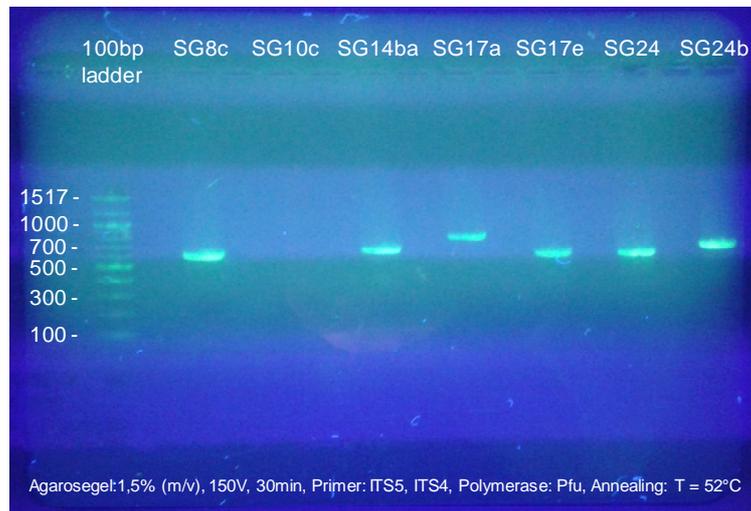


Abbildung 3.4.: Visualisierung amplifizierter ITS-nrDNA aus genomischer DNA nach Trennung durch Gelelektrophorese am Beispiel verschiedener Stämme der SG-Reihe (eigene Darstellung).

3.4.3. Sequenzierung und Sequenzabgleich

Die in Wasser eluierten ITS-DNA bzw. LSU-DNA aufgereinigten Proben (20 µl) und die jeweiligen Vorwärts-Primer wurden zur Sequenzierung (GATC Biotech, DEU) versendet. Die verwendete Ketten-Abbruch Methode nach Sanger lieferte ein Elektropherogramm. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit dem Programm „Chromatogramm-Explorer“ (v4.0.0, Heracle BioSoft SRL2011, ROU) auf Lesefehler untersucht und per Hand editiert.

Die so bearbeiteten Sequenzen wurden mit verschiedenen Programmen gegen Sequenzen in verschiedenen Datenbanken abgeglichen.

Verwendet wurden der BLAST-(Basic Local Alignment Search Tool) Algorithmus (Altschul *et al.* 1990) als Nukleotid-BLAST (BLASTn) mit den Datenbanken GenBank, EMBL, DDBJ, PDB und RefSeq (Auswahl: „nucleotide collection“ (nr/nt)) und dem Programm megablast (Zhang *et al.* 2000, Morgulis *et al.* 2008). Bei nicht aussagekräftigen Ergebnissen (z.B. viele Treffer mit Kennzeichnung „uncultured“, „environmental samples“) wurde die Suche mit der Restriktion (Auswahl: Exclude: „uncultured/environmental sample sequences“ oder Auswahl: limit to: „type material“) ausgeführt (Federhen 2015).

Für zusätzliche Sicherheit bei der Zuordnung der Sequenzen zu den vorgeschlagenen Gattungen bzw. Arten wurde ebenfalls das internetbasierte Programm „Ribosomal Database Project-classifier“ (RDP-classifier, Naive Bayesian rRNA Classifier Version: 2.11) mit dem Datensatz "Warcup Fungal ITS trainset 2" (Deshpande *et al.* 2015) und der Datenbank „UNITE“ (Kõljalg *et al.* 2013) genutzt.

Der Abgleich der Sequenzen über verschiedene Algorithmen anhand von Referenzsequenzen in den genannten Datenbanken lieferte eine prozentuale Sequenzabdeckung bzw. einen Punktwert in Abhängigkeit zur Sequenzlänge und -übereinstimmung. In der Regel wurde der Eintrag mit der höchsten Sequenzübereinstimmung zur Klassifizierung des Isolats in Gattung bzw. Spezies verwendet. Bei $\geq 97\%$ Sequenzübereinstimmung (bzw. 0 bis 3% Sequenzabweichung) konnte die Klassifizierung bis zum taxonomischen Rank "Spezies" übernommen werden. Zwischen 95-96.9% Ähnlichkeit zur vorgeschlagenen Vergleichssequenz wurde die Einteilung bis zur "Gattung" akzeptiert (Marquez *et al.* 2008, Raja *et al.* 2017). Unter 95% Sequenzübereinstimmung konnte meist nur noch eine grobe Einteilung bis zum taxonomischen Rank "Familie" oder "Ordnung" mittels RDP-classifier vorgenommen werden. Eine Absicherung bzw. Verfeinerung der taxonomischen Zuordnung erfolgte gegebenenfalls über einen zweiten Barcodemarker (LSU, TEF1, etc.).

Für artenreiche Gattungen, wie *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* und *Trichoderma*, wurde trotz Übereinstimmung von 99% Sequenzidentität beim Abgleich der ITS-Region nur eine taxonomische Einstufung bis zur "Gattung" vorgenommen.

3.4.4. Phylogenie

Bei unzureichender Sequenzabdeckung und zur Absicherung der Spezieszuordnung wurden zudem phylogenetische Analysen durchgeführt. Die Ausrichtung der Sequenzen wurde über den „CLUSTEL W“- (Thompson *et al.* 1994) oder „CLUSTEL Omega“-Algorithmus (Sievers *et al.* 2014) vorgenommen. Die Erstellung der phylogenetischen Bäume erfolgte durch das Programm „MEGA X“ (Kumar *et al.* 2018a) mit dem "Maximum-Likelihood"- (Tamura & Nei 1993) oder "Neighbor-Joining"-Evolutionsmodell (Saitou & Nei M. 1987, Tamura *et al.* 2004) unter Absicherung durch "Bootstrapping"-Wiederholungen (N = 1000, Felsenstein 1985). In Abbildung 3.5. ist als Beispiel ein phylogenetischer Baum mit ITS-Vergleichssequenzen zur Unterstützung der Klassifizierung des Stammes SG25 angegeben.

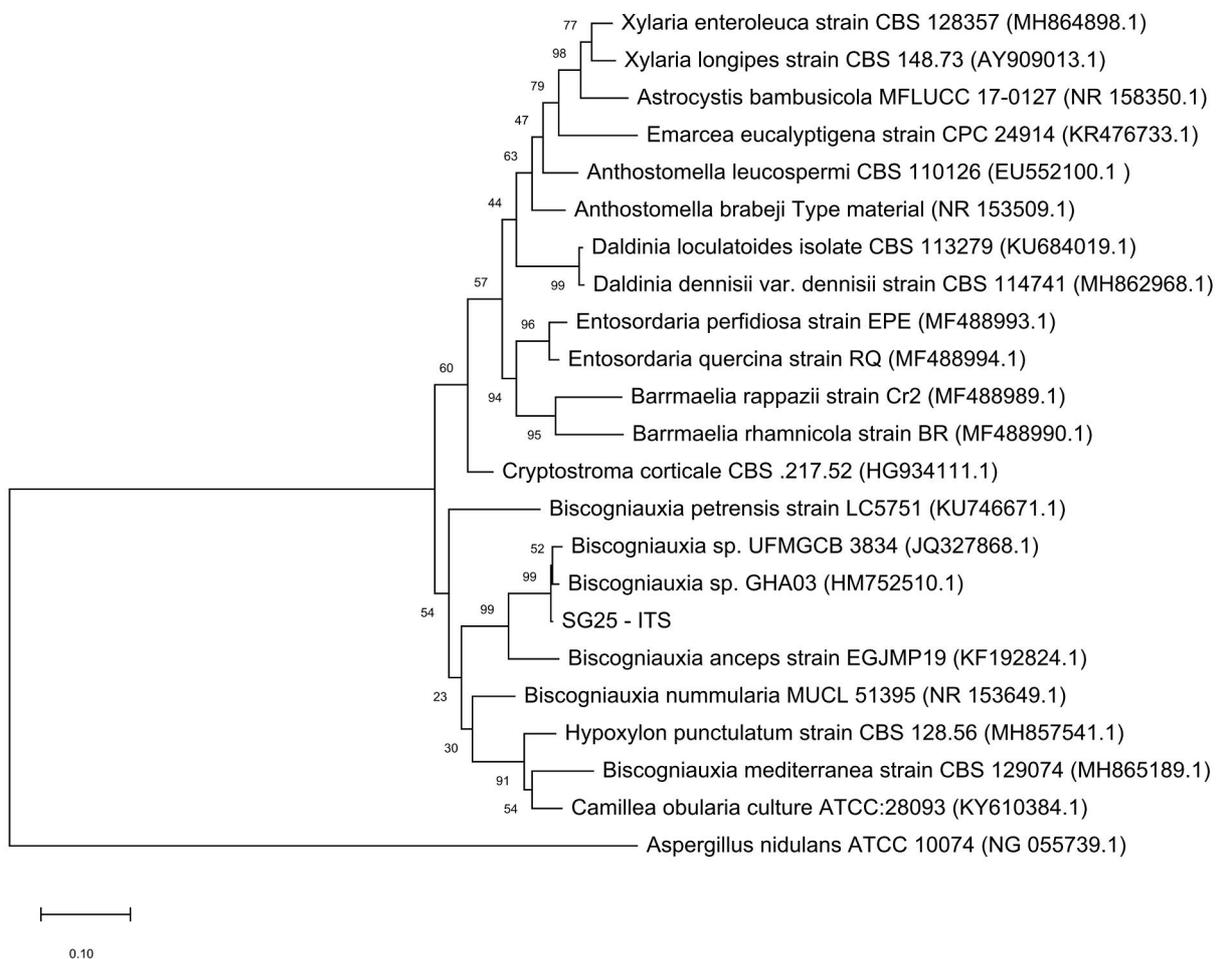
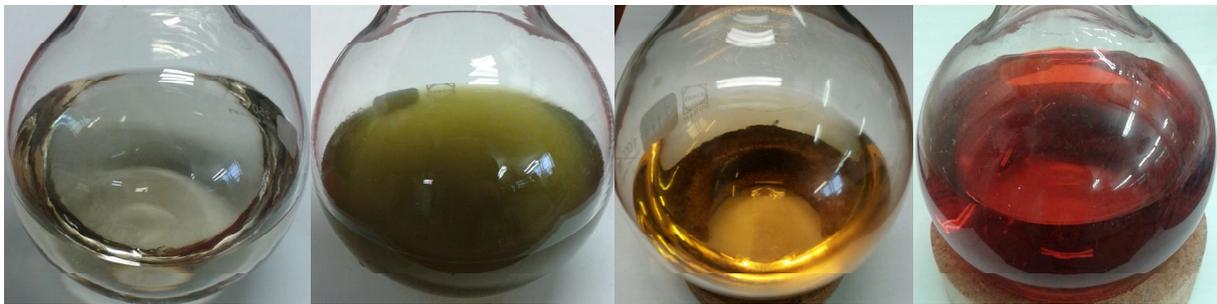


Abbildung 3.5.: Phylogenetischer Baum erstellt durch Maximum-Likelihood Methode und 1000 Bootstrap-Replikationen am Beispiel von SG25 zur Absicherung der Klassifizierung als *Biscogniauxia* sp. mit ITS-Vergleichssequenzen aus der Familie Xylariaceae (eigene Darstellung).

3.5. Extraktion der Pilzmetaboliten

Die Standardextraktion der Pilzmetaboliten aus dem Reismedium bzw. Pilzgewebe erfolgte durch zweifache Extraktion mit Ethylacetat, wie nachfolgend beschrieben. Die Innenwand der Kolben wurde mit Lösemittel (EtOAc) gespült und die Reiskultur mit Lösemittel (4 ml/g Substrat (Reis)) überschichtet. Nach mechanischer Zerkleinerung (Spatel) und Aufenthalt im Ultraschallbad (t ~ 10-15 min, Sonorex Super 10P, Bandelin, DEU) wurden die Kolben auf Rotationsschüttlern (t > 12 h, 150 rpm; Tabelle 3.18.) platziert. Nach erneuter Behandlung im Ultraschallbad (t ~ 10-15 min, 40 °C) wurde die Suspension mittels Faltenfilter (MN 6151/4, 27 cm, Macherey-Nagel, DEU) filtriert. Der Medien-Rückstand wurde, wie oben beschrieben, erneut mit EtOAc behandelt und extrahiert. Die vereinigten Filtrate wurde über einen Rotationsverdampfer (Laborota 4000, Heidolph, DEU; CVC 2, Vakuubrand, DEU) bei 40 °C zum Rohextrakt eingengt. Das Retentat wurde in einigen Fällen (z.B. bei SG8c, SG25) zusätzlich mit Methanol überschichtet (1.5 ml/g Substrat (Reis)), insgesamt einmal extrahiert und wie zuvor bei der Behandlung mit Essigsäureethylester bearbeitet. Es wurde ein separates Extrakt (MeOH-Rohextrakt) erhalten. Beide Rohextrakte wurden abschließend nach einem am Rotationsverdampfer zusätzlich lyophilisiert (Christ Alpha 2-4, DEU; Pumpe: Vakuubrand PC8RC6, DEU) und bis zur Verwendung gelagert (T = -20 °C).



a)

b)

c)

d)

Abbildung 3.6.: Farbvariation von Extrakten am Beispiel von: a) SG1 (*Daldinia* sp.), b) SG3 (*Penicillium* sp.), c) TS5 (*Xhuskia* sp.), d) SG8c (cf. *Tremateia* sp.) (eigene Darstellung).

3.6. Bioaktivitätstests

3.6.1. Agardiffusionstest

Die antibakterielle Aktivität von Rohextrakten und Reinstoffen wurde durch Agardiffusions-, Plattendiffusions- bzw. Hemmhofstests bestimmt. Die Testorganismen (Tabelle 3.11.) wurden aus Kryokulturen ($V = 100 \mu\text{l}$) in Nutrient-Broth (NB) Medium ($V \sim 25\text{-}50 \text{ ml}$, Zusammensetzung siehe Tabelle 3.12.) für 24 h bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (*M. luteus*, *P. agarici*, *B. subtilis*) bzw. $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (*E. coli*, *S. minor*, *S. ferus*, *S. warneri*) im Rotationsschüttler (Innova 4000, New Brunswick Scientific, USA) kultiviert.

Tabelle 3.11.: Verwendete Stämme für antimikrobiellen Tests.

Organismus	Stamm	gram-Färbung
<i>Escherichia coli</i>	DSMZ 1058	Negativ
<i>Pseudomonas agarici</i>	DSMZ 11810	Negativ
<i>Micrococcus luteus</i>	DMSZ 1605	Positiv
<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ 704	Positiv
<i>Streptococcus minor</i>	DSMZ 17118	Positiv
<i>Streptococcus ferus</i>	DSMZ 20646	Positiv
<i>Staphylococcus warneri</i>	DSMZ 20036	Positiv

Diese Übernachtskultur ($100 \mu\text{l}$) wurden mit frischem NB-Medium (10 ml) gemischt, per UV-VIS-Spektrometer (UV-3100PC Spectrophotometer, VWR, USA) vermessen und die optische Dichte (OD) durch gegebenenfalls weiteres Verdünnen eingestellt ($\lambda_{600\text{nm}} = 0.05 - 0.1$). Davon abgenommenes Volumen ($200 \mu\text{l}$) diente als Inokulum für mit NB-Agar gefüllte Petrischalen ($\varnothing = 10 \text{ cm}$, Sarstedt, DEU), welches mittels sterilem Glasstab gleichmäßig auf dem NB-Agar ausgestrichen wurde.

Tabelle 3.12.: Zusammensetzung des Mediums für antibakterielle Test.

Nutrient-Broth-No. 1		
Material	Konzentration [g/l]	Produzent
Peptone	15	Sigmar-Aldrich, USA
NaCl	6	Sigmar-Aldrich, USA
Hefe-Extrakt	3	Sigmar-Aldrich, USA
D(+)-Glucose	1	Sigmar-Aldrich, USA
Agar (für Molekularbiologie)	15	AppliChem, DEU
Wasser	ad 1000 ml	Millipore, USA
Einstellung auf pH 7.0 mittels HCl (1M) bzw. NaOH (1M)		

Aufzutragendes Testmaterial (Rohextrakt (c = 40 mg/ml), Fraktion (c = 20 mg/ml), Reinstoff (c = 1-10 mg/ml)), gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO, V = 25 µL; VWR International, USA) wurde auf Zelluloseplättchen (Ø = 6 mm, Rotilabo-Testblättchen, Roth, DEU), welche wiederum auf den angeimpften Agarplatten platziert waren, pipettiert. Die so präparierten Testplatten wurden im Inkubator (Function line 60I, Heraeus, DEU) kultiviert (T = 30 °C bzw. 37 °C, t = 24 h). Der bakterielle Bewuchs konnte als Trübung auf dem Agar-Medium beobachtet werden. Die antibakterielle Aktivität wurde als Durchmesser der bewuchsfreien Zone um die mit dem Testmaterial getränkten Zelluloseplättchen gemessen und qualitativ bewertet (Abbildung 3.7.). Proben mit fehlendem Hemmhof Bereich (Ø = 6mm) wurden als inaktiv bezeichnet. Bei einer bewuchsfreien Zone (Ø = 7-9 mm) wurde die Probe als leicht aktiv bzw. als moderat aktiv (Ø ≥ 10 mm) klassifiziert. Proben, die einen Inhibitionsbereich gleich oder größer der Referenzsubstanz aufwiesen, wurden als stark aktiv eingeordnet. Als Positivkontrolle bzw. Referenzsubstanz diente Ampicillin (c = 0.5 mg/ml, V = 25 µl; Fisher BioReagents, USA) oder Gentamycinsulfat (c = 0.5 mg/ml, V = 25 µl; Applichem GmbH, DEU) als Negativkontrolle DMSO (V = 25 µl). Eine Unterscheidung zwischen bakteriostatisch (Zone mit vermindertem bakteriellem Wuchs) und bakteriotoxisch (Zone ohne bakteriellen Bewuchs) wurde bei der Bestimmung des Hemmhofdurchmessers nicht vorgenommen.

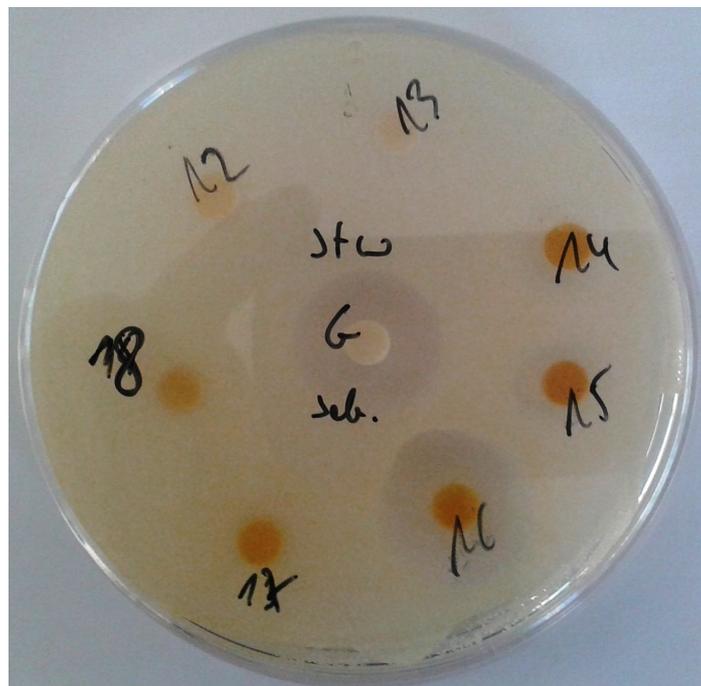


Abbildung 3.7.: Beispiel eines Agar-Diffusions-Assay gegen *Staphylococcus warneri* (eigene Darstellung).

3.6.2. Inhibitorkonzentrationen (IC₅₀, MIC)

Von isolierten und charakterisierten Reinstoffe deren Fraktionen im Agardiffusionstest (siehe Kapitel 3.6.1.) antibakteriell aktiv waren, wurden die IC₅₀- (half maximal inhibitory concentration) und die MIC-Werte (minimum inhibitory concentration) bestimmt. Diese Kennwerte wurden gegen die Testorganismen *Bacillus subtilis* (DSMZ 704, gram-positiv) und *Pseudomonas agarici* (DSMZ 11810, gram-negativ) in einer Verdünnungsreihe mit 96well Mikrotiterplatten (TC-Plate, 96well, Suspension F, Sarstedt, DEU) bestimmt. Die genannten Testorganismen wurden als Übernachtskulturen aus Kryokulturen (1:1 (v/v), Glycerol/NB-Medium, gelagert bei T = -80 °C) in NB-Medium (25 ml, siehe Tabelle 3.12.) im Rotationschüttler (T = 30 °C, 120-150 rpm) kultiviert (Erlenmeyerkolben, EH V = 50 ml). Die Bakteriensuspension wurde mit NB-Medium verdünnt, photometrisch (UV-3100PC Spectrophotometer, VWR, USA) bei 600 nm vermessen und die OD (OD₆₀₀ = 0.05) durch weiteres verdünnen eingestellt. Diese verdünnte Suspension diente als Inokulum in der Verdünnungsreihe. Zu testende Substanzen wurden in DMSO gelöst und als Stammlösung (c = 20 mg/ml) verwendet. Für die Testreihe wurde diese Stammlösung mit NB-Medium auf die Arbeitskonzentration (i.d.R. c = 0.1 - 1 mg/ml) gebracht und in der Mikrotiterplatte seriell verdünnt, sodass sich die Arbeitskonzentration der Testsubstanz in jeder Reihe halbierte. Die Testreihen wurden in doppelt oder dreifach Bestimmungen mit zehn Messpunkten bzw. zehn verschiedenen Konzentrationen ausgeführt. Die erste Reihe enthielt dabei nur NB-Medium ohne Bakterienzellen, die Reihen 2 bis 11 die Testsubstanz in den zehn verschiedenen, sich in jeder Reihe halbierenden Konzentrationen und die letzte Reihe nur NB-Medium und Bakterienzellen, jedoch keine Testsubstanz. So präparierte Mikrotiterplatten wurden für 8 h bei 30 °C im Rotationsschüttler inkubiert und bis zum Vermessen bei 8 °C im Kühlraum per Schüttler weiter agitiert. Bei den Mikrotiterplatten wurde sowohl die optische Dichte (OD₆₀₀) als auch die Fluoreszenz (Exzitationwellenlänge: 530 nm, Emissionswellenlänge: 588 nm) nach Zugabe von Resazurin (V = 30 µl/well, c_{Resazurin} = 0.175 mM, Arcos Organics, USA) in Natriumhydrogencarbonatpuffer: c_{NaHCO₃} = 26 mM, c_{NaCl} = 116 mM) und Inkubation (t = 0.5 – 1 h, T = 25 °C) im Rotationschüttler (150-400 rpm) vermessen (Spark 10M, TECAN, CHE; Software: Sparkcontrol, Version: 2.1, CHE). Zum Vergleich als Positivkontrolle wurde das Antibiotikum Gentamicin (c = 0.5 mg/ml, V = 25 µl; Applichem GmbH, DEU) mit derselben Methodik bearbeitet und vermessen. Die Farbentwicklung in der Mikrotiterplatte nach Resazurinzugabe ist exemplarisch in Abbildung 3.8. visualisiert. Der Farbumschlag bei niedrigeren Substanzkonzentrationen zeigt die metabolische Aktivität der Bakterien an.

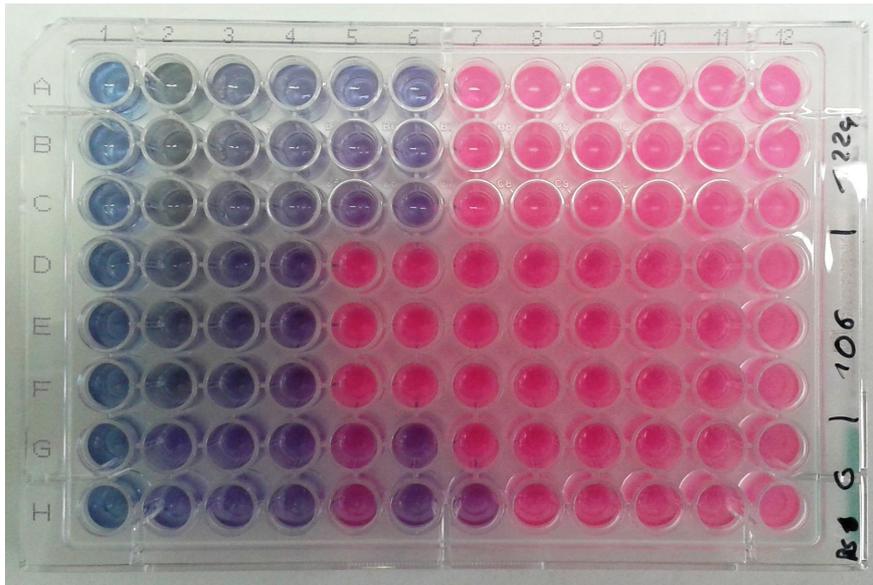


Abbildung 3.8.: Farbentwicklung einer Testreihe zur MIC-Bestimmung nach Resazurinzugabe am Beispiel isolierter Depsidone aus Stamm SG8c gegen *Bacillus subtilis* (eigene Darstellung).

Die Auswertung der Messwerte und Bestimmung der Inhibitorkonzentration wurden durch die Auftragung der Testsubstanzkonzentration (Abzisse bzw. x-Achse) als unabhängige Variable über die jeweiligen OD₆₀₀ bzw. Fluoreszenzmessung (Ordinate bzw. y-Achse) ermittelt. Die Konzentration (x-Werte) wurde dabei als dekadischer Logarithmus dargestellt. Die y-Werte (OD₆₀₀ bzw. Fluoreszenz) hingegen wurden, mit Abzug des Messwertes mit reinem Medium (ohne Testsubstanz und Testorganismus) und Normierung auf den Messwert ohne Testsubstanz aber mit Testorganismus, aufgetragen (Gleichung 3.1.).

$$y_{\text{Normiert}} = \frac{Y_{C_x} - Y_{C_0, \text{Medium}}}{Y_{C_n, \text{Zellen}} - Y_{C_n, \text{Medium}}} \quad (\text{Gleichung 3.1})$$

Sofern die Messwerte einen sigmoidalen Verlauf abbildeten konnte eine Kurvenanpassung vorgenommen werden. Eine Kurvenanpassung (sigmoidaler Fit, Funktion: Dose Response) durch die Messwerte mit der Software Origin (Origin 2018b, OriginLab, USA) lieferte den IC₅₀. Die Konzentration bei halbmaximalem Effekt (x = IC₅₀, y = 0.5 bzw. (A₁+A₂)/2) ergab sich nach der Anpassungsfunktion (A₁ - untere Asymptote, A₂ - obere Asymptote, p - Steigung am Wendepunkt) aus Gleichung 3.2. (Abbildung 3.9.).

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + 10^{(\log x^0 - x)^p}} \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Der MIC ergab sich aus dem Schnittpunkt der Gerade durch die Tangente am Wendepunkt (berechnet als Gerade durch Punkte IC_{80} und IC_{20}) mit der unteren Asymptote (i.d.R. y-Achse).

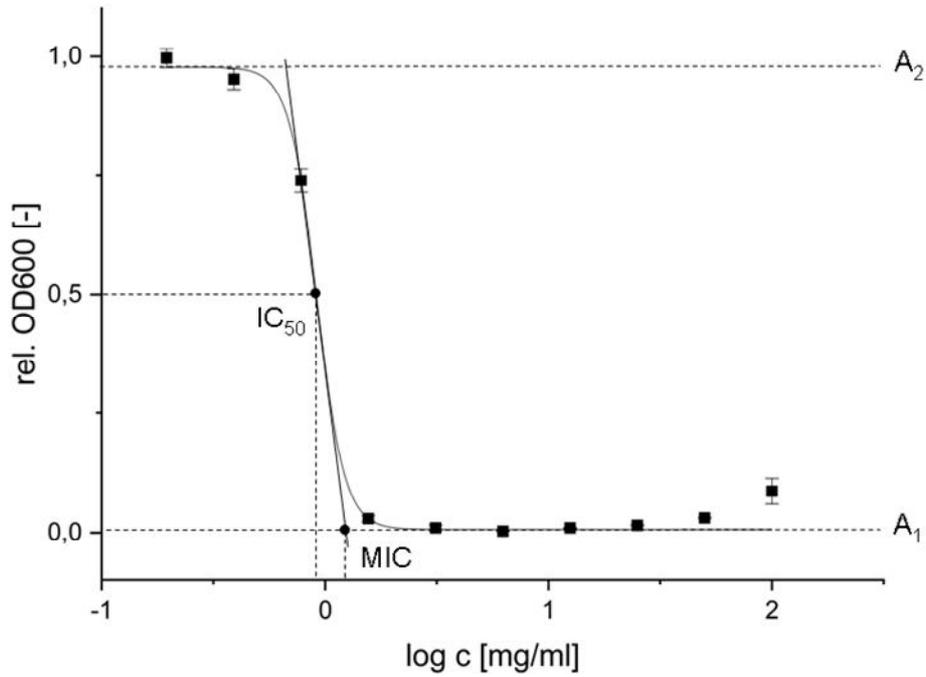


Abbildung 3.9.: Dose-Response Kurve und Messwerte aus einer Verdünnungsreihe zur Bestimmung der IC_{50} - und MIC-Konzentration am Beispiel von Verbindung SG8c-105 gegenüber *B. subtilis* (eigene Darstellung).

3.6.3. Zytotoxizitäts Test

Der Zellviabilitäts- bzw. Antiproliferationstest wurde gegenüber der Zervix-Karzinom-Zelllinie KB-3-1 (DSMZ: ACC-158, Dauerlagerung in Medium mit 20% Glycerol bei ≥ -196 °C in flüssigem Stickstoff) bzw. gegenüber der medikamentenresistenten Zelllinie KB-V-1 (DSMZ: ACC-149) vollzogen. Beide Zelllinien sind wahrscheinlich Abkömmlinge der HeLa-Zelllinie, wobei die KB-V-1 zusätzlich durch Vinblastin selektiert wurde (Akiyama *et al.* 1985, Roninson *et al.* 1986). Die Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe in Mikrotiterplatten (TC-Platte, 96 Well, Standard, K) mit den Testsubstanzen im CO₂ Inkubator (Model 311, Forma Scientific, USA) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Pan Biotech, DEU) mit 10% (v/v, bei KB-3-1) bzw. 15% (v/v, bei KB-V-1) Zusatz an fötalem Kälberserum (FBS, Pan Biotech, DEU) kultiviert (t = 72 h, T = 37 °C, 5.3% CO₂). Nach der Zugabe von Resazurin (30 µL, Arcos Organics, USA) und Inkubation (t = 4-6 h, T = 37 °C) wurden die Fluoreszenz (Exzitationswellenlänge: 530 nm, Emissionswellenlänge: 588 nm) per Photometer (Spark 10M, TECAN, CHE; Software: Sparkcontrol V2.1, CHE) vermessen. Die Bestimmung erfolgte entweder mit der Software Origin (Origin 2018b, OriginLab, USA) über eine Funktionsanpassung (sigmoidaler Fit, Funktion: Dose Response, siehe Kap. 3.6.2.) oder über das Programm GraphPad Prism (Version: 4.03, USA) mit der Wendepunktbestimmung mittels nicht linearem Fit. Die Ausführung der Testreihen erfolgte durch Frau Carmela Michalek (Organische Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld) als Doppelbestimmung. Eine detaillierte Beschreibung der Kultivierung, Handhabung der Zellen und Hinweise zur Ausführung des Testes findet sich bei Bogner (2011).

3.7. Substanzisolierung

Für die Reinigung und Isolierung der Substanzen wurden Kombinationen verschiedener Trenntechniken verwendet. Die Überprüfung der Substanzreinheit und die Wahl der Trenntechnik, sowie das Zusammenlegen von Fraktionen wurde anhand von DC- und RP-HPLC-(MS)-Profilen vorgenommen (siehe Kapitel 3.8.).

3.7.1. Flüssig-Flüssig-Extraktion

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde bei einigen der Rohextrakte (SG1, TS7 und T26BI) zur Vorbehandlung für die initiale Trennung durch Säulenchromatographie und zur "Entfettung" genutzt. Das getrocknete EtOAc-Rohextrakt (ca. 10-25 g) wurde in Essigsäureethylester (250-500 ml) erneut gelöst und mit H₂O im Verhältnis 1:1 (v/v) extrahiert. Nach der Phasentrennung wurde die organische Phase erneut mit H₂O extrahiert und die eventuell auftretende Interphase (schmale, gräuliche Bande zwischen organischer und wässriger Phase) verworfen. Die wässrige Phase wurde lyophilisiert (Christ Alpha 2-4, DEU; Pumpe: Vacuubrand PC8RC6, DEU), die organische Phase getrocknet (Rotationsverdampfer, T = 40 °C, Laborota 4000, Heidolph, DEU; CVC 2, Vakuubrand, DEU) und in einem Methanol/Wasser-Gemisch (95/5, % v/v) aufgenommen. Diese Lösung wurde mit n-Hexan extrahiert (2x) und nach der Phasentrennung getrocknet. Die Prozedur ist mit Abbildung 3.10. visualisiert.

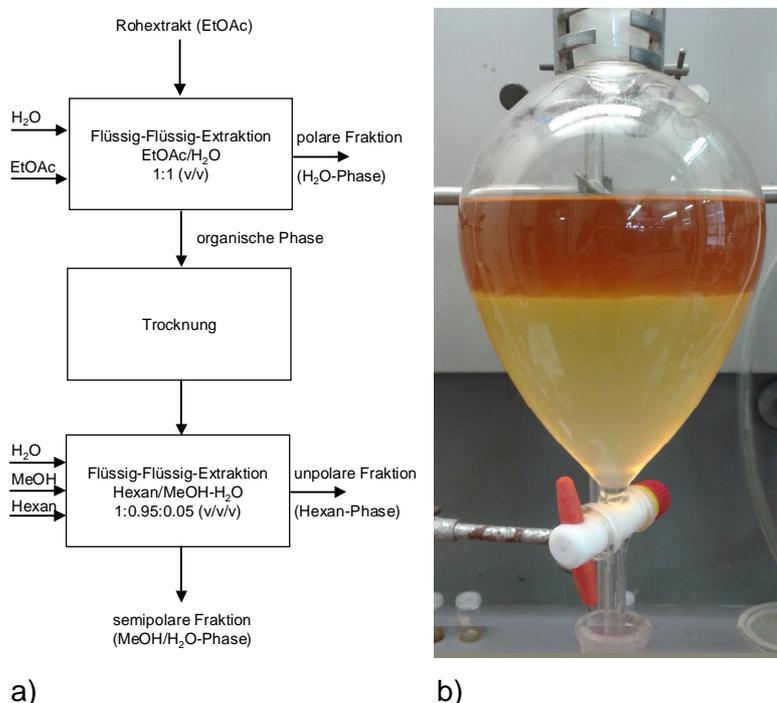


Abbildung 3.10.: Flüssig-Flüssig-Extraktion: a) Vorbehandlungsschema, b) Phasentrennung im Scheidetrichter (eigene Darstellung).

3.7.2. Flüssigkeitssäulenchromatographie

Der initiale Trennschritt für Rohextrakte und vorbehandelte Rohextrakte ($m \sim 5\text{-}25\text{ g}$) wurde über eine Flüssigkeitssäulenchromatographie (Säule: $\varnothing = 5\text{ cm}$, $h = 50\text{ cm}$) mit Kieselgel (60, 0.04-0.063 mm Sieb, Merck, DEU) als stationäre Phase ausgeführt. Die Auftragung des zu trennenden Materials erfolgte als Feststoffauftragung gebunden an Kieselgel. Dafür wurde zum Rohextrakt Kieselgel (1:1, w/w) und Aceton (5:1, v/w) hinzugefügt. Die entstandene Suspension wurde am Rotationsverdampfer ($T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, Laborota 4000, Heidolph, DEU; CVC 2, Vakuubrand, DEU) unter vermindertem Druck getrocknet und als Pulver am Säulenkopf aufgetragen. Durch Gradienten verschiedener nachfolgend genannten Lösemittelsysteme wurden die Substanzen nacheinander von der Säule eluiert (Abbildung 3.11.).

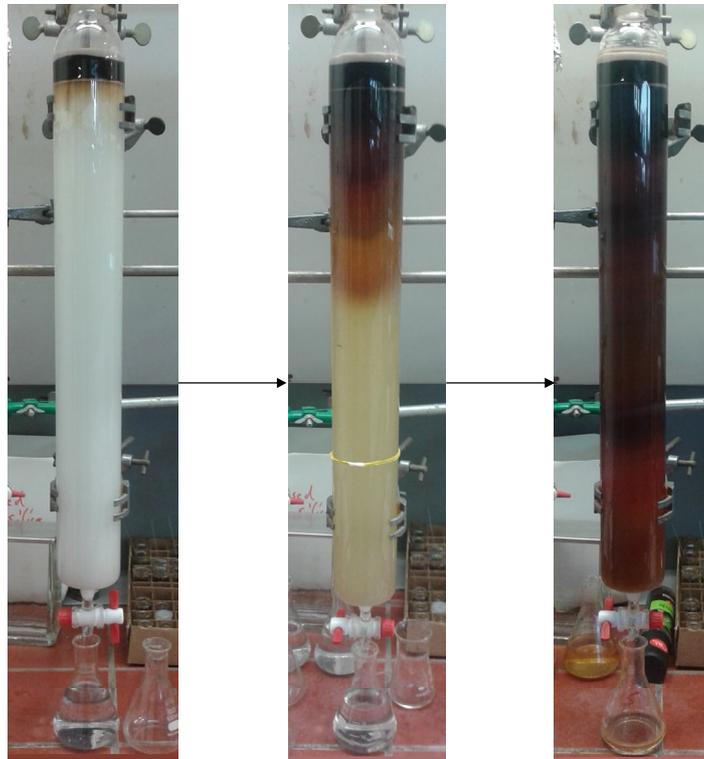


Abbildung 3.11.: Säulenchromatographische Auftrennung am Beispiel von EtOAc Rohextrakt des Stammes SG25 (eigene Darstellung).

Für unpolare bis intermediär unpolare Komponenten wurden Petrolether/Ethylacetat- (PE/EtOAc) oder Petrolether/Dichlormethan-Gemische (PE/DCM), für intermediär polare bis polare Komponenten hingegen Ethylacetat/Methanol (EtOAc/MeOH), DCM/MeOH oder MeOH/H₂O genutzt. Die standardmäßige Trennung des Rohextraktes umfasste den Beginn der Elution mit reinem PE über Mischungen aus PE/EtOAc bzw. PE/DCM über reinem EtOAc bzw. DCM bis hin zu EtOAc/MeOH bzw. DCM/MeOH mit jeweils steigendem Anteil des Laufmittels mit der höheren Elutionskraft. Am Ende der Trennung erfolgte das Spülen der Säule mit Methanol/Wasser/Essigsäure (75/20/5, % v/v/v).

Das Eluat wurde fraktioniert ($V_{\text{Fraktion}}/V_{\text{Säule}} \sim 0.1$), per Rotationsverdampfer ($T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$, $\downarrow p$) unter vermindertem Druck eingeengt ($V \sim 1/10$) und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Anhand des Elutionsprofils wurde qualitativ die weitere Anpassung des Lösemittelgradienten bestimmt und ähnliche Fraktionen zu übergeordneten Fraktionen vereinigt. Diese grob getrennten, übergeordneten Fraktionen (Hauptfraktionen) wurden getrocknet (Druckluftstrom), für weitere Analysen (RP-HPLC-Profil, Bioaktivitätstest, etc.) genutzt und weiteren Trenntechniken (RP-HPLC, SEC, etc.) unterworfen.

Im weiteren Verlauf der Extraktauftrennung wurden gegebenenfalls weitere Säulenchromatographien über Kieselgel ($m_{\text{Kieselgel}}/m_{\text{Fraktion}} \sim 25-150$) vorgenommen. Hierbei wurden an das Trennproblem angepasste Laufmittelgemische ($R_f \sim 0,2-0,5$) der zuvor genannten Lösemittelsysteme (PE/EtOAc, DCM/MeOH, etc.) als isokratische Elution verwendet. Die Auftragung des zu trennenden Substanzgemisches erfolgte als Flüssigkeitsauftragung im jeweiligen Elutionslösemittelgemisch. Weiterhin wurde eine Schicht Sand (40-100 μm Sieb, Acros Organics, USA) am Säulenkopf und am Säulenauslass aufgetragen.

3.7.3. Reversed-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC)

Zur Trennung polarer Substanzgemische wurde eine präparative RP-HPLC (LaChrom, Interface (D-7000), UV-VIS-Detektor (L-7420), Pumpe (L-7150), Hitachi/Merck, Jap/DEU) genutzt. Je nach Materialmenge stand eine präparative (Hypersil Gold C₁₈, 8 µM Partikel, 250 x 21.2 mm, Thermo Fischer Scientific, USA) bzw. semipräparative (Nucleosil 100-7 C₁₈, 7 µm Partikel, 250 x 10 mm, Macherey-Nagel, DEU) C₁₈-Säule zur Verfügung. Als mobile Phase wurden Wasser/Acetonitril-Gemische (Laufmittel A: 94.9/5/0.1, % v/v/v, H₂O/ACN/TFA), Laufmittel B: 94.9/5/0.1, % v/v/v, ACN/H₂O/TFA) mit Trifluoressigsäure (TFA) als Protonierungszusatz verwendet. Standardmäßig wurden die Substanzen je nach Trennproblem entweder über Gradientenfahweise nach Standardmethode 1 bzw. Standardmethode 2 (Tabelle 3.13) oder isokratisch getrennt. Ausgehend von der vorhandenen Menge wurden bei der präparativen Säule (Startmaterial m = 50-150mg in V_{inj.} ≤ 1.5 ml, V = 8-10 ml/min) und bei der semipräparative Säule (Startmaterial: m = 5-25 mg in V_{inj.} ≤ 0.5ml, V = 3-4 ml/min) verschiedene Bedingungen eingehalten. Einige Fraktionen erforderten (z.B. wegen schlechter Löslichkeit) den Austausch des Lösemittels in den Laufmitteln A und B von Acetonitril durch Methanol (Eluent C bzw. D). Die Flussraten (höherer Gegendruck) wurde dabei allerdings jeweils für die präparative (V = 6-8 ml/min) und semipräparative (V = 2-3 ml/min) Säule reduziert.

Tabelle 3.13.: Präparative RP-HPLC Methodik (Hitachi-Gerät).

Standardmethode 1		
Zeit [min]	Eluent A [% v/v]	Eluent B [% v/v]
0.0	100	0
100.0	0	100
110.0	0	100
Standardmethode 2		
0.0	100	0
5.0	100	0
55.0	0	100
60.0	0	100

Der Trennlauf wurde per Software (HPLC-System-Manager, Version: 4.1, Hitachi, JAP) überwacht und ausgewertet. Das Eluat wurde manuell in Fraktionen aufgefangen und mittels Lyophilisierung (Christ Alpha 2-4, DEU; Pumpe: Vacuubrand PC8RC6, DEU) getrocknet.

3.7.4. Größenausschlusschromatographie

Eine weitere genutzte Chromatographietechnik war die Gelpermeations-, Gelfiltrations- bzw. Größenausschlusschromatographie (SEC) mit lipophilem Sephadex (Sephadex LH-20, GE Healthcare, USA) als stationäre Phase. Kommerziell erhältliches Sephadex LH-20 Pulver wurde in Methanol quellen lassen (3 h), in die Säule überführt, unter Lösemittel gelagert und dauerhaft für Trennungen verwendet. Als mobile Phase diente Methanol (Säule: h ~ 80 cm, $\varnothing_{\text{innen}} = 1$ cm) oder DCM/MeOH-Mischungen (Säule: h ~ 50 cm, $\varnothing_{\text{innen}} = 2$ cm; 50/50, % v/v bzw. 75/25, % v/v).

Zur Reinigung wurden die Säulen entweder mit DMSO (5 ml) im entsprechenden Lösungsmittelsystem oder mit Wasser als Laufmittel gespült.

3.7.5. Präparative-Dünnschichtchromatographie

Präparative-Dünnschichtchromatographie (PTLC) wurde auf selbst beschichteten (Kieselgel F60, Merck, DEU) Glasplatten (20 x 20 cm) ausgeführt. Die in Lösemittel gelösten Substanzen (m ~ 3-5 mg je Platte) wurden als Linie aufgetragen und mit zuvor per analytischer Dünnschichtchromatographie getesteten Laufmittelgemisch ($R_f \sim 0.3-0.7$) in mit Lösemitteldampf gesättigten Glaskammern entwickelt. Nach zerstörungsfreier Detektion der Substanzbanden mittels UV-Lampe (MinUVIS, Desaga, DEU) bei 254 nm und 366 nm wurden diese mechanisch per Spatel von der Glasplatte entfernt. Die an Kieselgel gebundenen Substanzen wurden abschließend per Filtration (Faltenfilter oder Säulenfiltration) ausgewaschen und getrocknet.

3.7.6. Kristallisation

Die Kristallisation der Proben für die Kristallstrukturanalyse erfolgte hauptsächlich in binären Lösemittelsystemen (bevorzugt in Hexan/Aceton, Hexan/Ethylacetat oder Hexan/DCM) unter langsamer Evaporation der leichter flüchtigen Komponente bei reduzierter Temperatur ($T = 4\text{ °C}$). Bei ungenügender Kristallqualität wurden gegebenenfalls Gemische höher siedender Lösemittel (Toluol, Methanol, Ethylacetat, etc.) oder die Verdampfung bei tieferen Temperaturen ($T = -20\text{ °C}$) zur Eignung der Kristallgenerierung getestet. Teilweise konnten Komponenten direkt aus verunreinigten Fraktionen mittels Kristallisation bzw. Fällung unter Lösemittelverdampfung oder Umkristallisation unter Erwärmung und Abkühlung nach anschließendem Waschen aufgereinigt werden (Abbildung 3.12.).



Abbildung 3.12.: Aufreinigung durch Kristallisation am Beispiel einer Unterfraktion des EtOAc Extraktes von Stamm SG25 (*Biscogniauxia* sp.) (eigene Darstellung).

3.8. Analytik

3.8.1. Dünnschichtchromatographie

Die Entwicklung der Dünnschichtchromatographieläufe wurde auf kommerziell erhältlicher mit Kieselgel beschichteter Aluminiumfolie (TLC Silica gel 60, F₂₅₄, Aluminium roll 500 x 20 cm, Merck, DEU) in mit Lösemittel gesättigten Glaskammern mit verschiedensten binären bzw. ternären Lösemittelgemischen vollzogen. Das Elutionsprofil wurde erst zerstörungsfrei mit UV-Lampe (Min UVIS, Desaga, DEU) bei 254 und 366 nm untersucht und danach mittels Färbereagenzien behandelt. Die Anfärbung erfolgte hauptsächlich mit den Universalfärbelösungen Anisaldehyd-Schwefelsäure, Ceriumammoniummolybdat (CAM bzw. Hanessians stain), oder Kaliumpermanganat als Tauchlösung mit anschließender Erhitzung (Heißluft Pistole, BHA 2000/1, Bavaria, DEU). Für die Anfärbung von Aminen wurde Ninhydrin-Lösung verwendet. Die Rezepte der Färbelösungen (Jork 1990) sind in Tabelle 3.14. angegeben. Die Aufbewahrung erfolgte möglichst lichtgeschützt in Braunglas im Kühlschrank (T = 4 °C).

Tabelle 3.14.: Zusammensetzung der Anfärbereagenzien für die Dünnschichtchromatographie.

Anisaldehyd-Schwefelsäure-Lösung		
Komponente	Menge	Produzent
Methanol	85 ml	VWR international, USA
Essigsäure konz. "Glacial"	14 ml	VWR international, USA
Schwefelsäure konz. (> 95%, H ₂ SO ₄ %)	1 ml	Carl Roth, DEU
Anisaldehyd (4-Methoxybenzaldehyd)	1 ml	Merck-Schuchardt, DEU
Ceriumammoniummolybdat / Hanessians stain-Lösung		
H ₂ O	90 ml	Millipore, USA
Ammonium-VI-molybdat-tetrahydrat (H ₂₄ Mo ₇ N ₆ O ₂₄ x 4H ₂ O)	5 g	Arcos Organics, USA
Cerium IV sulfat tetrahydrat (Ce(SO ₄) ₂ x 4 H ₂ O)	1 g	AppliChem, DEU
Schwefelsäure konz. (>95%, H ₂ SO ₄)	10 ml	Carl Roth, DEU
Kaliumpermanganat-Lösung		
H ₂ O	112.5 ml	Millipore, USA
Natriumhydroxyd (NaOH)	12.5 g	Carl Roth, DEU
Kaliumpermanganat (KMnO ₄)	1.5 g	Carl Roth, DEU
Kaliumcarbonat (K ₂ CO ₃)	10 g	Carl Roth, DEU
Ninhydrin-Lösung		
Ethanol	100 ml	VWR international, USA
Essigsäure konz. (>95%, AcOH)	3 ml	VWR international, USA
Ninhydrin (p.A.)	1.5 g	Merck, DEU

3.8.2. RP-HPLC-(MS)

Verschiedene Geräte standen für die Verbindungsanalytik über Reversed-Phasen-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) zur Verfügung. RP-HPLC gekoppelt mit hochauflösender "time of flight" Massenanalyse (RP-HPLC-HR-TOF-MS) wurde auf einem Agilent Gerät (Agilent Technologies, USA) der Serie 1200 bestehend aus DAD (SL G1315C), Autosampler (HiP-ALS SL, G1367C), Säulenofen (TCC SL, G1316B und FC/ALS Therm, G1330B), Pumpe (SL G1312B), Entgaser (C1379B) und TOF-Detektor (LCMS 6220 accurate mass) mit einer RP-Säule (Hypersil Gold C₁₈, 3 µm, 150 x 2.1 mm Thermo Scientific, USA) ausgeführt. Die Ionisierung erfolgte über eine duale Elektronenspray-Quelle (Dual-ESI) mit 2500 V und N₂ als Trägergas (Generator: NGM 11, cmc-Instruments GmbH, DEU). Eine Trennung der Verbindung wurde durch eine Gradientenmethode (Tabelle 3.15., V = 0.3 ml/min, T = 40 °C) mittels dualem Laufmittelgemischen (Eluent A: 94.9/5/0.1, % v/v/v, H₂O/ACN/Ameisensäure; Eluent B: 94.9/5/0.1, % v/v/v, ACN/H₂O/Ameisensäure) als Standardmethode vollzogen. Bei problematischer Trennung und Signalüberlagerung wurde entweder eine verlängerte Standardmethode gewählt oder eine isokratische Methode (X = fester Anteil Eluent B) entwickelt (Tabelle 3.15.). Die Datensammlung (LC-MS Data Acquisition) und Bearbeitung (Qualitative Analysis, Version: B.07.00) erfolgte über das "MassHunter Workstation" Programm.

Tabelle 3.15.: HPLC-MS Methodik (Agilent-Gerät).

Standardmethode		
Zeit [min]	Eluent A [% v/v]	Eluent B [% v/v]
0.0	100	0
10.0	2	98
13.0	2	98
13.5	100	0
18.0	100	0
Standardmethode verlängert		
0.0	100	0
30.0	2	98
33.0	2	98
33.5	100	0
35.0	100	0
Standardmethode isokratisch		
0.0	100-X	X
10.0	100-X	X
10.5	2	98
13.0	2	98
13.5	100	0
15.0	100	0

Ein weitere RP-HPLC-Maschine stand mit einem Shimadzu-Gerät (Shimadzu Corp., JPN) der Serie NexeraXR bestehend aus DAD (SPD-M20A), Säulenofen (CTO-20A), Autosampler (SIL-20A XR), Pumpe (LC-20AD XR), Kommunikationsmodul (CBM-20A) und Entgasereinheit (DGU-20A 5R) mit einer C₁₈ Trennsäule (Hypersil Gold, 1.9 µM, 50 x 2.1 mm, Thermo Scientific, USA) zur Verfügung. Die Trennmethode mit Laufmittelzusammensetzung (Eluent A: 99.9/0.1, % v/v, H₂O /TFA; Eluent B: 99.9/0.1, % v/v, ACN/H₂O/TFA) bei konstanter Durchflussrate ($V = 0.5$ ml/min) und bei konstanter Temperatur ($T = 40^{\circ}\text{C}$) ist in Tabelle 3.16. angegeben. Die Daten wurden mit dem Programm LabSolution (Version: 5.87, Shimadzu, USA) aufgenommen und bearbeitet.

Tabelle 3.16.: HPLC-Methodik (Shimadzu-Gerät).

Standardmethode		
Zeit [min]	Eluent A [% v/v]	Eluent B [% v/v]
0.0	95	5
10.5	5	95
11.5	5	95
11.6	95	5
15.0	95	5
Standardmethode isokratisch		
0.5	100-X	X
10.5	100-X	X
11.5	5	95
12.5	5	95
12.6	95	5
15.5	95	5

Ebenfalls zur Analytik genutzt wurde ein HPLC-Gerät der Accela-Serie (Thermo Scientific, USA) mit DAD (Accela PDA Detector), Pumpe (Pump 600), Autosampler (Accela Autosampler oder Spectra Series AS100) und der Kommunikationseinheit (SN 4000 Spectra System). Als Trennsystem fand entweder eine C₁₈ Säule (Hypersil Gold, 3 µm Partikel, 150 x 2.1 mm, Thermo Scientific, USA) oder eine C₁₈ "core-shell"-Säule (Nucleoshell RP18, 5 µm Partikel, 150 x 4 mm, Macherey-Nagel, DEU) mit zwei verschiedenen Laufmittelgemischen (Eluent A: 94.9/5/0.1, % v/v/v, ACN/H₂O/TFA; Eluent B: 94.9/5/0.1, % v/v/v, H₂O/ACN/TFA), gefahren als Gradient oder in isokratischer Fahrweise (X = fester Anteil Eluent A, % v/v) bei konstanter Durchflussrate ($V = 0.7$ ml/min) Anwendung (Tabelle 3.17.). Datenmanagement und Bearbeitung erfolgt über die Software ChromQuest5 (Version: 3.2.1., Thermo Fisher Scientific, USA).

Tabelle 3.17.: HPLC-Methodik (Thermo Scientific-Gerät).

Standardmethode		
Zeit [min]	Eluent A [% v/v]	Eluent B [% v/v]
0.0	0	100
10.0	100	0
11.0	100	0
11.5	0	100
13.5	0	100
Standardmethode isokratisch		
0.0	X	100-X
15.0	X	100-X
16.0	100	0
16.5	100	0
17.5	0	100
18.0	0	100

Abhängig vom Elutionsprofil wurden die Standardmethoden gegebenenfalls bei der Dauer des Gradienten bzw. Elutionskraft und Dauer bei den isokratischen Läufen angepasst.

3.8.3. MS-Analytik

Neben HPLC-gekoppelten Massenanalysatoren (Kapitel 3.8.2. Agilent-Gerät) standen zwei niedrig auflösende Massenanalysatoren in Form eines NanoESI-Geräts (Esquire 3000 ion trap, Bruker Daltonik GmbH, DEU) und eines MALDI TOF-Geräts (Ultraflex MALDI-TOF/TOF, Bruker Daltonik, DEU) in der Regel als Auftragsmessung (Abteilung Massenspektrometrie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld) zur Verfügung.

Proben für das NanoESI wurden in geeignetem Lösemittel (i.d.R. MeOH, ACN, DCM) gelöst und unter Umgebungsdruck per "inhouse" gezogener Glaskapillare zum Emitter geführt (static nano-ESI). Stickstoff (Stickstoffgenerator NGM 11, cmc Instruments, DEU) diente als Zerstäuber- und Trocknergas. Die Kalibrierung wurde durch eine Standardmischung (ESI-L Tuning Mix, Agilent Technologies, USA) vorgenommen. Die Aufnahme der Messwerte und die Auswertung der Spektren erfolgte durch die Software esquireNT (Version 5.2, esquireControl, Bruker Daltonik) bzw. DataAnalysis (Version 3.4).

Proben für die MALDI-MS-Untersuchung ($V = 0.5 \mu\text{l}$) wurden direkt auf dem MALDI-Target (Stahlplatte) mit 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB, $V = 0.5 \mu\text{l}$) gemischt. Die Ionisierung erfolgte im "reflectron mode" mit einem Stickstofflaser (MNL 200, LTB Laser Technik, DEU) bei 337 nm und Wiederholungsraten von 50 Hz im Vakuum. Die Spektrenaufnahme wurde durch das Programm "FlexControl" (Version 3.0, Bruker Daltonik, DEU) und die Prozessierung durch das Programm "FlexAnalysis" (Version 3.4, Bruker Daltonik, DEU) vorgenommen.

3.8.4. NMR-Analytik

Getrocknete Proben wurden je nach Löslichkeit in 400-500 μL deuteriertem Lösemittel (DMSO- D_6 , MeOH- D_4 , MeOH- D_3 , CDCl_3 , Pyridin- D_5 , D_2O , Aceton D_6 ; Deutero GmbH, DEU) gelöst und in NMR-Röhrchen überführt ($\varnothing = 5 \text{ mm}$). Für ^1H -, ^{13}C -, COSY-, HMQC-, HMBC-, NOESY- und ROESY-Standardmessungen wurde entweder das Bruker Avance III 500 ausgestattet mit einem 5 mm BBFO-Probenkopf oder das Bruker Avance III 500HD ausgestattet mit einem 5 mm TBO-Probenkopf verwendet. Die Messfrequenzen lagen je nach beobachtetem Kern demnach bei 500 MHz (^1H) bzw. 126 MHz (^{13}C). Gering konzentrierte oder komplexe Proben wurde dagegen am Bruker Avance 600 (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 151 MHz) mit 5 mm TXO-Probenkopf vermessen.

Die Auswertung der erhaltenen FID-Daten erfolgte über das Programm "MestReNova" (Version: 8.1.0-11315, Mestrelab Research, ESP) mit der Referenzierung auf das Signal des jeweiligen zu geringen Teilen enthalten und nicht vollständig deuterierten Lösemittels. Chemische Verschiebungen und Signale häufiger Verunreinigungen, wie Lösemittelrückstände vom Separationsprozess, wurden gegebenenfalls mit Literatur identifiziert (Gottlieb *et al.* 1997, Fulmer *et al.* 2010, Babij *et al.* 2016).

3.8.5. Kristallstrukturanalyse

Röntgenbeugungsuntersuchungen wurden mit einem von zwei Diffraktometern (Supernova, Single source at offset, Eos, Rigaku, JPN bzw. Supernova, Dual, Cu at zero, Atlas, Rigaku, JPN) bei fester Kristalltemperatur ($T = 100 \text{ K}$) vermessen. Die Daten wurden mit der Software „CrysAlisPro“ (Version: 1.171.38.41 bzw. Version: 1.171.38.43) aufgenommen, im Programm „OLEX2“ (Version: 1.2. OlexSys, GBR) mit „ShelXT“ (Sheldrick 2008) zur Molekülstruktur gelöst und mit „ShelXL“ (Sheldrick 2015) unter Verwendung der "kleinsten Quadrate Methode" verfeinert (Dolomanov *et al.* 2009). Die Messungen und Auswertung der Daten erfolgte durch Frau Beate Neumann und Herrn Dr. Hans-Georg Stammer (Abteilung Anorganische Chemie und Struktur Chemie, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld). Bildbearbeitung und Visualisierung der Struktur wurde mit der Software OLEX2 ermöglicht.

3.8.6. Computer und Datenbank assistierte Strukturidentifizierung

Die generelle Literatur- und Informationssuche wurde über "PubMed" (PubMed 2019), ScienceDirect (Elsevier 2019) oder "Google" bzw. "Google Scholar" als Suchmaschine vollzogen. Spezielle Suchen zu Pilzorganismen, Taxonomy und Synonymen wurde über "Mycobank" (Mycobank 2019, Crous *et al.* 2004, Robert *et al.* 2013) und "NCBI-Taxonomy" (Federhen 2011) bewerkstelligt. Je nach bereits vorhandenen spektroskopischen Daten (Masse, 1d-NMR-Spektren, etc.), Bearbeitungsstand (bereits etablierte Substrukturen, exakte Struktur) und Abfragemöglichkeiten innerhalb der Suchmaske (Summenformel, Masse, Strukturmerkmale, chemische Verschiebungen, etc.) lieferten öffentliche Datenbanken (Spectral Database for Organic Compounds (SDBSWeb 2019), NIST Chemistry WebBook, SRD 69 (Linstrom 1997), NMRShiftDB2 (Steinbeck & Kuhn 2004)) und kommerzielle Datenbanken (SciFinder 2019) Unterstützung bei der aufwendigen Strukturidentifizierung. Für eine Verbindung wurden Informationen durch die auf Naturstoffe spezialisierte, kommerzielle Datenbank "AntiBase" (Laatsch & Wiley-VCH 2017) abgefragt.

3.9. Synthesearbeiten

3.9.1. Methylierung von Auranticin A

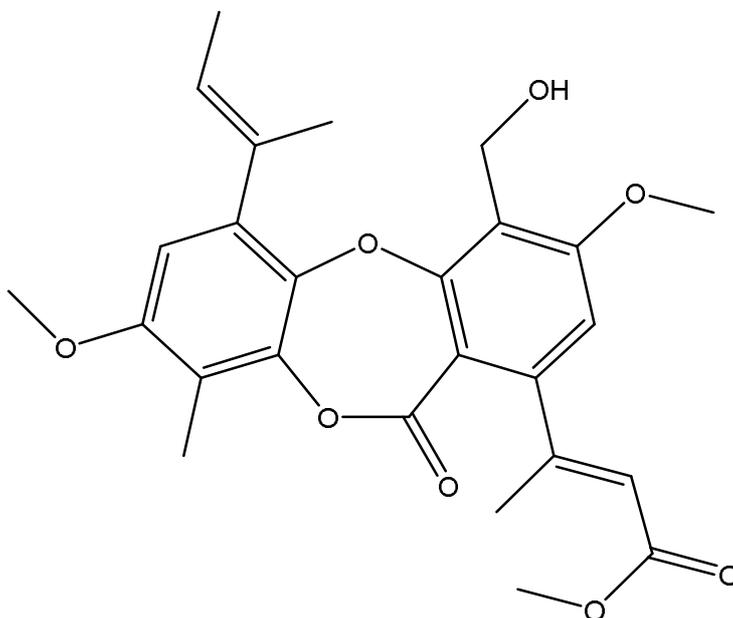


Abbildung 3.13.: Dimethyliertes Auranticin A (SS02.02).

Auranticin A (SG8-102, $m = 56.3$ mg, $n = 0.128$ mmol, 1 Äq) und K_2CO_3 ($m = 72$ mg, $n = 0.52$ mmol, 4.1 Äq.) wurden in Aceton ($V = 89.4$ ml) vorgelegt. Dimethylsulfat (DMS, $V = 40$ μ l, $n = 0.42$ mmol, 3.3 Äq.) wurde zugegeben und die Reaktionsmischung gerührt ($t = 1.5$ h, RT). Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit gesättigter $NaHCO_3$ -Lösung ($V = 10.2$ ml) versetzt und mit Ethylacetat (3 x 10 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden einer Säulenchromatographie (95/5/1, v/v/v, DCM/MeOH/AcOH) unterzogen und das dimethylierte Produkt (SS02.02) als farbloser Feststoff erhalten ($m = 8.03$ mg, $\eta = 13\%$).

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] 6.59 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 5.81 (s, 1H) 5.66 (q, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.13 (s, 3H), 1.85 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR ($\{^1H\}$, 126 MHz, $CDCl_3$): δ [ppm] 166.6, 163.3, 161.4, 161.3, 156.8, 154.9, 150.1, 143.4, 142.6, 135.9, 134.5, 126.7, 120.2, 119.2, 118.2, 113.8, 108.1, 107.8, 56.4, 56.1, 54.5, 51.4, 21.0, 18.1, 14.2, 9.3. HR-ESI-MS: $m/z = 486.2022$ $[M+NH_4]^+$, 469.1769 $[M+H]^+$, 451.1681 $[M-H_2O+H]^+$, berechnet für $C_{26}H_{28}O_8+H^+$, 469.1857.

3.10. Sonstige Materialien und Geräte

Generelle Materialien und Geräte sind in Tabelle 3.18. angegeben. Sofern nicht anders beschrieben, wurden technische Lösemittel vor Benutzung destilliert.

Tabelle 3.18.: Auflistung von Material und Geräten.

Material/Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Aceton techn.	Stockmeier Chemie, DEU
Aceton	Aceton p.A.	VWR International, USA Fisher Scientific, GBR
Acetonitril (ACN)	Acetonitril HiPerSolv, Chromanorm Acetonitril HPLC Grade	VWR International, USA Fisher Scientific, GBR
Autoclav	Vapour-Line 80-M	VWR International, USA
Dichlormethan (DCM)	Dichlormethan techn.	Stockmeier Chemie, DEU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Dimethylsulfoxid, p.a.	Fisher Scientific, GBR
Essigsäure (AcOH)	Essigsäure p.a.	VWR International, USA
Ethylacetat (EtOAc)	Ethylacetat techn.	Stockmeier Chemie, DEU
Ethanol (EtOH)	Ethanol techn.	Stockmeier Chemie, DEU
Glycerol	Glycerol \geq 98%, Phar. EU	Carl Roth, DEU
Handschuhe, einweg	Nitril Gloves	VWR International, USA
Hexan	n-Hexan p.A.	VWR International, USA
Inkubator Inkubator (CO ₂)	Function line 60l, Model 311	Heraeus, DEU Forma Scientific, USA
Gefriertrocknung	Alpha 2-4 Pumpe: PC8RC6, DEU	Christ, DEU Vacuubrand, DEU
Pipetten (Kolbenhub)	Research plus	Eppendorf, DEU
Pipetten (Kolbenhub)	Transferpette	Brand, DEU
Kühlraum	Kühlzelle	Viessmann, DEU
Methanol (MeOH)	Methanol techn.	Stockmeier Chemie, DEU
Methanol (MeOH)	Methanol HiPerSolv, Chromanorm Methanol HPLC Grade	VWR International, USA Fisher Scientific, GBR
Parafilm	Parafilm M	Bemis, USA
Petrolether	Petrolether techn.	Stockmeier Chemie, DEU
pH-Sonde	MP220 pH Meter	Mettler-Toledo, USA
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen (10, 200, 1000 μ l)	Sarstedt, DEU
Polarimeter	Digitalpolarimeter DIP360 Polarimeter Model 341 Spektropolarimeter J-810	Jasco, DEU Perkin Elmer, USA Jasco, DEU
ReagiergefäÙe	Mikro-ReagiergefäÙe (1.5ml, 2ml)	Sarstedt, DEU
Rotationsverdampfer	Laborota 4000, Pumpe: CVC 2	Heidolph, DEU Vakuubrand, DEU
Schüttler (Kipp-)	Mini Rocker MR-1	Biosan, LVA
Schüttler (Platten-)	Titramax 1000/ Incubator 1000	Heidolph, DEU
Schüttler (ReagiergefäÙs-)	Thermomixer compact	Eppendorf, DEU
Schüttler (Rotations-)	KS 130 Basic TH15/ KS-15 Innova 4000 Ecotron	IKA, DEU Edmund Bühler, DEU New Brunswick Scientific, USA Infors HT, CHE

Tabelle 3.18.: Auflistung von Material und Geräten (Fortsetzung).

Material/Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Sand	Sand, acid washed	Fisher Scientific, GBR
Spannungsversorger	EPS601	Amersham Bioscience, GBR
Spektrometer (IR) Spektrometer (UV-VIS) Spektrophotometer	Nicolet 380 FT-IR UV-3100PC ND-1000, Nanodrop	Thermo Electron, USA VWR International, USA PEQLAB Biotechnologie, DEU
Tiefemperaturschrank	MDF-U5386F	Panasonic, JPN
Trifluoressigsäure (TFA)	Trifluoressigsäure (TFA) p.a.	Fisher Scientific, GBR Carl Roth, DEU
Thermocycler	PeqStar XS Primus 25 advanced	PEQLAB Biotechnologie, DEU
Ultraschallbad	Sonorex Super 10P	Bandelin electronic, DEU
UV-Lampe	MinUVIS	Desaga, DEU
Waage (Analyse-)	XS105 Dual Range FA-210-4I	Mettler-Toledo, USA Faust, DEU
Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf, DEU

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Isolierte endophytische Pilze

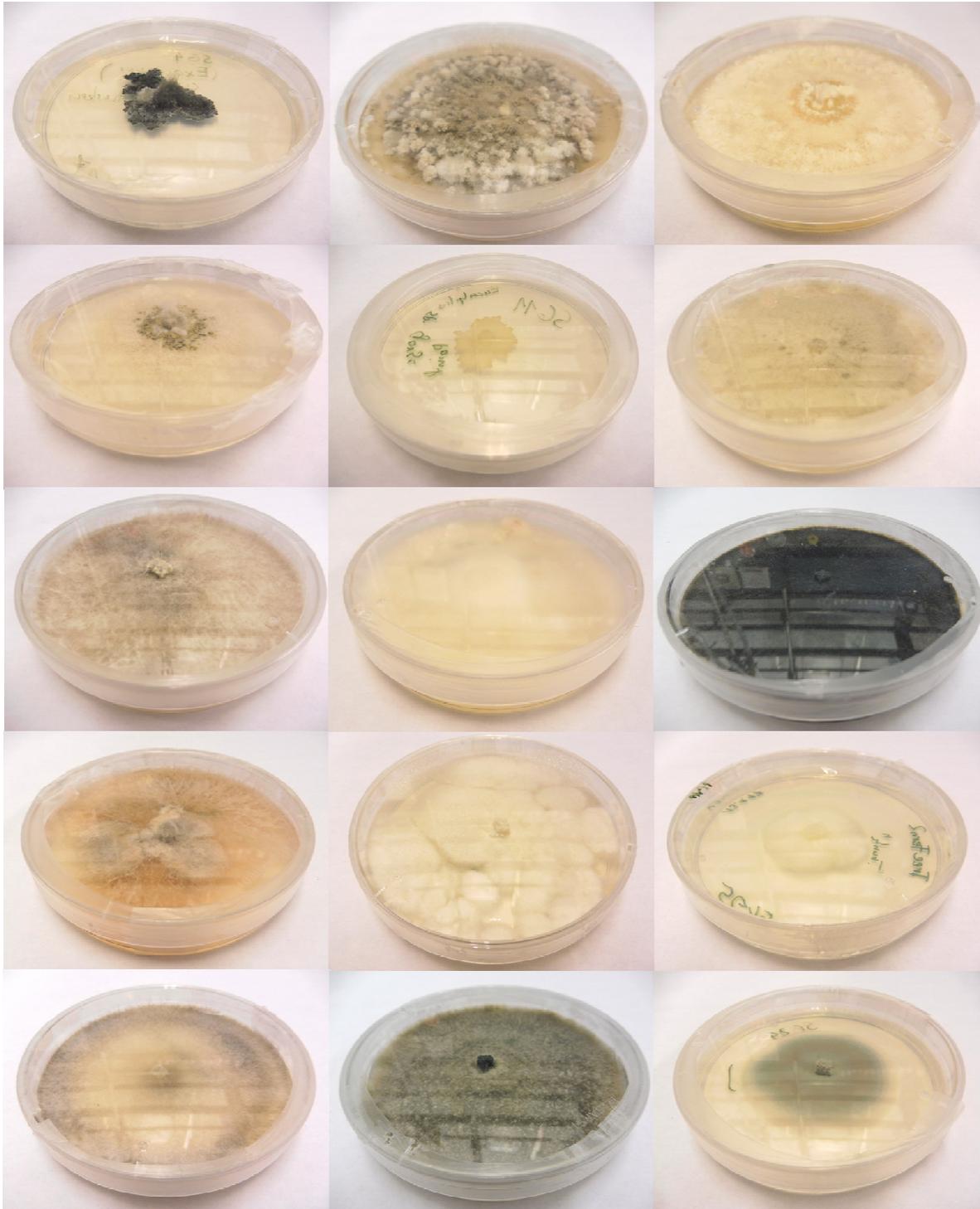


Abbildung 4.1.1.: Abbildungszusammenstellung einiger isolierter Endophytenstämme auf Kartoffel-Dextrose-Agar (von links): 1. Reihe: *Dothiorella* sp. (SG4), *Stemphylium* sp. (SG6), *Pestalotiopsis* sp. (SG7); 2. Reihe: *Verrucoconiothyrium* sp. (SG10), *Preussia* sp. (SG11), *Waydora* sp. (SG12); Reihe 3: *Khusia* sp.(SG14a), *Pyronema* sp. (SG15b), *Gelasinospora* sp. (SG16); Reihe 4: *Biscogniauxia* sp. (SG17a), *Pseudoplectania* sp. (SG18d), *Xylariaceae* sp. (SG19); Reihe 5: *Daldinia* sp. (SG22), *Valsa* sp. (SG23), *Penicillium* sp. (SG24) (eigene Darstellung).

4.1.1. Kultivierte und identifizierte Endophytenstämme

Im Rahmen der Stammsuche für die mykochemischen Untersuchungen wurden insgesamt 55 Stämme aus verschiedenen Wirtspflanzen, unterschiedlicher Gewebearten und Habitats isoliert und per ITS- bzw. LSU-Sequenzierung und Sequenzabgleich mit Referenzdaten klassifiziert (siehe Kapitel 3.4.3.). Viele Stämme, insbesondere die der artenreichen Gattungen (z.B. *Penicillium* (SG3, SG17c, etc.), *Pestalotiopsis* (SG7, SG17b), *Fusarium* (SG18b, SG18c)), welche sehr hohe oder die komplette Sequenzidentität in der ITS-Region für verschiedene Arten aufwiesen, ließen sich ohne detaillierte phylogenetische Untersuchungen und weitere Markerregionen nur bis zur Gattung bestimmen (Tabelle 4.1.). Dies stellte eine Limitierung des ITS-Barcodings dar, welche bereits in anderen Studien angemerkt worden war (z.B. O'Brien *et al.* 2005, Begerow *et al.* 2010). Auf der anderen Seite war auffällig, dass sich für einige der Stämme nur hohe Sequenzidentitäten zu nicht genau klassifizierten Stämmen fanden (z.B. bei SG8c, SG19) oder nur relativ schlechte Sequenzübereinstimmungen zu den Referenzen finden ließen (z.B. bei SG13, SG24b). Dies erschwerte die Arten- (Sequenzübereinstimmung > 97%) oder sogar die Gattungszuordnung (Sequenzübereinstimmung > 95%). Solche Stämme waren prinzipiell von hohem Interesse für die Untersuchung von Metabolitprofilen. Es könnte sich bei diesen Stämmen entweder um neue Arten oder um mykochemisch wenig erforschte Arten, deren genetische Markerregionen noch nicht sequenziert wurden, handeln. Neue Arten werden in der Regel mit neuen Sekundärmetaboliten in Verbindung gesetzt (Strobel *et al.* 2005). Die Restriktion der Suche auf überprüfte und referenzierte Einträge ("type material", Federhen 2015) sollte zwar eine verlässliche Klassifizierung ermöglichen, erwies sich häufig aber auch als unpraktikabel, da in einigen Fällen (z.B. *Lanzia* sp. (SG10c), *Biscogniauxia* sp. (SG17a, SG25), *Ascobolus* sp. (SG13, SG15a), *Hypoxylon* sp. (SG19, SG28)) deutlich schlechtere Sequenzüberübereinstimmung (< 95%) erreicht wurden. Für die Klassifizierung wurden Sequenzen von Typspezies bzw. Typmaterial generell präferiert, wenn vergleichbare Sequenzlänge und -übereinstimmung bei den Datenbankeinträgen vorhanden waren. Zwei vielversprechende Stämme von *Ascobolus*- (SG13) und *Peziza*-Arten (SG21) waren nach der Kryopräservierung nicht mehr vital. Bei diesen Kulturen wurde stattdessen das Auftreten anderer Pilze festgestellt (SG13-2, SG21-2). Ob diese Proben bei der Kultivierung kontaminiert wurden oder bereits bei der Isolierung aus dem oberflächensterilisierten Pflanzenmaterial nicht axenisch waren, ließ sich nicht klären. Zumindest sind *Clonostachys rosea* und *Trichoderma lixii* (\equiv *Hypocrea lixii* bzw. *Trichoderma harzianum*-Artenkomplex, Chaverri *et al.* 2015) als verbreitete endophytische Isolate bekannt (Sutton *et al.* 2008, Nordström 2014, Katoch *et al.* 2019).

Tabelle 4.1.1: Endophyten Stammsammlung und taxonomische Klassifizierung.

Stammcode	taxonomische Klassifikation	Übereinstimmung ITS-Sequenz [%]	Referenzsequenzen	Wirtspflanz, Gewebe
TS3-2 (TS9)	<i>Endomelanconiopsis endophytica</i>	99	MH863083.1	<i>Rauvolfia macrophylla</i> , Rinde
TS5-2	<i>Xhuskia/Nigrospora oryzae</i>	99	FN435755.1	<i>Rauvolfia macrophylla</i> , Rinde
TS6-2	<i>Rhinocladiella similis</i>	99.0	MH862885.1	<i>Rauvolfia macrophylla</i> , Rinde
TS7-2	<i>Xylaria cubensis</i>	98.0	AB625440.1	<i>Rauvolfia macrophylla</i> , Rinde
T26B	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	99.5	MH865347.1	<i>Rauvolfia macrophylla</i> , Rinde
SG1	<i>Daldinia</i> sp.	95.5	AM407726.1	<i>Sequoiendendron giganteum</i> , Rinde
SG3	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>toxicarum</i> , <i>citreonigrum</i>)	99.4-99.8	KJ173540.1, NR_138264.1	<i>Sequoiendendron giganteum</i> , Rinde
SG4	<i>Dothiorella</i> sp. (cf. <i>sarmentorum</i> , <i>iberica</i>)	97.9	NR_111166.1, NR_111165.1	<i>Exocarpus cupressiformis</i> , Blatt
SG5	<i>Trichoderma</i> sp. (cf. <i>aethiopicum</i> , <i>longibrachiatum</i>)	100	MH865820.1, KY378946.1	<i>Dicksonia antarctica</i> , Sprossachse
SG6	<i>Pleospora/Stemphylium</i> sp. (cf. <i>S. versicarium</i>)	99.5	MH628104.1	<i>Carprobrotus rossii</i> , Blatt
SG7	<i>Pestalotiopsis</i> sp. (cf. <i>knightsiae</i>)	99.8	KM199310.1	<i>Banksia serrata</i> , Blatt
SG8b	<i>Embellisia/Alternaria lolii</i>	99.6-100	JN383492.1, NR_159632.1	<i>Carprobrotus rossii</i> , Blatt
SG8c	<i>Didymosphaeriaceae</i> (cf. <i>Tremateia</i> sp.) / unbekannt	<90 / 99.8	KU991905.1, AM922221.1	<i>Carprobrotus rossii</i> , Blatt
SG9	<i>Bartalinia robillardoides</i>	100	NR_126145.2	<i>Carprobrotus rossii</i> , Blatt
SG9b	<i>Embellisia/Alternaria lolii</i>	99.6-100	JN383492.1, NR_159632.1	<i>Carprobrotus rossii</i> , Blatt
SG10	<i>Verrucoconiothyrium nitidae</i>	98.6	JN712452.1	<i>Carprobrotus rossii</i> , Blatt
SG10b	<i>Cladosporium</i> sp.	100	z.B. MH862342.1, NR_148193.1	<i>Allocasuarina verticillata</i> , Blatt
SG10c	<i>Lanzia griseliniae</i>	99.3	MH003473.1	<i>Allocasuarina verticillata</i> , Blatt
SG11	<i>Preussia minima</i>	99.1	KX710248.1	<i>Allocasuarina verticillata</i> , Blatt
SG12	<i>Waydora typica</i>	99.8	KF727412.1	<i>Eucalyptus</i> sp., Rinde
SG13	<i>Ascobolus</i> sp.	94.8	KF574867.1	<i>Allocasuarina verticillata</i> , Rinde
SG13-2	<i>Clonostachys</i> sp. (cf. <i>rosea</i>)	97.7	KJ619987.1	<i>Atriplex cinerea</i> , Blatt
SG14a	<i>Xhuskia/Nigrospora oryzae</i>	100	MH844777	von SG13
SG14ba	<i>Umbelopsis</i> sp.	99.5	JN206381.1	<i>Tristaniopsis laurina</i> , Rinde
SG14bb	<i>Daldinia</i> sp.	99.5	AF176982, AM407726.1	<i>Tristaniopsis laurina</i> , Rinde
SG14c	<i>Mucor parviseptatus</i>	99.5	JN206108.1	<i>Tristaniopsis laurina</i> , Rinde
SG15a	<i>Ascobolus</i> sp.	94.9	KF574867.1	<i>Eucalyptus regnans</i> , Rinde
SG15b	<i>Pyronema</i> sp.	100	KF128839.1	<i>Eucalyptus regnans</i> , Rinde

Tabelle 4.1.1.: Endophyten Stammsammlung und taxonomische Klassifizierung (Fortsetzung).

Stammcode	taxonomische Klassifikation	Übereinstimmung ITS-Sequenz [%]	Referenzsequenzen	Wirtspflanz, Gewebe
SG15c	<i>Preussia</i> sp. (cf. <i>africana</i> , <i>isomera</i>)	100	KX710221.1, AY510418.1	<i>Eucalyptus regnans</i> , Rinde
SG16	<i>Gelasinospora</i> (cf. <i>saitoi</i> , <i>dictyophora</i>)	99.5-100	MG669243.1, AY681181.1	<i>Exocarpos cupressiformis</i> , Rinde
SG17a	<i>Biscogniauxia</i> sp.	98.7	MH410022.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Blatt
SG17b	<i>Pestotiopsis</i> sp. (cf. <i>oryzae</i> , <i>microspora</i> , etc.)	99.8	MH854881.1, AF377291.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Sprossachse
SG17c	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>glabrarum</i> , <i>bussumense</i>)	99.8-100	JX140796.1, NR_137895.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Blatt
SG17d	<i>Stemphylium/Pleospora</i> sp. (cf. <i>eturmiunum</i> , <i>vesicarium</i>)	100	MK681350.1, NR_154927.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Blatt
SG17e	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>glabrarum</i> , <i>bussumense</i>)	99.8-100	JQ863239.1, NR_137895.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Sprossachse
SG17f	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>spinulosum</i> , <i>sterculinicola</i> , etc.)	100	MH856402.1, NR_137897.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Sprossachse
SG18a	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>chatabudae</i> , <i>philippinense</i> , etc.)	100	MH860600.1, NR_144845.1	<i>Banksia</i> sp., Blatt
SG18b	<i>Gibberella</i> / <i>Fusarium</i> sp.	100	MK849925.1	<i>Banksia</i> sp., Blatt
SG18c	<i>Gibberella</i> / <i>Fusarium</i> sp. (cf. <i>trinctum</i> Artenkomplex)	99.4	MH862424.1, MH863232.1	<i>Banksia</i> sp., Blatt
SG18d	<i>Pseudoplectania</i> sp.	96.3	KP050642.1	<i>Banksia</i> sp., Blatt
SG18e	<i>Penicillium</i> cf. (<i>armarii</i>)	100	NR_137915.1	<i>Banksia</i> sp., Blatt
SG19	<i>Hypoxyton</i> (cf. <i>vinosopulvinatum</i>), <i>Xylariaceae</i> sp.	91.1, 99.4	JQ009321.1/MH844083.1	<i>Dicksonia</i> sp., Sprossachse
SG21	<i>Peziza</i> sp. (cf. <i>ammophila</i>)	96.9	KX271731.1	<i>Atriplex cinerea</i> , Sprossachse
SG21-2	<i>Hypocrea</i> / <i>Trichoderma</i> <i>fixii</i>	100	AY605720.1	von SG21
SG22	<i>Daldinia</i> sp.	99.5	AF176982, AM407726.1	<i>Lophozonia cunninghamii</i> , Rinde
SG23	<i>Valsa fabianae</i> / <i>Cytospora eucalypticola</i>	99.8-100	KY051876.1, DQ923539.1	<i>Eucalyptus</i> sp. II, Rinde
SG23b	<i>Valsa fabianae</i> / <i>Cytospora eucalypticola</i>	99.5-99.8	KY051947.1, DQ923539.1	<i>Eucalyptus</i> sp. II, Rinde
SG24	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>spinulosum</i> , <i>sterculinicola</i> , etc.)	100	NR_137897.1, MH856402.1	<i>Eucalyptus</i> sp. I, Rinde
SG24b	<i>Hypoxyton</i> sp., <i>Annulohypoxyton</i> (cf. <i>yungensis</i>)	95.6, 95.6	KX376323.1, KU743960.1	<i>Eucalyptus</i> sp. I, Rinde
SG24c	<i>Pseudoplectania affinis</i>	99.8	JX669826.1	<i>Eucalyptus</i> sp. I, Rinde
SG24d	<i>Pseudoplectania</i> sp.	96.3	KP050642.1	<i>Eucalyptus</i> sp. I, Rinde
SG25	<i>Biscogniauxia</i> sp.	98.2	HM752510.1	<i>Eucalyptus regnans</i> , Rinde
SG26	<i>Meyeromyces caribbica</i>	100	MK394109.1	<i>Atriplex cinerea</i> , Sprossachse
SG27	<i>Penicillium</i> sp. (cf. <i>citreonigrum</i> , <i>aeneum</i> , etc.)	99.8	MH857876.1, MK719926.1	<i>Eucalyptus regnans</i> , Rinde
SG28	<i>Hypoxyton</i> (cf. <i>vinosopulvinatum</i>), <i>Xylariaceae</i> sp.	91.7, 99.4	JQ009321.1, MH844083.1	<i>Eucalyptus regnans</i> , Rinde

4.1.2. Diversität der isolierten Endophyten

Bei der Identifizierung und Klassifizierung der Stämme fiel generell auf, dass für die Datenbanksuche vieler Stämme (z.B. *Preussia* sp. (SG11, SG15c), *Verrucoconiothyrium* (SG10), *Ascobolus* sp. (SG13, SG15a), *Pyronema* sp. (SG15b) und *Biscogniauxia* sp. (SG17a, SG25)) einige Sequenzeinträge mit hoher Übereinstimmung vorhanden waren, deren Organismen zusätzlich als Endophyten annotiert waren. Dies lässt sich als ein Indiz für die Funktionsfähigkeit der gewählten Isolierungsmethode und der vornehmlichen Kultivierung von Endophytenstämmen werten.

4.1.2.1. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Abteilung

Die isolierten Pilzstämme waren überwiegend Ascomyceten. Daneben wurden zwei Vertreter der Mucoromycota (*Umbelopsis* sp. SG14ba, *Mucor* sp. SG14c) registriert (Tabelle 4.1.2.).

Tabelle 4.1.2: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Abteilung

Abteilung	Anzahl Isolate	Anteil [%]
Ascomycota	53	96.4
Mucoromycota	2	3.6

Mucor- und *Umbelopsis*-Arten sind in der Regel als Bodenisolat oder auf abgestorbenem Pflanzenmaterial vorhanden (Walker 1913, Meyer & Gams 2003, Wang *et al.* 2013, Ziaee *et al.* 2016). Arten aus dieser Gattung wurden aber ebenfalls als Endophyten mykochemischer Studien beschrieben (z.B. *U. dimorpha*, Qin *et al.* 2018; *M. fuscus*, Selim *et al.* 2018), weshalb es sich bei diesen Stämmen wahrscheinlich nicht um versehentlich isolierte bzw. nicht eliminierte Epiphyten oder Kontaminationen handelte. Basidiomyceten, die als Isolate auch nur selten in anderen Endophytenstudien berichtet werden und eher mit der Beprobung holziger Pflanzenteile assoziiert sind (Rodriguez *et al.* 2009), konnten trotz eines hohen Bearbeitungsanteils von Rindengewebe nicht isoliert werden. Zudem wurde festgestellt, dass Basidiomyceten häufiger in nicht-kultivierungsabhängigen Methoden identifiziert werden, weshalb sie in Endophytenstudien unterrepräsentiert sein könnten bzw. deren Verbreitung als Endophyten eventuell unterschätzt wird (Arnold *et al.* 2007). Ob die Isolierung eines dominanten oder wirtsspezifischen Endophyten unter den isolierten Stämmen in der jeweiligen Pflanze bzw. Pflanzengewebe vollzogen wurden, lässt sich nicht bestimmen, da die Probenmenge mit maximal zehn Segmenten je Pflanze und Gewebe nicht ausreichend für Aussage zur Endophytengemeinschaft einer Pflanzenart war. Der Untersuchungsfokus war allerdings auch nicht zur Klärung diesbezüglicher Fragestellungen ausgelegt. Die Darstellungen zur taxonomischen Diversität der Pilzisolat nach Klassen, Ordnungen und Familien zeigte dennoch eine breite Verteilung über verschiedene Taxa (siehe Kapitel 4.1.2.2.-4.1.2.4.)

4.1.2.2. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Klasse

Die hauptsächlichliche Repräsentation nach Klassen erfolgte durch Sordariomyceten, Dothideomyceten, Eurotiomyceten und Pezizomyceten (Abbildung 4.1.2.).

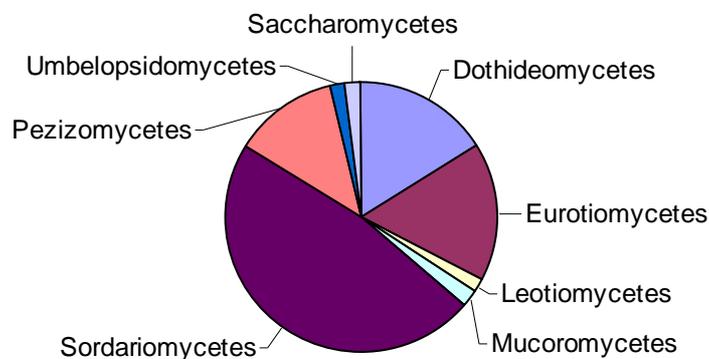


Abbildung 4.1.2.: Verteilung der Endophytenisolate nach taxonomischem Rank Klasse (eigene Darstellung).

Von ähnlichen Ergebnissen der Verteilung von Endophyten innerhalb verschiedener Klassen ist bereits in anderen Studien berichtet worden (Higgins *et al.* 2007, Rodriguez *et al.* 2009), auch wenn Organismen der Leotiomyceten zumindest in kultivierungsbedingten Identifizierungsmethoden stärker vertreten waren (Arnold *et al.* 2007). Diese wurden im vorliegenden Fall nur durch ein Isolat (*Lanzia griseliniae*, SG10c) repräsentiert (Tabelle 4.1.3.).

Tabelle 4.1.3.: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Klasse.

Klasse	Anzahl Isolate	Anteil [%]
Dothideomycetes	9	16.4
Eurotiomycetes	9	16.4
Leotiomycetes	1	1.8
Mucoromycetes	1	1.8
Sordariomycetes	26	47.3
Pezizomycetes	7	12.7
Umbelopsidomycetes	1	1.8
Saccharomycetes	1	1.8

4.1.2.3. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Ordnung

Bezogen auf die taxonomische Stufe Ordnung waren Stämme der Xylariales, Eurotiales, Hypocreales, Pleosporales und Pezizales stark vertreten (Abbildung 4.4.3.).

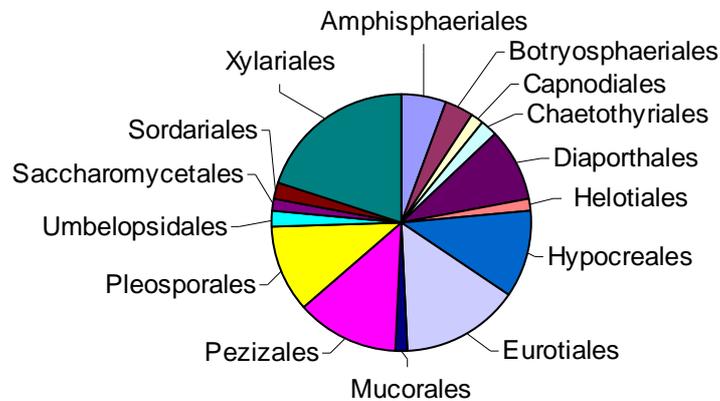


Abbildung 4.1.3.: Verteilung der Endophytenisolate nach taxonomischem Rank Ordnung (eigene Darstellung).

Der vergleichsweise hohe Prozentsatz der erhaltenen Endophytenstämme aus der Ordnung Xylariales war eventuell durch einen hohen Anteil von Rindenproben als Wirtsgewebetyp bei der Pflanzenbeprobung bedingt (siehe Tabelle 4.1.1.). Arten der Xylariales sind häufig als Holz-besiedelnde, saprophytische Pilze anzutreffen (Helaly *et al.* 2017). Demnach war ihre Isolierung aus Rinden und Xylemgewebe naheliegend. Die teilweise Übereinstimmung der Pilzgemeinschaft von Saprophyten und Endophyten wurde bereits in einigen Artikeln diskutiert (siehe Ghimire & Hyde 2008, Hyde & Soyong 2008; Rodriguez *et al.* 2009). Dabei wird Endophytismus bei einigen Arten als Übergangsphase bzw. Zwischenstufe der ansonsten saprotrophen Ernährung interpretiert, die es ermöglicht das Substrat bereits zu einem möglichst frühen Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung zu okkupieren. Jedoch zeigt die Veränderung der Organismengemeinschaft im Laufe der Zersetzung des Pflanzmaterials, dass diese sich von der ursprünglichen Endophytengemeinschaft, daher zum Zeitpunkt der Seneszenz des Pflanzmaterials, unterscheiden und graduell durch saprotrophe Pilze ersetzt werden (Stone *et al.* 2004). Des Weiteren werden auch zunehmend Arten gefunden, die nicht zu den saprotrophen Pilzen gezählt werden (Rodriguez *et al.* 2009). Demnach ist naheliegend, dass Endophyten nicht generell mit Saprophyten identisch sind und von Saprophyten abzugrenzen sind. Dass die in dieser Arbeit isolierten Stämme aber über saprotrophe Lebensabschnitte verfügen bzw. zwischen diesen Trophiemodi wechseln können (Promputtha *et al.* 2007), kann damit nicht ausgeschlossen werden.

Unabhängig von der ökologischen Funktion der Xylariales-Arten sind diese für Naturstoffuntersuchungen generell interessant, da sie bekannt für ihre bioaktiven Verbindungen sind (Helaly *et al.* 2018) und ihre Extrakte häufig moderate bis hohe antiparasitäre und antiprolife-

rative Wirkung zeigen (Higginbotham *et al.* 2013). Dementsprechend gehören drei der fünf Stämme (TS7 (*Xylaria* sp.), SG1 (*Daldinia* sp.), SG25 (*Biscogniauxia* sp.)), welche für detaillierte mykochemische Untersuchungen ausgewählt worden waren, der Ordnung Xylariales an (siehe Kapitel 4.3.-4.6.). Diese Stämme repräsentieren zudem drei verschiedene Familien (Xylariaceae, Hypoxylaceae (Wendt *et al.* 2018), Graphostromataceae (Smith *et al.* 2003)). Im Vergleich zu den Stämmen der Ordnung Xylariales waren hingegen kaum Vertreter von Pilzen der Ascomyceten aus zum Beispiel der Ordnung Capnodiales und Botryosphaeriales (Tabelle 4.1.4.) kultiviert worden, obwohl diese Ordnungen in anderen Studien durch häufigere Isolierung präsenter vertreten waren (z.B. Arnold & Lutzoni 2007, Higginbotham *et al.* 2013).

Tabelle 4.1.4.: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Ordnung.

Ordnung	Anzahl Isolate	Anteil [%]
Amphisphaeriales	3	5.5
Botryosphaeriales	2	3.6
Capnodiales	1	1.8
Chaetothyriales	1	1.8
Diaporthales	5	9.1
Helotiales	1	1.8
Hypocreales	6	10.9
Eurotiales	8	14.5
Mucorales	1	1.8
Pezizales	7	12.7
Pleosporales	6	10.9
Umbelopsidales	1	1.8
Saccharomycetales	1	1.8
Sordariales	1	1.8
Xylariales	11	20.0

Unterschiede in der taxonomischen Verteilung der Endophyten auch bei niedrigem taxonomischem Rank (Klasse, Ordnung) waren sicher durch die verschiedenen Regionen, Wirtsbiologie bzw. Wirtsarten, Umweltbedingungen und saisonale Effekte bestimmt, welche sich nur schwer vergleichen ließen. Für verschiedene Wirtsabstammungslinien und grob definierte biogeographische Regionen wurden aber merkliche Unterschiede in der Endophytenzusammensetzung, welche zudem einzigartig für ihre jeweilige Region ist, festgestellt (Arnold & Lutzoni 2007, Higgins *et al.* 2007, U'Ren *et al.* 2012). Ein weiterer Punkt, der Endophytendiversität beeinflussen kann, ist der Beprobungsaufwand an isolierten Arten und behandelten Pflanzensegmenten. Dieser Beprobungsaufwand ist für Studien zur Beurteilung der Endophytengemeinschaft mehrerer Regionen und Wirtspflanzen deutlich höher (z.B. Isolate N = 1403 (Arnold & Lutzoni 2007), N = 558 (Higgins *et al.* (2007), N = 4154 (U'Ren *et al.* 2012), N = 3307 (Higginbotham *et al.* 2013)) als es in der vorliegenden Arbeit mit dem Fokus auf extensive mykochemische Untersuchungen der Stämme möglich war.

4.1.2.4. Verteilung der Endophytendiversität nach taxonomischer Stufe Familie

Die graphische Darstellung der Endophytendiversität getrennt nach Familienzugehörigkeit zeigte eine breite Aufteilung auf viele verschiedene Familien (Abbildung 4.1.4.).

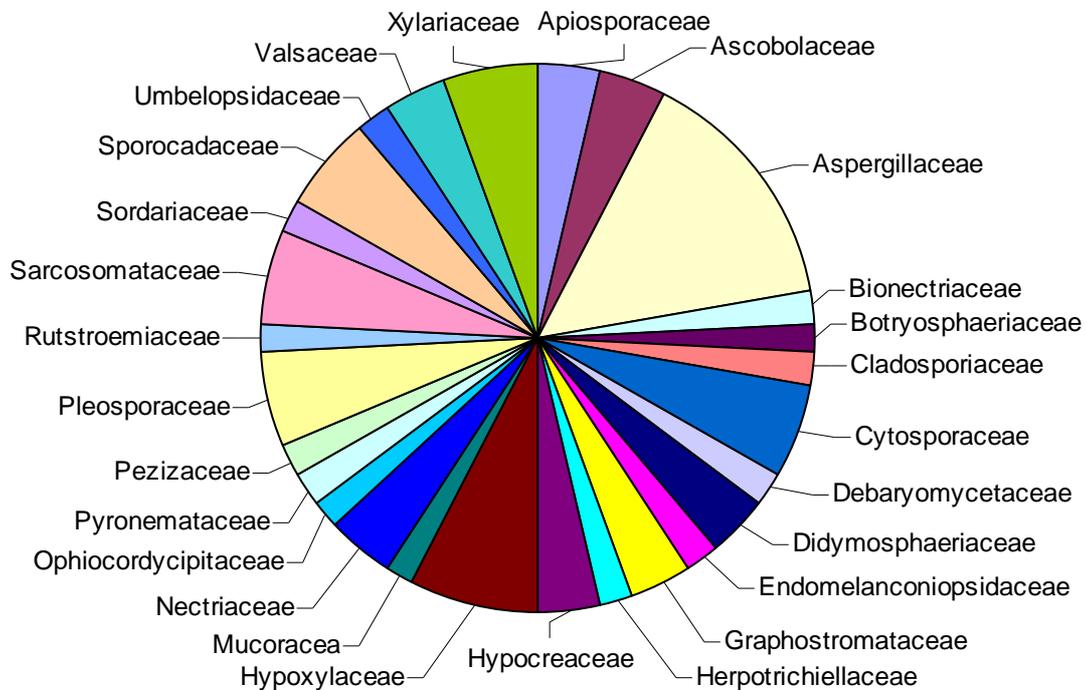


Abbildung 4.1.4.: Verteilung der Endophytenisolate nach taxonomischem Rank Familie (eigene Darstellung).

Mit Ausnahme der Aspergillaceae, deren Isolate nur durch nicht näher klassifizierte *Penicillium* Stämme repräsentiert waren, waren viele Familien nur durch wenige ($N < 4$) Isolate charakterisiert. Davon waren viele Familien sogar nur durch Einzelisolate vertreten (Tabelle 4.1.5.).

Tabelle 4.1.5.: Verteilung der isolierten Endophyten nach taxonomischen Rank Familie.

Familie	Anzahl Isolate	Anteil [%]	Anzahl Genera	Stammcode
Apiosporaceae	2	3.6	1	TS5-2, SG14a
Ascobolaceae	2	3.6	1	SG13, SG15a
Aspergillaceae	8	14.5	1	SG3, SG17c, SG17e, SG17f, SG18a, SG18e, SG24, SG27
Bionectriaceae	1	1.8	1	SG13-2
Botryosphaeriaceae	1	1.8	1	SG4
Cladosporiaceae	1	1.8	1	SG10b
Cytosporaceae	3	5.5	2	SG11, SG12, SG15c
Debaryomycetaceae	1	1.8	1	SG26
Didymosphaeriaceae	2	3.6	2	SG8c, SG10
Endomelanconiopsidaceae	1	1.8	1	TS3-2
Graphostromataceae	2	3.6	1	SG17a, SG25
Herpotrichiellaceae	1	1.8	1	TS6-2
Hypocreaceae	2	3.6	1	SG5, SG21-2
Hypoxylaceae	4	7.3	2-3	SG1, SG14bb, SG22, SG24b
Mucoraceae	1	1.8	1	SG14c
Nectriaceae	2	3.6	1	SG18b, SG18c
Ophiocordycipitaceae	1	1.8	1	T26B
Pyronemataceae	1	1.8	1	SG15b
Pezizaceae	1	1.8	1	SG21
Pleosporaceae	3	5.5	2	SG6, SG8b, SG9b
Rutstroemiaceae	1	1.8	1	SG10c
Sarcosomataceae	3	5.5	1	SG18d, SG24c, SG24d
Sordariaceae	1	1.8	1	SG16
Sporocadaceae	3	5.5	2	SG7, SG9, SG17b
Umbelopsidaceae	1	1.8	1	SG14ba
Valsaceae	2	3.6	1	SG23, SG23b
Xylariaceae	3	5.5	1-3	TS7-2, SG19, SG28

Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der generell beobachteten hohen Diversität der Klasse 3 Endophyten, welche teilweise hunderte unterscheidbare Morpho- bzw. Genotypen je Wirtspflanze aufweisen können (Rodriguez *et al.* 2009). Einige Familien und Gattungen der hier isolierten und kultivierten Pilze sind bekannt für pathogene Stämme (z.B. *Pestalotiopsis* (Maharachchikumbura *et al.* 2011), *Pleospora/Stemphylium* (Brahamanage *et al.* 2018)). Das Ausmaß der Stammklassifizierung anhand des ITS-Barcodings ist allerdings nicht ausreichend für eine Aussage zur Funktion der isolierten Pilze als Mutualisten ("true endophyt") oder latente Pathogene. Die genetischen Unterschiede zwischen endophytischen und pathogenen Isolaten einer Art bzw. naheverwandter Arten kann sehr gering sein (Xu *et al.* 2014, Wheeler *et al.* 2019). Minimale genetische Veränderungen, sowohl bei Wirtspflanze als auch beim endophytischen Pilz, können über den Ausgang der Wirt-Endophyten-Interaktion entscheiden (Fesel & Zuccaro 2016). Teilweise kann die Konversion eines pathogenen Stammes zu einem mutualistischen Endophyten durch die Mutation innerhalb eines einzigen Genlocus vollzogen werden (Freeman & Rodriguez 1993). Zudem kann die Wirt-Endophyt-Interaktion je nach Pflanzenart verschieden sein, wie sich am Beispiel von *Verticillium dahliae* Stämmen zeigt, die in Senfgewächsen und Gräsern als mutualistische Endo-

phyten wachsen, in Kartoffeln hingegen als Pathogene auftreten. Ebenfalls ist vorstellbar, dass einige Pilze, wie es bereits für die Saprophyten diskutiert worden ist (Promputtha *et al.* 2007), generell zwischen biotrophem bzw. peritrophem und endophytem Lebensstil wechseln können. Die unklare Funktion bzw. der nicht direkt feststellbare generierte Vorteil für den Wirt und die hohe taxonomische Diversität der Endophytenisolate ist ein generelles Phänomen der Klasse 3 Endophyten und ist Gegenstand andauernder Diskussionen und Forschungen (Rodriguez *et al.* 2009). Allerdings zeigte die Isolierung vieler Metaboliten (siehe Kapitel 4.2-4.6.) aus den für die mykochemische Untersuchung ausgewählten Endophytenstämmen, dass diese über bioaktive Eigenschaften verfügen. Diese Wirkungen sind unter anderem gegen phytopathogene Pilze, Bakterien und Nematoden, sowie Herbivoren gerichtet. Obwohl sich die Produktion der Verbindungen in der Kultivierung unter Laborbedingungen nicht direkt auf das Metabolitprofil beim Wachstum innerhalb des Pflanzengewebes (*in planta*) übertragen lässt, so kann doch vermutet werden, dass diese Verbindungen ebenfalls während der Endophyten-Wirt-Interaktion gebildet werden können und gegebenenfalls vom Wirtsmetabolismus verändert werden (Ludwig-Müller 2015). Die so erzeugten Moleküle könnten den besiedelten Pflanzen Selektionsvorteile verschaffen.

Abschließend kann konkludiert werden, dass mutualistische Endophyten aus nicht Graswirten (nicht Clavicipitaceae) taxonomisch sehr divers sind. Insbesondere die niedrige Übereinstimmung des genetischen Markers (ITS-Barcoding) gegenüber den Referenzsequenzen für einige der isolierten Stämme lässt vermuten, dass die genetische Diversität und die Artenvielfalt weiterhin durch Endophytenstudien erweitert werden kann. In Konsequenz könnte dies in der Isolierung biotechnologisch nützlicher Stämme resultieren. Darüber hinaus sollten endophytische Pilze gerade wegen der komplexen Interaktion und unklaren bzw. nicht vollständig verstandenen ökologischen Funktion weiter im Forschungsfokus bleiben.

4.2. T26B (*Purpureocillium lilacinum*)

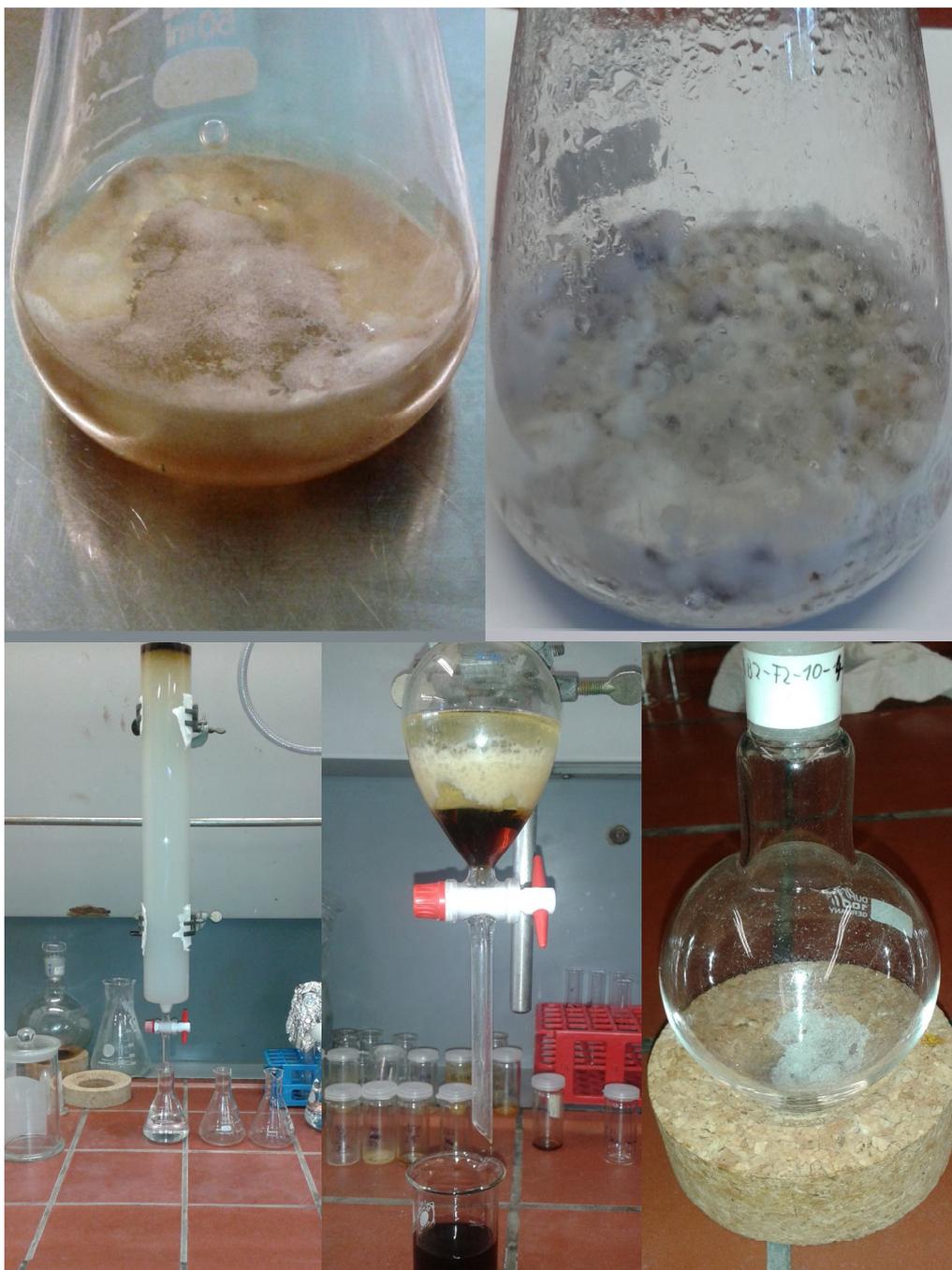


Abbildung 4.2.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm T26B (*Purpureocillium lilacinum*): Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (oben links), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (oben rechts), Initiale Säulenchromatographie (unten links) DCM-H₂O Flüssig-Flüssig-Extraktion (unten), nach RP-HPLC isolierte Verbindung T26B2-203a (unten rechts) (eigene Darstellung).

4.2.1. Stammidentifizierung und Auswahl

Die Kultur T26B, isoliert als Endophyt aus *Rauvolfia macrophylla*, und die Ergebnisse der antiparasitären Tests wurde von Prof. Bruno Lenta (Universität Yaoundé I, Kamerun) zur Verfügung gestellt. Während der Kultivierung waren vor allem die makroskopisch beobachtbare rosa-lila Färbung des Oberflächenmycels auffällig (Abbildung 4.2.1. oben links). Die ITS-Amplifizierung (Zugangsnummer NCBI: LR584023) aus genomischer DNA und der Sequenzabgleich lieferte sehr gute Sequenzübereinstimmungen (99.5%) zu vielen *Purpureocillium lilacinum* (syn.: *Paecilomyces lilacinus*, *Penicillium lilacinus*) Stämmen. Die phylogenetische Analyse der nrITS-DNA bestätigte die Zuordnung als *Purpureocillium lilacinum*-Art durch entsprechende Clusterung und geringer evolutionärer Distanz in Maximum Likelihood-Analysen (Abbildung 4.2.2.).

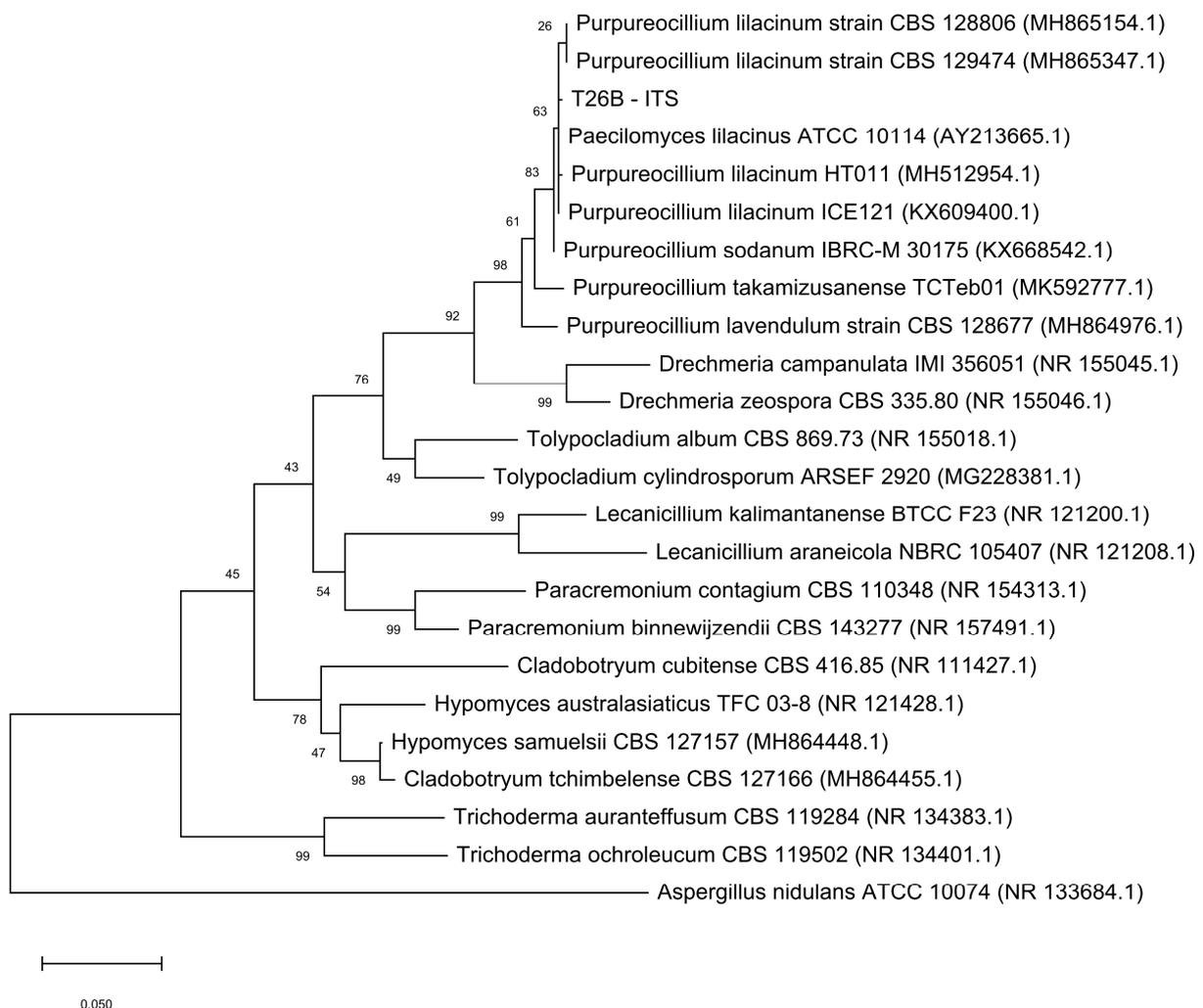


Abbildung 4.2.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit ITS-Sequenz des Stammes T26B und Vergleichsreferenzen aus der Ordnung Hypocreales mit 1000 Bootstrap Replikationen und *Aspergillus nidulans* als Outgroup (eigene Darstellung).

Die Amplifikation des ITS-Bereichs aus genomischer DNA und damit die Spezieszuordnung war zu Beginn der mykochemischen Untersuchung zunächst nicht erfolgreich. Demnach war die Auswahl anhand phylogenetischer Gesichtspunkt und eine Literaturrecherche zu bereits bestehenden Naturstoffstudien zu anderen *P. lilacinum* Stämmen nicht möglich. Das Rohextrakt zeigte allerdings antiparasitäre Aktivität mit bemerkenswerter Wirkung gegen *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* und *Plasmodium falciparum* (Tabelle 4.2.1.).

Tabelle 4.2.1.: Antiparasitäre und zytotoxische Ergebnisse des T26B2-Rohextrakts.

	<i>T. brucei</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>L. donovani</i>	<i>P. falciparum</i>	L6	KB3-1
Probenbezeichnung	IC ₅₀ [µg/ml]					
T26B Rohextrakt	< 0.002	1.18	0.077	0.086	2.92	> 800
Melarsoprol (Referenz)	0.003	-	-	-	-	-
Benznidazol (Referenz)	-	0.541	-	-	-	-
Miltefosin (Referenz)	-	-	0.057	-	-	-
Chloroquin (Referenz)	-	-	-	0.002	-	-
Podophyllotoxin (Referenz)	-	-	-	-	0.007	-
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	-	7
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	-	8.7 x 10 ⁶

Die IC₅₀-Werte sind im Falle der *Trypanosoma* und *Leishmania*-Parasiten ähnlich potent wie die in der Behandlung eingesetzten Referenzwirkstoffe. Gleichzeitig offenbarte sich in den Testreihen gegen L6 (Myoblast, *Rattus norvegicus*) und KB 3-1 (Cervixkarzinom, *Homo sapiens*) Zelllinien nur vergleichsweise geringe Zytotoxizität, was auf das mögliche Vorhandensein von selektiv wirksamen, antiparasitären Verbindungen im Extrakt hinwies. Die Evaluation der Inhaltstoffe und der zu bestimmenden aktiven Komponenten sollten Hinweise liefern inwiefern Extrakte aus Pilzstamm T26B einfache Formulierungen zur Applikation in Ländern mit hohen Inzidenzen an *Trypanosoma*-Infektionen ergeben könnten. Die „traditionelle Medizin“ mit simplen Formulierungen in Form von Extrakten und getrockneten Medizinalpflanzen bzw. -pilzen stellt für viele Menschen in diesen Ländern zudem meist den einzigen Zugang medikamentöser Behandlung und medizinischer Versorgung dar (Bussmann 2013).

4.2.2. Extraktbearbeitung

Die T26B-Rohextrakte (T26BI und T26B2) wurden in zwei getrennten mykochemischen Untersuchungen aufgearbeitet. Das erste Extrakt (T26BI, m = 4.71 g) wurde von Prof. Bruno Lenta (Universität Yaoundé I, Kamerun) nach Soldi-State-Fermentation (SSF) auf Reis zur Verfügung gestellt. Das zweite Extrakt (T26B2, m = 19.0 g) wurde aus zwei aufeinanderfolgenden Kultivierungsrunden (t = 57 d bzw. t = 63 d) ebenfalls durch SSF auf Reissubstrat (m_{Gesamt} = 1.25 kg) erhalten. Das Behandlungs- und Aufreinigungsschema der beiden Extrakte ist mit Abbildung 4.2.3. gegeben.

Extrakt eins (T26BI) wurde direkt einer Gradienten-Säulenchromatographie (Säule: m_{Silica} ~ 200 g, Ø = 3 cm, h = 30 cm, PE/EtOAc) als initialem Trennschritt unterzogen. Die abschließende Elution der auf dem Kieselgel verbliebenen Verbindungen erfolgte durch Spülen mit Methanol bzw. Methanol/Wasser/Essigsäure (75/20/5, % v/v/v). Diese Behandlung lieferte elf über DC eingeteilte Hauptfraktionen (T26BI-F1 bis T26BI-F11). Weitere Behandlung von Fraktion F2 (T26BI-F2) durch Säulenchromatographie, Größenausschlusschromatographie (SEC) und abschließendem Umkristallisieren lieferte Palmitinsäure bzw. Hexadecansäure (T26BI-14, m = 46.4 mg). Aus Fraktion F4 (T26BI-F4, m = 48.0 mg) konnte nach weiterer Aufreinigung (LC, SEC) Ergosterolperoxid (T26BI-20, m = 14.1 mg) erhalten werden. Die neunte Fraktion (T26BI-F9, m = 250 mg), welche als scharfe, grün-bräunliche Bande nach dem Spülen (75/20/5, % v/v/v, MeOH/H₂O/AcOH) eluierte, lieferte nach präparativer RP-HPLC Leucinostatin A (T26BI-108, m = 8 mg), Leucinostatin B (T26BI-107, m = 7.3 mg), Leucinostatin A2 (T26BI-110, m = 9.1 mg), Leucinostatin B2 (T26BI-106, m = 9.5 mg) und ein putatives, bisher unbeschriebenes Leucinostatin (T26BI-109, m = 4.2 mg).

Beim zweiten Extrakt (T26B2) erfolgte eine Vorbehandlung durch eine zweistufige Flüssig-Flüssig-Extraktion in der drei Subfraktionen (T26B2-F1 bis T26B2-F3) erhalten wurden. Die H₂O-Fraktion enthielt hauptsächlich polare Komponenten (T26B2-F1, m = 1.38 g), die EtOAc- bzw. MeOH-Fraktion semipolare Verbindungen (T26B2-F2, m = 4.52 g) und die n-Hexan-Fraktion hauptsächlich unpolare Moleküle (T26B2-F3, m = 12.6 g). Die Fraktion mit den überwiegend intermediär polaren Komponenten (T26B2-F2, m = 4.52 g) wurde ebenfalls der Auftrennung durch eine Gradienten-Säulenchromatographie (Säule: m_{Silica} ~ 450 g, Ø = 5 cm, h = 36 cm, PE/EtOAc) und abschließendem Spülen (90/9/1, % v/v/v, MeOH/H₂O/AcOH) als initialem Trennschritt unterworfen. Diese Behandlung resultierte in 17 per DC unterscheidbaren Hauptfraktionen (T26B2-F2-1 bis T26B2-F2-17). Die Hauptfraktion 10 (m = 127 mg), 11 (m = 159 mg) und 15 (m = 344 mg) wurden weiter mittels präparativer RP-HPLC aufgearbeitet und ergaben die Verbindungen Alternariol (T26B2-203, m = 15.7 mg), 1-Linolyglycerol (T26B2-211, m = 27.3 mg) und ein bisher nicht beschriebenes Butenolid "Lilacinolid A" (T26B2-205, m = 7.3 mg). LC-MS-Analysen ergaben, dass die Hauptfraktion 17 die gesuchten Leucinostatine enthielt. Wegen der geringen Löslichkeit und der Gesamtmenge

von Hauptfraktion 17 (T26B2-F2-17, m = 2.22 g), bei der aber nur geringe Konzentrationen bzw. isolierbare Mengen von Leucinostatinen in einem präparativen RP-HPLC-Testlauf festgestellt worden war, wurde diese zuvor extrahiert (1 g Fraktion/10 ml MeOH) und filtriert. Dies ermöglichte die Entfernung von zuvor in der Säulenchromatographie eluiertem Kieselgel und reduzierte die zu trennende Menge. Mehrere Läufe der präparativen RP-HPLC resultierten in der Isolierung einer Leucinostatin-haltigen Fraktion (T26B2-F2-17-20). Die Trennung der einzelnen Leucinostatine erforderte zudem einen weiteren RP-HPLC-Trennlauf. Des Weiteren wurden diese Fraktionen aufgrund von vorhandenen Verunreinigungen weiteren Trennschritten (SEC, RP-HPLC) ausgesetzt. Dies wirkte sich allerdings negativ auf die isolierten Mengen aus, sodass vom gewünschten putativ neuen Leucinostatin T26BI-109 am Ende nur ungenügende Mengen ($m < 0.5$ mg) für weitere Analysen (NMR) erhalten wurden. Weitere Haupt- und Unterfraktionen, wie beispielsweise T26B2-F2-8 ($m = 37$ mg) und T26B2-F2-9 ($m = 68.8$ mg), wurden bearbeitet aber ergaben keine charakterisierbaren Verbindungen oder wurden durch zu geringe Mengen in der weiteren Trennung bzw. Analyse limitiert.

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.2. T26B (Purpureocillium lilacinum) -

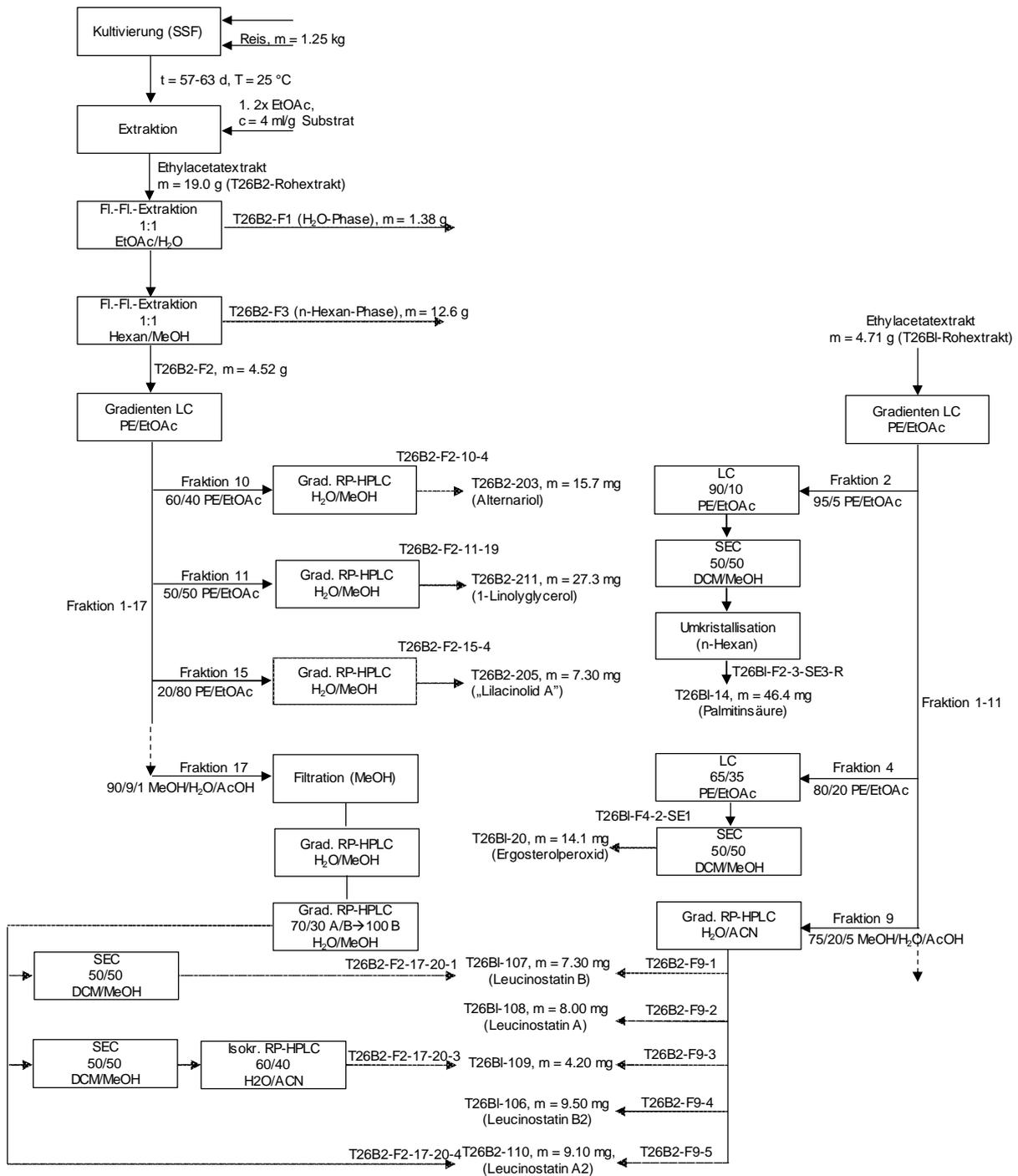


Abbildung 4.2.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm T26B (eigene Darstellung).

4.2.3. Isolierte und charakterisierte Verbindungen aus Stamm T26B

4.2.3.1. Leucinostatine

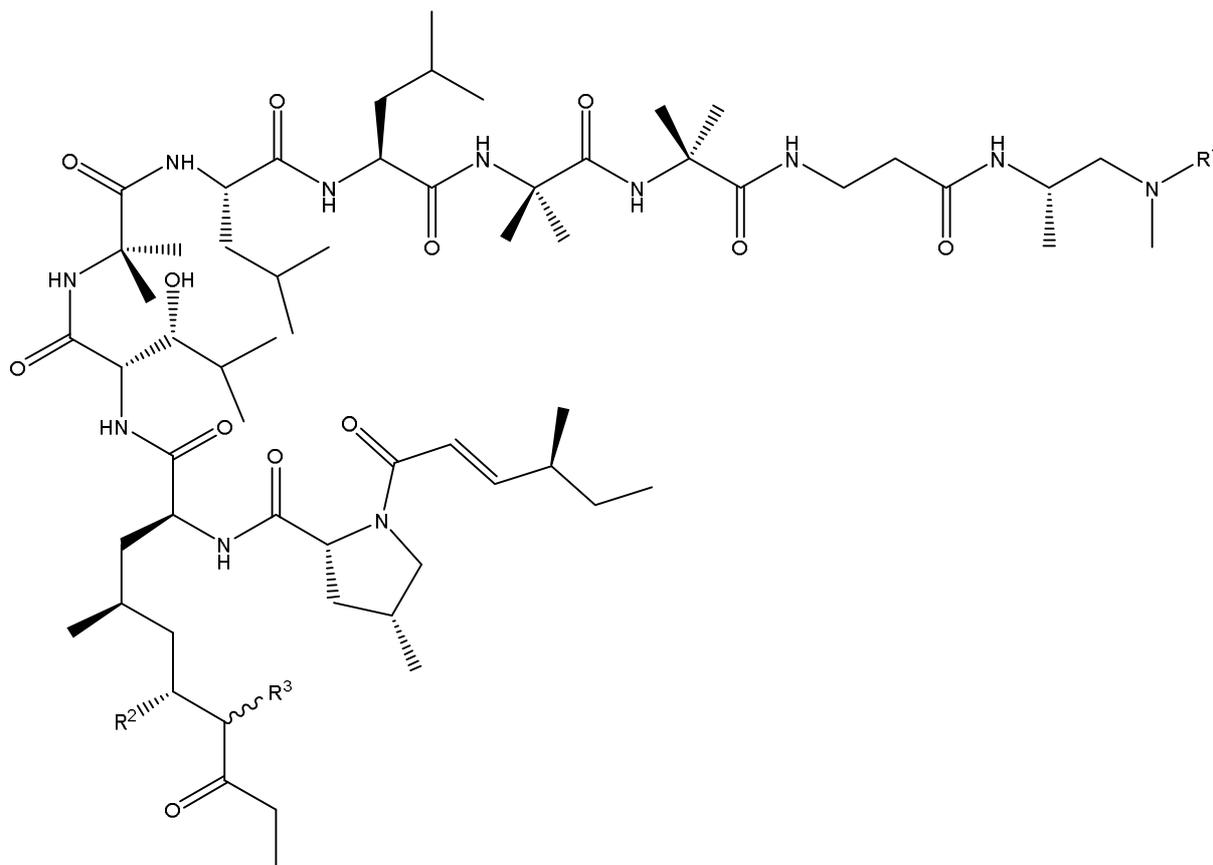


Abbildung 4.2.4.: Struktur von Verbindung T26BI-106 (Leucinostatin B2, $R^1 = H$, $R^2 = -$, $R^3 = -$), T26BI-107 (Leucinostatin B, $R^1 = H$, $R^2 = OH$, $R^3 = H$), T26BI-108 (Leucinostatin A, $R^1 = CH_3$, $R^2 = OH$, $R^3 = H$), T26BI-110 (Leucinostatin A2, $R^1 = CH_3$, $R^2 = -$, $R^3 = -$) (eigene Darstellung).

Die Verbindungen T26BI-106 ($m = 9.5$ mg), T26BI-107 ($m = 7.3$ mg), T26BI-108 ($m = 8.0$ mg), T26BI-109 ($m = 4.2$ mg) und T26BI-110 ($m = 9.1$ mg) wurden als farblose Feststoffe aus Fraktion F9 ($m = 250$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 63.0$ min (T26BI-107), $t_R = 65.0$ min (T26BI-108), $t_R = 66.2$ min (T26BI-109), $t_R = 67.7$ min (T26BI-106), $t_R = 69.5$ min (T26BI-110), Standardmethode 1, Eluent A/B, $V = 10$ ml/min) isoliert. Aufgrund geringer Mengen und der daraus resultierenden geringen Signalintensität in den NMR-Spektren war eine Identifizierung der Verbindung mittels NMR zunächst nicht möglich. Allerdings lieferten Untersuchungen mittels hochauflösender Massenspektrometrie die Pseudomolekularionen bei positiver Ionisierung (Tabelle 4.2.2.).

Tabelle 4.2.2.: Massenspektrometrische Daten der isolierten Leucinostatine.

Verbindungscode	m/z	Addukt	Elementarzusammensetzung	m/z kalkuliert, Δm [ppm]	Identität
T26BI-106	1186.81704	[M+H] ⁺	C ₆₁ H ₁₀₇ N ₁₁ O ₁₂ H ⁺	1186.817344, 0.26	Leucinostatin B2
T26BI-107	1204.82772	[M+H] ⁺	C ₆₁ H ₁₀₉ N ₁₁ O ₁₃ H ⁺	1204.827909, 0.16	Leucinostatin B
T26BI-108	1218.84329	[M+H] ⁺	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₃ H ⁺	1218.843559, 0.22	Leucinostatin A
T26BI-109	1216.82776	[M+H] ⁺	C ₆₂ H ₁₀₉ N ₁₁ O ₁₃ H ⁺	1216.827909, 0.12	Leucinostatin (putativ)
T26BI-110	1200.83271	[M+H] ⁺	C ₆₂ H ₁₀₉ N ₁₁ O ₁₂ H ⁺	1200.832994, 0.24	Leucinostatin A2

Eine Abfrage der erhaltenen Massen in spezialisierten Naturstoffdatenbanken zeigte die Leucinostatine als in Frage kommende Stoffklasse mit sehr guter Übereinstimmung ($\Delta m < 0.3$ ppm) beim Abgleich der gemessenen und kalkulierten Massen der jeweiligen Elementarzusammensetzung. Trotz der geringen Signalintensität in den NMR-Spektren konnten für Leucinostatine charakteristische chemische Verschiebungen beobachtet werden. Dazu zählten zum Beispiel die Verschiebungen im ¹³C-NMR für die Ketogruppe in der Octylseitenkette (δC [ppm] = 210.1 (Leucinostatin A,B), 200.0 (Leucinostatin A2/B2)) und die zehn Carbonyl-Verschiebungen der Amidfunktionen (δC [ppm] = 165-175), sowie zwei Signale für sp²-hybridisierte C-Atome, die der Doppelbindung am N-Terminus zugeordnet werden konnten (δC [ppm] = 151.1, 120.3). Des Weiteren ließen sich die im ¹H-NMR erwartbaren Kopplungsmuster für die Amidprotonen der Leucinostatine detektieren. Demnach waren beispielsweise die drei Singulets der α -Aminoisobuttersäure- und das Triplet der β -Alanin-Gruppe beobachtbar. Zudem war die Übereinstimmung des ¹³C-NMR-Profiles von Leucinostatin A, welches von Strobel *et al.* (1997) publiziert wurde, offensichtlich, auch wenn die Carbonylgruppen-Zuordnung in dieser Quelle abweicht bzw. inkorrekt ist. Die geringen isolierten Mengen und daraus resultierenden geringen Signalintensitäten, zusätzliche Signalaufspaltung durch Konformere und Signalüberlagerung der Seitenkettenprotonen (C _{β} -Protonen, Methylgruppen, etc.) erlaubten allerdings keine vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen.

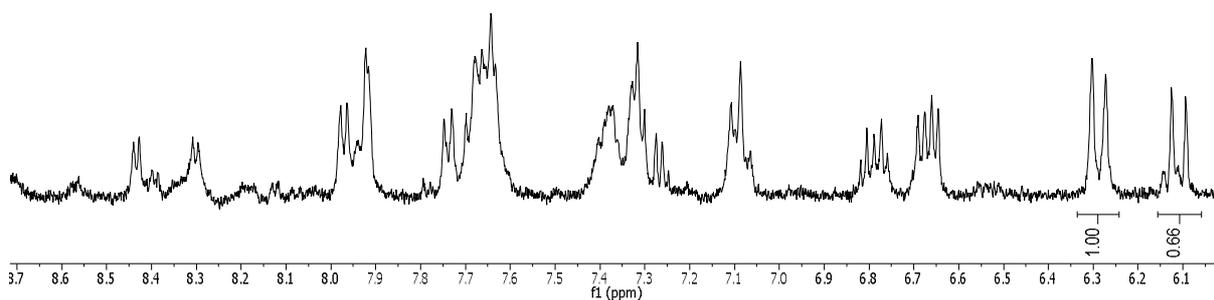
Leucinostatine wurden bisher hauptsächlich nur in *Paecilomyces lilacinus*-Stämmen (Syn.: *Purpureocillium lilacinum*) (Isogai *et al.* 1980, Mori *et al.* 1982), in einigen Studien in *Paecilomyces marquandii* (Syn.: *Metarhizium marquandii*) (z.B. Rossi *et al.* 1983, Crebelli *et al.* 1988) und einzeln in einer endophytischen *Acremonium* sp. (Strobel *et al.* 1997) nachgewiesen (Ricci *et al.* 2000). Dieses enge taxonomische Spektrum an Produktionsorganismen und die Identifizierung des Stammes T26B als *P. lilacinum* war ein zusätzliches Indiz für die Leucinostatin-Identität der isolierten Verbindungen. Teilweise werden diese aufgrund ihrer antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften zu den Mykotoxinen gezählt (Mikami *et al.* 1984, Mikami *et al.* 1989). Diese generelle Einteilung wird allerdings von anderen Autoren in Frage gestellt (Rossi *et al.* 1993).

Leucinostatine bzw. Paecilotoxine sind nicht ribosomal gebildete (Nona) Peptide (NRP) mit ungewöhnlichen Strukturelementen. Der C-Terminus ist im Falle von Leucinostatin A (Syn.: Leucinostatin I, Paecilotoxin, Antibiotic P168, Antibiotic 1907-II) mit

N,N-Dimethylpropan-1,2-diamin (DPD) modifiziert. Der N-Terminus ist hingegen mit (4*S*,2*E*)-4-Methylhex-2-enyl (MeHA) derivatisiert. Neben der proteinogenen Aminosäure L-Leucin (L-Leu) sind ebenfalls die nichtkanonischen Aminosäuren α -Aminoisobuttersäure (AiB), 2-Amino-2-methylpropansäure ((α -Me)Ala), β -L-Alanin (β -Ala), β -Hydroxy-L-leucin (HyLeu) und (4*R*)-4-Methyl-L-prolin (MePro), sowie die einzigartige Aminosäure (2*S*,4*S*)-2-Amino-6-hydroxy-4-methyl-8-oxodecansäure (AHMOD) vorhanden (Mori *et al.* 1982, Isogai *et al.* 1984, Isogai *et al.* 1992).

Einige Leucinostatine (z.B. Leucinostaine A2 und B2) sind bisher ausschließlich als gering abundante Verbindungen per MS-Untersuchungen identifiziert worden (Isogai *et al.* 1992). Ein weiteres, bisher nicht beschriebenes Leucinostatin, ließ sich mit der Verbindung T26BI-109 und dessen gemessener monoisotopischer Masse (Tabelle 4.2.2.) postulieren. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte die vier Signale für die olefinischen Protonen, welche für Leucinostatin A2 und B2 vorhanden waren. Weiterhin war ein ähnliches Signalmuster im Bereich der Amidprotonen präsent, was die Identität als Leucinostatin bekräftigte (Abbildung 4.2.5.).

OC3_GohlkeSe_0928_SG-T26BI.109.1.fid
Se. Gohlke, OC3, SG-T26BI.109



OC3_GohlkeSe_0924_SG-T26BI-106.1.fid
Se. Gohlke, OC3, SG-T26BI-106

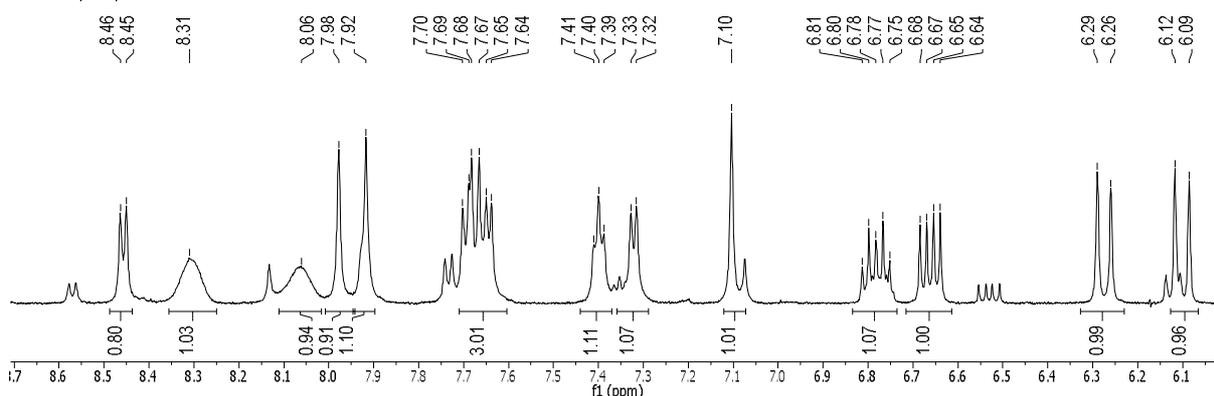


Abbildung 4.2.5.: Vergleich des $^1\text{H-NMR}$ von T26BI-109 (oben, putatives neues Leucinostatin) und T26BI-106 (unten, Leucinostatin B2) im Bereich der amidischen und olefinischen Protonen

Weitergehende Aussagen zur Unterscheidung bezüglich bekannter Derivate ließ sich aufgrund der geringen isolierten Menge und der schlechten NMR-Spektrenqualität nicht vornehmen. Die Probe enthielt zudem, feststellbar durch Begleit-Peaks in der LC-MS-Analytik,

die Leucinostatine A und B2, welche die benachbarten Substanz-Peaks während der präparativen Aufreinigung waren (Abbildung 4.2.6.). Die Reihenfolge der Peaks bei der Auftrennung über RP-HPLC entspricht den Literaturbeobachtungen bei Isogai *et al.* (1992).

Präparative RP-HPLC T26BI-F9

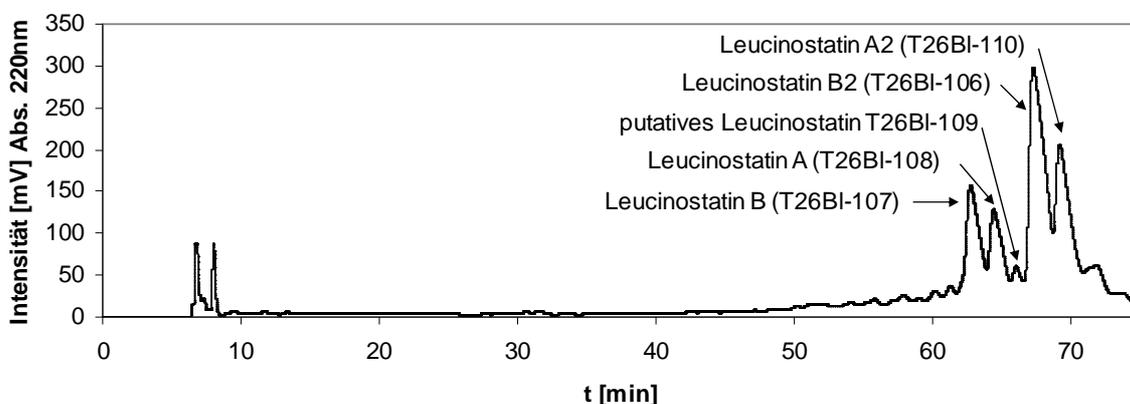


Abbildung 4.2.6.: Chromatographisches Profil der Leucinostatinfraktion (eigene Darstellung).

Eine erneute Kultivierung im größeren Maßstab unter Erweiterung der Kultivierungszeit, welche die Idiophase bzw. die stationäre Wachstumsphase verlängern sollte, wurde durchgeführt (Abbildung 4.4.3.). Ziel war es demnach die Menge der produzierten Leucinostatine zu erhöhen, um eine ausreichende Menge für weitere Analysen isolieren zu können. Die mykochemische Untersuchung des neuen Extraktes, bezogen auf die Isolierung von Leucinostatinderivaten, war allerdings nicht erfolgreich. Das gesuchte Leucinostatin mit der Ionenadduktmasse $m/z = 1216.8 [M+H]^+$ konnte nach der Aufreinigung und Fraktionierung wieder nur mit sehr geringen Mengen ($m < 0.5 \text{ mg}$) isoliert werden. Weiterhin wurden die Leucinostatine B2 und B als Hauptprodukte der Substanzklasse nachgewiesen, jedoch nicht Leucinostatin A. Spekulativ bleibt, ob bereits durch die veränderten Kultivierungsbedingungen geringere Mengen an Leucinostatine produziert wurden oder die abgewandelte Aufreinigungsstrategie, wie zum Beispiel die Flüssig-Flüssig-Extraktion als Vorbehandlung und die nötigen zusätzlichen Trennschritte, nicht zielführend waren. Eine weitere Erklärung für das veränderte Metabolitenprofil und die Metabolitenmenge könnte in einer Veränderung oder Beschädigung des Stammes während der Kryostammhaltung liegen. Bei der zweiten Kultivierung war bemerkt worden, dass die Besiedlung des Substrates in geringerer Geschwindigkeit erfolgte und die makromorphologische Beobachtung der intensiven schwarzen Pigmentierung aus der ersten Kultivierung nicht mehr vorhanden war. Stattdessen war die für die Spezies charakteristische rosa-lila Färbung des Oberflächenmycels offensichtlich. Eine weitere Charakterisierung des postulierten neuen Leucinostatins mit der Nominalmasse von 1215 Dalton, sowie die angestrebte, bisher nicht literaturbekannte vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebung von Leucinostatin A und B blieb demnach erfolglos.

4.2.3.2. Leucinostatinderivate und deren Produktionsorganismen

Leucinostatine wurde bisher, wie bereits im vorherigen Kapitel (Kapitel 4.4.3.2.) ausgeführt, nur in den drei Pilzarten *Purpureocillium lilacinum* (ursprünglich: *Paecilomyces lilacinus*, Isogai *et al.* 1980, Mori *et al.* 1982 bzw. *Penicillium lilacinus*, Arai *et al.* 1973), *Metarhizium marquandii* (ursprünglich: *Paecilomyces marquandii*, Rossi *et al.* 1983) und in einer endophytischen *Acremonium*-Art (Strobel *et al.* 1997) nachgewiesen. Es ergibt sich demnach ein enges taxonomisches Verteilungsspektrum im Vergleich zu anderen komplexen Naturstoffen, wie beispielsweise den Cytochalasinen. In mykochemischen Studien wurden in der Regel Leucinostatin A, welches als erstes von Arai *et al.* (1973) beschrieben wurde, sowie Leucinostatin B, welches ursprünglich zusammen mit Leucinostatin A isoliert und für dieselbe Verbindung gehalten wurde (Mori *et al.* 1983, Fukushima *et al.* 1983a, Fukushima *et al.* 1983b), als Hauptprodukte isoliert. Die Strukturaufklärung erfolgte einige Jahre später in kurzen Abständen, unabhängig in vier verschiedenen Arbeitsgruppen, jeweils aus unterschiedlichen *P. lilacinus* Stämmen (Sato *et al.* 1980, Isogai *et al.* 1980 Mori *et al.* 1982) bzw. *P. marquandii* (Rossi *et al.* 1983). Weiterhin wurden einige weniger abundante Leucinostatin Derivate (Leucinostatin C-H, K) aus *P. marquandii* isoliert und biologischen Tests unterzogen (Crebelli *et al.* 1988). Aus einer endophytischen *Acremonium* sp. wurde zudem ein diglykosyliertes Leucinostatin A nachgewiesen (Strobel & Hess 1997). Nachfolgend beschriebene, gering abundante Derivate (Leucinostatin A2, B2, L-X) wurden nur über MS/MS basierte Verfahren detektiert und strukturell bestimmt (Isogai *et al.* 1992, Martinez & Moraes 2015). Demnach sind bisher etwa 33 natürliche Leucinostatinderivate beschrieben. Diese Derivate unterscheiden sich in der Regel nur in geringem Maße durch die vorhandene bzw. nicht vorhandene Methylierung des Prolins und des N-Terminus, sowie in stärkerem Maße an der zweiten Aminosäure durch die Länge der aliphatischen Kette und deren Sauerstofffunktionalisierung. Die Konstitution ist bei einigen Derivaten zudem nicht abschließend geklärt (Martinez & Moraes 2015). Die zuvor als einzigartiges Strukturelement angesehene Aminosäure AHMOD (Isogai *et al.* 1992) wurde später auch in anderen Pepti antibiotika bzw. Lipoaminopeptiden, wie Helioferinen, Roseoferinen und Acremostatinen belegt (Degenkolben *et al.* 2003). Obwohl Syntheserouten für die Totalsynthese, beispielsweise von Leucinostatin D (Kuwata *et al.* 1992) und Leucinostatin A (Abe *et al.* 2017), bekannt sind, sind Leucinostatin A und Mischungen aus und Leucinostatin A und B die einzigen Derivate, die kommerziell vertrieben werden. Diese sind jedoch nur als Kulturisolate bzw. Fermentationsprodukte erhältlich.

4.2.3.3. Biologische Aktivität der Leucinostatine

Leucinostatine können zur Strukturklasse der Peptiobiotika, Lipoaminopeptide, bzw. Peptaiboltyp-Peptide gezählt werden. Dies sind amphiphile Penta- bis Eikosapeptide, die überwiegend Aminosäuren mit unpolaren Seitenketten enthalten und einen hohen Anteil der Aminosäure α -Aminoisobuttersäure (Aib), weitere ungewöhnliche Aminosäuren, sowie modifizierte N-, C-Termini aufweisen (Degenkolben *et al.* 2003, Walton *et al.* 2004, Zeilinger 2015). Das meist studierte Peptaibol ist Alamethecin aus *Trichoderma viride* (Zeilinger 2015). Die biologische Aktivität von Peptaibolen liegt unter anderem in der Fähigkeit Kanäle bzw. Poren in biologische Membranen zu implementieren. Leucinostatin A wurde ebenfalls als Ionophor bzw. als Porenbildner beschrieben (Csermely *et al.* 1994), welches zur Selbst-Aggregation (molecular self-assembly) in Phospholipiddoppelschichten neigt (Fresta *et al.* 2000). Andere Mechanismen beinhalten die Inhibierung der mitochondrialen ATP-Synthese und verschiedener Phosphorylierungspfade (Csermely *et al.* 1994, Park *et al.* 2004). Demnach sind Leucinostatine für ihre breite antibiotische Wirkung gegen Bakterien (z.B. MIC: ~ 5 $\mu\text{g/ml}$, *Bacillus subtilis*), insbesondere gegen gram-positive Bakterien und Pilze (z.B. MIC: ~ 5-10 $\mu\text{g/ml}$, *Candida albicans*, MIC: 0.5-1 $\mu\text{g/ml}$, *Cryptococcus neoformans*) (Arai *et al.* 1973, Sato *et al.* 1980, Rossi *et al.* 1983, Fukushima *et al.* 1983a), sowie sehr potente Wirkung gegen verschiedene Tumorzelllinien (z.B. $\text{IC}_{50} = 2.3 \text{ nM}$, BT-20 Brustkrebszelllinie, Strobel *et al.* 1997) bekannt. Erstaunlicherweise wurde ebenfalls für Leucinostatin A eine spezifische antivirale Aktivität durch Blockade der Zelloberflächenexpression von viralen Glycoproteinen beim "Newcastle Disease"-Virus (Moroi *et al.* 1996) und die Störung der Tumor-Stroma-Zellinteraktion belegt (Kawada *et al.* 2010). Letzteres wird als interessantes Target in der Krebstherapie gesehen (Abe *et al.* 2018). Des Weiteren sind phytotoxische (Rossi *et al.* 1983) und die *in vitro* und *in vivo* bestimmte antiparasitäre Aktivität gegen *Plasmodium* (Otoguro *et al.* 2003) und *Trypanosoma*-Stämme (Ishiyama *et al.* 2009) im niedrigen, nanomolaren Bereich beschrieben. Die Literaturergebnisse spiegeln die Wirkung gegen einen Chloroquin-resistenten *Plasmodium falciparum* Stamm (PfINDO) in eigenen, extern durchgeführten Messreihen (Lenta 2016 pers. Kommunikation) wieder (Tabelle 4.2.3.).

Tabelle 4.2.3.: Antiplasmodiale und zytotoxische Aktivität der isolierten Leucinostatine aus Stamm T26B.

Probenbezeichnung	PfINDO	HEK239T	
	IC_{50} [nM]	CC_{50} [μM]	SI ($\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$) [-]
T26BI-106	17	> 674	> 400
T26BI-107 + T26BI-108	16	> 656	> 400
T26BI-109	33	> 658	> 200
T26BI-110	25	> 666	> 267

Ein Vergleich der zytotoxischen Wirkung gegen menschliche Embryonierenzellen (HEK - Human Embryonic Kidney) zeigte deutliche höhere halbmaximale inhibitorische Werte als gegenüber *P. falciparum*, was zu einer guten Selektivität führte. Die Leucinostatine zeigten sich bei der Behandlung von Malariainfektionen auch gegen Plasmodiumstämme wirksam, welche gegen den Standardwirkstoff Chloroquin resistent sind. Sie sind damit vermutlich die Extraktkomponenten, welche für die antitrypanosomale und antiplasmodiale Aktivität des Rohextraktes verantwortlich waren.

Zusätzlich zu den bereits erläuterten umfassenden biologischen Beeinflussungen verschiedenster Organismengruppen wurden ebenfalls nematizidale Effekte beschrieben (Park *et al.* 2004), sodass der Einsatz von *P. lilacinum* als Biokontrollstamm gegen Nematoden und Phytopathogene patentiert und kommerzialisiert ist (Wang *et al.* 2016). Interessanterweise wurde von Park *et al.* (2004) gezeigt, dass die nematizidale Aktivität mit der Produktion der Leucinostatine in *P. lilacinus* Stämmen korreliert. Für einen anderen Biokontrollstamm (*P. lilacinus* P251) hingegen wurden keine detektierbaren Paecilotoxin- bzw. Leucinostatinkonzentrationen gemessen (Khan *et al.* 2003).

Um die zwar teilweise vorhandene Selektivität der Leucinostatine gegenüber verschiedenen pathogenen Mikroorganismen und Tumorzelllinien (Strobel *et al.* 1997) aber der dennoch nicht zu vernachlässigenden unspezifischen toxischen Wirkung der Leucinostatine Rechnung zu tragen, wurden unterschiedliche Formulierungskonzepte vorgeschlagen. Die akute Toxizität der Leucinostatine (z.B. LD₅₀ = 0.8 mg/kg (i.V.), LD₅₀ = 5.4 mg/kg (oral) für Leucino-
statin A) ist relativ hoch, was ihre Anwendung limitiert (Fukushima *et al.* 1983a, Ricci *et al.* 2000). Konzepte zur direkten Adressierung in Form von Antikörperkonjugaten (Dosio *et al.* 1994) und verbesserten Formulierungen über Liposome (Ricci *et al.* 2000) und Nanopartikel (Ricci *et al.* 2002, Ricci *et al.* 2004) zur Reduzierung der akuten Toxizität und Verbesserung der pharmakologischen Eigenschaften sind bekannt. Weiterhin wurde keine relevante Genotoxizität festgestellt (Crebelli *et al.* 1988).

In Anbetracht der breiten antibiotischen Aktivität liegt die biologische Funktion und der generierte Vorteil für den Endophyten Stamm T26B und dessen Wirtspflanze sicherlich in der Schwächung konkurrierender bzw. pathogener Organismen. Vor dem Hintergrund der Endophyt-Pflanzen-Wechselwirkung und der ebenfalls generellen phyto- und mykotoxischen Effekte der Leucinostatine ist die Isolierung eines diglykosylierten Leucino-
statin A mit verringerter biologischer Aktivität (Strobel & Hess 1997) bemerkenswert. Es lässt sich vermuten, dass die Glykosylierung ein Mechanismus ist, der Endophyt und Wirt vor den negativen Effekten der eigenen Metaboliten schützt und resistenzbildend wirkt.

4.2.3.4. Alternariol (T26B2-203a)

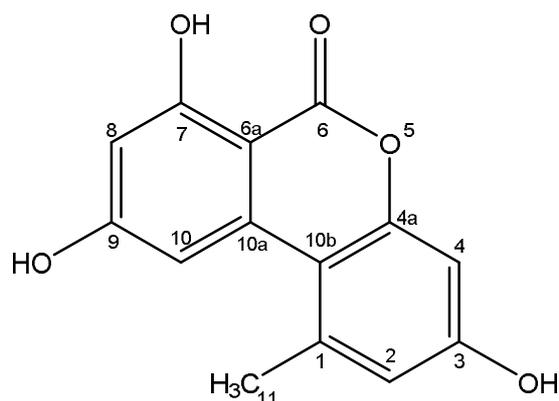


Abbildung 4.2.7.: Struktur von Verbindung T26B2-203a (eigene Darstellung).

Die Verbindung T26B2-203 wurde als farbloser Feststoff ($m = 15.7$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 83.0$ min, Standardmethode 1, Eluent C/D, $V = 2$ ml/min) aus Fraktion 10 ($m = 127$ mg) gewonnen.

Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte insgesamt acht klar getrennte Signalgruppen. Drei davon ($\delta\text{H [ppm]} = 11.77$ (s, 1H, 7-OH), 10.89 (s, 1H, 9-OH), 10.32 (s, 1H, 3-OH)) waren stark ins Tieffeld verschoben und zeigten darüber hinaus keine Resonanzen im HMQC-Spektrum. Demzufolge waren diese Protonen über Heteroatome gebunden und ließen sich als Hydroxylprotonen identifizieren. Des Weiteren waren vier weitere Protonen ($\delta\text{H [ppm]} = 7.24$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-10), 6.72 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-2), 6.64 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, H-4), 6.37 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-8)) im aromatischen Verschiebungsbereich jeweils als Dublett aufgespalten. Die Kopplungskonstanten wiesen dabei auf jeweils zwei Protonen in *meta*-Stellung hin. Das letzte $^1\text{H-NMR}$ Signal ließ sich einer Methylgruppe ($\delta\text{H [ppm]} = 2.70$ (s, 3H, H-11)) zuordnen, welche an ein olefinisches bzw. aromatisches System gebunden war.

Im $^{13}\text{C-NMR}$ waren insgesamt 14 Signale für Kohlenstoffatome ersichtlicht von denen, anhand ihrer chemischen Verschiebung, 13 sp^2 hybridisiert waren. Zusätzlich wiesen fünf Kohlenstoffe eine Verschiebung von >150 ppm auf, was, neben den bereits beschriebenen Alkoholgruppen ($\delta\text{C [ppm]} = 165.4$ (C-9), 164.1 (C-7), 158.4 (C-3)), zwei weitere Kohlenstoffatome mit Bindung zu Heteroatomen ($\delta\text{C [ppm]} = 164.7$ (C-6), 152.6 (C-4a)), erwarten ließ. Diese chemischen Verschiebungen in Verbindung mit der starken Tieffeldverschiebung des Hydroxylprotons bei 11.77 ppm ließen eine Carbonylgruppe als Ester bzw. Laktonfunktion in *peri*-Stellung zur Hydroxylfunktion vermuten (vgl. auch Melleinderivate TS7-202 (Kapitel 4.3.3.1.) und SG25-105 (Kapitel 4.6.3.1.)).

Die bisher vorgestellten Strukturelemente wiesen auf ein nicht lineares, annelliertes Dreiringssystem mit Heterocyclus als Grundstruktur hin. Die Überprüfung aller HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.2.8b.) ermöglichte die Etablierung eines Benzo[*c*]isocumarin- (Benzo[*c*]chromen-one), Dibenzo[*b,d*]pyranon- bzw. Phenanthrenderivates und die vollständige

Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.2.8a.). Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen (HR-ESI-MS: $m/z = 259.0576$, $[M+H]^+$, $m/z = 281.0389$ $[M+Na]^+$) konnte die Elementarzusammensetzung ($C_{14}H_{10}O_5$) des Strukturvorschlages bestätigt werden.

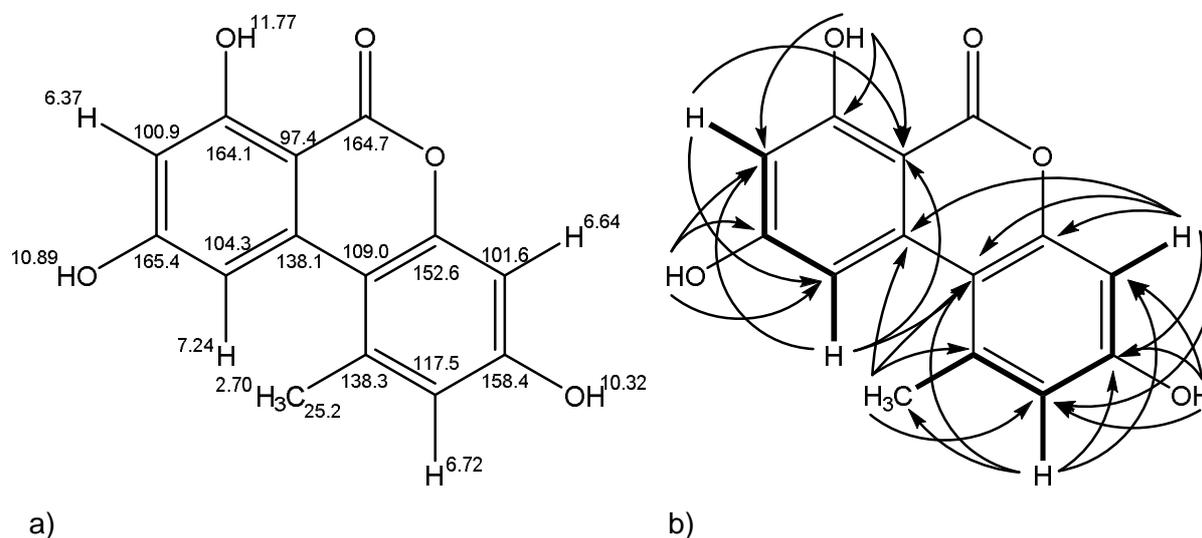


Abbildung 4.2.8.: a) Chemische Verschiebung von 1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von T26B2-203a in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).

Die Verbindung konnte als die literaturbekannte Verbindung Alternariol (3,7,9-Trihydroxy-1-methyl-6H-dibenzo[b,d]pyran-6-on) identifiziert werden. Alternariol ist ein bekanntes Mykotoxin und hauptsächlich mit der Nahrungsmittelkontamination durch *Alternaria*-Arten assoziiert. Unter den *Alternaria*-Toxinen gehört es zu den am besten studierten Mykotoxinen. Zudem wird die Prävalenz der Kontamination aufgrund der weiten Verbreitung der *Alternaria*-Arten auf agrikulturellen Produkten im Vergleich zu anderen Mykotoxinen als hoch eingeschätzt. (Brzonkalik 2005, Escrivá *et al.* 2017). Kürzlich konnte eine Alternariol produzierende Polyketidsynthase identifiziert werden (Saha *et al.* 2012). Der Metabolit weist im Gegensatz zu anderen verbreiteten Mykotoxinen (z.B. Aflatoxin $LD_{50} \sim 7.2$ mg/kg, Rattenmodell, Dhanasekaran *et al.* 2011) eine vergleichsweise geringe akute Toxizität auf ($LD_{50} > 400$ mg/kg, Mausmodell, Pero *et al.* 1973). Jedoch gilt Alternariol als mutagen und relativ zytotoxisch gegen verschiedene Testorganismen (z.B. *Bacillus mycoides*, Pero *et al.* 1973) und Zelllinien (Brzonkalik 2011, Escrivá *et al.* 2017). Interessanterweise zeigt sich Alternariol mit dem oft zusammen auftretenden Alternariolmonomethylether (9-OMe-Alternariol) als stark synergistisch im antibakteriellen Agardiffusions-Assay (Pero *et al.* 1973).

Neben der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Alternariolmetabolisierung mit direkter DNA-Schädigung wird die Genotoxizität hauptsächlich durch die Inhibierung der Topoisomerase, welche in Doppel- und Einzelstrangbrüchen resultiert, assoziiert (Solhaug *et al.* 2016). Die Zytotoxizität gegenüber Krebszelllinien wurde unter andern von Pero

und Mitarbeitern (1973) gegen HeLa- ($IC_{50} = 6 \mu\text{g/ml}$) und von Tan *et al.* (2008) gegen KB-Zelllinie ($IC_{50} = 3.7 \mu\text{g/ml}$) ermittelt. Aufgrund der bereits literaturbekannten Effekte und vielfältigen Bioassays wurde auf die Erhebung eigener zytotoxischer Kennzahlen verzichtet. Neben dem Nachweis von Alternariol in verschiedenen *Alternaria*-Arten (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. brassicae*, etc., Brzonkalik 2005) wurde diese Verbindung aus anderen bekannten Mykotoxin produzierenden Taxa, wie *Penicillium* sp. (Ali *et al.* 2017), *Trichoderma* sp. (Zhang *et al.* 2017), *Phomopsis* sp. (Chapla *et al.* 2014, Jouda *et al.* 2016) isoliert. Ebenfalls wurde die Verbindung auch in mykochemischen Untersuchungen weniger studierter Gattungen, wie beispielsweise *Rhizopycnis vagum* (Lai *et al.* 2016), *Peyronellaea glomerata* (Zhao *et al.* 2016) und *Pestalotiopsis uvicola* (Hou *et al.* 2018) festgestellt. Viele von diesen angeführten Beispielen wurden zudem als Endophyten isoliert. Nach bisherigen Recherchen ist dies die erste mykochemische Untersuchung, welche die Isolierung des Mykotoxins Alternariol aus der Gattung *Purpureocillium* im Allgemeinen und aus *P. lilacinum* im Speziellen nachweist.

4.2.3.5. Lilacinolid (T26B2-205)

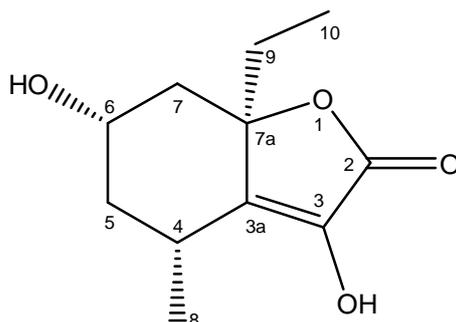


Abbildung 4.2.9.: Struktur von Verbindung T26B2-205 (eigene Darstellung).

Die Verbindung T26B2-205 wurde als weißer Feststoff ($m = 7.30$ mg) nach RP-HPLC ($t_R = 43.5$ min, Standardmethode 1, Eluent C/D, $V = 6$ ml/min) aus der Hauptfraktion 15 ($m = 344$ mg) isoliert.

Im $^1\text{H-NMR}$ ließen sich neun Signalgruppen beobachten. Darunter wurden zwei aliphatische Methylgruppen ($\delta^1\text{H}$ [ppm] = 1.34 (d, $J = 7.5$ Hz, 3H, H-8), 0.77 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H, H-10)) identifiziert (Tabelle 4.2.4.). Die Kopplungsmuster der anderen Signalgruppen und die COSY-Korrelationen zeigten zwei getrennte Spinsysteme. Eines davon ließ sich durch das Kopplungsmuster und dem Integralverhältnis als Ethylgruppe (H-9, H-10) interpretieren. Das HMQC-Experiment verdeutlichte zusätzlich das Vorhandensein von zwei weiteren diastereotopen Methylengruppen.

Tabelle 4.2.4.: Zuordnung der ^1H , ^{13}C und HMBC-Signale von T26B2 in MeOH- D_4 .

Position	T26B2-205 (MeOH- D_4)		
	$\delta^1\text{H}$ (m, J [Hz])	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	-	-	-O-
2	-	171.3	O=C-O-
3	-	137.8	=C-OH
3a	-	139.8	qC=
4	3.21 (m)	28.8	-CH-
5	1.81-1.78 (m)	39.5	-CH ₂ -
6	4.11 (pseudo p)	68.0	-CH-OH
7	2.30 (dd, 13.8, 4.4), 1.76 (dd, 13.8, 4.6)	45.4	-CH ₂ -
7a	-	86.3	qC-O-
8	1.34 (d, 7.5)	19.2	-CH ₃
9	2.25 (dq, 14.7, 7.3), 2.03 (dq, 14.7, 7.3)	33.7	-CH ₂ -
10	0.77 (t, 7.3)	7.9	-CH ₃

Aus dem $^{13}\text{C-MNR}$ ließen sich insgesamt elf Signale für Kohlenstoffatome ausmachen. Neben den sieben Kohlenstoffen, die bereits aus dem HMQC-Spektren offensichtlich waren, fielen vier quaternäre, tieffeldverschobene Signale ($\delta^1\text{C}$ [ppm] = 171.3 (C-2), 139.8 (C-3a), 137.8 (C-3), 86.3 (C-7a)) auf. Aufgrund der Verschiebungen ließ sich für ersteres eine Carbonylkohlenstoff in Esterfunktion und für letzteres eine Sauerstofffunktionalisierung vermuten. Die anderen beiden Signale ließen C-Atome mit sp^2 -Hybridisierung in einer Doppelbin-

derung erwarten. Die, anhand des COSY-Spektrums nachvollziehbaren, geminalen und vicinalen Kopplungspartner der Protonen an C4, C5, C6, C7 und die übereinstimmenden, intensiven HMBC-Signale der Methylprotonen an Position C-8 und der Methylenprotonen an C-7 jeweils zu $\delta C = 139.8$ ppm (C-3a) und $\delta C = 39.5$ ppm (C-5) ermöglichten die Etablierung eines Cyclohexanrings. Die Tieffeldverschiebung von C-6 bzw. H-6 ließ dabei eine Oxofunktionalisierung an dieser Position des Cyclohexanrings vermuten. Des Weiteren offenbarten die HMBC-Korrelationen der Ethylgruppe (Methylenprotonen zu C-3a, C-7 und C-7a, Methylprotonen zu C-7a) Verbindung zum Cyclohexanring und ermöglichten die Positionierung an den quaternären Kohlenstoff an C-7a. Das Proton H-4 zeigte durch sein HMBC-Spektrum als einziges eine Resonanz zum quaternären Kohlenstoff bei $\delta C = 137.8$ ppm (C-3), sodass eine Doppelbindung zwischen C-3a und C-3 platziert wurde. Leider wurde das Signal mit der Verschiebung bei $\delta C = 171.3$ ppm nicht durch eine Korrelation im HMBC-Spektrum abgedeckt.

Weitere und bestätigende Informationen für den Strukturvorschlag wurden durch MS-Untersuchungen erhalten. LR-MS mittels Nano-ESI ergab verschiedene Molekülionenaddukte ($m/z = 447.1$, $[2M+Na]^+$, $m/z = 246.9$, $[M-Cl]^-$), welche zunächst die Nominalmasse ($M = 212$ Da) lieferten. Die Überprüfung mittels HPLC-HR-ESI-TOF bestätigte die Nominalmasse durch die Messung des Pseudomolekularions ($m/z = 213.1101$, $[M+H]^+$, berechnet 213.1121 , $\Delta m = 9.55$ ppm), eines Fragmentions ($m/z = 195.0996$, $[M-H_2O+H]^+$) und zweier Natriumaddukte ($m/z = 235.0921$, $[M+Na]^+$; $m/z = 447.1964$, $[2M+Na]^+$) bei positiver Ionisierung. Darüber hinaus erlaubte es die Ableitung der Elementarzusammensetzung ($C_{11}H_{16}O_4$), in guter Übereinstimmung zu den Messwerten des Pseudomolekularions ($C_{11}H_{16}O_4H^+$, berechnet 213.1121 , $\Delta m = 9.55$ ppm). Die Bildung eines Fragmentions mit der formalen Entfernung von H_2O suggeriert zudem das Vorhandensein einer Hydroxyfunktion, welche trotz der relativ schonenden ESI-Ionisierung häufig Wasser als Neutralteilchen abspalten.

Der Abgleich aller HMBC- und COSY-Korrelationen (Abbildung 4.2.10b.) unter Einbeziehung der Elementarzusammensetzung aus den MS-Experimenten resultierte in einem Strukturvorschlag und der vollständigen Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.2.10a.).

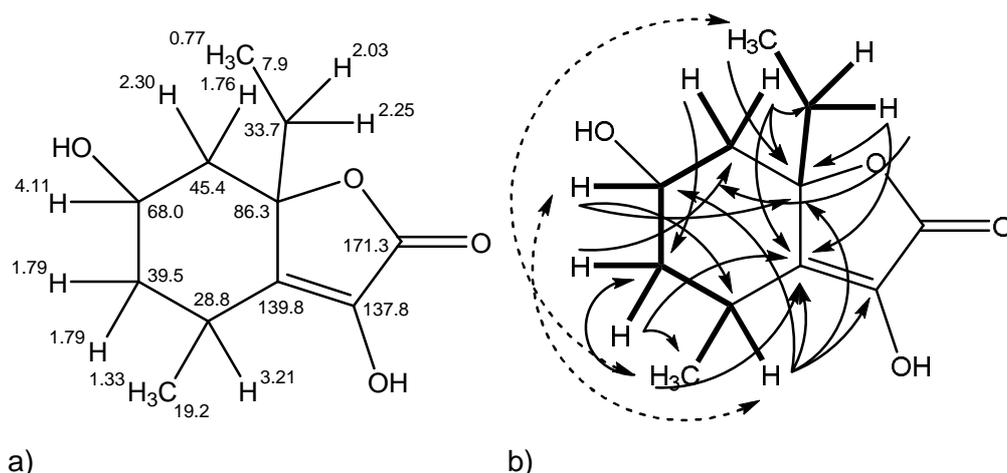


Abbildung 4.2.10.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von T26B2-205 in MeOH-D_4 (eigene Darstellung).

Die geringe chemische Verschiebung von C-3 ($\delta\text{C} = 137.8$ ppm) im Vergleich zu anderen sp^2 -hybridisierten und hydroxylierten Kohlenstoffatomen, die normalerweise eine Verschiebung $\delta\text{C} > 150$ ppm erwarten ließe, könnte durch den schirmenden Effekt der Carbonylgruppe in α -Position erklärt werden. Diese chemische Verschiebung, wie auch die Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen an anderen Positionen (Tabelle 4.2.5.), wurden allerdings auch für ein strukturell verwandtes synthetisches Derivat (3-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-on) (Abbildung 4.2.12a.) beschrieben (Kamat *et al.* 2007).

Tabelle 4.2.5.: Vergleich der ^{13}C NMR Daten von T26B2-205 und 3-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4H)-on.

Position	T26B2-205 (MeOH-D_4)	Referenz: Kamat <i>et al.</i> 2007 (CDCl_3)
	$\delta^{13}\text{C}$	
1	-	-
2	171.3	170.1
3	137.8	133.9
3a	139.8	141.3
4	28.8	35.8
5	39.5	39.0
6	68.0	19.9
7	45.4	41.6
7a	86.3	85.1

Bestehende Unterschiede in der chemischen Verschiebung des ^{13}C -NMR-Spektrums sind durch die Substituenten (Abbildung 4.2.12.) am Cyclohexanyling (z.B. Hydroxylierung an C-6) und durch die Messung in einem anderen Lösemittel (MeOH-D_4 vs. CDCl_3) erklärbar. Bezüglich der relativen Stereochemie gibt das NOESY Spektrum Auskunft. Kreuzkorrelationen zwischen den Protonen der Ethylgruppe an C-7a und den Protonen der Methylgruppe (H-8), aber nicht zum Proton an C-4, implizieren die gleichseitige Ausrichtung der Methyl-

und Ethylgruppe. Gleiches gilt für ein, wenn auch mit geringer Intensität, beobachtetes Kreuzsignal zwischen dem Proton H-6 und H-4, aber nicht zwischen H-6 und den Protonen der Methylgruppe (H-8) bzw. den Ethylprotonen (H-9). Dies bedeutet, dass die Hydroxylgruppe, wie auch die Methyl- und die Ethylgruppe relativ zum planaren Furanring in dieselbe Richtung orientiert sind. Die Klärung der absoluten Konfiguration wurde durch einen Vergleich der CD-Spektren mit (-)-Loliolid als Referenz vorgenommen. Beide weisen einen positiven Cotton-Effekt sowie eine negative molare Eliptizität (gemessen: $[\Theta]_{227} = -2690$, MeOH; $[\Theta]_{224} = -494$, ACN; Literatur: $[\Theta]_{219} = -53089$, MeOH (Uchida & Kuriyama 1976), $[\Theta]_{218} = -67609$ MeOH Chin *et al.* 2008) bei etwa 225 nm auf (Abbildung 4.2.11.). Uchida & Kuriyama (1976) berichteten, dass die Chiralität des γ -Kohlenstoffes (hier C-7a) in α,β -ungesättigten Lactonen (Butenolide (γ -Lacton)) der bestimmende Faktor für das Vorzeichen des $\pi\text{-}\pi^*$ -Übergangs in CD-Spektren ist. Die Stereochemie und das Vorzeichen (negativ) von $\pi\text{-}\pi^*$ von (-)-Loliolid ist bekannt. Demnach kann auch die Konfiguration für die Butenolid Verbindung T26B2-205 an C-7a abgeleitet werden. In Anlehnung der Stereoinformation aus dem NOESY-Spektrum ergibt sich die absolute Konfiguration.

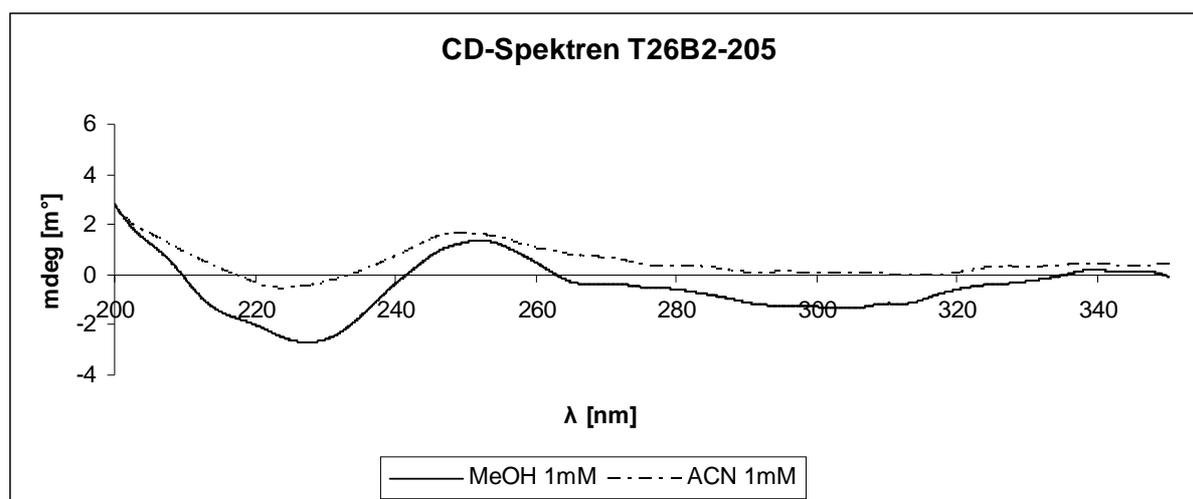


Abbildung 4.2.11.: CD-Spektrum von Lilacinolid A (T26B2-205) in MeOH und ACN bei $c = 1 \text{ mM}$ (eigene Darstellung).

Die dargelegten experimentellen Daten sprechen demnach für die Identität des Strukturvorschlages, sodass Verbindung T26B2-205 als Benzofuranon- ((4*R*,6*S*,7*aR*)-7*a*-Ethyl-3,6-dihydroxy-4-methyl-5,6,7,7*a*-tetrahydrobenzofuran-2(4*H*)-on) bzw. 3-Hydroxybutenolidderivat identifiziert werden konnte. Ein Datenbankabgleich über SciFinder zeigte, dass es sich um eine bisher nicht beschriebene Verbindung handelt. Als Name wurde Lilacinolid A vorgeschlagen (Maschke *et al.* 2019b).

Bekanntere Verbindungen mit dem 3-Hydroxybutenolid (3-Hydroxy-2(5*H*)-furanon) Strukturelement sind zum Beispiel das Vitamin Ascorbinsäure oder der Aromastoff Sotolon, welcher als geruchsbestimmende Komponente vor allem in Liebstöckel (*Levisticum officinale*),

Bockshornklee (*Trigonella foenum-graecum*), Curry und Ahornsirup vorhanden ist (Podebrad *et al.* 1999).

Für die strukturell verwandte Verbindung (3-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4*H*)-on), welche von Kamat *et al.* (2007) und zuvor von Brooks *et al.* (1961), durch Oxidierung von β -Jonon (β -Ionon) mit KMnO_4 hergestellt und spektroskopisch untersucht wurde, liegen wenige Bioaktivitätsdaten vor. *In vitro*-Tests gegenüber *Chromobacterium violaceum* (Martinelli *et al.* 2004) und *in silico*-Berechnungen (Sun *et al.* 2009) zeigen, dass diese Verbindung Interaktion und Inhibition bei der interspezieskommunikation (Quorum Sensing) als Analogon zu N-Acetylhomoserinlacton (AHL, Abbildung 4.2.12c.) ausübt. Die Inhibition des bakteriellen Wachstums durch das Quorum-Sensing-System (Quorum-Quenching) wird als interessanter Ansatzpunkt bei der Bekämpfung von Infektionen in Medizin, Aquakulturen, Agrikulturen und zur Kontrolle von ungewünschten Biofilmen gesehen (Galloway *et al.* 2012, Grandclément *et al.* 2016).

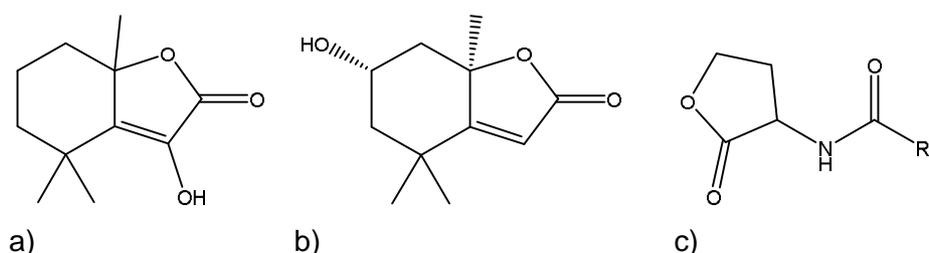


Abbildung 4.2.12.: Derivate und Strukturanaloga von T26B2-205: a) 3-Hydroxy-4,4,7a-trimethyl-5,6,7,7a-tetrahydrobenzofuran-2(4*H*)-on, b) (-)-Loliolid, c) N-Acetylhomoserinlacton (R = C₄-C₁₄-Kette, Substitution an Position 3 der Kette möglich) (eigene Darstellung).

Ein weiteres strukturell sehr ähnliches Molekül ist das Terpen Loliolid (Abbildung 4.2.12b.). Dieses hat breite, weltweite, hauptsächlich in verschiedenen Bäumen (z.B. *Alchornea glandulosa* (Conegro *et al.* 2003), *Rollinia emarginata* (Colom *et al.* 2007), *Juglans regia* (Schwindl *et al.* 2019)), Sträuchern (z.B. *Penstemon campanulatus*, (z.B. Zajdel *et al.* 2012)) Gräsern (*Lolium perenne* (Hodges & Porte 1964); *Digitaria sanguinalis* (Zhou *et al.* 2013)) und Algen (z.B. *Jolyana laminarioides* (Khan *et al.* 2011), *Ulva australis* (Li *et al.* 2017b)) vorkommende Verbreitung. Nach Literaturrecherchen stammt der bisher einzige Bericht zur Isolierung von Loliolid aus einem Pilz, welcher zugleich als Endophyt (*Annulohyphoxylon ilanense*) aus einer *Cinnamomum* sp. isoliert wurde (Wu *et al.* 2013). Diese Verbindung und deren Derivate scheinen demnach nicht besonders in Pilzen verbreitet zu sein. Neben der von Sun *et al.* (2016) beschriebenen starken Wachstumsinhibition gegenüber Rotalgen wurde weiterhin keine breite antibiotische Wirkung des Loliolids berichtet. Die ermittelten antibakteriellen und antimykotischen Effekte gegenüber einzelnen Zellen können als unwesentlich gewertet werden, da MIC-Werte erst ab millimolaren-Konzentrationen (~ 3-15 mM) beschrieben werden (Zajdel *et al.* 2012). Interessanterweise wird von weiteren Autoren auch für Loliolid

ein Einfluss als Allelochemikalie mit Einfluss auf die mikrobielle Gemeinschaft und das Biomassewachstum anderer Pflanzen beobachtet (Zhou *et al.* 2013, Bich & Kato-Noguchi 2014). Eine weitere Funktion dieses Moleküls wird in der Induzierung der Pflanzenabwehr gegenüber Insektenherbivoren, ohne direkt toxisch für diese zu sein, festgestellt (Murata *et al.* 2019). Andere Autoren beschreiben zusätzlich potenziell nützliche humanmedizinische Effekte, die eine Anwendung in dermalen Applikationen nahelegen (Park *et al.* 2019). Diese reichen zum Beispiel von schwacher zytotoxischer Wirkung gegen Krebszellen ($IC_{50} = 141 \mu\text{M}$, Caco-2-Zelllinie, Machado *et al.* 2012) über antioxidative und zellprotektive Wirkung, sowie weiteren Effekten (z.B. antiinflammatorisch). Die Enantiomere ((+)-Loliolid (6*R*/7*aS*)) bzw. die Diastereomere Isololiolid bzw. Epilolioid ((+)-Epiloliolid (6*S*/7*aS*), (-)-Epiloliolid (6*R*/7*aR*)) sind ebenfalls aus natürlichen Quellen verfügbar, auch wenn diese in weniger Literaturstellen beschrieben wurden (z.B. Colom *et al.* 2007, Ren *et al.* 2013, Chen *et al.* 2019).

Die Übertragung der beschriebenen Bioaktivitäten von 3-Hydroxy-4,4,7*a*-trimethyl-5,6,7,7*a*-tetrahydrobenzofuran-2(4*H*)-on und (-)-Loliolid auf den neu beschriebenen Metaboliten Lila-cinolid A sind spekulativ. Allerdings ist aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit ein vergleichbares Aktivitätsspektrum denkbar. Weitere Untersuchungen insbesondere zur Phytotoxizität und der Auswirkung auf die bakterielle Kommunikation zur Klärung der biologischen Relevanz wären für zukünftige Studien von Interesse.

4.2.3.6. Weitere aus Stamm T26B isolierte Verbindungen

Während der mykochemischen Untersuchung des Endophytenstammes T26B wurden neben den bereits beschriebenen Verbindungen weitere Metaboliten isoliert, welche generell weit verbreitet sind bzw. sehr häufig aus Pilzen gewonnen werden können (Abbildung 4.2.13.). Zu diesen gehören die Fettsäure Hexadecansäure (Palmitinsäure) (T26BI-14, m = 46.4 mg), sowie das Lipid 1-Linolyglycerol (T26B2-211, m = 27.3 mg) und das Sterol Ergosterolperoxid (T26BI-20, m = 12.0 mg). Die Verbindungen wurden nicht eingehender charakterisiert, da sie nicht spezifisch für *P. lilacinum*-Stämme sind, jedoch der Vollständigkeit wegen dargestellt. Ihre NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen-Daten sind aber in Übereinstimmung mit der Literatur (Kim *et al.* 1997, De Queiroz *et al.* 2001). Interessanterweise wurde bereits in den 1960er Jahren die Vermutung geäußert, dass Ergosterolperoxid als Artefakt bei der Extraktbearbeitung durch Oxidation von Ergosterol entsteht (Adam *et al.* 1967) und nicht als echtes Produkt der pilzlichen Biosynthese zu bewerten ist. Später erschienene Literatur kommt hingegen zu dem Schluss, dass es sich nicht um ein Artefakt des Isolierungsprozesses handelt (Nemec *et al.* 1997). Trotz des breiten Vorkommens und langer Bekanntheit wird Ergosterolperoxid als interessante Verbindung mit vielen biologischen Effekten gesehen, die als eine der gesundheitsfördernden Komponenten in Medizinalpilzen gilt und nach wie vor Gegenstand aktueller Forschungen ist (Medivan & Lindequist 2017).

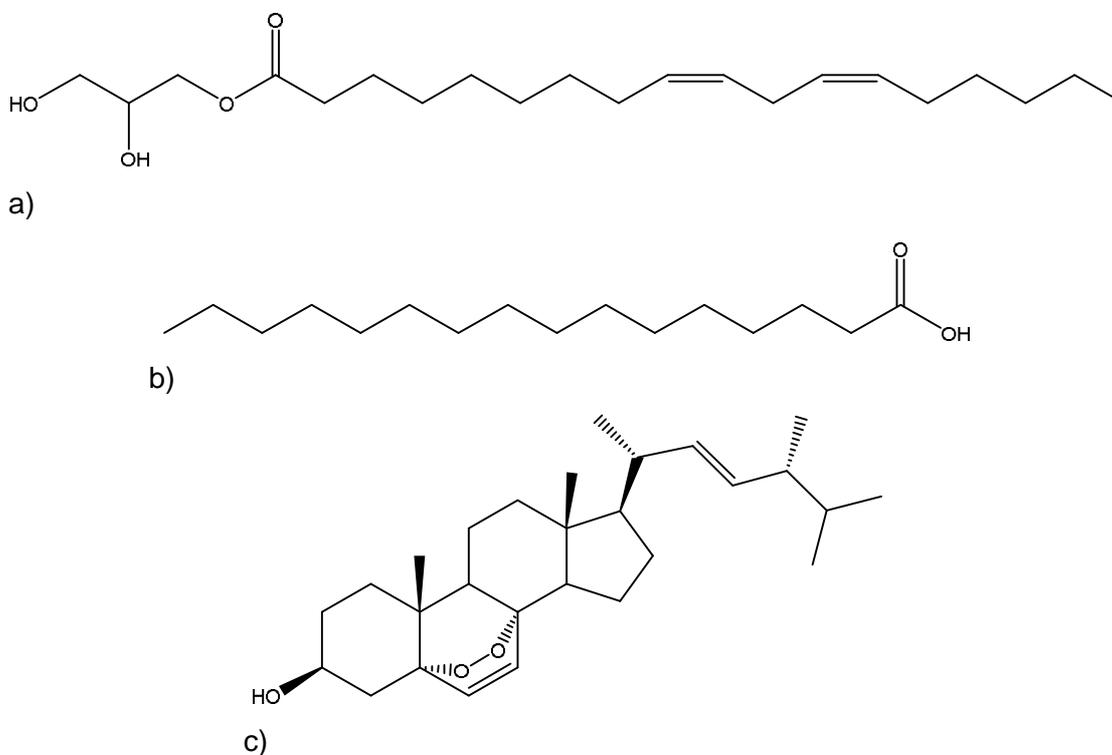


Abbildung 4.2.13.: Struktur von den häufig isolierten Verbindungen: a) 1-Linolyglycerol, b) Hexadecansäure, c) Ergosterolperoxid (eigene Darstellung).

4.2.4. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm T26B und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von *Purpureocillium*-Arten

In mykochemischen Untersuchungen des als Endophyten isolierten und als *Purpureocillium lilacinum* identifizierten Stammes T26B konnten zehn Verbindungen isoliert und charakterisiert werden. Darunter konnte ein bisher nicht literaturbekanntes Butenolid mit Hydroxylierung an der 3-Position und anneliertem Cyclohexanring ((4*R*,6*S*,7*aR*)-7*a*-Ethyl-3,6-dihydroxy-4-methyl-5,6,7,7*a*-tetrahydrbenzofuran-2(4*H*)-on) gefunden werden. Als Trivialname wurde Lilacinolid A vorgeschlagen. Zusätzlich wurde ein putativ neues Leucinostatinderivat identifiziert. Trotz Maßstabsvergrößerung der Kultivierung und erneuter Bearbeitung des Extrakts konnte nicht genug Material für eine genauere Charakterisierung erhalten werden. Des Weiteren wurden die bekannten Peptibiotika Leucinostatin A, B, A2 und B2, die Fettsäure Palmitinsäure, das Lipid 1-Linolyglycerol und das Sterol Ergosterolperoxid, sowie das Mykotoxin Alternariol isoliert. Die zu den antiplasmodialen und antitrypanosomalen Effekten gehörigen Verbindungen, welche die beobachtete Aktivität des Rohextraktes erklären, konnten mit den Leucinostatinen gefunden werden.

Die Eignung des Rohextraktes von T26B als einfache Formulierung zur Behandlung parasitärer Erkrankungen, wie Malaria, Leishmaniasis, oder der Chagaskrankheit, in Ländern mit vorwiegendem Zugang zur „traditionellen Medizin“ ist nur bedingt gegeben. Die antiparasitären Komponenten konnten zwar identifiziert werden, allerdings weisen diese unter anderem auch ein sehr breites zellschädigendes Aktivitätsspektrum auf. Die *in vitro* bestimmte, hohe Selektivität der isolierten Leucinostatinen (Tabelle 4.2.3.) gegenüber *P. falciparum* Zellen im Vergleich zur humanen Nierenzellenlinie HEK deutet daraufhin hin, dass diese Wirkung am Parasiten zeigen, ohne vorher Wirtszellen zu schädigen, und somit prinzipiell medizinisch nutzbar sind. Dennoch sind nach bisherigen Erkenntnissen keine *in vivo* Studien an Menschen verfügbar, die über eine Verträglichkeit oder schädigende Effekte von Leucinostatinen Aufschluss geben können. Tierstudien in Mäusen weisen allerdings auf die Wirksamkeit des Leucinostatins A bei der Behandlung bei *T. brucei rhodesiense* Infektionen *in vivo* hin (Ishiyama *et al.* 2009). Bedenklich ist allerdings der Nachweis von Alternariol als generelles Mykotoxin. Demnach wären weitere Studien zu Kultivierungsbedingungen nötig, welche die Produktion von Leucinostatinen maximieren und die anderer Mykotoxine minimieren. Ein Patent beschäftigt sich zum Beispiel bereits mit einer Optimierung der Leucinostatin A Bildung durch Veränderung der Mediumzusammensetzung (Yang *et al.* 2017). Neben der Kommerzialisierung (Wang *et al.* 2016) und dem stärker werdenden Interesse an neuen *Purpureocillium lilacinum* bzw. *Paecilomyces lilacinus* Stämmen (z.B. Lan *et al.* 2017, Nguyen *et al.* 2017) zur Nutzung als Biokontrollstamm gegen pathogene Nematoden und Pilze ist gleichzeitig verstärkt von Mykosen beim Menschen im Zusammenhang mit *P. lilacinum* berichtet worden. Obwohl die Virulenz des Pilzes als niedrig bis moderat eingestuft wird

und Infektionsfälle hauptsächlich bei immundefizienten Patienten und Patientinnen berichtet worden sind, werden *P. lilacinum* Stämme zunehmend als klinisch relevante Pathogene gesehen (Pastor & Guarro 2006, Luang-Ard *et al.* 2011). Die Aufwertung des biologischen Sicherheitslevels bzw. die Einstufung in eine höhere Risikogruppe (siehe TRBA 460, 2016), die nach den Kultivierarbeiten zu Stamm T26B erfolgte, unterstreicht die Problematik.

Da die Art *Purpureocillium lilacinum* bzw. *Paecilomyces lilacinus* vor kurzem, wegen beachtlicher Unterschiede von genetischen Markern (ITS, TEF) zu anderen *Paecilomyces* Arten, aus der Gattung *Paecilomyces* ausgegliedert und in die neue, bis dahin nicht bestehende Gattung *Purpureocillium* eingliedert wurde (Luangsa-Ard *et al.* 2011), existieren generell wenig Naturstoffstudien zu Arten der Gattung *Purpureocillium*. Ebenfalls sind nur wenige mykochemische Untersuchungen unter dem vorherigen Synonym (*Paecilomyces lilacinus*) vorhanden. Neben den seit den 1970er Jahren bekannten Literaturstellen zur Isolierung verschiedener Leucinostatine (siehe Kapitel 4.2.3.2.) wurde Paecilomid (Abbildung 4.2.13.), ein neues Pyridonderivat, als neuer Naturstoff mit vielversprechender Acetylcholinesterase-Inhibition aus *P. lilacinus* beschrieben (Teles & Takahashi 2013). Des Weiteren isolierten Elbandy *et al.* (2009) zwei neue α -Pyrone (Paecilopyrone A und B), sowie zwei neue Cyclohexenonderivate (Phomaligol B und C).

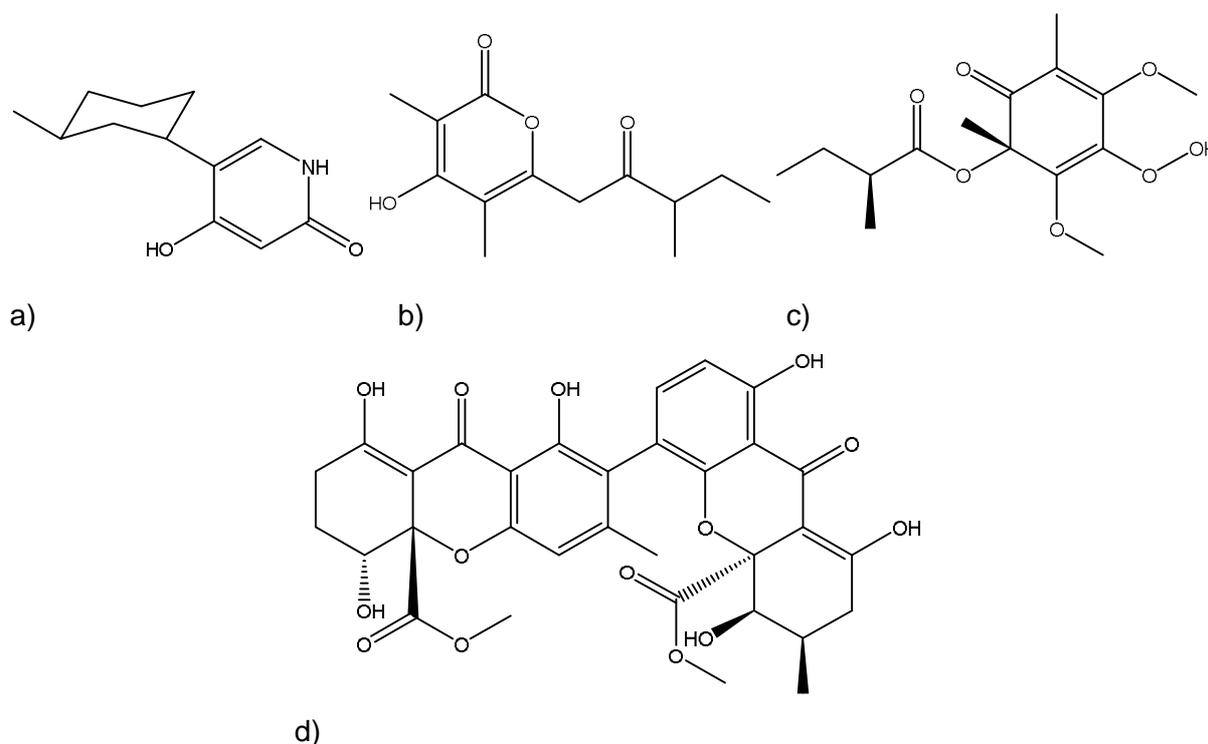


Abbildung 4.2.14.: In der Literatur neu isolierte Metabolite aus *P. lilacinum* (*P. lilacinus*): a) Paecilomid, b) Paecilopyron A, c) Phomaligol B, d) Purpureon (eigene Darstellung).

Naturstoffuntersuchungen zu anderen Arten der Gattung *Paecilomyces* sind mannigfaltig vorhanden (z.B. *Paecilomyces variotii* (Zhang *et al.* 2015)), wurden aber wegen ungeklärter bzw. divergierender Verwandtschaftsverhältnisse (Luangsa-Ard *et al.* 2004, Luangsa-Ard *et al.* 2011) nicht in die Ausführungen mit einbezogen. Dies erschwert einen Vergleich und eine Einordnung der eigenen isolierten Metaboliten zu anderen Metaboliten aus *Purpureocillium*/*Paecilomyces*-Arten. Nur zwei andere mykochemische Untersuchungen mit jeweils als *P. lilacinum* klassifizierten Stämmen behandeln isolierte Verbindungen aus *Purpureocillium* Arten. Madariaga-Mazón *et al.* (2013) isolierten zwei bekannte Xanthon-Anthrachinon-Heterodimere (Acremonidin A und Acremoxanthon C) mit starker inhibitorischer Wirkung auf Calmodulin. Des Weiteren isolierten Lenta und Mitarbeiter (2016) ein neues Ergochromderivat (Purpureon) mit guter antiparasitärer Wirkung (z.B. $IC_{50} = 0.87 \mu M$, *Leishmania donovani*) und weitere bekannte Verbindungen, darunter die Anthrachinonderivate Emodin, Chrysophanol, und Aloe-Emodin, ebenfalls die Fettsäure Palmitinsäure und zwei Ergosterolderivate. Interessanterweise wurden keine Leucinostatine von diesem Stamm gewonnen, obwohl es sich um einen Endophyten handelt, der im Rahmen derselben Untersuchung vom gleichen Pflanzenmaterial (Rinde von *Rauvolfia macrophylla*) isoliert worden war. Stattdessen wurde das neue, dimere Xanthonderivat (Purpureon) als antiparasitäre Verbindung bestimmt. Diese Beobachtung bestätigt die Erfahrung von Li *et al.* (1996), dass aus den vielen Stämmen eines Morpho- oder Genotyps oftmals nur wenige Stämme eine bestimmte Verbindungsklasse mit entsprechenden biologischen Eigenschaften überhaupt bzw. in ausreichender Menge bilden. Zudem zeigt sich, dass die Applikation von Extrakten als einfache Formulierung durch mögliche synergistische Effekte verschiedener Verbindungsklassen gegenüber der aufwendigen Isolierung und Applikation von definierten Einzelsubstanzen weiterhin interessant erscheint. Die genaue Definition von Kultivierungsbedingungen, die Bestimmung der Stammidentität, sowie die Überprüfung der quantitativen und qualitativen Extraktzusammensetzung, wie sich an der problematischen Bildung von ungewünschten Mykotoxinen zeigt, sind dennoch unerlässlich.

4.3. Stamm TS7 (*Xylaria cubensis*)



Abbildung 4.3.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm TS7 (*Xylaria* sp.): Axenische Kultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (oben), Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (mitte links), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (mitte rechts), Rohextrakte nach EtOAc-H₂O Flüssig-Flüssig-Extraktion (EtOAc-Fraktion unten links, H₂O-Fraktion unten rechts) (eigene Darstellung).

4.3.1. Stammidentifizierung und Auswahl

Die Stammidentifizierung wurde genbasiert mittels ITS-nrDNA vorgenommen (ITS-Barcoding). Ein Abgleich der aus genomischer DNA amplifizierten ITS-Sequenz (Zugangsnummer NCBI: LR584022) mittels Blast-Algorithmus innerhalb des kompletten Entrez-Suchbereiches für Nukleotidsequenzen lieferte nahezu ausschließlich Einträge (98 von 100 Einträgen) mit hoher Sequenzübereinstimmung (98.7-99.5%) zu Pilzendophyten, die allerdings nicht näher klassifiziert waren. Weitere Einträge entfielen auf *Xylaria* sp. genauer *Xylaria cubensis* (98.0%). Die Restriktion der Suchergebnisse auf "type material" resultierte hingegen nur in Treffern mit deutlich herabgesetzter Sequenzübereinstimmung (~ 88%). Diese wurden daher für eingehendere Betrachtungen nicht weiter herangezogen. Überprüfungen der Sequenz in „BOLDSystems“ (Ratnasingham et al. 2007) und im „RDP-classifier“ unterstrichen ebenfalls die Einordnung als *Xylaria cubensis* mit guter Sequenzübereinstimmung (jeweils 97-98%). Zur Absicherung wurden weiterhin phylogenetische Analysen durchgeführt (Abbildung 4.3.2.). Der phylogenetische Baum bestätigte die Clusterung innerhalb der *Xylaria* sp. und erlaubte darüber hinaus eine genaue Klassifizierung als *Xylaria cubensis* Stamm. Die Auswahl des Stammes erfolgte primär anhand der bemerkenswerten Zytotoxizität gegen die Zervix-Karzinom-Zelllinie KB-3-1 ($IC_{50} = 5.1 \mu\text{g/ml}$), die sich im Rohextrakt nach der Maßstabsvergrößerung noch ausgeprägter ($IC_{50} = 1.4 \mu\text{g/ml}$) zeigte.

Die Stammeinordnung anhand der Sequenzübereinstimmung, die wegen Problemen bei der Amplifizierung der ITS-Sequenz aus genomischer DNA erst während der Extraktbearbeitung vorgenommen werden konnte, zeigt über die Sequenzabweichung (2%) dennoch genug Diversität zu bereits beschriebenen *Xylaria cubensis*-Stämmen, sodass die Isolierung neuer Metaboliten für möglich eingeschätzt wurde. Zudem sind *Xylaria*-Stämme bzw. die Stämme aus der Ordnung Xylariales allgemein bekannt für bioaktive Metaboliten (Helaly et al. 2018). Das als *Xylaria cubensis* identifizierte Isolat TS7 wurde demnach für die mykochemische Untersuchung und Kultivierung in größerem Maßstab ausgewählt.

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.3. Stamm TS7 (*Xylaria cubensis*) -

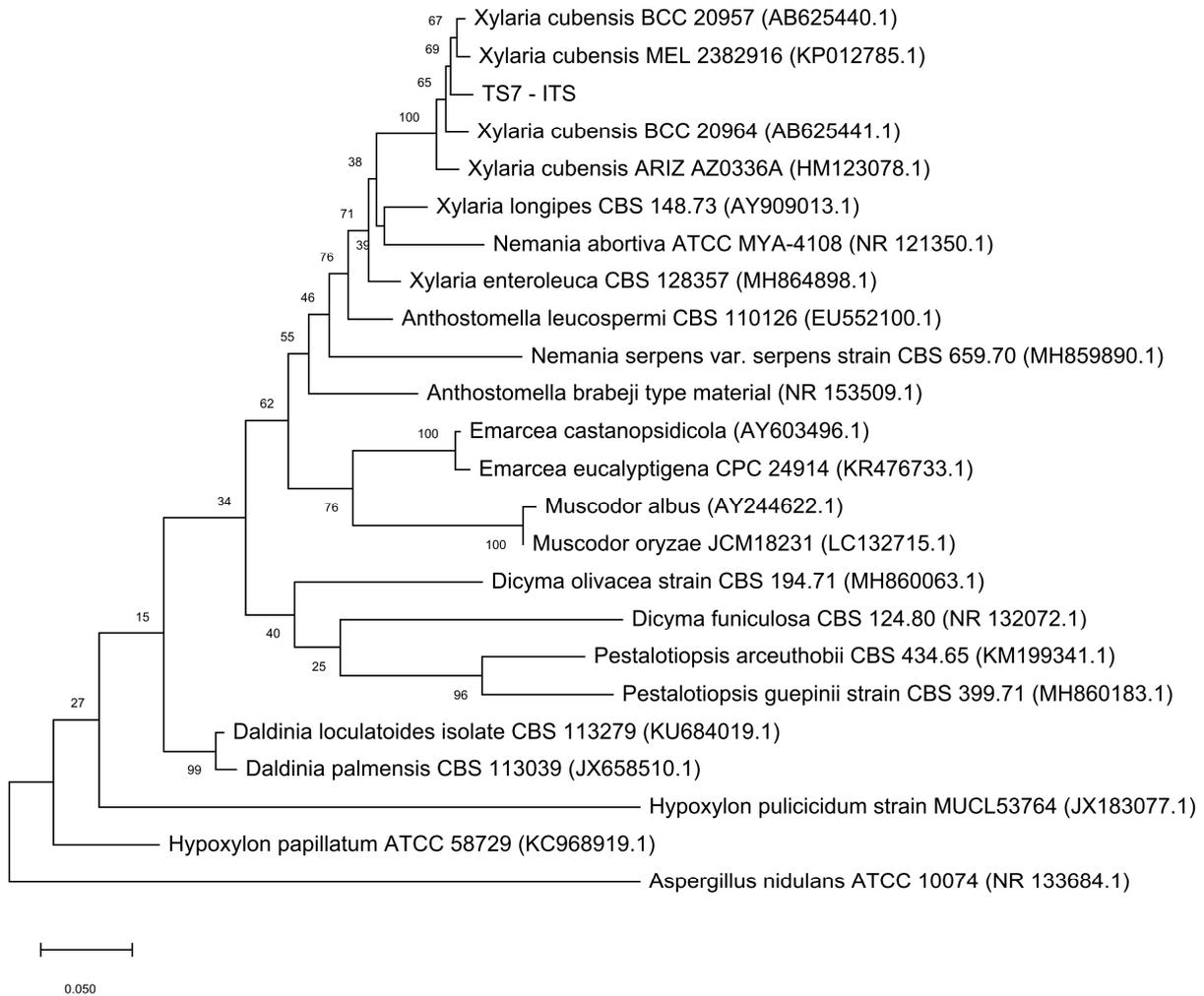


Abbildung 4.3.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit ITS-Sequenz des Stammes TS7 und Vergleichsreferenzen aus der Ordnung Xylariales mit 1000 Bootstrap Replikationen und *Aspergillus nidulans* als Outgroup (eigene Darstellung).

4.3.2. Extraktbearbeitung

Das getrocknete Essigsäureethylester-Rohextrakt ($m = 17.4$ g), gewonnen nach SSF (2 x 28 d, $T = 25$ °C, $m = 1.2$ kg Reissubstrat), wurde einer zweistufigen Flüssig-Flüssig-Extraktion (1. 2x $H_2O/EtOAc$ 1:1, % v/v; 2. 2x $MeOH-H_2O$ (95/5, % v/v)/Hexan, 1:1, % v/v) unterzogen. Als Ergebnis wurden drei Unterextrakte, welche sich grob in eine polare (TS7-F3, H_2O -Phase), eine unpolare (TS7-F1, n-Hexan-Phase) und semipolare Fraktion (EtOAc- bzw. MeOH-Phase) unterteilen ließ, erhalten. Die Überprüfung der biologischen Aktivität zeigte, dass die zytotoxisch aktiven Wirkstoffe hauptsächlich in der Fraktion mit den EtOAc- bzw. MeOH-löslichen Substanzen konzentriert waren. Die Fraktion F2 wurde folglich für eine detailliertere Untersuchung und Substanztrennung ausgewählt. Initiale Trennung (NP-LC) an einer Kieselgelsäule (Säule: $m_{Silica} = 250$ g, $\varnothing = 5$ cm, $h = 20$ cm) über Gradientenfahrtweise beginnend mit Petrolether über PE/EtOAc-Mischungen gefolgt von EtOAc/MeOH-Gradienten und abschließendem Spülen (75/20/5, $MeOH/H_2O/AcOH$, % v/v/v) ergab 23 per DC unterscheidbare Fraktionen (Abbildung 4.3.3.). Der bioaktivitätsgeführten Isolierungsstrategie folgend wurden die um Fraktion 12 liegenden Fraktionen als die zytotoxisch auffälligsten Fraktionen registriert. Fraktion 12 ($m = 88.6$ mg) selbst zeigte dabei deutlich geringere halbmaximale Effektkonzentration ($IC_{50} = 75$ ng/ml) als das Rohextrakt und die angrenzenden Fraktionen ($IC_{50} > 0.8$ µg/ml). Sie wurde mittels RP-HPLC in Gradientenfahrtweise weiterbearbeitet und abschließend durch zuvor über analytische RP-HPLC festgelegte, isokratische Laufmittelzusammensetzung präparativ getrennt. Dieses Vorgehen lieferte Griseofulvin (TS7-207, $m = 9.98$ mg) und Cytochalasin C (TS7-218, $m < 2.00$ mg). Dieselbe Trennstrategie wurde für Fraktion 14 ($m = 141$ mg), welche zuvor allerdings noch über SEC behandelt wurde, angewendet. Dies lieferte die Metaboliten 19,20-Epoxyctochoalasin D (TS7-235, $m = 7.80$ mg) und Hirsutatin A (TS7-232, $m = 5.10$ mg). Der Hauptmetabolit (bezogen auf die isolierte Menge) Cytochalasin D (TS7-223, $m = 202$ mg) wurde aus Fraktion 13 ($m = 354$ mg) nach Größenausschlusschromatographie über Sephadex LH20 und optionaler isokratischer RP HPLC (TS7-223-2, $m = 12.0$ mg) erhalten.

Weiterhin wurden nicht zytotoxisch aktive Fraktionen (z.B. Fraktion 4 ($m = 34.7$ mg), Fraktion 8 ($m = 80.2$ mg)) anhand des klaren analytischen RP-HPLC Profils getrennt. Diese lieferten nach weiteren präparativen RP-HPLC Trennschritten die Melleinderivate 5-Methoxycarbonylmellein (TS7-202, $m < 30$ mg) und Akolitserin (TS7-230-1, $m = 1.05$ mg) (Abbildung 4.3.3.). Weitere Fraktionen wurden untersucht und bearbeitet. Allerdings konnten bei diesen entweder aus Mangel an Ausgangsmaterial, wenig vielversprechender, vorausgegangener Analytik bzw. suboptimalem Substanzprofil oder nicht erfolgreicher Trennung, keine weiteren Metaboliten isoliert werden.

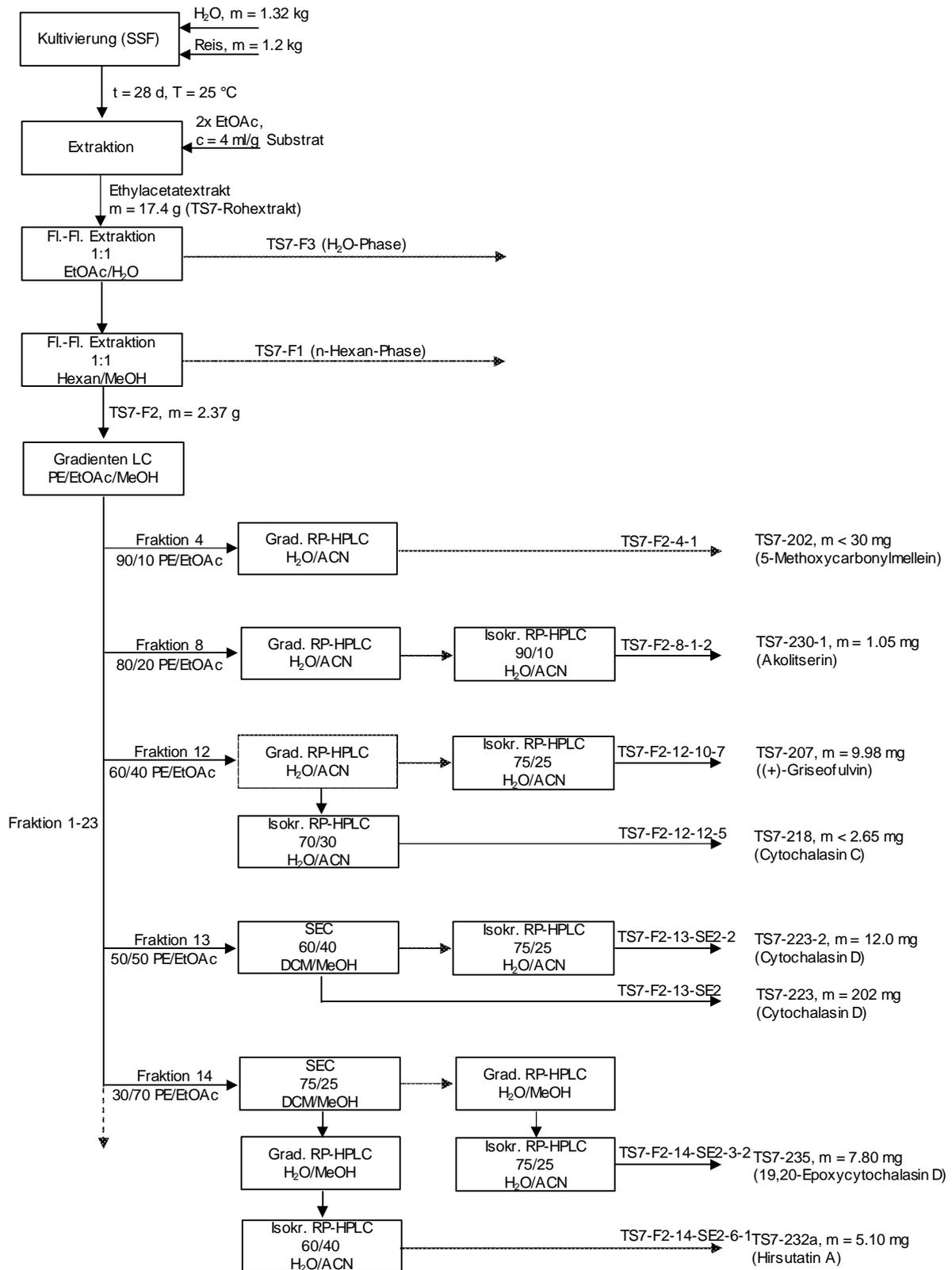


Abbildung 4.3.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm TS7 (eigene Darstellung).

4.3.3. Isolierte und charakterisierte Verbindung aus Stamm TS7

4.3.3.1. (*R*)-5-Methoxycarbonylmellein (TS7-202)

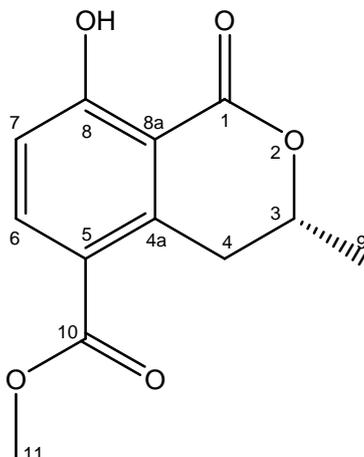


Abbildung 4.3.4.: Struktur von Verbindung TS7-202 (eigene Darstellung).

Die Verbindung TS7-202 (Abbildung 4.3.4.) wurde als farbloser Feststoff ($m < 30$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 46.5$ min, Standardmethode 1, $V = 10$ ml/min) aus Hauptfraktion vier ($m = 34.7$ mg) isoliert. ESI-MS-Analysen resultierten in der Bestimmung des Pseudomolekularions ($m/z = 234.8$, $[M-H]^-$) bei negativer Ionisierung. Das $^1\text{H-NMR}$ offenbarte insgesamt acht Signalgruppen. Von diesen ließen sich, anhand der Verschiebungen und Signalaufspaltung, zwei als *ortho*-koppelnde aromatische Protonen (δH [ppm] = 8.13 (d, $J = 9.0$ Hz), 1H, H-6), 6.94 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-7)), zwei Methylgruppen (δH [ppm] = 3.89 (s, 3H, H-11) 1.56 (d, $J = 6.3$ Hz), 3H, H-9)) von denen eine oxygeniert ist, und ein stark entschirmtes Proton (δH [ppm] = 11.83 (s, 1H, 8-OH)), welches wiederum auf ein Heteroatomproton in *peri*-Stellung zu einer Carbonylgruppe deutet, identifizieren. Kreuzsignale im COSY-Spektrum zeigten zudem, dass die restlichen Signalgruppen (δH [ppm] = 4.67 (dq, $J = 12.6, 6.3, 3.2$ Hz, 1H, H-3), 3.89 (dd, $J = 17.8, 3.2$ Hz, 1H, H-4), 3.05 (dd, $J = 17.8, 11.8$ Hz), 1H, H-4'')), inklusive der bereits erwähnten Methylgruppe ein zusammenhängendes, koppelndes Spinsystem darstellen. HMQC-Signale ($^1J_{\text{C,H}}$) erlaubten die Zuordnung der angrenzenden Kohlenstoffatome und offenbarten, dass die Protonen mit der Verschiebung bei $\delta\text{H} = 3.89$ ppm bzw. $\delta\text{H} = 3.05$ ppm zu einer diastereotopen Methylengruppe gehörten. Zudem bestätigten sie die Bindung des stark entschirmten Wasserstoffatoms ($\delta\text{H} = 11.83$ ppm) an ein Heteroatom. Das $^{13}\text{C-NMR}$ in Kombination mit dem DEPT135-Experiment erlaubte die Bestimmung von zwölf Kohlenstoffatomen insgesamt, von denen sechs quaternäre Kohlenstoffatome waren. Durch die chemische Verschiebung von diesen ließen sich wiederum zwei Carbonylgruppen einer Esterfunktion (δC [ppm] = 170.2 (C-1), 166.3 (C-10)) formulieren. Anhand der Verschiebung von H-3 bzw. C-3 war zudem eine Oxo-Funktionalisierung zu vermuten. Anhand der HMBC-Korrelationen ließ sich die Position der bereits identifizierten Strukturelemente eindeutig festlegen. Die Entschirmung des Protons

($\delta\text{H} = 11.83$ ppm) durch Wasserbrücken zur Carbonylgruppe in *peri*-Stellung ließ zunächst ein 8-Hydroxynaphthalin-1-on bzw. Isochroman-1-on als Grundgerüst formulieren. Durch nur eine vorhandene Korrelation der Methylgruppe (C-11) zu $\delta\text{C} = 166.3$ ppm ließ sich diese einer Methylesterfunktion zuordnen. Die fehlende $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplung der aromatischen Protonen zu den sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffen (Methin- und Methylengruppe), sowie deren *ortho*-Kopplung legten die Hydroxygruppe in *para*-Stellung zum Methylester-Substituenten fest. Der Ringschluss zum Lacton gegenüber der Formulierung einer freien Carbonsäure und eines 2-Hydroxypropylsubstituenten ließ sich anhand der oben beschriebenen Molekülmasse und der dazu passenden Summeformel ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$) belegen. Die Schlüsselkorrelation aus dem HMBC-Spektrum (Abbildung 4.3.5b.) unterlegten den Strukturvorschlag und ermöglichten die komplette Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.3.5a.).

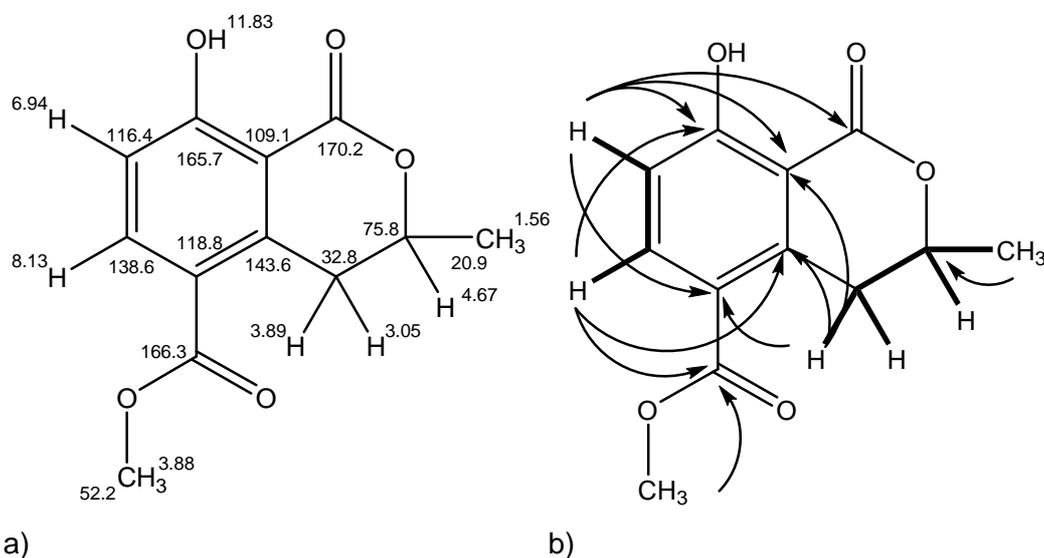


Abbildung 4.3.5.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von TS7-202 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

TS7-202 konnte als bekanntes 1-Oxobenzopyran- bzw. Isochroman-1-on-Derivat mit dem Trivialnamen Methoxycarbonylmellein (8-Hydroxy-3-methyl-1-oxoisochroman-5-methylcarboxylat) identifiziert werden. Die spektroskopischen Daten waren dabei in sehr guter Übereinstimmung zu den Literaturwerten (Klaiklay *et al.* 2012). Dieser Naturstoff wurde erstmals von Anderson und Mitarbeitern 1983 aus *Hypoxylon mammatum* (Syn. *Entoleuca mammata*, Mycobank 2019), eine Art, die ebenfalls zur Familie der Xylariaceae gehört, berichtet. Seitdem, wenn auch nicht häufig, wurde der Metabolit hauptsächlich aus Arten der Gattung *Xylaria* (Sumarah *et al.* 2008, Rukachaisirikul *et al.* 2013, Ibrahim *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2018), welche in zwei Arbeiten sogar direkt *Xylaria cubensis* Stämmen (Klaiklay *et al.* 2012, Fan *et al.* 2014) zugeordnet werden konnten, isoliert. Des Weiteren wurde von der Verbindung ebenfalls aus *Aspergillus allahabadii* (Sadorn *et al.* 2016) und ungewöhnlicherweise von dem Basidiomyceten *Marasmiellus ramealis* (Yang *et al.* 2015) berichtet. Bemer-

kenswert ist, dass bis auf die Gewinnung aus dem Basidiomyceten und *Hypoxylon mammatum* sämtliche Produktionsstämme als Endophyten isoliert wurden. Da aus den genannten Quellen, insbesondere der *Xylaria* sp. (Ordnung: Xylariales) bisher ausschließlich das Enantiomer mit negativem Drehwert (R-Konfiguration) berichtet wurde, wird diese Konfiguration ebenfalls für die eigene Verbindung vermutet. Das S-Enantiomer ist zwar als Naturstoff bekannt, wurde aber bisher als einziges aus einer phylogenetisch entfernten *Tubercularia* sp. (Ordnung: Hypocreales) beschrieben (Wang *et al.* 2003). Auf die Bestimmung des Drehwertes oder der Kristallstruktur wurde daher verzichtet.

Melleinderivate sind typische Polyketide aus der Familie der Xylariaceae und wurden ebenfalls aus weiteren Stämmen (siehe *Biscogniauxia* Stamm, SG25 Kapitel 4.6.3.1.) gewonnen. Über die Performance in Bioaktivitätstests ist wenig berichtet. Sumarah und Mitarbeiter (2008) beschrieben eine insektizidale Wirkung des *Xylaria* sp. Extrakts gegenüber *Choristoneura fumiferana*-Larven, einem Schädling der Wirtspflanze des Endophyten, wobei die isolierten Komponenten leider nicht separat getestet wurden. Die Verbindung zeigte sich weiterhin unauffällig in Zytotoxizitätsassays (KB-Zelllinie bis 50 µg/ml), antibakteriellen Tests (*Staphylococcus aureus* (MRSA), bis 200 µg/ml) (Klaiklay *et al.* 2012) und antioxidativen Tests (DPPH-Radikal-Assay) (Rukachaisirikul *et al.* 2013). Im Gegensatz dazu wurde das strukturell verwandte (-)-Mellein jedoch in Agardiffusionstests als antimykotisch (*Ustilaga vialacea*, *Euratum repens*) und antialgal (*Chlorella fusca*), sowie phytotoxisch in Samenkeimungstests (*Lepidium sativum* (Gartenkresse), *Medicago sativa* (Alfalfa)) bewertet (Schulz *et al.* 1995). Sumarah *et al.* (2008) stellen für Carboxymethylmellin ebenfalls antimykotische Wirkung. Diese wurde allerdings gegenüber den Testorganismen (*Saccharomyces cerevisiae*) nicht genauer quantifiziert. Aus den genannten Effekten lässt sich in erster Linie eine Funktion als Allelochemikalie in der Konkurrenz mit anderen Endophyten oder pathogenen Pilzen um denselben Lebensraum und Ressourcen ableiten.

4.3.3.2. Akolitserin (TS7-230-1)

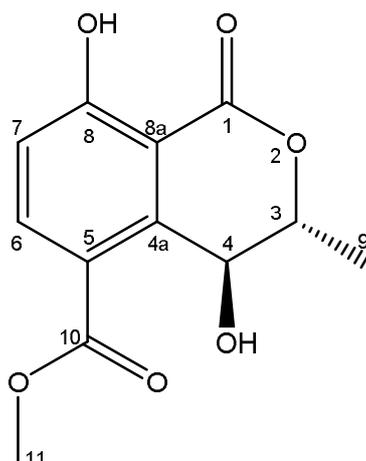


Abbildung 4.3.6.: Struktur von Verbindung TS7-230 (eigene Darstellung).

Die Verbindung TS7-230 (Abbildung 4.3.6.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 1.05$ mg) aus Hauptfraktion 8 ($m = 80.2$ mg) nach zweifacher RP-HPLC (1. $t_R = 34.5$ min, Standardmethode 1, $V = 3$ ml; 2. $t_R = 45.0$ min, 90/10, % v/v, Eluent A/B isokratisch, $V = 3$ ml) gewonnen.

Das Isolat wies ein ähnliches Signalmuster, wie die zuvor beschriebene Verbindung TS7-202 (Kapitel 4.3.3.1.), im $^1\text{H-NMR}$ auf. Demnach waren unter anderem ein auffälliges, tieffeldverschobenes Proton (δH [ppm] = 11.98 (s, 1H, 8-OH)), eine Methoxygruppe (δH [ppm] = 3.95 (s, 3H, H-11)), zwei *ortho*-koppelnde Protonen im aromatischen Verschiebungsbereich (δH [ppm] = 8.13 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-6), 7.06 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, H-7)) und ein als Dublett aufgespaltenes aliphatisches Methylsignal (δH [ppm] = 1.36 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-9)) vorhanden. Das ^{13}C - und HMQC-Spektrum verdeutlichte jedoch das Fehlen einer diastereotopen Methyleinheit und zeigte stattdessen ein Oxymethin (δH [ppm] = 5.10 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, H-4), δC [ppm] = 65.3 (C-4)). Aus den COSY- und HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.3.7.) ließ sich die Verbindung als ein in vierter Position (C-4) hydroxyliertes 5-Methylcarboxymelleinderivat ableiten. Massenspektrometrische Daten aus LR-ESI-MS ($m/z = 527.1$, $[2\text{M}+\text{Na}]^+$) belegten dies als einen validen Strukturvorschlag.

Die Konfiguration an C-3 war durch das ebenfalls isolierte Melleinderivat (TS7-202) als *R*-konfiguriert festgelegt. Im Rahmen der Literaturrecherche zur Stereochemie an C-4 ergab sich, dass erst kürzlich zwei diastereomere, mit den Trivialnamen Xylarellein (*cis*-(3*R*,4*R*)-5-Carbomethoxy-4-hydroxymellein, Rukachaisirikul *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2018) und Akolitserin ((3*R*,4*S*)-5-Carbomethoxy-4-hydroxymellein; Fan *et al.* 2014) beschrieben wurden. Von diesen Melleinderivaten wurde bisher nur aus endophytischen *Xylaria* Arten berichtet, wobei der Produktionsorganismus aus einer Studie ebenfalls als *Xylaria cubensis*-Stamm (Fan *et al.* 2014) klassifiziert wurde. Ein Vergleich der chemischen Verschiebung und Kopplungskonstanten der beiden Diastereomere zeigte sehr gute Übereinstimmung zu den eigenen NMR-Daten (Tabelle 4.3.1.).

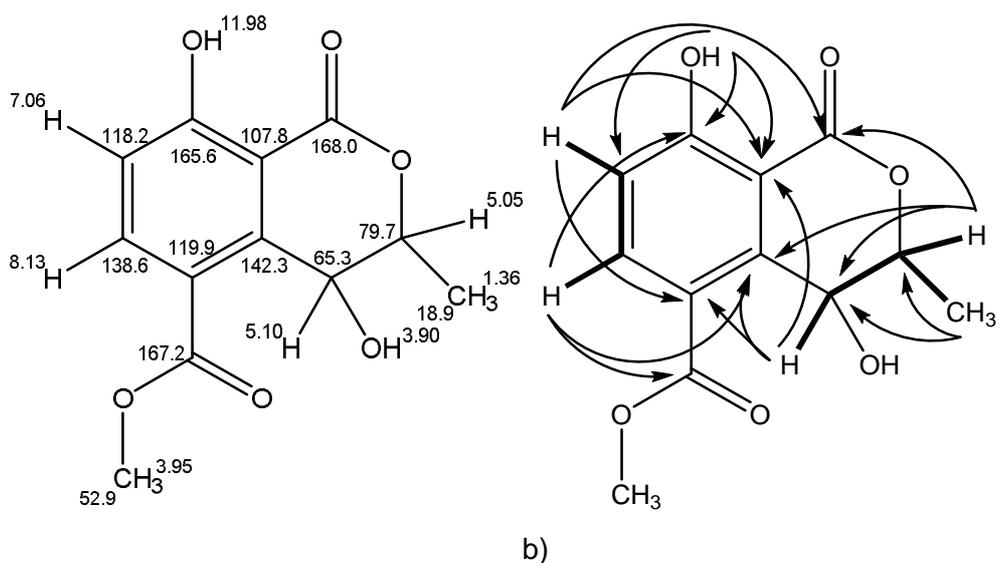


Abbildung 4.3.7.: Chemische Verschiebung von ¹H- und ¹³C-Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von TS7-230-1 in CDCl₃ (eigene Darstellung).

Nach der Karplus-Beziehung sind Kopplungskonstanten zwischen *vicinalen*-Protonen in Abhängigkeit zum Bindungswinkel (Dieder-Winkel) in bestimmten Wertebereichen vorzufinden. Sie können damit zur Ableitung der Konfigurationen herangezogen werden. Im vorliegenden Fall waren die Werte der Kopplungskonstanten zwischen den Protonen an C-3 und C-4 allerdings sehr ähnlich und ließen daher keine Aussage zum Bindungswinkels bzw. der Konfiguration zu. Ein Vergleich der spezifischen Drehwerte von TS7-230-1 ($\alpha_D^{30} = +107$, $c = 0.1$, CDCl₃) zur den Referenz Verbindungen Akolitserin ($\alpha_D^{23} = +126$, $c = 0.05$, CDCl₃) bzw. Xylarellein ($\alpha_D^{25} = -58$, $c = 0.04$, CDCl₃) zeigte eindeutig, dass die isolierte Verbindung als Akolitserin ((3*R*,4*S*)-4,8-Dihydroxy-3-methyl-1-oxisochroman-5-methylcarboxylat) identifiziert werden konnte.

Tabelle 4.3.1.: Vergleich der NMR-Daten von TS7-230-1, Akolitserin und Xylarellein.

Position	TS7-230-1 (CDCl ₃)		Fan <i>et al.</i> 2014 Akolitserin (3 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)(CDCl ₃)		Rukachaisirikul <i>et al.</i> 2013 Xylarellein (3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)(Aceton-D ₆)	
	δ ¹ H (m, J [Hz])	δ ¹³ C	δ ¹ H (m, J [Hz])	δ ¹³ C	δ ¹ H (m, J [Hz])	δ ¹³ C
1	-	168.0	-	167.9	-	168.0
2	-	-	-	-	-	-
3	5.05 (qd, 7.0, 1.6)	79.7	5.05 (qd, 6.9, 1.5)	79.5	5.00 (dd, 7.0, 2.0)	80.4
4	5.10 (d, 1.6)	65.3	5.10 (dd, 3.6, 1.5)	65.1	5.59 (dd (4.0, 2.0)	64.0
4a	-	142.3	-	142.1	-	142.5
5	-	119.9	-	120.0	-	120.3
6	8.13 (d 9.0)	138.6	8.13 (d, 8.7)	138.5	8.17 (d, 9.0)	138.4
7	7.06 (d 9.0)	118.2	7.06 (d, 8.7)	118.1	7.08 (d, 9.0)	117.3
8	-	165.6	-	165.4	-	166.0
8a	-	107.8	-	107.6	-	107.9
9	1.36 (d, 7.0)	18.9	1.39 (d, 6.9)	18.8	1.30 (d, 6.5)	17.1
10	-	167.2	-	167.0	-	166.0
11	3.95 (s)	52.9	3.95 (s)	52.7	3.89 (s)	51.7
4-OH	3.90 (s, breit)	-	3.91 (breit, dd, 3.6)	-	4.89 (d, 4.0)	-
8-OH	11.98 (s)	-	11.98 (s)	-	11.94	-

4.3.3.3. (+)-Griseofulvin (TS7-207)

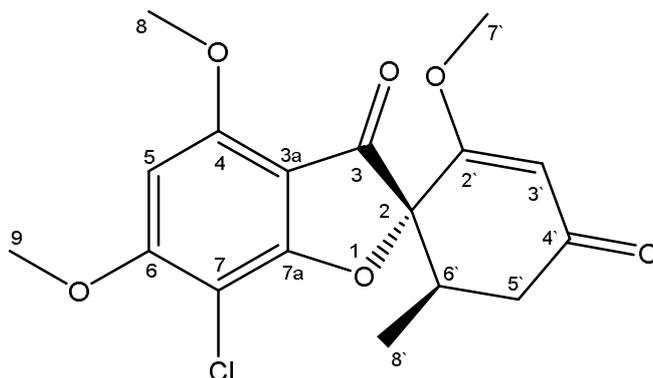
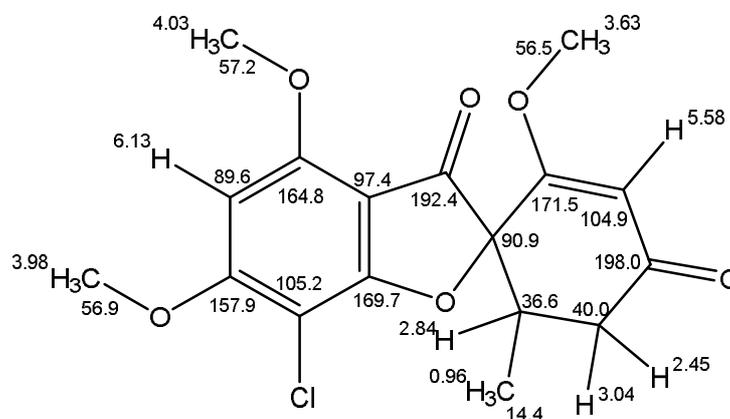


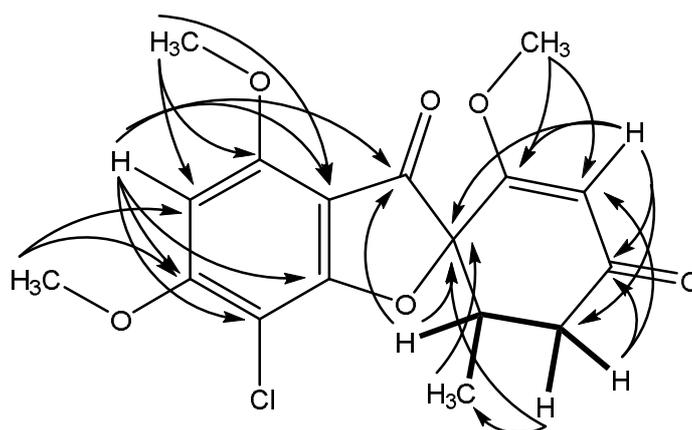
Abbildung 4.3.8.: Struktur von Verbindung TS7-207 (eigene Darstellung).

Die in Abbildung 4.3.8. dargestellte Verbindung (TS7-207) wurde als farbloser Feststoff ($m = 9.98$ mg) nach zweifacher präparativer RP-HPLC (1. $t_R = 42.0$ min, Standardmethode 1, $V = 10$ ml/min; 2. $t_R = 25.5$ min, 75/25 % v/v, Eluent A/B isokratisch, $V = 4$ ml/min) aus der zytotoxisch aktivsten Hauptfraktion 12 ($IC_{50} = 75$ ng/ml, $m = 88.6$ mg) isoliert. Spektroskopische Untersuchungen lieferten für das 1H -NMR zwei Signale im aromatischen bzw. olefinischen Protonenbereich (δ_H [ppm] = 6.13 (s, 1H, H-5), 5.58 (s, 1H, H-9) und drei Resonanzen, die oxygenierte Methylgruppen erwarten ließen (δ_H [ppm] = 4.03 (s, 3H, H-8), 3.98 (s, 3H, H-9), 3.63 (s, 3H, H-7')), sowie eine aliphatische Methylgruppe (δ_H [ppm] = 0.96 (s, 3H, H-8')) und ein drei-Protonen Spinsystem (δ_H [ppm] = 3.04 (dd, $J = 16.8, 13.4$ Hz, 1H, H-5'), 2.84 (dq, $J = 13.4, 6.7, 4.7$ Hz, 1H, H-6'), 2.45 (dd, $J = 16.8, 4.7$ Hz, 1H, H-5'')), welches mit der aliphatischen Methylgruppe koppelte. Durch das HMQC-Spektrum ließen sich zwei Protonen des Spinsystems einer diastereotopen Methylengruppe (δ_C [ppm] = 40.0 (C-5')) zuordnen. Im ^{13}C -NMR wurden Resonanzen für insgesamt 17 Kohlenstoffatome beobachtet. Besonders auffällig waren die stark entschirmten Carbonylkohlenstoffe (δ_C [ppm] = 198.0 (C-4'); 192.5 (C-3)) über 190 ppm, sowie die hochfeldverschobenen sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffe, die auf Sauerstofffunktionen in α - bzw. *ortho*-Position hinwiesen. Ebenfalls auffällig waren die Signalmuster der Isotopenpeaks in der massenspektrometrischen Analyse. Die Isotopenverteilung mit einem intensiv präsenten $[M+2]$ -Isotop ließ auf eine Monochlorierung der Verbindung schließen. Die HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.3.9b.) ermöglichten die Etablierung eines Strukturvorschlages. Entscheidend für die Generierung der Benzofuranon-Substruktur waren die schwach intensiven $^4J_{C,H}$ -Korrelationen zur Carbonylgruppe (C-3) und zu C-7a ($\delta_C = 169.7$ ppm), welche die Anknüpfungspunkte zum Furanonteil festlegten. Die ebenfalls schwachen $^4J_{C,H}$ Kopplung der Methoxygruppen an C-4 ($\delta_C = 164.8$ ppm) und C-6 ($\delta_C = 157.9$ ppm) zum aromatischen Proton verdeutlichten die jeweilige *ortho*-Position zu diesem. Die *diortho*-Oxygenierung des aromatischen Protons wurde auch durch schwache Kreuzsignale im COSY zu den Methoxyprotonen, sowie durch die starke Abschirmung bzw. Hochfeldverschiebung (δ_C [ppm] = 89.6 (C-5)) unterlegt (vgl. $\delta_C = 128.5$ ppm in Benzol,

Pretsch *et al.* 2010). Der noch fehlende Substituent am aromatischen Ring wurde mit dem Halogenatom besetzt. Die andere Substruktur wurde maßgeblich durch HMBC-Signale des stark aufgespaltenen Protonensignals (H-5') zum Carbonyl an C-3, welches zudem die Verbindung der beiden Substrukturen ermöglichte, sowie durch dessen Kreuzsignale im COSY, etabliert. Des Weiteren waren die HMBC-Signale des olefinischen Protons an C-3' ($\delta_C = 104.9$) für die Etablierung des Cyclohexenon Ringes wichtig. Die Identität der Struktur wurde durch die Masse der Natriumadduktionen ($m/z = 375.1 [M+Na]^+$ und $m/z = 727.0 [2M+Na]^+$), welche die Elementarzusammensetzung der vorgeschlagenen Verbindung ($C_{17}H_{17}ClO_6$) bestätigte, bewiesen. Die starke Entschirmung des Kohlenstoffatoms mit der Methoxygruppe an C-7' ($\delta_C = 171.5$ ppm) lässt sich durch die beiden Carbonyle in β -Position erklären. Die chemischen Verschiebungen wurden in Abbildung 4.3.9a. vollständig zugeordnet.



a)



b)

Abbildung 4.3.9.: a) Chemische Verschiebung von 1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von TS7-207 in $CDCl_3$ (eigene Darstellung).

Die Überprüfung des Drehwertes ($[\alpha]_D^{22} = +235$, $c = 0.499$, CHCl_3), welcher allerdings auffällige Abweichung zu den Literaturwerten ($[\alpha]_D^{17} = +370$, CHCl_3 (Milne 2000)) zeigte, ließ vermuten, dass es sich um die literaturbekannte Verbindung (+)-Griseofulvin handelt. Gründe für die Unterschiede der gemessenen Drehwerte zu den Literaturdaten könnten in abweichenden Messbedingungen (z.B. Temperatur) oder in der Präsenz des Enantiomers liegen. Zur Überprüfung der Konfiguration an beiden Stereozentren wurden Einkristalle durch Eindampfen von einer Hexan/Acetonmischung gewonnen und einer Kristallstrukturanalyse unterzogen (Abbildung 4.3.10.).

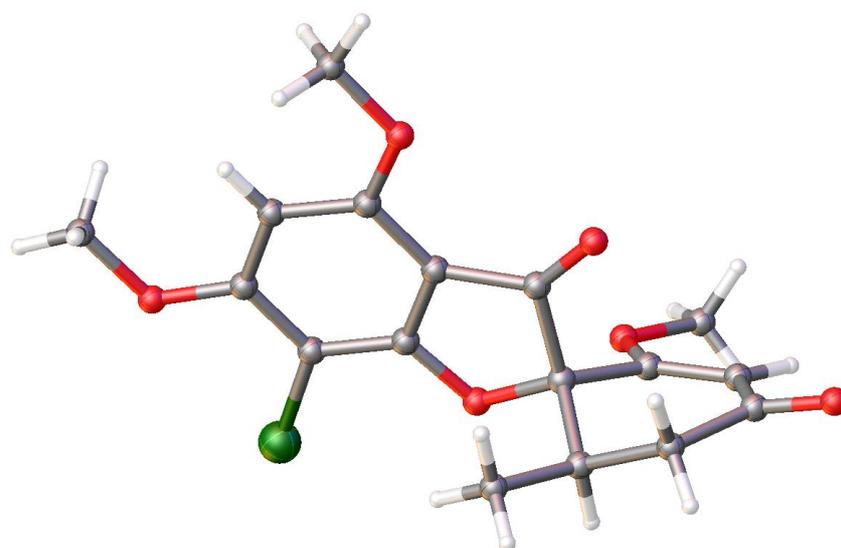


Abbildung 4.3.10.: Kristallstruktur von Griseofulvin (C - grau, H - weiß, O - rot, Cl - grün) (eigene Darstellung).

Trotz der Abweichung zu den in der Literatur verfügbaren Drehwerten zeigte die Kristallstruktur eindeutig, dass es sich um die Spiroverbindung (+)-Griseofulvin ((2*S*,6'*R*)-7-chloro-2',4,6-trimethoxy-6'-methyl-3*H*-spiro[benzofuran-2,1'-cyclohexan]-2'-en-3,4'-dion) handelt.

Das Enantiomer (-)-Griseofulvin ist ebenfalls bekannt, allerdings nur als Syntheseprodukt (Brossi *et al.* 1962) bzw. nach Biotransformation durch *Streptomyces* sp. (Sato *et al.* 1981).

(+)-Griseofulvin wurde bereits im Jahr 1939 aus *Penicillium griseofulvum* beschrieben (Oxford *et al.* 1939) und danach teilweise unter einem anderem Namen ("curling factor"), nach Beobachtung der Verdrehung von Pilzhyphen aus *Penicillium janczewskii* erneut entdeckt (Petersen *et al.* 2014). Die Bildung von Griseofulvin scheint weit verbreitet in *Penicillium* sp., denn sie ist wenigstens für 16 verschiedene *Penicillium*-Arten beschrieben. Weiterhin, wenn auch in vereinzelt Arten der Gattung, ist die Produktion von (+)-Griseofulvin in *Aspergillus* (*A. lanosus*), *Phomopsis* und *Memnoniella* (*M. echinata*) belegt. Hingegen ist das Auftreten von (+)-Griseofulvin durchgehend in *Xhuskia*-Arten und deren anamorphen Vertretern (*Nigrospora*) als monophyletisches Merkmal bekannt. Ein genauer taxonomischer Vergleich der Produzenten lässt den Schluss zu, dass die Griseofulvin-Biosynthesefähigkeit we-

nigstens 13 Mal in separaten evolutionären Ereignissen aufgetreten ist (Larsen *et al.* 2005). Neuere Studien nennen sogar die Verbreitung in weiteren Taxa, unter anderem in *Stachybotrys levispora* (Ribeiro *et al.* 2018, Ord.: Hypocreales, Fam.: Stachybotryaceae), *Arthrinium* sp. (Elissawy *et al.* 2017, Ord.: Xylariales, Fam.: Apiosporaceae) und ebenfalls *Xylaria* sp. (Rukachaisirikul *et al.* 2013, Ord.: Xylariales, Fam.: Xylariaceae). Bei vielen Griseofulvin-produzierenden Stämmen handelt es sich ebenfalls um endophytische Pilze (z.B. Xue *et al.* 2006, Rukachaisirikul *et al.* 2013, Ali *et al.* 2017).

Hauptsächlich ist Griseofulvin durch seine fungizide Wirkung als eines der ersten antimykotischen Naturstoffen aus filamentösen Pilzen bekannt (Larsen *et al.* 2005). Auf dieser Grundlage wird es je nach Quelle seit 1956 bzw. 1959 kommerziell als Medikament gegen Fadenpilze (Dermatophyten) bei Tieren und Menschen genutzt und ist bis heute in der Anwendung (Hector *et al.* 2005, Peterson *et al.* 2014). Erneutes Interesse und weitere mögliche Anwendungen generieren Berichte über antimittotische und antivirale Eigenschaften. Obwohl der antiproliferative Effekt nicht stark ausgeprägt ist und erst bei hohen mikromolaren-Dosen auftritt, wurde die Inhibierung der Tubulinpolymerisation und die Störung der Mikrotubulodynamik beobachtet (Panda *et al.* 2005, Petersen *et al.* 2014). In Kombination mit anderen antimittotischen Medikamenten (z.B. Nodcodazole, Ho *et al.* 2001) lässt sich die Wirkung allerdings potenzieren, was den Einsatz als Supplement in der Antitumortherapie wiederum interessant erscheinen lässt (Panda *et al.* 2005). Der synergistische Effekt zusammen mit anderen antimittotischen Verbindungen (siehe Kapitel 4.3.1.) erklärt somit eventuell die bereits im Rohextrakt festgestellte hohe zytotoxische Aktivität gegen die KB-3-1 Zelllinie ($IC_{50} = 5.1 \mu\text{g/ml}$). Der IC_{50} -Wert von isoliertem Griseofulvin ($IC_{50} = 14 \mu\text{M}$) wurde gegenüber der KB-3-1 Zelllinie bestimmt und ist damit in Übereinstimmung zu den Literaturwerten (z.B. HeLa-Zelllinie, $IC_{50} = 20 \mu\text{M}$, Bladt *et al.* 2013).

Griseofulvin ist gutes Beispiel für die Produktion bioaktiver Metaboliten durch Endophyten. Da die Isolierung des Metaboliten sehr oft von verschiedensten Taxa berichtet wurde, wäre die Entwicklung einer Dereplikationstrategie zur Verhinderung der Reisolierung innerhalb mykochemischer Untersuchungen wünschenswert. Aktuelle Studien zeigen, dass das Interesse und die Entwicklung von verbesserten Griseofulvinanaloga nicht abgeschlossen ist (Hamdy *et al.* 2017). Die Isolierung von Griseofulvinderivaten im Rahmen mykochemischer Studien wäre demnach weiterhin relevant.

4.3.3.4. Cytochalasin C (TS7-218)

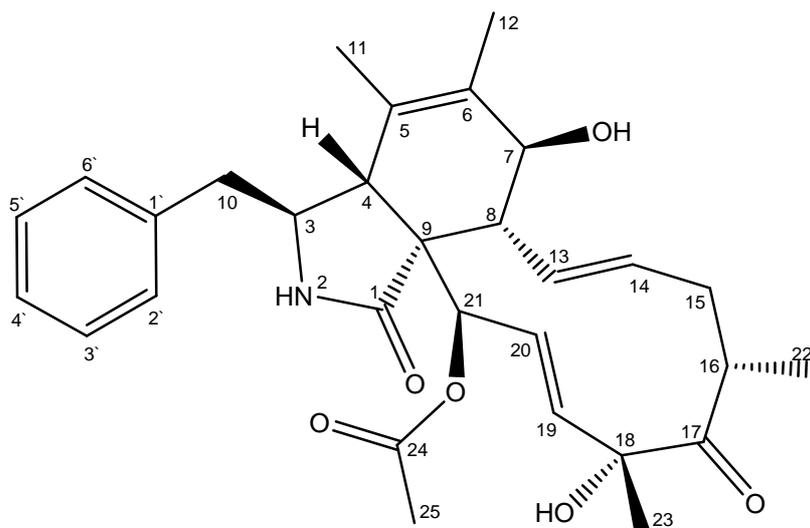


Abbildung 4.3.11.: Struktur von Verbindung TS7-218 (eigene Darstellung).

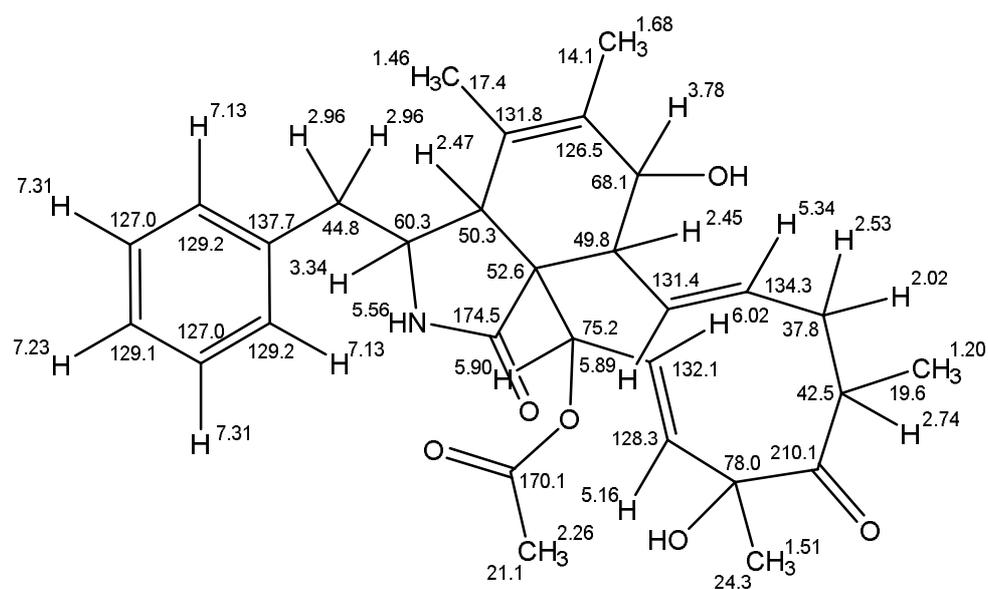
Die Verbindung mit der Struktur aus Abbildung 4.3.11. wurde als farbloser Feststoff ($m < 2.56$ mg) aus der potentesten Fraktion des Zytotoxizitätstest (Hauptfraktion 12, $m = 88.6$ mg, $IC_{50} = 75$ ng/ml) nach zweifacher RP-HPLC (1. $t_R = 47.5$ min, Standardmethode 1, $V = 10$ ml/min; 2. $t_R = 30.5$ min, 30/70, % v/v, Eluent A/B, isokratisch, $V = 4$ ml/min) gewonnen.

Das 1H -NMR zeigte komplexe Signalmuster mit vielen Signalgruppen ($n = 22$). Unter anderem ließen sich fünf Protonen im aromatischen Bereich ausmachen, welche teilweise vom Lösemittelsignal ($CDCl_3$) überdeckt waren. Die Signalaufspaltung von diesen führte zur Erscheinung eines Triplets (δ_H [ppm] = 7.31 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-3' und H-5')), eines weiteren Triplets (δ_H [ppm] = 7.23 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H, H-4')) und eines Dubletts (δ_H [ppm] = 7.17 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-2' und H-6')). Die Kopplungsmuster und relativen Integralverhältnisse wiesen folglich auf eine Phenylgruppe hin. Zusätzlich waren fünf Methylgruppen (δ_H [ppm] = 2.26 (s, 3H, H-25), 1.68 (s, 3H, H-12), 1.51 (s, 3H, H-23), 1.46 (s, 3H, H-11), 1.20 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-22)) und vier Protonen im olefinischen Verschiebungsbereich augenscheinlich (δ_H [ppm] = 6.02 (dd, $J = 15.6, 2.5$ Hz, 1H, H-20), 5.89 (dd, $J = 15.8, 2.5$ Hz, 1H, H-13), 5.34 (ddd, $J = 15.8, 10.6, 5.4$ Hz, 1H, H-14), 5.16 (dd, $J = 15.6, 2.3$ Hz, 1H, H-19)). Weitere zwei Signale aus dem olefinischen Verschiebungsbereich (δ_H [ppm] = 5.90, (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-21), 5.56 (s breit, 1H, NH)) konnten im HMQC-Spektrum durch die chemische Verschiebung des Kohlenstoffatoms (δ_C [ppm] = 75.2 (C-21)) einem oxygenierten Methin bzw. durch die Abwesenheit des HMQC-Signals einem Heteroatomprotonen, zugeordnet werden.

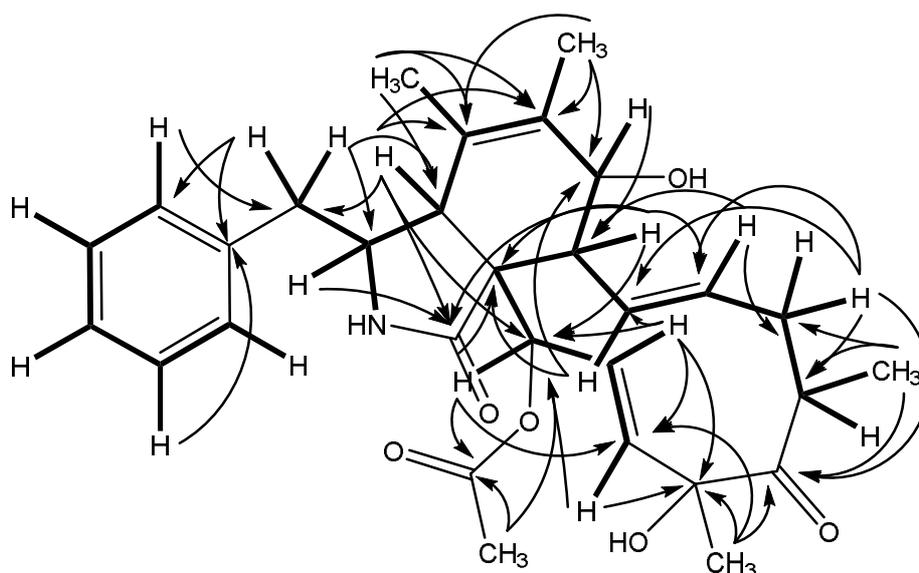
Zwischen den genannten Verschiebungen der Methylgruppen und der olefinischen Protonen zeigten sich noch weitere Signalgruppen ($N = 7$) mit deutlicher Feinaufspaltung, welche sich verschiedenen Methingruppen (δ_H [ppm] = 3.78 (m, 1H, H-7), 3.34 (m, 1H, H-3), 2.74 (m,

1H, H-14), 2.47 (s breit, 1H, H-4)) und zwei Methyleinheiten (δH [ppm] = 2.96 (m, 2H, H-10 und H-10'), 2.53 (m, 1H, H-15), 2.02 (m, 1H, H-15')) zuordnen ließen. Das ^{13}C -NMR zeigt 28 Signale, wobei zwei Signale (δC [ppm] = 129.2 (C-2' und C-6'); 127.0 (C-3' und C-5')) etwa die doppelte Signalintensität aufwiesen (Symmetrieeigenschaft der Phenylgruppe). Damit ergaben sich für das Molekül insgesamt 30 Kohlenstoffatome. Auffällig waren die chemischen Verschiebungen im Tieffeld, welche als Carbonylgruppen, davon eine als Keto (δC [ppm] = 210.1 (C-17)) und zwei als Ester- (δC [ppm] = 170.1 (C-24)) bzw. Amidfunktion (δC [ppm] = 174.5 (C-1)) vorliegend, zu identifizieren waren. Die geradzahigen Nominalmassen der Ionenaddukte im Nano-ESI (m/z = 530.3 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, m/z = 1032.4, [$2\text{M}+\text{Na}$] $^+$), wiesen auf das Vorhandensein von Stickstoff hin. Zusammen mit der Anzahl der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome aus den 1d-NMR-Experimenten ließ sich die Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_6$) ableiten. Ein intensiver Abgleich der vielfachen HMBC- und COSY-Korrelationen als nahezu ein großes Spinsystem (Abbildung 4.3.12b.) führte zur kompletten Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.3.12a.). Kritisch für Strukturerstellung waren die HMBC-Korrelationen der beiden Protonen bei δC = 2.47 ppm (H-4) und δC = 2.43 ppm (H-8) zum Amidcarbonyl, da diese die Etablierung des zentralen Perhydroisindolon-Gerüsts ermöglichten. Des Weiteren waren die übereinstimmenden Signale der Protonen H-4, H-8 und H-21 im HMBC, insbesondere die Korrelationen zum zentral verbrückenden quaternären Kohlenstoff bei δC = 52.6 (C-9), für die Erstellung des Grundgerüsts wichtig. Diese ermöglichte die Positionierung eines elfgliedrigen Makrozyklusses an das zentrale Perhydroisindolon-Gerüst.

Die Verbindung mit den dargelegten Strukturelementen (Perhydroisindolon-Grundgerüst, elfgliederiger Makrozyklus, Phenylring, etc.) konnte als die literaturbekannte Verbindung Cytochalasin C identifiziert werden. Die Stereochemie wurde aus der Kristallstruktur (Abbildung 4.3.14.) eines Cytochalasin C Derivats (Cytochalasin D, TS7-223, siehe Kapitel 4.3.3.4.), welches ebenfalls aus Stamm TS7 isoliert wurde, abgeleitet. Die bioaktiven Eigenschaften und Organismen aus denen Moleküle der Verbindungsklasse der Cytochalasine isoliert wurden, werden nachfolgend in Kapitel 4.3.3.6 diskutiert.



a)



b)

Abbildung 4.3.12.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von TS7-218 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

4.3.3.5. Cytochalasin D (TS7-232-2)

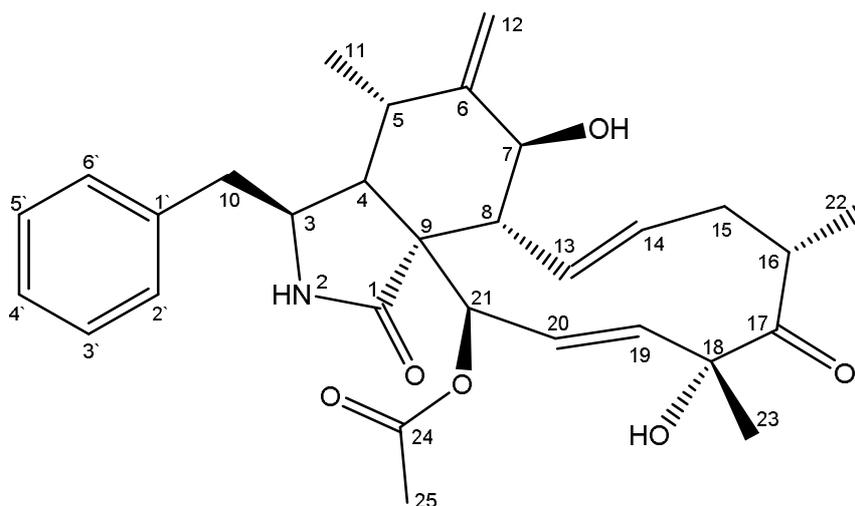
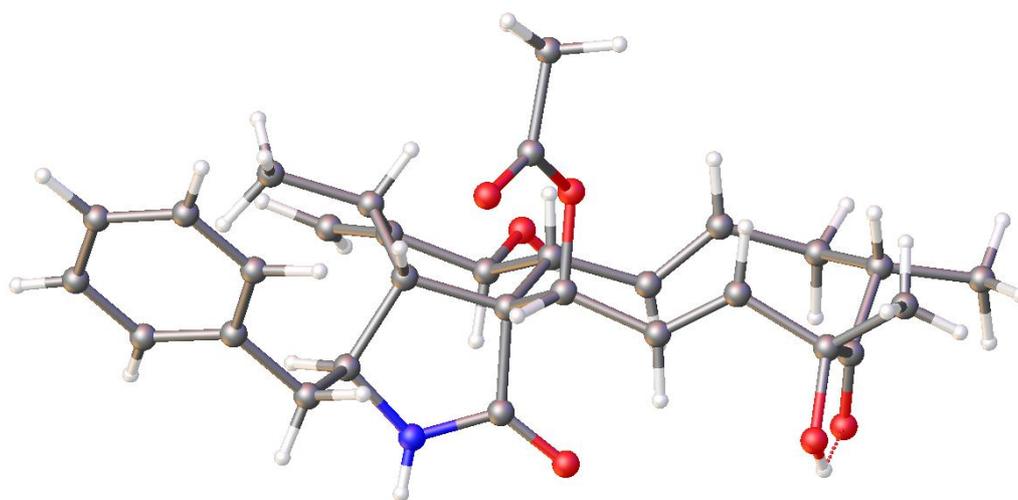


Abbildung 4.3.13.: Struktur von Verbindung TS7-223-2 (eigene Darstellung).

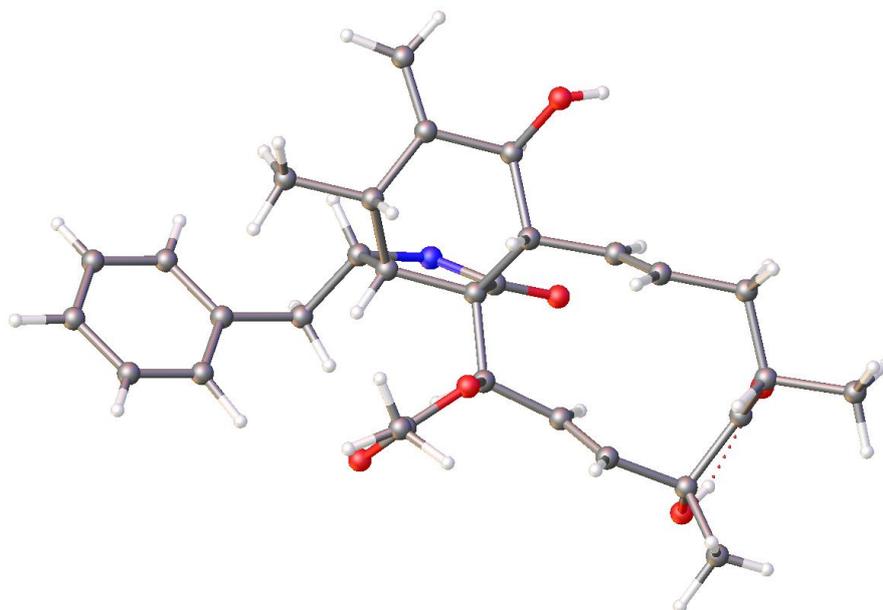
Die Verbindung TS7-223 (Abbildung 4.3.13.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 202$ mg) aus der biologisch aktiven Hauptfraktion 13 ($m = 354$ mg, $IC_{50} = 3.2 \mu\text{g/ml}$) nach SEC (60/40, % v/v, DCM/MeOH) mit Sephadex LH-20 gewonnen. Die Verbindung wurde danach teilweise noch weiter über RP-HPLC ($t_R = 40.0$ min, 75/25, % v/v, Eluent A/B isokratisch, $V = 3$ ml/min) gereinigt. Aufgrund der begrenzten Löslichkeit (~ 15 mg/ml in ACN), des komplexen Elutionsverhaltens ("Peakfronting") in den RP-HPLC Trennläufen und der bereits für die NMR-Auswertung ausreichenden Reinheit der Ausgangsfraktion wurde nur ein kleiner Teil der Fraktion durch RP-HPLC weiter aufgereinigt. Die Substanz (TS7-223-2, $m \sim 12$ mg) aus diesen Trennläufen wurde aufgrund der besseren Qualität der Messdaten zur Strukturaufklärung genutzt.

Die Substanz zeigte deutliche Ähnlichkeit bei der Signalverteilung im $^1\text{H-NMR}$ und $^{13}\text{C-NMR}$ zu TS7-218 (Cytochalasin C). Im Unterschied war allerdings die Abwesenheit einer Methylgruppe bei gleichzeitigem Vorhandensein zweier zusätzlicher Protonen im olefinischen Verschiebungsbereich (δH [ppm] = 5.30 (s breit, 1H, H-12), 5.09 (s breit, 1H, H-12')) und eines weiteren Protons, wenn auch überlagert, im aliphatischen Verschiebungsbereich (δH [ppm] = 2.73 (m, 1H, H-5)) des $^1\text{H-NMR}$ nachvollziehbar. Gleiches war im $^{13}\text{C-NMR}$ zu beobachten. Auffällig waren die drei präsenten Verschiebungen (δC [ppm] = 147.7 (C-6), 114.6 (C-12), 32.8 (C-5)) bei zu TS7-218 gleichbleibender Kohlenstoffanzahl von insgesamt 30 C-Atomen. Die bereits bei TS7-218 diskutierten Verschiebungen und abgeleiteten Strukturelemente (Phenylgruppe: doppelte Intensität der Signale (δC [ppm] = 129.2 (C-2' und C-6'), 129.1 (C-3' und C-5')); Carbonylgruppen (δC [ppm] = 210.4 (C-17), 173.8 (C-1), 169.8 (C-24))) waren dennoch weiterhin vorhanden. Im HMQC-Spektrum konnten die neuen Protonen im olefinischen Bereich einer terminalen Doppelbindung zugeordnet werden. Massenspektrometrische Untersuchungen mit niedrig aufgelöster ESI-MS-Messung ($m/z = 530.3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$;

$m/z = 1037.5$, $[2M+Na]^+$) zeigten wiederum nicht nur eine geradzahlige Nominalmasse aus der sich das Vorhandensein von Stickstoff abzeichnete, sondern auch die Ableitung derselben elementaren Zusammensetzung ($C_{30}H_{37}NO_6$). Dies führte zur Etablierung eines zu TS7-218 sehr ähnlichen Grundgerüsts als Konstitutionsisomer mit ebenfalls kompletter Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.3.15a.). Dennoch wurden alle Korrelationen insbesondere die zahlreichen COSY- und HMBC-Resonanzen erneut überprüft (Abbildung 4.3.15b.). Die Konfiguration an den Stereozentren konnte durch eine Kristallstrukturanalyse (Abbildung 4.3.14.) geklärt werden.



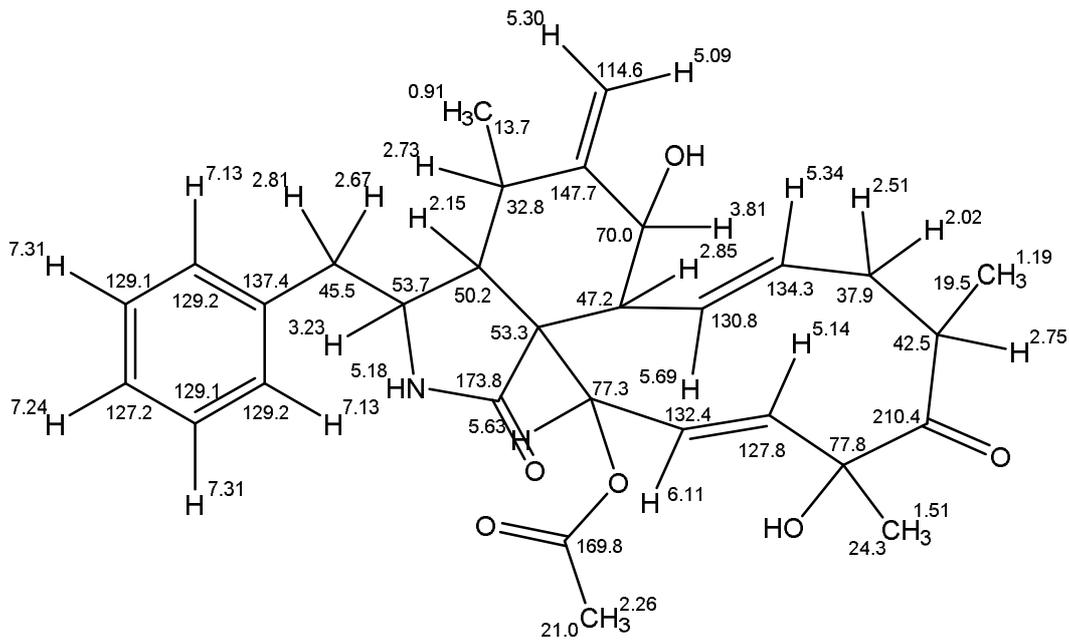
a)



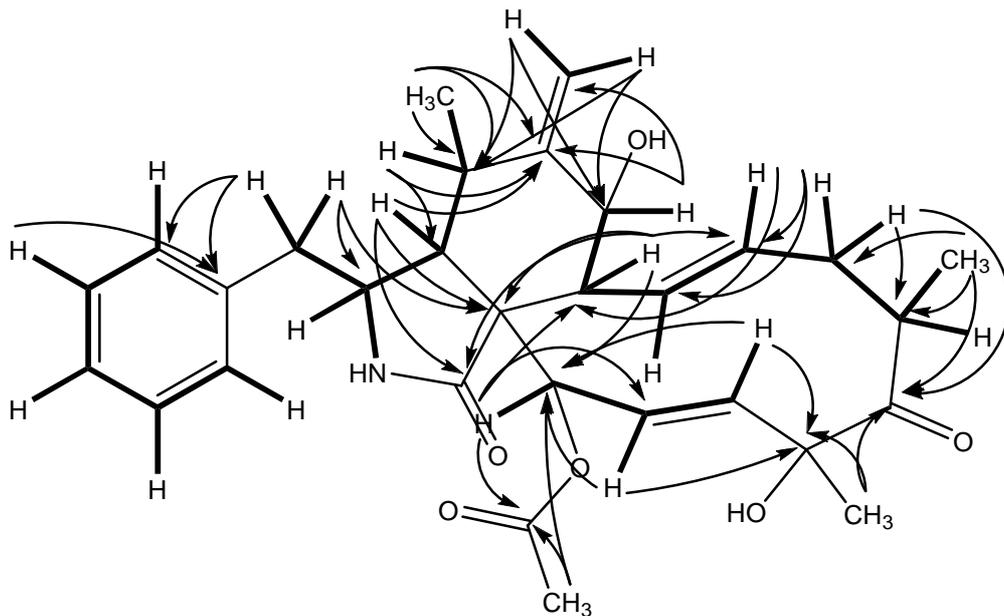
b)

Abbildung 4.3.14.: Kristallstruktur von Cytochalasin D (TS7-223-2): a) Pyrrolring in Zeichenebene (oben), b) Cyclohexanring in Zeichenebene (unten), (C - grau, H - weiß, O - rot, N- blau) (eigene Darstellung).

Der Metabolit wurde als die ebenfalls literaturbekannte Verbindung Cytochalasin D (syn.: Zygosporine A) identifiziert. Es handelt sich demnach nicht um das ebenfalls aus natürlicher Quelle isolierte Diastereomer Hypoxylin A (Wang *et al.* 2005). Die Verbindung stellte neben den ubiquitär vorhandenen Fettsäuren mengenmäßig den Hauptmetabolit des Extraktes dar. Die im Vergleich zu anderen isolierten Verbindungen hohen Metabolitmengen scheinen die Relevanz der Verbindungen für den Organismus zu unterstreichen. Die biologischen Eigenschaften und weitere Produktionsstämme werden in Kapitel 4.3.4.6. diskutiert.



a)



b)

Abbildung 4.3.15.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von TS7-223-2 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

4.3.3.6. 19,20-Epoxycytochalasin D (TS7-235)

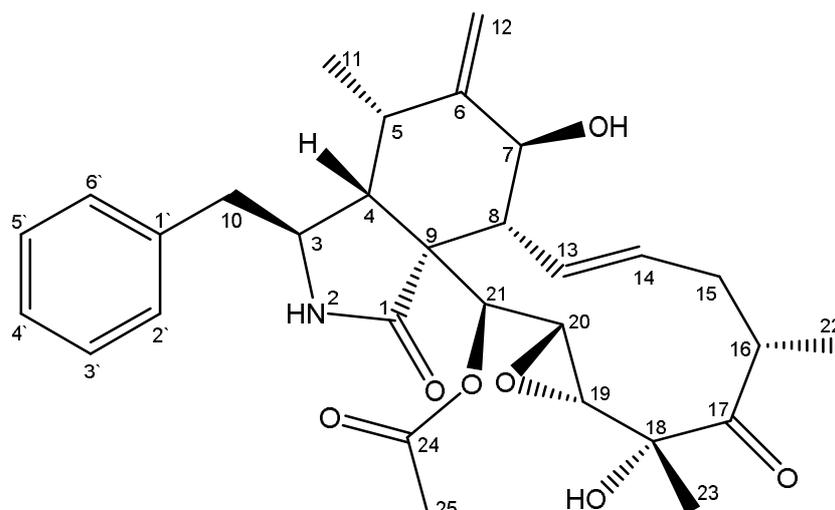


Abbildung 4.3.16.: Struktur von Verbindung TS7-235 (eigene Darstellung).

Die Verbindung TS--235 (Abbildung 4.3.16.) wurde ebenfalls als farbloser Feststoff ($m = 7.80$ mg) nach SEC (75/25, % v/v, DCM/MEOH) und zweifacher RP-HPLC (1. $t_R = 73.0$ min, Standardmethode 1, Eluent C/D, $V = 2$ ml/min; 2. $t_R = 33.0$ min, 75/25, % v/v, Eluent A/B, isokratisch) isoliert. Die Verbindung zeigte erneut ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie sie auch schon für die anderen beiden oben genannten Moleküle (Kapitel 4.3.3.3. und 4.3.3.4.) beobachtet und diskutiert wurden. Der Unterschied im $^1\text{H-NMR}$ im Vergleich zu Cytochalasin D war allerdings durch den Verlust zweier Protonen-Signale im olefinischen Bereich deutlich, was die Veränderung an einer der Doppelbindungen nahelegte. Der Befund bestätigte sich durch die Abwesenheit zweier Signale für sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome im Bereich von 125-135 ppm.

Die Strukturaufklärung und die Formulierung der chemischen Zuordnung waren dennoch zunächst nicht zielführend, da zwei Signale (δC [ppm] = 174.0 (C-1), 52.8 (C-9)) aus der zentralen Perhydroisoindolonstruktur im Vergleich zu den anderen Signalen sehr geringe Intensitäten aufwiesen und folglich nicht in die Strukturaufklärung mit einbezogen wurden. Die somit abgeleitete Kohlenstoffanzahl und Strukturvorschläge ließen sich nicht mit den Daten ($m/z = 546.3$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) aus den LR-ESI-Experimenten in Einklang bringen. Eine Messung des $^{13}\text{C-NMR}$ in MeOH-D_4 zeigte allerdings die in CDCl_3 fehlenden Signale für diese Kohlenstoffe und führte zur Zuordnung der chemischen Verschiebung anhand der COSY- und HMBC-Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.3.17.). Durch spätere durchgeführte HR-LC-MS ($m/z = 524.2665$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, $m/z = 1047.5177$, $[\text{2M}+\text{H}]^+$) konnte zudem die Summenformel ($\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{NO}_7$) bestätigt werden. Die Verbindung zeigte eine Epoxidierung an Position C-19 bzw. C-20. Das isolierte Molekül war damit allerdings bereits als 19,20-Epoxycytochalasin D literaturbekannt. Die Konfiguration der Stereozentren wurde vom Hauptmetabolit Cytochalasin D anhand der Kristallstruktur (Abbildung 4.3.14) abgeleitet. Speziell am Epoxid wurde

die ermittelte Konfiguration nach Shi & Zhan (2007), welche die Konfiguration am Epoxid vor kurzem durch intensive Überprüfung von NOESY-Korrelationen und Kristallstrukturanalysen revidieren konnten, übernommen. Die Diskussion und Einordnung der Verbindung erfolgt im nachfolgenden (Kapitel 4.3.4.).

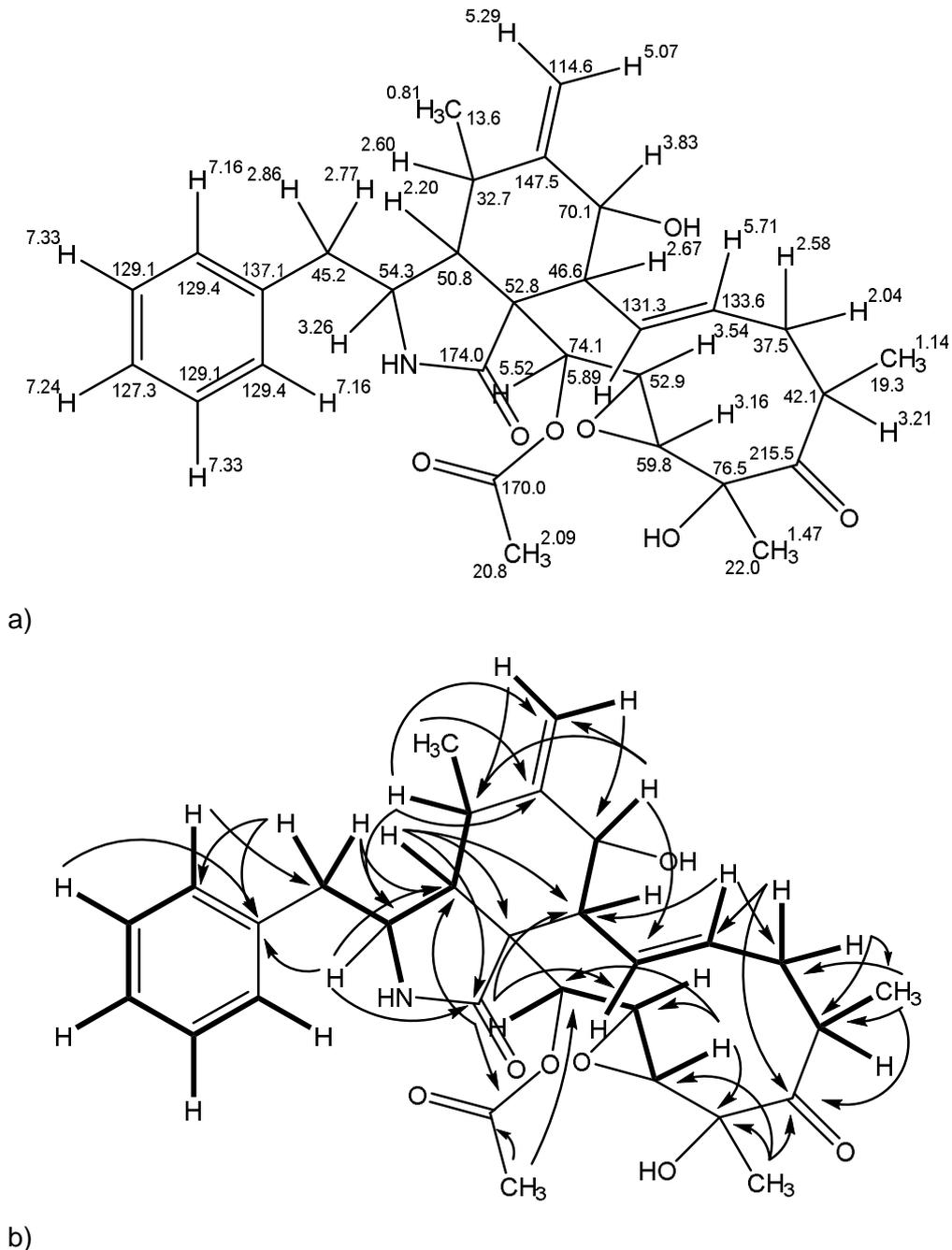


Abbildung 4.3.17.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von TS7-235 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

4.3.3.7. Hirsutatin (TS7-232a)

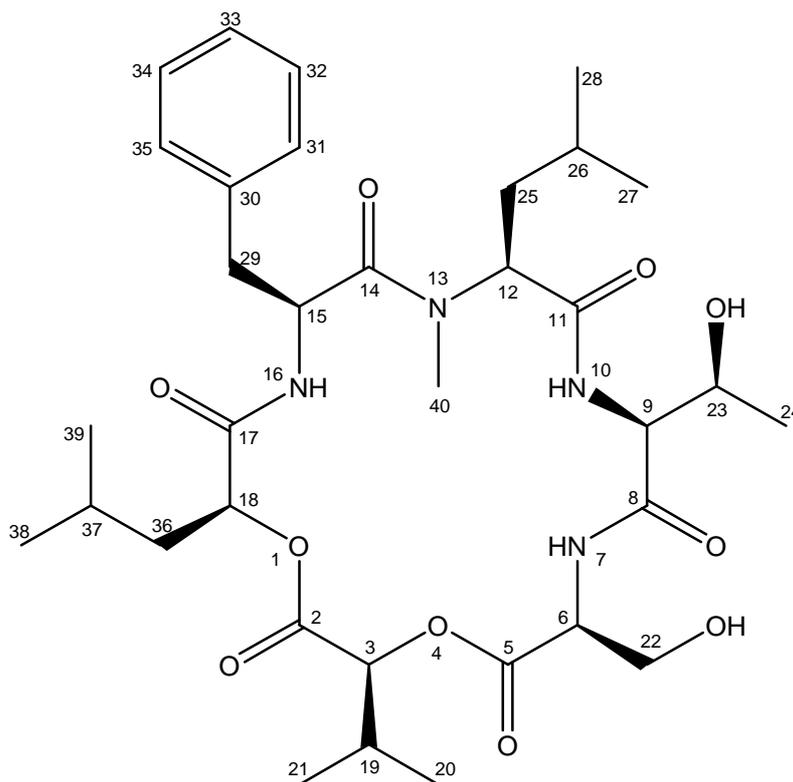


Abbildung 4.3.18.: Struktur von Verbindung TS7-232a (eigene Darstellung).

Die als farbloser Feststoff ($m = 5.10$ mg) mit dem Verbindungscode TS7-232a (Abbildung 4.3.18.) isolierte Verbindung, wurde nach SEC (75/25, % v/v, DCM/MeOH) und zweifach präparativer RP-HPLC (1. $t_R = 95.0$ min, Standardmethode 1, Eluent C/D, $V = 2$ ml/min; 2. $t_R = 33.5$ min, 75/25 % v/v, Eluent A/B, isokratisch, $V = 3$ ml/min) aus der zytotoxisch zweitaktivsten Fraktion 14 ($m = 141$ mg, $IC_{50} = 0.8$ μ g/ml) gewonnen.

Spektroskopische Untersuchungen ergaben ein komplexes 1H -NMR mit über 30 koppelnden Signalgruppen. Prominenten Gruppen waren die sieben aliphatischen Methylgruppen zwischen 0.82 - 1.19 ppm (δ_H [ppm] = 1.19 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-24), 1.06 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-20), 1.04 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-21), 0.94 (d, $J = 3.7$ Hz, 3H, H-38), 0.92 (d, $J = 3.7$ Hz, 3H, H-39), 0.86 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-27), 0.82 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H, H-28)), sowie eine tieffeldverschobene Methylgruppe (δ_H [ppm] = 3.06 (s, 3H, N-CH₃)). Die vergleichsweise geringe Tieffeldverschiebung des Kohlenstoffs dieser Methylgruppe (δ_C [ppm] = 40.8 (C-40)), zum Beispiel gegenüber Methoxygruppen aus dem HMQC-Spektrum, ließ eine *N*-Methylierung als strukturelles Element erwarten. Des Weiteren fielen sieben tieffeldverschobene Signale zwischen 3.5 und 5.5 ppm auf (δ_H [ppm] = 5.50 (dd, $J = 7.8, 4.7$ Hz, 1H, H-18), 5.34 (ddd, $J = 10.3, 8.6, 4.8$ Hz, 1H, H-15), 4.73 (d breit, $J = 7.2$ Hz, 1H, H-6), 4.67 (d, $J = 5.3$ Hz, 1H, H-3), 4.66 (q, $J = 9.5$ Hz, 1H, H-23), 4.41 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-9), 4.21 (dd, $J = 12.3, 2.0$ Hz, 1H, H-22), 4.18 (dd, $J = 12.3, 1.8$ Hz, 1H, H-22'), 3.49 (dd, $J = 5.4, 9.3$ Hz, 1H, H-12)), welche auf die nahe Bindung zu Heteroatomen (Oxymethin- und Aminomethingruppe) hinwie-

sen. Zusätzlich zeigten sich acht Protonen im Verschiebungsbereich für aromatische Wasserstoffatome. Überprüfung der HMQC-Signale zeigten, dass drei Signale (δH [ppm] = 8.18 (d, $J = 7.1$ Hz), 1H, 6-NH), 7.56 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, 15-NH), 6.71 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, 9-NH)) von diesen Heteroatomen zugewiesen werden konnten. Die anderen Protonen im aromatischen Bereich konnten, trotz der teilweisen Überlagerung durch zurückbleibendes nicht deuteriertes Lösemittelsignal, einer Phenylgruppe zugeordnet werden. Die zuvor schon bei anderen Verbindungen beschriebene und zu erwartende Verdopplung der Signalintensität von zwei Positionen (δC [ppm] = 129.6 (C-31 und C-35), 128.7 (C-32 und C-34)) im ^{13}C -NMR, aufgrund von Symmetrieeigenschaften des Phenylrings, konnten ergänzend beobachtet werden. Bezogen auf das ^{13}C -NMR zeigten sich des Weiteren insgesamt 32 Signale (34 Kohlenstoffatome) und sechs tieffeldverschobene Kohlenstoffe, welche vom Verschiebungsbereich Carbonylgruppen in Amid- und Esterfunktionen entsprechen. Bisher hervorgehobene spektroskopische Merkmale ließen ein Peptid vermuten. Aufgrund von nur drei registrierten Amidprotonen und einer N-Methylierung sind demnach zwei Positionen im Peptidbackbone durch Esterfunktionen besetzt.

Die Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.3.19.) der Amidprotonen und der α -Kohlenstoffe zu den Carbonylkohlenstoffen im HMBC-Spektrum lieferten die Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.3.20.) im Peptidrückrat und die Reihenfolge der Aminosäuren. Diese Korrelationen zeigen zudem, dass die Verbindung zyklisch ist. COSY-Kreuzsignale genauso wie die HMBC-Resonanzen halfen bei der Bestimmung der Seitenkette. Die vollständige Analyse aller 2d-NMR-Korrelationen lieferte die Struktur eines zyklischen Hexadepsipeptides (*cyclo*[-OVal, OLeu-Phe-(MMe)Leu-Thr-Ser-]. welche durch die LR-ESI-Messungen bei positiver ($m/z = 699.4$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $m/z = 366.2$, $[\text{M}+\text{Na}]^{2+}$) und negativer Ionisierung ($m/z = 675.3$, $[\text{M}-\text{H}]^-$) bestätigt wird.

Die Datenbanksuche mittels SciFinder ergab die bekannte Struktur Hirsutatin A. Besagte Verbindung wurde bisher nur von Isaka und Mitarbeitern (2005b) aus dem entomopathogenen Pilz *Hirsutella nivea* (BCC 2594) beschrieben. Dabei wurden ebenfalls Hirsutatin B (*p*-Methoxy-Hirsutatin A) isoliert. Die Stereochemie der α -Aminosäureposition wurden durch das Säurehydrolysat und einem Vergleich zu Referenzmischungen mit L- und D-Aminosäuren in chiralen RP-HPLC-Läufen eindeutig an allen Positionen als S-konfiguriert bestimmt (Isaka *et al.* 2005b). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde auf eine eigene Konfigurationsanalyse verzichtet.

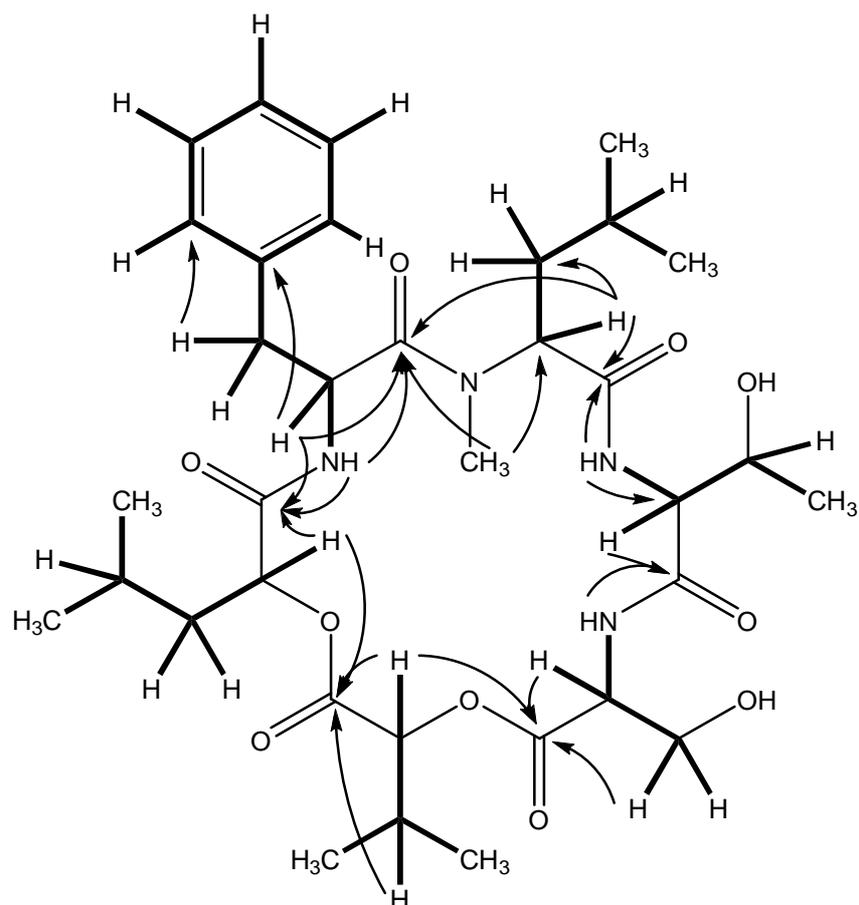


Abbildung 4.3.19.: COSY- (—) und HMBC- (---) Schlüsselkorrelationen von TS7-232a in CDCl_3 (eigene Darstellung).

Sy-Cordero *et al.* 2011 isolierten ähnliche Verbindungen (Trichodepsipeptide A und B) aus *Trichothecium* sp., welche sich allerdings an einer Aminosäureposition (Leu bzw. Val statt Thr an Position 9) unterschieden. Für diese Verbindungen wurde bis zu $10\ \mu\text{M}$ keine Zytotoxizität gegen verschiedene Krebszelllinien berichtet. Isakak *et al.* (2005b) stellten allerdings eine antiparasitäre Wirkung für Hirsutatin B ($\text{IC}_{50} = 8.6\ \mu\text{M}$, *Plasmodium falciparum*) und schwache antibakterielle Eigenschaften ($\text{MIC} = 74\ \mu\text{M}$, *Mycobacterium tuberculosis*) für beide Hirsutatine fest. Allerdings wurden ebenfalls keine zytotoxischen Effekte gegen Verozellen (african green monkey kidney cells) bis zu einer Konzentration von $75\ \mu\text{M}$ detektiert. Weiterhin konnten keine Studien gefunden werden, die sich mit Hirsutatinen befassen. Demnach sind die biologische Zielstruktur und die Funktion für den produzierenden Pilz unbekannt.

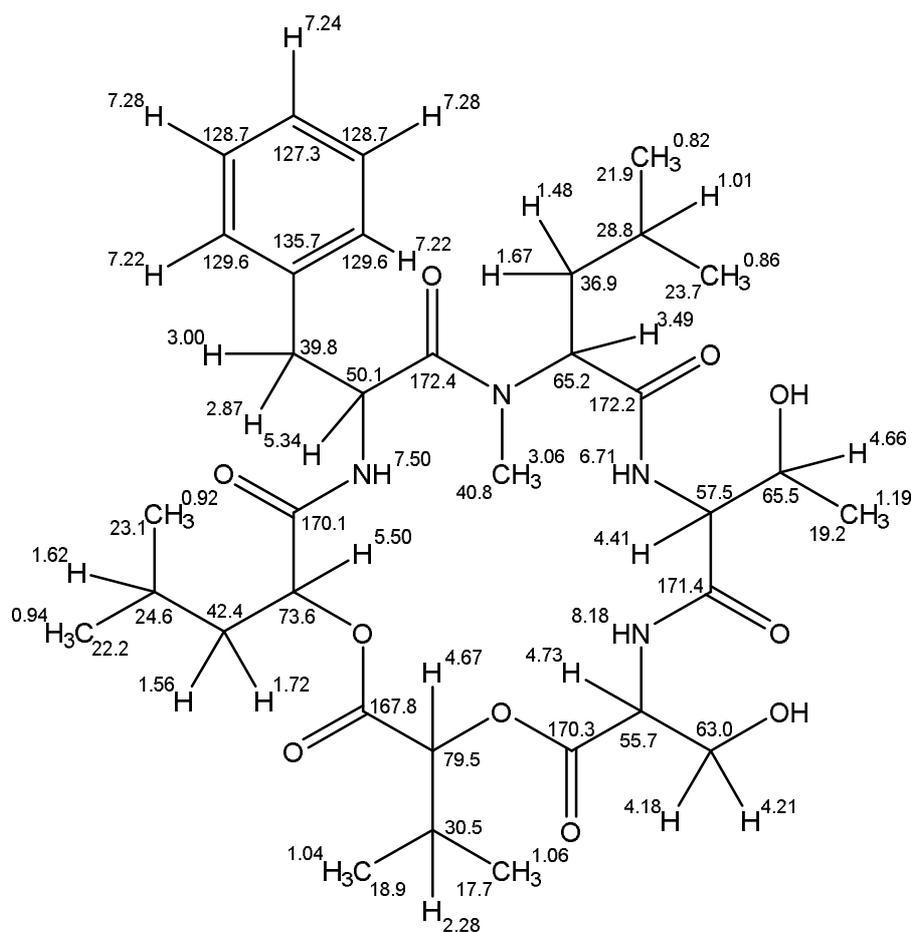


Abbildung 4.3.20.: Chemische Verschiebung von ¹H- und ¹³C-Signalen von TS7-232a in CDCl₃ (eigene Darstellung).

Die "similarity search" in SciFinder zeigte interessanterweise strukturell ähnliche Cyclopeptide wie *N*-Methylsalsalvamide A (*cyclo*[-Leu-OLeu-Val-(NMe)Leu-Phe-Leu-], Cueto *et al.* 2000) und Guangomide A bzw. Spicellamide B (*cyclo*[-Ala-OVal-Ala-(NMe)Ala-D-Ala-D-Phe-OLeu-], Amagata *et al.* 2006, Kralj *et al.* 2007), isoliert von Pilzen als Algen- und Schwammsymbionten mariner Herkunft, welche zumindest moderate antiproliferative Aktivität ($IC_{50} = 8.3 \mu\text{M}$ und $6.2 \mu\text{M}$) gegen verschiedene Krebszelllinien aufwiesen. Demnach ließen sich eventuell auch, wie für die Kombination von Cytochalasin C und Griseofulvin (siehe Kapitel 4.3.4.2.), synergistische Effekte vermuten, welche die robuste antiproliferative Aktivität der Elternfraktion erklären könnte. In der Literatur sind viele zyklische Depsipeptide beschrieben die antitumorale Wirkung mit unterschiedlichen Wirkmechanismen aufweisen (Kitagaki *et al.* 2015). Abseits der zytotoxischen Wirkung sind zyklische Peptide, insbesondere zyklische Depsipeptide interessante Metaboliten mit breiter biologischer Wirkung und Funktion (Lemmens-Gruber *et al.* 2009, Lee *et al.* 2017, Abdalla & McGaw 2018), weshalb für Hirsutatin A weitere biologische Aktivitätstests vollzogen werden sollten.

4.3.4. Vergleichende Diskussion der Cytochalasine

4.3.4.1. Die Struktur der Cytochalasine und Cytochalasane

Die isolierten Verbindungen Cytochalasine C, D und 19,20-Epoxyctochoalasin können der Strukturklasse der Cytochalasane zugeordnet werden. Aufgrund von Konfusion durch verschiedene Namen für dieselben Verbindungen und unterschiedlicher Nummerierungen wurde eine einheitliche Nomenklatur und der generische Name Cytochalasane als Strukturklasse vorgeschlagen (Binder *et al.* 1973, Binder & Tamm 1973). Die Trivialnamen, abgeleitet nach den Herkunftsorganismen (z.B. Phomine aus *Phoma* sp., Zygosporine aus *Zygosporium* sp.) bzw. nach der biologischen Aktivität (Cytochalasine (gr. cytos - Zelle, chalisis- Relaxation)) sind allerdings weiterhin in Gebrauch (Scherlach *et al.* 2010). Als gemeinsames Hauptstrukturmerkmal wurde der hochsubstituierte perhydrierte Isoindolonring mit Makrozyklus definiert. Seit den bei Binder & Tamm (1973) beschriebenen zehn Cytochalasanen sind bis heute über 60 Vertreter bekannt (Van Goietsenoven *et al.* 2011). Diese können je nach Größe (C11-C14) und funktioneller Gruppe innerhalb des Makrozyklusses (Lacton (z.B. Cytochalasin B), Carbozyklus (z.B. Cytochalasin D), cyclisches Carbonat (z.B. Cytochalasin E), sowie nach in das Polyketidrückgrat eingebaute Aminosäure (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Alanin oder Leucin) in weitere Untergruppen klassifiziert werden. Je nach Aminosäure ergeben sich demnach an C-3 Position Benzyl- (Cytochalasine), p-methoxybenzyl- (Pyrichalasin), 3-methyl-indolyl-, (Chaetoglobosine), Methyl- (Alachalasin), 2-Methylpropyl- (Aspochalasin) Gruppen (Abbildung 4.3.21.).

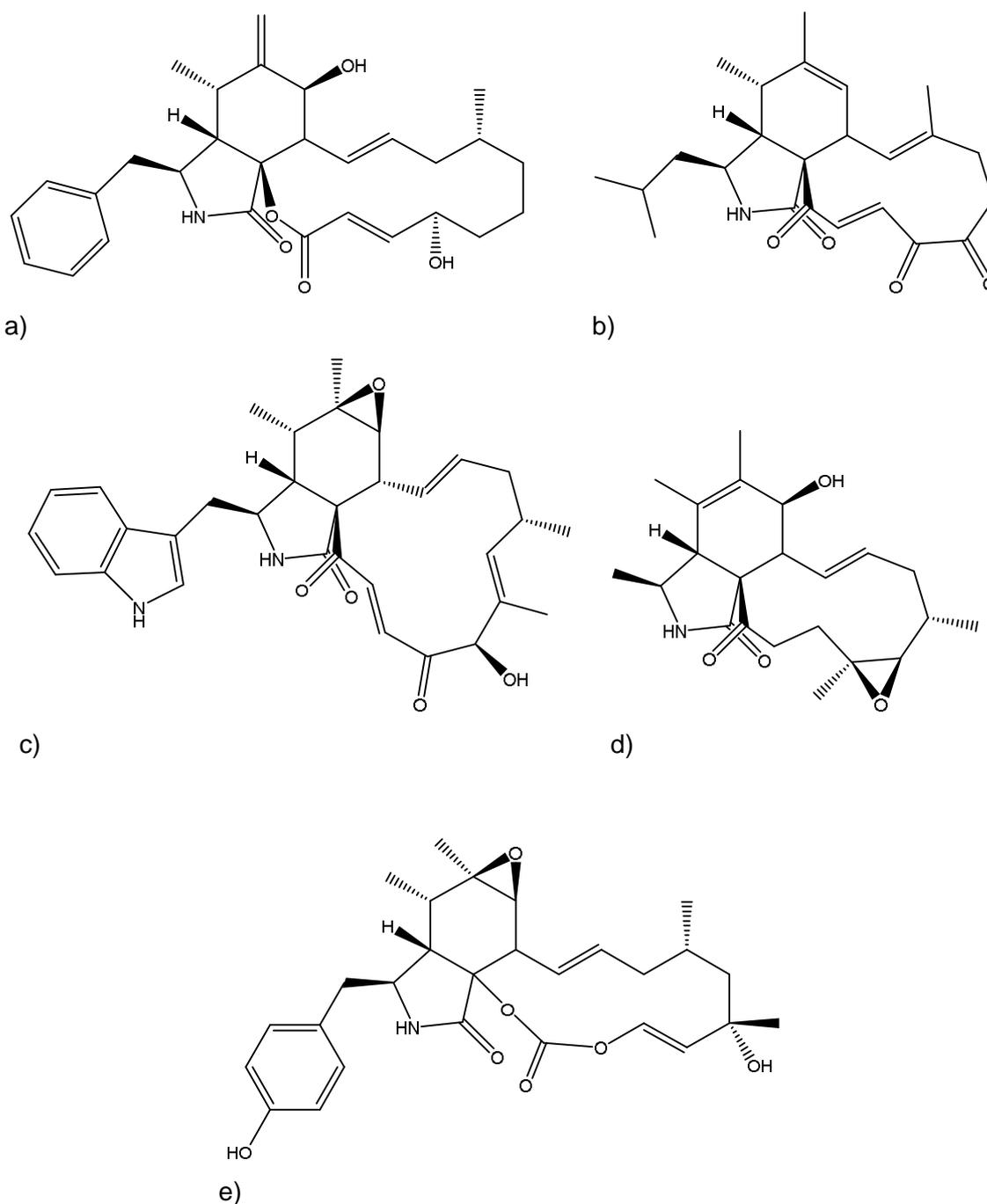


Abbildung 4.3.21.: a) Strukturvielfalt der Cytochalasansubgruppen: a) Cytochalasin B, b) Aspochalasin A, c) Chaetoglobosin A, d) Alachalasin C, e) Cytochalasin E (eigene Darstellung, angelehnt an Scherlach *et al.* 2010).

Dazu können vielfältige Variationen am Makrozyklus auftreten, was folglich in breiter chemischer Diversität und biologischen Eigenschaften resultiert (Trendowski 2015, Scherlach *et al.* 2010). Im weiteren Sinne werden auch Verbindungen zu den Cytochalasinen gezählt, die formal nicht in die ursprünglichen von Binder *et al.* (1973) genannten Kriterien fallen. Dazu gehören zum Beispiel Spicochalasin A mit ungewöhnlichem Hexanon-Heptanon-Bizyklus, Phomopsichalasin mit 13-gliedrigem Dreiringsystem und die Cytochalasine Z10-Z15 mit of-

fenkettiger, achtgliedriger Kohlenstoffkette statt eines Makrozyklusses, sowie Penochalasin, die einen Pyrrolring im Makrozyklus eingebaut haben (Scherlach *et al.* 2010) (Abbildung 4.3.22.)

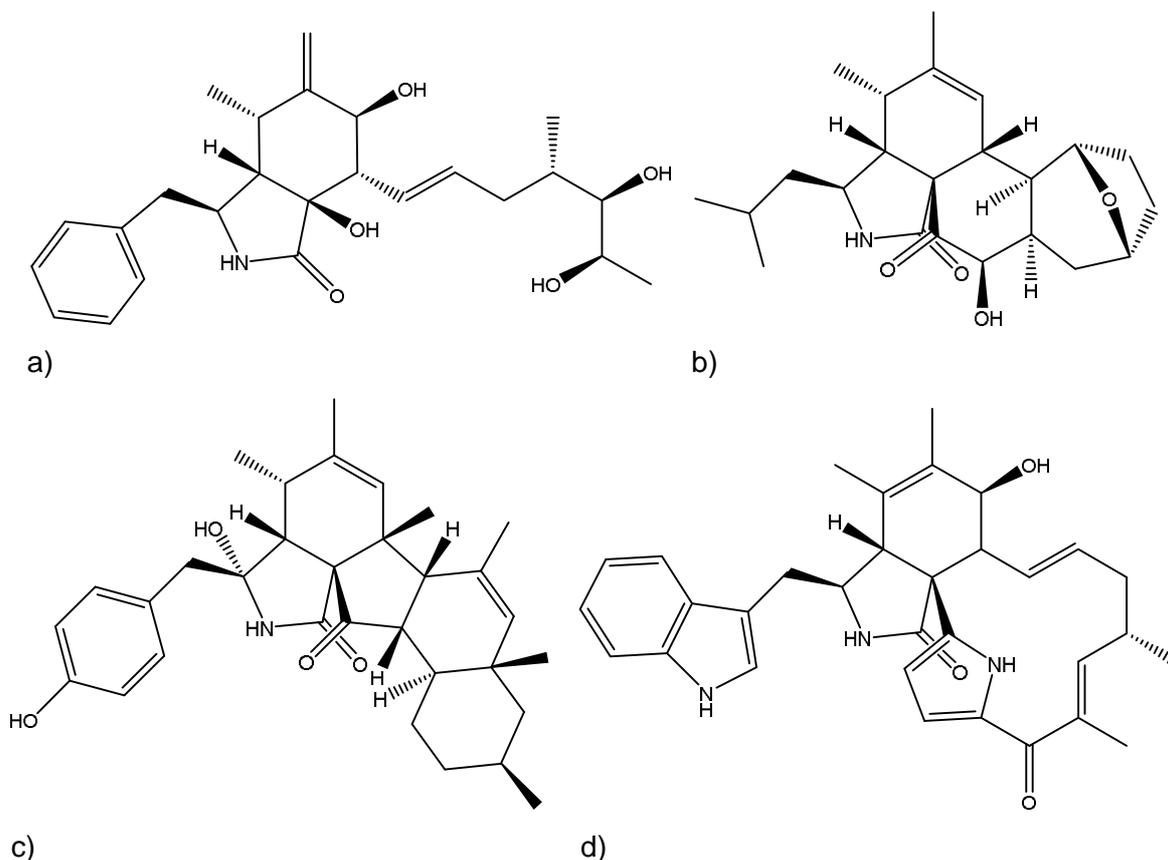


Abbildung 4.3.22.: Beispiele für Cytochalasane mit Ersatz für den Makrozyklus: a) Cytochalasin Z10, b) Spicochalasin A, c) Phomopsichalasin, d) Penochalasin B (eigene Darstellung, angelehnt an Scherlach *et al.* 2010).

Noch einmal erweitert wird die strukturelle Vielfalt durch mögliche Diastereomere der Cytochalasane. Wang *et al.* (2005) und Lui *et al.* (2015) berichteten zum Beispiel von der Isolierung von Hypoxylin A und Hypoxylin B aus marinen Pilzen (*Halorosellinia oceanicum*), welche Diastereomere von Cytochalasin D bzw. Cytochalasin C darstellen. Die identifizierte Stereochemie von Hypoxylin A und Hypoxylin B scheint allerdings ungewöhnlich, da die beschriebenen natürlich isolierten Cytochalasine alle mit übereinstimmender Konfiguration beispielsweise an den Fusionpunkten am Makrozyklus zum Isoindolonring beschrieben sind. Weiterhin würde die Biosynthese von Hypoxylin den Einbau von D-Phenylalanin voraussetzen. Eine Kristallstruktur, welche die postulierte absolute Konfiguration der Hypoxyline bestätigt, konnte leider nicht in der Literatur gefunden werden.

Auch wenn die Strukturklasse der Cytochalasane seit dem Ende der 1960er Jahre bekannt ist, werden bis heute konstant neue Cytochalasin und Cytochalasanderivate isoliert. Dies erweitert beständig die strukturelle Vielfalt, biologische Zielstrukturen und die Bioaktivität

(siehe Kapitel 4.3.4.2.). Als Beispiele sind Cytochalasine mit geringfügigen Modifikationen zu zuvor bekannten Cytochalasinen, wie zum Beispiel Cytochalasin P (Chen *et al.* 2017) und 18-Methoxy-Cytochalasin J (Shen *et al.* 2014). Weiterhin existieren zudem auch mehrfache Variationen am Grundgerüst beispielsweise bei Xylochalsin (Noppawan *et al.* 2018), Cytochalasin J₃ (Shang *et al.* 2017) und Curtachalasin (Wang *et al.* 2018) (Abbildung 4.3.23.).

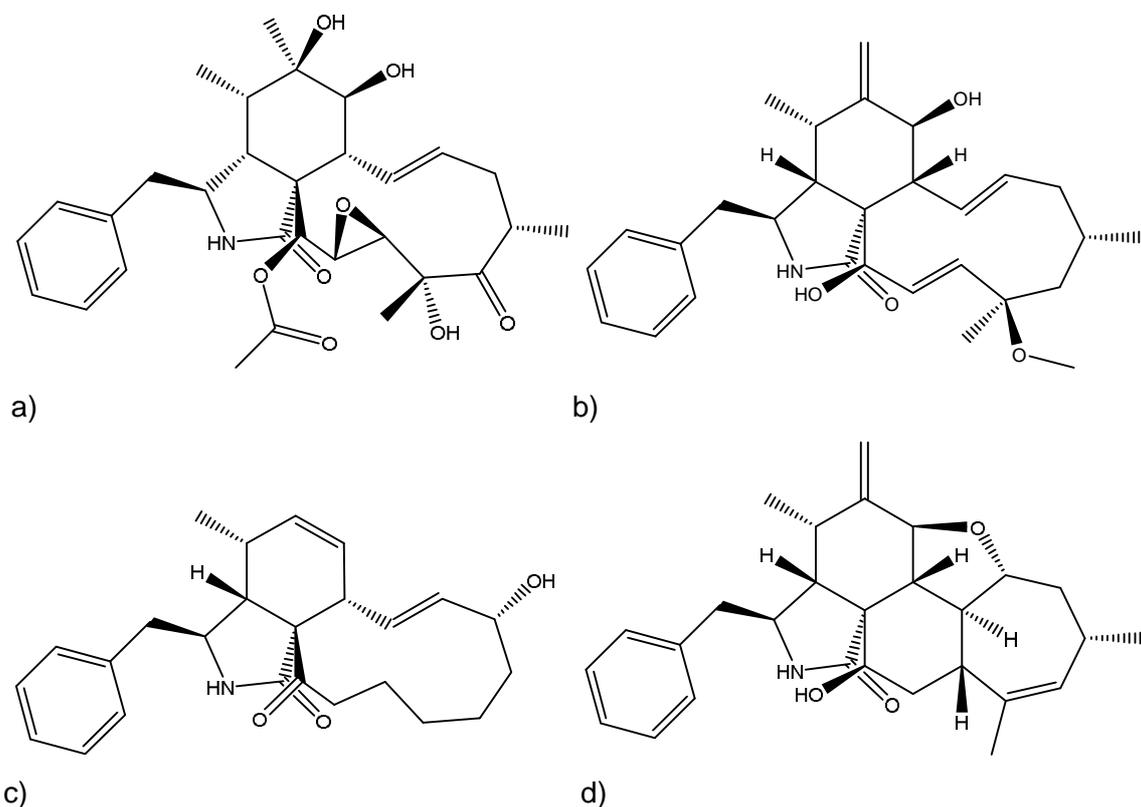


Abbildung 4.3.23.: Struktur von kürzlich neu isolierten Cytochalasinderivaten: a) Cytochalasin P, b) 18-Methoxy-Cytochalsin J, c) Xylochalsin, d) Cytochalasin J₃ (eigene Darstellung).

4.3.4.2. Biologische Aktivität von Cytochalasanen und zytotoxischen TS7 Metaboliten

Cytochalasanen und speziell Cytochalasine sind mit einer ganzen Reihe biologischer Effekte (zytotoxisch, phytotoxisch, antimykotisch, etc.) assoziiert. Diese Effekte werden hauptsächlich über die Interaktion der Cytochalasane mit Aktinfilamenten (MacLean-Fletcher & Pollard 1980, Brown & Spudich 1981, Casella *et al.* 1981) in Verbindung gebracht. Die Auswirkung auf die Mikrofilamentdynamik ruft demnach prominente Effekte in allen eukaryotischen Zellen hervor (Scherlach *et al.* 2015). Cytochalasane zeigen daher generell Zytotoxizität gegenüber verschiedensten Krebszelllinien, wie zum Beispiel HeLa (Epithel Zervixkarzinom), HT29 (Colon Adenokarzinom), P388 (Murines Lymphom), und U373 (humanes Gliom) im niedrigen mikromolaren-Bereich (IC_{50} -Werte) (Sekita *et al.* 1982, Alvi *et al.* 1997, Jiao *et al.* (2004), Van Goietsenoven *et al.* 2010). Durch SAR-Vergleiche natürlicher und modifizierter Zygosporine (Cytochalasine) konnte gezeigt werden, dass die Benzylgruppe an C-3 und Hydroxylgruppe an C-7 zytotoxizitätsdeterminierende Elemente darstellen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Isoindolkern und der Makrozyklus aktivitätsbestimmend sind, auch wenn die Größe des Makrozyklusses von untergeordneter Natur ist. Zusätzlich sind Effekte durch Variationen der eingebauten Aminosäure beobachtet worden. Cytochalasane mit aromatischen Resten (Benzyl, Indolyl) sind dabei antiproliferativ potenter als ihre aliphatischen Derivate (Methyl, Isopropyl) (Scherlach *et al.* 2015).

Des Weiteren sind antiparasitäre Eigenschaften gegenüber *Entamoeba invadens* ($IC_{50} < 10 \mu\text{M}$, Makioka *et al.* 2004), antimykotische Effekte unter anderem gegenüber filamentösen Pilzen (z.B. *Botrytis cinerea*) und Hefepilzen (z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, Betina *et al.* 1972), sowie gegen Dermatophyten (*Microsporum gypseum*, Pongcharoen *et al.* 2006) nachgewiesen. Überraschenderweise sind auch antibakterielle Effekte beispielsweise gegen *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* (Betina *et al.* 1972) als auch antivirale Wirkung als HIV-1-Proteaseinhibitor (Ondeyka *et al.* 1992) beschrieben. Die beschriebenen Effekte gegen Mikroorganismen sind anders als bei den zytotoxischen Effekten gegenüber Mammaliazellen aber sehr unterschiedlich ausgeprägt. Cytochalasin A wirkt inhibitorisch auf das Wachstum von Bakterien und Pilzen. Cytochalasin D zeigt sich hingegen nur gegen Pilze wirksam, während Cytochalasin B inaktiv gegenüber beiden Organismengruppen ist (Betina *et al.* 1972). Ähnliches ist bei dem Parasiten *Entamoeba invadens* zu beobachten. Hierbei zeigt Cytochalasin A keinerlei Inhibition bei $10 \mu\text{M}$ während der Testorganismus bei Cytochalasin B und Cytochalasin D stark am Wachstum gehindert wird.

Aufgrund der guten Datenlage bei Cytochalasinen bezüglich der zytotoxizitätsbestimmenden Kennzahlen wurden keine eigenen IC_{50} -Werte für die als Reinstoffe isolierten Cytochalasine C, D und 19,20-Epoxyctochalasin D bestimmt (vgl. z.B. Sekita *et al.* 1982, Shi & Zhan 2007, Klaiklay *et al.* 2012, Wei *et al.* 2015). Der IC_{50} -Wert von $3.2 \mu\text{g/ml}$ (Tabelle 4.3.2.) der ungeeinigten Vorfraktion TS7-F2-13, die aber überwiegend Cytochalasin D enthielt, ist gegen-

über der Zelllinie KB-3-1 in Übereinstimmung mit den Literaturwerten für reines Cytochalasin D ($IC_{50} = 3.99 \mu\text{g/ml}$, KB-Zelllinie (Zervixkarzinom), Klaiklay *et al.* 2012). Gleiches gilt für den IC_{50} -Literaturwert von 19,20-Epoxychothalasin D ($IC_{50} = 0.16 \mu\text{M}$, P-388 Zelllinie (Mauslymphom), Shi & Zhan 2007) aus Hauptfraktion 14, auch wenn dieser von einer anderen Zelllinie ermittelt wurde.

Tabelle 4.3.2.: IC_{50} -Werte Cytochalasin-haltiger Fraktionen des Pilzstammes TS7 gegen die KB-3-1 Zelllinie.

Fraktionsbezeichnung	Enthaltene Komponenten	IC_{50} [$\mu\text{g/ml}$]
TS7-F2-12	Cytochalasin C (TS7-218), Griseofulvin (TS7-207)	0.075
TS7-F2-13	Cytochalasin D (TS7-223)	3.2
TS7-F2-14	19,20 Epoxychothalasin D (TS7-235), Hirsutatin A (TS7-232)	0.8

Auffällig ist der deutlich geringere IC_{50} -Wert der Cytochalasin C-beinhaltenden Fraktion gegenüber Cytochalasin D. Dies ist in sofern erstaunlich, da die Werte der Einzelkomponenten gegen die KB-3-1 Vorgängerzelllinie (vgl. Sekita *et al.* 1982, HeLa, $IC_{50} = 0.32\text{-}1 \mu\text{g/ml}$) und andere Krebszelllinien (vgl. Wei *et al.* 2015, z.B. PC-3M Zelllinie (Prostatakarzinom), $IC_{50} = 1.65 \mu\text{M}$ (Cytochalasin C), $IC_{50} = 1.03 \mu\text{M}$ (Cytochalasin D)) vergleichbar sind und in derselben Größenordnung liegen. Griseofulvin allein kann ebenfalls nicht für den verstärkten zytotoxischen Effekt verantwortlich sein, da der IC_{50} -Wert von Griseofulvin gegen KB-3-1 bei $5 \mu\text{g/ml}$ ($14 \mu\text{M}$) liegt. Demnach lässt sich vermuten, dass eine Kombination beider Stoffe einen größeren Effekt als die Summe ihrer Einzelwirkungen hervorruft. Ähnliches wurde bereits von Ho *et al.* (2001) für die Kombination des Tubulinpolymerisierungsinhibitors Nodocazol mit Griseofulvin, welches ebenfalls die Mikrotubulindynamik (Panda *et al.* 2005) beeinflusst, angezeigt. Des Weiteren wurde über die positiven Auswirkungen der Kombination von Cytochalasin B mit den klinisch eingesetzten Zytostatika Doxorubicin (DNA-Interkalator) und Paclitaxel (Tubulin-Depolymerisierungsinhibitor) berichtet (Trendowsky *et al.* 2015). Demnach kann sich ebenfalls ein bisher nicht beschriebener synergistischer Effekt durch die Kombination von Cytochalasinen und Griseofulvin postulieren lassen. Weitere Untersuchungen mit den kombinierten Reinstoffen in unterschiedlicher Konzentration wären wünschenswert, um die Erklärung für den beobachteten Effekt zu festigen.

Obwohl der Nutzen von Cytochalasinen, hauptsächlich als Modelkomponenten aus biologischen Studien für die Erforschung der Cytoskelettfunktion und des Zellzyklus, schon lange bekannt ist (Scherlach *et al.* 2010), wird aktuell eine Nutzung in der Krebstherapie diskutiert (Trendowsky 2015). Aufgrund der generellen und nicht selektiven Zytotoxizität ist eine Anwendung nicht direkt möglich. Bisher sind zudem keine Aktininhibitoren in der Krebstherapie bzw. in klinischen Studien im Einsatz (Scherlach *et al.* 2010, Trendowsky 2015). Denkbar ist allerdings der Einsatz gegenüber Tubulininhibitor-resistenten Tumoren oder die Kombination mit Zytostatika, welche andere Wirkmechanismen als Cytochalasane aufweisen (z.B. Vin-

blastin, Cryptophycin (Tubulin-Polymerisierungsinhibitoren), Paclitaxel (Tubulin-Depolymerisierungsinhibitor), Doxorubicin (DNA-Interkalator)). Dies könnte die notwendige therapeutische Dosis senken. Das direkte Adressieren des Tumorgewebes per Antikörper (Antibody Drug Conjugates (ADCs), Jerijan *et al.* 2016, Beck *et al.* 2018) oder selektiven Liganden (Small Molecule Drug Conjugates (SMDCs), Casi & Neri 2015, Zhuang *et al.* 2019) als "homing device", welche bi- oder multifunktionale Beladung mit zytotoxischen Agenzien erlauben, sind vielversprechende Ansätze in der Krebstherapie, welche die unselektive Schädigung normalen Gewebes umgehen (Tang *et al.* 2016, Levengood *et al.* 2017, Kumar *et al.* 2018b). Speziell Cytochalasin D wäre als "Payload" für SMDCs oder ADCs interessant, da es sich als deutlich potenterer Aktinpolymerisierungs-Inhibitor als beispielsweise Cytochalasin B gezeigt hat und zusätzlich Apoptose via p53-Proteine induzieren kann. Zudem ist es ein potenter Zytokineseinhibitor, welches die Zielzellen teilweise zu vergrößerten, mehrkernigen Zellen verändert, was diese wiederum empfänglicher für mit DNA-interagierende Agenzien macht (Trendowsky 2015).

Trotz der vielfach beschriebenen biologischen Effekte werden nach wie vor unbekannte Wirkungen und biologische Ziele für neue Cytochalasane gefunden. Ein Beispiel hierfür ist die beobachtete Herabsetzung der Fluconazol-Resistenz bei human pathogenen *Candida albicans*-Stämmen durch Curtachalasin D-E (Wang *et al.* 2019).

4.3.4.3. Produktionsorganismen und ökologische Funktion von Cytochalasinen

Die ersten Cytochalasane, namentlich Cytochalasin A (Dehydrophomin) und Cytochalasin B (Phomin) wurden nahezu zeitgleich unabhängig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen aus *Helminthosporium dematioideum* (Aldridge *et al.* 1967) bzw. *Phoma* sp. (Rothweiler & Tamm 1966) isoliert und beschrieben (Binder & Tamm 1973). Dieselbe Publikation von Aldridge und Mitarbeitern (1967) beschreibt ebenfalls die Gewinnung von Cytochalasin C, sowie Cytochalasin D aus *Metarhizium anisopliae*, das kurze Zeit später erneut aus *Zygosporium masonii* (Hayakawa *et al.* 1968) berichtet wird. Einige Jahre später wurde 19,20-Epoxyctochalasin D erstmals aus *Xylaria hypoxylon* (Espada *et al.* 1997) beschrieben. Deren Stereochemie wurde inzwischen überarbeitet und durch Kristallstrukturanalyse geklärt (Shi & Zhan 2007). Seit dem wurde Cytochalasane aus vielen Pilzen, hauptsächlich aus den Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Zygosporium*, *Chaetomonium*, *Phoma*, *Hypoxylon*, *Xylaria* und *Phomopsis* berichtet (Scherlach *et al.* 2010). Die Fähigkeit für die Biosynthese von Cytochalasinen ist demnach über auch taxonomisch wenig verwandte Gruppen verteilt. Interessant ist zudem, dass die Cytochalasin-Produzenten sowohl von terrestrischen, als auch aus mariner Umgebung isolierten Pilzen stammen und verschiedene ökologischen Funktionen besetzen (Saprophyten z.B. *Penicillium expansum* (Andersen *et al.* 2004), Endophyten z.B. *Aspergillus allahabadii* (Sadorn *et al.* 2016), Entomopathogene z.B. *Metarhizium anisopliae* (Vilcinskis *et al.* 1997)). Speziell die isolierten Metaboliten Cytochalasin C, Cytochalasin D und 19,20-Epoxyctochalasin D wurden bereits aus einigen *Xylaria* sp. (z.B. Silva *et al.* 2010, Rukachaisirikul *et al.* 2013, Wei *et al.* 2015, Chapla *et al.* 2018) gewonnen. Der überwiegende Teil der Pilze ist endophytischen Ursprungs. Zudem wurde Cytochalasin D bereits direkt aus als *Xylaria cubensis* identifizierten Stämmen isoliert (Edwards *et al.* 1991, Klaikey *et al.* 2012, Sawadsitang *et al.* 2015). Andere *Xylaria*-Arten, wie *X. mellisii* (Pittayakhajonwut *et al.* 2005) und *X. arbusculata* (Amarala *et al.* 2014) sind ebenfalls bekannt für die Fähigkeit Cytochalasin D zu produzieren. Weiterhin werden auch in aktueller Literatur beständig neue Cytochalasin- und Cytochalasanderivate aus natürlichen Quellen, unter anderem aus *Xylaria*- (Chen *et al.* 2017, Noppawan *et al.* 2018) und *Phomopsis*-Arten (Shen *et al.* 2014, Shang *et al.* 2017), berichtet.

Für Cytochalasane allgemein wurden aufgrund der strukturellen Variabilität verschiedene Bioaktivitäten und Wirkorte (siehe Kapitel 4.3.4.2.) beschrieben. Dementsprechend ist die ökologische Funktion der Cytochalasine sicherlich dahingehend zu interpretieren, dass diese einen Vorteil (antimykotische und antibakterielle Effekte) für den produzierenden Stamm in der Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen generieren. Bei dem Entomopathogen *Metarhizium anisopliae* gibt es zudem Hinweise, dass Cytochalasin D in Kombination mit anderen Verbindungen durch die Inhibierung der Plasmacytenanhaftung als Virulenzfaktor funktioniert (Vilcinskis *et al.* 1997) und demnach eine Rolle bei der Besiedlung und dem Wachstum

des Pilzes in den Wirtsinsekten spielt. Cytochalasin D weist ein engeres und schwächeres Wirkspektrum gegen Bakterien und andere Pilze auf, als zum Beispiel Cytochalasin A (Bettina *et al.* 1972), ist aber ein sehr potenter Aktinpolymersierungs-Inhibitor (Trendowsky 2015). Speziell in Endophyten ist die Bildung von Cytochalasin D daher als Schutz vor Herbivoren denkbar. Der Schutz vor Insekten-Herbivoren ist zum Beispiel für Lolin- und Ergotalkaloidebildende Endophyten in Gräsern beschrieben (Schardl *et al.* 2004). Adverse Effekte auf die Entwicklung und Zellfunktionen von Insekten durch Cytochalasin D sind zumindest Gegenstand einiger Publikationen (Sauman & Berry 1993; Gvakharia *et al.* 2003). Demnach könnten die Cytochalasine diese Funktionen ebenfalls innerhalb der Pflanzen-Endophyten-Interaktion erfüllen.

4.3.5. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm TS7 und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von *Xylaria*-Arten

In der mykochemischen Untersuchung des als *Xylaria cubensis* identifizierten Stammes TS7 konnten insgesamt sieben Metaboliten isoliert und charakterisiert werden. Identifiziert wurden die beiden Melleinderivate 5-Methoxycarbonylmellein und Akolitserin, die chlorierte Spiroverbindung Griseofulvin und drei Cytochalasinderivate Cytochalasin C, Cytochalasin D und 19,20-Epoxyctochochalin D, sowie das zyklische Depsipeptid Hirsutatin A. Die für die im Rohextrakt und bearbeiteten Fraktionen beobachtete antiproliferative Wirkung gegen die Zervixkarzinomzelllinie KB-3-1 verantwortlichen Verbindungen konnten mit den Cytochalasinderivaten und Griseofulvin identifiziert werden. Die in der Vorfraktion ermittelten teilweise im Vergleich zu den Einzelsubstanzen deutlich geringere halbmaximale inhibitorische Konzentration kann wahrscheinlich auf einen synergistischen Effekt der die Aktinfilamentdynamik verändernden Cytochalasane und des die Mikrotubulindynamik störenden Griseofulvins zurückgeführt werden. Da beständig neue Cytochalasane, welche neue therapeutische Zielstrukturen adressieren oder potentere Wirkung an bereits bekannten Zielen aufweisen können besonders in *Xylaria*-Arten entdeckt werden (siehe Kapitel 4.3.4.2. und 4.3.4.3.), stellen endophytische *Xylaria* sp. gutes Ausgangsmaterial für mykochemische Studien dar. Leider wurden keine strukturell neuen Cytochalasinderivate aus dem untersuchten Stamm TS7 isoliert. Modifizierung der Kultivierungsbedingungen könnten wahrscheinlich weitere Metaboliten liefern. Vom Stamm TS7 wird allerdings Cytochalasin D als bioaktiver Metabolit, selbst unter nicht optimierten Bedingungen, in robusten Mengen gebildet, weshalb dieser einen interessanten Produktionsstamm für Cytochalasin D darstellt. Obwohl verschiedene Syntheserouten für die Totalsynthese von Cytochalasinen existieren, umfassen diese, je nach Komplexität der Edukte, Herangehensweise und des Fokus auf bestimmte Cytochalasane, 9 bis 24 Syntheseschritte (Stork *et al.* 1978, Merifield & Thomas 1999, Haidle & Myers 2004, Scherlach *et al.* 2010). Daher wird Cytochalasin D kommerziell nach wie vor als Kulturisolat aus zum Beispiel *Zygosporium mansonii* gewonnen und kostenintensiv angeboten (138 Euro/mg, www.sigmaaldrich.com, 15.04.2019). Die Verbindung stellt demnach einen wertvollen Wirkstoff dar.

Des Weiteren sind *Xylaria*-Arten allgemein als Produzenten vielfältiger Naturstoffe bekannt (Helaly *et al.* 2018). Regelmäßig werden zuvor nicht beschriebene Metaboliten, wie beispielsweise Cubentriol, Xylaritriol (Fan *et al.* 2014) und ein Aminoamidinderivat (Sawadsitang *et al.* 2017), direkt aus einem als Endophyt identifiziertem *Xylaria cubensis*-Stamm gewonnen. Aktuellere Beispiele umfassen des Weiteren Xylarianin A (Zhang *et al.* 2018), Hydroxyldecandrin G (Han *et al.* 2019) und (\pm)-Xylaridin A (Li *et al.* 2019), welche aus anderen *Xylaria*-Arten berichtet worden sind (Abbildung 4.3.24.).

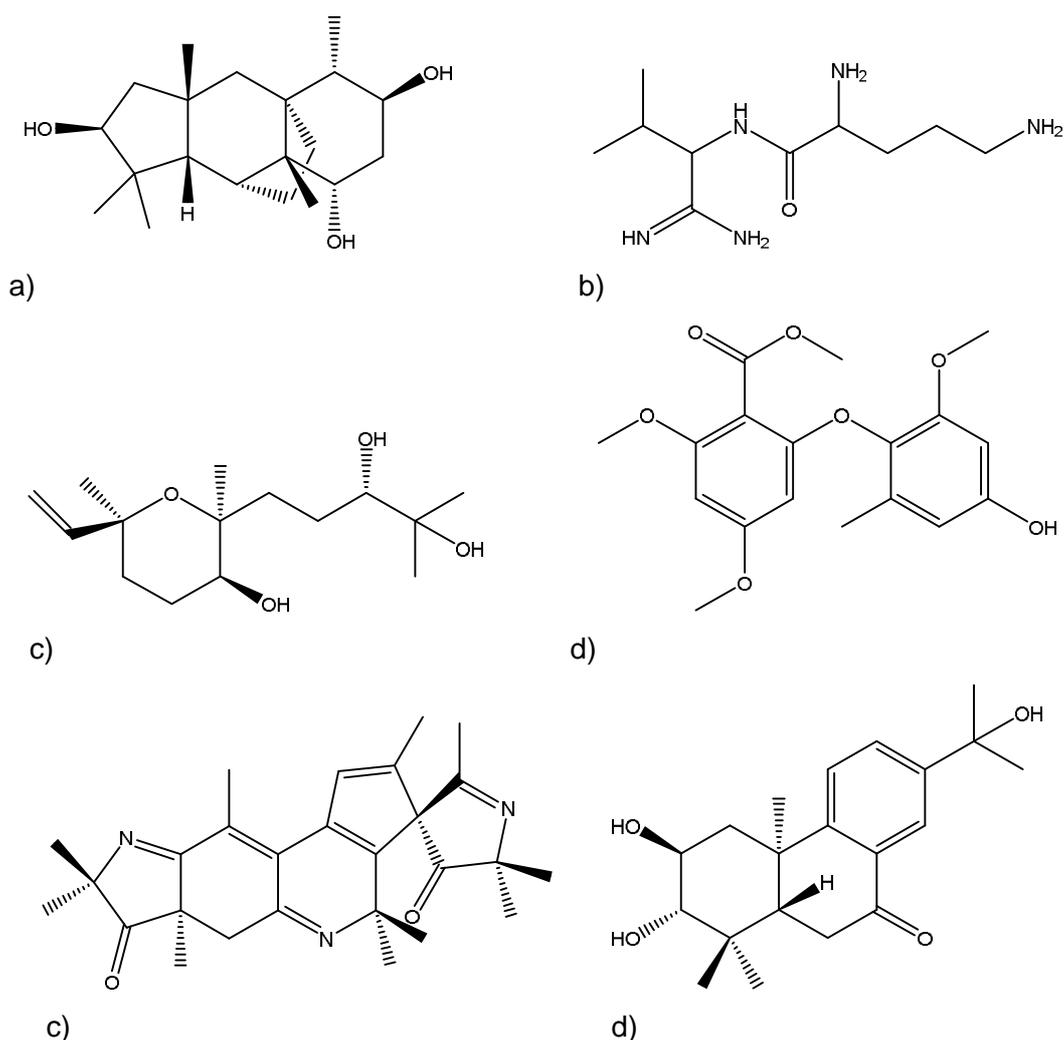


Abbildung 4.3.24.: Kürzlich in der Literatur neu beschriebene Naturstoffe aus *Xylaria*-Arten: a) Cubentriol, b) Aminoamidinderivat, c) Xylaritriol, d) Xylarianin A, e) Hydroxyldecandrin G, f) Xylaridin A (eigene Darstellung).

Demnach sind insbesondere endophytische *Xylaria*-Arten als Quelle neuer Verbindungen interessant und valide Ziele detaillierter Naturstoff- und Pharmakognosieuntersuchungen. Dies gilt auch für zukünftige Arbeiten, insbesondere wenn beispielsweise das Biosynthese-Repertoire durch spezielle Kultivierungstechniken und Zusätzen mittels „co-cultivation“ bzw. „mixed-cultivation“ (Marmann *et al.* 2014, Wu *et al.* 2015), Kultivierung mit Wirts- bzw. Pflanzenextrakt (Eevers *et al.* 2014) oder Submersfermentation mit Resin (Tsueng & Lam 2007) angeregt und erweitert wird.

4.4. Stamm SG1 (*Daldinia* sp.)

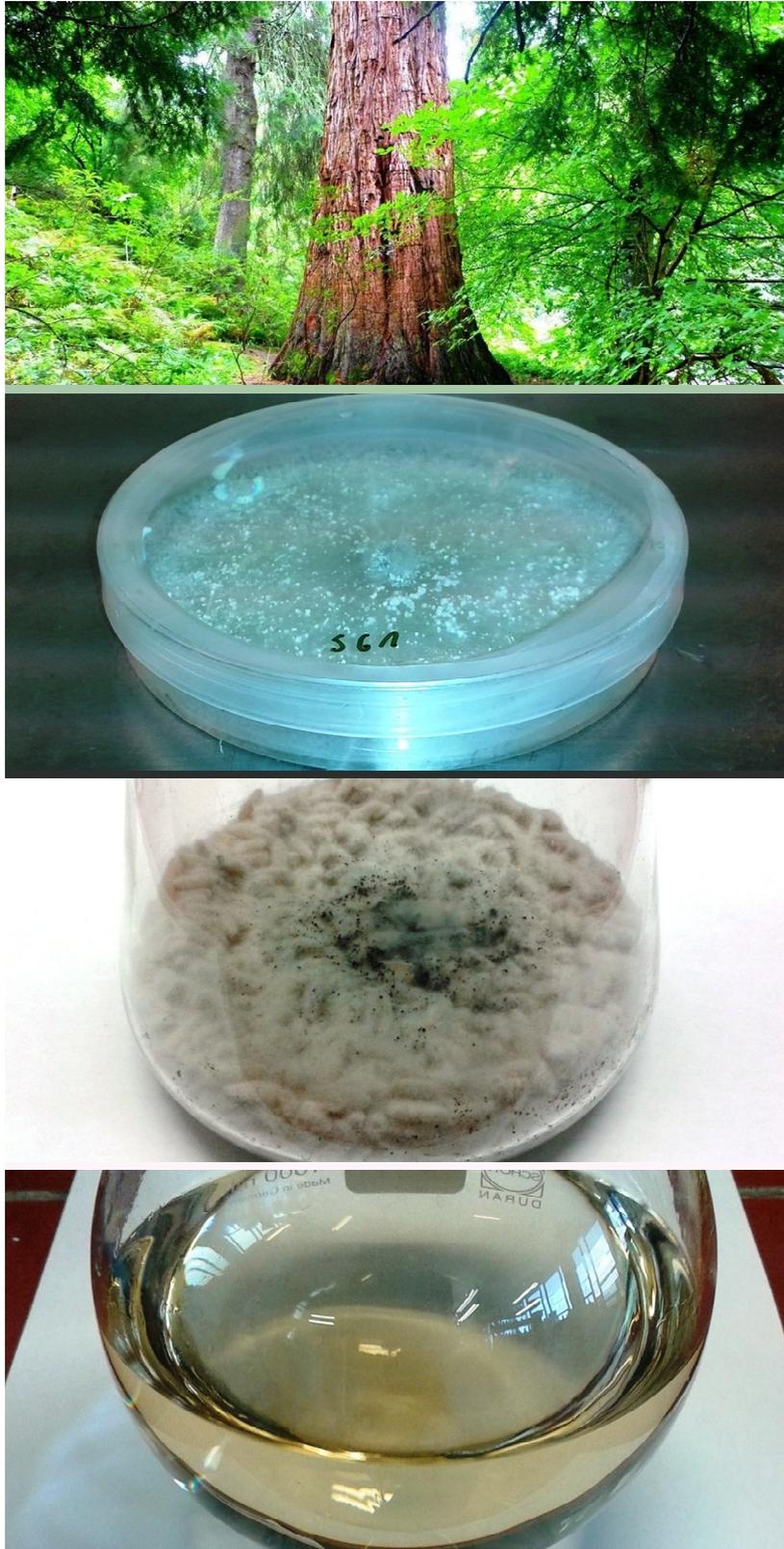


Abbildung 4.4.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm SG1 (*Daldinia* sp.): Stamm der Wirtspflanze (*Sequoiadendron giganteum*, oben), axenische Kultur auf Kartoffel-Dextrose-Agar (mitte oben), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (mitte unten), Rohextrakt nach Extraktion mit Essigsäureethylester (eigene Darstellung).

4.4.1. Stammidentifizierung und Auswahl

Die unbeschränkte Suche und der Abgleich der ITS-Sequenz (Zugangsnummer NCBI: LR585032) innerhalb des kompletten Entrez-Suchbereiches für Nukleotidsequenzen über den BLAST-Algorithmus ergab Sequenzübereinstimmungen zu einigen Isolaten, die als *Daldinia*-Arten klassifiziert wurden (z.B. *Daldinia* cf. *loculatoides* (Stamm: PRM885050), Zugangsnummer NCBI: AM407726.1 und *Daldinia grandis*, Zugangsnummer NCBI: AF176982.1), sowie zu einer Reihe nicht näher bestimmter Sordariomyceten bis zu einer Sequenzübereinstimmung von 95.5%. Die auf "typ material" beschränkte Abfrage zeigte ein ähnliches Bild mit der Auflistung weiterer *Daldinia*-Arten (z.B. *Daldinia dennisii* var. *dennisii* strain (Stamm: CBS 114741), Zugangsnummer NCBI: MH862968.1 und *Daldinia loculatoides* (Stamm: CBS 113279), Zugangsnummer NCBI: KU684019.1), allerdings mit weiterhin relativ schlechter Sequenzübereinstimmung von lediglich 93.3%. Zur Absicherung für die Einstufung als Stamm der Gattung *Daldinia* wurde ebenfalls die LSU-Region amplifiziert und ein Sequenzabgleich durchgeführt. Dieser ergab, ebenso wie für den ITS-Bereich, Einträge zu verschiedenen *Daldinia*-Arten, allerdings mit über 99% Übereinstimmung in der Sequenzidentität. Phylogenetische Analysen mit Vergleichsequenzen für *Daldinia* und weitere Arten aus der Klasse der Sordariomyceten über das Maximum-Likelihood-Model ergab für die LSU-Barcodingregion eine Clusterung innerhalb des *Daldinia*-Arten-Komplexes (Abbildung 4.4.2.). Die gleiche Analyse für den ITS-Bereich mit weiteren Arten der für die Gattung *Daldinia* annotierten Sequenzen zeigte eine Gruppierung mit dem *D. loculata*, *D. novae-zelandiae* bzw. *D. vernicosa*-Artenkomplex (Abbildung 4.4.3.). Das Grundgerüst des phylogenetischen Baumes der ITS-Region für den *Daldinia*-Artenkomplex bzw. für verschiedene *Daldinia*-Kladen (*D. eschscholtzii*, *D. concentrica*, etc.) ist statistisch wenig abgesichert (Maximum-Likelihood-Bootstrap 12-61%). Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung zu den phylogenetischen Studien von Stadler *et al.* (2014). Die geringe interspezifische und die vorhandene intraspezifische Sequenzvariabilität innerhalb des *Daldinia*-Artenkomplexes ermöglicht nur selten die sichere taxonomische Klassifizierung bis auf Artlevel. Die generelle Topologie der phylogenetischen Bäume basierend auf nrITS-DNA, ist allerdings konsistent mit der Unterscheidung der einzelnen *Daldinia*-Kladen bzw. -Gruppen anhand morphologischer Charakteristika (Stadler *et al.* 2014). Nach den phylogenetischen Analysen lässt sich als Schlussfolgerung formulieren, dass es sich bei dem Stamm SG1 um eine Spezies des *Daldinia*-Artenkomplex mit Affinität zur *D. loculata*-, *D. novae-zelandiae*-, bzw. *D. vernicosa*-Klade handelt. Chemotaxonomische Betrachtungen einiger isolierter Metabolite (siehe Kapitel 4.4.3.2. (1,8-Dimethoxynaphthalen), 4.4.3.3. (Hept-6-en-2,4,5-triol) und 4.4.3.4. (*Daldinia*-pyron)) unterlegen zudem die Zugehörigkeit zur Gattung *Daldinia*.

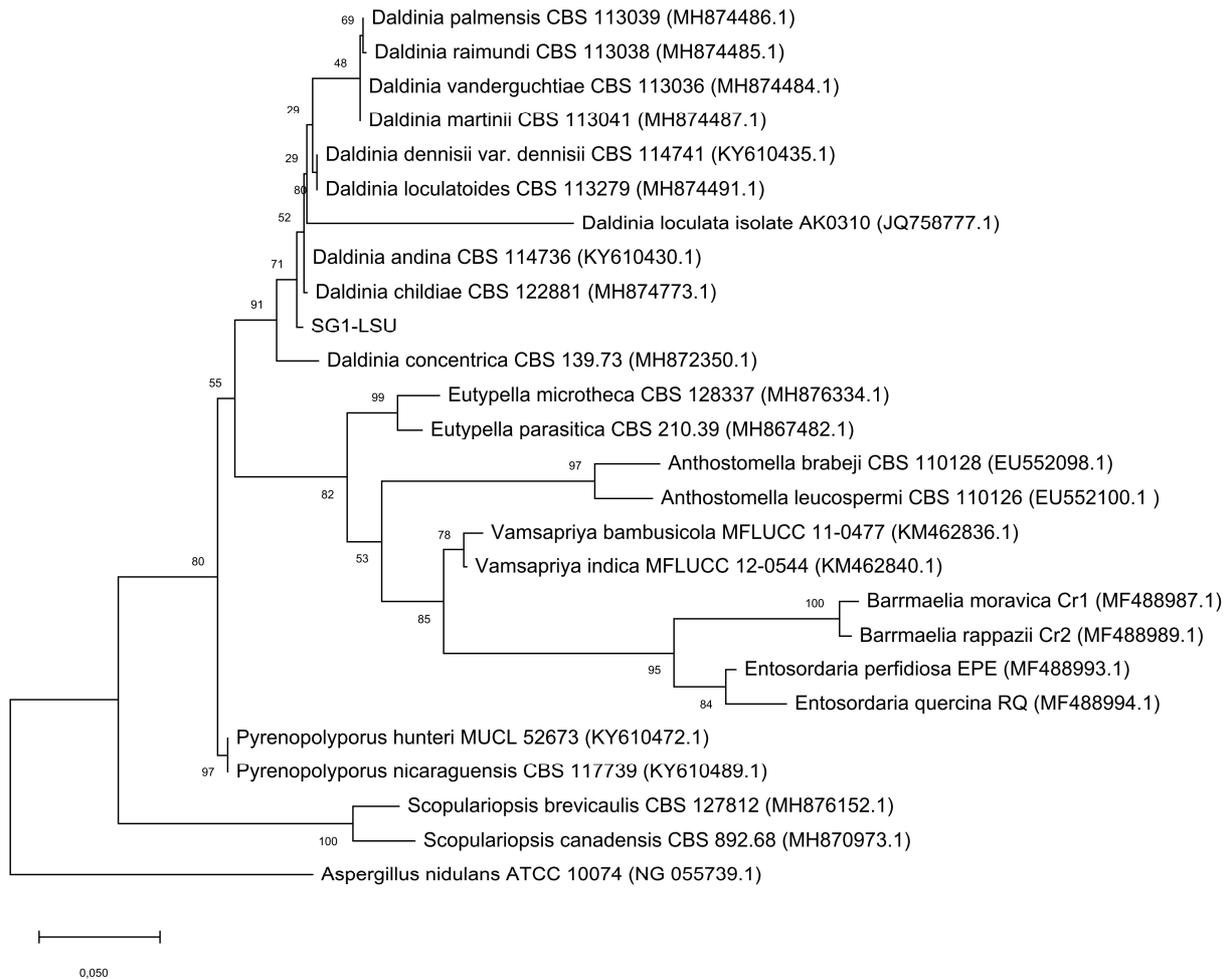


Abbildung 4.4.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit LSU-Sequenz des Stammes SG1 und Vergleichsreferenzen aus der Xylariaceae-Familie mit 1000 Bootstrap-Replikationen und *Aspergillus nidulans* als Outgroup (eigene Darstellung).

Gemäß der generell angewandten "Operational Taxonomic Unit" (OTU) als Artengrenze bei Sequenzidentitäten von $\geq 97\%$ bzw. $\leq 3\%$ Sequenzunterschied könnte der Stamm SG1 mit maximal 95,5% Sequenzidentität zu bestehenden Sequenzen in der Datenbank als neue bzw. bisher nicht beschriebene Art gewertet werden. Die Möglichkeit der Beschreibung einer neuen Art allein anhand von DNA-Sequenzen ist allerdings nicht generell akzeptiert bzw. in der wissenschaftlichen Diskussion (z.B. Santos & Faria 2011, Page & Hughes 2011). Demnach wurde auf die Artbeschreibung ohne eine Betrachtung der morphologischen Merkmale verzichtet. Es konnte zumindest gezeigt werden, dass die Sequenz einer nahverwandten Vergleichsart bisher nicht in den Datenbanken erfasst ist.

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.4. Stamm SG1 (Daldinia sp.) -

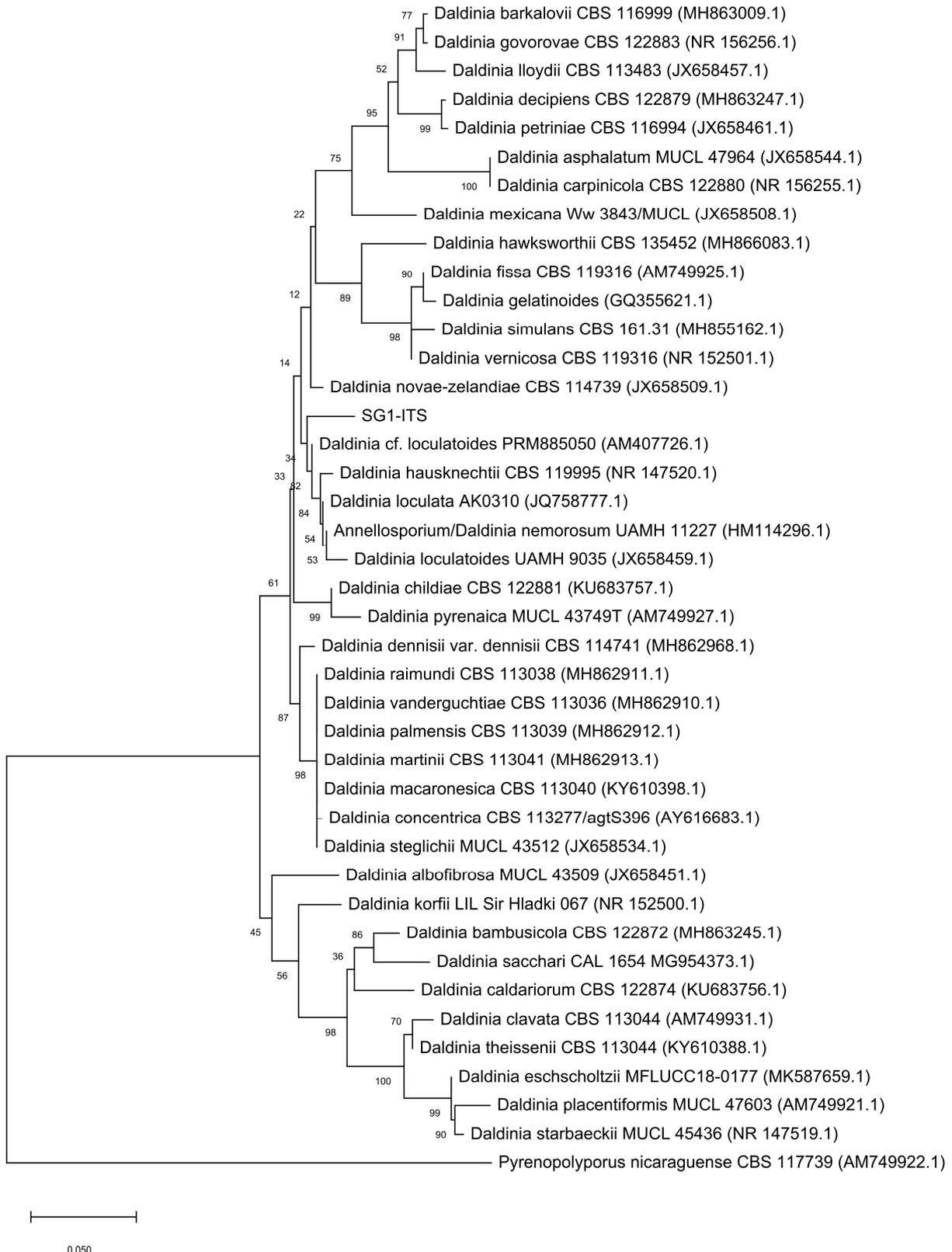


Abbildung 4.4.3.: Maximum-Likelihood-Baum mit ITS-Sequenz des Stammes SG1 und Vergleichsreferenzen aus Xylariaceae-Familie mit 1000 Bootstrap-Replikationen und *Aspergillus nidulans* als Outgroup (eigene Darstellung).

Die Testung des Rohextrakts auf zytotoxische ($IC_{50} > 500 \mu\text{g/ml}$) und antibakterielle (kein Hemmhof bei $1000 \mu\text{g}$ je Plättchen) Aktivität war nicht auffällig. Eine bioaktivitätsgeführte Isolierung der Verbindungen war daher nicht möglich. Die Auswahl zur Kultivierung im größeren Maßstab für die mykochemische Untersuchung erfolgte demnach allein anhand einer putativen neuen *Daldinia*-Art. Neue Arten von Endophyten werden generell eher mit dem Vorhandensein von neuen, bisher nicht beschriebenen Sekundärmetaboliten assoziiert (siehe Kapitel 2.1.4.). Außerdem war zum Zeitpunkt der Auswahl nach einer Literaturrecherche nur eine überschaubare Anzahl an mykochemischen Untersuchungen ($N \sim 20$), welche die Gattung *Daldinia* als Gegenstand der Untersuchung hatten, verfügbar (i.d.R. *Daldinia concentrica* (Feng *et al.* 2013) oder *Daldinia eschscholtzii* (z.B. Hu *et al.* 2014)). Die evolutionäre Distanz zu den beiden am häufigsten studierten *Daldinia*-Arten *D. eschscholtzii* und *D. concentrica* zeigte zudem im Vergleich zu anderen *Daldinia*-Vertretern nur geringe Verwandtschaft (Abbildung 4.5.3.). Demnach wurde die mykochemische Untersuchung des *Daldinia*-Stammes SG1 als gute Möglichkeit zur Isolierung neuer Metaboliten eingeschätzt.

4.4.2. Extraktbearbeitung

Das aus der Kultivierung ($t = 28$ d, $T = 25$ °C) durch Solid-State-Fermentation (SSF) auf Reis ($m = 1.8$ kg) erhaltene getrocknete Rohextrakt ($m = 19.7$ g, Essigsäureethylester) von Stamm SG1 (*Daldinia* sp.) wurde durch eine zweistufige Flüssig-Flüssig-Extraktion (1. EtOAc/H₂O, 1:1, % v/v; 2. MeOH/Hexan, 1:1, % v/v) vorbehandelt (Abbildung 4.4.4.). Die erste Phasentrennung lieferte eine wässrige Fraktion mit überwiegend polaren Komponenten (SG1-F1, $m = 5.51$ g, H₂O-Fraktion). Die organische Phase wurde getrocknet, in Methanol aufgenommen und mit Hexan extrahiert. Die Hexanfraktion beinhaltete überwiegend unpolare (SG1-F3, $m = 4.41$ g) und die Methanolfraktion hauptsächlich intermediär-polare Verbindungen (SG1-F2, $m = 7.89$ g). Letztere der Fraktionen wurde einer groben Trennung (NP-LC) über Gradientenelution in einer Kieselgelsäule (Säule: $m_{\text{Silica}} = 400$ g, $\varnothing = 5$ cm, $h = 40$ cm) unterworfen und lieferte 19 Hauptfraktionen. Die Gradientenelution wurde beginnend mit Petrolether über Petrolether/Ethylacetat- gefolgt von Ethylacetat/Methanol-Mischungen und abschließenden Spülen mit einem Methanol/Wasser/Essigsäure-Gemisch (75/20/5, % v/v/v) vollzogen. Die Bearbeitung von Hauptfraktion 3 (SG1-F2-3, $m = 398$ mg), 7 (SG1-F2-7, $m = 68.5$ mg) und 10 (SG1-F2-10, $m = 62.0$ mg) mittels präparativer RP-HPLC lieferte die Verbindungen 1,8-Dimethoxynaphtalen (SG1-203, $m = 18.7$ mg), Hexadecansäure (SG1-205, $m = 16.2$ mg) und (+)-Orthosporin (SG1-202, $m = 8.10$ mg). Nach fünfstufiger Trennungssequenz der vierten Hauptfraktion (SG1-F2-4, $m = 778$ mg) bestehend aus LC, SEC, präparativer Dünnschichtchromatographie, sowie wiederholter SEC und LC konnte das Ergosterolderivat 5-Campestenon (SG1-213b, $m = 4.02$ mg) gewonnen werden. Die Bearbeitung von Fraktion 6 (SG1-F2-6, $m = 1.21$ g) durch SEC und LC resultierte in der Isolierung des Hauptmetaboliten Heptentriol (Hept-6-en-2,4,5-triol, SG1-212a, $m = 337$ mg). Da nur ein Teil des Ausgangsmaterials bearbeitet worden ist, wäre etwa die doppelte der angegebenen Menge isolierbar gewesen. Mit derselben Trennstrategie (SEC und LC) gefolgt von einer abschließenden präparativen RP-HPLC erfolgte die Isolierung von Daldiniapyron (SG1-219, $m = 4.20$ mg) aus Fraktion 6. Die Ceramide enthaltene Fraktion wurden direkt aus dem Eluat der initialen Säule aus Hauptfraktion 14 ($m = 164$ mg) präzipitiert. Bedingt durch die schlechte Resolvierung wurde das Präzipitat gewaschen (PE, EtOAc, DCM, MeOH, ACN) und erbrachte ein Ceramidgemisch (SG1-201b, $m = 3.21$ mg). Die durch Spülen (EtOAc/MeOH) erhaltene Fraktion 17 (SG1-F2-17, $m = 125$ mg) wurde einer Flüssig-Flüssig-Extraktion (1:1, % v/v, DCM/H₂O) unterworfen. Die *N*-Acetylphenylalanin (SG1-230, $m = 2.5$ mg) enthaltene wässrige Phase wurde per RP-HPLC aufgereinigt. Weitere Haupt- und Unterfraktionen wurden bearbeitet (z.B. SG1-F2-8, SG1-F2-16) lieferten aber entweder kein sauberes Endprodukt in für Analysen ausreichender Menge oder enthielten bereits im Laufe der Extraktbearbeitung isolierte Metaboliten (z.B. SG1-208 (SG1-F2-3-5-SE1-1) \equiv 1,8-Dimethoxynaphtalen (SG1-203) oder SG1-216b (SG1-F2-6-SE2-3-S2-SE1-5) \equiv Ergosterolperoxid (SG1-209)).

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.4. Stamm SG1 (Daldinia sp.) -

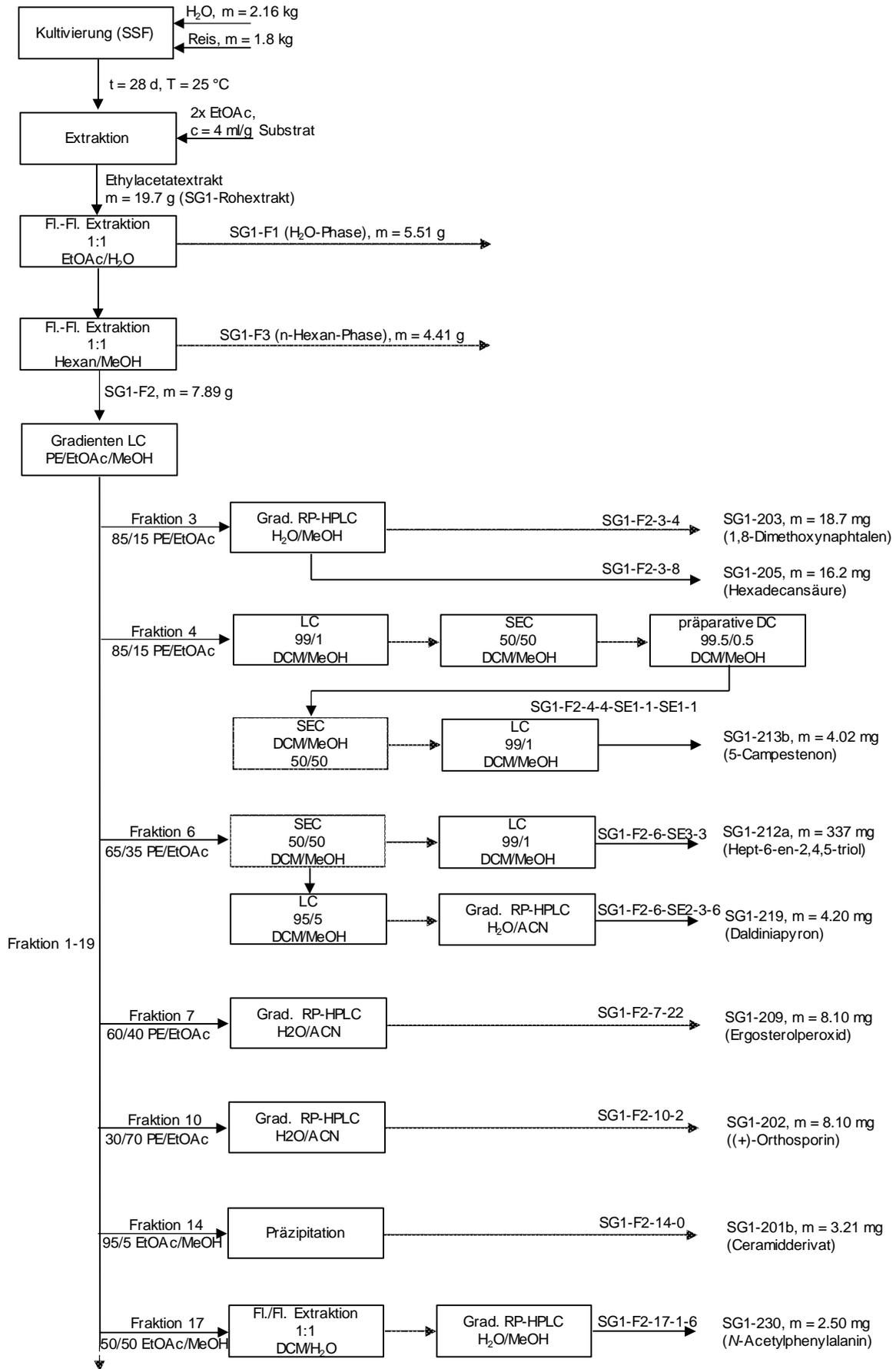


Abbildung 4.4.4.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm SG1 (eigene Darstellung).

4.4.3. Isolierte und charakterisierte Verbindung aus Stamm SG1

4.4.3.1. (+)-Orthosporin (SG1-202)

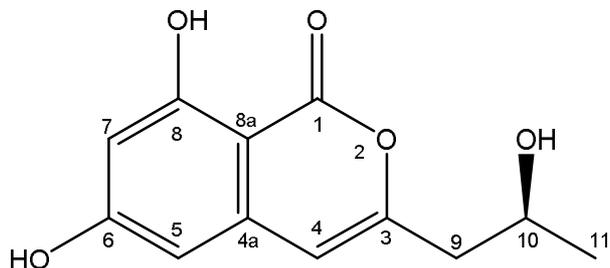


Abbildung 4.4.5.: Struktur von Verbindung SG1-202 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG1-202 wurde als farbloser Feststoff ($m = 7.97$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_r = 27.7$ min, Standardmethode 1, Eluent A/B, $V = 10$ ml/min) aus Hauptfraktion 10 ($m = 62.0$ mg) gewonnen.

Im $^1\text{H-NMR}$ waren vier Signalgruppen beobachtbar, von denen drei Protonen im aromatischen bzw. olefinischen Bereich (δ_{H} [ppm] = 6.63 (s, 1H, H-4), 6.31 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 6.30 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-5)), ein oxymethin Proton (δ_{H} [ppm] = 4.15 (m, 1H, H-10)) und eine aliphatische Methylgruppe (δ_{H} [ppm] = 1.25 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-11)) identifiziert werden konnten. Trotz der teilweisen Signalüberlagerung der aromatischen Protonen H-5 und H-7 ließ sich anhand der Kopplungskonstante eine *meta*-Stellung ableiten. Des Weiteren deutete die Hochfeldverschiebung bzw. Abschirmung der aromatischen Protonen im Vergleich zum Benzol ($\delta_{\text{H}} = 7.16$ ppm) auf eine Funktionalisierung durch Heteroatome in *ortho*-Position am Ring hin. Anhand der HMQC-Resonanz konnte die noch verbliebene Signalgruppe des $^1\text{H-NMR}$ Spektrums (δ_{H} [ppm] = 2.63 - 2.55 (m, 2H, H-9 und H-9')) einer diastereotopen Methyleinheit zugeordnet werden. Im COSY-Spektrum ließen sich zwei separate Spinsysteme ausmachen, wobei das Kreuzsignal zwischen H-4 und H-9 wenig intensiv ist und auf eine 4J -Kopplung hinweist. Des Weiteren lieferte es die Reihenfolge der Verknüpfung von Methyl-, Methylen- und Oxymethineinheit.

Das $^{13}\text{C-NMR}$ zeigte insgesamt zwölf zum Molekül gehörige Kohlenstoffatome. Neben den bereits bekannten Elementen der Methylgruppe (δ_{C} [ppm] = 23.3 (C-11)), des Oxymethins (δ_{C} [ppm] = 66.1 (C-10)), der diastereotopen Methyleinheit (δ_{C} [ppm] = 43.8 (C-9)) und der aromatischen bzw. olefinischen Protonen (δ_{C} [ppm] = 107.0 (C-4), 102.6 (C-5), 103.7 (C-7)) waren sechs quarternäre Kohlenstoffatome ersichtlich. Vier dieser quarternären C-Signale wiesen chemische Verschiebungen auf, die eine Sauerstofffunktionalisierung als Carbonyl- bzw. Hydroxylgruppe (δ_{C} [ppm] = 167.8 (C-1), 167.2 (C-8), 164.8 (C-6), 156.1 (C-3)) vermuten ließen.

Obwohl keine Korrelation von Protonen zu C-1 ($\delta_{\text{C}} = 167.8$ ppm) im HMBC sichtbar waren, wurde diese Gruppe als zum Molekül gehörige Carbonylgruppe gewertet. Die übereinstimmenden HMBC-Signale (Abbildung 4.5.5b.) der aromatischen Protonen ermöglichten die

Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.5.5a.) und die Etablierung der Struktur. Aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebung der aromatischen Protonen H-5 und H-7 und der mitunter mangelnden Unterscheidbarkeit der Signalintensität zwischen $^2J_{C,H}$ und $^4J_{C,H}$ Kopplungen in rigiden Gerüsten kann die chemische Verschiebungszuordnung der Positionen an C-5 und C-7 und der Hydroxylkohlenstoffe (C-6, C-8) bzw. des Carbonylkohlenstoffs (C-1) vertauscht sein. Die Überprüfung der Summenformel ($C_{12}H_{12}O_5$) des Strukturvorschlages gelang durch den Nachweis passender Pseudomolekularionen bei positiver ($m/z = 237.0716$, $[M+H]^+$, $m/z = 219.0610$ $[M-H_2O]^+$) und negativer Ionisierung ($m/z = 235.0591$, $[M-H]^-$) in HR-MS-Untersuchungen. Die Massenanalyse, welche die Anzahl vorhandener Sauerstoffatome verifizierte, zeigte zudem, dass der Carbonylester an C-1 über ein Lacton mit dem Kohlenstoff an C-3 verbunden ist und nicht als Hydrolyseprodukt mit Carbonsäure- bzw. Alkoholfunktion vorlag.

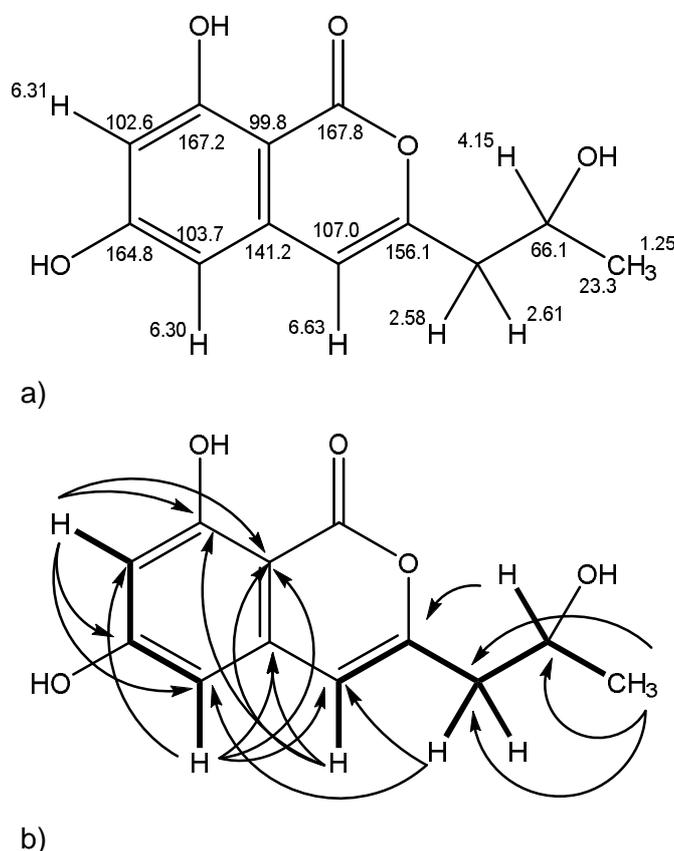


Abbildung 4.5.6.: a) Chemische Verschiebung von 1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von SG1-202 in MeOH- D_4 (eigene Darstellung).

Die Verbindung konnte als das literaturbekannte Isocoumarinderivat (+)-Orthosporin ((*S*)-6,8-dihydroxy-3-(2-hydroxypropyl)-1H-isochromen-1-on) identifiziert werden. (-)-Orthosporin ist in Naturstoffuntersuchungen bisher nur in einer einzigen Literaturstelle aus dem Pilz *Ascotricha* sp. (Familie: Xylariaceae) bekannt (Zhang *et al.* 2016). Hingegen (+)-Orthosporin wurde unter anderem schon als Isolat mehrerer mykochemischer Untersuchungen aus den verwand-

ten *Daldinia*-Arten *D. concentrica* (Familie: *Hypoxylaceae*) (Quang *et al.* 2002, Lee *et al.* 2006) und *D. eschscholtzii* (Zhang *et al.* 2011, Barnes *et al.* 2016) berichtet. Ein Vergleich der spezifischen Drehwerte (SG1-202: $\alpha_D^{30} = +36, c = 1.0$, MeOH) zu der von Hallock *et al.* (1988) isolierten Verbindung ($\alpha_D^{25} = +22, c = 0.09$, MeOH) zeigte ebenfalls einen positiven Drehwert in guter Übereinstimmung zu den Werten bei Hallock *et al.* (1988). Somit handelt es sich bei dem isolierten Metabolit um das S-konfigurierte Enantiomer (+)-Orthosporin.

(+)-Orthosporin wurde erstmals von Hallock *et al.* (1988) aus dem Phytopathogen *Drechslera siccans* (Pleosporaceae) isoliert und charakterisiert. Weiterhin wurde dieses Polyketid in diversen Pilztaxa (*Rhynchosporium* sp. (Ichihara *et al.* 1989), *Ceratocystis* sp. (Gremaud & Tabacchi 1996), *Stagonospora* sp. (Nicolett *et al.* 1999), *Penicillium* sp. (Malmstrøm *et al.* 2000), *Mollisia* sp. (Weber *et al.* 2007), *Aspergillus* sp. (*A. ochraceus*, Harris & Mantle 2001; *A. oryzae*, Nakazawa *et al.* 2012), *Phomopsis* sp. (Abreu *et al.* 2012), *Mucor* sp. (Feng *et al.* 2014), *Elaphocordyceps* sp. (Yuan 2014), *Botryosphaeria* sp. (Ju *et al.* 2016), *Peyronellaea* sp. (Zhao *et al.* 2016), *Alternaria* sp. (Orfali *et al.* 2017), *Graphostroma* sp. (Niu *et al.* 2018)) verschiedener Ordnungen (Botryosphaeriales, Diaporthales, Eurotiales, Helotiales, Hypocreales, Microascales, Mucorales, Pleosporales, Xylariales) nachgewiesen, sodass sich für das Auftreten der Verbindung keine Fokussierung bzw. Spezialisierung auf bestimmte Familien oder Ordnungen erkennen lässt. Auch ist eine breite Verteilung über verschiedene Habitate und ökologische Funktionen beobachtbar. Einigen der Pilze aus den genannten mykochemischen Studien wurden als Endophyten (Barnes *et al.* 2016, Ju *et al.* 2016, Orfali *et al.* 2017, Abreu *et al.* 2012) aus terrestrischen Habitaten und andere aus marinen Habitaten (Malmstrøm *et al.* 2000, Zhao *et al.* 2016) isoliert. Wiederum andere sind beispielsweise als Erdbodenisolate (Feng *et al.* 2014), als Saprophyten auf Totholz (Weber *et al.* 2007), als Pflanzenpathogene (Hallock *et al.* 1988, Gremaud & Tabacchi 1996) oder mit Insekten assoziiert (Zhang *et al.* 2011) beschrieben.

Über die Bioaktivität der Verbindung und die ökologische Funktion sind kaum Daten verfügbar. Weber *et al.* (2007) stellte geringe zytotoxische Aktivität ($IC_{50} = 212 \mu\text{M}$, Jurkat-Zelllinie) fest. Zhao *et al.* (2016) berichten zusätzlich über die antibakterielle Wirkung gegenüber dem gram-negativen Pflanzenpathogen *Ralstonia solanacearum* ($MIC = 32 \mu\text{M}$), sowie antioxidativen Effekten durch Regulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2). Des Weiteren wurden phytotoxische Effekte, wie zum Beispiel die Inhibition des Wurzelwachstums von Salat (*Lactuca sativa*, Ichihara *et al.* 1989) und nekrotische Symptome bei Blättern des Kaffeebaums (*Coffea arabica*, Gremaud & Tabacchi 1996) festgestellt. Die Sensitivitäten bzw. beobachteten nekrotisierten Flächen sind aber je nach Pflanzenlinie unterschiedlich stark ausgeprägt (Hallock *et al.* 1988). Weitere Bioaktivitäten (z.B. antimykotisch, Repellent bei Insektenlarven), die bei den strukturell verwandten Isocoumarin- bzw. Melleinderivaten (vergleiche TS7-202 (Kapitel 4.3.3.1.) und SG25-105 (Kapitel 4.6.3.1.))

festgestellt wurden, sind wahrscheinlich ebenfalls für (+)-Orthosporin erwartbar, auch wenn dies bisher nicht getestet wurde. Die phytotoxischen Eigenschaften des von SG1 produzierten Metaboliten verdeutlichen ein möglicherweise ambivalentes Verhältnis der Wirtspflanze zum Endophytenstamm SG1. Die Produktion von Phytotoxinen durch einen mutualistischen Pilzendophyten erscheint zunächst widersprüchlich, da die Endophytenkolonisierung als symptomlos ohne offensichtlich schädigende Effekte definiert ist. Ein erhöhter Anteil an herbizidaler Extraktaktivität von endophytischen gegenüber beispielweise Erdbodenisolaten ist bereits in der Literatur dokumentiert (Schulz *et al.* 2002). Diese Beobachtung schließt eine mutualistische bzw. symbiotische Interaktion zwischen Endophyt und Wirt nicht aus (Schulz *et al.* 1999), denn die Produktion des phytotoxischen Metaboliten in geringerer Konzentration könnte die Anregung der Abwehrfähigkeit gegenüber pathogenen Mikroorganismen fördern bzw. verstärken. Dies könne sich aus der beobachteten stärkeren Abwehrreaktion (Schulz *et al.* 1999) der Pflanzen gegenüber der Endophyten- im Vergleich zu Pathogeninfektion ableiten lassen. Des Weiteren könnte ein stärkerer Nutzen für den Wirt durch die endophytische Produktion antimikrobieller Substanzen, welche gegen andere potenzielle Pathogene gerichtet sind, bestehen, als durch die schädigende Wirkung der ebenfalls endophytisch produzierten Phytotoxine entsteht. Zudem ist nicht klar, ob und in welchen Mengen phytotoxische Verbindungen auch innerhalb der Endophyt-Pflanzen-Interaktion gebildet werden. Die Endophyt-Wirts-Beziehungen können sehr komplex und zeitlich variabel sein. Demnach werden Netzwerke von multiplen, ausgeglichenen Antagonismen zwischen Wirtspflanze und verschiedenen Endophyten, sowie Pathogenen postuliert (Schulz *et al.* 2015).

4.4.3.2. 1,8-Dimethoxynaphthalen (SG1-203)

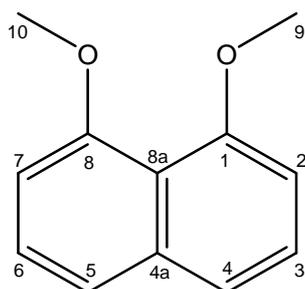


Abbildung 4.4.7. Struktur von Verbindung SG1-203 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG1-203 wurde als leicht bräunlicher, farbloser Feststoff ($m = 18.7$ mg) aus der dritten Hauptfraktion ($m = 398$ mg) nach RP-HPLC ($t_R = 73.9$ min, Standardmethode 1, Eluent C/D, $V = 6$ ml/min) gewonnen.

Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte eine wenig-komplexe Resonanzverteilung, die nur vier Signalgruppen insgesamt umfasste. Drei davon (δH [ppm] = 7.40 (dd, $J = 8.2, 1.2$ Hz, 2H, H-4 und H-5), 7.36 (t, $J = 7.4$ Hz, 2H, H-3 und H-6), 6.85 (dd, $J = 7.4, 1.0$ Hz, 2H, H-2 und H-7)) waren im Verschiebungsbereich für aromatische Protonen vorzufinden. Deren Kopplungsmuster und Kopplungskonstanten sind charakteristisch für *ortho-meta*-koppelnde (zwei doppel Dubletts) bzw. *diortho*-koppelnde (pseudo Triplet) aromatische Protonen und legten somit als Element des Grundgerüsts ein tri-substituierten Phenylring (*ortho*-, *meta*-, *para*-substituiert) nahe. Das verbliebene Signal im $^1\text{H-NMR}$ (δH [ppm] = 3.98 (s, 3H, H-9 und H-10)) war anhand der Verschiebung und dem Integralverhältnis als Methoxyfunktion zu identifizieren. Das HMQC-Spektrum lieferte die vier Korrelationen und die Zuordnung der chemischen Verschiebung für die mit Wasserstoff verbundenen Kohlenstoffe (δC [ppm] = 126.5 (C-3 und C-6), 121.0 (C-4 und C-5), 106.3 (C2 und C-7), 56.6 (C-9 und C-10)). Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum enthielt insgesamt sieben Signale für Kohlenstoffatome, wonach drei Signale quaternären Kohlenstoffen (δC [ppm] = 157.2 (C-1 und C-8), 137.5 (C-4a), 117.7 (C-8a)) zuzuordnen waren. Letztere Beiden der drei Signale verfügten über eine, selbst für die bei quaternären Kohlenstoffen oft beobachtetete Signalintensitätsabschwächung hinaus, auffällig geringe Signalstärken. Dies lieferte einen Hinweis für eine mögliche Symmetrieebene und das Vorhandensein von chemisch und magnetisch äquivalenten Kernen. Massenspektrometrische Analysen (HR-MS-TOF: $m/z = 189.0938$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, NanoESI: $m/z = 211.0$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$) lieferten die Elementarzusammensetzung der Verbindung ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$) und damit die Bestätigung für eine größere Struktur als die NMR-Spektren zunächst vermuten ließen. Die Auswertung der Schlüssel COSY- und HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.5.6b.) ermöglichten die komplette Zuordnung der chemischen Verschiebung der ^1H - und ^{13}C -Kerne (Abbildung 4.4.8a.).

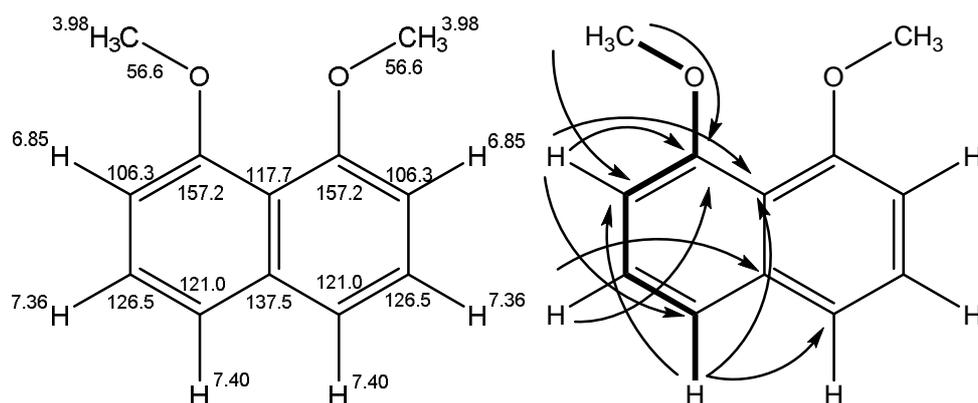


Abbildung 4.4.8.: a) Chemische Verschiebung von ¹H- und ¹³C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für eine Seite der Symmetrieebene von SG1-203 in CDCl₃ (eigene Darstellung).

Die Verbindung konnte als 1,8-Dimethoxynaphthalen bestimmt werden. Vermutlich handelt es sich bei dieser Verbindung um ein Nebenprodukt der pilzlichen Melaninsynthese ausgehend von 1,8-Dihydroxynaphthalen, einem zentralen Intermediat der Melaninbildung (Anke *et al.* 1995, Thines *et al.* 1995, Cordero & Casadevall 2017). 1,8-Dimethoxynaphthalen wird über den Polyketidweg (Pentaketid) gebildet und wurde erstmals 1960 aus einer *Daldinia concentrica*-Mutante berichtet (Allport & Bu'Lock 1960). Zuvor war die Verbindung bereits als Syntheseprodukt bekannt (Heller & Kretschmann 1921, Buu-Hoï & Lavit 1956). Die Verbindung wurde weiterhin natürlich vorkommend in *Leptographium wagneri* (Ophiostomataceae, Ayer *et al.* 1989), endophytischen *Nodulisporium* sp. (Xylariaceae, Dai *et al.* 2006, Dai *et al.* 2009), endophytischen *Sporothrix* sp. (Ophiostomataceae, Wen *et al.* 2009), *Hypoxylon* sp. (Hypoxylaceae, *H. investiens*, Chang *et al.* 2014; *H. invadens*, Dickschat *et al.* 2018), endophytischen *Daldinia eschholtzii* (Hypoxylaceae, Kongyen *et al.* 2015, Yang *et al.* 2018b) und einer endophytischen *Cladosporium* sp. (Cladosporiaceae, Wu *et al.* 2019) nachgewiesen. Der überwiegende Teil der Pilze aus den genannten Studien wurde dabei als Endophyt isoliert. Der taxonomische Fokus der Produktionsorganismen liegt in der Familie Hypoxylaceae, wobei es sich bei den von Dai *et al.* (2006, 2009) identifizierten *Nodulisporium*-Stämmen aufgrund ihres Metabolitprofils um anamorphe *Daldinia*-Stämme handeln könnte (Stadler *et al.* 2014). Das demethylierte Derivat (1-Hydroxy-8-methoxynaphthalen) gilt zudem als chemotaxonomischer Marker für *Daldinia* und assoziierte Genera (*Entonaema*, *Phylacia*, *Ruwenzoria*, *Rhopalostroma*, *Thamnomyces*) (Stadler *et al.* 2011, Stadler *et al.* 2014). Dies unterstreicht erneut, dass es sich bei dem Stamm SG1 wahrscheinlich um einen Pilz handelt, welcher der Gattung *Daldinia* zugeordnet werden kann.

Studien, welche die Bioaktivität der Verbindung evaluieren, sind vorhanden. Chang *et al.* (2014) ermitteln immunmodulatorische Effekte durch die Inhibierung der NO₂⁻ (IC₅₀ = 13 μM) und der Interleukin-6-Produktion (IC₅₀ = 2 μM) in Makrophagen (RAW264.7), welche sogar den Effekt der Positivkontrolle Quercetin übertraf. Des Weiteren stellten Rauf und Mitarbeiter

(2014) im Rattenmodell eine antihyperglykämische Wirkung und eine Modulation des Lipidstoffwechsels, ähnlich des als Antidiabetikum eingesetzten Referenzmedikamentes Glibenclamid, fest. Ebenfalls wurde eine dosisabhängige Zytotoxizität gegen die beiden Krebszelllinien HeLa (Zervixkarzinom) und L1210 (Mauslymphom) ermittelt (Rauf *et al.* 2014, Anke *et al.* 1995). Die angegebenen Kennzahlen ($IC_{50} = 133 \mu\text{M}$, HeLa und $MIC = 53 \mu\text{M}$, L1210) sind im Vergleich zu anderen Zytostatika (Taxol, Doxorubicin, etc.) aber als wenig potent anzusehen.

Darüber hinaus wurden antimykotische (z.B. $MIC = 133 \mu\text{M}$, *Saccharomyces cerevisiae*), antibakterielle ($MIC = 133 \mu\text{M}$, *Staphylococcus aureus*) und nematizidale Tests (z.B. $LC_{50} = 133 \mu\text{M}$, *Caenorhabditis elegans*) durchgeführt (Anke *et al.* 1995). Der nematizidale Effekt der Substanz ist gegen verschiedene Fadenwurmartensarten aber unterschiedlich ausgeprägt. Das mono-demethylierte Derivat zeigte ebenfalls nematizidale und antimikrobielle Aktivität in der gleichen Größenordnung (Anke *et al.* 1995), war allerdings in später erfolgten antibakteriellen und antimykotischen Testreihen gegen ein anderes Set von Testorganismen (*Bacillus subtilis*, *Trichoderma atroviride*, *Yarrowia lipolytica*) nahezu inaktiv ($MIC \geq 500 \mu\text{M}$) (Stadler *et al.* 2007).

Die antimikrobielle Wirkung, abgeleitet aus den MIC-Werten, ist insgesamt als wenig potent einzuschätzen. Demnach ist die ökologische Funktion des 1,8-Dimethoxynaphtalens nicht in der direkten Hemmung des Wachstums anderer Organismen zu sehen. Interessanterweise berichtete Thines *et al.* (1995), dass 1,8-Dimethoxynaphtalen als Inhibitor der pilzlichen Melanin-Biosynthese wirkt. Die Melanisierung in *Daldinia* und verwandten Gattungen ist omnipräsent (Stadler *et al.* 2014). Es könnte sich bei der Produktion der methylierten 1,8-Dihydroxynaphtalene demnach einerseits um eine interne Regulationsmöglichkeit zur Melanin-Biosynthese handeln (Thines *et al.* 1995). Die Melanisierung der Pilzzellwand ermöglicht den Schutz vor vielen physischen und chemischen Umweltstressoren (z.B. UV-Strahlung, Temperatureffekte, mechanische Belastung) (Cordero & Casadevall 2017). Allerdings ist sie auch als Virulenzfaktor bei der Pathogenität von Pilzen involviert (Nosanchuk *et al.* 2015). Die Blockierung der Melaninsynthese ist unter anderem mit der Störung der Zellwandpenetration von Pflanzengewebe durch die Pathogene *Pyricularia oryzae* ("rice blast fungus", Syn.: *Magnaporthe oryzae*), *Colleototrichum lagenarium* (Pathogen von Kürbisgewächsen (Cucurbitaceae) Syn.: *C. orbiculare*) und *Colleototrichum lindemuthianum* ("Brennfleckenkrankheit") assoziiert (Thines *et al.* 1995). Insbesondere im Kontext der Endophyt-Wirts-Wechselwirkung, könnte demnach andererseits vermutet werden, dass ein protektiver Effekt durch die endophytische Produktion methylierter 1,8-Dihydroxynaphtalene besteht, welche die Verhinderung der Zellwandpenetration pathogener Pilze ermöglicht.

4.5.3.3. Hept-6-en-2,4,5-triol (SG1-212a)

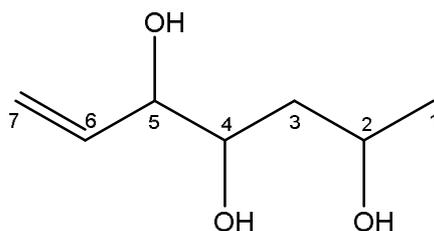


Abbildung 4.4.9. Struktur von Verbindung SG1-212a (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG1-212a (Abbildung 4.4.9.) wurde als farbloses Öl ($m = 337$ mg) nach SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH) und konsekutiver Säulenchromatographie (99/1, % v/v, DCM/MeOH) aus der sechsten Hauptfraktion ($m = 1.21$ g) isoliert.

Im $^1\text{H-NMR}$ waren insgesamt zehn Signalgruppen mit teilweise ausgeprägter Signalaufspaltung zu beobachten. Drei Signale waren dem olefinischen Protonenverschiebungsbereich zuzuordnen (δH [ppm] = 5.94 (ddd, $J = 17.4, 10.7, 5.8$ Hz, 1H, H-6), 5.43 (ddd, $J = 17.4, 1.5, 1.5$ Hz), 1H, H-7), 5.34 (ddd, $J = 10.7, 1.5, 1.5$ Hz, 1H, H-7')). Zwei der Signalgruppen traten dabei aufgrund ähnlicher Kopplungskonstanten als Pseudo-Triplets auf. Die drei Signale wurden zudem aufgrund ihrer übereinstimmenden Kopplungskonstanten als Kopplungspartner eines Spinsystems erkannt. Die Korrelationen im COSY-Spektrum bestätigten diese Annahme. Das HMQC-Spektrum dieser Protonen verdeutlichte darüber hinaus, dass eine terminale Doppelbindung vorliegen musste (δC [ppm] = 133.7 (C-6), 118.8 (C-7)). Des Weiteren waren im $^1\text{H-NMR}$ eine Resonanz für eine tieffeldverschobene aliphatische Methylgruppe (δH [ppm] = 1.34 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H, H-1)), sowie drei weitere Signale vorhanden, die aufgrund ihrer Tieffeldverschiebung (δH [ppm] = 4.26 (ddd, $J = 6.4, 3.4, 3.4$ Hz, 1H, H-4), 4.17 (dddd $J = 6.6, 3.0, 1.2, 1.2$ Hz, 1H, H-5), 4.02 (dq $J = 12.8, 6.2, 1.1$ Hz), 1H, H-2)) drei Wasserstoffe von Oxymethinen vermuten ließen. Die ersten beiden Resonanzgruppen erschienen dabei im $^1\text{H-NMR}$ aufgrund ähnlicher Kopplungskonstanten wiederum als pseudo dt- bzw. pseudo ddt-Signalmuster. Die restlichen drei Resonanzgruppen offenbarten in Kombination mit den HMQC-Korrelationen eine diastereotope Methyleninheit (δH [ppm] = 2.39 (ddd, $J = 13.5, 7.7, 6.4$ Hz, 1H, H-3), 1.58 (ddd, $J = 13.5, 6.8, 2.7$ Hz, 1H, H-3')) und ein breites Signal (δH [ppm] = 1.82 (s breit, 1H)), welches allerdings über keine weiteren Korrelationen in anderen Spektren (COSY, HMQC, HMBC) verfügte. Das $^{13}\text{C-NMR}$ zeigte insgesamt sieben Verschiebungen für Kohlenstoffatome, welche die getroffenen Annahmen der identifizierten Strukturelemente unterstützten (Methyl (δC [ppm] = 22.1 (C-1)), Methylen (δC [ppm] = 42.7 (C-3)), Oxymethine (δC [ppm] = 84.0 (C-5), 74.0 (C-2), 73.9 (C-4)), terminale Doppelbindung (δC [ppm] = 133.7 (C-6) 118.8 (C-7))). Die intensive Überprüfung der 2d-NMR-Spektren (COSY und HMBC) lieferte die Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.4.10a.) und die Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.4.10b.) zur Erstellung eines Strukturvorschlages. Um mögliche Resonanzen der OH-Protonen zu erhalten, wurde ein

Satz Spektren zur Vollcharakterisierung ebenfalls in MeOH-D₃ aufgenommen. Diese ergaben ähnliche chemische Verschiebungen für die bereits erläuterten Strukturelement (Abbildung 4.4.10.c), beinhalteten aber auch zwei zusätzliche Signale im ¹H-NMR (δ H [ppm] = 5.29 (s breit, 1H, 4-OH), 4.60 (s breit, 1H)) unter Abwesenheit des nicht identifizierbaren, vormaligen Protonensignals bei δ H = 1.82 ppm. Ersteres der neu vorhandenen Signale konnte anhand der HMBC-Korrelation einem Hydroxylproton an C-4 zugeordnet werden (Abbildung 4.4.10d.). Das zweite Signal verfügte allerdings über keine weiteren Korrelationen in den 2d-NMR-Spektren und konnte demnach nicht zur weiteren Strukturaufklärung beitragen. Die Komplexität der Kopplungsmuster und die mangelnde Intensität von NOESY-Signalen verhinderten die Etablierung der relativen Konfiguration an den Stereozentren C-2, C-4 und C-5.

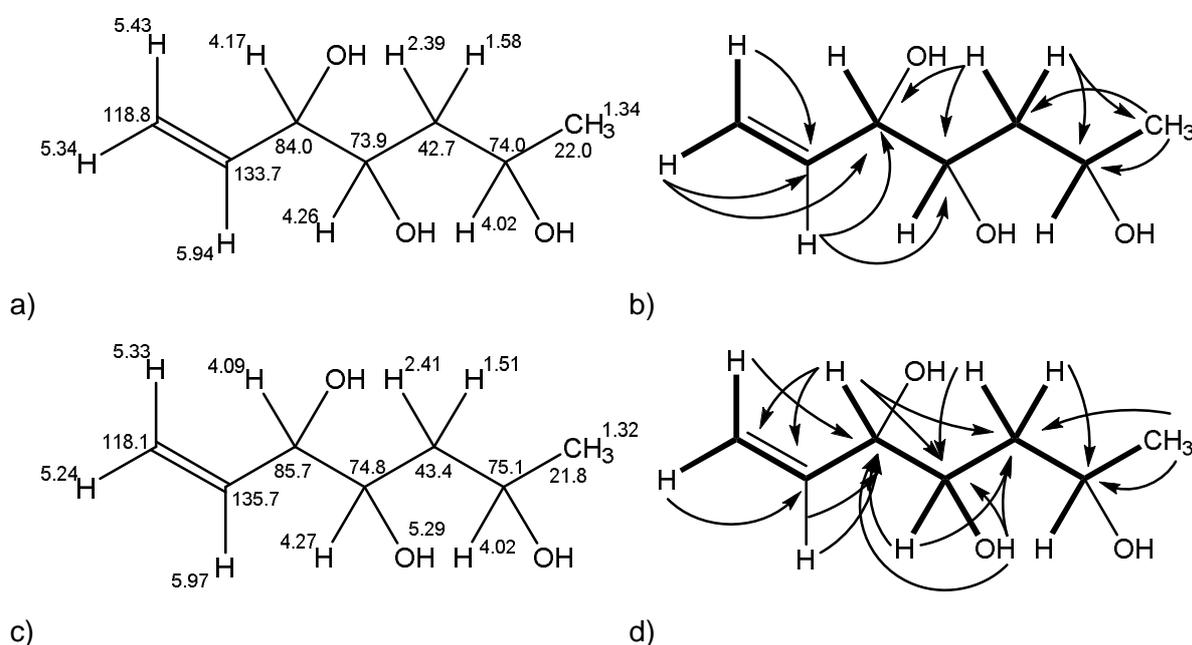


Abbildung 4.4.10.: a) Chemische Verschiebung von ¹H- und ¹³C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für SG1-212a in CDCl₃ bzw. c) und d) in MeOH-D₃ (eigene Darstellung).

HR-LC-MS-Messungen ergaben erstaunlicherweise keine detektierbare Ionisierung bei der entsprechenden Retentionszeit der Verbindung sowohl für den Positiv- als auch für den Negativ-Modus. Massenspektrometrische Untersuchungen mittels Nano-ESI zeigten einerseits m/z -Werte ($m/z = 293.2$, [2M+H], $m/z = 129.0$, [M-H₂O]), die sich Ionenaddukten der deduzierten Struktur zuordnen ließen und somit eine lineare Struktur über einer ebenfalls möglichen zyklisierten Verbindung präferiert werden konnte. Andererseits waren viele weitere m/z -Werte vergleichbarer Intensität vorhanden, die sich nicht zuordnen ließen.

Die Struktur wurde dennoch als Hept-6-en-2,4,5-triol identifiziert. Zwei nicht genauer bestimmte Stereoisomere dieser Verbindung wurden zuvor bereits von Wang & Liu (2004) aus *Daldinia concentrica* postuliert. Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration dieser natürlich isolierten Heptentriole synthetisierten Jiang *et al.* (2011) verschiedene Stereo- und Konstitu-

tionsisomerer. Allerdings fanden sie für die vier hergestellten Vergleichs-Diastereomere von Hept-6-en-2,4,5-triol keine hinreichende Übereinstimmung zu den chemischen Verschiebungen und Drehwerten der isolierten Naturstoffe aus der Primärpublikation. Ebenso ergaben die vier Diastereomere des Konstitutionsisomers Hept-6-en-2,3,5-triol keine Übereinstimmung. Die Autoren um Jiang *et al.* (2011) empfahlen daher für eine Revision der von Wang & Liu (2004) vorgestellten Struktur. Ein Vergleich der chemischen ^{13}C -Verschiebungen zeigte dennoch eine relativ gute Übereinstimmung zu einer der postulierten Heptentriole des Naturstoffextraktes von *D. concentrica* (Tabelle 4.4.1.).

Tabelle 4.4.1.: Chemische Verschiebung der ^{13}C -Signale von Verbindung SG1-212a im Vergleich zu Literaturwerten natürlicher und synthetischer Hept-6-en-2,4,5-triole in CDCl_3 .

Position	Wang & Liu 2004				Jiang <i>et al.</i> 2011		
	SG1-212a	Isomer 1	Isomer 2	2S,4S,5S	2S,4S,5R	2R,4S,5S	2R,4S,5R
	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] (CDCl_3)						
6	133.7	133.6	136.7	137.3	136.2	137.2	139.0
7	118.8	117.9	115.4	117.6	117.4	117.8	116.6
5	84.0	83.9	87.2	76.4	75.7	76.2	77.6
2	74.0	73.6	76.0	74.9	74.7	71.8	72.4
4	73.9	73.2	74.2	68.2	68.4	65.5	65.4
3	42.7	42.0	41.1	40.5	38.7	40.1	42.4
1	22.1	21.0	20.1	23.9	24.1	23.6	24.4
$\alpha_D, T [^\circ\text{C}], c (\text{CDCl}_3)$	+24, 30, 1.0	+22, 25, 0.75	-52, 26, 0.75	-1, 25, 0.76	+18, 26, 0.76	-38, 24, 0.55	-18, 26, 0.74
Erscheinung	farbl. Öl	farbl. Öl	farbl. Öl	farbl. Öl	farbl. Öl	farbl. Festst.	farbl. Festst.

Die in der Tabelle angegebenen Werte waren wiederum schwer zu vergleichen, da einerseits Wang & Liu (2004) für die NMR-Daten-Akquise ein Lösungsmittelgemisch ($\text{CDCl}_3/\text{MeOH-D}_4$, 2:1) angegeben hatten. Jiang und Mitarbeiter (2011), welche Zugang zu den Originalspektren der Verbindungen von Wang & Liu (2004) hatten, konnten hingegen keinen Hinweis für eine Messung mit MeOH-Zusatz finden. Andererseits sind die Beschriftungen für die Daten der synthetisierten Diastereomere in Jiang *et al.* (2011) inkonsistent, sodass die Zuordnung der experimentellen Daten zum jeweiligen Isomer eventuell fehlerhaft ist.

Die Identität der Struktur und deren Stereochemie ließen sich somit nicht abschließend anhand der Literaturwerte klären. Ein Vergleich der chemischen Verschiebungen ergab allerdings Hinweise, dass es sich um ein bereits von Wang & Liu (2004) (Isomer 1), ebenfalls aus einer *Daldinia*-Art, isolierte Verbindung handelte. Ein Vergleich der Drehwerte legte diese Vermutung ebenfalls nahe (Tabelle 4.4.1.). Die NMR-Korrelationen und chemischen Verschiebungen stützten die Annahme, dass es sich trotz der fehlenden Übereinstimmung der Messwerte zu den synthetischen Vergleichsverbindungen entweder um die Verbindung Hept-6-en-2,4,5-triol oder um ein Molekül mit Heptenol als Symmetrieeinheit handelte. Letzteres konnte allerdings wegen der schlechten Ionisierung der Verbindung in HR-LC-MS-Messungen nicht validiert werden.

Daten zur Bioaktivität sind bisher nicht verfügbar, da dieser Metabolit bisher nur in zwei Publikationen (Wang & Lui 2004, Jiang *et al.* 2011) behandelt wurde und keine Bioaktivitätstests durchgeführt wurden. Das Rohextrakt zeigte in den Voruntersuchungen keine nennenswerten antibakteriellen und zytotoxischen Eigenschaften. Die isolierte Reinsubstanz wurde daher nicht gesondert getestet. Ein antibakteriell oder zytotoxisch potenter Effekt wäre als Hauptmetabolit aufgrund der isolierten Menge aber bereits bei der Untersuchung des Rohextraktes auffällig geworden. Die biologische Funktion des Metaboliten bleibt insbesondere wegen der vergleichsweise hohen Abundanz ($w \sim 3.5\%$ des Rohextraktes), die eine besondere Relevanz der Verbindung für den Organismus erwarten ließ, ungeklärt. Es könnte sich bei dem Molekül entweder um einen akkumulierten, nicht umgesetzten Präkursor für die Biosynthese weiterer, komplexerer Verbindungen oder um einen als Speicherstoff gebildetes Depot für eine spätere Nährstoffverfügbarkeit bei suboptimaler Versorgungslage, handeln. Die dargelegten Vermutungen bleiben jedoch ohne weitere Untersuchungen spekulativ.

4.5.3.4. Daldiniapyron (SG1-219)

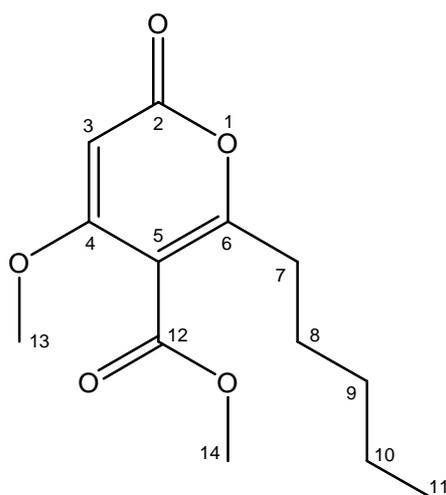


Abbildung 4.4.11. Struktur von Verbindung SG1-219 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG1-219 ($m = 4.20$ mg) wurde als farbloser Feststoff aus der sechsten Hauptfraktion ($m = 1.21$ g) nach SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH), Säulenchromatographie (95/5, % v/v, DCM/MeOH) und abschließender Reinigung durch RP-HPLC ($t_R = 9.5$ min, Methode: 50-100% Eluent B in 100 min, Eluent A/B, $V = 4$ ml/min) gewonnen.

Im $^1\text{H-NMR}$ waren insgesamt sieben Signalgruppen erkennbar. Zwei von diesen wurden direkt als Methoxygruppe (δH [ppm] = 3.86 (s, 3H, H-13), 3.83 (s, 3H, H-14)) identifiziert. Ein weiteres Proton (δH [ppm] = 5.45 (s, 1H, H-3)) war einem aromatischen bzw. olefinischen Verschiebungsbereich zuzuordnen. Die verbliebenden Signale ließen eine aliphatische Kette mit einer terminalen Methylgruppe (δH [ppm] = 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-11)) und der Anbindung an ein aromatisches oder olefinisches System bzw. an ein sp^2 -hybridisiertes Kohlenstoff erwarten. Das COSY-Experiment verdeutlichte Kopplungen innerhalb der aliphatischen Kette und half die Konnektivität der einzelnen Positionen zu bestimmen. Daneben war, wenn auch mit sehr geringer Intensität, ein zweites Spinsystem, welche die Methoxygruppe (H-13) und das aromatische Proton (H-3) involvierte, bemerkbar. Daraus ließ sich eine *ortho*-ständige Positionierung zwischen den beiden Gruppen vermuten. Das $^{13}\text{C-NMR}$ zeigte indes Signale für dreizehn Kohlenstoffatome insgesamt. Aus einem Vergleich der chemischen Verschiebungen der C-Atome im HMQC- und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum wurden fünf quaternäre Kohlenstoffe ermittelt. Augenscheinlich waren vier Signale, die Anhand ihrer chemischen Verschiebung sp^2 -hybridisiert und sauerstofffunktionalisierte Kohlenstoffatome (δH [ppm] = 168.3 (C-4), 167.0 (C-2), 164.5 (C-12), 163.0 (C-6)) erwarten ließen. Aus massenspektrometrischen Analysen in Kombination mit einer Eingrenzung der Kohlen- und Wasserstoffanzahl konnte die Summenformel ($\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_5$) anhand des Pseudomolekularions ($m/z = 255.1291$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) bei positiver Ionisierung abgeleitet werden. Im Negativmodus lie-

ßen sich leider keine erkennbaren Adduktionen zur zusätzlichen Absicherung der abgeleiteten Summenformel generieren.

Das HMBC-Spektrum ermöglichte die Verknüpfung der einzelnen Substrukturen. Entscheidend für die Etablierung der Molekülstruktur waren die Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.4.12b.) und deren zugehörige Signalintensitäten der Methoxyfunktionen (C-13, C-14), des aromatischen Protons (C-3) und der Methylengruppe (C-7) mit der größten Tieffeldverschiebung. Das Proton an C-3 zeigte dabei drei Korrelationen zu den tieffeldverschobenen, oxofunktionalisierten Kohlenstoffatomen (C-2, C-4 und C-12), die Methylengruppe an C-7 hingegen Korrelation zu einem anderen der vier oxygenierten, sp^2 -hybridisierten C-Atome (C-6). Die signalintensiven $^3J_{C,H}$ - und schwachen $^4J_{C,H}$ -Kopplungen der Methoxygruppen legten deren Position am Pyron-Kern fest (C-4 bzw. C-5). In Übereinstimmung mit der Summenformel und den chemischen Verschiebungen wurden die Carbonylfunktion als Methylester bzw. als Lacton erkannt. Auffällig ist die starke Hochfeldverschiebung des Ringprotons (δH [ppm] = 5.45 (H-3), δC [ppm] = 87.8 (C-3)) und die starke Tieffeldverschiebungen der quaternären, oxygenierten, sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffe an C-4 (δC = 168.3 ppm) und C-6 (δC = 167.0 ppm). Diese Beobachtung ist allerdings durch den Mesomerieffekt der Sauerstofffunktionen (Methoxy bzw. Carbonyl) in zweifacher α - (Hochfeldverschiebung) bzw. zweifacher β -Position (Tieffeldverschiebung) erklärbar.

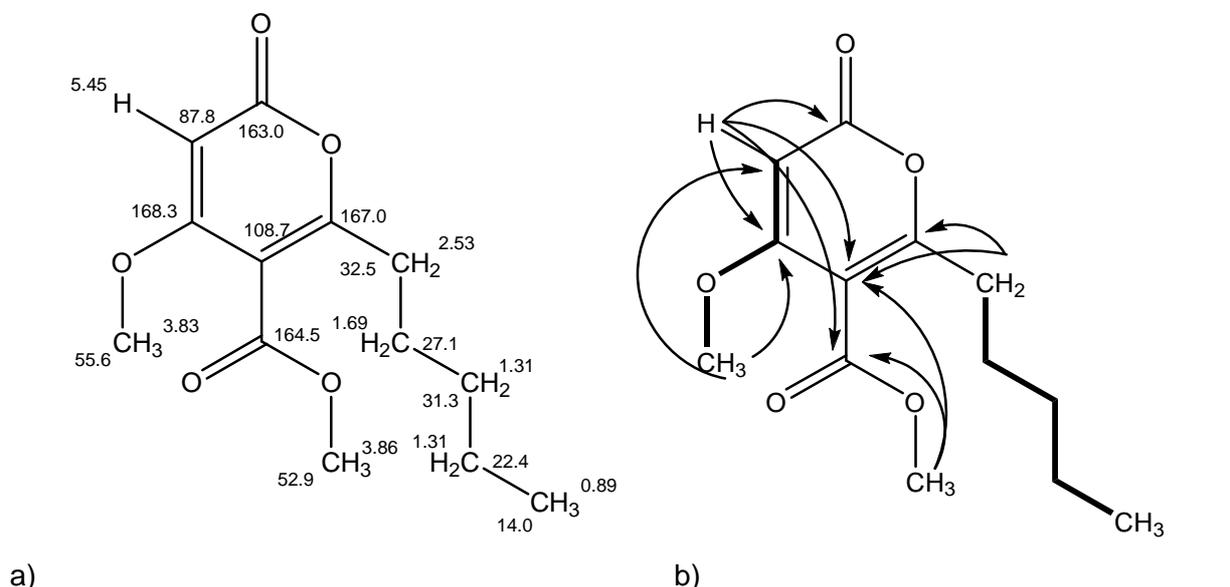


Abbildung 4.4.12.: a) Chemische Verschiebung von 1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für SG1-219 in $CDCl_3$ (eigene Darstellung).

Das Molekül konnte als das bereits publizierte Daldiniapyron (Methyl-4-methoxy-2-oxo-6-pentyl-2H-pyran-5-carboxylat) identifiziert werden. Die spektroskopischen Daten sind in Übereinstimmung mit der Literatur (Quang *et al.* 2002, Kurdymov *et al.* 2008), auch wenn die chemische Verschiebung der einzelnen Positionen zur eigenen Zuordnung abweicht (Abbil-

dung 4.4.12a.). Die Verbindung wurde bisher nur zweimal in Metabolitprofil-Untersuchungen durch Quang *et al.* (2002) und Stadler *et al.* (2007) jeweils aus *Daldinia concentrica* registriert. Darüber hinaus wurde eine Totalsynthese publiziert (Kurdymov *et al.* 2008). Bisher sind wenige Bioaktivitätsdaten ermittelt worden. Stadler *et al.* (2007) berichtete eine nicht feststellbare Wachstumsinhibierung gegen *Bacillus subtilis* und *Yarrowia lipolytica* im Agardiffusionstest bis 50 µg/Plättchen. Des Weiteren wurde eine schwache nematizidale Aktivität ($LC_{50} = 395 \mu\text{M}$, *Caenorhabditis elegans*) ermittelt. Interessanterweise zeigte Daldiniapyron bei sublethalen Konzentrationen (40-200 µM) eine sofortige Paralyse der Nematoden, welche etwa drei Stunden anhielt und von den meisten Organismen ohne weitere Motilitätsstörungen überstanden wurde (Stadler *et al.* 2007). Die strukturell ähnlichen Verbindungen Annularin B und Annularin F aus dem Süßwasserpilz *Annulatascus triseptatus* (Annulatascales) zeigten allerdings geringe antibakterielle Aktivität (*Bacillus subtilis*) im Agardiffusionsassay (200 µg/Plättchen). Interessanterweise wurden für einige weitere strukturell ähnliche Pyrone aus dem Schwamm-assoziierten Pilz *Xylaria feejeensis* (Xylariales) signifikante inhibitorische Aktivität auf die Osteoklastogenese im Bereich von 0.5-1 µM berichtet (Wang *et al.* 2018b), was einen möglichen Einsatz bei Erkrankung des Knochengewebes (z.B. Osteoporose, rheumatoide Arthritis) nahelegt.

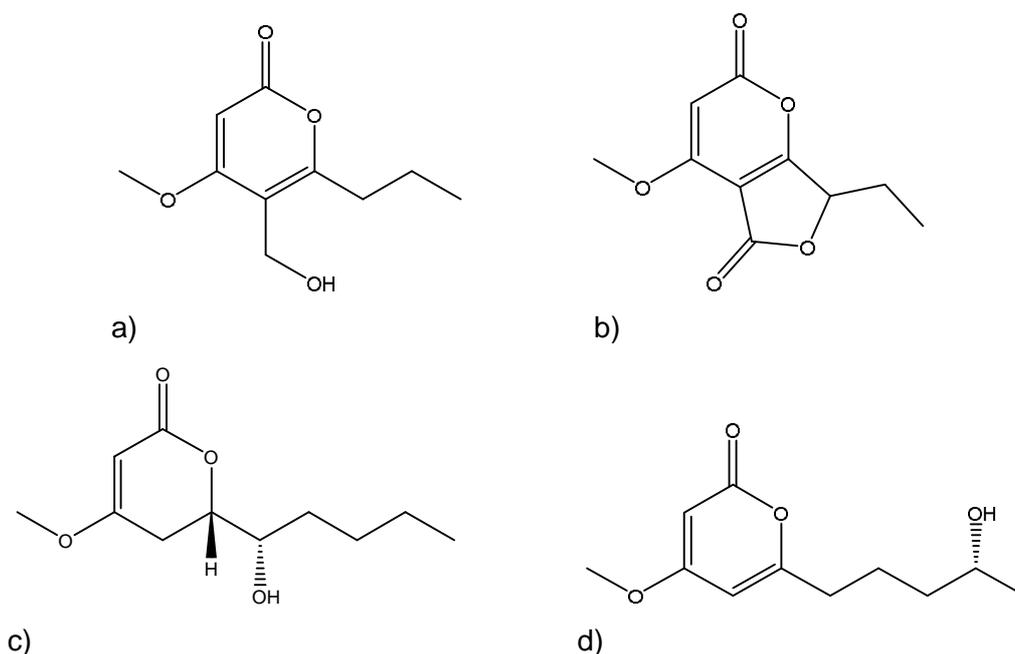


Abbildung 4.4.13.: Strukturell ähnliche Verbindungen zu Daldiniapyron (SG1-219): a) Annularin B, b) Annularin F, c) Pestalotin, d) Scipyrone D (eigene Darstellung).

Im Kontext der Pflanzen-Endophyt-Wechselwirkung ist vor allem der nematizidale und antibakterielle Effekt hervorzuheben. Diese Effekte sind aber im Vergleich zu anderen *Daldinia*-Metaboliten (z.B. Daldinin C) nur sehr schwach ausgeprägt. Demnach bleiben die biologische Funktion bzw. die Zielstruktur des Metaboliten, insbesondere vor der dem Hintergrund der zeitlich beschränkten Motilitätsstörung von Nematoden, unklar.

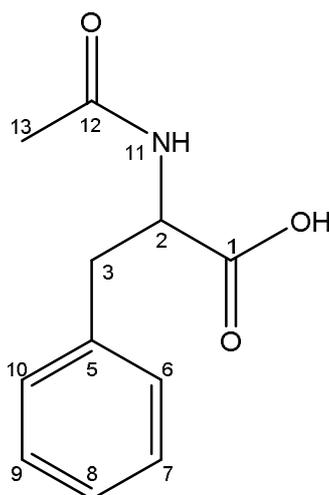
4.4.3.5. *N*-Acetylphenylalanin (SG1-230)

Abbildung 4.4.14. Struktur von Verbindung SG1-230 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG1-230 (Abbildung 4.4.14.) wurde als gelblicher Feststoff ($m = 2.50$ mg) aus der 17. Hauptfraktion ($m = 125$ mg) nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (1:1, % v/v, DCM/MeOH) und RP-HPLC ($t_R = 24.7$ min, Standardmethode 1, Eluent A/B, $V = 10$ ml/min) isoliert.

In HR-LC-MS Messungen konnten die Pseudomolekularionen für die positive ($m/z = 208.0975$, $[M+H]^+$, $\Delta m = 3.27$ ppm) und negative Ionisierung ($m/z = 206.1586$, $[M-H]^-$) ermittelt werden. Die ungerade Nominalmasse deutete dabei das Vorhandensein von einem bzw. $2n+1$ Stickstoffatomen an ("Stickstoffregel"). Die Einschränkung der möglichen Elementkombination durch Information aus den $^1\text{H-NMR}$ - und $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektren ermöglichten die Deduzierung der Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$).

Spektroskopische Messungen im $^1\text{H-NMR}$ zeigten die Anwesenheit von fünf Gruppen von Protonen, darunter fünf überlagerte Wasserstoffatome (δH [ppm] = 7.30-7.17 (m, 5H, H-6 bis H-10)) im aromatischen Bereich und eine im Vergleich zu Aliphaten tieffeldverschobene Methylgruppe (δH [ppm] = 1.90 (s, 3H, H-13)). Des Weiteren offenbarten sich drei weitere Protonen anhand ihrer Kopplungskonstanten als Kopplungspartner eines Spinsystems (δH [ppm] = 4.65 (dd, $J = 9.1, 5.1$ Hz, 1H, H-2) 3.20 (dd, $J = 13.9, 5.1$ Hz, H-3), 2.94 (dd, 13.9, 9.1 Hz, 1H, H-3')) von denen zwei in Kombination mit dem HMQC-Spektrum als diastereotopie Methyleninheit erkannt wurden. Zudem konnten die aromatischen Protonen durch HMQC-Korrelationen drei Kohlenstoffverschiebungen (δC [ppm] = 130.2 (C-6 und C-10), 129.4 (C-7 und C-9), 127.8, C-8) zugeordnet werden. Diese Beobachtung implizierte das Vorhandensein einer Phenylgruppe, deren Achsensymmetrie weniger ^{13}C -Signale erwarten ließ. Diese Einschätzung wurde ebenfalls durch die nahezu doppelte Signalintensität bei zwei chemischen Verschiebungen ($\delta\text{C} = 130.2$ ppm und $\delta\text{C} = 129.4$ ppm) im $^{13}\text{C-NMR}$ unterlegt. Das $^{13}\text{C-NMR}$ zeigte darüber hinaus noch sechs weitere Signale, die insgesamt elf Koh-

lenstoffatome erwarten ließen. Auffällig waren drei Verschiebungen, die quaternären C-Atomen zuordenbar waren. Zwei davon deuteten, anhand ihrer Verschiebung ins Tieffeld, auf Carbonylgruppen in Ester- oder Amidfunktion hin (δC [ppm] = 174.7 (C-1), 173.1 (C-12)). Das HMBC-Spektrum ermöglichte die Verknüpfung der beschriebenen Strukturelemente (Abbildung 4.4.15a.) mit der jeweiligen chemischen Verschiebungszuordnung (Abbildung 4.4.15b.).

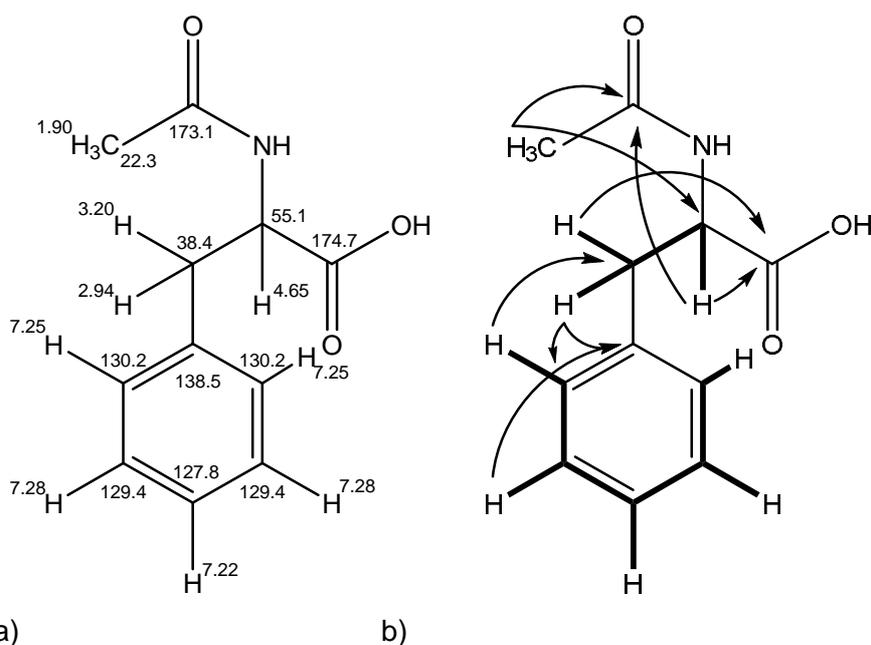


Abbildung 4.4.15.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen für SG1-230 in MeOH- D_4 (eigene Darstellung).

Schlüsselkorrelationen waren unter anderem die Korrelationen der diastereotopen Methylen-einheit zum Phenylring, welche sie in Benzylstellung positionierte. Außerdem waren die Korrelationen des Protons bei $\delta\text{H} = 4.65$ ppm (H-2) zu beiden Carbonylfunktionen entscheidend. Die tieffeldverschobenen Methylprotonen hatten eine intensive $^2\text{J}_{\text{C,H}}$ -Korrelation zu einer der Carbonylgruppen, sowie eine schwache $^4\text{J}_{\text{C,H}}$ -Korrelation zu C-2, sodass diese als Teil einer Acetylgruppe etabliert wurde. Die Verbindung SG1-230 wurde daraufhin als *N*-Acetylphenylalanin identifiziert. Die abgeleitete Summenformel ($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$) bestätigte dieses Ergebnis. Eine ebenfalls mögliche Struktur in der die elfte Position als Ester und der Stickstoff als terminales, primäres Amin an C-1 vorliegt, wurde aufgrund der dann höheren zu erwartenden chemischen Verschiebung an C-2 (Oxymethin $\delta\text{C} \sim 70\text{-}90$ ppm) verworfen. Die Daten der chemischen Verschiebungen sind zudem in hervorragender Übereinstimmung zur Literatur (Koshti *et al.* 2005). *N*-Acetyl-geschütztes Phenylalanin ist hauptsächlich als synthetisch hergestellte Verbindung als Edukt zur Synthese von anderen Molekülen bekannt. Vereinzelt wurde von der Verbindung jedoch auch als Naturstoff aus Pilzen (Wu *et al.* 2011) und Pflanzen (Zengin *et al.* 2018, Farag & Shakour 2019, Bene *et al.* 2019) berichtet. Beim

Nachweis der Verbindung in Pflanzen wurde diese allerdings nicht isoliert sondern lediglich in Metabolomstudien per LC-MS registriert. Bei der isolierten Verbindung SG1-230 könnte es sich eventuell auch um ein Artefakt der Extrakt-Aufarbeitung oder der Trennschritte handeln. Dabei wird die mögliche Acetylierung durch Ethylacetat oder durch Spuren von Essigsäure während der Extraktion oder der initialen Kieselgelsäule aber als sehr unwahrscheinlich eingeschätzt. Aufgrund der synthetischen Verfügbarkeit und der geringen Relevanz als bioaktiver Naturstoff wurde auf weitere Analysen, welche zum Beispiel die Konfiguration der Position am α -C-Atom klärt, verzichtet.

4.4.3.6. Weitere aus Stamm SG1 isolierte Verbindungen

Neben den im vorherigen Abschnitt (Kapitel 4.4.3.1-4.4.3.5.) ausführlich diskutierten Verbindungen wurden ebenfalls andere Metaboliten isoliert, welche häufig in mykochemischen Untersuchungen gewonnen werden und daher nicht spezifisch für eine Gruppe von Pilzen sind oder, wie im Fall des Ceramids (SG1-201b), nicht abschließend strukturell bestimmt werden konnte bzw. eventuell als Gemisch von Verbindungen mit unterschiedlicher Länge der aliphatischen Ketten vorlag. Aufgrund von biosynthetischen Betrachtungen (C18-Dihydrosphingosin, Singh & Del Poeta 2016) und weiteren abgeleiteten Strukturelementen, wie beispielsweise das Vorhandensein einer α -hydroxylierten Fettsäure, sowie der Abschätzung der Kohlenstoffe und Protonen aus dem ^{13}C - und ^1H -NMR ($N_{\text{C}} \sim 42$, $N_{\text{H}} \sim 85$), konnte eine Struktur abgeleitet werden. Es handelte sich bei der isolierten Verbindung (SG1-201b) wahrscheinlich um ein α -OH-Phytoceramid (t18:0) mit Tetracosansäure (C24:0) als amidierten Fettsäurerest. Der Strukturvorschlag für dieses Phytoceramid (*N*-2-Hydroxylignoceroylphytosphingosin) ließ sich allerdings nicht abschließend durch massenspektrometrische Untersuchungen (Nano-ESI) verifizieren. Weitere MS-Untersuchungen (HR-HPLC-MS) ließen sich aufgrund der Unlöslichkeit in gängigen organischen Lösemitteln (eine Löslichkeit wurde nur in Pyridin- D_5 registriert) nicht ausführen.

Ceramide und andere Sphingolipide (Cerebroside, Sphingomyeline, etc.) sind integrale Bestandteile biologischer Membranen und zudem in vielen verschiedenen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Hyphenbildung, Endozytose, Sporolierung, Signaltransduktion, Apoptose und der Virulenz involviert (Singh & Del Poeta 2016). Interessanterweise wurden des Weiteren, in Abhängigkeit von weiteren Substituenten und der aliphatischen Kettenlänge, zytotoxische Effekte gegen Krebszelllinien und antimikrobielle Wirkung (gram-positive und gram-negative Bakterien, Pilze, Mikroalgen) in niedrigen mikromolaren-Bereich publiziert (Becam *et al.* 2017). Unabhängig zum generellen Vorkommen von Verbindungen aus der Klasse der Ceramide und anderen Sphingolipide in Pilzen wurde diese Verbindung bereits aus endophytischen Pilzen isoliert (z.B. Yu *et al.* 2002, Tao *et al.* 2010).

Hexadecansäure (SG1-205) und Ergosterolperoxid (SG1-209) (Abbildung 4.4.16b. und 4.4.16c.) wurden ebenfalls aus dem Stamm T26B isoliert und wurden demnach bereits diskutiert (Kapitel 4.2.3.4). Daneben wurde mit Campestenon (SG1-213b) ein weiteres Ergosterolderivat (Abbildung 4.4.16d.) gewonnen.

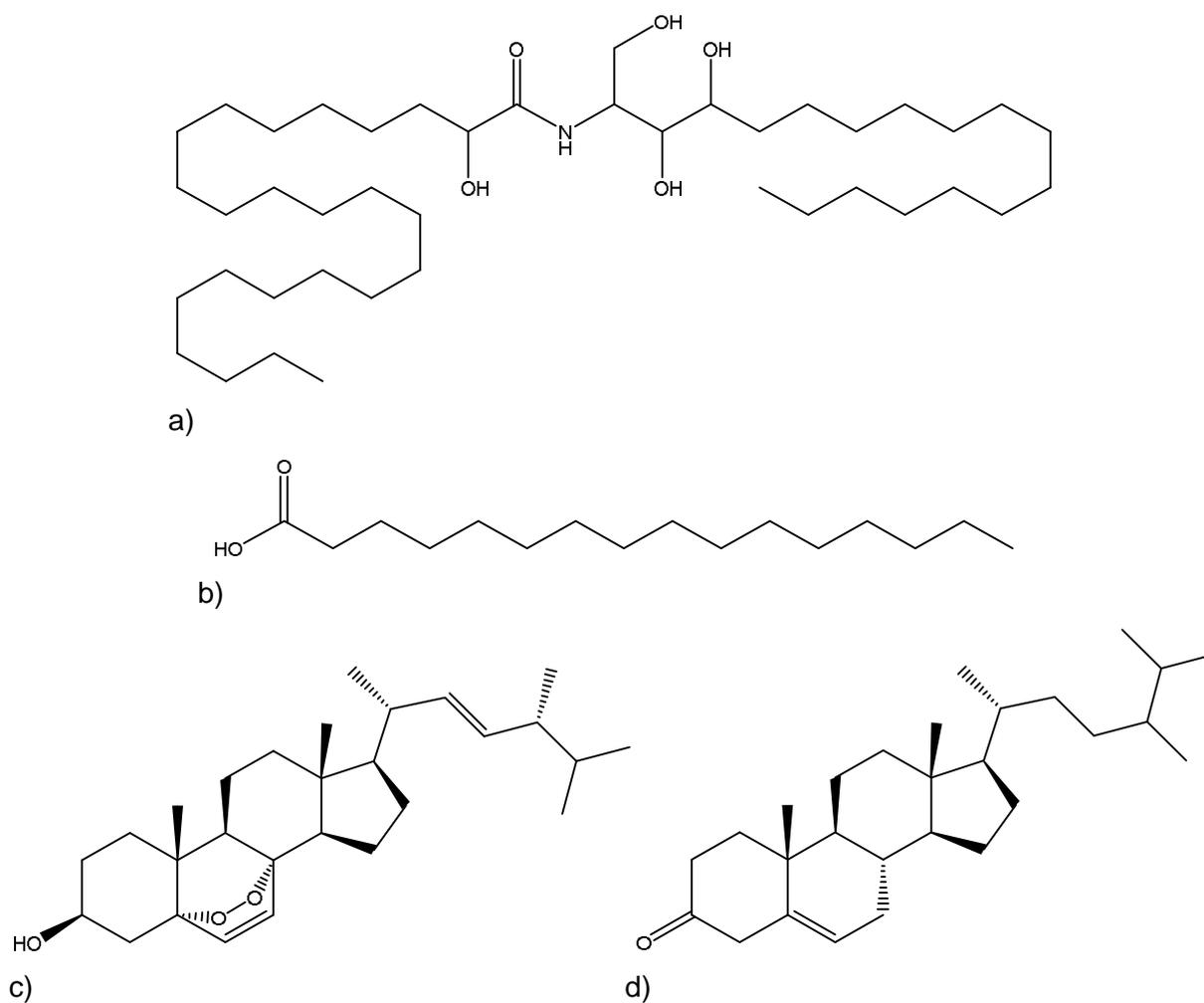


Abbildung 4.4.16.: Weitere isolierte Verbindungen aus *Daldinia*-Stamm SG1: a) *N*-2-Hydroxylignoceroylphytosphingosin, b) Hexadecansäure (Palmitinsäure), c) Ergosterolperoxid, d) 5-Campestenon (eigene Darstellung).

4.4.4. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm SG1 und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von *Daldinia*-Arten

In mykochemischen Untersuchungen des zur Gattung *Daldinia* klassifizierten Endophytenstammes SG1 konnten neun Verbindungen gewonnen und strukturell charakterisiert werden. Unter diesen befanden sich mit (+)-Orthosporin (SG1-202), 1,8-Dimethoxynaphthalen (SG1-203), Hept-6-en-2,4,5-triol (SG1-212a) und Daldiniapyron (SG1-219) Moleküle, welche zuvor bereits aus *Daldinia*-Arten isoliert wurden. Letztere beiden wurden bisher exklusiv für *Daldinia*-Pilze beschrieben und scheinen spezifisch für die Gattung *Daldinia* oder speziell für bestimmte *Daldinia*-Kladen (z.B. *D. concentrica*, *D. eschscholtzii*) zu sein. Die Isolierung dieser Metaboliten unterlegte die Klassifizierung des Stammes SG1 als *Daldinia*-Art. Andere chemotaxonomische Marker (Stadler *et al.* 2007, Stadler *et al.* 2014), wie Daldinone, Concentricole und Binaphthalenole (z.B. Daldinon A (Abbildung 4.4.17a.), Concentricol A (Abbildung 4.4.17b.), 1,1'-Binaphthalene-4,4'-5,5'-tetrol (Abbildung 4.4.17c.)) bzw. bereits häufiger isolierte Metaboliten (z.B. Cytochalasine, Daldinale) wurden nicht isoliert. Komplexere Polyketide mit ungewöhnlichem Grundgerüst, wie sie beispielsweise von Barnes *et al.* (2014) und Zhang *et al.* (2016b) mit Daldionin (Abbildung 4.4.17e.) bzw. (+)-Selesconol (Abbildung 4.4.17d) aus *Daldinia eschscholtzii* isoliert worden sind, konnten ebenfalls nicht identifiziert werden. Diese Literaturbeispiele von Verbindungen zeigen jedoch deutlich, dass Biosynthesepotenzial der Gattung *Daldinia*. Weitere neue und bioaktive Moleküle aus *Daldinia*-Arten werden regelmäßig publiziert (z.B. Daldinon E (Du *et al.* 2014), Childinin A-G (Zhao *et al.* 2017a), Daldinan B und C, Daldinolid A und B, Daldiquinon A (Kamauchi *et al.* 2018)). Auch wenn aus Stamm SG1 keine neuen Verbindungen isoliert und charakterisiert wurden, könnten in Zukunft noch interessante Verbindungen mit vielversprechenden Bioaktivitäten aus endophytischen *Daldinia* sp. zu erwarten sein. Nachweise für als neu berichtete Moleküle aus *Daldinia*-Endophyten sind beispielweise mit Barnes *et al.* (2014) und Hu *et al.* (2019) gegeben.

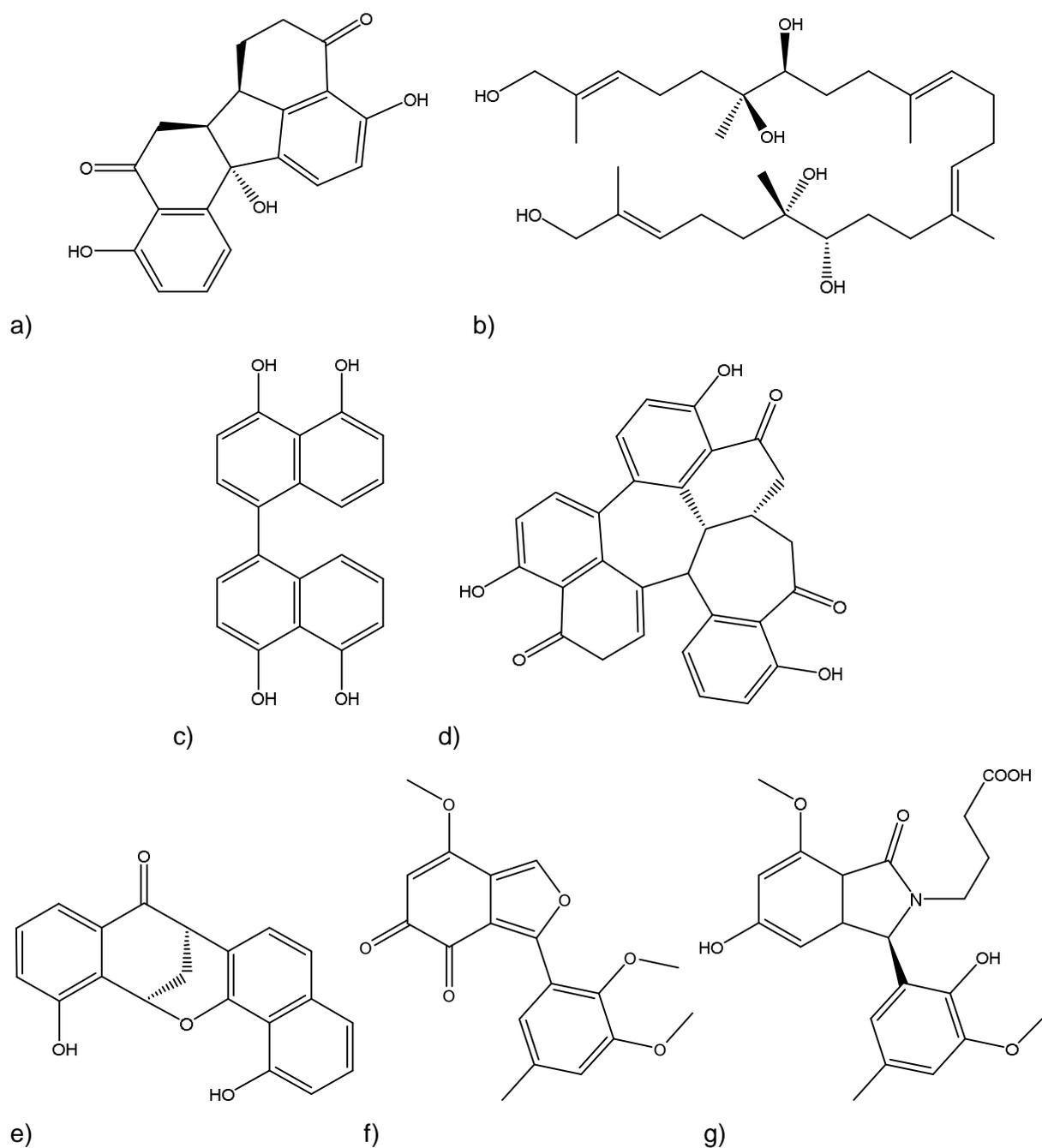


Abbildung 4.4.17.: Bekannte chemotaxonomische Marker für *Daldinia*-Arten: a) Daldinon A, b) Concentricol A, c) 1,1'-Binaphthalene-4,4'-5,5'-tetrrol und in der Literatur neu isolierte Metaboliten, d) (+)-Selesconol, e) Daldionin, f) Childinin B, g) Daldinan C (eigene Darstellung).

4.5. Stamm SG8c (cf. *Tremateia* sp.)



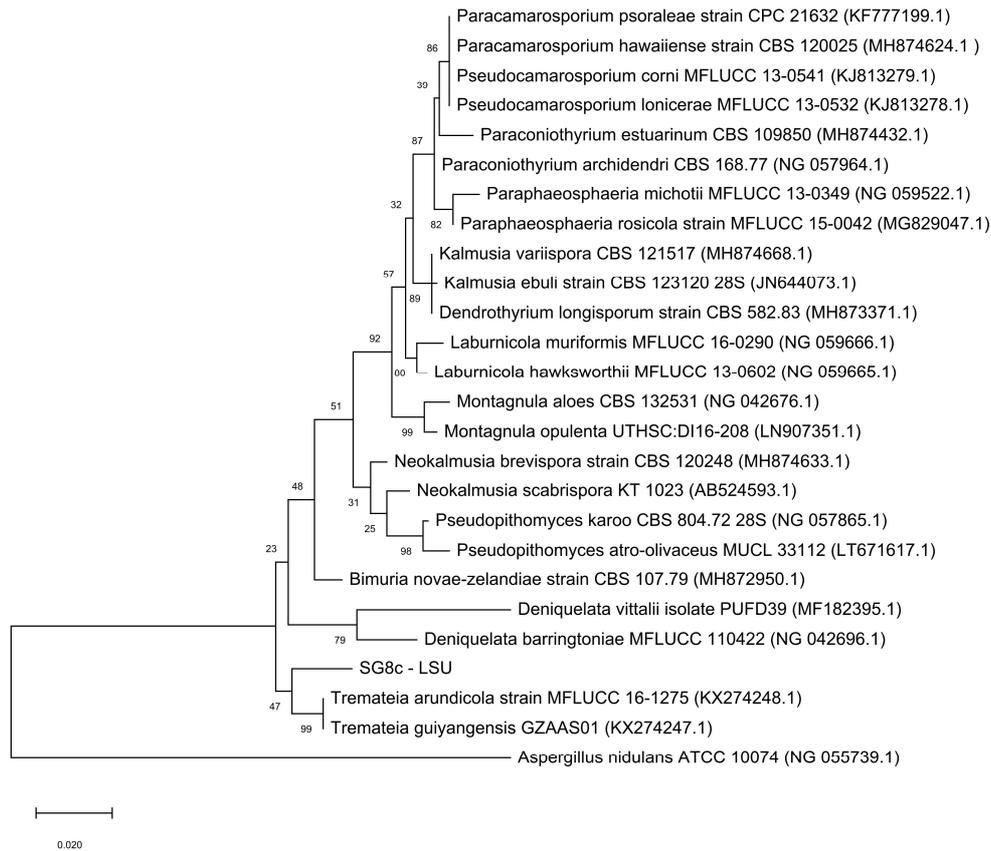
Abbildung 4.5.1.: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm SG8c: Wirtspflanze (*Carpobrotus* sp., oben links), Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (oben rechts), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (unten links), Rohextrakt mit Essigsäureethylester (unten rechts) (eigene Darstellung).

4.5.1. Stamm Identifizierung und Auswahl

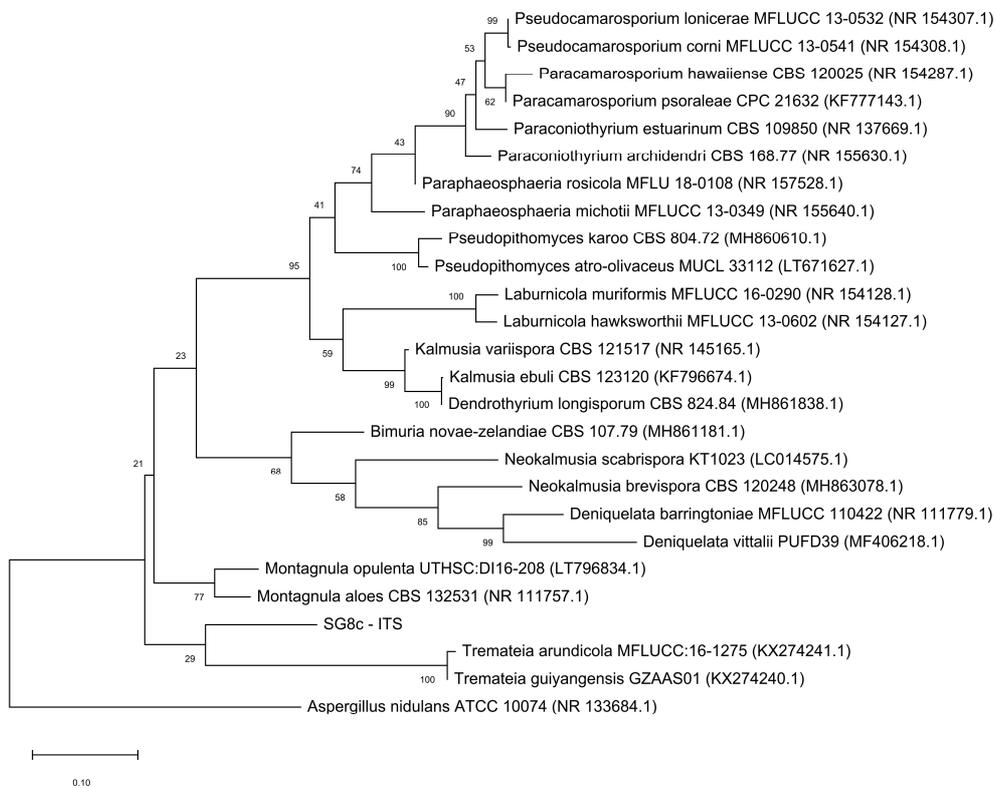
Der Abgleich der aus genomischer DNA amplifizierten ITS-Sequenz (Zugangsnummer NCBI: LR585034) via BLAST innerhalb von Nukleotidsequenzdatenbanken (Entrez) ergab eine sehr gute Übereinstimmung (99%) mit einer Referenzsequenz (Zugangsnummer NCBI: AM922221.1). Der zur Referenz gehörige Stamm wurde als Endophyt von einem Küstengras (*Elymus farctus*) in Spanien isoliert, der allerdings leider nicht eingehender als Schlauchpilz (Ascomycota) bzw. Coelomycet (fungi imperfecti) klassifiziert wurde (Sánchez Márquez *et al.* 2008). Weitere Treffer mit deutlich schlechterer Sequenzabdeckung (~ 89-93%) zeigten Vertreter aus der Ordnung Pleosporales speziell aus der Familie Didymosphaeriaceae (Syn. Montagnulaceae). Der Wert der Übereinstimmung bei der ITS-Region ist deutlich niedriger als die generell angesetzte Schwelle von > 97% oder > 95% Sequenzübereinstimmung bzw. <3% oder <5% Sequenzdivergenz (Arnold & Lutzoni 2008, Raja *et al.* 2017) und erlaubt daher keine Zuordnung auf Artniveau. Für die Absicherung und Einstufung in intermediären taxonomischen Stufen (Familie, Gattung) ist die nrLSU-Region (28S-Region) als zweiter Barcodemarker etabliert (Raja *et al.* (2017), vgl. Kapitel 2.2.6.).

Die Familienzugehörigkeit der angezeigten Referenzstämme nach dem Abgleich der LSU-Sequenzidentität über den BLAST-Algorithmus in Nukleotid-Datenbanken mit bis zu 98% unterstreicht zudem die Zugehörigkeit zur Familie der Didymosphaeriaceae. Phylogenetische Analysen anhand ITS- und LSU-Sequenzen mit Vertretern der Didymosphaeriaceae-Familie aus aktueller Literatur (Ariyawansa *et al.* 2015, Tanaka *et al.* 2015, Tennakoon *et al.* 2016) ergaben ebenfalls eine Clusterung innerhalb dieser Familie. Genauere Betrachtung der phylogenetischen Analyse der LSU- (Abbildung 4.5.2a.) und der ITS-Sequenzen (Abbildung 4.5.2b.) ergibt eine Gruppierung zusammen mit *Tremateia*-Arten. Bei dem untersuchten Stamm könnte es sich demnach um eine bisher nicht beschriebene Art aus der Gattung *Tremateia* handeln. Da allerdings keine morphologischen Untersuchungen des Stammes SG8c vorgenommen wurden und die im phylogenetischen Baum angezeigte evolutionäre Distanz im Vergleich zu anderen Spezies derselben Gattung dennoch relativ hoch ist, bleibt dieses Ergebnis spekulativ. Die Etablierung als Schwester-Taxon zur Gattung *Tremateia* ist aber wahrscheinlich.

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.5. Stamm SG8c (cf. *Tremateia* sp.) -



a)



b)

Abbildung 4.5.2.: Maximum-Likelihood-Baum mit: a) LSU- und b) ITS-Sequenz des Stammes SG8c und Vergleichsreferenzen aus Didymosphaeriaceae Familie mit 1000 Bootstrap Replikationen (eigene Darstellung).

Der Stamm wurde aufgrund der breiten und potenten antibakteriellen Aktivität (Tabelle 4.5.1.) und der geringen Übereinstimmung zu bekannten Referenzorganismen für die mykochemische Untersuchung ausgewählt. Zudem waren nach einer Literaturrecherche keine Naturstoffstudien von *Tremateia*-Arten gefunden worden. Demnach wurde die Möglichkeit zu Isolierung neuer und bioaktiver Verbindungen als hoch eingeschätzt.

Tabelle 4.5.1.: Ergebnis der SG8c-Rohextrakte im Agardiffusionstest.

Sample Name	c [mg/ml]	V [μ l]	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. agarici</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. warneri</i>
			\varnothing [mm]				
Gentamycin (pos. control)	0.5	25	15	25	20	24	18.5
SG8c (EtOAc Rohextrakt)	40	25	7	15	18	30	14
Gentamicin (positiv Kontrolle)	0.5	25	15	20	15	21	20
SG8c-E1 scale up (EtOAc Rohextrakt)	20	25	8	13	14	18	10
SG8c-E2 scale up (MeOH Rohextrakt)	20	25	-	-	-	-	-

4.5.2. Extraktbearbeitung

Das Methanolrohextrakt wurde nach anfänglichem Trennversuch mittels RP-HPLC wegen mangelhafter Trennbarkeit der enthaltenen Komponenten und deutlich geringerer antibakterieller Aktivität nicht weiterbearbeitet (Abbildung 4.5.3.). Als initiale Trennung wurde das mit Essigsäureethylester extrahierte und getrocknete Rohextrakt ($m = 21.3$ g) einer Gradientensäulenchromatographie (Säule: $m_{\text{Kieselgel}} = 450$ g, $\varnothing = 5$ cm, $h = 43$ cm) beginnend mit Petroleumäther (SG8c-E1-1) und PE/DCM-Mischungen (SG8c-E1-2 bis SG8c-E1-9) über DCM/MeOH-Mischungen (SG8c-E1-10 bis SG8c-E1-20) und abschließendem Spülen mit Methanol ($> 20\%$, SG8c-E1-S1 bis SG8c-E1-S2) und MeOH/H₂O/AcOH (75/20/5, % v/v/v, SG8c-E1-S3) unterworfen. Die Bearbeitung der Fraktionen wurde anhand der biologischen Aktivität ("bioguided fractionation") und der Trennbarkeit vorgenommen. Der Hauptmetabolit Auranticin A (SG8c-102, 899 mg), konnte aufgrund seiner Abundanz und schlechten Löslichkeit ohne weitere chromatographische Trennverfahren durch Ausfällen und Waschen in DCM und Methanol aus Fraktion 17 (SG8c-E1-17, $m = 1.44$ g) gewonnen werden. Die fettsäurehaltigen unpolaren bis semipolaren Fraktionen (SG8c-E1-8, SG8c-E1-11, SG8c-E1-12) wurden in nachgeschalteter, isokratischer LC mit Essigsäure als Laufmittelzusatz und anschließender Reinigung mittels SEC mit Sephadex LH-20 in Methanol bearbeitet. Dies resultierte in der Isolierung und Charakterisierung von Riparin C (SG8c-126a, $m = 3.54$ mg), einem Chinonderivat (SG8c-146a, $m = 5.85$ mg), Gymnoascolide A (SG8c-148, $m = 99.0$ mg) und einem Depsidonderivat (SG8c-149, $m = 137$ mg). Die stark antibakteriell aktiven Fraktionen (SG8c-E1-14, $m = 5.39$ g, SG8c-E1-15, $m = 771$ mg, SG8c-E1-16, $m = 1.03$ g, SG8c-E1-17A, $m = 967$ mg) wurden mittels präparativer RP-HPLC (Standardmethode 2) weiter getrennt, was die Gewinnung von weiteren Depsidonderivaten (SG8c-106, $m = 36.1$ mg), Piloboluson C, (SG8c-107, $m = 94.0$ mg), Auranticin B (SG8c-108, $m = 361$ mg), (SG8c-110, $m = 208$ mg)), sowie von Vanilinsäure (SG8c-119, $m = 4.39$ mg), 1-Monodecanoylglycerol (SG8c-136, $m = 5.72$ mg), Linolsäure (SG8c-139, $m = 66.8$ mg), einem Gliovictinderivat (SG8c-140, $m = 2.19$ mg) und (-)-Gliovictin (SG8c-141, $m = 7.33$ mg) ergab.

Weitere Moleküle - ein Depsidderivat (SG8c-105b, $m = 215$ mg), ein Pyranocoumarinderivat (SG8c-114, $m = 3.64$ mg), ein Depsidonderivat, (SG8c-122, $m = 2.33$ mg), p-Hydroxyzimtsäure (SG8c-130, $m = 5.49$ mg), ein weiteres Depsidonderivat (SG8c-132, $m = 28.6$ mg), ein Pyronderivat (SG8c-13, $m = 2.33$ mg) und ein Benzopyranderivat (SG8c-143, $m = 39.1$ mg) lieferte die SEC über Sephadex LH-20 mit Methanol als Laufmittel. Für die Trennung des Depsidonderivats (SG8c-128, $m = 1.44$ mg) und *E*-Ferulärsäure (SG8c-131, $m = 3.54$ mg) war ein zusätzlicher chromatographischer Trennschritt nötig. Von Fraktion 14 (SG8c-E1-14, $m = 5.39$ g) wurde nicht das komplette Ausgangsmaterial getrennt, sodass etwa die fünffache-Menge der Verbindungen aus dieser Fraktion isolierbar gewesen wäre.

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.5. Stamm SG8c (cf. Tremateia sp.) -

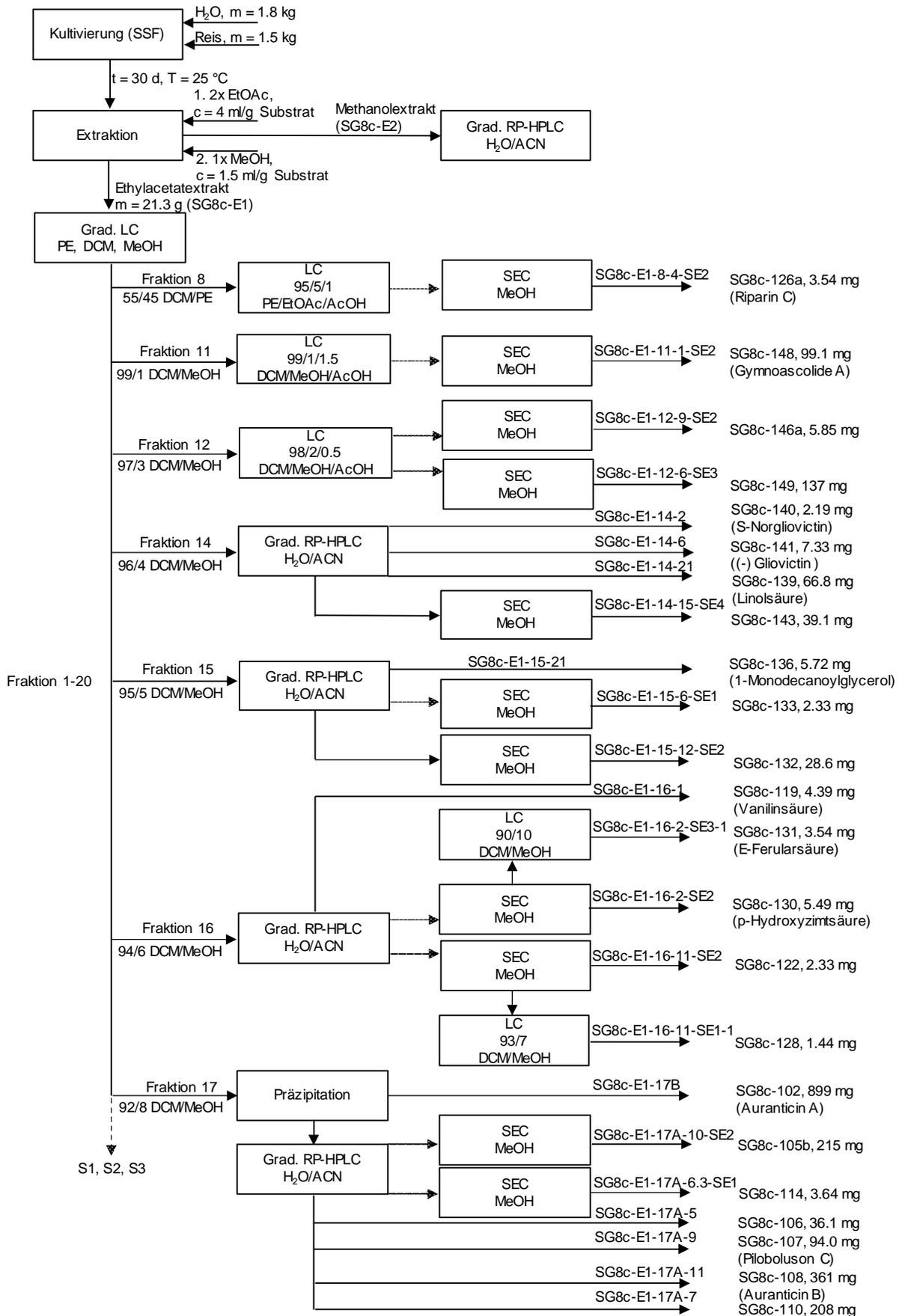


Abbildung 4.5.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm SG8c (eigene Darstellung).

4.5.3. Isolierte Depsidon- und Depsidverbindungen

4.5.3.1. Auranticin A (SG8c-102)

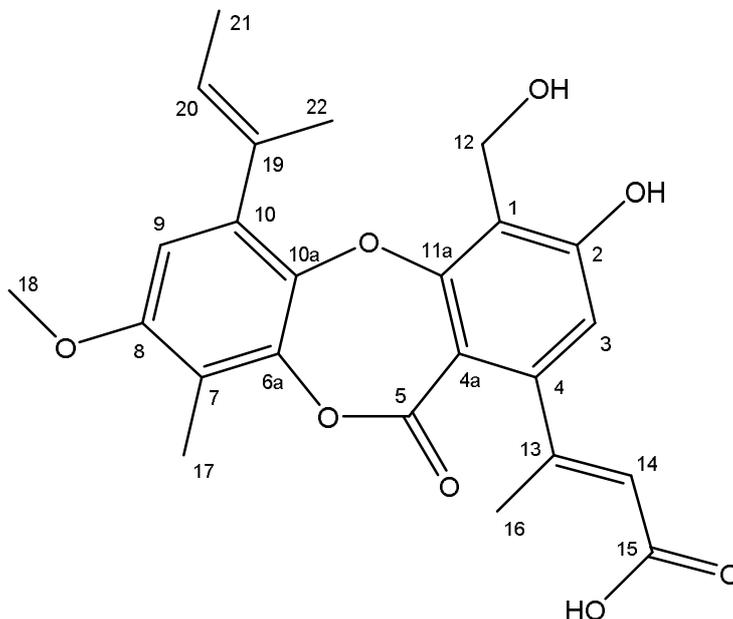


Abbildung 4.5.4.: Struktur von Verbindung SG8c-102 (eigene Darstellung).

Das Molekül SG8c-102 (Abbildung 4.5.4.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 900$ mg) aus Fraktion 17 ($m =$, SG8c-E1-17) durch Ausfällen gewonnen. Das Präzipitat wurde aufgrund seiner schlechten Löslichkeit mehrfach in DCM und Methanol gewaschen und ohne weitere Aufreinigung NMR-spektroskopisch und massenspektrometrisch vermessen. Aus LC-MS Untersuchungen bei positiver Ionisierung ($m/z = 458.1879$, $[M+NH_4]^+$; $m/z = 441.1616$, $[M+H]^+$; $m/z = 423.1508$, $[M-H_2O+H]^+$) und bei negativer Ionisierung ($m/z = 439.1374$, $[M-H]^-$) konnte die Summenformel ($C_{24}H_{24}O_8$) abgeleitet werden. Das 1H -NMR Spektrum zeigte vier Methyl- (δH [ppm] = 2.26 (d, $J = 1.2$ Hz, 3H, H-16), 2.10 (s, 3H, H-17), 2.04 (s breit, 3H, H-22), 1.79 (dd, $J = 6.8, 0.9$ Hz, 3H, H-21)); eine Methoxygruppe (δH [ppm] = 3.78 (s, 3H, H-18)) und jeweils zwei Protonen im aromatischen (δH [ppm] = 6.63 (s, 1H, H-3), 6.57 (s, 1H, H-9)) bzw. olefinischen Bereich (δH [ppm] = 5.60 (m, 1H, H-14), 5.56 (qd, $J = 6.8, 1.3$ Hz, 1H, H-20). Des Weiteren ist eine Methylengruppe (δH [ppm] = 4.57 (s, 2H, H-12), die aufgrund der beobachteten Tieffeldverschiebung an Sauerstoffgebunden war, sowie eine breites, stark entschirmtes Signal bei $\delta H = 12.29$ ppm (H-15), welches einer Carboxylgruppe zuzuordnen war, zu beobachten. Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte insgesamt 24 Signale, darunter 14 quaternäre, sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome. Die COSY- und HMBC-Signale des olefinischen Protons an H-20 zu zwei Methylgruppen (δC [ppm] = 13.9 (C-21), 17.7 (C-22)) zeigten das Vorhandensein einer Butenylgruppe (1-Methyl-prop-1-enyl). Das aromatische Proton an $\delta C = 107.7$ ppm (C-9) zeigte HMBC-Korrelation zu den Kohlenstoffen dieser Butenylgruppe, weshalb es der Position in *ortho*-Stellung zugeordnet worden ist. Die Hochfeldverschiebung am Kohlenstoff des aromatischen Protons im Vergleich zur Verschiebung im

Benzol wies zudem auf Sauerstoffsubstitution in *ortho*- bzw. *para*-Stellung hin. Die übereinstimmenden HMBC-Signale der Methoxygruppe (δC [ppm] = 56.0 (C-18)) an C-8 (δC = 154.2 ppm), der Methylgruppe (δC [ppm] = 8.9 (C-17)) an C-7 (δC = 116.3 ppm) und des aromatischen Protons an C-9 lieferte die Substruktur in Abbildung 4.5.5a..

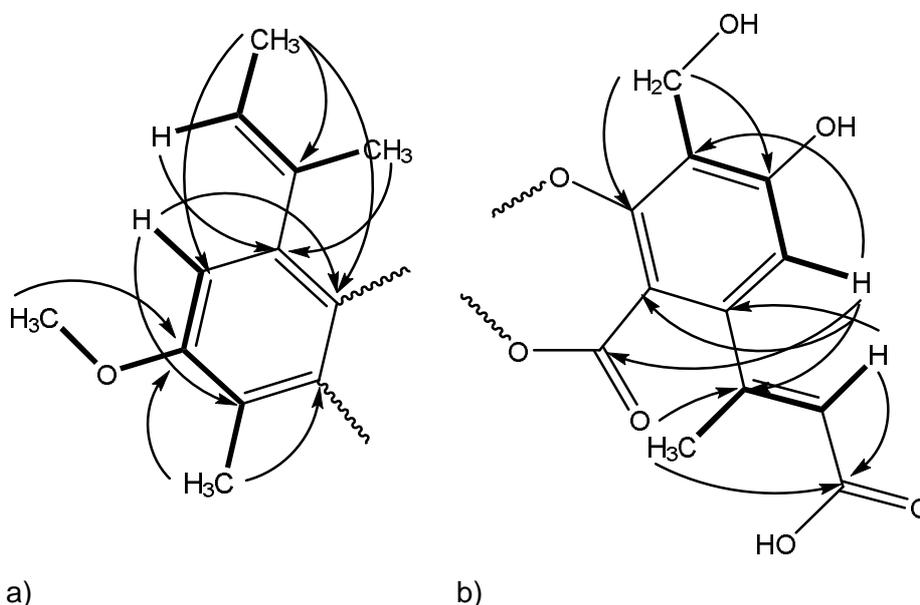


Abbildung 4.5.5.: COSY (---) und HMBC (—) Korrelation für die beiden etablierten Untereinheiten a) und b) (eigene Darstellung).

Die COSY-, HMQC- und HMBC-Resonanzen der verbliebenen Signale lieferten eine weitere Untereinheit (Abbildung 4.5.5b.), vergleichbar mit der bereits erläuterten (Abbildung 4.5.5a.). Im Unterschied zeigte sich allerdings eine Hydroxymethyleinheit (δC [ppm] = 52.1 (C-12)) an C-1 statt einer Methylgruppe und eine Hydroxylierung statt einer Methoxylierung an C-2 (δC = 160.8 ppm). Zudem wies die Butenylgruppe dieser Untereinheit, bestätigt durch HMBC-Korrelationen des olefinischen Protons an C-14 (δC = 119.5) und der Methylgruppe (δC [ppm] = 20.0 (C-16)), eine Carboxylfunktion (δC [ppm] = 166.8 (C-15)) statt einer Methylgruppe auf. Aufgrund der Tieffeldverschiebung wurde das bereits durch das ¹H-NMR vermutete Säureproton dieser Gruppe zugeordnet. Weiterhin auffällig war eine ⁴J-Kopplung des aromatischen Protons an C-3 (δC = 112.8 ppm) zum Kohlenstoff bei δC = 163.0 ppm (C-5). Diese chemische Verschiebung und die Kombination der HMBC-Signale deutete auf eine Esterfunktion hin. In Analogie zur anderen Untereinheit wurden die Positionen der Substitutionen am aromatischen Ring durch übereinstimmende COSY- und HMBC-Korrelationen benachbarter Substituenten bestimmt (Abbildung 4.5.5b.).

Die Kombination der Untereinheiten anhand der Elementarzusammensetzung ergab das komplette Molekül mit der Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.5.6.). Die Verbindung konnte als das literaturbekannte Auranticin A identifiziert werden.

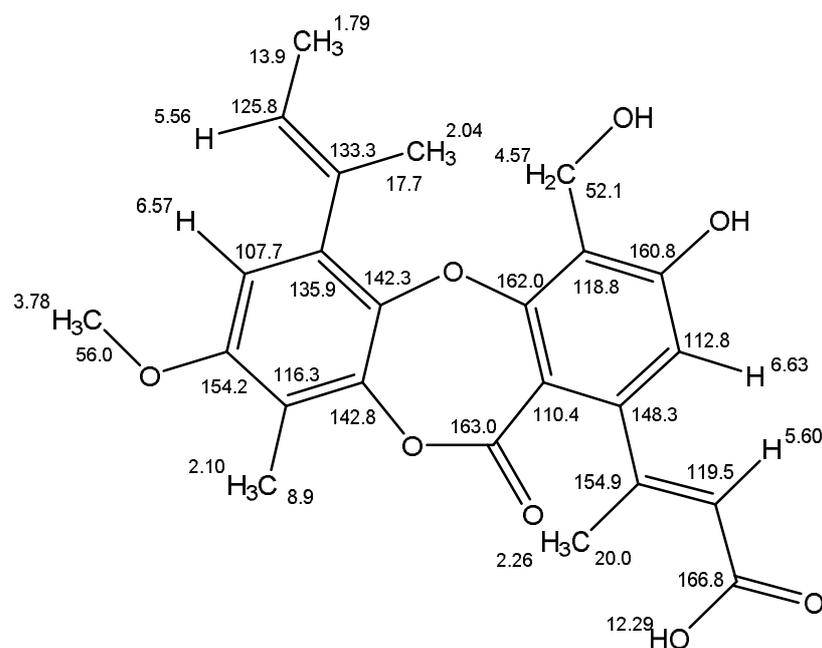


Abbildung 4.5.6.: Zuordnung der chemischen Verschiebung der ^1H - und ^{13}C -Signale von SG8c-102 in DMSO-D_6 (eigene Darstellung).

Die spektroskopischen Daten sind dabei in Übereinstimmung mit der Primärpublikation von Poch & Gloer (1991).

Die Position der Substrukturen zueinander und die Stereochemie an der Doppelbindung wurde durch NOESY-Korrelationen zwischen der Hydroxymethyleinheit an C-12 und der Methyleinheit an C-22 einerseits und zwischen den beiden Methylgruppen an C-21 bzw. C-22 andererseits, wie in Abbildung 4.5.7. dargestellt, bestätigt.

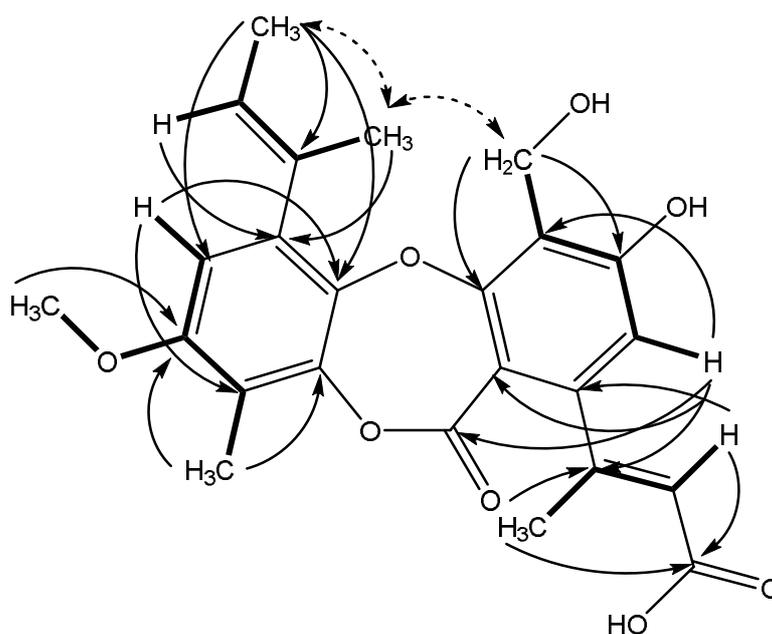


Abbildung 4.5.7.: COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von Auranti-cin A (SG8c-102) in DMSO-D_6 (eigene Darstellung).

Die Konfiguration der beiden Doppelbindungen wurde, wie in der Originalpublikation, jeweils als *E*-konfiguriert angenommen. Die Strukturidentität dieser Annahme wurde allerdings erst kürzlich durch eine Kristallstruktur bewiesen (Maschke *et al.* 2019a, Abbildung 4.5.8.).

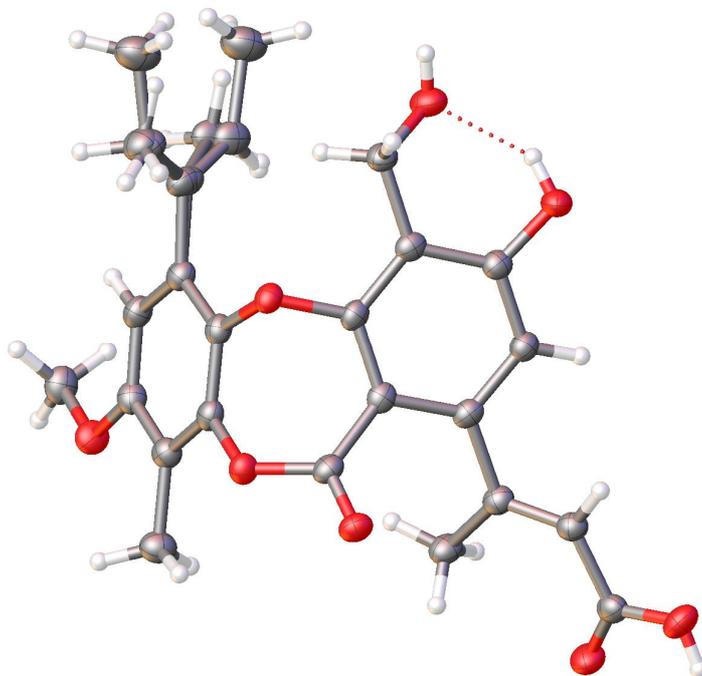


Abbildung 4.5.8.: Kristallstruktur von Auranticin A (C - grau, H - weiß, O - rot) (eigene Darstellung.).

Von Auranticin A war mit $m = 899$ mg die größte Menge, mit deutlichem Abstand zu allen anderen gewonnenen Metaboliten, isoliert worden und kann damit als Hauptmetabolit angesehen werden. Der relativ hohe Anteil am Gesamtextrakt scheint zudem die Relevanz dieses Depsidon-Metaboliten für den Organismus zu unterstreichen. Die Diskussion der biologischen Aktivität sowie der Produktionsorganismen erfolgt zusammen mit den anderen Depsidonen in Kapitel 4.5.4..

4.5.3.2. Tremateiasidon A (SG8c-106)

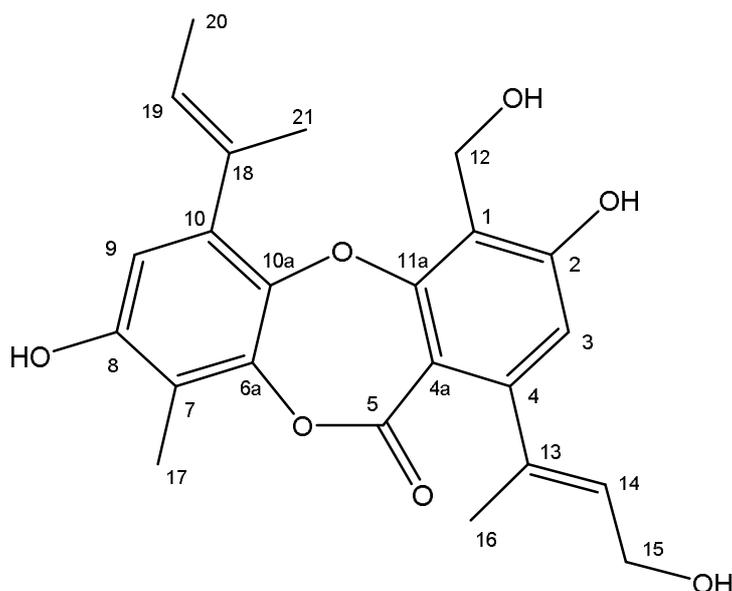


Abbildung 4.5.9.: Struktur von Verbindung SG8c-106 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-106 (Abbildung 4.5.9.) wurde als gelblich-weißer Feststoff ($m = 36.1\text{ mg}$) aus der antibakteriell aktiven Fraktion 17 (SG8c-E1-17, $m = 1.44\text{ g}$) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 32.0\text{ min}$, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8\text{ ml/min}$) isoliert. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte das Vorhandensein von vier aromatischen bzw. olefinischen Methylgruppen ($\delta_{\text{H}} [\text{ppm}] = 2.07\text{ (s, 3H, H-17)}$, $1.99\text{ (s, 3H, H-21)}$, $1.79\text{ (s, 3H, H-16)}$, $1.76\text{ (d, } J = 6.7\text{ Hz, 3H, H-20)}$), zwei olefinische Protonen ($\delta_{\text{H}} [\text{ppm}] = 5.48\text{ (q, } J = 6.7\text{ Hz, 1H, H-19)}$, $5.38\text{ (t, } J = 5.8\text{ Hz, 1H, H-14)}$), sowie zwei Protonen im aromatischen Bereich ($\delta_{\text{H}} [\text{ppm}] = 6.60\text{ (s, 1H, H-3)}$, 6.41 (s, 1H, H-9)) und zwei oxygenierte Methylenheiten ($\delta_{\text{H}} [\text{ppm}] = 4.53\text{ (s, 2H, H-12)}$, $4.04\text{ (t, } J = 4.9\text{ Hz, 2H, H-15)}$) (Tabelle 4.5.2.).

Weitere $^1\text{H-NMR}$ Signale ($\delta_{\text{H}} [\text{ppm}] = \delta_{\text{H}} = 10.57\text{ (s, 1H, 2-OH)}$, $9.67\text{ (s, 1H, 8-OH)}$, $4.73\text{ (s, 1H, 15-OH)}$, $4.66\text{ (s breit, 1H, 12-OH)}$) in Kombination mit fehlender Korrelation im HMQC-Spektrum wiesen auf vier Protonen hin, die an Heteroatome gebunden waren. Das $^{13}\text{C-NMR}$ verfügt insgesamt über 23 Signale. Anhand der chemischen Verschiebung bestätigte sich die zuvor durch das $^1\text{H-NMR}$ implizierten vier Methyl- und zwei oxofunktionalisierten Methylengruppen. Darüber hinaus war die Existenz von 15 quaternären Kohlenstoffen im $^{13}\text{C-NMR}$ ersichtlich. Eine der Methylgruppen (H-20) zeigte eine Kopplung ($^3J = 6.7\text{ Hz}$) mit einem der olefinischen Protonen (H-19), welche wiederum COSY- und HMBC-Signale zu einer weiteren Methylgruppe ($\delta_{\text{C}} [\text{ppm}] = 17.7\text{ (C-21)}$) aufwies. Dadurch ließ sich eine Butenylgruppe (1-Methylpropyl-1-en) als Strukturelement zuordnen. Die Abwesenheit eines COSY-Kreuzsignals und gemeinsamer Korrelationen der zwei aromatischen Protonen führte zur Etablierung von zwei getrennten, vollständig substituierten Phenylringen. Die HMBC-Signale des aromatischen Protons an C-9 ($\delta_{\text{H}} = 6.41\text{ ppm}$, $\delta_{\text{C}} = 111.0\text{ ppm}$), der Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} [\text{ppm}] = 2.07\text{ (H-17)}$) an C-7 ($\delta_{\text{C}} = 114.6\text{ ppm}$) und des Hydroxylprotons

($\delta\text{H} = 9.67$ ppm) an C-8 zu den quaternären Kohlenstoffen des Rings und der Butenylgruppe führten zur Formulierung einer Unterstruktur (Abbildung 4.5.10a.).

Tabelle 4.5.2.: Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Signale von SG8c-106 in DMSO- D_6 und MeOH- D_4 .

Position	SG8c-106a (DMSO- D_6)			SG8c-106 (MeOH- D_4)			
	$\delta\ ^1\text{H}$ (m, J [Hz])	$\delta\ ^{13}\text{C}$	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	$\delta\ ^1\text{H}$ (m, J [Hz])	$\delta\ ^{13}\text{C}$	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	
1	-	117.6	qC (Ar)	-	117.9	-	
2	-	160.1	qC-OH (Ar)	-	162.2	-	
3	6.60 (s)	112.6	CH (Ar)	1, 2, 4a, 5, 12, 13	6.60 (s)	114.0	1, 2, 4a, 5, 11a, 12, 13, 14
4	-	149.1	qC (Ar)	-	-	151.8	-
4a	-	111.1	qC (Ar)	-	-	112.8	-
5	-	163.5	O=C-O-	-	-	166.4	-
6	-	-	-O-	-	-	-	-
6a	-	143.2	qC-O- (Ar)	-	-	144.8	-
7	-	114.6	qC (Ar)	-	-	116.5	-
8	-	152.6	qC-OH (Ar)	-	-	154.1	-
9	6.41 (s)	111.0	CH (Ar)	7, 8, 10a, 17, 18	6.40 (s)	112.6	6a, 8, 7, 10, 10a, 18, 19
10	-	135.7	qC (Ar)	-	-	137.6	-
10a	-	141.6	qC-O- (Ar)	-	-	143.4	-
11	-	-	-O-	-	-	-	-
11a	-	162.1	qC-O- (Ar)	-	-	163.7	-
12	4.53 (s)	52.2	-CH ₂ -OH	1, 2, 11a	4.80 (s)	55.1	1, 2, 11a
13	-	134.5	qC=	-	-	138.3	-
14	5.38 (t, 5.8)	131.1	=CH	4, 16	5.46 (dt, 6.4, 1.3)	130.5	4, 13, 16
15	4.04 (t, 4.9)	58.1	-CH ₂ -OH	13, 14	4.20 (d, 6.4)	59.8	3, 4, 13, 14
16	1.79 (s)	17.6	-CH ₃ (Ar)	4, 13, 14	1.92 (s)	18.2	3, 4, 13, 14
17	2.07 (s)	9.1	-CH ₃ (Ar)	6a, 7, 8, 10	2.16 (s)	9.3	6a, 7, 8, 9, 10, 10a
18	-	133.4	qC	-	-	135.2	-
19	5.48 (q, 6.7)	125.2	=CH	10, 20, 21	5.55 (qd, 6.7, 1.3)	126.7	10, 20, 21
20	1.76 (d, 6.7)	13.8	-CH ₃	9, 10a, 18, 19	1.83 (dd, 6.7, 0.8)	14.1	9, 10, 10a, 18, 19, 21
21	1.99 (s)	17.7	-CH ₃	10, 18, 19	2.06 (s)	18.1	10, 18, 19
2-OH	10.57 (s)	-	-	1,2,3	-	-	-
8-OH	9.67 (s)	-	-	6a, 7, 8, 9	-	-	-
12-OH	4.66 (s, breit)	-	-	-	-	-	-
15-OH	4.73 (s)	-	-	14, 15	-	-	-

Der zweite Ring zeigte ein vergleichbares Substitutionsmuster mit dem Unterschied, dass jeweils eine Hydroxymethyleneinheit (δC [ppm] = 52.2 (C-12), 58.1 (C-15)) statt einer Methylgruppe vorhanden war. Des Weiteren war für das aromatische Proton an C-3 ($\delta\text{H} = 6.60$ ppm) im HBMC-Spektrum ein weiteres Signal (4J -Kopplung) zu einem quaternären Kohlenstoff bei $\delta\text{C} = 163.5$ ppm (C-5) sichtbar (Abbildung 4.5.10b). Dadurch ließ sich ein Ester bzw. Lacton als funktionelle Gruppe an C-5 formulieren. Den anderen beiden tieffeldverschobenen Kohlenstoffen (δC [ppm] = 160.1 (C-2), 162.1 (C-11a)) ließen sich ebenfalls Sauerstofffunktionalisierungen zuordnen.

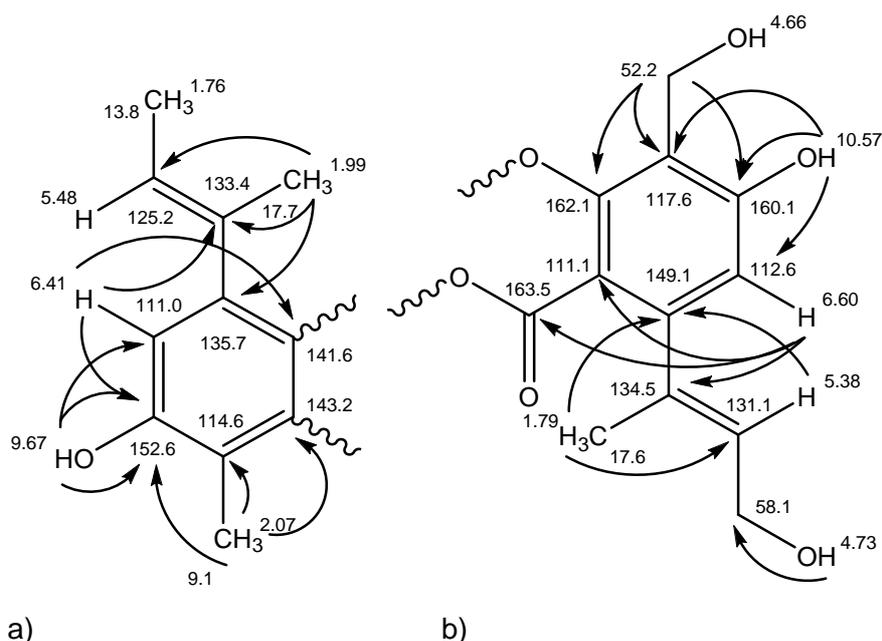


Abbildung 4.5.10.: HMBC (→) Korrelationen der etablierten Substrukturen a) und b) für Verbindung SG8c-106 mit Zuordnung der chemischen Verschiebung für ^1H - und ^{13}C -Kerne in DMSO-D_6 (eigene Darstellung).

In hochauflösenden massenspektrometrischen Untersuchungen konnte das Pseudomolekularion ($m/z = 411.1417$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$, berechnet 411.1443) im Negativmodus und Fragmentionen im Positivmodus ($m/z = 395.1560$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$, berechnet 395.1494), welches zur korrespondierenden Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_7$) führte, gefunden werden. Demnach konnten die beiden bereits etablierten Unterstrukturen zu einem Depsidon verknüpft werden. Eine der zwei möglichen Orientierungen der beiden Ringe zueinander konnte durch ein NOESY-Signal zwischen den Protonen der hydroxylierten Methyleneinheit an C-12 zu den Protonen der Methylgruppe an C-21 bestätigt werden (Abbildung 4.5.11.). Demnach waren die beiden raumfordernden Butenylgruppen, 1-Methylprop-1-enyl an C-10 bzw. 3-Hydroxy-1-Methylprop-1-enyl an C-4, an entgegengesetzten Seiten des Depsidongerüsts gelegen (Abbildung 4.5.11.). Die Konfiguration an den beiden Doppelbindungen (C-13, C-14 und C-18, C-19) wurde durch die NOESY-Protonenkreuzsignale zwischen den Methylgruppen (H-20, H-21) und zwischen Methylen (H-15) und Methylgruppe (H-16) jeweils als *E*-konfiguriert bestimmt. Die Konfiguration an den Doppelbindungen und die Positionierung der beiden Substrukturen zueinander wurde auch durch die Kristallstruktur des ebenfalls isolierten, strukturell-verwandten Derivats Auranticin A zusätzlich bekräftigt (siehe Abbildung 4.5.8.).

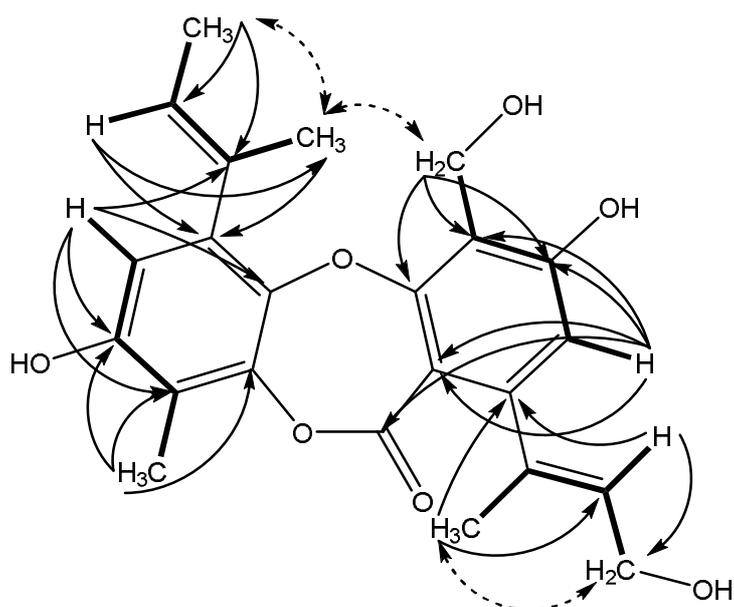


Abbildung 4.5.11.: COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-106 in DMSO-D₆ (eigene Darstellung).

Die vorgestellte Verbindung zeigte strukturelle Ähnlichkeit (Methoxy an C-8, Carbonsäure an C-15) zu dem bereits beschriebenen Depsidon Auranticin A (Poch & Gloer 1991). Dennoch stellte das Molekül ein in der Literatur bisher nicht beschriebenes Depsidonderivat dar (Maschke *et al.* 2019a). Als Trivialname der Verbindung wurde Tremateiasidon A vorgeschlagen.

4.5.3.3. Piloboluson C (SG8c-107)

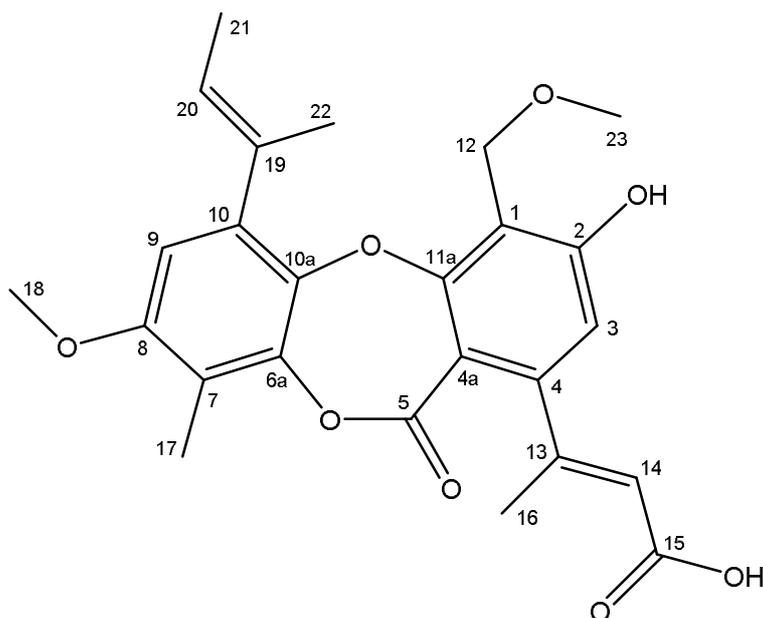
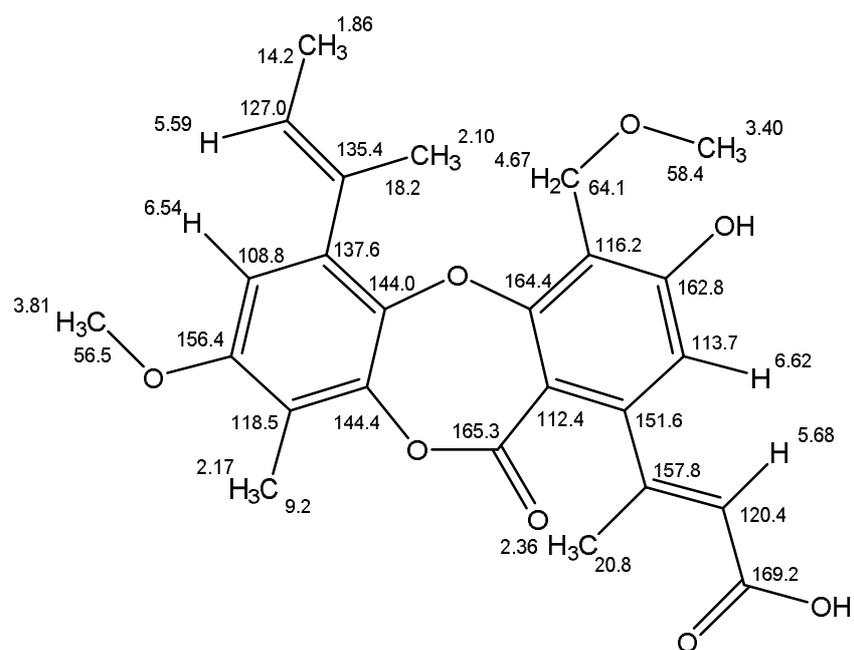


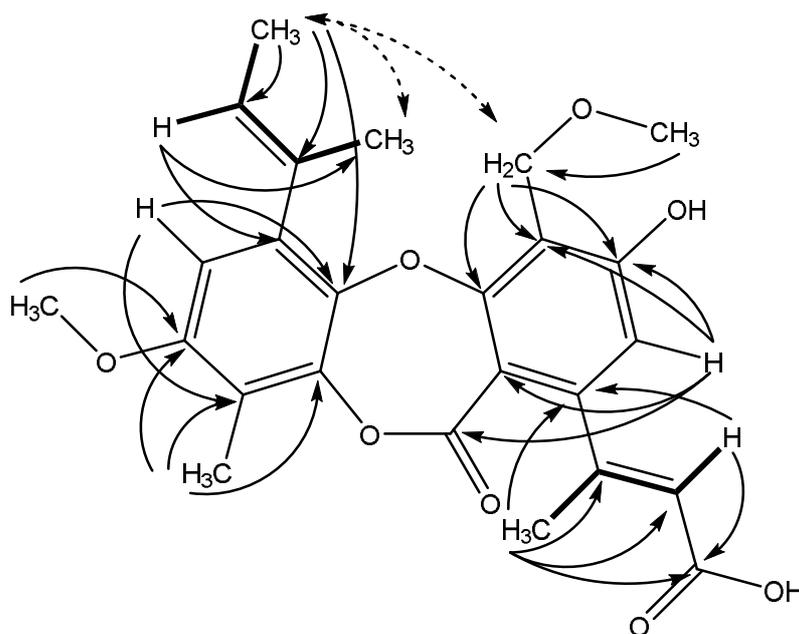
Abbildung 4.5.12.: Struktur von Verbindung SG8c-107 (eigene Darstellung).

Verbindung SG8c-107 (Abbildung 4.5.12.) wurde als weißer Feststoff ($m = 94.0$ mg) ebenfalls aus der antibakteriell aktivsten Hauptfraktion (SG8c-E1-17, $m = 1.44$ g) nach RP-HPLC ($t_R = 45.0$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) isoliert. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte ein sehr ähnliches Signalmuster zu Auranticin A (SG8c-102) verfügte aber über ein zusätzliches Signal (δ_{H} [ppm] = 3.40 (s, 3H, H-23)), welches eine weitere Methoxygruppe anzeigte. Das $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigte diese zusätzliche Methoxyfunktion (δ_{C} [ppm] = 58.4 (C-23)). Zusammen mit den massenspektrometrischen Untersuchungen bei positiver Ionisierung ($m/z = 455.1836$, $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z = 472.2112$, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$; $m/z = 437.1722$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) und negativer Ionisierung ($m/z = 453.1567$, $[\text{M}-\text{H}]^-$) ergab sich die elementare Zusammensetzung der Verbindung ($\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{O}_8$). Die Position der zusätzlichen Methyl- bzw. Methoxygruppe ließ sich durch deren HMBC-Korrelation zu C-12 ($\delta_{\text{C}} = 64.1$ ppm) eindeutig bestimmen. Die Doppelbindungsgeometrie und Position der Substrukturen erfolgte in Analogie zu Verbindung SG8c-102 (Auranticin A). Die Zuordnung aller Verschiebungen zum Molekül (Abbildung 4.5.13a.) und deren Schlüsselkorrelation (Abbildung 4.5.13b.) sind in den nachfolgenden mit Abbildungen gegeben.

Die anhand der spektroskopischen Daten erstellte Struktur war bereits in der Literatur bekannt und wurde kürzlich von Rajachan *et al.* (2014) unter dem Namen Piloboluson C von dem koprophilen Pilz *Pilobolus heterosporus* isoliert und charakterisiert.



a)



b)

Abbildung 4.5.13.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- - -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-107 in MeOH- D_4 (eigene Darstellung).

4.5.3.4. Auranticin B (SG8c-108)

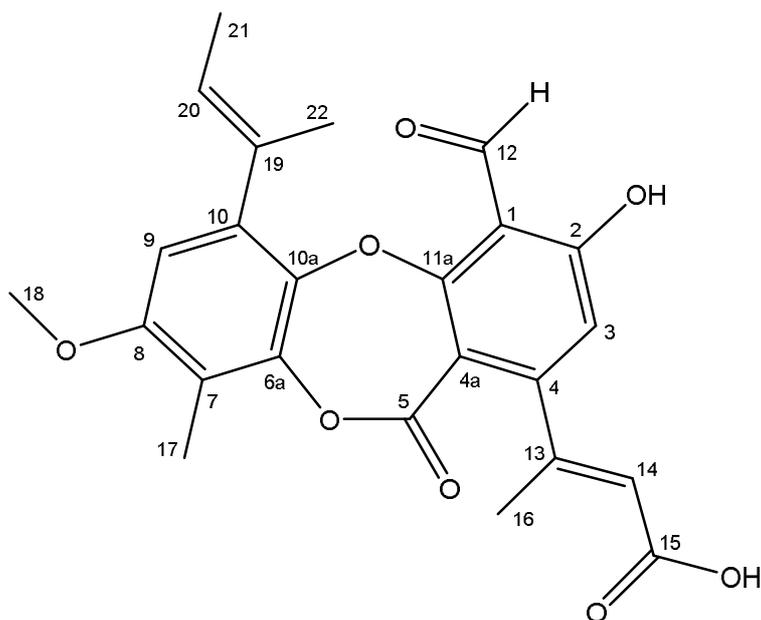


Abbildung 4.5.14.: Struktur von Verbindung SG8c-108 (eigene Darstellung).

Eine weitere Komponente aus Fraktion 17 (SG8c-E1-17, $m = 1.44$ g) wurde mit Verbindung SG8c-108 (Abbildung 4.5.14.) als gelb-oranger Feststoff ($m = 361$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 50.0$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) isoliert. Die HR-LC-MS Untersuchungen lieferten unterschiedliche Addukt- und Fragmentationen im positiven ($m/z = 439.1444$ ($[M+H]^+$), $m/z = 456.1710$ ($[M+NH_4]^+$) und $m/z = 421.1336$ ($[M-H_2O+H]^+$) und im negativen Modus ($m/z = 437.1115$ ($[M-H]^-$)) mit der korrespondierenden Summenformel ($C_{24}H_{22}O_8$). Das 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum zeigte, wie auch bei den zuvor vorgestellten Verbindungen (siehe Kapitel 4.5.3.1.-4.5.3.3.), ein ähnliches Signalmuster, was wiederum auf strukturelle Ähnlichkeit schließen lässt. Im Gegensatz zu den NMR-Daten der Verbindung Auranticin A (Kapitel 4.5.3.1.) war das Vorhandensein eines tieffeldverschobenen Protons (δ_H [ppm] = 10.29 (H-12)) mit der für eine Aldehydfunktion charakteristische Carbonylkohlenstoffverschiebung (ca. 190-200 ppm) von $\delta_C = 194.4$ ppm (C-12) offensichtlich. Obwohl die direkte Zuordnung dieses Protons zum Carbonylkohlenstoff durch eine fehlende Korrelation im HMQC-Spektrum nicht möglich war, zeigte sich im HMBC-Spektrum ein geteilter Signalsatz mit einer Kopplungskonstante von etwa $J = 100$ Hz. Diese ließ sich einer $^1J_{C,H}$ -Kopplung zuordnen. Weiterhin, im Vergleich zu den bereits diskutierten spektroskopischen Daten von Auranticin A, war die Abwesenheit der CH_2 -Einheit auffällig, womit sich vermuten ließ, dass sich die besagte Aldehydfunktion an der Stelle der vormaligen Hydroxymethyleinheit befand. Ein weiteres Indiz für diese Einschätzung war in dem stark tieffeldverschobenen Hydroxylproton (δ_H [ppm] = 12.24 (s, 1H, 2-OH)) an C-2, welches durch die räumliche Nähe zum Carbonylsauerstoff chelatisiert wird bzw. Wasserstoffbrücken ausbildet (Bildung eines sechsgliedrigen Ringes). Letztendlich ließ sich die Position der Aldehydfunktion an

C-1 durch die HMBC-Korrelationen des Aldehydprotons unter anderem zu den Kohlenstoffen C-1 ($\delta\text{C} = 111.5$ ppm), C-2 ($\delta\text{C} = 165.8$ ppm) und C-11a ($\delta\text{C} = 166.0$ ppm) bestätigen. Die vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.5.15a.) wurde durch sorgfältige Überprüfung der Signale aus 2d-NMR-Experimenten vorgenommen (Abbildung 4.5.15b.). Eine Verbindung mit dieser Struktur konnte dem bereits literaturbekannten Auranticin B (Poch & Gloer 1991), isoliert aus dem Pilz *Preussia aurantiaca*, zugeordnet werden.

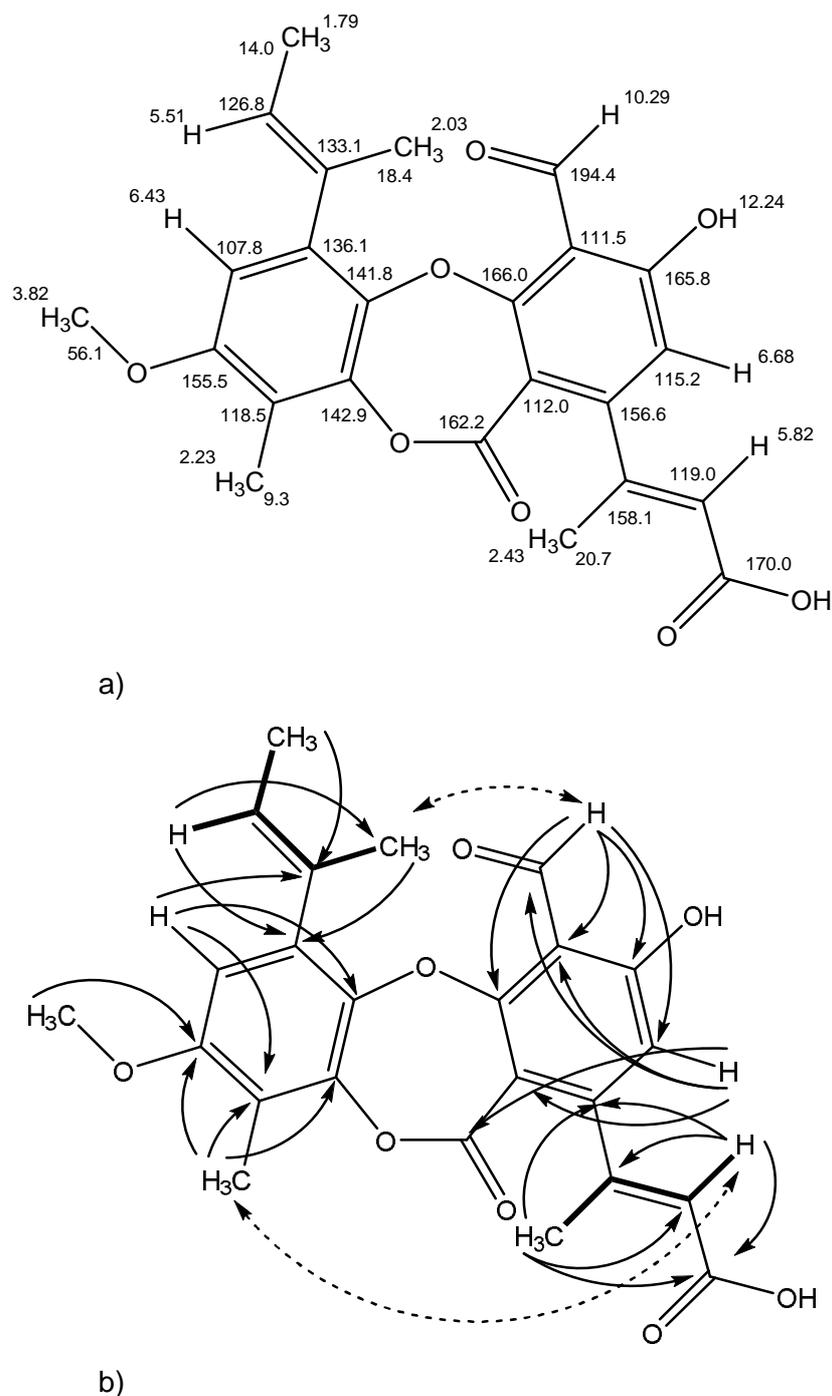


Abbildung 4.5.15.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-108 (Auranticin B) in CDCl_3 (eigene Darstellung).

4.5.3.5. SG8c-110a

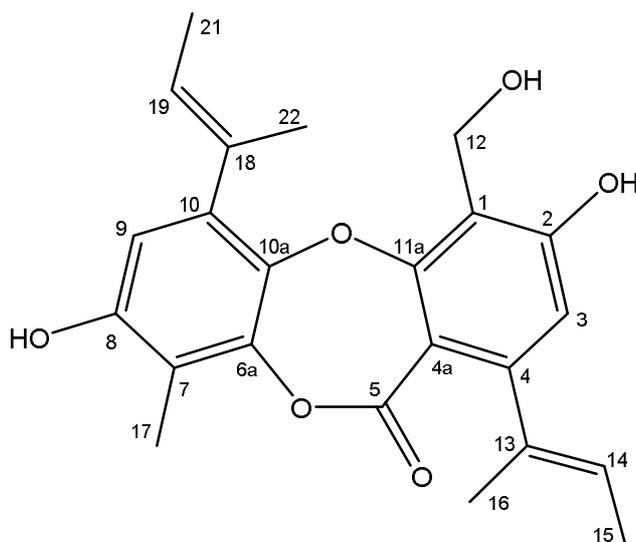
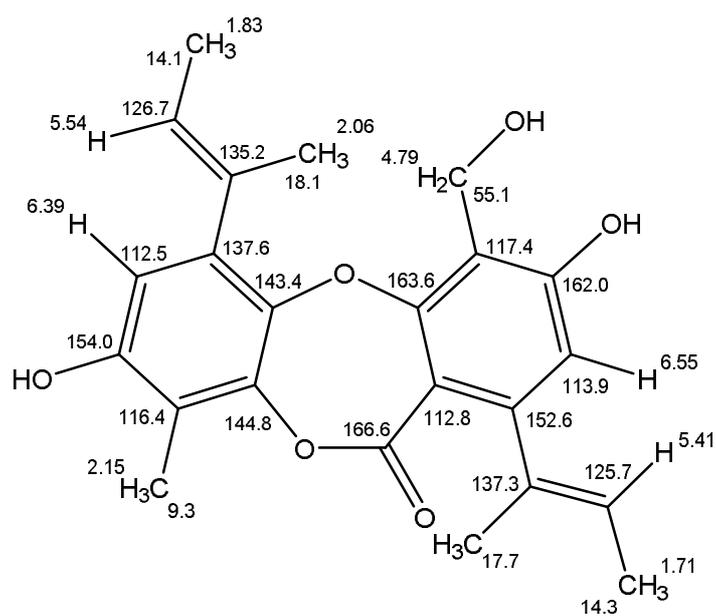
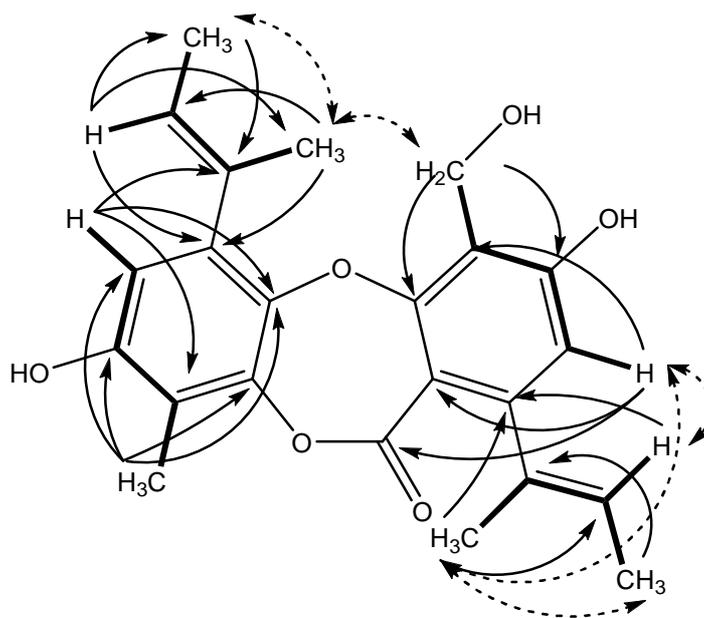


Abbildung 4.5.16.: Struktur von Verbindung SG8c-110a (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-110a (Abbildung 4.5.16.) wurde aus der Hauptfraktion 16 und 17 (SG8c-E1-16, $m = 1.03$ g, SG8c-E1-17, $m = 1.44$ g) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 39.6$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) als farbloser Feststoff ($m = 208$ mg) isoliert. Spektroskopische Daten zeigten hier, wie bei den anderen vorgestellten Verbindungen, ebenfalls ein Depsidon-Grundgerüst. Im $^1\text{H-NMR}$ war als Auffälligkeit, im Unterschied zu den vorher beschriebenen Depsidonen, allerdings eine weitere Methylgruppe vorhanden (δ_{H} [ppm] = 1.71 (dd, $J = 6.8, 0.8$ Hz, 3H, H-15)), deren Signal als Doppeldublett aufgespalten war. Dies ließ vermuten, dass das Strukturelement der Butenylgruppe (1-Methyl-prop-enyl) zweimal vorhanden war. Zusätzlich war das Fehlen von Singulettsignalen mit einem Integral von drei Protonen im Bereich der chemischen Verschiebung von $\delta_{\text{C}} = 3.4$ ppm bis $\delta_{\text{C}} = 3.9$ ppm beobachtbar. Dies schloss das Vorhandensein von Methoxygruppen aus und führte zu der Erkenntnis, dass diese funktionellen Gruppen stattdessen als Hydroxyleinheiten vorlagen. Die Anzahl der C-Atome im $^{13}\text{C-NMR}$ und die LC-MS Untersuchungen ($m/z = 397.1718$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) und $m/z = 395.1475$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$)) lieferten Hinweise zur Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_6$). Die Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.5.17a.) und die Positionsanordnung der funktionellen Gruppen wurden wiederum durch intensiven Abgleich der C,H-Korrelationen im HMBC-Spektrum vorgenommen (Abbildung 4.5.17b.). Das strukturell bestimmte Molekül ist literaturbekannt, verfügt aber über keinen Trivialnamen (1,6-di((*E*)-But-2-en-2-yl)-3,8-dihydroxy-4-(hydroxymethyl)-9-methyl-11*H*-dibenzo[b,e]-1,4-dioxepin-11-on) und wurde zuvor bereits von Pittayakhajonwut *et al.* (2006) aus einem nicht näher bestimmten Pilz aus der Ordnung Pleosporales isoliert.



a)



b)

Abbildung 4.5.17.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- - -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-110a in MeOH-D_4 (eigene Darstellung).

4.5.3.6. Tremateiasidon B (SG8c-122)

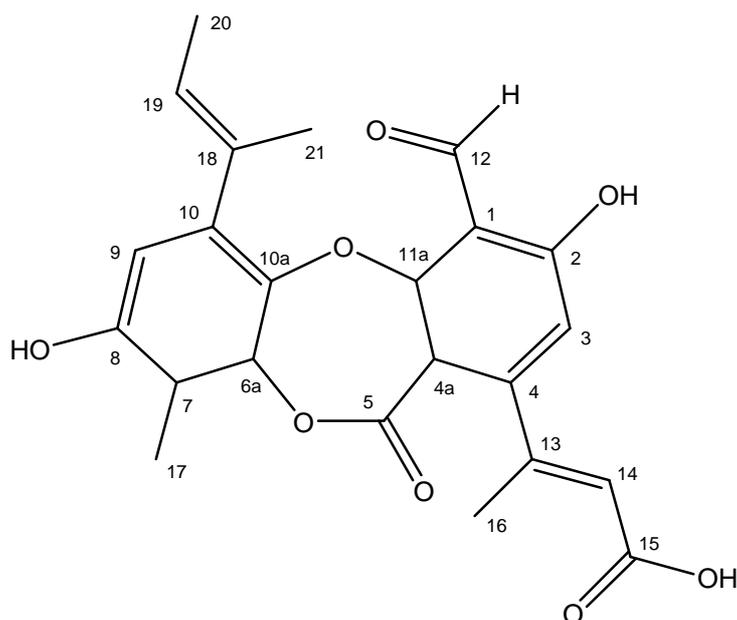


Abbildung 4.5.18.: Struktur von Verbindung SG8c-122 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-122 (Abbildung 4.5.18.) konnte aus der Hauptfraktion 16 (SG8c-E1-16, $m = 1.03$ g) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 43.3$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) und Größenausschlusschromatographie (100, % v, MeOH) als farbloser Feststoff ($m = 2.33$ mg) gewonnen werden. Durch Massenspektrometrie wurden Pseudomolekular-, Addukt- und Fragmentionenmassen bei positiver Ionisierung ($m/z = 432.1223$ $[M+H]^+$, berechnet 425.1230; $m/z = 442.1486$ $[M+NH_4]^+$, und $m/z = 407.1116$ $[M-H_2O+H]^+$) und bei negativer Ionisierung ($m/z = 423.1180$, $[M-H]$) gefunden. Diese konnte einer Elementarzusammensetzung ($C_{23}H_{20}O_8$) zugeordnet werden. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Daten zeigten vergleichbare Signalmuster zu anderen Depsidon-Verbindungen (Tabelle 4.5.3.).

Unterschiede zeigten sich im Vergleich zu beispielsweise Verbindung SG8c-106 (Tremateiasidon A) in der Abwesenheit von zwei Hydroxymethylengruppen und dem Vorhandensein einer Aldehyd- (δH [ppm] = 10.17 (H-12), δC [ppm] = 191.5 (C-12)) und einer Carbonsäurefunktion (δH [ppm] = 12.37 (H-15), δC [ppm] = 166.6 (C-15)). Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.5.19a.) und deren Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.5.19b.) wurden grafisch aufbereitet in den nachfolgenden Abbildungen angegeben. Die Doppelbindungsgeometrie und die Positionen der Substrukturen zueinander wurden wieder in Anlehnung an die anderen Depsidonderivate, ebenfalls impliziert durch die Kristallstruktur von Auranticin A (SG8c-102), festgelegt (Abbildung 4.5.8.).

Tabelle 4.5.3.: Zuordnung der ¹H-, ¹³C- und HMBC-Signale von SG8c-122 in DMSO-D₆ und MeOH-D₄. ¹Signalzuordnung uneindeutig

Position	SG8c-122a DMSO-D ₆			SG8c-122 MeOH-D ₄			
	$\delta^1\text{H}$ (m, J [Hz])	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	$\delta^1\text{H}$ (m, J [Hz])	$\delta^{13}\text{C}$	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	
1	-	112.1	qC (Ar)	-	112.5	-	
2	-	164.3	qC-OH (Ar)	-	167.1	-	
3	6.78 (s)	115.2	CH (Ar)	1, 2, 4a, 5, 13	6.75 (s)	116.0	1, 2, 4a, 13
4	-	154.4	qC (Ar)	-	157.8	-	
4a	-	111.4	qC (Ar)	-	112.7	-	
5	-	162.3	O=C-O-	-	163.9	-	
6	-	-	-O-	-	-	-	
6a	-	142.7	qC-O- (Ar)	-	144.3	-	
7	-	115.3	qC (Ar)	-	117.3	-	
8	-	153.3	qC-OH (Ar)	-	155.0	-	
9	6.43 (s)	110.5	CH (Ar)	6a, 7, 8, 10a, 17, 18	6.41 (s)	112.8	6a, 7, 8, 10a, 18
10	-	135.8	qC (Ar)	-	137.6	-	
10a	-	140.5	qC-O- (Ar)	-	142.5	-	
11	-	-	-O-	-	-	-	
11a	-	165.6	qC-O (Ar)	-	167.1 ¹	-	
12	10.17 (s)	191.5	CHO	1, 2, 3	10.32 (s)	195.2	1, 2, 3, 11a
13	-	153.7	qC=	-	155.8	-	
14	5.65 (d, 1.2)	120.3	=CH	4, 15, 16	5.72 (s)	121.6	4, 16
15	-	166.6	COOH	-	167.0 ¹	-	
16	2.28 (d, 1.2)	19.5	-CH ₃ (Ar)	4, 13, 14, 15,	2.37 (s)	20.3	4, 13, 14, 15
17	2.10 (s)	9.0	-CH ₃ (Ar)	6a, 7, 8, 10, 10a	2.18 (s)	9.3	6a, 7, 8, 9, 10
18	-	132.3	qC=	-	134.2	-	
19	5.40 (dq, 6.7, 1.4)	125.8	=CH	10, 20, 21	5.45 (q, 6.7)	127.4	10, 20, 21
20	1.70 (s, 6.7)	13.6	-CH ₃	9, 10, 18, 19	1.77 (d, 6.7)	13.9	18, 19
21	1.92 (s)	18.0	-CH ₃	18, 19, 10	2.01 (s)	18.5	10, 18, 19
2-OH	9.89 (s, breit)	-	-	-	-	-	-
8-OH	-	-	-	-	-	-	-
COOH	12.37 (s breit)	-	-	-	-	-	-

Die vorgeschlagene Molekülstruktur ist ähnlich zu dem bereits in der Literatur bekannten Auranticin B (SG8c-108) (Poch & Gloer 1991). Ihr fehlt allerdings die Methoxygruppe an Position (8-OH). Die Verbindung wurde daher als neues Depsidon-Derivat beschrieben (Maschke *et al.* 2019a). Für die Verbindung SG8c-122 wurde der Trivialname Tremateiasidon B vorgeschlagen.

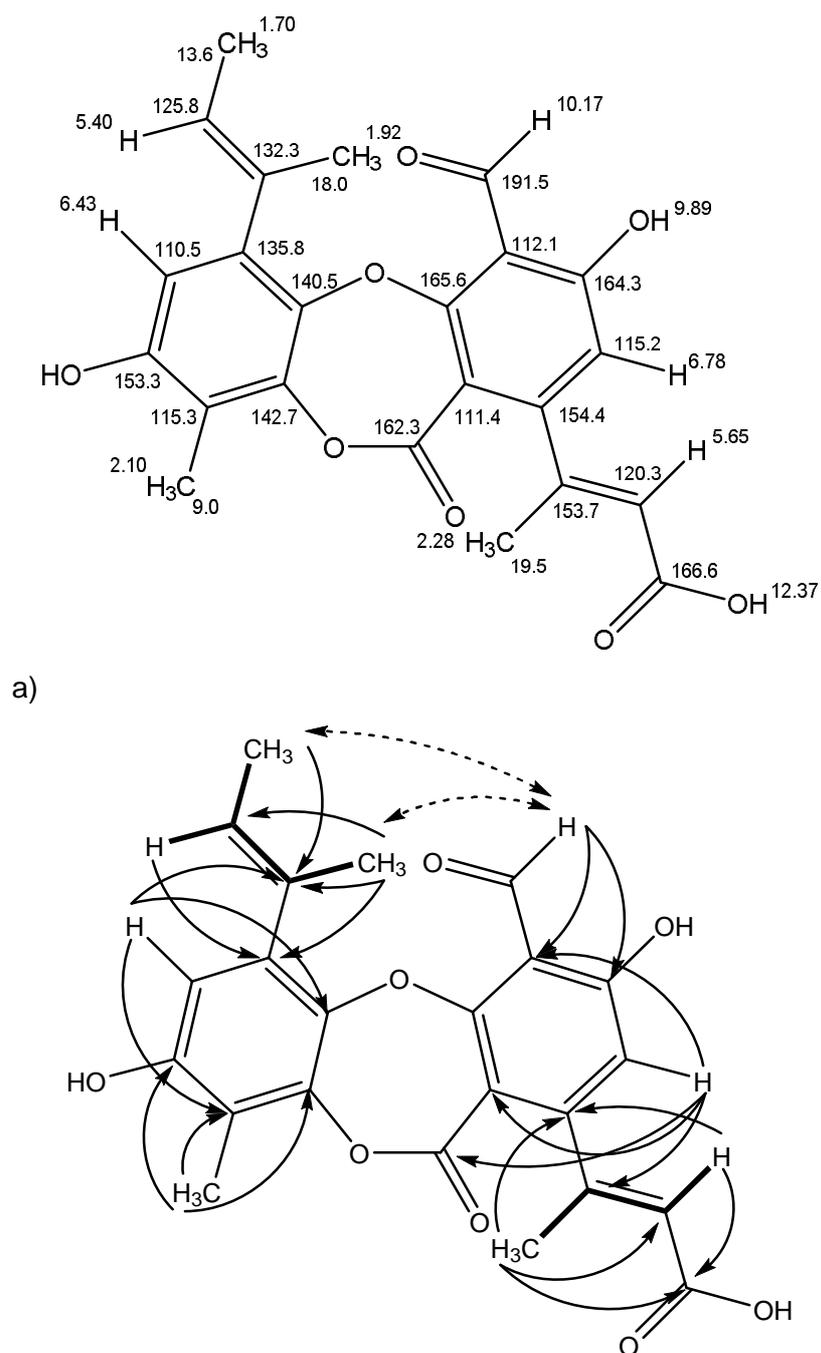


Abbildung 4.5.19.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- - -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-122 in $\text{DMSO-}D_6$ (eigene Darstellung).

4.5.3.7. SG8c-128

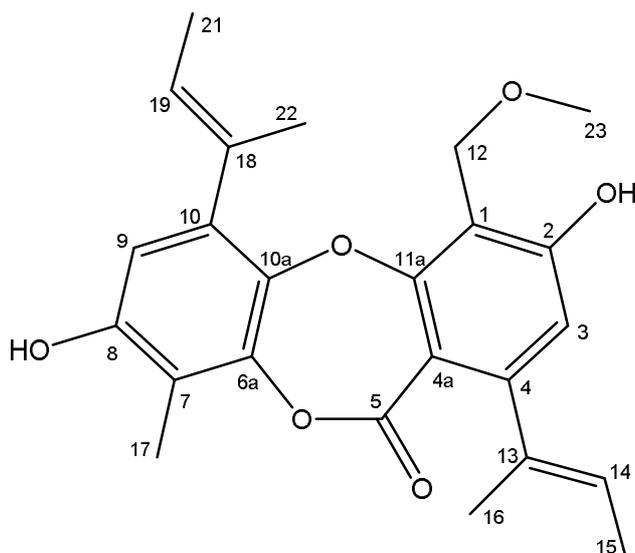


Abbildung 4.5.20.: Struktur von Verbindung SG8c-128 (eigene Darstellung).

Verbindung SG8c-128 (Abbildung 4.5.20.) wurde als weiß-beiger Feststoff ($m = 1.44$ mg) aus Fraktion 16 (SG8c-E1-16, $m = 1.03$ g) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 43.3$ min, Standardmethode 2, $V = 8$ ml/min), SEC (100, % v, MeOH) und abschließender Säulenchromatographie gewonnen (93/7, % v/v, DCM/MeOH).

Das ^1H - und ^{13}C -NMR zeigt ein sehr ähnliches Signalmuster zu Verbindung SG8c-110a. Auffällig gegenüber Verbindung SG8c-110a war allerdings ein zusätzliches Signal (δ_{H} [ppm] = 3.48 (s, 3H, H-23), δ_{C} [ppm] = 58.9 (C-23)), das sich einer Methoxygruppe zuordnen ließ. Deren Zugehörigkeit zum Molekül und die Position innerhalb der Verbindung wurde durch die HMBC-Korrelation zu C-12 ($\delta_{\text{C}} = 69.0$ ppm) bewiesen. Hochauflösende Massenspektrometrie lieferte die Summenformel ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_6$) anhand der Pseudomolekularionen im Positiv- ($m/z = 411.1873$, $[\text{M}+\text{H}]^+$), sowie im Negativ-Modus ($m/z = 409.1827$, $[\text{M}-\text{H}]^-$). Die Identität des Strukturvorschlages wurde zusätzlich unter sorgfältiger Betrachtung der Korrelationen aus den 2d-NMR-Experimenten bestätigt (Abbildung 4.5.21b.). Die Verbindung ohne vergebenen Trivialnamen (1,6-Di((*E*)-But-2-en-2-yl)-3,8-dihydroxy-4-(methoxymethyl)-9-methyl-11*H*-dibenzo[b,e]-1,4-dioxepin-11-on) wurde zuvor bereits in einer Naturstoffuntersuchung aus einem Pilz der Ordnung Pleosporales (Stamm: BCC 8616) isoliert und beschrieben (Pittayakhajonwut *et al.* 2006). Die Literaturwerte sind dabei in sehr guter Übereinstimmung mit den gesammelten spektroskopischen Daten (Abbildung 4.5.21a.). Stereochemische Aspekte sind in Anlehnung an die Kristallstrukturanalyse von Verbindung SG8c-102 (Auranticin A) übernommen worden.

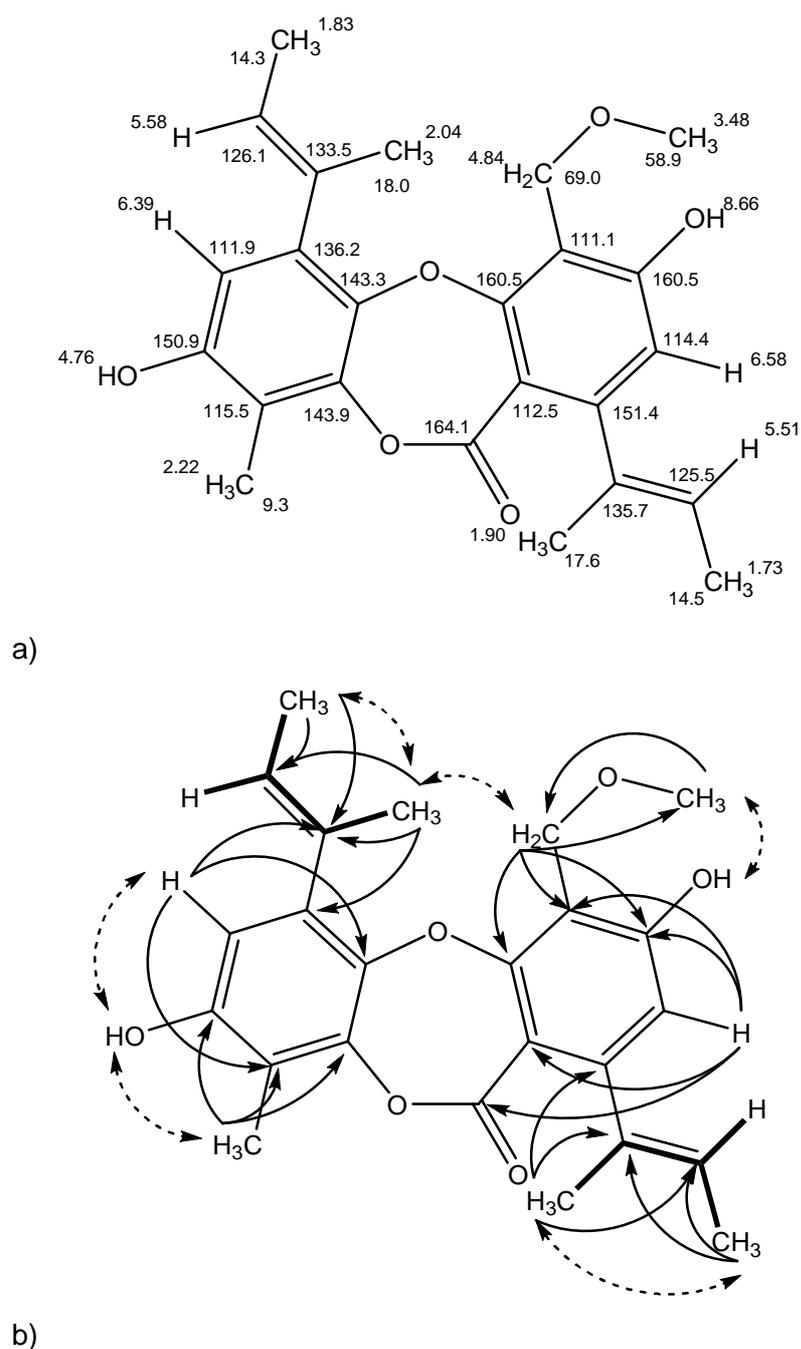


Abbildung 4.5.21.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-128 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

4.5.3.8. Tremateiasidon C (SG8c-132)

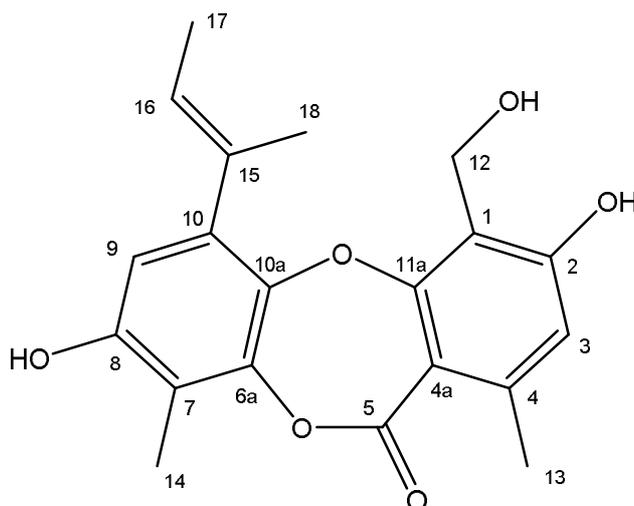


Abbildung 4.5.22.: Struktur von Verbindung SG8c-132 (eigene Darstellung).

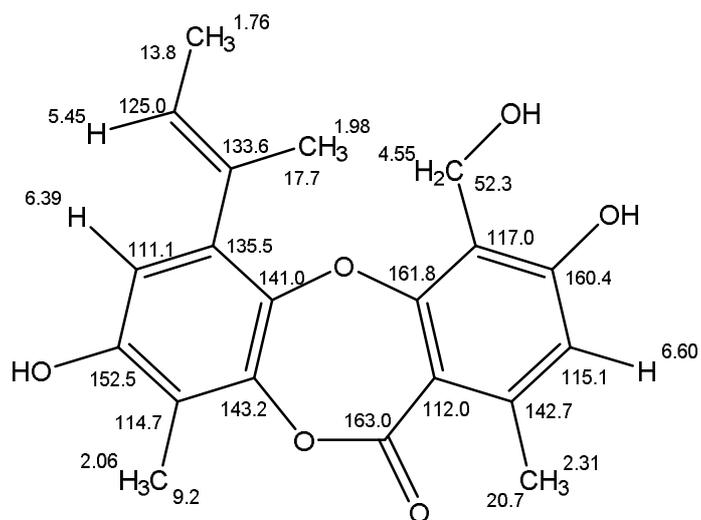
Das Molekül SG8c-132 (Abbildung 4.5.22.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 28.6$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 38.5$ min, Standardmethode, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) und abschließender Reinigung durch SEC (100, % v, MeOH) aus der Hauptfraktion 15 gewonnen (SG8c-E1-15, $m = 771$ mg). Die Verbindung zeigte wiederum das bereits bekannte Signalmuster der bereits vorgestellten Depside. Abweichungen hierbei ergaben sich in der Abwesenheit eines olefinischen Protonensignals im $^1\text{H-NMR}$, sowie beispielweise im Vergleich zu Verbindung SG8c-106, bei drei Signalen im $^{13}\text{C-NMR}$ (Tabelle 4.5.4.).

Tabelle 4.5.4.: Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Signale von SG8c-132 in DMSO-D_6 .

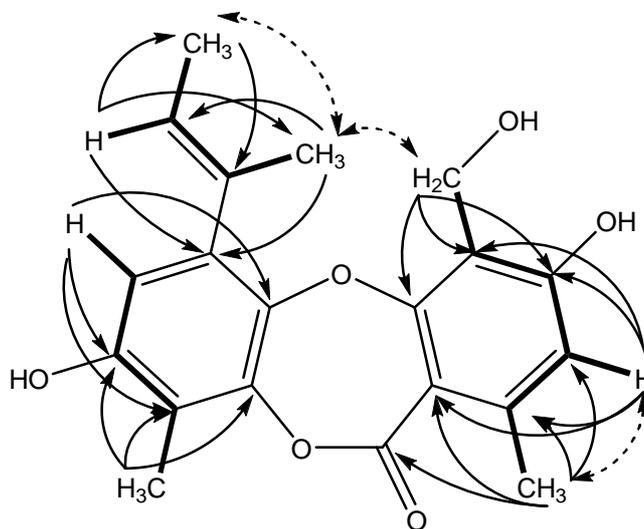
Position	SG8c-132 (DMSO-D ₆)			
	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	
1	-	117.0	qC (Ar)	
2	-	160.4	qC-OH (Ar)	
3	6.60 (s)	115.1	CH (Ar)	1, 2, 4a, 5, 12, 13
4	-	142.7	qC (Ar)	-
4a	-	112.0	qC (Ar)	-
5	-	163.0	O=C-O-	-
6	-	-	-O-	-
6a	-	143.2	qC-O- (Ar)	-
7	-	114.7	qC	-
8	-	152.5	qC-OH (Ar)	-
9	6.39 (s)	111.1	CH (Ar)	6a, 7, 8, 10a
10	-	135.6	qC (Ar)	-
10a	-	141.0	qC-O- (Ar)	-
11	-	-	-O-	-
11a	-	161.8	qC-O- (Ar)	-
12	4.55 (s)	52.3	CH ₂ -OH	1, 2, 11a
13	2.31 (s)	20.7	-CH ₃ (Ar)	3, 4, 4a, 5, 11a
14	2.06 (s)	9.2	-CH ₃ (Ar)	6a, 7, 8
15	-	133.5	qC=	-
16	5.45 (dq 1.4, 6.8)	125.0	C=CH	15, 17, 18
17	1.76 (dd 0.9, 6.8)	13.8	-CH ₃	9, 10a, 15, 16, 18
18	1.98 (s)	17.7	-CH ₃	10, 15, 16

Die für die bisherige Strukturaufklärung der Depsidon-Substitutionsmuster relevanten aromatischen Protonen lieferten ebenfalls wieder wichtige Signalkorrelationen. So zeigte das Proton bei $\delta\text{H} = 6.60$ ppm (H-3) ein Kreuzsignal im COSY-Spektrum und starke HMBC-Korrelation zu einer Methylgruppe (δH [ppm] = 2.31 (s, 3H, H-13), δC [ppm] = 20.7 (C-13)). Darüber hinaus fehlte eine der sonst vorhandenen signalintensiven ^3J -Kopplungen zu quaternären Kohlenstoffen im HMBC-Spektrum. Die bereits erwähnte Methylgruppe an C-4 hatte wiederum eine starke Korrelation im HMBC-Spektrum zum Carbonylkohlenstoff (δC [ppm] = 163.0 (C-5)) der Lactonverbrückung. Diese Beobachtungen führten zu dem Schluss, dass in der vorliegenden Verbindung, die sonst bei den anderen isolierten Depsidonen an C-4 vorhandene, derivatisierte Butenylgruppe (z.B. 1-Methyl-propyl-1-enyl, SG8c-110a) durch eine Methylgruppe substituiert war. Die zweite Unterstruktur war identisch zu anderen bereits beschriebenen Depsidonen (z.B. SG8c-106, SG8c-122) und wurde analog gelöst. Die vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebung ist in Abbildung 4.5.23a. gegeben.

Der Strukturvorschlag wurde durch Daten aus HR-HPLC-MS-TOF ($m/z = 357.1326$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet 357.1333; $m/z = 339.1217$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ und $m/z = 355.1298$ $[\text{M}-\text{H}]^-$) und der damit abgeleiteten Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_6$) bestätigt. Die Konfiguration der Doppelbindung und die Position der separierten HMBC-Spinsysteme zueinander ergaben sich durch die NOESY-Kreuzsignale (Abbildung 4.5.23b). Die Verbindung SG8c-132 stellte ein bisher nicht beschriebenes Depsidon dar (Maschke et al. 2019a). Für das Molekül wurde der Trivialname Tremateiasidon C vorgeschlagen.



a)



b)

Abbildung 4.5.23.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (---) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-132 in $\text{DMSO}-\text{D}_6$ (eigene Darstellung).

4.5.3.9. SG8c-149

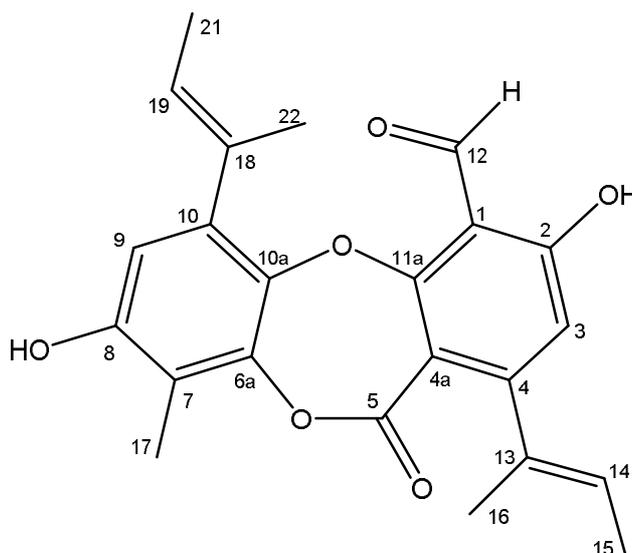


Abbildung 4.5.24.: Struktur von Verbindung SG8c-149 (eigene Darstellung).

Als letzte Komponente mit Depsidon-Grundgerüst wurde die Verbindung SG8c-149 (Abbildung 4.5.24.) als weißer Feststoff ($m = 137$ mg) aus der zwölften Hauptfraktion (SG8c-E1-12, $m = 1.70$ g) nach zusätzlicher Säulenchromatographie (98.5/1/0.5, % v/v/v, DCM/MeOH/AcOH) zur Entfernung von Fettsäuren und abschließender SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH) isoliert. Die so isolierte Verbindung zeigte zu den Molekülen SG8c-110a (Kapitel 4.5.3.5.) und SG8c-128 (Kapitel 4.5.3.7.) vergleichbare Daten im $^1\text{H-NMR}$. Im Unterschied zu diesen war allerdings keine Methylengruppe vorhanden. Dafür zeigten sich zwei scharfe, stark ins Tieffeld verschobene Signale (δ_{H} [ppm] = 12.10 (s, 1H, 2-OH), 10.22 (s, 1H, H-12)). Weiterhin war im $^{13}\text{C-NMR}$ ebenfalls ein stark entschirmtes Signal bei $\delta_{\text{C}} = 194.2$ ppm (C-12) vorhanden. In Analogie zu den Ausführungen für Auranticin B (SG8c-108, Kapitel 4.5.3.4.) ließ sich eine Aldehydfunktion an C-12 ableiten. Des Weiteren wurde ein durch Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonylfunktion entschirmtes Protonensignal für das Hydroxylproton an Kohlenstoff C-2 deduziert. Die $^1J_{\text{C,H}}$ Kopplung für C-12 bzw. H-12 ließ sich wiederum nur im HMBC- (Signalaufspaltung: $^1J_{\text{C,H}} \sim 100$ Hz) und nicht im HMQC-Spektrum beobachten. LC-MS-Messungen lieferten mit $m/z = 395.1556$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ und $m/z = 393.2380$, $[\text{M}-\text{H}]^-$ die Absicherung für die Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$). Vollständige Auswertungen der COSY-, HMQC-, HBMC- und NOESY-Spektren insbesondere der Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.5.25b.) erlaubten eine vollständige Zuordnung der chemischen Verschiebung (Abbildung 4.5.25a). Ein Datenbanksuche (SciFinder) zeigte, dass sich die Verbindung ohne vergebenen Trivialnamen (1,6-Di((*E*)-but-2-en-2-yl)-3,8-dihydroxy-9-methyl-11-oxo-11*H*-dibenzo[b,e]-1,4-dioxepine-4-carbaldehyd) als literaturbekannt herausstellte und bereits von Pittayakhajonwut *et al.* (2006) im Rahmen einer Naturstoffuntersuchung des Pilzstammes BCC 8616 (Pleosporales) beschrieben wurde. Die spektroskopi-

4.5.3.10. Tremateiasid A (SG8c-105)

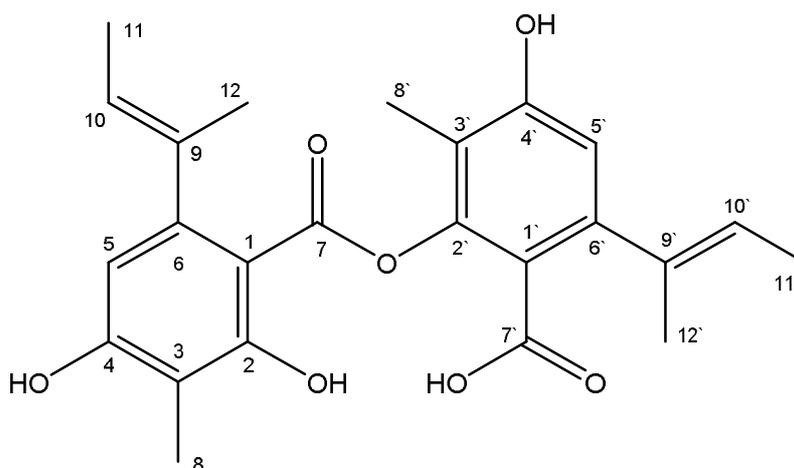


Abbildung 4.5.26.: Struktur von Verbindung SG8c-105 (eigene Darstellung).

Die in Abbildung 4.5.26. dargestellte Komponente (SG8c-105) wurde als farbloser Feststoff ($m = 215$ mg) aus der antibakteriell aktivsten Hauptfraktion (Fraktion 17, SG8c-E1-17, $m = 1.44$ mg) durch präparative RP-HPLC ($t_R = 47.0$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) gewonnen und dann teilweise weiter durch SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH) aufgereinigt. Die Verbindung zeigte, wie auch bereits beschriebene Depsidonverbindungen (Kapitel 4.5.3.1.-4.5.3.9.), Ähnlichkeiten im ^1H - und ^{13}C -NMR. Jedoch verfügte sie im ^1H -NMR allerdings über zwei olefinischen und zwei aromatische Protonen, sowie sechs Methylgruppen (Tabelle 4.5.5.).

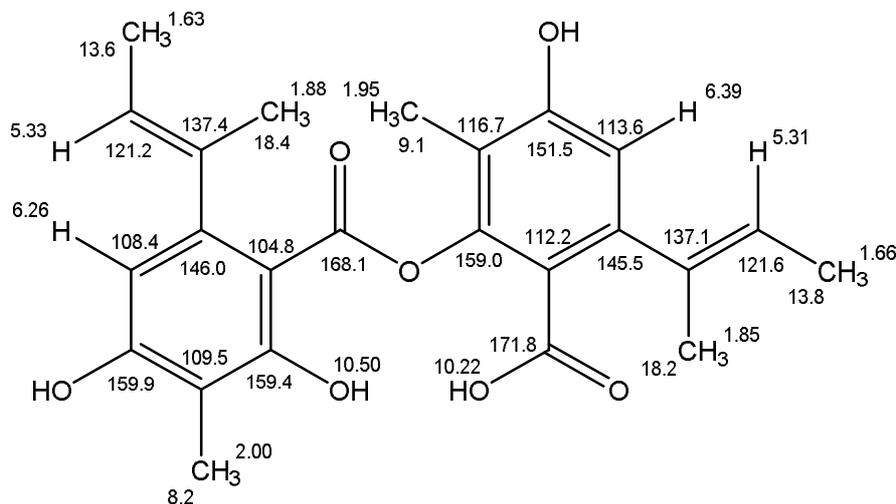
Das Signalprofil im ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum erschien dabei hauptsächlich als ein doppelter Satz an Signalen. Dies deutete auf eine Verbindung, welche aus sehr ähnlichen Grundbausteinen aufgebaut sein musste. Des Weiteren zeigte sich im Vergleich zu den Depsidonen ein zusätzlicher, ins Tieffeld-verschobener Kohlenstoff (δC [ppm] = 171.8 (C-7')) im ^{13}C -NMR und im ^1H -NMR ein stark verbreitertes, tieffeldverschobenes Signal (δC [ppm] = 10.22 (s breit, 1H, COOH)) ohne HMQC-Korrelation. Diese Beobachtungen ließen auf eine Carboxylgruppe schließen. Die Substitutionsmuster an den Phenylringen, etabliert durch HMBC-Korrelationen, ließen sich zusammen mit der Summenformel ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_7$), bestimmt aus hochauflösenden LC-MS-Messungen im Positiv- ($m/z = 427.1817$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, berechnet 427.1751) und Negativ-Modus ($m/z = 425.1593$, $[\text{M}-\text{H}]^-$), zu einem Depsid zusammenführen.

Tabelle 4.5.5.: Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Signale von SG8c-105 in DMSO- D_6 , CDCl_3 , und MeOH- D_4 . ¹ Signalüberlagerung zweier als Quartett aufgespaltener ^1H , erscheint hier als pentett

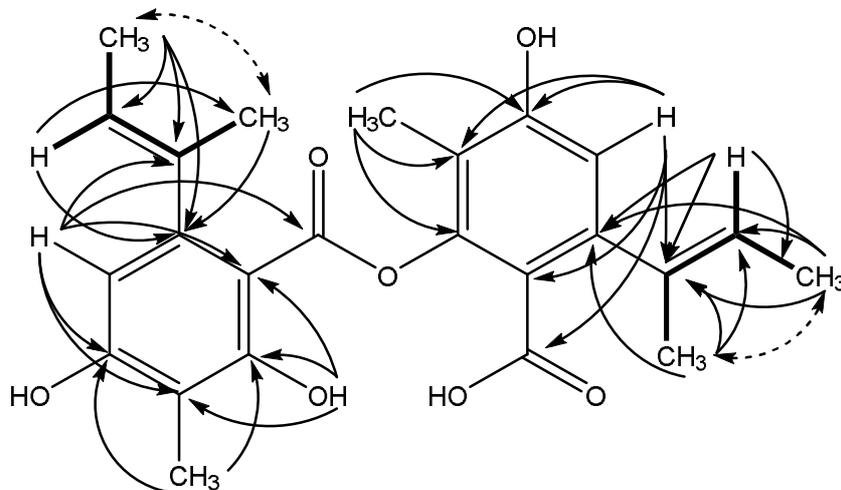
Position	SG8c-105b (DMSO- D_6)			SG8c-105 (CDCl_3)			SG8c-105a (MeOH- D_4)		
	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	
1	-	104.8	qC (Ar)	-	-	103.0	-	-	103.0
2	-	159.4	qC-O- (Ar)	-	-	163.1	-	-	163.8
3	-	109.5	qC (Ar)	-	-	109.8	-	-	110.9
4	-	159.9	qC-O- (Ar)	-	-	159.1	-	-	162.3
5	6.26 (s)	108.4	CH (Ar)	1, 3, 4, 7, 8, 9	6.21 (s)	109.8	2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10	6.17 (s)	110.4
6	-	146.0	qC (Ar)	-	-	148.9	-	-	149.5
7	-	168.1	O=C-O-	-	-	169.5	-	-	170.1
8	2.00 (s)	8.2	-CH ₃ (Ar)	1, 2, 3, 4, 6	2.14 (s)	7.9	1, 2, 3, 4, 5, 6	2.01 (s)	8.0
9	-	137.4	qC=C	-	-	138.2	-	-	139.9
10	5.33 (q, 6.7) ¹	121.2	=CH	6, 11, 12	5.37 (q, 6.7)	121.6	6, 11, 12	5.30 (q, 6.7) ¹	121.8
11	1.63 (d, 6.7)	13.6	-CH ₃	6, 9, 10	1.66 (d, 6.7)	13.9	1, 5, 6, 9, 10	1.61 (d, 6.7)	13.8
12	1.88 (s)	18.4	-CH ₃	6, 9, 10	1.93 (s)	19.0	1, 5, 6, 9, 10	1.88 (s)	19.1
1'	-	112.2	qC (Ar)	-	-	107.2	-	-	110.0
2'	-	159.0	qC-O- (Ar)	-	-	162.9	-	-	162.9
3'	-	116.7	qC (Ar)	-	-	118.4	-	-	118.1
4'	-	151.5	qC-O- (Ar)	-	-	153.6	-	-	153.8
5'	6.39 (s)	113.6	CH (Ar)	1', 2', 3', 4', 7', 8', 9'	6.42 (s)	114.8	1', 2', 3', 4', 7', 8', 9'	6.60 (s)	115.3
6'	-	145.5	qC (Ar)	-	-	147.5	-	-	149.0
7'	-	171.8	O=C-O-	-	-	174.0	-	-	174.2
8'	1.95 (s)	9.1	-CH ₃ (Ar)	2', 3', 4', 6'	2.05 (s)	9.3	1', 2', 3', 5', 4', 6'	1.94 (s)	9.3
9'	-	137.1	qC=C	-	-	137.6	-	-	139.4
10'	5.31 (q, 6.7) ¹	121.6	=CH	6', 11', 12'	5.55 (q, 6.7)	124.8	6', 11', 12'	5.27 (q, 6.7) ¹	122.4
11'	1.66 (d, 6.7)	13.8	-CH ₃	6', 9', 10'	1.77 (d, 6.7)	14.1	1', 5', 6', 9', 10'	1.64 (d, 6.7)	13.9
12'	1.85	18.2	-CH ₃	6', 9', 10'	1.96 (s)	18.9	1', 5', 6', 9', 10'	1.86 (s)	18.7
2-OH	10.50 (s)	-	-	1, 2, 3	11.38 (s)	-	1, 2, 3	-	-
COOH	10.22 (s, breit)	-	-	-	11.58 (s, breit)	-	-	-	-
4-OH/ 4'-OH	-	-	-	-	6.97 (s, breit)	-	-	-	-

Die Argumentation einer Verbindung des Esters über C-7 ($\delta\text{C} = 168.1$ ppm) zu C-2' ($\delta\text{C} = 159.0$ ppm) entgegen der anderen möglichen Variante von C-7' ($\delta\text{C} = 171.8$ ppm) zu C-2 ($\delta\text{C} = 159.4$ ppm) ließ sich über die relative chemische Verschiebung der beiden Carbonylgruppen führen. Die stärkere Tieffeldverschiebung an C-7' ließ dort demnach die Säurefunktion erwarten. Ein anderes mögliches Regioisomer mit der Esterverknüpfung von C-7 zu C-4', wie es bereits mit Agonodepside B beschrieben war (Cao *et al.* 2002), wurde trotz der sehr ähnlichen chemischen Verschiebung im ^1H - und ^{13}C -NMR nicht als Struktur favorisiert. Begründen ließ sich dies durch die chemische Verschiebung der Hydroxylprotonen. Das Hydroxylproton an C-2 ($\delta\text{H} = 10.50$ ppm), dessen Position durch die HMBC-Korrelationen zu C-1, C-2, und C-3 nachgewiesen war (Abbildung 4.5.27b.), war durch Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonylkohlenstoff der Säurefunktion in *ortho*-Position chelatisiert und damit ins Tieffeld verschoben. Dieser Effekt wurde ebenfalls in 1, 4, 5 oder 8-Position hydroxylierten Anthrachinonen (z.B. Francis *et al.* 1998, Shao *et al.* 2007) beobachtet. Das Vorhandensein eines zweiten tieffeldverschobenen OH-Protons, wie es für Agonodepside B beschrieben war, würde mit einem weiteren Hydroxylproton in *ortho*-Stellung zu einer Carboxylfunktion erwartet werden können. Im vorliegenden Fall mit der Hydroxylgruppe in *para*-Position zur Carbonsäure war dies nicht zu beobachten. Stattdessen

ist in CDCl_3 ein breites Signal ($\delta\text{H} = 6.97$ ppm) mit dem Integral von zwei Protonen zu sehen. Da diese chemischen Verschiebungen nicht für Carbonsäure-Protonen beschrieben sind, jedoch für Hydroxylgruppen, wurden diese den verbliebenen Hydroxyl-Protonen zugeordnet. Das übrige tieffeldverschobene, breite Signal bei $\delta\text{C} = 10.22$ ppm wurde daher der freien Säure zugewiesen (Abbildung 4.5.27a.).



a)



b)

Abbildung 4.5.27.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-105 in $\text{DMSO-}d_6$ (eigene Darstellung).

Ein Molekül mit der dargelegten Struktur konnte nach einer Literatur- bzw. Datenbanksuche (SciFinder) nicht gefunden werden. Es wurde daher als neue Verbindung gewertet und der Trivialnamen Tremateiasid A vorgeschlagen.

Eine vergleichende Diskussion der Depsid- und Depsidonproduzenten, berichtete Bioaktivität, sowie die antibakterielle und zytotoxische Aktivität des isolierten Depsids, wird vergleichend mit den Depsidonen im nächsten Kapitel geführt (Kapitel 4.5.4.).

4.5.4. Vergleichende Diskussion der Depsidone und Depside

4.5.4.1. Isolierungsquellen von Depsidonen und Depsiden

Depsidone sind hauptsächlich als Stoffwechselprodukte vom Mykobionten der Flechten bekannt. Neben der Produktion innerhalb der Flechtensymbiose wurden Depsidone, wenn auch nicht weit verbreitet (Ibrahim *et al.* 2018), aus einer Reihe weiterer Pilze von unterschiedlichen Habitaten isoliert. Unter diesen sind als Endophyten isolierte Pilze wie zum Beispiel *Simplicillium* sp. (Simplicildone A-I; Seatang *et al.* 2017), *Talaromyces stipitatus* (Talaromyzone A-B, Cai *et al.* 2017), *Cordyceps dipterigena* (Cordycepsidone A-B, Varughese *et al.* 2012), *Corynespora cassiicola* (Corynesidone A-D, Chomcheon *et al.* 2009), *Chaetomium* sp. (Chaetosidone A, Talontsi *et al.* 2013), *Phomopsis* sp. (Phomopsidone A, Zhang *et al.* 2014b) *Botryosphaeria rhodina* (Botryorhodine A-D, Abdou *et al.* 2010) und *Meyerozyma guilliermondi* (Botryorhodine E-G, Chen *et al.* 2015). Weitere terrestrische Quellen von Depsidonproduzenten sind Erdbodenisolate von *Chaetomium brasiliense* (Mollicellin B-N, Khumkomkhet *et al.* 2009) und kropophile Pilze wie *Pilobolus heterosporus* (Pilbolusone A-D, Rajachan *et al.* 2014). Am Übergang von terrestrischer zu mariner Umwelt, aus einem Mangrovenwald, wurde die Kultivierung von *Preussia aurantiaca* mit den Depsidonen Auranticin A und Auranticin B berichtet (Poch & Gloer 1991). Des Weiteren wurden Depsidongenerierende Pilze aus speziellen Meereshabitaten, wie beispielsweise aus Tiefseesediment (*Spiromastix* sp., Spiromastixone A-O, Niu *et al.* 2014), sowie von der Oberfläche von Rotalgen (Zhang *et al.* 2014a) und Schwämmen isoliert (*Aspergillus unguis* (Teleomorph: *Emericella unguis*); Aspergillusidone A-F, Nidulin, Unguinol, Sureram *et al.* 2012). Die aus der Meeresumgebung isolierten Pilze produzieren dabei häufig halogenierte Depsidone. Interessanterweise wurden ebenfalls chlorierte Depsidone aus Erdbodenisolaten von *E. unguis* (Klaiklay *et al.* 2016) und *C. brasiliense* beschrieben (Khumkomkhet *et al.* 2009).

Depside, genauso wie Depsidone auch, sind bekannte Metabolite aus Flechten, wurden jedoch, wenn auch selten, als Isolate von Pflanzen (z.B. Hillebrand *et al.* 2004, Reynertson *et al.* 2006) und Pilzendophyten publiziert (z.B. Cao *et al.* 2002, Nazir *et al.* 2011, de Medeiros *et al.* 2011). Depside mit ähnlicher Struktur wie Verbindung SG8c-105 wurden aus *Aspergillus unguis* (Teleomorph: *Emericella unguis*), sowohl als Erdboden- (Aspergisid A-B, Phainu-phong *et al.* 2018) als auch als Meeresisolat von Makroalgen (Aspergillusidon G, Yang *et al.* 2018), und aus einem nicht sporulierenden, nicht näher klassifizierten, als Endophyt isolierten Pilz aus der Pflanze *Derris thyrsoiflora* berichtet (Agonodepside A-B, Cao *et al.* 2002).

4.5.4.2. Pharmakologische Eigenschaften der Depsidone und Depside

Depsidonderivate sind Gegenstand aktueller Literatur und werden derzeit als wertvolles Pharmakophor mit vielen, relevanten biologischen Eigenschaften (antineoplasiv, antioxidativ, antibakteriell, antimykotisch, entzündungshemmend, etc.) angesehen (Ibrahim *et al.* 2018). An Derivaten mit vergleichbarem Substitutionsmuster, wie die Verbindungen der Auranticin- bzw. Piloboluson-Reihe, welche ebenfalls im Laufe der Extraktbearbeitung isoliert wurden, konnten bereits antibakterielle (Poch & Gloer 1991), sowie schwache bis moderat antiparasitäre und antiproliferative (Rajachan *et al.* 2014) Eigenschaften gezeigt werden. Einige der Depsidone die von Rajachan *et al.* (2014) isoliert worden waren, sind zuvor in einem endophytischen Pilz nachgewiesen worden und waren dort ebenfalls als schwach zytotoxisch befunden worden (Pittayakhajonwut *et al.* 2006). Antibakterielle Untersuchungen dieser Verbindungsserie wurden allerdings entweder nicht oder bisher nur mit nicht quantitativen Tests (Hemmhof- bzw. Agar-Diffusionstests) vorgenommen.

Da Depside mit den Depsidonen strukturell und biosynthetisch verwandt sind (Legaz *et al.* 2011, Ibrahim *et al.* 2018), sind bei den Depsiden ebenfalls eine ganze Reihe von biologischen Eigenschaften bekannt (z.B. antibakteriell (Piovano *et al.* 2002, Phainuphong *et al.* 2018), entzündungshemmend (Studzińska-Sroka & Dubino 2018), antimykotisch (Smeda-Hirschmann *et al.* 2008), antioxidativ (Goutam *et al.* 2018), photoprotektiv und antiproliferativ (Molnár & Farkas 2009). Verbindungen mit einem vergleichbaren Substitutionsmuster zum selbst isolierten Depsid SG8c-105b (Abbildung 4.5.28.) wurden mit Agonodepsid A-B (Cao *et al.* 2002), Aspergillusid G (Yang *et al.* 2018) und Aspergisid A-B (Phainuphong *et al.* 2018) berichtet. Diese wurden neben weiteren pharmakologischen Eigenschaften (z.B. Enzyminhibition: Acetylcholinesterase) als moderat bis stark antibiotisch bewertet.

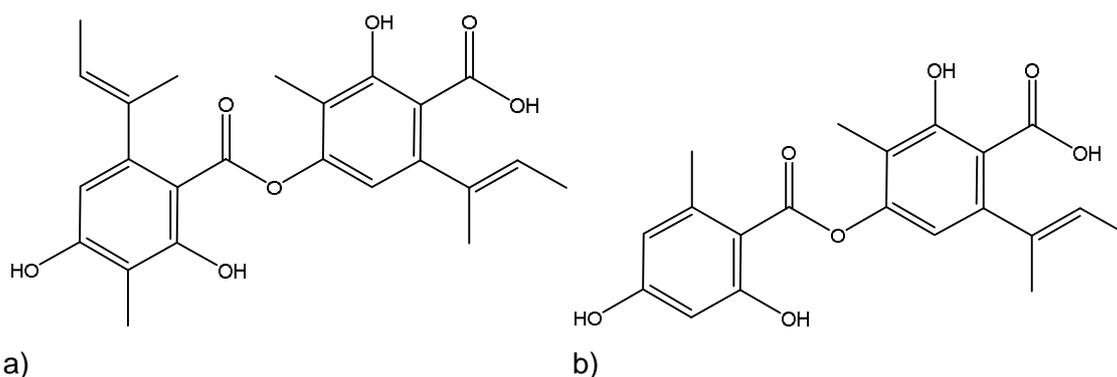


Abbildung 4.5.28.: Strukturell zur Verbindung SG8c-105 verwandte Depsidderivate: a) Agonodepside B, b) Aspergicide B/ Aspergillusidone G (eigene Darstellung).

Aspergicid B und Aspergillusidone G sind dabei strukturell identisch. Je nach Vergleichstamm und Verbindung lagen die MIC-Werte in einem Bereich von 8-200 μM (z.B. MIC = 8 μM Aspergicid A, methicillin resistent *Staphylococcus aureus*; MIC = 102 μM Aspergillusidone G, *Pseudomonas aeruginosa*). Die Isolierung der Depsid-Verbindung (Tremateiasid A, SG8c-105) aus einer im Vortest antibakteriell wirksamen Fraktion ließ ebenfalls vergleichbare Aktivität erwarten. Demnach war es für einen Vergleich ebenfalls wichtig die antibakterielle und antiproliferative Aktivität der Komponente in Reinform festzustellen (siehe Kapitel 4.5.4.3.).

4.5.4.3. Antibakterielle und antiproliferative Eigenschaften der isolierten Depside und Depsidone

Die Depsidone Auranticin A und Auranticin B wurden bereits als antibakteriell wirksame Verbindungen beschrieben (Poch & Gloer 1991). Die Aktivitätsbestimmung erfolgte dabei allerdings bisher nur über die semi-quantitative Agardiffusionsmethode, was einen Vergleich mit anderen Verbindungen erschwert. Für die anderen zuvor isolierten Depsidone (Pilobolusone C, SG8c-110a, SG8c-128, SG8c-149) wurden hingegen gar keine antibakteriellen Untersuchungen vorgenommen (Pittayakhajonwut *et al.* 2006; Rajachan *et al.* 2014). Die Bestimmungen der MIC- und IC₅₀-Werte (Tabelle 4.5.6.) zeigten bemerkenswerte antibakterielle Aktivität bei dem isolierten Depsid Tremateiasid A (SG8c-105) und dem Depsidone SG8c-149 (Maschke *et al.* 2019a).

Tabelle 4.5.6.: Antibakterielle und zytotoxische Kennwerte (MIC, IC₅₀) isolierter Depsidone und Depside gegenüber *B. subtilis*, *P. agarici* und der Zervix-Karzinom Zelllinie KB-3-1. ¹ Butenylgruppe (1-Methyl-prop-enyl) an C-4 ersetzt durch Methylgruppe; ² Depside: 6a-OH, 4a-COOH

Trivialname	Verbindung	<i>B. subtilis</i>		<i>P. agarici</i>		KB-3-1	Substituenten			
		IC ₅₀ [µM]	MIC [µM]	IC ₅₀ [µM]	MIC [µM]	IC ₅₀ [µM]	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Auranticin A	SG8c-102	173	245	69	115	101	CH ₃	CH ₂ -OH	H	COOH
Auranticin B	SG8c-108	18	19	33	36	120	CH ₃	CHO	H	COOH
-	SG8c-110a	14	19	9	16	50	H	CH ₂ -OH	H	CH ₃
-	SG8c-128	19	20	11	16	91	H	CH ₂ -O-CH ₃	H	CH ₃
-	SG8c-149	5	5	5	5	55	H	CHO	H	CH ₃
Pilobolusone C	SG8c-107	21	25	17	19	249	CH ₃	CH ₂ -O-CH ₃	H	COOH
Tremateiasidon A	SG8c-106	153	165	133	145	50	H	CH ₂ -OH	H	CH ₂ -OH
Tremateiasidon B	SG8c-122a	35	38	18	20	>236	H	CHO	H	COOH
Tremateiasidon C ¹	SG8c-132	46	66	82	88	96	H	CH ₂ -OH	H	-
-	SS02.02	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	69	CH ₃	CH ₂ -OH	CH ₃	COO-CH ₃
Tremateiasid A ²	SG8c-105	2	3	2	2	156	H	CH ₃	H	CH ₃
Gentamicinsulfat	Referenz	1	2	12	16	-	-	-	-	-
(+)-Grisoefulvin	Referenz	-	-	-	-	20	-	-	-	-
Cryptophycin 52	Referenz	-	-	-	-	1.3 x 10 ⁻⁵	-	-	-	-

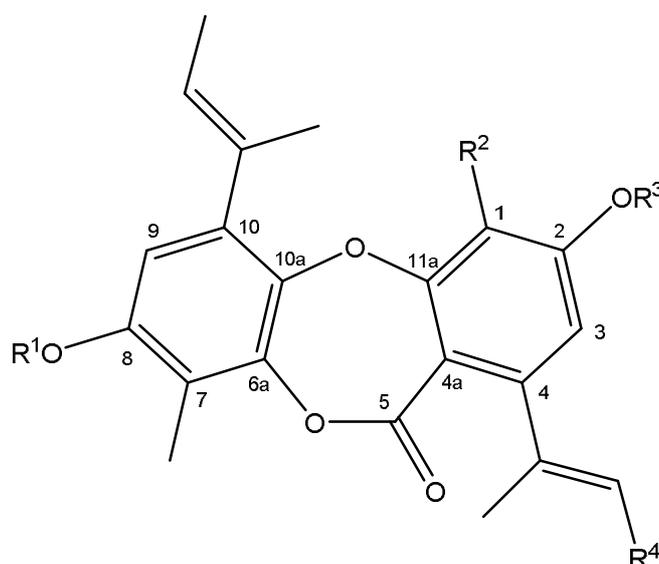


Abbildung 4.5.29.: Grundgerüst der für die Bioaktivitätstests untersuchten Depsidone und Depside (eigene Darstellung).

Die ermittelten Werte waren vergleichbar mit den Werten für das Referenzantibiotikum Gentamicin gegenüber *B. subtilis* (gram-positiv) und übertrafen diese sogar gegenüber dem gram-negativen Bakterium *P. agarici*. Die meisten anderen Depsidone zeigten ebenfalls resolute MIC-Werte im Bereich von 19-66 μM für *B. subtilis* bzw. 16-88 μM für *P. agarici*. Eines der neu beschriebenen Depsidonderivate (Tremateiasidon A, SG8c-106) und Auranticin A (SG8c-102) zeigte hingegen nur moderate bis schwache Aktivität (165-245 μM , *B. subtilis*; 115-1455 μM , *P. agarici*) gegenüber den getesteten Stämmen.

Das an R³ und R⁴ (Abbildung 4.5.29.) methylierte Derivat von Auranticin A (SS02.02) war hingegen im getesteten Bereich (> 1000 μM) komplett inaktiv. Es kann daher vermutet werden, dass die Hydroxylgruppe an R³ wichtig für die Interaktion mit der Zielstruktur im Bakterium ist. Eine andere Erklärung für die Inaktivität wäre die durch Methylierung stark herabgesetzte Löslichkeit im wässrigen Nährmedium. Bis zu einer Konzentration von etwa 250 μM (125 mg/ml) wurden Trübungen während der MIC-Bestimmung durch ungelöste Testsubstanz beobachtet. Die erforderliche Konzentration für einen wachstumshemmenden Effekt läge somit über der Löslichkeitsgrenze. Auffällig war, dass besonders die Depsidonderivate mit einer Aldehydfunktion an R² gegenüber der Hydroxy- bzw. Methoxyfunktionalisierung zu den aktivsten Verbindungen gehörten. Die funktionelle Gruppe (OH bzw. O-CH₃) an R¹ schien hingegen keine oder nur geringe Auswirkungen auf die antibakterielle Aktivität der Verbindungen zu haben (vgl. Auranticin B (SG8c-108) und Tremateiasidon B (SG8c-122a)). Bei der Struktureigenschaftsbeziehung (SAR) für R⁴ begünstigte ein hydrophober Rest in Form einer Methylgruppe die antibakterielle Wirkung (siehe SG8c-110a, R⁴ = CH₃), da die Aktivität bei Auranticin A (R⁴ = COOH) und Tremateiasidon A (R⁴ = CH₂-OH) deutlich geringer ausgeprägt war. Bei der Abwesenheit der kompletten Seitenkette an C-4 lagen die MIC- und IC₅₀-Werte hingegen zwischen denen der Depsidone mit hydrophilem bzw. hydrophobem Rest an R⁴. Für eine weiterführende Analyse und Diskussion zur Struktur-Eigenschafts-Beziehungen der antibakteriellen Aktivität wären allerdings weitere Ergebnisse anderer Derivate nötig. Interessanterweise wurde Auranticin A von Poch & Gloer (1991) als deutlich stärker antibakteriell als Auranticin B beschrieben. Die selbst ausgeführten und vorgestellten Messreihen zeigten hingegen die gegenteilige Beobachtung, sogar gegenüber derselben Referenz-Art *B. subtilis*.

Von Pittayakhajonwut *et al.* (2006) und Rajachan *et al.* (2014) wurde bereits für die von ihnen isolierten Depsidone eine schwache zytotoxische Aktivität im niedrigen mikromolaren-Bereich gegenüber verschiedenen Zelllinien berichtet. In den Testreihen gegenüber der Zervix-Karzinom Zelllinie KB-3-1 konnte ebenfalls eine moderat bis schwache antineoplastische Aktivität (vgl. Referenzverbindung (+)-Griseofulvin (IC₅₀ = 20 μM)) im Bereich von 50-250 μM gezeigt werden. Diese Aktivität ist allerdings sehr gering im Vergleich zu der extrem zytotoxischen Referenz-Verbindung Cryptophycin 52 (1.3 x 10⁻⁵ μM).

Die Stärke der antibakteriellen Aktivität innerhalb der Depsidonreihe ist nicht in Übereinstimmung mit den Werten für die zytotoxische Wirksamkeit. Dies deutet auf einen anderen Wirkort bzw. Wirkmechanismus, statt des Vorliegens einer generellen Zellschädigung, hin. Honda *et al.* (2010) zeigten, dass die physiko-chemischen Eigenschaften (logP und pKa) wichtig für die antibakterielle Aktivität sind. Shrestha (2015) beobachtete Membran-schädigende Effekte durch Kulturextrakte von Flechten. Dieser Bakterienmembran-schädigende Effekt, der zuvor schon von Gupta *et al.* (2012) für L-Usninsäure (Abbildung 4.5.30) berichtet wurde, sei allerdings nicht der einzige antibakterielle Effekt. Des Weiteren wurden Hinweise, die eine Störung bei der Zellteilung anzeigen, gefunden (Shrestha 2015). Diese Untersuchungen wurden allerdings nur mit Kulturextrakten aus Flechten und nicht mit einzeln-isolierten Depsid- bzw. Depsidonderivaten vorgenommen. Dies schließt jedoch mögliche synergistische Effekte oder die Wirkung anderer Komponenten des Extrakts nicht aus. Der genaue Wirkort und der Wirkmechanismus, welcher die antibakterielle Aktivität von Depsidonen erklärt, ist der Literatur bisher nicht bekannt (Shrestha & St. Clair 2013). Als mögliches Ziel kommt allerdings das FtsZ-Protein (filamenting temperature-sensitive mutant Z-Protein) als bakterielles Tubulinhomolog infrage, da bereits eine Interaktion und Störung der FtsZ-Polymerisation durch Polyphenolverbindungen (z.B. Viriditoxin & Chrysophaentin A) nachgewiesen wurde (Schaffner-Barbero *et al.* 2011).

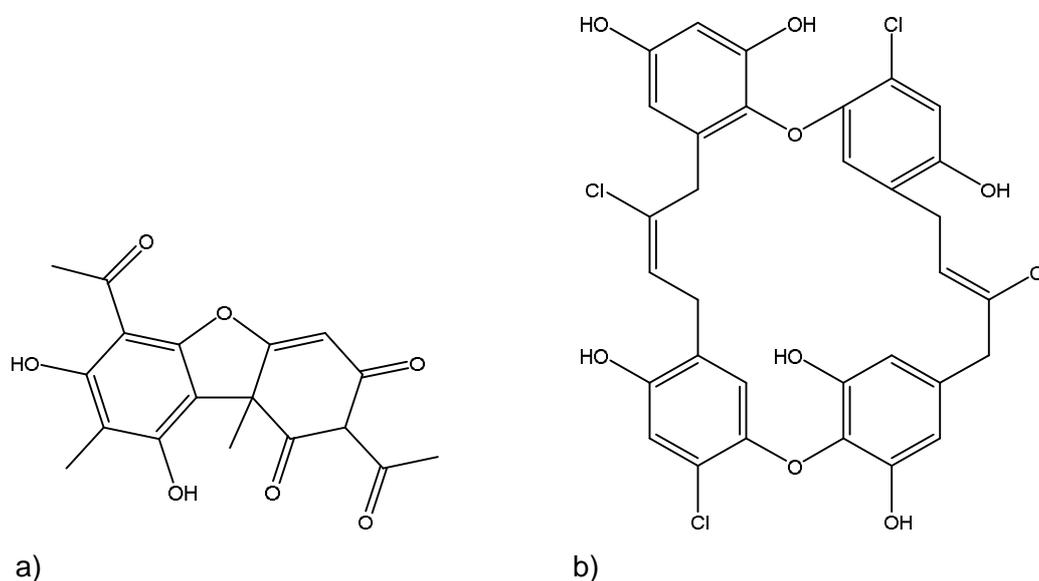


Abbildung 4.5.30.: Struktur von a) L-Usninsäure, b) Chrysophaentin A (eigene Darstellung).

4.5.5. Neue Verbindungen aus Stamm SG8c

4.5.5.1. Tremateiajulin A (SG8c-114)

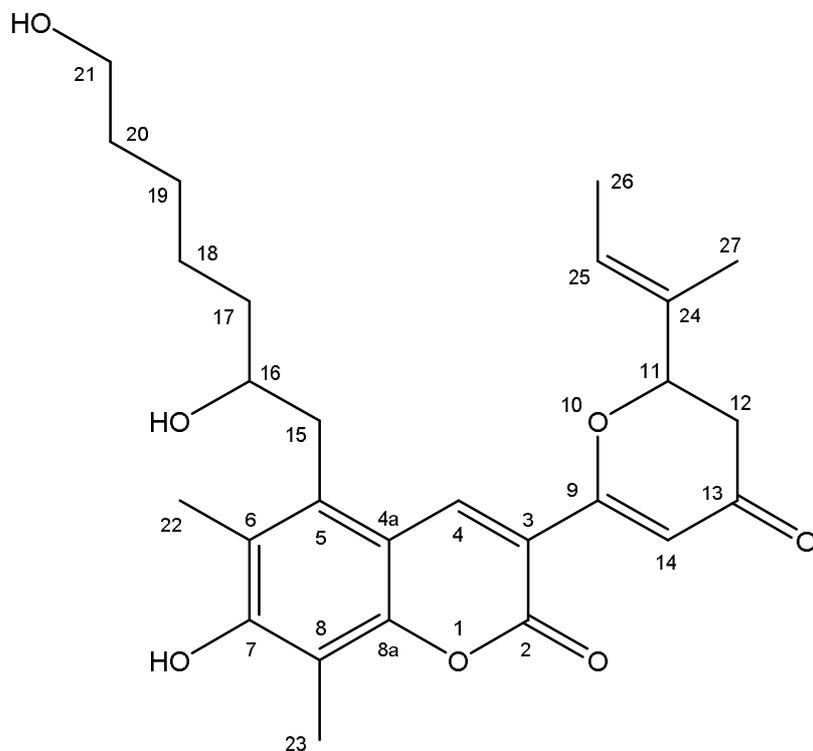


Abbildung 4.5.31.: Struktur von Verbindung SG8c-114 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-114 (Abbildung 4.5.31.) wurde als gelber Feststoff ($m = 3.64$ mg) aus Fraktion 17 (SG8c-E1-17, $m = 1.44$ g) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 37.7$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) und SEC (100, % v, MeOH) mit der Pseudomolekularionenmasse im Positiv-Modus ($m/z = 471.2327$, $[M+H]$) und im Negativ-Modus ($m/z = 469.2192$, $[M-H]$) isoliert. Die Ionenmassen in Kombination mit weiteren Information aus den NMR-Spektren lieferten die Elementarzusammensetzung ($C_{27}H_{34}O_7$).

Anhand der chemischen Verschiebungen im 1H - und ^{13}C -NMR-Spektrum konnten vier aromatische bzw. olefinische Methylgruppen, eine aliphatische Methylgruppe, zwei aromatische bzw. olefinische Protonen, zwei sauerstoffverbrückte Methine, sowie eine aliphatische Kette und elf quaternäre Kohlenstoffatom beobachtet werden (Tabelle 4.5.7.). Gemeinsame HMBC-Signale der beiden Methylgruppenprotonen am Aromaten (δ_H [ppm] = 2.29 (s, 3H, H-22), δ_C [ppm] = 13.0 (C-22); δ_H [ppm] = 2.28 (s, 3H, H-23), δ_C [ppm] = 8.5 (C-23)) und der Methyleinheit (δ_H [ppm] = 3.04 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-15), δ_C [ppm] = 37.5 (C-15)) der aliphatischen Kette ließen einen komplett substituierten Phenylring mit zwei Oxo-Funktionalisierungen (δ_C [ppm] = 161.4 (C-7), δ_C [ppm] = 154.5 (C-8a)) erwarten.

Tabelle 4.5.7.: Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Signale von SG8c-114 in DMSO- D_6 und MeOH- D_4 .

Position	SG8c-114b (MeOH- D_4)			SG8c-114a (DMSO- D_6)		
	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	-	-	-	-	-	-
2	-	160.3	O=C-O-	-	157.8	-
3	-	113.3	qC (Ar)	-	111.2	-
4	8.76 (s)	144.5	CH (Ar)	8.65 (s)	142.5	2, 3, 5, 8, 8a, 9
4a	-	112.5	qC (Ar)	-	110.8	-
5	-	137.4	qC (Ar)	-	136.4	-
6	-	124.0	qC (Ar)	-	122.4	-
7	-	161.4	qC (Ar)	-	159.8	-
8	-	110.3	qC (Ar)	-	108.6	-
8a	-	154.5	qC (Ar)	-	152.5	-
9	-	166.8	=C-O-	-	163.5	-
10	-	-	-	-	-	-
11	4.97 (dd, 13.9, 2.9)	85.1	CH	4.96 (d, 13.7)	82.5	13, 24, 25, 26, 27
12	2.87 (dd, 16.8, 13.9) 2.47 (dd, 16.8, 2.9)	40.9	-CH ₂	2.78 (dd, 16.4, 13.9) 2.41 (dd, 2.9, 16.2)	39.7	11, 13, 14, 24
13	-	197.1	C=O	-	192.8	-
14	6.76 (s)	106.3	C=CH	6.55 (s)	105.0	3, 9, 12
15	3.04 (d, 6.5)	37.5	-CH ₂	2.90 (m)	36.2	4a, 5, 6, 16, 17
16	3.71 (p, 6.5)	73.2	CH	3.55 (s, breit)	70.8	-
17	1.55 (m)	38.8	-CH ₂	1.44 (m)	37.9	-
18	1.57 (m), 1.41 (m)	26.8	-CH ₂	1.42 (m)	25.2	-
19	1.39 (m)	27.1	-CH ₂	1.27 (m)	25.8	18
20	1.52 (m)	33.6	-CH ₂	1.39 (m)	32.6	-
21	3.54 (t, 6.6)	62.9	-CH ₂ -OH	3.37 (t, 6.5)	60.7	19, 20
22	2.29 (s)	13.0	-CH ₃ (Ar)	2.21 (s)	12.7	5, 6, 7
23	2.28 (s)	8.5	-CH ₃ (Ar)	2.21 (s)	8.6	7, 8, 8a,
24	-	134.1	qC=	-	132.8	-
25	5.79 (q, 6.7)	125.1	=CH	5.71 (q, 6.6)	122.6	11, 26, 27
26	1.75 (d, 6.7)	13.5	-CH ₃	1.68 (d, 6.6)	13.1	11, 24, 25
27	1.87 (s)	12.6	-CH ₃	1.78 (s)	12.4	11, 24, 25
16-OH	-	-	-	4.59 (d, 4.2)	-	15, 16, 17
21-OH	-	-	-	4.32 (s, breit)	-	-

Die aliphatische Kette an C-5 ($\delta\text{C} = 137.4$ ppm) trug zusätzlich zwei Hydroxylgruppen. Eine der Hydroxylfunktionen war terminal an C-21 (δH [ppm] = 3.54 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-21), δC [ppm] = 62.9 (C-21)) und die andere an C-16 positioniert (δH [ppm] 3.71 (p, $J = 6.5$ Hz, 2H, H-16), δC [ppm] = 73.1)). Zusammen mit COSY-, HMQC- und ausgewählten HMBC-Korrelationen war es unzweifelhaft möglich die Zuordnung der chemischen Verschiebungen innerhalb der aliphatischen Kette vorzunehmen (Abbildung 4.5.32a).

Ebenfalls war in den Spektren eine Butenylgruppe, ähnlich der in den Depsidon-Verbindungen (z.B. SG8c-106, SG8c-122a, SG8c-132), die allerdings an ein Oxymethin an C-11 (δH [ppm] = 4.97 (dd, $J = 13.9, 2.9$ Hz, 1H, H-11), δC [ppm] = 85.1 (C-11)) gebunden war, erkennbar. Dieses Oxymethingruppe hatte wiederum starke COSY-Kreuzsignale zu einer Methylengruppe an C-12 (δH [ppm] = 2.87 (dd, $J = 16.8, 13.9$ Hz, 1H, H-12), 2.47 (dd, $J = 16.8, 2.9$ Hz, 1H, H-12'), δC [ppm] = 40.9 (C-12)). Von den HMBC-Korrelation dieser Methyleneinheit ausgehend, zeigten sich weitere Signale zu einer Carbonylfunktion (δC [ppm] = 197.1 (C-13)) und einem weiteren Proton (δH [ppm] = 6.76 (s, 1H, H-14),

δC [ppm] = 106.3 (C-14)), welches wiederum Verknüpfungen zu zwei sp^2 -hybridisierten, quaternären Kohlenstoffen aufwies (δC [ppm] = 113.3 (C-3), 166.8 (C-9)).

Das Pyranocoumarin-Grundgerüst wurde durch starke HMBC-Korrelationen des zentralen Protons an C-4 (δH [ppm] = 8.76 (s, 1H, H-4), δC [ppm] = 144.5 (C-4)) zu C-5 (Anbindungspunkt zur aliphatischen Kette), zu C-8a und ebenfalls zu C-3 und C-9, was auf eine Anbindung zur bereits beschriebenen Untereinheit mit der Butenylgruppe hindeutete, bestimmt. Zusätzlich war mit dem HMBC-Signal zum Kohlenstoff an C-2 (δC = 160.3 ppm), welches sonst keine Korrelation mit einem anderen Proton zeigte und das aufgrund der chemischen Verschiebung eine Esterfunktion bzw. ein Lacton erwarten ließ, eine Korrelation vorhanden. Die Ringschlüsse über einen Ester bzw. ein Lacton (C-2 zu C-8a) und einen Ether (C-9 zu C-11), statt des Vorhandenseins der freien Säure bzw. des Alkohols wurde zusätzlich durch die Elementarzusammensetzung verdeutlicht. Dies schloss eine lineare Struktur aus und etablierte ein ungewöhnliches Pyranocoumarin-Grundgerüst. Die vergleichsweise starke Tieffeldverschiebung des sauerstofffunktionalisierten Kohlenstoffes an C-9 im Vergleich zum Carbonylkohlenstoff an C-2 ließ sich durch die beiden β -ständigen Carbonylgruppen, welche einen entschirmenden bzw. Elektronen-ziehenden Effekt haben, erklären. Interessanterweise waren die Kohlenstoffe an C-3 und C-7 im ^{13}C -Spektrum nicht mit dem Lösemittel $\text{DMSO-}D_6$, beobachtbar, sondern nur durch deren HMBC-Korrelation erkennbar. Dies erschwerte die Zuordnung. In Methanol- D_4 hingegen waren die ^{13}C -Signale für diese Kohlenstoffe klar zu erkennen.

Die Geometrie der Doppelbindung wurde durch die Beobachtung eines starken NOESY-Kreuzsignals von H-11 (δH = 4.97) zu H-25 (δH = 5.79) bei gleichzeitigem Fehlen der Korrelation von H-11 zu den Methylprotonen H-26 (δH = 1.75) bestimmt. Vorliegender Befund ließ sich mit der Doppelbindung in *E*-Konfiguration in Übereinstimmung bringen. Zur Verdeutlichung sind ausgewählte COSY-, HMBC-, und NOESY-Korrelationen in Abbildung 4.5.32b. dargestellt. Aufgrund der geringen isolierten Menge und fehlgeschlagenen Bemühungen bei der Kristallisation konnte die absolute Konfiguration des Moleküls nicht abschließend bestimmt werden. Für die etablierte Struktur konnte dennoch keine Referenzen in den Datenbanken gefunden werden, sodass die Verbindung als neues Pyranocoumarinderivat ((*E*)-3-(2-(But-2-en-2-yl)-4-oxo-3,4-dihydro-2*H*-pyran-6-yl)-5-(2,7-dihydroxyheptyl)-7-hydroxy-6,8-dimethyl-2*H*-chromen-2-on) gewertet wurde. Für die Verbindung wurde der Trivialname Tremateiajulin A vorgeschlagen.

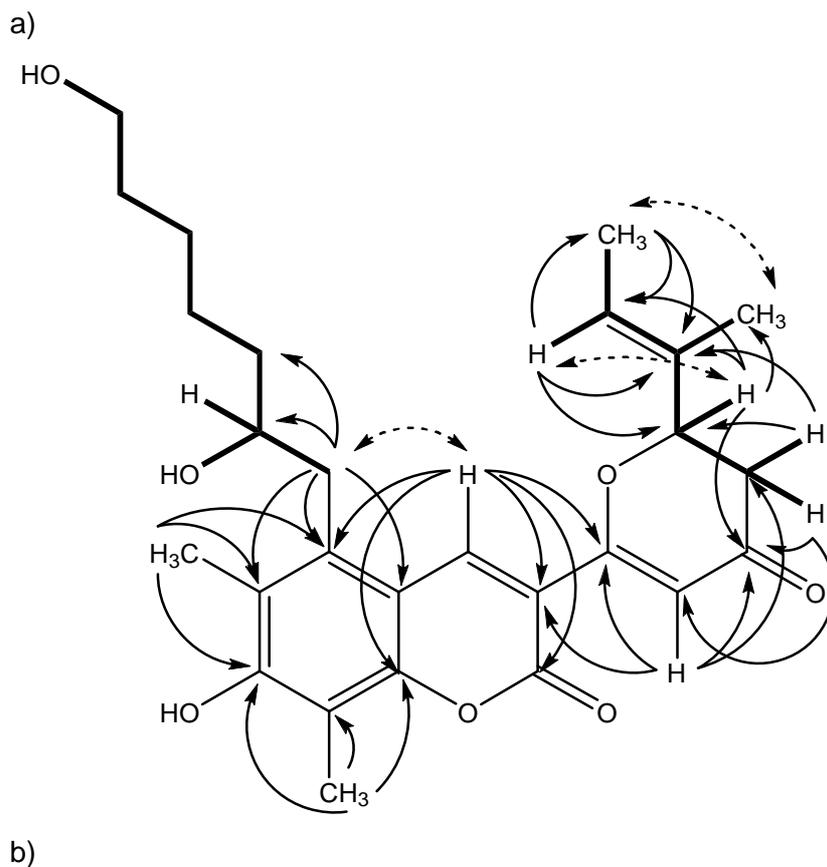
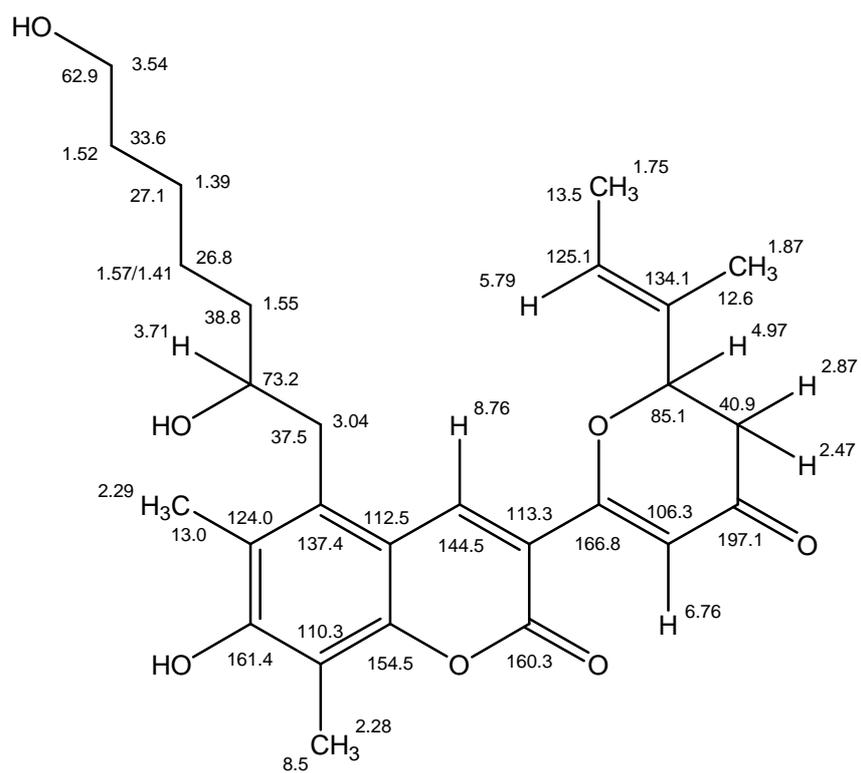


Abbildung 4.5.32.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG8c-114 in MeOH-D_4 (eigene Darstellung).

Die aus den NMR-Spektren abgeleitete Struktur zeigte das ungewöhnliche Pyranocoumarin-Gerüst der Monankarin Serie. Monankarine (A-F) wurden zuvor nur aus dem "Rotschimmelpilz" *Monascus anka* (syn. *Monascus purpureus* (Mycobank 2019, Crous *et al.* 2004)) isoliert (Hossain *et al.* 1997). Bei diesen Verbindungen ist der Pyranring nicht direkt an die Coumarin-Einheit anelliert. Im Unterschied dazu existieren die angularen, die linearen Pyranocoumarine der Xanthyletin-Reihe (6,7-Pyranocoumarin bzw. Pyrano[3,2-g]coumarin), Pyranocoumarine der Seselin-Reihe (7,8-Pyranocoumarin bzw. Pyrano[3,2-f]coumarin) und die ebenfalls gewinkelten Pyranocoumarine der Bothrioclinin-Reihe (3,4-Pyranocoumarin bzw. Pyrano[3,2-c]coumarin) (Abbildung 4.5.33.), welche in verschiedenen Pflanzen nachgewiesen worden sind (z.B. Hänsel & Sticher 2010, Chen *et al.* 2007). Die isolierte Verbindung unterscheidet sich jedoch noch weitergehend von den zuvor isolierten Monankarinen in der Länge der aliphatischen Kette (Heptyl vs. Propyl) an C-5 und dem Substituenten des Pyranringes an C-11 (Butenyl vs. Methyl).

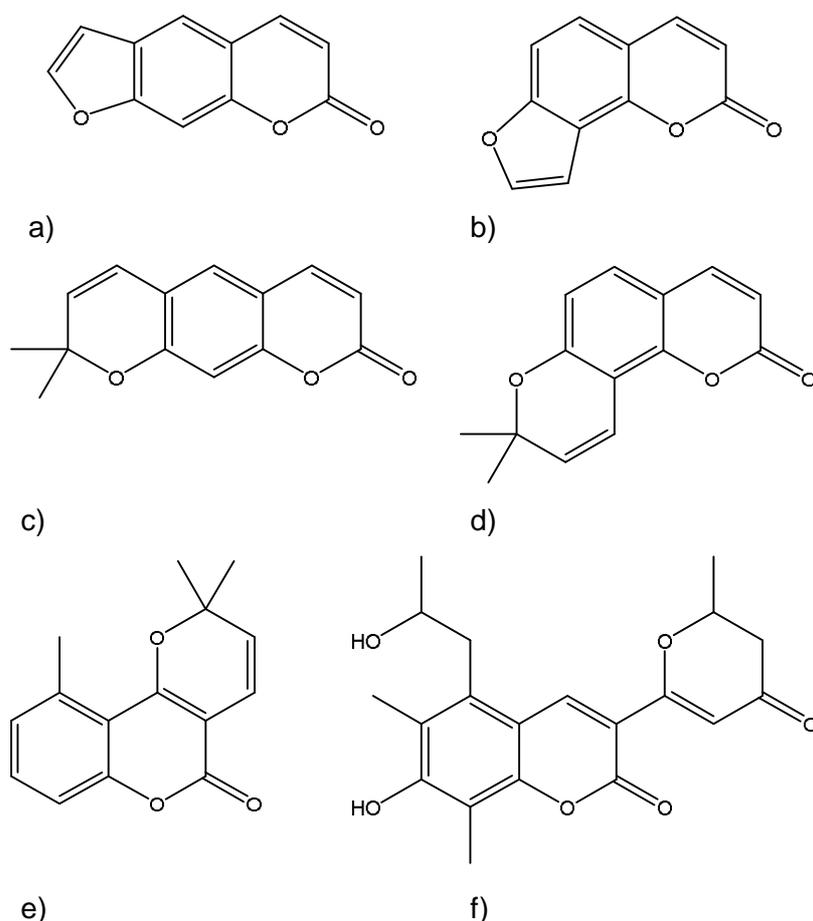


Abbildung 4.5.33.: Strukturelle Vielfalt der Furano- und Pyranocoumarine: a) Psoralen, b) Angelicin, c) Xanthyletin, d) Seselin, e) Bothrioclinin, f) Monankarin F (eigene Darstellung).

Furano- und seltener Pyranocoumarine sind allgemein bekannt für ihr Vorkommen als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe in Apiaceae (Doldengewächse, z.B. Bärenklau- und Engelwurzarten) sowie Rutaceae (Rautengewächse, z.B. Zitrusfrüchte), sowie dem Auslösen von Photoreaktivität in Epidermalzellen (Photodermatitis) beim Menschen (Hänsel & Sticher 2010, Dugrand-Judek *et al.* 2015). Ihr Vorkommen in Pilzen ist hingegen selten und hauptsächlich bei endophytischen Pilzen beschrieben (Huang *et al.* 2012, Nicoletti & Fiorentino 2015). Für Furano- und Pyranocoumarine verschiedener Klassen wurden unter anderem antimykotische (Song *et al.* 2017), antibakterielle und antivirale Wirkung (Venugopala *et al.* 2013) sowie Zytotoxizität gegen verschiedene Krebszelllinien beschrieben (Magiatis *et al.* 1998, Hung *et al.* 2017). Des Weiteren wurden ebenfalls antiinflammatorische (Kirsch *et al.* 2016) und antioxidative Eigenschaften berichtet (Hung *et al.* 2017).

Ihre Rolle in Pflanzen wird vor allem als Pflanzenabwehrstoff (Phytoalexine) gegen pathogene Pilze und herbivore Insekten gesehen (Hadaček *et al.* 1994, Bougraud *et al.* 2006). Über die bioaktiven Eigenschaften der Pyranocoumarine aus der Monankrin-Reihe ist hingegen wenig bekannt. Hossain *et al.* (1996) berichteten über MAO-hemmende Aktivität im niedrigen mikromolaren-Bereich für Monankarin A ($IC_{50} = 10.7 \mu M$) and Monankarin B ($IC_{50} = 15.5 \mu M$), die für Monankarin E und Monankarin F hingegen deutlich verringert ist ($IC_{50} > 100 \mu M$). Eigene Untersuchungen zeigten keine antibakterielle Aktivität im getesteten Bereich (ca. 1-1000 μM) gegenüber dem gram-positiven *Bacillus subtilis* und dem gram-negativen Bakterium *Pseudomonas agarici*. Zudem wurde ebenfalls eine, wenn auch nur sehr schwach ausgeprägte, zytotoxische Wirkung gegenüber der Zelllinie KB-3-1 festgestellt (Tabelle 4.5.8.).

Tabelle 4.5.8.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität von Verbindung SG8c-114.

Probenbezeichnung	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Pseudomonas agarici</i>		KB-3-1
	IC_{50} [μM]	MIC [μM]	IC_{50} [μM]	MIC [μM]	IC_{50} [μM]
Gentamicin (Referenz)	1	2	12	16	-
SG8c-114	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 425
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	20
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3×10^{-5}
	IC_{50} [mg/l]	MIC [mg/l]	IC_{50} [mg/l]	MIC [mg/l]	IC_{50} [mg/l]
Gentamicin (Referenz)	0.8	1.3	8.8	12	-
SG8c-114	> 500	> 500	> 500	> 500	> 200
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	7
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3×10^{-5}

Über die Funktion der linearen und angularen Pyranocoumarine in Pflanzen ist wenig bekannt, jedoch wird aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit eine ähnliche Relevanz als Phytoalexin gegen Insekten und pathogene Pilze, wie bei den Furanocoumarinen erwartet (Bougraud *et al.* 2006). Ob dies ebenfalls für die strukturell abweichenden Pyranocoumarine der Monankarin-Reihe gilt ist möglich, bleibt aber spekulativ und sollte daher in weiteren Studien untersucht werden.

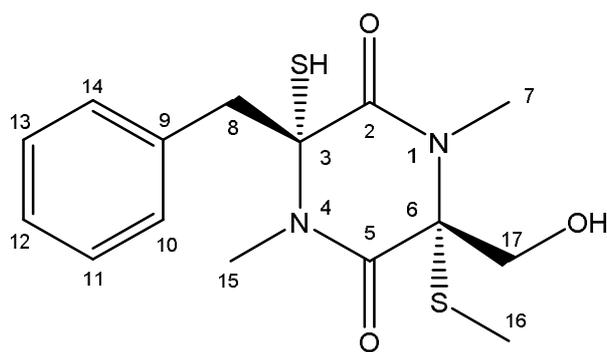
4.5.5.2. ³S-Norgliovictin (SG8c-140)

Abbildung 4.5.34.: Verbindung von Verbindung SG8c-140 (eigene Darstellung).

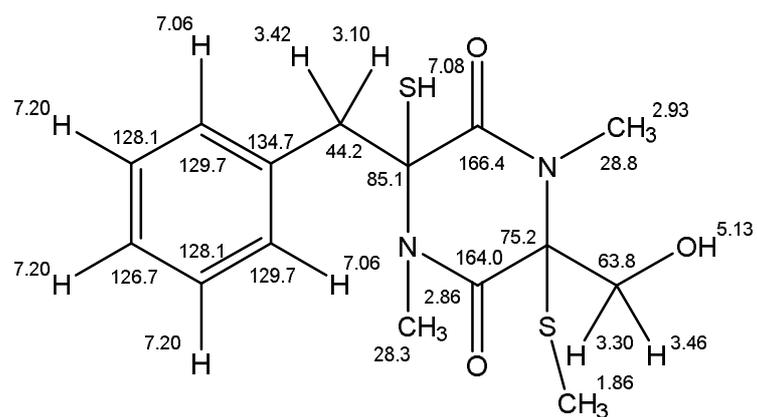
Die Verbindung SG8c-140 (Abbildung 4.5.34.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 2.19$ mg) durch präparative RP-HPLC ($t_R = 24.1$ min), Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) aus der 14. Fraktion (SG8c-E1-14, $m = 5.39$ g) gewonnen.

Die spektralen Eigenschaften der Verbindung (Tabelle 4.5.9.) zeigten im ¹H-NMR sechs Protonen in der Aromatenregion (δ_H [ppm] = 7.24-7.17 (m, 3H, H-11, H-12, H-13), 7.08 (s, 1H, 3-SH), 7.06 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H, H-10 und H-14)) und zwei diastereotope Methylengruppen, von denen eine anhand ihrer chemischen Verschiebung einem Sauerstoffsubstituenten zugeordnet werden kann (δ_H [ppm] = 3.46 (dd, $J = 11.3, 5.4$ Hz, 1H, H-17), 3.30 (dd, $J = 11.3, 6.4$ Hz, 1H, H-17)), sowie drei Methylgruppen (δ_H [ppm] = 2.93 (s, 3H, H-7), 2.86 (s, 3H, H-15), 1.86 (s, 3H, H-16)).

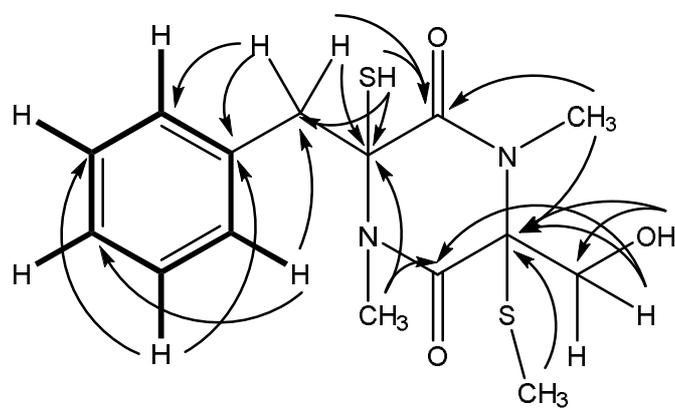
Tabelle 4.5.9.: Zuordnung der ¹H-, ¹³C- und HMBC-Signale von SG8c-140 in DMSO-D₆ und MeOH-D₄.

Position	SG8c-140a (DMSO-D ₆)			SG8c-140 (MeOH-D ₄)		
	δ ¹ H (m, J [Hz])	δ ¹³ C	HMBC (¹ H → ¹³ C)	δ ¹ H (m, J [Hz])	δ ¹³ C	HMBC (¹ H → ¹³ C)
1	-	-	-	-	-	-
2	-	166.4	O=C-N-	-	169.0	-
3	-	85.1	qC (N,S)	-	87.2	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	164.0	O=C-N-	-	166.9	-
6	-	75.2	qC (N,S)	-	76.9	-
7	2.93 (s)	28.8	-N-CH ₃	3.02 (s)	29.6	2, 6
8	3.42 (d, 14.0) 3.10 (d, 14.0)	44.2	-CH ₂	3.47 (d, 13.7) 3.22 (d, 13.7)	45.7	2, 3, 9, 14
9	-	134.7	qC (Ar)	-	135.6	-
10	7.06 (d, 6.6)	129.7	CH (Ar)	7.12 (d, 6.7)	131.2	9, 11
11	7.24 - 7.17 (m)	128.1	CH (Ar)	7.29 - 7.22 (m)	129.5	9, 11
12	7.24 - 7.17 (m)	126.7	CH (Ar)	7.29 - 7.22 (m)	128.3	9, 11
13	7.24 - 7.17 (m)	128.1	CH (Ar)	7.29 - 7.22 (m)	129.5	9, 11
14	7.06 (d, 6.6)	129.7	CH (Ar)	7.12 (d, 6.7)	131.2	8, 10, 12, 14
15	2.86 (s)	28.3	-N-CH ₃	3.05 (s)	29.4	3, 5
16	1.86 (s)	11.1	-S-CH ₃	1.92 (s)	11.6	6
17	3.46 (dd, 11.3, 5.4) 3.30 (dd, 11.3, 6.4)	63.8	-CH ₂ -OH	3.45 (s)	65.3	5, 6
3-SH	7.08 (s)	-	-	-	-	-
17-OH	5.13 (dd, 5.4, 6.4)	-	-	-	-	-

Die Signale dieser Methylgruppen zeigten dabei im HMQC-Spektrum die charakteristische chemische Verschiebung einer *N*-Methylierung (δH [ppm] = 2.93 (s, 3H, H-7), 2.86 (s, 3H, H-15), δC [ppm] = 28.8 (C-7), 28.3 (C-15)) und einer *S*-Methylierung (δH [ppm] = 1.86 (s, 3H, H-16), δC [ppm] = 11.1 (C-16)). Das Vorhandensein der *S*-Methylierung an C-16 wurde zudem durch nur eine beobachtbare Kopplung (3J) zu C-6 in HMBC-Spektrum unterlegt. Die über Stickstoff gebundenen Methylgruppen zeigten im HMBC-Spektrum wiederum 3J -Kopplungen zu jeweils einer Carbonylfunktion (δC [ppm] = 166.4 (C-2), 164.0 (C-5)) und zu den Kohlenstoffen an Position C-6 bzw. C-3. Dadurch ließ sich eine Diketopiperazin als Kernstruktur etablieren. Gemeinsame HMBC-Signale der fünf aromatischen Protonen und die fast doppelte Signalintensität bei zwei Kohlenstoffatomen (δC [ppm] = 126.7 (C-10, C-12), 128.1 (C-11, C-13)) aufgrund von Symmetrie innerhalb der Substruktur, ließ einen monosubstituierten Phenylring vermuten. Weitere HMBC-Korrelationen der diastereotopen Methylengruppe zum Phenylring (δH [ppm] = 3.42 (d, J = 14 Hz, 1H, H-8), 3.10 (J = 14 Hz, 1H, H-8') einerseits und zur Carbonylgruppe an C-2 andererseits ließ diese die Benzylstellung mit Verknüpfung zum C-3 Kohlenstoff am Diketopiperazine einnehmen. Die Position der anderen, hydroxylierten Methyleneinheit (C-17) war durch deren HMBC-Signal zum Carbonylkohlenstoff bei δC = 164.0 ppm (C-5) an C-6 gegeben. Die Bindung des noch fehlenden Substituenten am Diketopiperazin über ein Heteroatom war anhand des fehlenden Signals des tieffeldverschobenen Protons (δH [ppm] = 7.08 (s, 1H, 3-SH) im HMQC-Spektrum und an dessen HMBC-Korrelationen zu C-2, C-3 und C-8, nachweisbar (Abbildung 4.5.35.).



a)



b)

Abbildung 4.5.35.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-140 in $\text{DMSO-}D_6$ (eigene Darstellung).

Die Thiofunktion bestätigte sich hierbei durch die massenspektrometrischen Untersuchungen. Obgleich das Molekül selbst bei der Vergleichsweise milden Ionisierung mittels ESI fragmentierte und andere Ionenpeaks (z.B. $m/z = 277.1179$ ($C_{14}H_{17}N_2O_2S$), $m/z = 231.1126$ ($C_{13}H_{15}N_2O_2$) im Positiv-Modus und im Negativ-Modus ($m/z = 275.1082$, $C_{14}H_{15}N_2O_2S$) deutlich intensivere Signale lieferten, konnte das Pseudomolekularion ($m/z = 339.1085$ $[M-H]^-$, $C_{15}H_{20}N_2O_3S_2-H^+$) mit geringer Signalstärke bei entsprechender Retentionszeit gefunden werden. Die Identität der vorgeschlagenen Struktur konnte zusätzlich über die Isolierung des in der Literatur bekannten dithiomethylierten Derivates (-)-Gliovictin (siehe SG8c-141, Kapitel 4.5.6.1.) bekräftigt werden.

Die Konfiguration an beiden Stereozentren wurden durch einen Vergleich des spezifischen Drehwerts ($\alpha_D^{20} = -5$, $c = 0.36$, MeOH) zur Verbindung (-)-Gliovictin ($[\alpha]_D^{25} = -39$, $c = 0.20$, MeOH, Isaka *et al.* 2005; $[\alpha]_D = -65$, $c = 1.88$ $CHCl_3$, Shin & Fenical 1987) als *R,R*-konfiguriert bestimmt. Unabhängig von der stereochemischen Betrachtung wurden Varianten von Gliovictin (*3R,6R*-Reihe) bzw. Dimethylthio-Hyalodendrin (*3S,6S*-Reihe (Strunz *et al.* 1975) mit einer Demethylierung am Schwefelatom bisher nicht beschrieben. Das vorliegende Derivat (-)³S-Norgliovictin (SG8c-140) stellte daher die bisher nicht beschriebene Struktur dar (*3R,6R*)-3-Benzyl-6-(hydroxymethyl)-3-mercapto-1,4-dimethyl-6-(methylthio)piperazine-2,5-dion) (Maschke *et al.* 2019a). Als Trivialname wurde ³S-Norgliovictin vorgeschlagen.

Sulfatierte 2,5-Diketopiperazine auf Basis von Serin und Phenylalanin (Pita Boente *et al.* 1991) wurden aus einer ganzen Reihe von Pilzen zum Beispiel *Verticillium hemipterigenum* (Isaka *et al.* 2005a) *Asteromyces cruciatus* (Shin & Fenical 1987, Gulder *et al.* 2012), *Helminthosporium victoriae* (Dorn-Arighioni 1973, Syn. *Bipolaris victoriae*, Mycobank 2019), *Penicillium janczewskii* (Smeda-Hirschmann 2005), *P. bilaii* (Savard *et al.* 1994, Syn. *P. bilaiae*, Mycobank 2019), *P. turbatum* (Michel *et al.* 1978), *Hyalodendron sp.* (Strunz *et al.* 1975), *Giocadium virens* (Kirby *et al.* 1988, Syn. *Trichoderma virens*, Mycobank 2019) aus verschiedenen ökologischen Nischen (marin, terrestrisch, endophytisch, entomopathogen, etc.) isoliert. Sie sind dabei klassenübergreifend (Eurotiomycetes, Sordiomycetes, etc.) innerhalb der Schlauchpilze (Ascomycota) weit verbreitet. Insbesondere das strukturell verwandte Gliotoxin ist durch seine Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Krebszelllinien aber auch gegenüber Phagozyten und T-Lymphozyten bekannt (Borthwick 2012). Dieses Toxin gilt zudem als Virulenzfaktor bei der Aspergillose durch *Aspergillus fumigatus* (Hof & Kupfahl 2009).

Die immunmodulatorischen, zytotoxischen, sowie antibakteriellen und antiviralen Aktivitäten der Thiodiketopiperazine sind in erster Linie mit der Disulfid- bzw. Polysulfidbrücke assoziiert (Müllbacher *et al.* 1986, Michel 1988). Die S-methylierten Verbindungen zeigten sich daher entweder als nicht aktiv gegenüber Bakterien-, Plasmodium-, Pilz- und Algenteststämmen (Gulder *et al.* 2012, Isaka *et al.* 2005) oder sind im Zytotoxizitätstest gegenüber verschiedenen Krebszelllinien nur moderat bis wenig aktiv (IC₅₀: z.B. 19 μ m, NCI-H187 (Isaka *et al.*

2005); 113 μM , MCF7 (Zhang *et al.* 2009); 475 μM , AGS, 681 μM , MRC-5 Fibroblasten (Smeda-Hirschmann 2005), wie sich am Beispiel von (-)-Gliovictin (3*R*,5*R*-Reihe) zeigte.

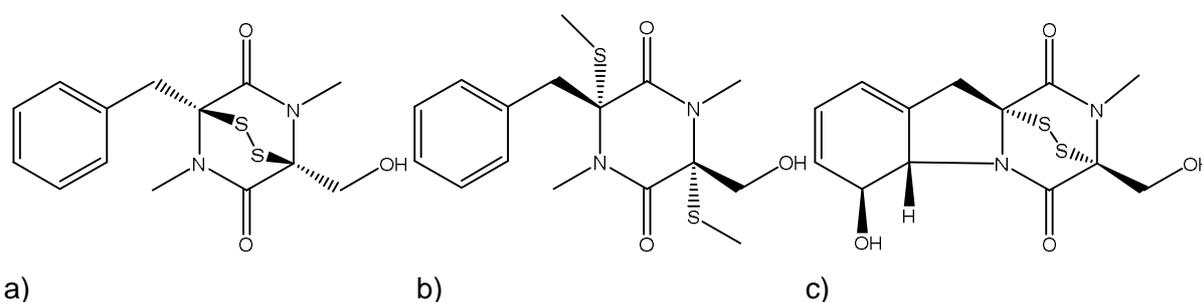


Abbildung 4.5.36.: Bekannte, strukturell verwandte Vertreter der Verbindung SG8c-140: a) (+)-Hyalodendrin (3*S*,6*S*), b) (-)-Gliovictin (3*R*,6*R*), c) Gliotoxin (eigene Darstellung).

Die stark verringerte antibakterielle und zytotoxische Aktivität konnte auch in eigenen Untersuchungen gegenüber *B. subtilis*, *P. agarici* und der Zervix-Karzinom-Zelllinie KB-3-1 festgestellt werden (Tabelle 4.5.10.) und ist damit in Übereinstimmung mit den Erwartungen aus der Literatur.

Tabelle 4.5.10.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität von ³S-Norgliovictin (SG8c-140).

Probenbezeichnung	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Pseudomonas agarici</i>		KB-3-1
	IC ₅₀ [μM]	MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]	MIC [μM]	IC ₅₀ [μM]
Gentamicin (Referenz)	1	2	12	16	-
SG8c-140	> 1469	> 1469	634	1446	> 587
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	20
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3×10^{-5}
	IC ₅₀ [mg/l]	MIC [mg/l]	IC ₅₀ [mg/l]	MIC [mg/l]	IC ₅₀ [mg/l]
Gentamicin (Referenz)	0.8	1.3	8.8	12	-
SG8c-140	> 500	> 500	216	492	> 200
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	7
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3×10^{-5}

Unklar bleiben hingegen die biologische Funktion bzw. der generierte Vorteil aus der Produktion dieses Metaboliten für den Pilz. Aufgrund der relativ geringen Menge an isoliertem Material könnte es sich hierbei eventuell um ein Abbauprodukt von (-)-Gliovictin (SG8c-141) oder des biologisch aktivieren Disulfidbrückenderivats (-)-Hyalodendrin (3*R*,5*R*-Reihe) handeln, welches allerdings nicht isoliert wurde.

4.5.5.3. Tremachroman A (SG8c-143)

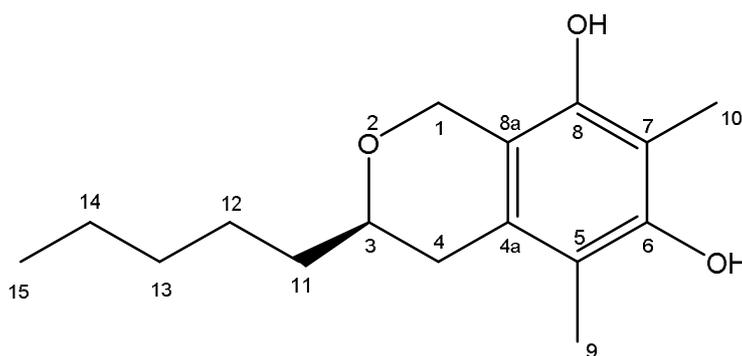


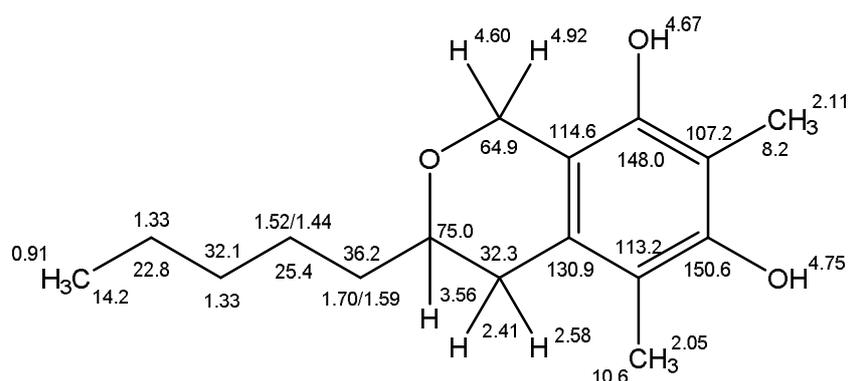
Abbildung 4.5.37.: Struktur von Verbindung SG8c-143 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-143 (Abbildung 4.5.37.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 31.1$ mg) aus Fraktion 14 (SG8c-E1-14, $m = 5.39$ g) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 45.0$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) und Größenausschlusschromatographie (100, % v, MeOH) mittels Sephadex LH-20 gewonnen. LC-MS-Messungen ergaben als Pseudomolekularionenpeak $m/z = 265.2140$, $[M+H]$ bei positiver Ionisierung und $m/z = 263.2105$, $[M-H]$ bei negativer Ionisierung. Durch das ^1H -NMR-Spektrum waren eine aliphatische und zwei aromatische Methylgruppen, sowie fünf Protonen mit Sauerstoffverbindung und acht aliphatische Protonen, welche das Vorhandensein einer Pentylkette anzeigten, ersichtlich. Das ^{13}C -NMR zeigte insgesamt 16 Kohlenstoffatome, von den sechs sp^2 -hybridisiert waren. Zwei davon waren, anhand der Tieffeldverschiebung (δC [ppm] = 150.6 (C-6), 148.0 (C-8)), wiederum mit Heteroatomen verbunden, was das Vorkommen eines Phenylrings erwartet ließ (Tabelle 4.5.11.).

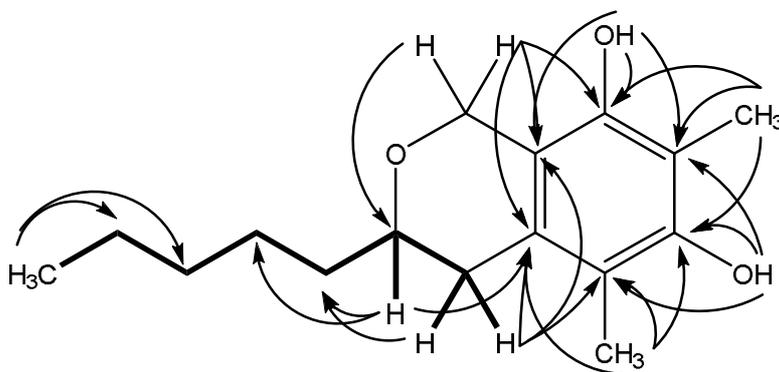
Tabelle 4.5.11.: Zuordnung der ^1H -, ^{13}C - und HMBC-Signalen von SG8c-143 in CDCl_3 .

Position	SG8c-143 (CDCl_3)		
	δ ^1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)
1	4.92 (d, 14.8), 4.60 (d, 14.8)	64.9	-O-CH ₂ -Ar 3, 6, 8, 4, 4a, 7, 8, 8a
2	-	-	-O-
3	3.56 (dddd 10.7, 8.3, 4.9, 3.4)	75.0	-O-CH 1, 4a, 11, 12
4	2.58 (dd, 16.3, 2.8), 2.41 (dd, 16.3, 10.7)	32.3	-CH ₂ - 3, 4a, 5, 6, 8a, 11,
4a	-	130.9	qC (Ar) -
5	-	113.2	qC (Ar) -
6	-	150.6	qC-OH (Ar) -
7	-	107.2	qC (Ar) -
8	-	148.0	qC-OH (Ar) -
8a	-	114.6	qC (Ar) -
9	2.05 (s)	10.6	-CH ₃ (Ar) 4a, 5, 6, 7, 8
10	2.11 (s)	8.2	-CH ₃ (Ar) 6, 7, 8
11	1.70 (m), 1.59 (m)	36.2	-CH ₂ - 3, 4, 12, 13
12	1.52 (m), 1.44 (m)	25.4	-CH ₂ - 3, 11, 13, 14
13	1.38 - 1.29 (m)	32.1	-CH ₂ - 12, 13, 14
14	1.38 - 1.29 (m)	22.8	-CH ₂ - 12, 13, 14
15	0.91 (t, 6.9)	14.2	-CH ₃ 13, 14
6-OH	4.75 (s)	-	- 5, 6, 7
8-OH	4.67 (s)	-	- 7, 8, 8a

Des Weiteren waren zwei oxygenierte sp^3 -Kohlenstoffatome offensichtlich (δC [ppm] = 64.9 (C-1), 75.0 (C-3)). Anhand von HMQC- und COSY-Korrelationen bestätigte sich die bereits vermutete Pentylkette, welche darüber hinaus mit einem Oxymethin (δH [ppm] = 3.56 (dddd, $J = 10.7, 8.3, 4.9, 3.4$ Hz, 1H, H-3), δC [ppm] = 75.0 (C-3)) und diastereotopen Methylenprotonen verknüpft war (δH [ppm] = 2.58 (dd $J = 16.9, 2.8$ Hz, 1H, H-4), 2.41 (dd, $J = 16.9, 10.7$ Hz, 1H, H-4'), δC [ppm] = 32.2 (C-4)). Zudem war eine sauerstoffverbrückte, diastereotopie Methyleneinheit (δH [ppm] = 4.92 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-1), 4.60 (d, $J = 14.8$ Hz, 1H, H-1'), δC [ppm] = 64.9 (C-1)) und die Abwesenden Signale von zwei Wasserstoffen (δH [ppm] = 4.75 (s, 1H, 6-OH), 4.67 (s, 1H, 8-OH)) im HMQC-Spektrum auffällig, was auf zwei Hydroxylgruppen schließen ließ. Das Substitutionsmuster am Phenylring ließ sich zweifelsfrei durch die HMBC-Korrelationen aufklären (Abbildung 4.5.38.). Die 3J -Kopplungen der aromatischen Methylgruppe (δH [ppm] = 2.11 (s, 3H, H-10), δC [ppm] = 8.2 (C-10)) zu beiden ins Tieffeld-verschobenen sp^2 -Kohlenstoffen (C-6, C-8), sowie das Signal der anderen aromatischen Methylgruppe (δH [ppm] = 2.05 (s, 3H, H-9), δC [ppm] = 10.6 (C-9)) zum Kohlenstoffatom an C-6 konnten beobachtet werden. Dies führte zu einer *diortho*-Positionierung der Methylgruppe an C-7, bezogen auf die beiden tieffeldverschobenen Kohlenstoffe, und einer *meta*-Position in Bezug zur Methylgruppe an C-5. Diese Methylgruppe (C-9) hatte Korrelationen zum Kohlenstoff C-4a ($\delta C = 130.9$ ppm), welche wiederum ebenfalls beim Oxymethin (C-3) und den diastereotopen Methylenprotonen (C-4) vorhanden war. Dies führte zu einer *ortho*-Positionierung der Methylgruppe zur aliphatischen Kettenanbindung an C-4a. Die bereits erwähnten diastereotopen Oxymethylenprotonen zeigten Kopplungen zum ins Tieffeld-verschobenen Kohlenstoffatom C-8 und zum Kohlenstoff der Alkylketten-Anbindung (C-4a). Dies legte die übrig geblieben Position am Phenylring (C-8a) fest. Zusätzlich war eine weitere Korrelation zum Oxymethin sichtbar. Dies ließ eine Etherverbrückung vermuten und führte zu einem Isochroman-Grundgerüst. Die Verbindung von C-1 zu C-3 über einen Ether statt des Vorhandenseins zweier Hydroxylgruppen wurde zusätzlich über die Summenformel ($C_{16}H_{24}O_3$), abgeleitet aus der LC-MS-Messung, verdeutlicht and bestätigte zudem das Vorhandensein von Hydroxylgruppen an den tieffeldverschobenen sp^2 -Kohlenstoffen C-6 und C-8. Die so aufgeklärte Struktur konnte durch Datenbank- (SciFinder) und Literaturrecherche keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden und stellte somit ein neues Isochromanderivat ((*R*)-6,8-Dihydroxy-5,7-dimethyl-3-pentylisochroman) dar. Der Trivialname Tremachroman A wurde für Verbindung SG8c-143 vorgeschlagen.



a)



b)

Abbildung 4.5.38.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-143 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

Die Konfiguration an C-8 wurde durch einen Vergleich des spezifischen Drehwertes ($\alpha_{\text{D}}^{20} = -65.3$, $c = 1.0$, MeOH) mit den strukturell verwandten Verbindungen Pseudoanguillosporin A ($\alpha_{\text{D}}^{20} = -72.5$, $c = 0.65$, MeOH), welches an Position C-7 demethyliert (Kock *et al.* 2009) und Pseudoanguillosporin C ($\alpha_{\text{D}}^{23} = -116$, $c = 0.065$, MeOH), welches carboxyliert ist (Rusman *et al.* 2015), als *R*-konfiguriert bestimmt. Beide Pseudoanguillosporine weisen zusätzlich zur isolierten Verbindung eine verlängerte aliphatische Kette (Heptyl vs. Pentyl) auf, verfügen aber ebenfalls über einen negativen Drehwert (Abbildung 4.5.39.). Annulohypoxyloman A, ein weiteres Isochromanderviat (Demethyliert an C-5 und C-7, Methyl statt Pentyl an C-3), weist ebenfalls einen negativen Drehwert ($\alpha_{\text{D}}^{25} = -72.6$, $c = 0.1$, MeOH) bei *R*-Konfiguration auf (Li *et al.* 2015). Dies führte zur Vermutung, dass die Konfiguration am einzigen Stereozentrum identisch zur Verbindung SG8c-143 war. Ein weiteres Isochromanderivat ($\alpha_{\text{D}}^{20} = +103$, $c = 0.36$, CH_3CN) ohne Alkykette (Methyl statt Pentyl an C-3) wurde aus dem Pappelpathogen *Stachybotrys cylindrospora*, reklassifiziert als *S. chartum* (Li 2007), berichtet, obwohl hierbei keine absolute Konfiguration angegeben wurde (Ayer & Miao 1993). Verschieden glykosylierte Varianten (Glc, Rha), mit Namen Colletobredin A-D, allerdings *S*-konfiguriert, sind vom endophytischen Pilz *Colletotrichum aotearoa* beschrieben worden (Hsaio *et al.* 2015).

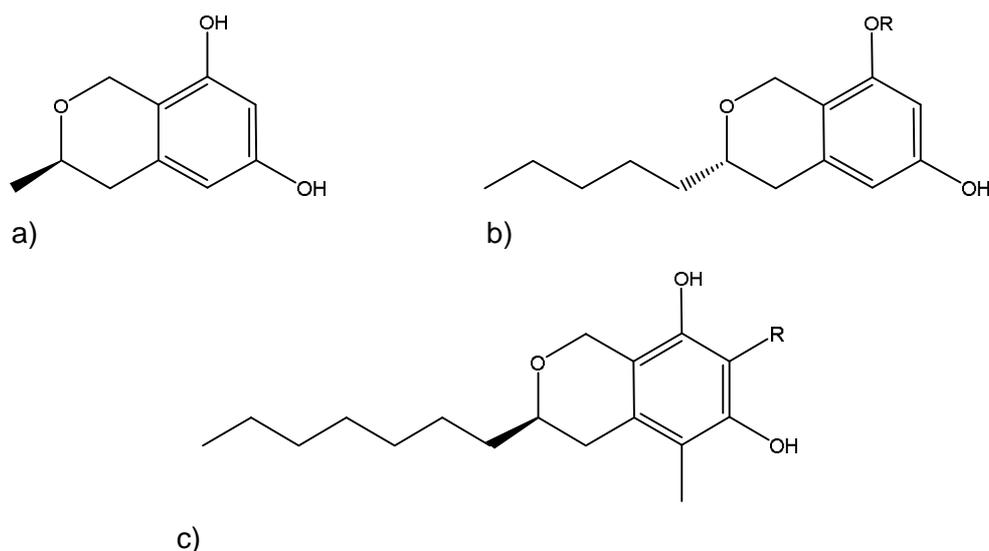


Abbildung 4.5.39.: Isochroman Vergleichsverbindungen: a) Annulohypoxyloman, b) Colletobredin A (R = α Rha), c) Pseudoanuillosporin A (R = H), B (R = COOH) (eigene Darstellung).

In biologischen Tests an Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen zeigte sich Colletobredin A als schwacher ($IC_{50} = 182 \mu M$) NO-Radikal-Inhibitor (Hsiao *et al.* 2015). Annulohypoxyloman A, isoliert aus dem Endophyten *Annulohypoxylon truncatum*, zeigte hingegen keine Wirkung in antiinflammatorischen und Zytotoxizitätstests (Li *et al.* 2015). Pseudoanguillosporin A wurde ebenfalls aus einer endophytischen *Pseudoanguillospora* sp. Pilzspezies, Pseudoanguillosporin C hingegen aus einem Pilz der Gattung *Cadophora*, isoliert aus einer Eisenmine, gewonnen. Beide Verbindungen weisen antimykotische ($MIC = 35 \mu g/ml$, *Cryptococcus neoformans*) Pseudoanguillosporin A zusätzlich antibakterielle und antialgale Eigenschaften auf (Kock *et al.* 2009, Rusman *et al.* 2015). Diese beschriebenen biologischen Aktivitäten ließen für das neu isolierte und strukturell etablierte Isochromanderivat ebenfalls vergleichbare antimykotische Aktivitäten und regulatorische Funktionen als Allelochemikalie vermuten. Die antibakterielle Wirkung gegen die ausgewählten Teststämme im Vergleich zum Referenzantibiotikum war hingegen nur schwach ausgeprägt (Tabelle 4.5.12.). Gleiches gilt für die Zytotoxizität die mit einem IC_{50} von $540 \mu M$ sehr schwach gegenüber der KB-3-1 Zelllinie ausgeprägt ist.

Tabelle 4.5.12: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität des Isochromans SG8c-143a.

Probenbezeichnung	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Pseudomonas agarici</i>		KB-3-1
	IC_{50} [μM]	MIC [μM]	IC_{50} [μM]	MIC [μM]	IC_{50} [μM]
Gentamicin (Referenz)	1	2	12	16	-
SG8c-143	267	366	244	257	540
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	20
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3×10^{-5}
	IC_{50} [mg/l]	MIC [mg/l]	IC_{50} [mg/l]	MIC [mg/l]	IC_{50} [mg/l]
Gentamicin (Referenz)	0.8	1.3	8.8	12	-
SG8c-143	71	97	65	68	143
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	7
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3×10^{-5}

4.5.5.4. Tremaquin A (SG8c-146a)

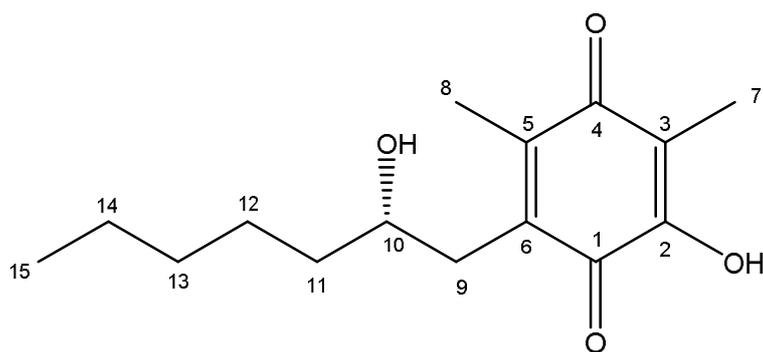


Abbildung 4.5.40.: Struktur von Verbindung SG8c-146a (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-146 (Abbildung 4.5.40.) wurde als gelber Feststoff ($m = 5.85$ mg) aus Fraktion 12 (SG8c-E1-12, $m = 1.70$ g) nach NP-Chromatographie (97.5/2/0.5, % v/v/v, DCM/MeOH/AcOH) und Sephadex LH-20 SEC (100, % v, MeOH) isoliert. Die Elementarzusammensetzung ($C_{15}H_{22}O_4$) konnte mit Hilfe von Massenanalyse im Positiv-Modus ($m/z = 249.1545$, $[M-H_2O+H]^+$) und im Negativ-Modus ($m/z = 265.2377$, $[M-H]^-$) bestätigt werden. Im 1H -NMR-Spektrum, war wie bei der Verbindung SG8c-143 eine aliphatische (δH [ppm] = 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-15)) und zwei aromatische Methyleinheit (δH [ppm] = 2.10 (s, 3H, H-8), 1.94 (s, 3H, H-7)), sowie eine Pentylkette beobachtbar. Die Verknüpfung und Zuordnung der aliphatischen Kette wurde mittels COSY- und HMBC-Spektren vorgenommen. Im ^{13}C -NMR waren eine Oxymethingruppe (δC [ppm] = 71.6 (C-9)) und ebenfalls sechs sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome sichtbar (Tabelle 4.5.13.).

Tabelle 4.5.13.: Zuordnung der 1H -, ^{13}C - und HMBC-Signalen von SG8c-146a.

Position	SG8c-146a (CDCl ₃)		
	δ 1H (m, J [Hz])	δ ^{13}C	HMBC ($^1H \rightarrow ^{13}C$)
1	-	184.2	C=O (Ar)
2	-	150.8	qC-OH (Ar)
3	-	117.3	qC (Ar)
4	-	187.8	C=O (Ar)
5	-	145.3	qC (Ar)
6	-	137.4	qC (Ar)
7	1.94 (s)	8.4	-CH ₃ (Ar)
8	2.10 (s)	13.4	-CH ₃ (Ar)
9	2.69 (dd, 13.5, 4.3), 2.64 (dd, 13.5, 8.5)	34.3	-CH ₂ (Ar)
10	3.74 (m)	71.6	CH-OH
11	1.52 (m)	38.3	-CH ₂ -
12	1.46 (m), 1.36 (m)	25.5	-CH ₂ -
13	1.34 - 1.28 (m)	31.9	-CH ₂ -
14	1.34 - 1.28 (m)	22.8	-CH ₂ -
15	0.90 (t, 6.9)	14.2	-CH ₃
2-OH	6.99 (s)	-	-

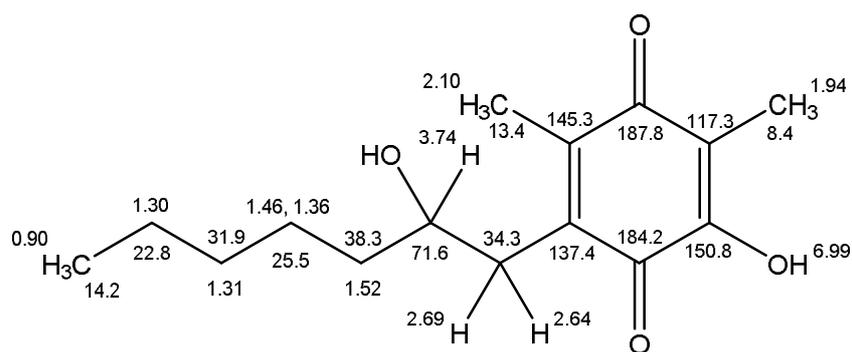
Dies ließ ebenfalls wieder auf einen Phenylring schließen. Im Gegensatz zu Verbindung SG8c-143 waren hier allerdings zwei der sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffe stark ins Tieffeld

verschoben (δC [ppm] = 184.2 (C-1) 187.8 (C-4)) und insgesamt 15 statt 16 Signale sichtbar. Kohlenstoffe mit Verschiebungen zwischen etwa 175-190 ppm sind charakteristisch für Carbonyle in konjugierten Systemen, wie zum Beispiel bei Antrachinonen (Arnone *et al.* 1977) und Flavonen (Yoon *et al.* 2011). Dies ließ zusammen mit der Anzahl der sp^2 -Kohlenstoffe auf ein unsymmetrisch substituiertes Chinon als Grundgerüst schließen. HMBC-Korrelationen liefern das Substitutionsmuster am Chinonring (Abbildung 4.5.40b.). Beide aromatischen Methyleinheiten (δC [ppm] = 8.4 (C-7), 13.4 (C-8)) zeigten dabei ein starkes Signal zur selben Carbonylgruppe (δC [ppm] = 187.8 C-4), was auf eine *meta*-Stellung zueinander hindeutete. Gleichzeitig klärte dies die relative Position der Carbonylgruppen in *para*-Positionierung zueinander (1,4-Benzochinon). Die Methylgruppe an C-3 (δC = 117.3 ppm) wies dabei eine $^3J_{\text{C,H}}$ -Korrelation zum Tieffeld-verschobenen Kohlenstoff (δC = 150.8 ppm) an C-2 auf. Zusammen mit der Summenformel ergab sich an dieser Position somit eine Hydroxygruppe. Deren Position und Identität wurde zusätzlich durch HMBC-Signale des Protons bei δH = 6.99 ppm (2-OH) zu C-2 und C-3 unterlegt. Der noch fehlende Substituend an C-6 (δC = 137.4 ppm) wurde durch übereinstimmende HMBC-Signale ($^2J_{\text{C,H}}$ und $^3J_{\text{C,H}}$ Kopplung) der Methylgruppe an C-5 (δC = 145.3 ppm) und der diastereotopen Methyleinheit (δH [ppm] = 2.69 (dd, J = 13.5, 4.3 Hz, 1H, H-9), 2.64 (dd, J = 13.5, 8.5 Hz, 1H, H-9') der aliphatischen Kette zu C-5 und C-6 bestätigt. Die räumliche Nähe der Methyleinheit an C-5 zur aliphatischen Kette wurde ebenfalls durch NOESY-Kreuzsignale zu H-9 und H-10 unterstützt.

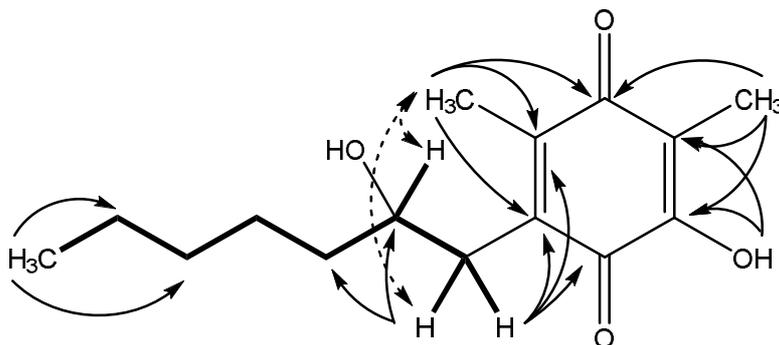
Aufgrund der fehlenden $^3J_{\text{C,H}}$ -Signalintensität des Oxymethin-Protons zu C-6 und der zweifelsfreien Unterscheidbarkeit zwischen $^2J_{\text{C,H}}$ und $^3J_{\text{C,H}}$ Kopplung von H-8 und H-9 zu C-5 bzw. C-6 im HMBC-Spektrum kann die Zuordnung der chemischen Verschiebung an C-6 und C-5 vertauscht sein. Diese chemische Verschiebung, wie in Abbildung 4.5.41a. dargestellt, wurde aufgrund der relativen HMBC-Signalintensität zwischen 2J - und 3J -Kopplungen ($^2J > ^3J$) der anderen Methylgruppen an C-3 zugeordnet und ebenfalls für die Methylgruppe an C-5 angenommen.

Die stark unterschiedliche chemische Verschiebung an den beiden Methylgruppenanknüpfungen C-3 (δC = 117.3 ppm) und C-5 (δC = 145.3 ppm bzw. 137.4 ppm) ließ sich durch den abschirmenden Effekt der Hydroxygruppe in α -Position zum C-3 erklären.

Die Bestimmung der Stereochemie an Position C-10 wurde durch einen Vergleich zur strukturell verwandten Struktur (+)-Anserinone B, welche mit positivem spezifischem Drehwert ($\alpha_{\text{D}}^{25} = +41.5$, $c = 0.1$, MeOH) in *R*-Konfiguration gemessen wurde, vorgenommen (Whisenant *et al.* 2016, Wang *et al.* 2004, Gautschi *et al.* 2004b). Da die Verbindung SG8c-146a mit negativem Drehwinkel ($\alpha_{\text{D}}^{20} = -57.9$, $c = 0.975$, MeOH) gemessen wurde, konnte das Stereozentrum als *S*-konfiguriert festgelegt werden.



a)



b)

Abbildung 4.5.41.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-146a in CDCl_3 (eigene Darstellung).

Zu dieser aus den Spektren abgeleiteten Struktur konnte keine literaturbekannte Verbindung gefunden werden. Demnach stellt das identifizierte (S)-2-Hydroxy-6-(2-hydroxyheptyl)-3,5-dimethylcyclohexa-2,5-dien-1,4-dion ein neue Benzochinonverbindung dar. Der Trivialname Tremaquin A wurde für die Verbindung vorgeschlagen (Maschke *et al.* 2019a).

Die strukturell Vergleichbare Substanz (+)-Anserinone B wurde in biologischen Tests als antimykotisch gegen *Sordaria fimicola* und *Ascobolus furfuraceus* und antibakteriell gegen *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* (Wang *et al.* 1997), sowie moderat zytotoxisch gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien beschrieben (z.B. IC₅₀ = 21 µM (NCT 60), IC₅₀ = 17 µM (MDA-MB-435), Wang *et al.* 1997, Gautschi *et al.* 2004a). Im Vergleich dazu ergaben sich in eigenen Testreihen für SG8c-146a ebenfalls moderate antibakterielle Aktivitäten gegen *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas agarici* und im Vergleich zu den Referenzen (+)-Grisoefulvin und Cryptophycin 52 relativ schwach ausgeprägte zytotoxische Aktivität gegenüber der Zervix-Karzinom Zelllinie KB-3-1 (Tabelle 4.5.14.).

Tabelle 4.5.14.: Antibakterielle und zytotoxische Aktivität von des Benzochinons SG8c-146a.

Probenbezeichnung	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Pseudomonas agarici</i>		KB-3-1
	IC ₅₀ [µM]	MIC [µM]	IC ₅₀ [µM]	MIC [µM]	IC ₅₀ [µM]
Gentamicin (Referenz)	1	2	12	16	-
SG8c-146a	70	107	121	168	150
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	20
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	1.3 x 10 ⁻⁵
	IC ₅₀ [mg/l]	MIC [mg/l]	IC ₅₀ [mg/l]	MIC [mg/l]	IC ₅₀ [mg/l]
Gentamicin (Referenz)	0.8	1.3	8.8	12	-
SG8c-146a	19	28	32	45	40
(+)-Grisoefulvin (Referenz)	-	-	-	-	7
Cryptophycin 52 (Referenz)	-	-	-	-	8.7 x 10 ⁻⁶

4.5.6. Weitere aus Stamm SG8c isolierte Verbindungen

4.5.6.1.: (-)-Gliovictin (SG8c-141)

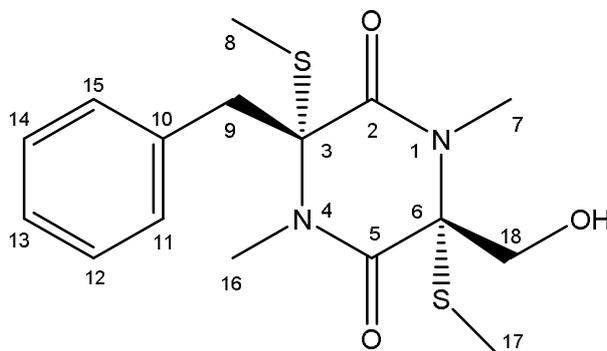


Abbildung 4.5.42.: Struktur von Verbindung SG8c-141 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-141 (Abbildung 4.5.42.) wurde als farbloser Feststoff ($m = 7.33$ mg) aus Hauptfraktion 14 (SG8c-E1-14, $m = 5.39$ g) mit präparativer RP-HPLC ($t_R = 33.3$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) isoliert und zeigte eine ähnliche Signalverteilung im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum, wie die weiter vorn besprochenen Verbindung SG8c-140. Die Spektren unterschieden sich lediglich durch Vorhandensein einer weiteren Methylgruppe (δ_{H} [ppm] = 2.24 (s, 3H, H-8)) und der Abwesenheit eines tieffeldverschobenen Protons. Die zusätzliche Methylgruppe (δ_{C} [ppm] = 13.9 (C-8)) mit charakteristischer Verschiebung einer S-Methylierung wurde durch das $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigt. Ihre Position zeigt sich in Analogie zur anderen S-Methylierung mit einem einzelnen HMBC-Signal zur Position C-3 ($\delta_{\text{C}} = 71.4$ ppm), statt der in SG8c-140 beobachteten Thiofunktion (Abbildung 4.5.43a.). Durch die HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.5.43b.) konnte gezeigt werden, dass die vorliegende Verbindung in allen anderen Positionen identisch zu SG8c-140 ist. Die absolute Konfiguration konnte durch einen Vergleich des Drehwertes ($\alpha_{\text{D}}^{20} = -47.9$, $c = 1.0$, CHCl_3) mit der Literatur ($\alpha_{\text{D}}^{24} = -43$, $c = 0.235$, CHCl_3 , Isaka *et al.* 2005) zu 3*R*,5*R*-konfiguriert bestimmt werden. Besagte Verbindung konnte damit als (-)-Gliovictin ((3*R*, 6*R*)-3-Benzyl-6-(hydroxymethyl)-1,4-dimethyl-3,6-bis(methylthio)piperazin-2,5-dion) identifiziert werden. Trotz dem die S-methylierten Thiodiketopiperazine in antimikrobiellen, antiviralen und zytotoxischen Tests als inaktiv oder deutlich weniger aktiv als di- oder polysulfidverbrückte Derivate beschrieben worden sind (Michel *et al.* 1988, Müllbacher *et al.*), zeigte (-)-Gliovictin dennoch schwache bis moderate Aktivität gegenüber verschiedenen Krebszelllinien (z.B. $\text{IC}_{50} = 19$ μM , NCI-H187 (Isaka *et al.* 2005); $\text{IC}_{50} = 113$ μM , MCF7 (Zhang *et al.* 2009); $\text{IC}_{50} = 475$ μM , AGS, $\text{IC}_{50} = 681$ μM , MRC-5 Fibroblasten (Smeda-Hirschmann 2005). Interessanterweise wurde trotz der beschriebenen Inaktivität in antimikrobiellen Tests gegenüber *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* (Bakterien), *Microbotryum violaceum*, *Eurotium repens*, *Mycothypha microsporum* (Pilze), *Chlorella fusca* (Alge) (Gulder *et al.* 2012) eine moderate Aktivität gegenüber *Mycobacterium tuberculosis* (MIC = 71 μM) festgestellt (Isaka *et al.* 2005).

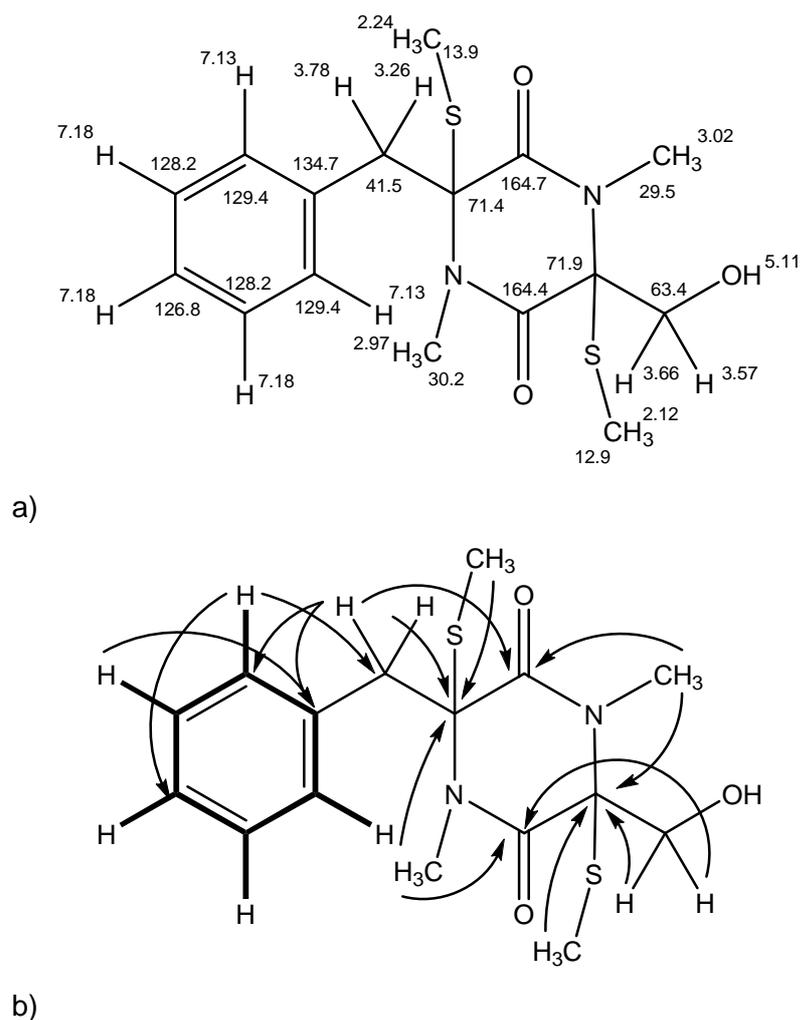


Abbildung 4.5.42.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-141 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).

Daten zur Aktivität des ebenfalls in der Literatur beschriebenen Enantiomers (+)-Bisdethiodi(methylthio)-hyalodendrin (3S,5S-Reihe), isoliert aus einer *Hyalodendron* sp., (Strunz *et al.* 1974) liegen leider nicht vor. Über die Funktion von (-)-Gliovictin für den Pilzorganismus kann wie beim ^3S -Norglivictin (SG8c-140) nur spekuliert werden. Obwohl entsprechende Verbindung nicht isoliert wurde, handelt es sich eventuell um ein Abbauprodukt des deutlich stärker antibiotisch wirksamen Epidithiodiketopierazines (-)-Hyalodendrin (3R,5R-Reihe)" (z.B. MIC = 0.6 μM , *Pseudomonas aeruginosa*; MIC = 6 μM *Staphylococcus aureus*, Michel *et al.* 1988) oder des ebenfalls antibiotisch wirksamen (+)-Hyalodendrins (3S,5S-Reihe) (Strunz *et al.* 1973, Stillwell *et al.* 1974, Strunz *et al.* 1975).

4.5.6.2. Riparin C (SG8c-126a)

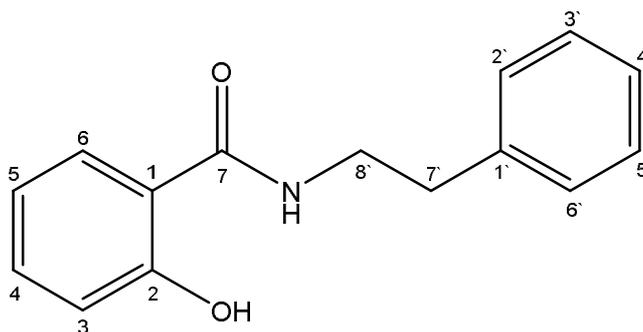


Abbildung 4.5.43.: Struktur von SG8c-126a (eigene Darstellung).

Das Molekül SG8c-126a (Abbildung 4.5.43.) wurde als brauner, amorpher Feststoff ($m = 3.5$ mg) aus achten Hauptfraktion (SG8c-E1-8, $m = 1.88$ g) nach Säulenchromatographie (94/5/1, % v/v/v, PE/EtOAc/AcOH, $R_f \sim 0.16$) und SEC (100, % v, MeOH) gewonnen. Das $^1\text{H-NMR}$ zeigte trotz leichter Verunreinigungen deutlich mehrere Signalgruppen im aromatischen Bereich (δH [ppm] = 7.83 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H, H-6), 7.33-7.26 (m, 5H, H-4, H-2', H-3', H-5', H-6'), 7.25 (m, (d teilw. CDCl_3 überlagert), 1H, H-4'), 6.67-6.61 (m, 2H, H-3, H-5)), sowie ein verbreitertes Signal (δH [ppm] = 5.69 (s breit, 2H, 2-OH und NH) und zwei koppelnde Methylengruppen (δH [ppm] = 4.49 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-8'), 3.07 (t, $J = 7.0$ Hz, 2H, H-7')). Breitband entkoppeltes $^{13}\text{C-NMR}$ offenbarte, dass Vorhandensein von 13 Signalen insgesamt. Davon sind neun Signale mit chemischen Verschiebungen zwischen 110-140 ppm enthalten, was somit auf zwei aromatische Ringe hindeutete. Zwei der Signale von nicht quaternären C-Atomen wiesen nahezu die doppelte Signalintensität (δC [ppm] = 129.1 (C-2' und C-6'), 128.7 (C-3' und C-5')) auf. Dies lieferte einen Hinweis auf einen Phenylring mit Symmetrieebene. Die Signale bei $\delta\text{C} = 168.2$ ppm (C-7) und $\delta\text{C} = 150.6$ ppm (C-2) deuteten ferner auf eine Sauerstofffunktionalisierung mit einer Carbonyl- (Carbonsäure-, Ester-, oder Amidfunktion) und einer Hydroxy- bzw. Ethergruppe an einem sp^2 -hybridisierten Kohlenstoff hin. COSY-, HMQC- und HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.5.44b.) halfen in der Identifizierung der zwei verbunden Substrukturen Ethylphenyl und 2-Hydroxybenzyl. Die massenspektrometrische Analyse ($m/z = 242.1232$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) lieferte die Summenformel ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$) und zeigte damit allerdings, dass die Verbindung der Substrukturen nicht, wie erst angenommen, über eine Ester sondern über ein Amid realisiert war. In Abbildung 4.5.44a. wurde die Zuordnung der ^1H - und ^{13}C -Signale visualisiert.

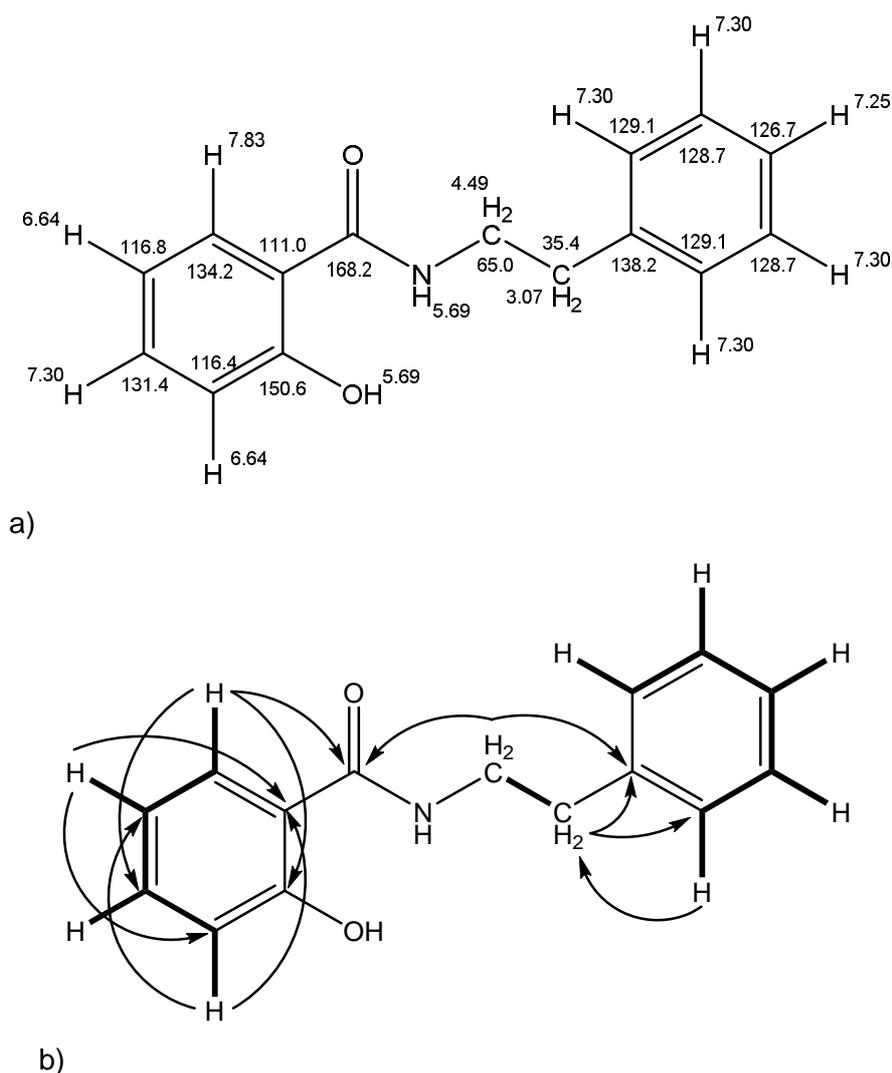


Abbildung 4.5.44.: a) Chemische Verschiebung von ¹H- und ¹³C-Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-126a in CDCl₃ (eigene Darstellung).

Das vorliegende Salicylamid wurde als Riparin C identifiziert. Verbindungen der Riparin-Serie (Riparin I-III (Tyraminderivate) wurden bisher natürlich aus unreifen Früchten der im Amazonasgebiet beheimateten Medizinalpflanze *Aniba riparia* isoliert (Barbosa-Filiho *et al.* 1987, Silva *et al.* 2015). Des Weiteren wurden synthetische Riparinderivate (Riparin A-F) beschrieben (Nunes *et al.* 2014, Araújo *et al.* 2016). Auf der einen Seite waren in den letzten Jahren Riparinderivate im Fokus verschiedener Studien, in welchen interessante pharmakologischen Eigenschaften zum Tragen kamen, wie beispielsweise antimikrobielle (De Souza *et al.* 2007, Catão *et al.* 2010), antiparasitäre (Araújo *et al.* 2016, Mafud *et al.* 2018), antidepressive (Teixeira *et al.* 2013), anxiolytische (De Souza *et al.* 2005, De Souza *et al.* 2007), antiinflammatorische (De Carvalho *et al.* 2014, Santiago *et al.* 2015, Silva *et al.* 2015, antioxidative und zytotoxische (Nunes *et al.* 2014). Auf der anderen Seite ist speziell Riparin C (N-Phenethyl-salicylamid) bereits seit über 50 Jahren als Syntheseprodukt bekannt und teilweise pharmakologisch charakterisiert (z.B. Way *et al.* 1953, Davidova *et al.* 1965). Interes-

santerweise werden die Phenylethyl- (1-10 t/a) und Benzyl-salicylester (> 1000 t/a) im großen Maßstab weltweit als Duft und Aromastoffe in der Nahrungsmittel- und Kosmetikindustrie eingesetzt. Sie werden von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) als "sicher" bewertet (GRAS - Generally Recognized As Safe) (Belsito *et al.* 2007) aber aufgrund der weit verbreiteten Anwendung und dem Potenzial als endokriner Disruptor eben auch als Regulierungswürdig eingestuft (Zhang *et al.* 2012b).

Die ökologische Funktion von Riparin C, über eine mögliche Pathogenabwehr durch den antimikrobiellen Effekt hinaus, ist unbekannt. Nach bisherigem Kenntnisstand ist allerdings hervorzuheben, dass dies der erste Bericht über Riparin C ist, welches aus einer natürlichen Quelle im Allgemeinen und im speziellen aus einem Pilz isoliert wurde.

4.5.6.3. SG8c-133

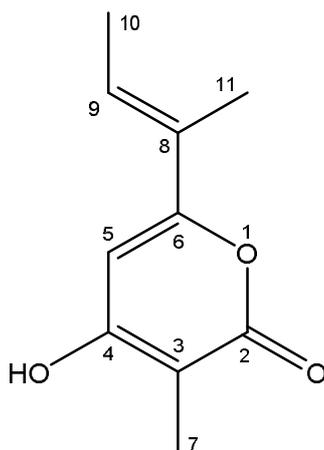


Abbildung 4.5.45.: Struktur von Verbindung SG8c-133 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG8c-133 (Abbildung 4.5.45.) wurde aus Hauptfraktion 15 (SG8c-E1-15, $m = 771$ mg) nach präparativer RP-HPLC ($t_R = 32.2$ min, Standardmethode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) und SEC (100, % v, MeOH) als farbloser Feststoff ($m = 2.33$ mg) isoliert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte lediglich fünf Signalgruppen. Eines war ein Quartett (δ_{H} [ppm] = 6.42 (q, $J = 6.3$ Hz), 1H, H-8)) im aromatischen Bereich, das allerdings noch weitere Peaks in der Feinstruktur der Signalaufspaltung zeigte. Ein weiteres Signal zeigte ein Singulett (δ_{H} [ppm] = 6.12 (s, 1H, H-5)) ebenfalls im aromatischen Bereich. Des Weiteren waren drei, im Vergleich zu aliphatischen Methylgruppen, entschirmte Signale für Methyleinheiten zu erkennen. Die Signale für die Methylgruppen (δ_{H} [ppm] = 1.80 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-10), 1.80 (s, 3H, H-11), 1.77 (s, 3H, H-7)) waren dabei teilweise überlagert. Sie ließen sich aber dennoch im HMQC-Spektrum eindeutig zuordnen. Die Verschiebung der Methylgruppen wies zudem auf Anbindung an einen aromatischen Ring oder an ein Doppelbindungssystem hin. Das $^{13}\text{C-NMR}$ zeigte insgesamt zehn Signale, wobei die drei Signale (δ_{C} [ppm] = 164.2 (C-2), 165.0 (C-4), 157.7 (C-6)) sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe mit Sauerstofffunktionalisierung anzeigten. Das Korrelationsmuster in COSY- und HMBC-Spektren von H-9, H-10 und H-11 bzw. der entsprechenden Kohlenstoffe (δ_{C} [ppm] = 126.9 (C-8), 127.7 (C-9), 14.0 (C-10), 11.8 (C-11)) zeigten wieder das Strukturelement der Butenylgruppe (1-Methyl-prop-1-en) die auch schon bei den Depsidonen/Depsiden (Kapitel 4.5.3.1-4.5.3.10) präsent waren. Die intensive $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplung von H-9 zum quaternären Kohlenstoff C-6 legte diesen als Anknüpfungspunkt zum Ringsystem fest. Die verbleibende Anzahl an fünf zuzuordnenden Kohlenstoffen wies entweder auf ein fünf-Ringsystem oder auf einen Heterozyklus hin. LC-MS-Untersuchungen offenbarten das Pseudomolekularion ($m/z = 181.0875$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) bei positiver und bei negativer Ionisierung ($m/z = 179.0755$, $[\text{M}-\text{H}]^-$) mit der korrespondierenden Summenformel ($\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$). Durch die Anzahl der Heteroatome und die HMBC-Korrelationen von H-5 und H-7 (Abbildung 4.5.46b.) wurde die Struktur der Verbindung als Lacton etabliert.

Die andere mögliche Struktur bei der die Position der Carbonylgruppe und des Sauerstoffs im Ring ausgetauscht ist, wurde durch die dann auftretende, unwahrscheinliche $^4J_{C,H}$ -Kopplung von H-7 zum Carbonyl-Kohlenstoff über ein Heteroatom hinweg, nicht weiter in Betracht gezogen. Die zugeordneten chemischen Verschiebungen ergaben sich somit wie in Abbildung 4.5.46a. dargestellt. Der abschirmende Effekt in *ortho*-Position zur Hydroxyl- bzw. Carbonylfunktion erklärt zudem die für sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe geringe Verschiebung von C-3 ($\delta C = 97.7$ ppm) bzw. C-5 ($\delta C = 97.2$ ppm) unter 100 ppm.

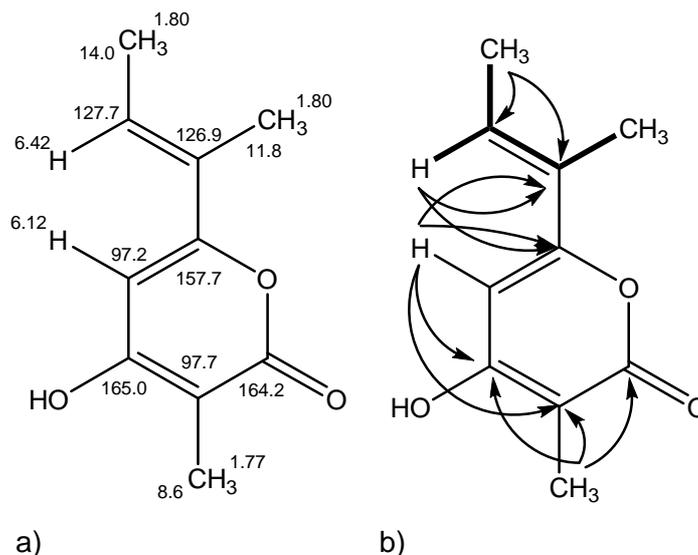


Abbildung 4.5.46.: a) Chemische Verschiebung von 1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-133 in DMSO- D_6 (eigene Darstellung).

Die Molekülstruktur konnte der literaturbekannten Verbindung (*E*)-4-Hydroxy-3-methyl-6-(1-methyl-1-propenyl)-2-pyron, welche über keinen Trivialnamen verfügt, zugeordnet werden. Sie wurde zuvor und erst kürzlich als natürliches Isolat nur aus dem Pilzen (*Aspergillus unguis* und *Graphostroma* sp.) marinen Ursprungs isoliert (Sureram *et al.* 2014, Niu *et al.* 2018). Allerdings ist die Verbindung als Syntheseprodukt für das strukturell engverwandte Nectriapyron bekannt (Abrahmson & Wormser 1981, Burkhardt & Dickschat 2018). Über die Bioaktivität gibt es bis auf eine beschriebene Inaktivität als antiinflammatorisches (Pansanit *et al.* 2013) und antiallergisches Mittel (Niu *et al.* 2018) keine Erkenntnisse. Das *O*-methylierte Nectriapyron ist als allerdings als MAO-hemmendes ($IC_{50} = 8.9 \mu M$, Lee *et al.* 1999), Melaninsynthese-modulierendes (Thines *et al.* 1998), antibakterielles (*Staphylococcus aureus*, 30 ppm, Nair & Carey 1975) und phytotoxisches Molekül (Türkhan *et al.* 2011), sowie als Repellent bekannt (Claydon *et al.* 1985). Die phytotoxische Aktivität, die auch für die Verbindung SG8c-133 angenommen werden könnte, und für viele endophytische Metaboliten nachgewiesen ist, lässt sich als weiteres Indiz für die postulierte "balanced antagonism" Beziehung zwischen Wirtspflanze und Endophyten heranziehen (Schulz *et al.* 1999, Schulz *et al.* 2015, vgl. auch Kapitel 2.2.4.).

4.5.6.4. Gymnoascolid A (SG8c-148)

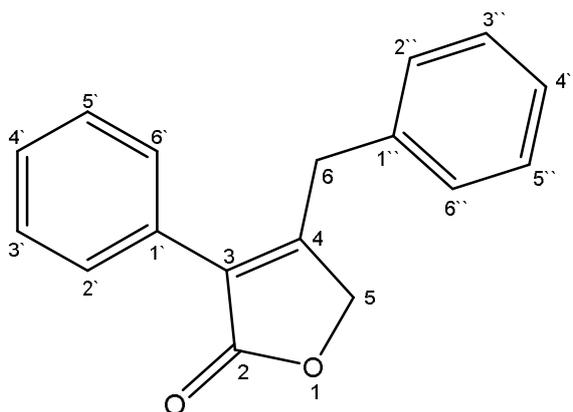


Abbildung 4.5.47.: Struktur von Verbindung (eigene Darstellung).

Nach Säulenchromatographie (97.5/1/1.5, % v/v/v, DCM/MeOH/AcOH, $R_f \sim 0.58$) und abschließender SEC (100, % v, MeOH) konnte die Verbindung SG8c-148 (Abbildung 4.5.47.) aus der Hauptfraktion elf (SG8c-E1-11, $m = 450$ mg) als farbloses Öl ($m = 99.1$ mg) gewonnen werden. LC-MS-Untersuchungen lieferten das Pseudomolekularion bei positiver ($m/z = 251.1247$, $[M+H]^+$) und negativer Ionisierung ($m/z = 249.1873$, $[M+H]^+$).

Die Signalgruppen aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigten zwei isolierte tieffeldverschobene Methyleinheiten (δH [ppm] = 4.68 (s, 2H, H-5), 3.96 (s, 2H, H-6)), die aufgrund der Verschiebung an ein Heteroatom gebunden bzw. in einem Doppelbindungssystem eingebunden sein mussten, sowie sechs Signalgruppen im Verschiebungsbereich für aromatische Protonen. Deren Integral lässt insgesamt zehn Protonen erwarten. Die Protonen im aromatischen Bereich offenbarten des Weiteren eine komplexe Feinstruktur in der Signalaufspaltung, konnten aber grob jeweils in zwei Dublettgruppen (δH [ppm] = 7.54 (m, 2H, H-2' und H-6'), 7.15 (m, 2H, H-2'' und H-6''), zwei Tripletgruppen (δH [ppm] = 7.47 (m, 2H, H-3' und H-5'), 7.33 (m, 2H, H-3'' und H-5'')) und zwei weiteren Tripletgruppen (δH [ppm] = 7.42 (m, 1H, H-4'), 7.29 (m, 1H, H-4'')) eingeteilt werden. Das Integralverhältnis in Kombination mit den Signalmustern deutete demnach auf zwei Phenylringe hin. Das $^{13}\text{C-NMR}$ bestätigt diese Vermutung indem vier Verschiebungen etwa die doppelte Signalintensität aufwiesen, was auf die Symmetrieeigenschaften von monosubstituierten Phenylringen zurückzuführen war. Des Weiteren ergaben sich zwei, im Vergleich zum Verschiebungsbereich für aromatische Kohlenstoffe, relativ stark entschirmte Kohlenstoffsignale bei $\delta\text{C} = 173.4$ ppm (C-2) und $\delta\text{C} = 160.0$ ppm (C-4). Das Signal bei $\delta\text{C} = 173.4$ ppm (C-2) wies auf eine Carbonylfunktion in einem Carboxylester hin. Die Verschiebungen für die Methylengruppen, dessen Zuordnung durch HMQC-Experimente bestätigt wurde, zeigten typische Werte für Methylene in Benzylstellung (δC [ppm] = 34.0 (C-6)) und Methylene mit Bindung zu Sauerstoff (δC [ppm] = 71.2 (C-5)). Somit ergeben sich 17 Kohlenstoffatome insgesamt, die zusammen mit den Daten aus der Massenspektrometrie die elementare Zusammensetzung ($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_2$) lieferte.

HMBC- und andere 2d-NMR-Korrelationen (Abbildung 4.5.48a.) lieferten schließlich den Strukturvorschlag und ermöglichten die komplette Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.5.48b.). Die Tieffeldverschiebung von C-4 ($\delta_C = 160.0$ ppm) lies sich durch die Carbonylgruppe in β -Position erklären.

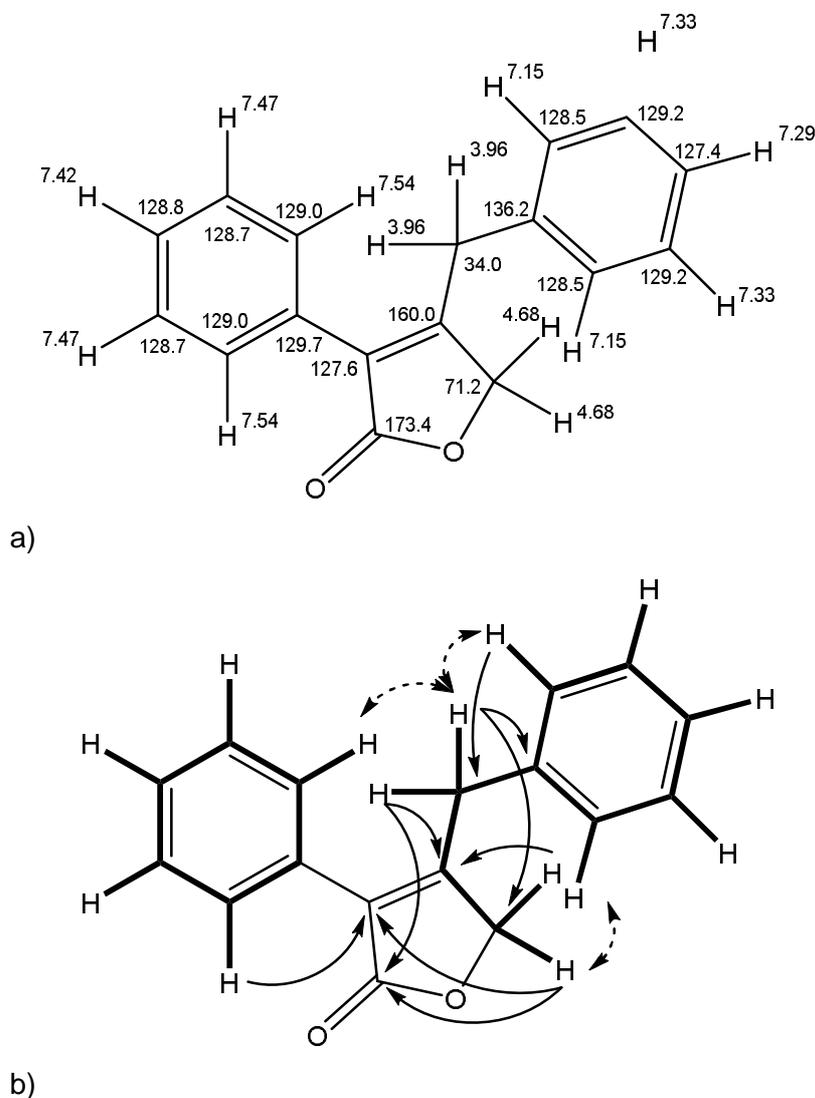


Abbildung 4.5.48.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (---), und NOESY- (- - -) Schlüsselkorrelationen von Verbindung SG8c-148 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

Die vorliegende Struktur wurde zuvor als erstes von Clark *et al.* (2005) als Gymnoascolid A, ein Butenolid aus dem Erdbodenisolat des Pilzes *Gymnoascus reessii*, beschrieben. Die spektralen Daten sind in guter Übereinstimmung zur Primärliteratur und erlaubten im Gegensatz zur Originalquelle durch eine höhere Messfrequenz des NMR-Messgerätes sogar eine zweifelsfreie Zuordnung der chemischen Verschiebungen. Obwohl 2-Furanone (z.B. das Vitamin Ascorbinsäure, das Mykotoxin Patulin) häufige Strukturelemente in Naturstoffen sind bzw. die Strukturklasse der Butenolide häufig isoliert wird, ist die direkte Verknüpfung einer Phenyl- und einer Benzylgruppe über die 2-Furanoneinheit ein seltenes Strukturmotiv (Clark

et al. 2005). Lediglich mit Eutypoid A (aus dem Meerespilz *Eutypa* sp.), Microperfuranon (aus dem terrestrischem Pilz *Anixiella micropertusa*) und Microperfuranonanhydrid (aus dem terrestrischem Pilz *Aspergillus nidulans*), sowie Carbonarin A und Carbonarin H (aus dem terrestrischem Pilz *Aspergillus carbonarius*), welche als Insektizid-Komponenten patentiert wurden, sind vergleichbare Strukturen bekannt (Clark et al. 2005). Gymnoascolid A (Hosoe et al. 2005) und deren Glykoside (Wakana et al. 2008) wurden kürzlich ebenfalls noch aus dem Pilz *Malbranchea filamentosa* isoliert. Weiterhin wurde Gymnoascolid A als Isolat aus *Nigrospora sphaerica* berichtet (Zhang et al. 2010). In Bioaktivitätstests wurde Gymnoascolid A als Blutgefäß erweiternd (Vasodilation), sowie als selektiv antimykotisch (MIC = 52 μ M) gegenüber dem Pflanzenpathogen *Septoria nodorum* bewertet (Clark et al. 2005). Der antimykotische Effekt konnte allerdings nicht gegenüber anderen getesteten filamentösen Pilzen (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*) oder Hefen (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*) im getesteten Bereich (100 μ g/Testplättchen) des Argar-Diffusionstestes festgestellt werden (Hosoe et al. 2005). Als ebenfalls inaktiv wurde die Verbindung gegenüber Bakterien (*Bacillus subtilis*), Nematoden (*Haemonchus contortus*) und einer Tumorzelllinie (NS-1, Mausmyelom) befunden. Die beschriebene selektive antimykotische Wirkung gegen einen für Pflanzen pathogenen Pilz lässt eine Funktion des Metaboliten als Allelochemikalie wahrscheinlich erscheinen und unterstreicht die mögliche Rolle des Stammes als mutualistischer Endoophyt.

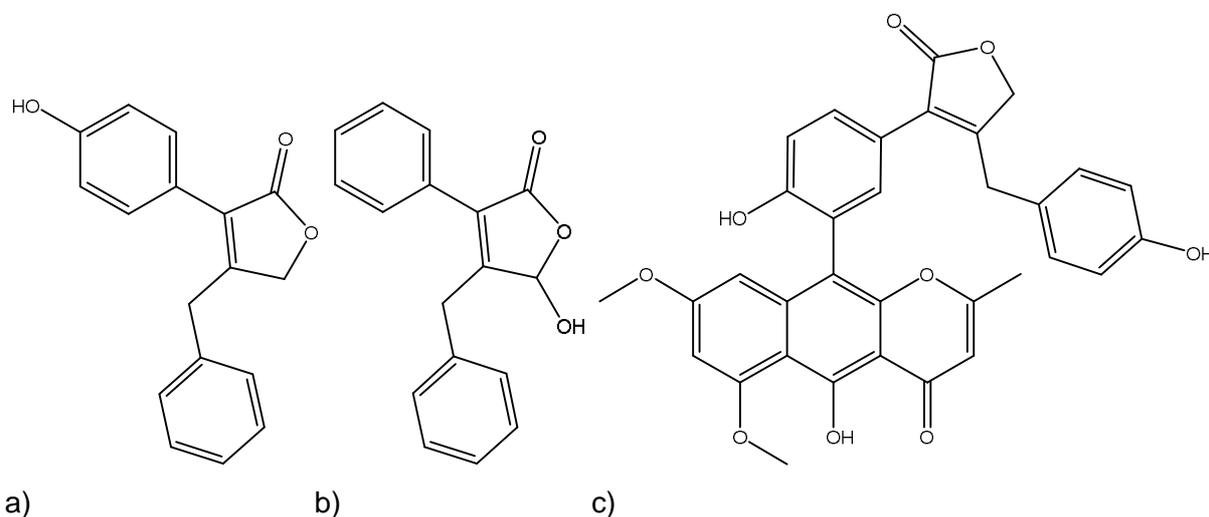


Abbildung 4.5.49.: Weitere Butenolide mit Strukturmotiv von SG8c-149: a) Eutypoid, b) Microperfuranon, c) Carbonarin H (eigene Darstellung).

4.5.6.5. Häufig isolierte Metabolite

Im weiteren Verlauf der Extraktbearbeitung konnten noch einige Verbindungen isoliert und charakterisiert werden, die allerdings als Naturstoffe weit verbreitet sind. Da sie nicht spezifisch für eine Art oder bestimmte Organismengruppe sind, sondern aus vielen verschiedenen Quellen gewonnen werden können, werden diese nur der Vollständigkeit wegen gezeigt aber nicht eingehender beschrieben (Abbildung 4.5.50.). Zu diesen häufig isolierbaren Metaboliten gehören Fettsäuren (z.B. Linolsäure, Abbildung 4.5.50e.) und Lipide (z.B. Monocaprin, Abbildung 4.5.50d), die als Speicherstoffe, Signalmoleküle und Zellwandbestandteile eine Rolle spielen, sowie einfache aromatische Verbindungen aus der Gruppe der Phenylpropanoide (z.B. Ferulasäure, Abbildung 4.5.50c., p-Hydroxyzimtsäure Abbildung 4.5.50b). Zimtsäurederivate sind typische Metaboliten aus der pflanzlichen Biosynthese werden jedoch gelegentlich auch aus Pilzen, zum Beispiel, wie bei Ferulasäure, aus marinen (Wu *et al.* 2016) und endophytischen Pilzen (Liu *et al.* 2017), isoliert. Dasselbe gilt für das ebenfalls isolierte Benzoessäurederivat Vanillinsäure (Abbildung 4.5.50a.) dessen Gewinnung auch aus mykochemischen Untersuchungen endophytischer Pilze berichtet wurde (z.B. Cheng *et al.* 2011, Song *et al.* 2015). Aufgrund der generell geringen isolierten Menge ist es allerdings auch möglich, dass es sich bei den aromatischen Metaboliten um Artefakte aus dem zur Pilzkultivierung genutzten Reismedium handelt. Auffällig ist zumindest, dass bei den genannten Literaturbeispielen ebenfalls ausnahmslos Reismedium zur Kultivierung verwendet wurde. Zudem sind einfache Hydroxybenzoensäuren und Hydroxyzimtsäuren als Inhaltsstoffe von Reiskörnern dokumentiert (Shao & Bao 2018)

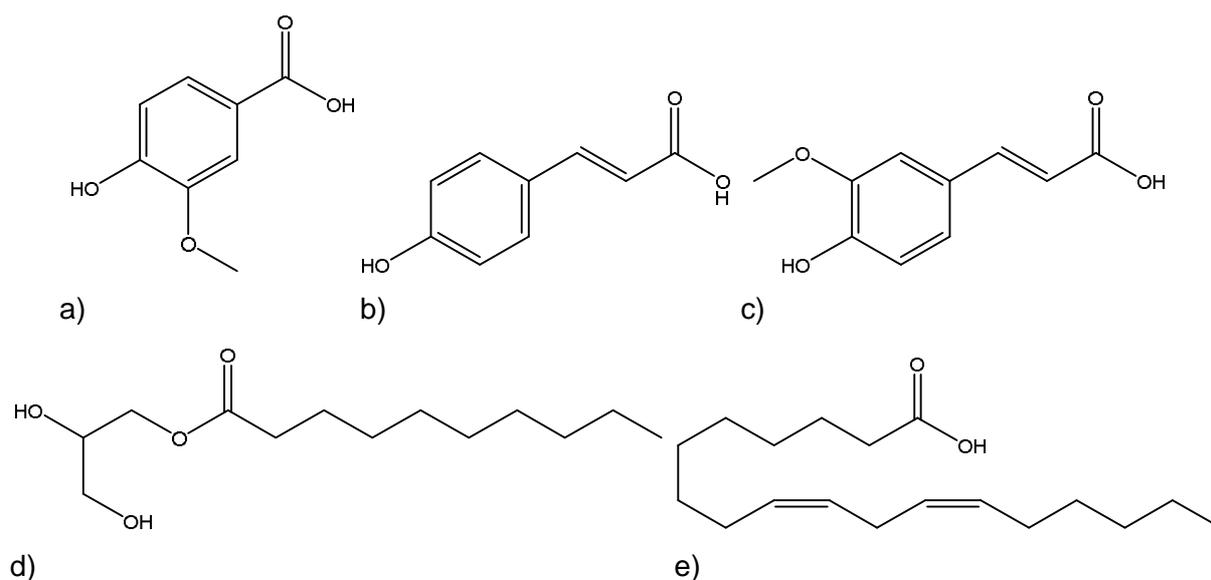


Abbildung 4.5.50.: Häufig ebenfalls aus anderen Quellen berichtet Metaboliten aus Stamm SG8c: a) Vanillinsäure, b) 4-Hydroxyzimtsäure, c) Ferulasäure, d) Monocaprin e) Linolsäure (eigene Darstellung).

4.5.7. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm SG8c

Aus Stamm SG8c konnten insgesamt 22 Metaboliten isoliert und charakterisiert werden. Davon stellten acht Verbindungen neue, zuvor unbeschriebene Naturstoffe dar. Viele zeigten darüber hinaus bemerkenswerte antibakterielle Aktivitäten, die sich mit dem bekannten Referenzantibiotikum (Gentamicinsulfat) vergleichen ließen. Der beobachtete antibakterielle Effekt des Rohextraktes und der Unterfraktionen konnte in erster Linie den enthaltenen Depsidonen und dem Depsid als aktive Komponenten zugeordnet werden. Die mykochemische Untersuchung von SG8c zeigt in hervorragender Weise, dass endophytische Pilze, insbesondere aus wenig studierten Gattungen, eine gute Quelle für neue und bioaktive Naturstoffe sein können.

Ein Literaturvergleich zu anderen isolierten Metaboliten aus *Tremateia*-Arten ist nicht möglich, da diese zuvor nicht Gegenstand mykochemischer Untersuchungen waren. Die Hauptmetaboliten, die Depsidon- und Depsidderivate, wurden allerdings bereits aus anderen Stämmen der Ordnung Pleosporales, wie zum Beispiel *Preussia aurantiaca*, (Syn.: *Pycnidiophora aurantiaca*) oder *Corynespora cassiicola* gewonnen. Interessanterweise wurden diese auch aus phylogenetisch weiter entfernten Arten isoliert, wie z.B. *Meyerozyma guilliermondii* (Saccharomycetes), *Pilobolus heterosporus* (Mucoromycetes), *Aspergillus unguis* (Syn.: *Emericella unguis* (Eurotiomycetes)), *Cordyceps dipterigena* (Syn.: *Ophiocordyceps dipterigena* (Sordariomycetes), Ibrahim *et al.* 2018). Die Depsidone sind daher nicht nur in einer Familie vorkommende Gruppe von Verbindungen, sondern über verschiedene Pilzklassen verteilt. Dies deutet eventuell auf einen horizontalen Gentransfer der beteiligten Biosynthesegene oder einer wiederholten, separaten Entwicklung zur Depsid- und Depsidonbiosynthesefähigkeit hin. Der Produktstamm SG8c lässt sich trotz des zu anderen isolierten Endophyten vergleichsweise langsamen Wachstums als guter Produktionsstamm für Depsidone interpretieren, da diese trotz nicht optimierter Kultivierungs- und Isolierungsbedingungen zu einem relativ großen Teil (~ 10% w/w) der Rohextraktmasse isoliert werden konnten. Für beispielsweise den Hauptmetabolit Auranticin A ist derzeit keine kommerzielle Quelle bekannt. Für andere kommerziell verfügbare Depsidone werden kostenintensive Beträge gefordert (z.B. Lobarsäure ~ 250 Euro/mg, www.caymanchem.com, 25.03.2019), so dass Depsidone als wertvolle Spezialchemikalien erscheinen.

Auch wenn die anderen neu beschriebenen Metaboliten (SG8c-114, SG8c-143, SG8c-146a) nicht in derselben Quantität isoliert werden konnten und sich deutlich weniger potent in den Bioaktivitätsmessungen (antibakteriell, cytotoxisch) zeigten, sind diese dennoch von Interesse. Weitere Untersuchungen wären notwendig, um die biologische Funktion bzw. die molekulare Zielstruktur mit denen diese Naturstoffe interagieren können, aufzufindig zu machen.

4.6. Stamm SG25 (*Biscogniauxia* sp.)



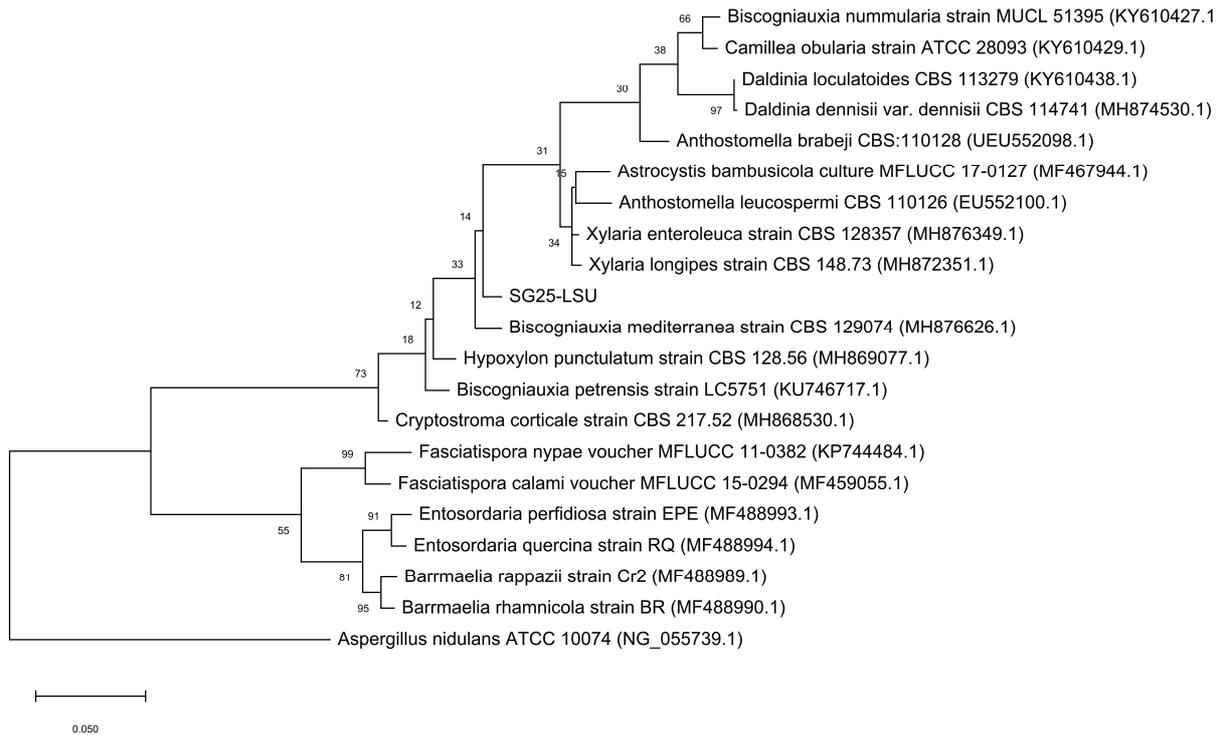
Abbildung 4.6.1: Abbildungszusammenstellung zur Bearbeitung von Endophytenstamm SG25 (*Biscogniauxia* sp.): Wirtspflanze (*Eucalyptus* sp., oben links), Rindenproben (oben rechts), Submers-Fermentation in Kartoffel-Dextrose-Medium (unten links), Solid-State-Fermentation auf Reismedium (unten rechts) (eigene Darstellung).

4.6.1. Stammidentifizierung und Auswahl

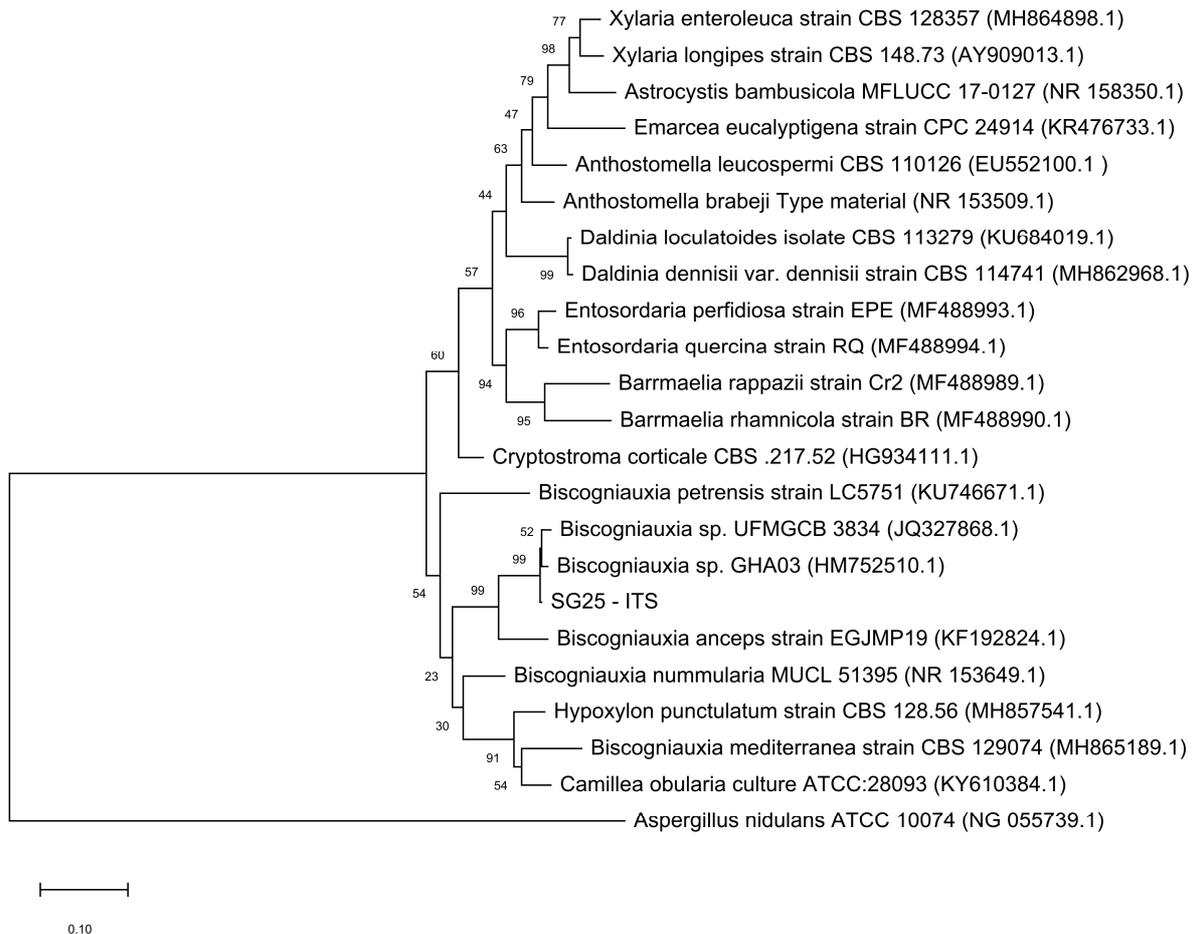
Die Klassifizierung des Stammes erfolgte anhand DNA-basierender Methoden über ITS-rDNA als für Pilze akzeptierter Barcodemarker und phylogenetischer Analyse der Sequenzen zu Referenzstämmen derselben Familie und Gattung. Der Abgleich der ITS-Sequenzen (Zugangsnummer NCBI: LR585035) mittels BLAST-Algorithmus ergab viele Treffer zu Stämmen aus der Familie der *Xylariaceae*, insbesondere der Gattung *Biscogniauxia*. Hohe Übereinstimmungen zu Referenzsequenzen ergaben sich bei zwei *Biscogniauxia*-Stämmen (z.B. 98.7%, *Biscogniauxia* sp. GHA03 (Zugangsnummer NCBI: HM752510.1), 98.2%, *Biscogniauxia* sp. UFMGCB 3834 (Zugangsnummer NCBI: JQ327868.1), die allerdings nicht bis auf Artlevel klassifiziert wurden. Auffällig war bei den gelisteten Treffern auch die relativ hohe Anzahl an Stämmen (ca. 10%), die als Endophytenisolat annotiert wurden.

Die Restriktion der Suche auf "type material"-Sequenzen (Federhen 2015) ergab ebenfalls als Haupttreffer Stämme innerhalb der Gattung *Biscogniauxia*, allerdings mit deutlich geringerer, für eine Zuordnung inakzeptabler prozentualer Übereinstimmung (88.8%, *B. nummularia* MUCL 51395, Zugangsnummer NCBI: NR_153649.1). Um die Gattungseinstufung des Stammes abzusichern wurde, demnach zusätzlich der LSU-Genbereich amplifiziert und sequenziert. Anschließend wurden beide Sequenzbereiche separaten phylogenetischen Analysen unterworfen (Abbildung 4.6.2.). Diese Analysen offenbarten beim LSU-Bereich, dass der Stamm tatsächlich innerhalb der *Xylariaceae* Familie clustert (Abbildung 4.6.2a.), auch wenn die innere Systematik gerade innerhalb der *Biscogniauxia* sp. (vgl.: *B. nummularia* und *B. mediterranea*) unklar zu sein scheint und somit einer Revision bedarf. Die phylogenetische Analyse der ITS-Sequenzen (Abbildung 4.6.2b.), zeigten hingegen eine eindeutige Positionierung innerhalb der *Biscogniauxia*-Clade und legten damit weiterhin die Einordnung des Stammes als *Biscogniauxia*-Art nahe. Eine Bestimmung bis auf Artlevel lässt sich anhand der Daten jedoch nicht formulieren.

4. Ergebnisse und Diskussion - 4.6. Stamm SG25 (*Biscogniauxia* sp.) -



a)



b)

Abbildung 4.2.2: Maximum-Likelihood-Baum mit LSU (a) und ITS (b)-Sequenz des Stammes SG25 und Vergleichsreferenzen aus Xylariaceen Familie mit 1000 Bootstrap Replikationen und *Aspergillus nidulans* als Outgroup (eigene Darstellung).

Der Stamm SG25 wurde als Kandidat zur genaueren mykochemischen Bearbeitung, einerseits aufgrund der Gattungsklassifizierung und andererseits wegen gezeigter antibakterieller Aktivität in den Vortests, ausgewählt. Zum einen waren nach Literaturrecherchen wenige jedoch aktuelle Naturstoffuntersuchungen für die gesamte Gattung *Biscogniauxia* bekannt (Evidente *et al.* 2005, Amand *et al.* 2012, Cheng *et al.* 2012, Figueroa *et al.* 2015, Wu *et al.* 2016b, Zhao *et al.* 2017b, Zhao *et al.* 2019) und zum anderen zeigte sich für das Rohextrakt starke antibakterielle Aktivität gegenüber *B. subtilis*, *M. luteus*, und *P. agraci* im Hemmhofstest (z.B. 19 mm, 500 µg/Plättchen, gegenüber *M. luteus*). Nach der Maßstabvergrößerung zur Kultivierung der für die mykochemischen Untersuchungen benötigten Menge mittels Solid-State-Fermentation (SSF) wurde allerdings trotz mehrfacher Vermessung festgestellt, dass die zuvor ermittelte antibakterielle Aktivität nicht mehr vorhanden bzw. stark verringert war (Tabelle 4.6.1.). Das Extrakt wurde dennoch mit der Intention eine antibakterielle Fraktion nach dem Initialtrennschritt ermitteln zu können weiterbearbeitet, um die aktive Verbindung bzw. Verbindungen zumindest in geringer Menge isolieren zu können.

Tabelle 4.6.1.: Ergebnis der SG25 Rohextrakte im Agardiffusionstest.

Sample Name	c [mg/ml]	V [µl]	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. agarici</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. warneri</i>
			Ø [mm]				
Gentamicin (Referenz)	0.5	25	15	25	20	24	18.5
SG25 (EtOAc Rohextrakt)	20	25	7	13	15	16	8.5
Gentamicin (Referenz)	0.5	25	15	24	14	20	16.5
SG25-E1 scale up (EtOAc Rohextrakt)	20	25	7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
SG25-E2 scale up (MeOH Rohextrakt)	20	25	7	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Gentamicin (Referenz)	0.5	25	14	19	14	18	17
SG25 (EtOAc Rohextrakt)	20	25	9	10	12	19	8
SG25-E1 scale up (EtOAc Rohextrakt)	20	25	n.a.	7	8	8	n.a.
SG25-E2 scale up (MeOH Rohextrakt)	20	25	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

4.6.2. Extraktbearbeitung

Die Kultivierung des Stammes wurde nach 28 Tagen durch zweifache Extraktion mit Essigsäureethylester beendet. Das ebenfalls erstellte MeOH-Extrakt ($m = 71.8$ g) wurde wegen mangelnder antibakterieller Aktivität (Tabelle 4.6.1.) in den Vortests nicht weitergehend bearbeitet. Das EtOAc-Rohextrakt ($m = 21.2$ g) wurde hingegen, an Kieselgel gebunden (1:1 w/w) und einer Gradientensäule (Kieselgel: $m \sim 450$ g, Säule: $h = 45$ cm, $\varnothing = 5$ cm), ausgehend von Petrolether, über Dichlormethan/Petrolether- und Dichlormethan/Methanol-Mischungen mit abschließender Spülung durch Methanol/Essigsäure (95/5, % v/v) als initialem Trennschritt, aufgereinigt (Abbildung 4.6.3.). Verbindung SG25-105 konnte direkt als Kristallisat aus der öligen Hauptfraktion neun (SG25-E1-9, $m = 2.37$ g) abgeschieden und charakterisiert werden (Kapitel 4.6.3.1.). Die weitere Bearbeitung der Fraktionen wurde anhand der biologischen Aktivität ("bioguided fractionation") und der Trennbarkeit vorgenommen. Die Fraktionen um die Hauptfraktion 17 (SG25-E1-17, $m = 863$ mg) zeigte dabei die größten Hemmhöfe (z.B. $\varnothing = 7 - 12$ mm, gegen *P. agarici* bei 0.5 mg/Plättchen) im Agardiffusionstest und wurden daher zunächst für die weitere Bearbeitung favorisiert. Die Fraktion 12 (SG25-E1-12, $m = 418$ mg), 14 - 23 wurden einer Größenausschlusschromatographie (50/50, % v/v DCM/MeOH) durch Sephadex LH-20 unterworfen. Dadurch konnten die Verbindung *p*-Hydroxybenzoesäure (SG25-107, $m = 23.6$ mg) und ein Dinaphthalinonderivat (SG25-112, $m = 26.5$ mg), sowie (+)-*trans*-4-Hydroxyscytalon (SG25-119, $m = 23.0$ mg) und 7-Hydroxy-5-methoxy-4,6-dimethylphthalid (SG25-136, $m = 20.7$ mg) isoliert und charakterisiert werden. Ein weiterer Aufreinigungsschritt durch SEC (100, % v, MeOH), wieder über Sephadex LH-20, waren für die Gewinnung von Methyltriacetylacton (SG25-110a, $m = 27.2$ mg), Protochatechusäure (SG25-124, $m = 9.89$ mg) und 5-O-Acetylmevalonsäure (SG25-116a, $m = 38.4$ mg) erforderlich. Letztere Verbindung wurde allerdings erst nach Elution durch eine Gradienten-RP-HPLC ($t_R = 21$ min, Standardmethode 2, $V = 8$ ml/min, ACN/H₂O/TFA) als abschließendem Schritt erhalten. Andere Fraktionen (z.B. SG25-E1-14, SG25-E1-15, SG25-E1-23) wurden weiterbearbeitet. Es wurden allerdings mangels Trennerfolg keine weiteren reinen Verbindungen erhalten oder strukturell charakterisiert.

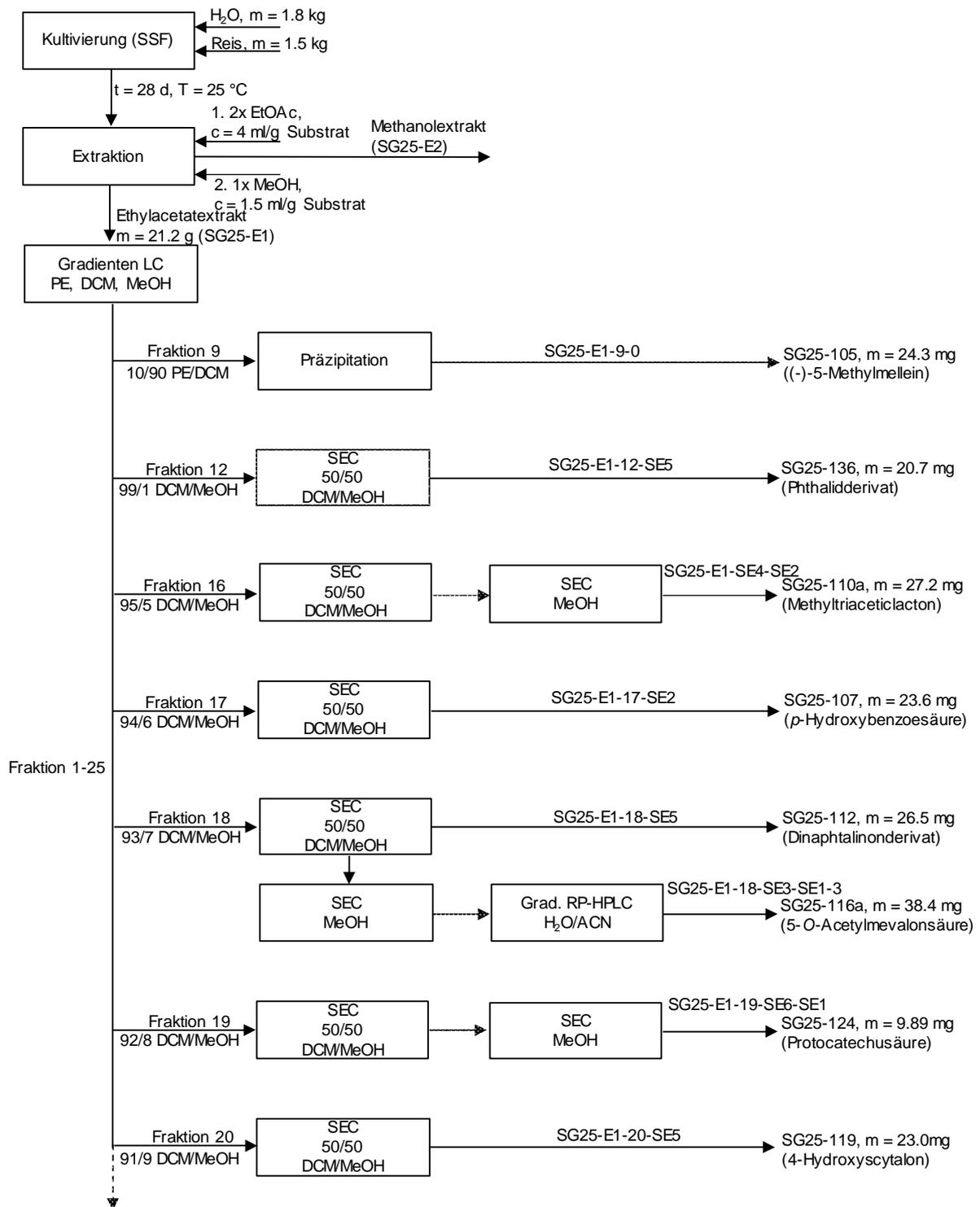


Abbildung 4.6.3.: Extraktbearbeitungs- und Verbindungsisolierungsschema für Stamm SG25 (eigene Darstellung).

4.6.3. Isolierte und charakterisierte Verbindungen aus Stamm SG25

4.6.3.1. (*R*)-5-Methylmellein (SG25-105)

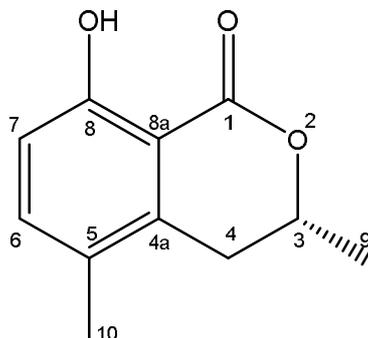


Abbildung 4.6.4.: Struktur von Verbindung SG25-105 (eigene Darstellung).

Die in Abbildung 4.6.4. dargestellte Verbindung ($m = 24.3$) wurde durch direkte Kristallisation und Waschen mit Petrolether aus der öligen Hauptfraktion neun (SG25-E1-9, $m = 3.07$ g) gewonnen. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren zwei miteinander koppelnde Kerne im Verschiebungsbereich für aromatische Protonen (δH [ppm] = 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-6) 6.81 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-7)) und drei Signalgruppen mit ausgeprägter Kopplung und Signalaufspaltung (δH [ppm] = 4.68 (dq, $J = 12.6, 6.3, 3.4$ Hz), 1H, H-3), 2.94 (dd, $J = 16.6, 3.4$ Hz, 1H, H-4), 2.71 (dd, $J = 16.6, 11.6$ Hz, 1H, H-4')), sowie zwei Methylgruppen (δH [ppm] = 2.19 (s, 3H, H-10), 1.55 (d, $J = 6.3$ Hz, 3H, H-9)) zu erkennen. Anhand der Kopplungskonstante der aromatischen Signale konnte bei einem Sechsring auf eine *ortho*-Stellung der miteinander koppelnden Protonen geschlossen werden.

Die Verschiebung des entschirmten Methins (H-3) wies zudem auf eine Bindung an Sauerstoff hin. Im COSY-Spektrum bestätigte sich, dass die Methylgruppe (H-9), das Oxymethin (H-3) und die Protonen an C-4 ($\delta\text{C} = 32.0$ ppm) ein Spinsystem bildeten. Die Protonen an Position C-4 stellten sich durch das HMQC-Spektrum zudem als diastereotope Protonen einer Methylengruppe heraus. Auffällig war zusätzlich ein stark ins Tieffeld verschobenes Proton (δH [ppm] = 10.99 (s, 1H, 8-OH)), welches im HMQC-Spektrum keine Korrelation aufwies und damit auf ein chelatisiertes bzw. H-Brücken stabilisiertes Hydroxylproton hindeutete.

Das $^{13}\text{C-NMR}$ offenbarte elf Signale für Kohlenstoffatome, von denen fünf quaternären Kohlenstoffen zuzurechnen waren. Zwei von diesen Kohlenstoffatomen (δC [ppm] = 170.5 (C-1), 160.6 (H-8)) waren anhand ihrer chemischen Verschiebung wiederum als sp^2 -hybridisiert und sauerstofffunktionalisiert (Carbonyl bzw. Hydroxyl) anzusehen. Bisher dargelegte spektroskopische Daten erlaubten die Postulierung eines dimethylierten, hydroxylierten Benzopyrons als Kernstruktur. Die Überprüfung der HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.6.5b.), sowie die massenspektrometrischen Untersuchungen ($m/z = 193.0975$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ und $m/z = 175.0803$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$), welche die elementare Zusammensetzung ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$) bestä-

tigte, erlaubten die strukturelle Charakterisierung der Verbindung und die unzweifelhafte Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.6.5a.).

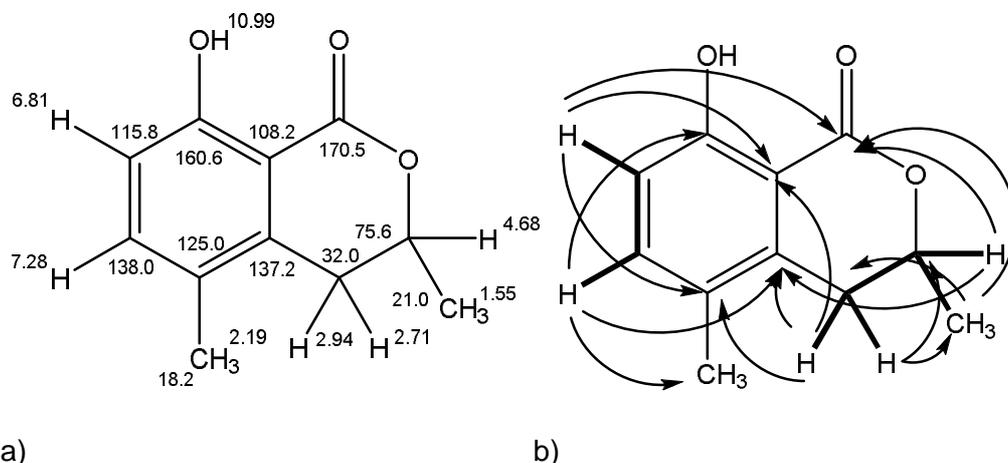


Abbildung 4.6.5.: a) Chemische Verschiebung von ¹H- und ¹³C-Signalen, b) COSY- (–) und HMBC- (→) Schlüsselkorrelationen von SG25-105 in CDCl₃ (eigene Darstellung).

Das Stereozentrum an C 3 konnte durch die Messung des spezifischen Drehwertes ($\alpha_D^{20} = -106.8$, $c = 1.0$, CHCl₃) und einem Literaturvergleich ($\alpha_D^{21} = -115$, CHCl₃ (De Alvarenga *et al.* 1978), $\alpha_D^{25} = -118$, $c = 0.6$, CHCl₃ (Cambie *et al.* 1991)) eindeutig bestimmt werden. Demnach konnte die Verbindung als das Isocoumarin- bzw. Benzopyranderivat (-)-5-Methylmellein ((*R*)-8-Hydroxy-3,5-dimethylisochroman-1-on) identifiziert werden.

Dieses Molekül wurde erstmals von Ballio *et al.* 1966 aus dem für Pflanzen pathogenen Pilz *Fusicoccum amygdali* berichtet. (-)-5-Methylmellein wird häufig als Verbindung aus Pilzen, insbesondere aus endophytischen Pilzen aus der Ordnung Xylariales isoliert (z.B. Ortega *et al.* 2014, Sorres *et al.* 2015, Ibrahim *et al.* 2017). Vereinzelt existieren auch Isolierungsberichte aus verholzten Pflanzenteilen (Carpenter *et al.* 1980, Sharif *et al.* 2011), wobei die Herkunft als Pflanzenmetabolit angezweifelt und eher den besiedelnden Pilzen zugeschrieben wird (De Alvarenga *et al.* 1978, Cambie *et al.* 1991). Die Verbindung wurde ebenfalls bereits aus anderen *Biscogniauxia* Stämmen, wie *B. mediterranea* (Evidente *et al.* 2005) und *B. nummularia* (Amand *et al.* 2012) isoliert.

Bei Bioaktivitätstest wurde der Metabolit als potenter MAO-Hemmer im niedrigen mikromolaren-Bereich (IC₅₀ = 1.1 μM, Lee *et al.* 1999) und als Repellent mit geringer Aktivität gegenüber Larven von *Spodoptera littoralis* (Kokubun *et al.* 2003) angegeben. Über die des Weiteren berichtete phytotoxische Wirkung sind konträre Aussagen verfügbar. Während bei Ballio *et al.* (1966) keine Ausprägung phytotoxischer Effekte festgestellt wurden, wurde in anderen Abhandlungen unter anderem wachstumshemmende Effekte gegenüber Salat-Keimlingen (*Lactuca sativa*) und Apfel-Trieben (*Malus domestica*) beschrieben (Okuno *et al.* 1986). Die widersprüchlichen Aussagen sind vermutlich auf die eingesetzten Konzentrationen und auf

die unterschiedlichen Methodiken, die von Ballio *et al.* 1966 allerdings auch nicht beschrieben wurden, zurückzuführen. Die phytotoxische Bewertung des produzierten Metaboliten, wirkt auf den ersten Blick ungewöhnlich, da die Generierung phytotoxischer Metaboliten eher einem als Pathogen wirkenden Stamm, wie bei z.B. *Valsa ceratosperma* (Okuno *et al.* 1986) zuzuordnen wäre. Die Einordnung des *Biscogniauxia* Stammes SG25 als ein Pathogen ließ sich damit allerdings trotzdem nicht vornehmen, da das Metabolitprofil innerhalb der Pflanzen-Endophyten-Interaktion variieren kann. Diese Erkenntnis wurde in kürzlich veröffentlichten Studien zumindest für das Pflanzenmetabolom in Interaktion mit Bakterien- (Maggini *et al.* 2017, Huang *et al.* 2018) und Pilzendophyten nachgewiesen (Tian *et al.* 2014, Quin *et al.* 2018). Die Veränderung des Metabolitprofils ist dabei prinzipiell einerseits über die Biotransformation der Pilzmetaboliten durch die Pflanze oder umgekehrt beeinflusst. Andererseits ist eine Regelung der Metabolitproduktion über die Induzierung von Pilzbiosynthesewege durch Elicitoren pflanzlichen Ursprungs oder *vice versa* denkbar (Ludwig-Müller 2015). Obwohl aktuell noch keine Studien verfügbar sind, die eine direkte Veränderung des Pilzmetaboloms *in vivo*, direkt im Pflanzengewebe dokumentieren, so lassen sich dennoch Hinweise auf eine gegenseitige Beeinflussung aus der beobachteten Wachstumsstimulation von Endophyten durch Wirtspflanzenextrakt (Peters *et al.* 1998, Eevers *et al.* 2014) oder durch Zusatz von epigenetischen Modulatoren (González-Menéndez *et al.* 2015) ableiten. Des Weiteren zeigen die Extrakte von Endophyten besonders häufig herbizide bzw. phytotoxische Aktivität, was wiederum den ausgeglichenen, antagonistischen Charakter der Endophyten-Pflanzen-Wechselwirkung unterstreicht (Schulz *et al.* 2002).

4.6.3.2. Methyltriaceticlacton (SG25-110a)

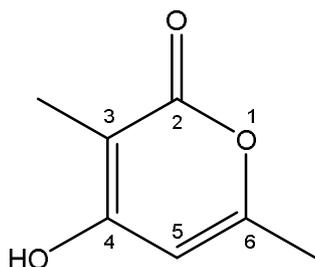


Abbildung 4.6.6.: Struktur von Verbindung SG25-110a (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG25 (Abbildung 4.6.6.) wurde als farbloser, amorpher Feststoff ($m = 27.2$ mg) aus der 16. Hauptfraktion (SG25-E1-16, $m = 345$ mg) nach zweifacher SEC isoliert (1. 50/50 % v/v, DCM/MeOH, 2. 100, % v, MeOH). Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum waren nur vier nicht koppelnde Signale zu erkennen. Davon waren zwei Methylgruppen (δ_{H} [ppm] = 2.13 (s, 3H; H-7), 1.73 (s, 3H, H-8)), die im Vergleich zu Methylgruppen in aliphatischen Systemen tieffeldverschoben auftauchen. Diese Beobachtung implizierte die Bindung an ein aromatisches System bzw. System mit sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffen. Die anderen beiden Protonen zeigten ein breites Signal (δ_{H} [ppm] = 11.11 (s breit, 1H, 4-OH)) und eines im aromatischen bzw. olefinischen Bereich (δ_{H} [ppm] = 5.98 (s, 1H, 5-H)). Das $^{13}\text{C-NMR}$ offenbarte insgesamt sieben Signale für Kohlenstoffe. Drei davon ließen anhand der Verschiebung auf sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffe mit Funktionalisierung durch Heteroatome schließen (δ_{C} [ppm] = 165.1 (C-4), 165.0 (C-2), 159.4 (C-6)). Im HMQC-Spektrum konnten sich die Signale der Protonen der Methylgruppen (δ_{C} [ppm] = 19.2 (C-8), 8.4 (C-7)) und des aromatischen Protons (δ_{C} [ppm] = 99.8 (H-5)) zuordnen lassen. Die weitreichenden Kopplungen ($>^3J$ -Kopplungen) im COSY-Spektrum von H-5 zu den beiden Methylgruppen untermauerten zusätzlich die Vermutung, dass in der Verbindung ein konjugiertes Doppelbindungs- oder aromatisches Ringsystem vorlag. Die Verschiebungen im $^{13}\text{C-NMR}$ (Abbildung 4.6.7a) sowie die COSY- und HMBC-Korrelation (Abbildung 4.6.7b.) ließen ein 2-Pyrongerüst mit Substituierung an Position drei (Methyl), vier (Hydroxy) und sechs (Methyl) etablieren. Der Strukturvorschlag wurde durch die massenspektrometrischen Messungen ($m/z = 141.0939$, $[\text{M}+\text{H}]^+$; $m/z = 139.0030$, $[\text{M}-\text{H}]^-$) und der abgeleiteten Summenformel ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3$) unterlegt. Das breite Protonensignal aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte so auch ohne weitere Korrelationen in anderen NMR-Experimenten der Hydroxygruppe an C-4 zugeordnet werden.

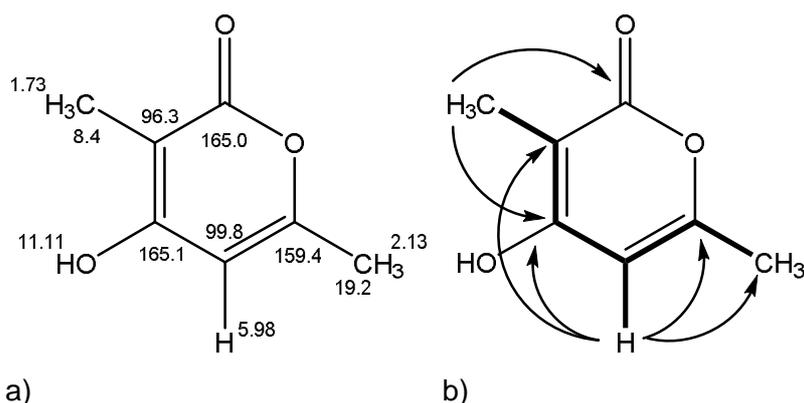


Abbildung 4.6.7.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY, (–) und HMBC, (→) Schlüsselkorrelationen von SG25-110a in DMSO-D_6 (eigene Darstellung).

Die vorliegende Struktur wurde als 3-Hydroxy-2,6-dimethyl-2H-pyran-2-on (Methyltriacetic-lacton) identifiziert und ist bereits von Brenneisen *et al.* (1964) aus *Penicillium stipitatum* isoliert und charakterisiert worden. Wenige weitere Nachweise der Verbindung stammen aus weiteren *Penicillium*-Stämmen (z.B. Savard *et al.* 1994) isoliert von besonderen Habitaten, wie hypersalinen Seen (Orfali *et al.* 2015) und epiphytisch von der Makrobraunalge *Padina* sp. (Smetanina *et al.* 2017). Des Weiteren wurde dieser Metabolit aus dem antarktischen Pilz *Aspergillus ochraceopetaliformis* (Wang *et al.* 2017), vom Grasspathogen *Leptosphaeria herpotrichoides* (Ayer *et al.* 1993b) und ebenfalls aus dem als Endophyten isolierten Pilz *Ampelomyces* sp. aufgeführt (Aly *et al.* 2008). Die Verbindung scheint demnach ausschließlich in Pilzen produziert zu werden. Eine Literaturquelle hingegen beschreibt die Detektion in Extrakten aus Tabakblättern (Zhang *et al.* 2012c), wobei die pflanzliche Herkunft aber bezweifelt werden darf, da es sich bei dem Blattmaterial um aussortierte, daher qualitativ weniger hochwertige Blätter handelt, die bereits eine stärkere Besiedlung mit Pilzen erwarten lassen. Zusätzlich wurde die Verbindung im Vergleich zu anderen identifizierten Metaboliten der Studie in sehr geringer Menge nachgewiesen, was die Vermutung als Kontaminante der Pflanzeninhaltsstoffe unterstreicht.

Über die Funktion des Metaboliten für den Pilz kann nur spekuliert werden, da keine herausragende Bioaktivität bzw. Zielstruktur bekannt ist. In Zellviabilitäts-Tests gegen verschiedene Zelllinien (Spleonzyten, Erythrocyten, Maus-Lymphom L5178Y) und Bakterienstämme (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, etc.) konnte entweder keine ($\text{IC}_{50} > 100$ mM, Smetanina *et al.* 201 bzw. $\text{MIC} > 50$ mM, Aly *et al.* 2008) oder nur eine sehr schwache Wirksamkeit (Orfali *et al.* 2015) nachgewiesen werden. Allerdings lässt sich aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum Nectriapyron (vgl. Kapitel 4.5.6.3, SG8-133) eine phytotoxische Aktivität und eine Wirkung als Repellent vermuten.

Der isolierte Metabolit ist ebenfalls sowohl über neuere (Burkhard & Dickschat 2018) als auch lange bekannte (Acker *et al.* 1966) Syntheserouten zugänglich.

4.6.3.3. SG25-112

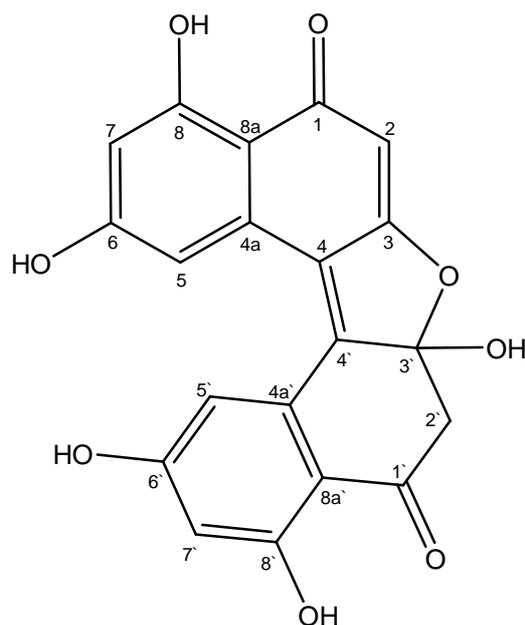
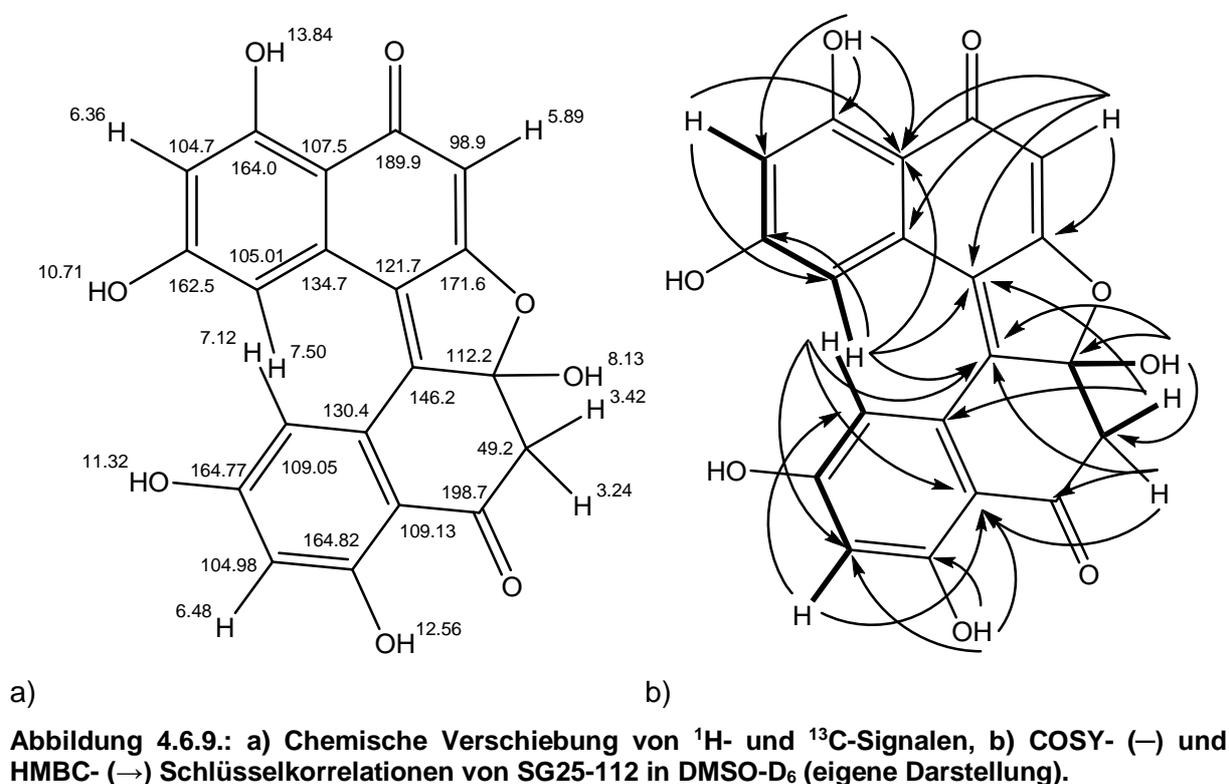


Abbildung 4.6.8.: Struktur von Verbindung SG25-112 (eigene Darstellung).

Das Molekül SG25-112 (Abbildung 4.6.8.) wurde als rot-brauner Feststoff ($m = 26.5$ mg) aus Hauptfraktion 18 (SG25-E1-18, $m = 702$ mg) nach SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH) isoliert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte vier stark entschirmte, teilweise verbreiterte Signale (δ_{H} [ppm] = 13.84 (s, 1H, 8-OH), 12.56 (s, 1H, 8'-OH), 11.32 (s breit 1H, 6'-OH), 10.71 (s breit, 1H, 6-OH)). Die starke Tieffeldverschiebung zusammen mit den Signalen und Kopplungsmustern im aromatischen Protonenbereich (δ_{H} [ppm] = 7.50 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-5), 7.12 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-5'), 6.48 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7'), 6.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, H-7), 5.89 (s, 1H, H-2)) ließ als Strukturelement auf mehrere aromatische Hydroxygruppen in *peri*-Stellung zur Carbonylgruppen schließen. Die Kopplungskonstante von vier aromatischen Wasserstoffen deutete auf jeweils zwei Protonengruppen in *meta*-Stellung zueinander hin. Die COSY-Korrelation von H-5 und H-7 bzw. H-5' und H-7' unterstrich diese Annahme. Des Weiteren offenbarte das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum noch drei weitere Signalgruppen (δ_{H} [ppm] = 8.13 (s, 1H, 3'-OH), 3.42 (d, $J = 16.7$ Hz), 1H, H-2'), 3.24 (d, $J = 16.7$ Hz, 1H, H-2')). Letztere deuteten anhand der Kopplungskonstante und Verschiebungen auf eine diastereotope Methylengruppe mit Nähe zu Heteroatomen hin. Das HMQC-Spektrum bestätigte eine Bindung der stark entschirmten Protonen im Bereich 8-14 ppm zu Heteroatomen. Das $^{13}\text{C-NMR}$ zeigte insgesamt 20 dem Molekül zugehörige Signale für Kohlenstoffe. Auffällig waren vor allem sechs Signale zwischen 160-200 ppm, welche die bereits vermuteten vier Hydroxylgruppen (δ_{C} [ppm] = 164.0 (C-8), 162.5 (C-6), 164.82 (C-6'), 164.77 (C-8')) und zwei Carbonylfunktionen bestätigten (δ_{C} [ppm] = 198.7 (C-1'), 189.9 (C-1)). Demnach ließ sich ein Dinaphthalinon als Grundgerüst annehmen. LC-MS-Untersuchungen lieferten die Pseudomolekularionen bei positiver ($m/z = 381.0724$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und negativer Ionisierung

($m/z = 378.8347$, $[M-H]^-$) mit der abgeleiteten Elementarzusammensetzung ($C_{20}H_{12}O_8$). Eine Datenbankabfrage über SciFinder ergab 62 Strukturen mit dieser Summenformel. Allerdings beinhalteten nur zwei Verbindungen die bereits durch die NMR-Spektren herausgearbeiteten Strukturelemente (keine Methylgruppen, Hydroxygruppen in *peri*-Stellung zur Carbonylfunktion, zwei Gruppen von Protonen in *meta*-Stellung, etc.). Zur Unterscheidung der beiden möglichen Strukturen (Asperlon B (Xiao *et al.* 2015) vs. RF 3192C (Yoshida *et al.* 1993), Abbildung 4.6.10.) oder sogar der möglichen Etablierung einer bisher nicht dokumentierten Verbindung waren die HMBC-Korrelationen an den diastereotopen Methylenprotonen entscheidend. Diese zeigten eine intensive Korrelation mit der Carbonylgruppe an C-1'. Dieser Aspekt wurde für Asperlone B nicht berichtet (Xiao *et al.* 2015). Zudem waren bei einigen Verschiebungen besonders im Bereich der Verknüpfungsregion der beiden Naphthalinonsubstrukturen deutlich Unterschiede zu den Literaturangaben, trotz der Messung im gleichen Lösemittel (DMSO- D_6), offensichtlich. Zu nennen wären hier zum Beispiel die Verschiebung am Carbonyl C-1' ($\delta C = 198.7$ ppm vs. $\delta C = 186.5$ ppm) und an den Methylenprotonen ($\delta C = 49.2$ ppm vs. $\delta C = 41.1$ ppm), was auf eine andere elektronische Umgebung hinwies und somit eine andere Molekülstruktur implizierte. Nach vollständiger Zuordnung der chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.6.9a.) anhand der HMBC-Schlüsselkorrelationen (Abbildung 4.6.9b.) konnte die andere bekannte Verbindung (RF 3192C, Yoshida *et al.* 1993) als strukturidentisch identifiziert werden.



Obwohl einige der in eigenen Messreihen beobachteten Signale nicht in der Referenzliteratur notiert sind, stimmen die restlichen chemischen Verschiebungen gut überein. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die wegen der geringeren NMR-Messfrequenz nicht aufgelösten, nahe beieinanderliegenden chemischen Verschiebungen zurückzuführen. Die absolute Konfiguration des Halbketals an C-3' wurde nicht bestimmt. Allerdings beschrieben Yoshida *et al.* (1993) das Vorliegen als Racemat. Ähnliches wurde für das Konstitutionsisomer Asperlon B berichtet (Xiao *et al.* 2015). Bei Xiao *et al.* (2015) wurde mangels auswertbaren Signale im CD-Spektrum und nicht vollzogenere Trennung per chiraler HPLC-Säule ebenfalls auf ein racemisches Vorliegen beider möglicher Enantiomere geschlossen. Die gemessenen kaum von null abweichenden Drehwerte von SG25-112 ($\alpha_D^{30} = +3$, $c = 0.5$, DMSO) legen ebenfalls die Vermutung eines racemischen Vorliegens nahe.

Das Dinaphthalinonderivat mit dem systematischen Namen 2,4,6a,10,12-Pentahydroxy-6,6a-dihydrodinaphtho[2,1-b:1',2'-d]furan-5,9-dion wurde bisher nur aus zwei Quellen berichtet. Die eine Quelle ist der Pilz *Chaetomella circinoseta* (Chaetomellales, Leotiomyces) (Yoshida *et al.* 1993) und die andere ein Tiefseeisolat der Pilzgattung *Graphostroma* (Xylariales, Sordariomyces) (Niu *et al.* 2018). Demnach sind Informationen über biologische Tests, Aktivitäten und biologische Funktionen rar. Die Verbindung zeigte sich bis 200 μM inaktiv gegenüber der Degranulationinhibierung an RBL-2H3 Zellen (Niu *et al.* 2018), was es als ungeeignete Komponente in antiallergischen Formulierungen darstellt. Allerdings wurde es als Aldose-Reduktaseinhibitor mit $\text{IC}_{50} = 0.35 \mu\text{M}$ Aktivität patentiert (Yoshida *et al.* 1993). Obwohl keine antibakteriellen Untersuchungen mit der isolierten Reinsubstanz ausgeführt wurden, wurde aufgrund der geringen festgestellten antibakteriellen Aktivität im Hemmhoftest der Elternfraktion eigener Versuchsreihen (z.B. 9 mm, 500 μg /Plättchen bei *P. agarici*) ebenfalls keine herausragende Aktivität erwartet.

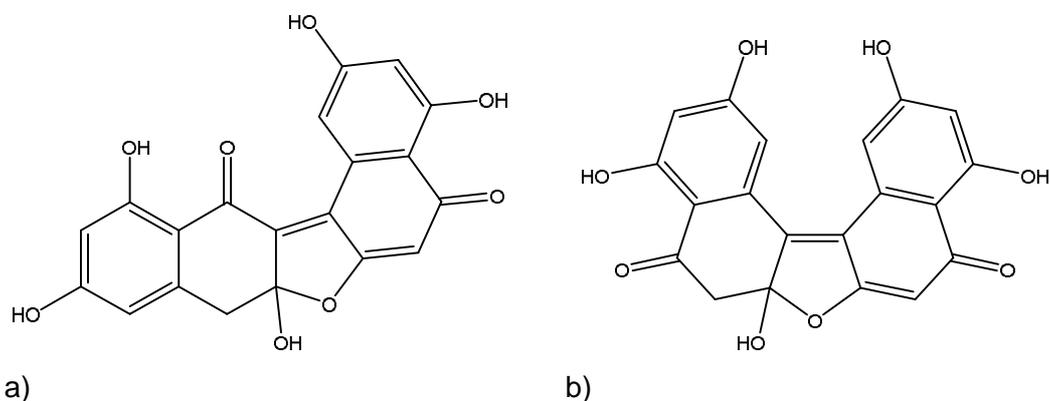


Abbildung 4.6.10.: Struktur von Vergleichsverbindung a) Asperlon B und b) RF 3192C.

4.6.3.4. 5-O-Acetylmevalonsäure (SG25-116a)

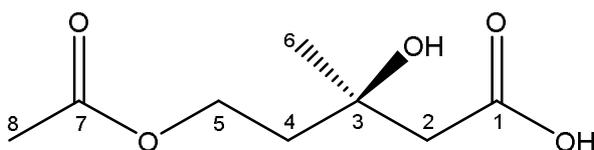
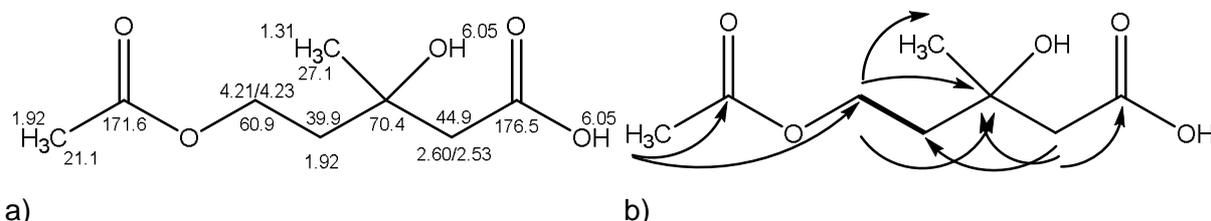


Abbildung 4.6.11.: Struktur von SG25-116a (eigene Darstellung).

Verbindung SG25-116a (Abbildung 4.6.11.) wurde als farbloses Öl ($m = 38.4$ mg) aus Fraktion 18 (SG25-E1-18, $m = 702$ mg) nach zweifacher SEC (1. 50/50, % v/v, DCM/MeOH; 2. 100, % v, MeOH) und abschließender RP-HPLC ($t_R = 21.0$ min, Standard Methode 2, Eluent A/B, $V = 8$ ml/min) erhalten. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte sechs Signalgruppen, darunter zwei Methyleinheiten (δH [ppm] = 2.04 (s, 3H, H-8), 1.31 (s, 3H, H-6)), und drei Methylenheiten (δH [ppm] = 4.27-4.16 (m, 2H, H-5 und H-5'), 2.60 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-2), 2.53 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H, H-2'), 1.92 (dt, $J = 6.7, 1.6$ Hz, 2H, H-4 und H-4')), sowie ein breites Signal (δH [ppm] = 6.05 (s breit, 2H)). Das HMQC-Spektrum bestätigte zudem das Vorhandensein der Methylengruppen und die Bindung der Protonen mit dem verbreiterten Signal zu Heteroatomen. Im $^{13}\text{C-NMR}$ wurden insgesamt acht Kohlenstoffatome angezeigt. Neben den bereits durch HMQC-Spektrum zuordenbaren Methyl- (δC [ppm] = 27.1 (C-6), 21.1 (C-8)) und Methylenheiten (δC [ppm] = 60.9 (C-5), 44.9 (C-2), 39.9 (C-4)) waren des Weiteren noch zwei quaternäre Kohlenstoffatome (δC [ppm] = 176.5 (C-1), 171.6 (C-7)), deren Verschiebungsbereich auf Carbonylgruppen hinwies, auffällig. Ein anderes quaternäres Kohlenstoffatom (δC [ppm] = 70.4 (C-3)) und die Verschiebung der Methylengruppe (δC [ppm] = 60.9 (C-5)) deutete auf die Bindung zu Sauerstoff hin. Aufgrund der HMBC-Korrelationen (Abbildung 4.6.12b.) ließ sich ein acetyliertes Mevalonsäurederivat (5-Acetoxy-3-hydroxy-3-methylpentansäure) formulieren und die chemischen Verschiebungen eindeutig zuordnen (Abbildung 4.6.12a.). Die Identität der etablierten Struktur wurde durch LC-MS-Messungen im Positiv-Modus ($m/z = 173.0858$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$) und im Negativ-Modus ($m/z = 189.0074$, $[\text{M}-\text{H}]^-$) mit der zuordenbaren Elementarzusammensetzung ($\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_8$) bestätigt.

Abbildung 4.6.12.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (---) und HMBC- (—) Schlüsselkorrelationen von SG25-116a in CDCl_3 (eigene Darstellung).

Interessanterweise wies das Integral des breiten Signals bei $\delta\text{H} = 6.05$ ppm den Wert für zwei Protonen auf, was vermuten ließ, dass das Hydroxylproton im selben Verschiebungsbereich wie das Carboxylproton erscheint. Das Carboxylproton wäre demnach, zum sonstigen erwartbaren Bereich ($\delta\text{H} > 9.5$ ppm, Pretsch *et al.* 2010) stark ins Hochfeld verschoben. Ähnliche Verschiebungen lassen sich auch aus den Angaben bei Mori & Okada (1985) entnehmen.

Die in der Natur ausschließlich *R*-konfiguriert vorliegende Mevalonsäure ist ein verbreiteter Primärmetabolit und eine Schlüsselverbindung zum Beispiel in der Terpenbiosynthese (Mevalonatweg) (Hänsel & Sticher 2009). Die an der fünften Position acetylierte Variante wurde hingegen nur in wenigen Quellen als Produktbaustein bzw. Nebenprodukt für die Synthese von Verrucarin A (Notegen *et al.* 1981) und Mevalonolacton beschrieben (Lewer & MacMillan 1983 Mori & Okada 1985). Kürzlich wurde die Verbindung, allerdings ohne Angabe der Stereochemie, in der bisher einzigen Literaturstelle als Naturstoff aus einem Erdbodenisolat von *Aspergillus flavus* beschrieben (Eliwa *et al.* 2017). Die chemischen Verschiebungen des ^1H -NMR-Spektrums waren dabei in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Lewer & MacMillan 1983). Die Klärung der Stereochemie an Position C-3 anhand des Drehwertes war leider nicht zweifelsfrei möglich, da bei Mori & Okada 1985 als einziger Vergleichsquelle ein positiver Drehwert ($[\alpha]_{\text{D}}^{19.5} = +0.2$, $c = 10.4$, CHCl_3) angeführt wurde. Im Gegensatz dazu ist bei eigenen Messreihen ein negativer Drehwert ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -4.9$, $c = 1.0$, MeOH) festgestellt worden. Die Unterschiede waren eventuell auf Messungenauigkeiten oder Lösemittelleffekte zurückzuführen. Eine weitere Erklärung könnte sich auf einen Fehler in der Literaturstelle zurückführen lassen, da bei den ^1H -NMR-Daten die Methylgruppe der Acetyleinheit nicht angegeben wurde (Mori & Okada 1985). Demnach könnte ein anderes Molekül, nämlich die (\pm)-Mevalonsäure als racemisches Gemisch, vermessen worden sein. Allerdings wurde im anschließenden Syntheseschritt durch Mori & Okada (1985) wieder ein optisch aktives Produkt ((-)-Mevalonolacton) erhalten. Aufgrund des ausschließlich natürlichen Vorkommens von *R*-konfigurierter (-)-Mevalonsäure und der vermessenen optischen Eigenschaften wurde für die Verbindung ebenfalls die *R*-Konfiguration angenommen. Eventuell handelte es sich bei der isolierten Verbindung um ein unter sauren Bedingungen, während der Aufarbeitung in Ethylacetat entstandenes Artefakt. Bei der Extraktion durch Eliwa *et al.* (2017) wurde ebenfalls Essigsäureethylester verwendet.

In Bioaktivitäts-Tests konnte, des Weiteren keine zytotoxische Aktivität gegenüber der Zervix-Karzinom-Zelllinie KB-3-1 festgestellt werden (Eliwa *et al.* 2017). Weitere Ergebnisse von Bioaktivitäts-Tests sind bisher nicht literaturbekannt.

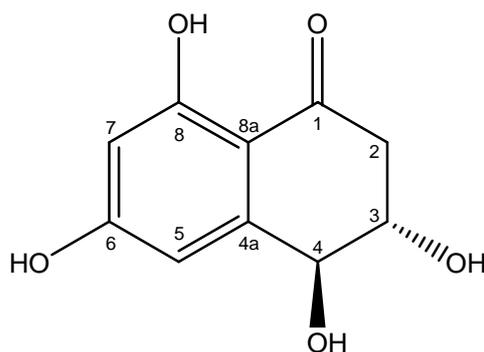
4.6.3.5. (+)-*trans*-4-Hydroxycytalon (SG25-119)

Abbildung 4.6.13.: Struktur von SG25-119 (eigene Darstellung).

Die Verbindung SG25-119 (Abbildung 4.6.13.) wurde als farbloser kristalliner Feststoff ($m = 23.0$ mg) aus der zwanzigsten Hauptfraktion (SG25-E1-20, $m = 343$ mg) nach SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH) gewonnen. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zeigte zwei stark (> 10 ppm) ins Tieffeld verschobene Protonen (δH [ppm] = 12.71 (s, 1H, 8-OH), 10.69 (s, 1H, 6-OH)) und zwei *meta*-koppelnde Protonen im aromatischen Verschiebungsbereich (δH [ppm] = 6.53 (dd, $J = 2.3, 0.7$ Hz, 1H, H-5), 6.14 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-7)), sowie sechs weitere Signalgruppen, deren chemische Verschiebung eine Funktionalisierung durch Heteroatome aufwies. Das HMQC-Spektrum bestätigte vier Protonensignale (δH [ppm] 12.71 (s, 1H, 8-OH), 10.69 (s, 1H, 6-OH), 5.72 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H, 4-OH), 5.34 (d, $J = 4.0$ Hz, 1H, 3-OH)) mit Bindung zu Heteroatomen. Des Weiteren offenbarte es eine diastereotope Methyleneinheit (δH [ppm] = 2.84 (dd, $J = 17.1, 4.1$ Hz, 1H, H-2), 2.57 (dd, $J = 17.1, 8.3$ Hz, 1H, H-2'), δC [ppm] = 43.2 (C-2)) und zwei Methine mit Sauerstofffunktionalisierung (δH [ppm] = 4.35 (dd, $J = 6.9, 5.7$ Hz, 1H, H-4), 3.86 (dddd, $J = 8.3, 6.9, 4.1, 4.0$ Hz), 1H, H-3), δC [ppm] = 71.6 (C-4), 69.8 (C-3)). Das COSY-Spektrum wiederum verdeutlichte, dass die Methylen-, die beiden Methin- und zwei Heteroatomprotonen ein Spinsystem bildeten, welches ebenfalls die aromatischen Wasserstoffatome inkludierte. Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum zeigte neben den bisher genannten Gruppen insgesamt zwölf Kohlenstoffatome, eine nicht in ein konjugiertes System eingebundene Carbonylfunktion (δC [ppm] = 200.9 (C-1)) und sechs sp^2 -hybridisierte C-Atome (δC [ppm] = 148.2 (C-4a), 109.0 (C-8a), 107.5 (C-5), 101.0 (C-7)), was einen aromatischen sechsgliedrigen Ring als Strukturelement impliziert. Zwei von diesen sp^2 -hybridisierten C-Atomen mussten, anhand ihrer chemischen Verschiebung (δC [ppm] = 165.2 (C-6), 164.2 (C-8)) zudem mit Heteroatomen funktionalisiert sein. Dies wurde durch die HMBC-Korrelationen der stark ins Tieffeld-verschobenen Protonen (> 10 ppm) zu jenen Kohlenstoffatomen noch zusätzlich unterlegt. Das stark entschirmte Protonensignal bei $\delta\text{H} = 12.71$ ppm deutete auf die Chelatisierung eines Hydroxylprotons mit einer Carbonylfunktion hin. Dies ist charakteristisch für diese funktionellen Gruppen in *peri*-Stellung, wie es zum Beispiel in 8-Hydroxy-naphtalin-1-on-Derivaten anzutreffen ist. Die dar-

gelegten strukturellen Merkmale, chemischen Verschiebungen (Abbildung 4.6.14a.) und Korrelationsmuster im COSY- und HMBC-Spektrum (Abbildung 4.6.14b.) lieferten einen Strukturvorschlag. Die Absicherung der Struktur erfolgte durch Auswertung der Ionenspur in der HPLC-MS ($m/z = 211.0654$, $[M+H]^+$, $m/z = 193.0505$, $[M-H_2O+H]^+$, $m/z = 208.9731$, $[M-H]$) und der Ableitung der Summenformel ($C_{10}H_{10}O_5$). Vorliegendes Molekül wurde als 1-Naphthalinonderivat mit dem Trivialnamen 4-Hydroxyscytalon (3,4,6,8-Tetrahydroxy-3,4-dihydronaphthalin-1(2*H*)-on) identifiziert.

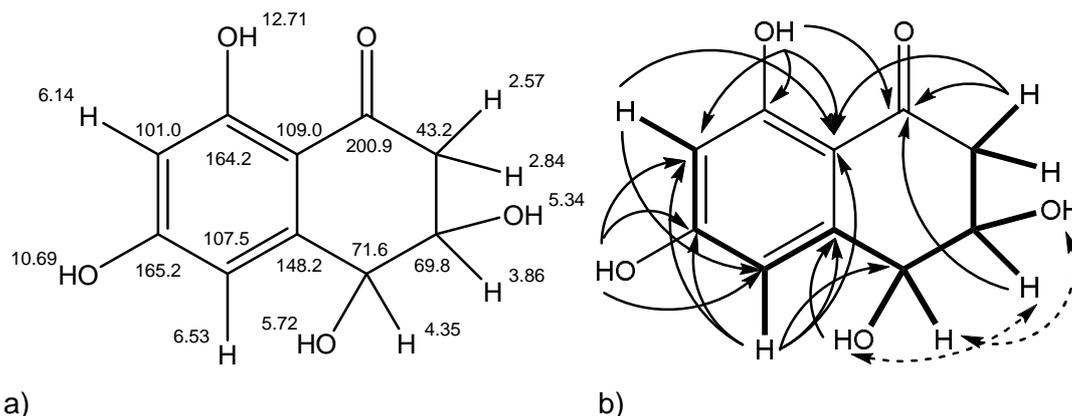


Abbildung 4.6.14.: a) Chemische Verschiebung von 1H - und ^{13}C -Signalen, b) COSY- (—), HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG25-119 in $DMSO-D_6$ (eigene Darstellung).

Mit Hilfe des NOESY-Spektrums ließ sich die relative Positionierung der Hydroxygruppen an den beiden stereogenen Zentren (C-3 und C-4) ableiten. Beobachtung der NOESY-Kreuzsignale zwischen dem Hydroxyproton an C-4 und dem Methinproton an C-3 einerseits und der zwischen dem Hydroxyproton an C-3 und dem Methinproton an C-4 andererseits implizierte eine "transartige"- bzw. "anti"-Stellung der Hydroxygruppen, auch wenn zusätzlich ebenfalls NOESY-Korrelationen zwischen den beiden Methinprotonen vorhanden waren. Diese Schlussfolgerung wurde zusätzlich durch den Vergleich der geminalen Kopplungskonstante der Methylenprotonen (*trans* ~ 17 Hz, *cis* ~ 13.0 Hz) bestätigt (Bürki *et al.* 2003). Ein Vergleich der Drehwerte (SG25-119: $\alpha_D^{30} = +24$, $c = 1.0$, MeOH) zur Verbindung die von Pittayakhajonwut *et al.* (2006) isoliert und charakterisiert wurde ($\alpha_D^{26} = +58$, $c = 0.07$, MeOH) zeigte ebenfalls einen positiven Drehwert, auch wenn die absoluten Werte divergierten. Gründe dafür könnten in den abweichenden Messbedingungen liegen. Dies Ergebnis verdeutlichte dennoch, dass es sich bei der Verbindung SG25-119 um das (3*S*,4*S*)-konfigurierte (+)-*trans*-4-Hydroxyscytalon ((3*S*,4*S*)-3,4,6,8-Tetrahydroxy-3,4-dihydronaphthalen(2*H*)-1-on) handelte.

Berichtet wurde 4-Hydroxyscytalon, unabhängig stereochemischer Betrachtungen, erstmaligen von Iwasaki *et al.* (1973) aus *Pyricularia oryzae* und des Weiteren unter anderem von einem terrestrischen, endophytischen *Nigrospora*-Stamm (Huang *et al.* 2016) und einem *Alternaria*-Stamm (Wang *et al.* 2017b). Ebenfalls als Endophyt isoliert, allerdings mariner

Herkunft, ist als Beispiel *Annulohyphoxylon stygium* (Medina *et al.* 2018) und ein *Xylaria*-Stamm (Arunpanichlert *et al.* 2015) zu nennen. Interessanterweise wurde als Quelle für 4-Hydroxyscytalone außerdem ein insektenassoziiertes Pilzstamm (*Daldinia eschscholzii*, Zhang *et al.* 2011) und ein Bakterium (*Streptomyces* sp., Conti *et al.* 2016) genannt.

In antibakteriellen Tests wird die Verbindung als nur sehr schwach (z.B. MIC = 610 μ M gegenüber *B. subtilis*) (Huang *et al.* 2016) aktiv oder inaktiv gegen human pathogene Bakterien und Pilze im getesteten Bereich beschrieben ($c < 1000 \mu$ M) (Arunpanichlert *et al.* 2015). Die Verbindung wurde aus verschiedenen Kulturfiltraten pflanzenpathogener Pilze isoliert (z.B. Stierle *et al.* 1991, Gremaud & Tabacchi 1996, Abou-Mansour *et al.* 2003). Zudem wurde Scytalon als generelles Phytotoxin beschrieben (Bürki *et al.* 2003). Die Rolle von 4-Hydroxyscytalon als Phytotoxin ist allerdings umstritten. Während Stierle *et al.* (1991) signifikante phytotoxische Effekte gegenüber Bananenzüchtungen (*Musa* sp.) feststellte, beschrieben Iwasaki und Mitautoren (1973) keine Auswirkung auf das Wachstum bei Reiskeimlingen. Zudem wurde von Gremaud *et al.* (1996) und Bürki *et al.* (2003) keine signifikante Toxizität im Testsetup gegenüber Kaffeebäumen (*Coffea arabica*) bzw. Platanen (*Platanus orientalis*) festgestellt. Unterschiede in der phytotoxischen Bewertung sind sicherlich auf die verschiedenen Testbedingungen, eingesetzten Konzentrationen und individuelle Resistenz der Testpflanzenarten zurückzuführen. Die Wirkung als generelles Phytotoxin kann demnach verneint werden.

Ein anderer interessanter Punkt ist die Involvierung des 4-Hydroxyscytalons in die Melaninproduktion von Pilzen (Dihydroxynaphthalin (DHN)-Melanin). Melanine kommen in den Zellwänden von Pilzen vor und schützen dort vor Austrocknung und Auswirkung der UV-Strahlung bzw. helfen bei der Überdauerung unwirtlicher Umweltbedingungen. Die Melanisierung von Pilzen trägt des Weiteren als Virulenzfaktor zur Pathogenität von Pilzen in Pflanzen (Stierle *et al.* 1991) und Menschen bei (Nosanchuk *et al.* 2015). Bei Blockierung der pilzlichen Melaninsynthese durch zum Beispiel Tricyclazole wurde unter anderem eine Akkumulation von 4-Hydroxyscytalon festgestellt (Dahiya & Rimmer 1988). Daher gilt die Verbindung, ebenfalls aus andern Experimenten abgeleitet, als Nebenprodukt der Melanin-Biosynthese (Stierle *et al.* 1991). Stierle *et al.* (1991), sowie Abou-Mansour *et al.* (2003) geben zu bedenken, dass der Einsatz von Fungiziden, welche auf die Blockierung der Melanin-Biosynthese zur Verringerung der Pathogenität abzielen gleichzeitig, ungewollt zur Produktion von potenziell phytotoxischen Nebenprodukten führen kann. Dies kann wiederum die Pathogenität anderer Pilze erhöhen, deren Beeinflussung eigentlich ungewünscht ist. Auch wenn 4-Hydroxyscytalon aus einigen Arten der Familie Xylariaceae isoliert worden ist (z.B. *Daldinia*, *Annulohyphoxylon*), so ist dennoch hervorzuheben, dass dies der erste Nachweis für 4-Hydroxyscytalon aus einer *Biscogniauxia*-Art ist.

4.6.3.6. SG25-136

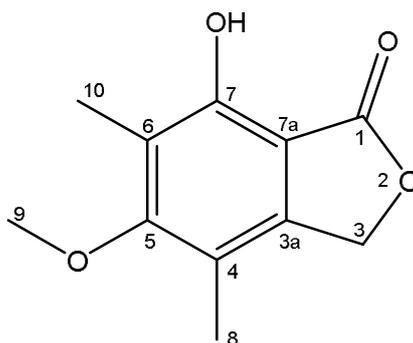


Abbildung 4.6.15. Struktur von Verbindung SG25-136 (eigene Darstellung).

Die Verbindung aus Abbildung 4.6.15. (SG25-136) wurde als farbloser Feststoff ($m = 20.7$ mg) nach SEC (50/50, % v/v, DCM/MeOH) aus der zwölften Hauptfraktion (SG25-E1-12, $m = 1.59$ g) isoliert. Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum ließ fünf isolierte Spinsysteme erkennen. Anhand der chemischen Verschiebung waren ein Proton im aromatischen Bereich (δH [ppm] = 7.66 (s breit, 1H, 7-OH)), eine oxygenierte Methylengruppe (δH [ppm] = 5.19 (s, 2H, H-3 und H-3')) und zwei aromatische/olefinische Methylgruppen (δH [ppm] = 2.18 (s, 3H, 10-H), 2.13 (s, 3H, 8-H)), sowie eine Methoxyfunktion (δH [ppm] = 3.76 (s, 3H, 9-H)) zu vermuten. Das Proton im aromatischen Verschiebungsbereich ließ sich durch HMQC-Signale allerdings eindeutig zu einem Heteroatom zugehörig einordnen. Das $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum verdeutlichte neben den bereits vermuteten Gruppen und der Gesamtanzahl an elf Kohlenstoffatomen noch sieben quaternäre, sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome in einem Verschiebungsbereich von 105-175 ppm. Zwei Verschiebungen (δC [ppm] = 173.1 (C-1), 163.9 (C-5)) zeigten zudem eine Sauerstofffunktionalisierung an, die bei der ersten zudem eine Carbonylfunktion involvierte. Betrachtungen der HMBC-Korrelationen zeigten, dass die Methoxygruppe als Methylether an C-5 (δC 163.9 ppm) positioniert war. Des Weiteren zeigten die Korrelation der Methylgruppen an $\delta\text{C} = 116.6$ ppm (C-4) und $\delta\text{C} = 118.6$ ppm (C-6) zu C-5, dass die Methoxygruppe zwischen den beiden aromatischen Methylgruppen liegen musste. Weitere Schlüsselsignale waren die Korrelationen der oxygenierten Methyleneinheit ($\delta\text{C} = 70.2$ ppm (C-3)) zum Einen zur Carbonylgruppe (C-2), welche zudem die einzige Korrelation zu dieser Funktion darstellte. Zum Anderen waren die Korrelation zum Anknüpfungspunkt der Methylgruppe an C-4 ($\delta\text{C} = 116.6$ ppm) und die Korrelation zu C-7a ($\delta\text{C} = 106.2$ ppm), welches ebenfalls die einzige C,H-Signalverknüpfung zu diesem Kohlenstoffatom darstellte, wichtige Signale zur Lösung der Molekülstruktur (Abbildung 4.6.16.). Das Proton am Heteroatom lieferte leider keine HMBC-Signal, welches die Position der OH-Gruppe an C-7 ($\delta\text{C} = 153.8$ ppm) eindeutig festgelegt hätte. Die Hochfeldverschiebung bzw. der abschirmende Effekt an C-7a ($\delta\text{C} = 106.2$ ppm) war allerdings in guter Übereinstimmung zur Carbonylfunktion in α -Position und *ortho*- bzw. *para*-Position der anderen Sauer-

stofffunktionalisierungen (Hydroxy- bzw. Methoxyfunktion). Das Selbe galt für die beobachtete Entschirmung bzw. Tieffeldverschiebung an C-3a ($\delta\text{C} = 143.5$ ppm), hier allerdings begründbar durch Carbonylfunktion in β -Position bzw. *dimeta*-Position der Hydroxy- bzw. Methoxygruppe. Die LC-MS-Messungen lieferten die Pseudomolekularionen jeweils bei positiver ($m/z = 209.0898$, $[\text{M}+\text{H}]^+$) und negativer Ionisierung ($m/z = 207.0411$, $[\text{M}-\text{H}]^-$), welche die Etablierung der Elementarzusammensetzung ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$) zuließ.

Die Bestätigung von vier Sauerstoffatomen aus LC-MS-Messungen ließ zudem nur den Ringschluss von C-1 zu C-3 zu einem Lacton und das Vorhandensein einer Hydroxyfunktion an C-7 zu. Die komplette Zuordnung der chemischen Verschiebungen und der Schlüsselkorrelationen ist in Abbildung 4.6.16. dargestellt.

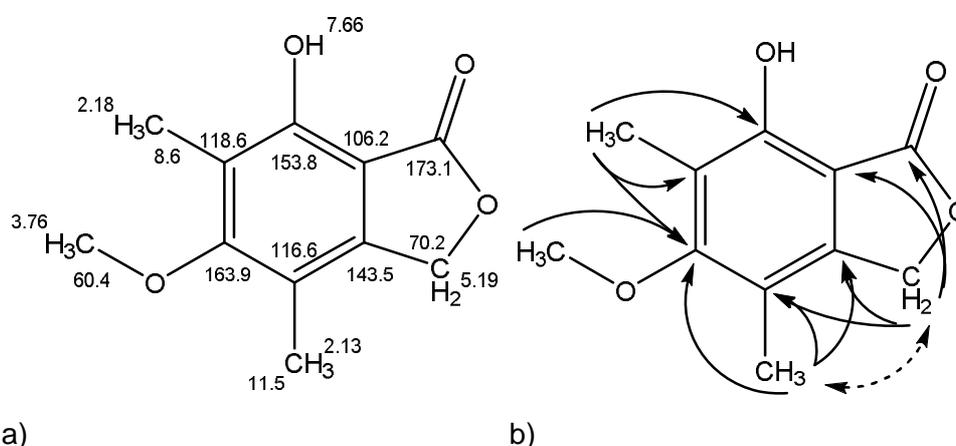


Abbildung 4.6.16.: a) Chemische Verschiebung von ^1H - und ^{13}C -Signalen, b) HMBC- (→) und NOESY- (- -) Schlüsselkorrelationen von SG25-119 in CDCl_3 (eigene Darstellung).

Die vorliegende Struktur (7-Hydroxy-5-methoxy-4,6-dimethylisobenzofuran-1(3*H*)-on) wurde bereits von Schneider *et al.* (1997) als Phthalidderivat aus einem mykophilen Pilz der Gattung *Hansfordia* isoliert. Allerdings wurde die Verbindung dort im Gegensatz zur eigenen Gewinnung (farbloser Feststoff) als farbloses Öl beschrieben. Ein Vergleich zeigte leichte Unterschiede der angegebenen NMR-Daten für die ^{13}C -Verschiebungen (Tabelle 4.6.2.). Zudem wurden die 2d-NMR-Korrelationen, die zur Begründung der Struktur führten nicht diskutiert bzw. angezeigt.

Nachfolgende Publikationen in denen diese Verbindung isoliert wurde, lieferten leider keine weiteren NMR-Daten zum Vergleich (vgl. Höller *et al.* 2000, Xing *et al.* 2011, Song *et al.* 2017b). Durch diese Umstände lag es nahe, andere Strukturisomere in Betracht zu ziehen (Abbildung 4.6.17.).

Tabelle 4.6.2.: Vergleich der chemischen ^{13}C -Verschiebungen (CDCl_3) mit Literatur (1 Schneider *et al.* 1997, $\text{CDCl}_3/\text{MeOH-D}_4$, 95/5, %v/v).

$\delta^{13}\text{C}$ [ppm]	$\delta^{13}\text{C}$ [ppm] ¹	Position	
173.1	173.8	O=C-O	C-1
163.9	163.8	C-O- (Ar)	C-5
153.8	155.9	qC-OH (Ar)	C-7
143.5	143.6	qC (Ar)	C-3a
118.6	118.7	qC (Ar)	C-6
116.6	114.9	qC (Ar)	C-4
106.2	105.6	qC (Ar)	C-7a
70.2	69.7	-O-CH ₂	C-3
60.4	60.1	-O-CH ₃	C-9
11.5	11.1	-CH ₃ (Ar)	C-8
8.6	8.5	-CH ₃ (Ar)	C-10

Die Variante mit dem β -Lacton-Ring (Abbildung 4.6.17a.) wird allerdings ausgeschlossen, da zwar Verbindungen mit diesem Grundgerüst (β -Salicylsäurelacton bzw. Benzoxet-2-on) bekannt sind diese aber allgemein instabil bzw. reaktiv sind (z.B. Wenstrup *et al.* 1987). Des Weiteren war die Kopplung der Methylenprotonen zur Carbonylgruppe sehr intensiv, was bei einer hierbei vorliegenden $^4J_{\text{C,H}}$ -Kopplung nicht wahrscheinlich ist. Die Variante in der die Hydroxylgruppe und die Methylengruppe auf derselben Molekülseite sind (Abbildung 4.6.16b.) wird durch die sehr schwache HMBC-Korrelation der Methylenprotonen zum Kohlenstoff mit der Hydroxylgruppe ($\delta\text{C} = 153.8$ ppm) ebenfalls ausgeschlossen. Diese müsste als $^3J_{\text{C,H}}$ -Kopplung eine hohe Signalintensität aufweisen, was allerdings nicht der Fall war.

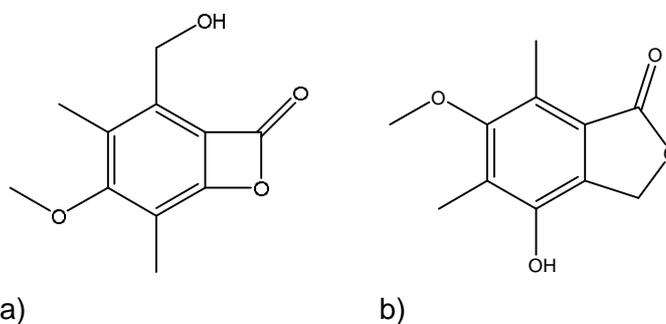


Abbildung 4.6.17.: Weitere diskutierte aber verworfene Strukturisomere von SG25-136 (eigene Darstellung).

Die bereits von Schneider *et al.* (1997) vorgestellte Verbindung (7-Hydroxy-5-Methoxy-4,6-Dimethylisobenzofuran-1(3*H*)-on) deckte die vorliegenden Korrelationen und Messwerte am besten ab. Die Unterschiede der Verschiebungswerte zur Literatur sind eventuell durch den geringen Zusatz an MeOD-D_4 zum verwendeten Lösemittel CDCl_3 in der Publikation von Schneider *et al.* (1997) erklärbar und bieten vor diesen Hintergrund dennoch gute Übereinstimmung zu den erhaltenen chemischen Verschiebungen.

Von der Isolierung der Verbindung wurde bisher exklusiv nur aus Pilzen berichtet. Dabei waren diese immer mit anderen Organismen, wie Pflanzen (endophytische *Pestalopsis* sp. von

Bruguiera gymnorrhiza bzw. *Photinia fraseri*) (Xing *et al.* 2011; Song *et al.* 2017b), marinen Schwämmen (*Monochaetia* sp. von *Callyspongia vaginalis*) (Höller *et al.* 2000) oder anderen Pilzen (*Hansfordia* sp. von *Tubaria* sp. Fruchtkörpern) (Schneider *et al.* 1997) assoziiert. Das Molekül zeigte antimykotische Eigenschaften speziell gegenüber Hefen (*Nadsonia fulvescens*, MIC: 48 µM; *Nematospora coryli*, MIC: 240 µM; *Rhodotorula glutinis*, MIC: 240 µM) und leichte zytotoxische Wirkung gegenüber verschiedenen Referenzzelllinien (z.B. HeLa S3, BHK21, etc. IC₅₀ > 250 µM). Sie war allerdings inaktiv (bis > 500 µM) gegenüber Bakterien (z.B. *B. subtilis*, *E. coli*, etc.) und Nematoden (*Caenorhabditis elegans* und *Meloidogyne incognita*) (Schneider *et al.* 1997). Von Holler *et al.* (2000) wurde die antimykotische Eigenschaft bestätigt und zusätzlich eine algizide Wirkung berichtet. Konträrerweise konnte Schneider *et al.* (1997) keine phytotoxische Aktivität gegenüber Gartenkresse- (*Lepidium sativum*) und Kolbenhirsekeimlingen (*Setaria italica*) feststellen.

Interessanterweise stellt SG25-136 ein Strukturelement von Mycophenolsäure dar (Abbildung 4.6.18.), welche unter anderem als ein lange bekanntes breitwirksames Antibiotikum (antibakteriell, antimykotisch, antiviral) mit weiteren pharmakologischen Eigenschaften (Immunsuppressivum, Antipsoriatikum) bekannt ist.

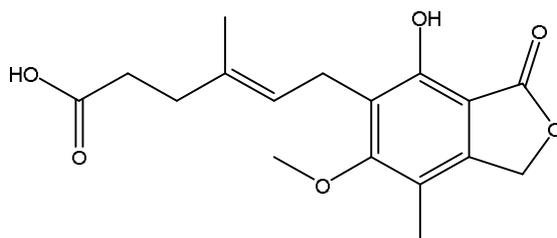


Abbildung 4.6.18.: Struktur von Mycophenolsäure (eigene Darstellung).

Es gilt als das Erste in Reinform isolierte Antibiotikum, dass bereits im Jahr 1893 vom Mediziner Bartolomeo Gosio entdeckt wurde. Später wurde es, viele Jahre vor Beschreibung des Penicillins durch A. Fleming, von Alsberg und Black in *Penicillium stoloniferum* (Syn. *P. brevicompactum*) wiederentdeckt (Demain & Zhang 2005). Mycophenolsäure wird derzeit in Form des Morpholinethylester (Mycophenolat Mofetil) als Prodrug zur Immunsuppression in Kombination mit Cyclosporinen und Corticosteroiden bei Organtransplantationen eingesetzt und galt als vielversprechend bei der Behandlung von Psoriasis (Silverman Kitchin *et al.* 1997).

Dies ist die erste Beschreibung dieses Isobenzofuranonderivats aus einer als Endophyt isolierten *Biscogniauxia* sp. und ist zudem, nach bisherigem Kenntnisstand, die erste Nennung eines Metaboliten aus der Strukturklasse der Phthalid- bzw. Isobenzofuranone für die Gattung *Biscogniauxia* überhaupt.

4.6.3.7. Weitere isolierte Metaboliten aus Stamm SG25

Des Weiteren wurden einfache Benzoessäurederivate, wie 4-Hydroxybenzoessäure (SG25-107, farbloser, kristalliner Feststoff ($m = 23.6$ mg), Abbildung 4.6.19a) und Protocatechusäure (SG25-124, farbloser, kristalliner Feststoff, ($m = 9.9$ mg), Abbildung 4.6.19b) im Extrakt detektiert. Sie sind häufige Produkte pflanzlicher Biosynthese und wurden in nahezu allen Organismengruppen (Pilze, Bakterien, Pflanzen, etc.) nachgewiesen. Sie werden weltweit im großen Maßstab synthetisch hergestellt, um als Additive zur Verlängerung der Haltbarkeit in Kosmetik- und Nahrungsmittelprodukten eingesetzt zu werden. Für *p*-Hydroxybenzoessäure und Protocatechusäure wurde darüber hinaus von viele biologischen Eigenschaften berichtet (antibakteriell, antiinflammatorisch, antioxidant, etc.) (Manuja *et al.* 2013). Vor allem aber sind ihre Ester (Parabene) durch den massiven Einsatz in Haushaltsprodukten und ihre Funktion als endokrine Disruptoren in Verruf geraten (Juliano & Magrini 2017, Patel 2017, Rattan *et al.* 2017).

Durch ihr ebenfalls bestätigtes Vorkommen in Reiskörnern (Shao & Bao 2018) und Reishüllen (Cho *et al.* 1998) konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Isolierung ein Artefakt aus dem verwendeten Reismedium darstellt. Aufgrund der einfachen synthetischen Zugänglichkeit, der geringen isolierten Mengen und der Gewinnungsmöglichkeit aus anderen Quellen, sind diese Naturstoffe des Endophyten von untergeordnetem Interesse.

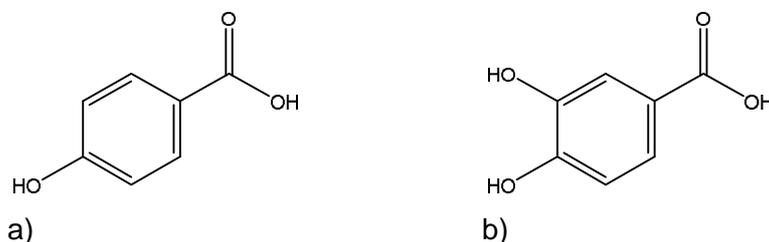


Abbildung 4.6.19.: Struktur von: a) SG25-107 (4-Hydroxybenzoessäure), b) SG25-124 (3,4-Hydroxybenzoessäure) (eigene Darstellung).

4.6.4. Zusammenfassung der Verbindungen aus Stamm SG25 und vergleichende Diskussion mit anderen Naturstoffstudien von *Biscogniauxia*-Arten

Aus dem EtOAc-Extrakt konnten insgesamt acht Komponenten isoliert und charakterisiert werden. Die hohe antibakterielle Aktivität des Rohextraktes aus kleinem Maßstab in Vorversuchen, welche unter anderem als Entscheidungskriterium für die mykochemische Untersuchung des Stammes diente, konnte bei der erneuten Kultivierung im größeren Maßstab leider nicht reproduziert werden. Trotz der Einhaltung konstanter Kultivierungsbedingungen (Temperatur, Lichtverhältnisse, Substrat/H₂O-Verhältnis, etc.) ließ sich nicht ausschließen, dass Temperaturschwankungen in Räumen (Kultivierung in Winter- vs. Sommermonaten) Einfluss auf das Metabolitprofil genommen haben könnten.

Allgemeine Aussagen zum Effekt der Temperatur auf Qualität und Quantität der Sekundärmetaboliten sind schwer möglich. Patil *et al.* 2016 beschrieb eine verringerte Metabolitproduktion bei höheren Temperaturen als das Wachstumsoptimum während der Submers-Fermentation von endophytischen Pilzen. Die Übertragbarkeit solcher Aussagen auf die Solid-State-Fermentation im Speziellen und im Allgemeinen auf die Kultivierung von Pilzen, insbesondere bei der phylogenetisch sehr vielfältigen und großen Gruppe endophytischer Pilze, bleibt fraglich. Dass die Kultivierungstemperatur Einfluss auf das Metabolitprofil nicht nur auf Organismen aus dem Reich der Pilze hat, steht allerdings außer Frage und wurde bei der Produktionsoptimierung für ausgewählte Naturstoffe, Mykotoxine (z.B. Naziri *et al.* 2014, Prendes *et al.* 2016), Enzyme (Mendoza *et al.* 2010, El-Hadi *et al.* 2014) oder Wirksamkeit von Extrakten (z.B. Gogoi *et al.* 2008, Mathan *et al.* 2013, Arumgam *et al.* 2015) mannigfaltig in Publikationen berichtet. Generelle Studien zur Auswirkung auf die qualitative Entwicklung des Metabolitprofils durch die Temperatur sind allerdings seltener vorhanden (z.B. Weinstein *et al.* 2000, Qui *et al.* 2018). Die eigenen gewählten Standard-Kultivierungsbedingungen (SSF auf Reis, 25 °C, t ~ 30 d) entsprechen aber den Bedingungen (Submers bzw. Solid-State-Fermentation, T = 20-30 °C, t = 7~35 d), die für viele Naturstoffstudien mit Endophyten gewählt wurden (vgl. Patil *et al.* 2016). Ein spezieller Metabolit bzw. eine Gruppe von Metaboliten, welche die hohe antibakterielle Aktivität, wie zum Beispiel im Stamm SG8c, erklärt, konnte leider nicht, auch nicht, wie anfänglich vermutet, in geringen Mengen, isoliert werden. Die einzige isolier- und charakterisierbare Verbindung aus der am stärksten antibakteriell aktiven Fraktion 17 war *p*-Hydroxybenzoesäure (SG25-107). Diese Verbindung ist zwar als antibakteriell bekannt und untersucht worden, allerdings ist sie wenig potent (z.B. IC₅₀ ~ 7000 µM, *B. subtilis*, Cho *et al.* 1998) und erklärt damit sicherlich nicht die beobachtete Aktivität der Fraktion, bzw. des ursprünglichen Extraktes. Möglich, aber schwerer zu reproduzieren, sind synergistische Effekte mit anderen Extraktmetaboliten, welche den antibakteriellen Effekt deutlich über den Effekt der einzelnen Komponenten hinaus verstärken.

Aus mykochemischen Untersuchungen von anderen *Biscogniauxia*-Arten sind zumindest antibakteriell aktive Verbindungen publiziert worden, wie zum Beispiel die antimykobakteriell potenten (MIC: 6 - 13 μM) Azaphilonderivate (*Biscogniazaphilon* A und *Biscogniazaphilon* B), isoliert aus *Biscogniauxia formosana* (Cheng *et al.* 2012). Ob Verbindungen dieser Strukturklasse ebenfalls vom *Biscogniauxia*-Stamm SG25 produziert werden können bzw. wurden und für die beobachtete antibakterielle Aktivität des Rohextraktes aus den Vortests verantwortlich ist, bleibt allerdings spekulativ.

Von den kürzlich als neu beschriebenen, bioaktiven und einzigartigen Verbindungen aus anderen *Biscogniauxia*-Arten, wie *Biscopyran* (Evidente *et al.* 2005), *Xylaranon* (Amand *et al.* 2012), *Biscogniauxon* (Wu *et al.* 2016b), *Biscognienyn* (A - C) und *Dimericbiscognienyn* (A - C) (Zhao *et al.* 2017b, Zhao *et al.* 2019) (Abbildung 4.6.19), konnten weiterhin keine anderen strukturell-verwandten Metaboliten isoliert werden.

Dennoch konnten aus dem Stamm SG25 sechs Verbindungen isoliert werden, die zuvor nicht aus *Biscogniauxia* Stämmen berichtet worden sind.

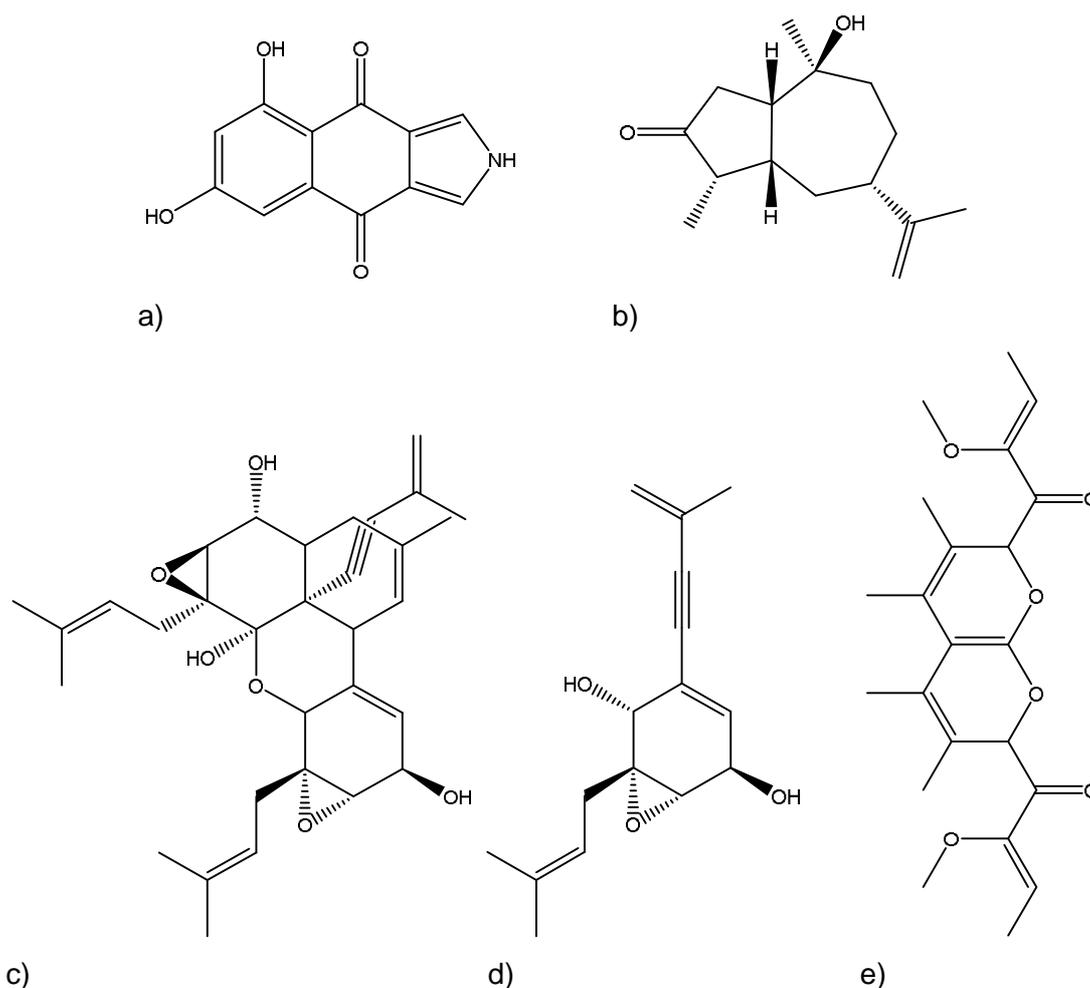


Abbildung 4.6.20.: In der Literatur neu beschriebene bioaktive Naturstoffe aus *Biscogniauxia*-Arten: a) *Biscogniauxon*, b) *Xylaranon*, c) *Dimericbiscognienyn* A, d) *Biscognienyn* B, e) *Biscopyran* (eigene Darstellung).

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1. Zusammenfassung

Im Rahmen der Arbeit wurden 55 endophytische Pilze aus verschiedenen Gewebetypen (Rinde, Blätter, etc.) und Wirtspflanzen unterschiedlicher Habitats (tropischer, gemäßigter Regenwald, Küstendünen, etc.) isoliert, kryopräserviert und über DNA-Barcoding (ITS- und LSU-rDNA) klassifiziert. Die Stämme zeigten eine breite taxonomische Verteilung mit dem Fokus auf Ascomycota und einem Schwerpunkt innerhalb der Klasse der Sordariomyceten und Dothideomyceten. Einige der isolierten Stämme verfügten bei der Identifizierung wenig Übereinstimmung zu den Arten der Referenzsequenzen, womit sie als potenziell neue oder wenig studierte Pilzarten erscheinen und somit interessante Studienobjekte für Metabolom-Untersuchungen darstellen.

Von den Endophyten wurden fünf Stämme, welche als *Purpureocillium lilacinum* (T26B), *Xylaria cubensis* (TS7), *Daldinia* sp. (SG1), Didymosphaeriaceae sp. (SG8c, cf. *Tremateia* sp.), *Biscogniauxia* sp. (SG25) klassifiziert wurden, anhand der antibakteriellen und zytotoxischen Aktivität ihrer Rohextrakte und aufgrund taxonomischer Gesichtspunkte für detaillierte mykochemische Untersuchungen ausgewählt. Eine Maßstabsvergrößerung der Kultivierung durch Solid-State-Fermentation auf Reis und der anschließenden Extraktion mit organischem Lösemittel (Essigsäureethylester) lieferte die Rohextrakte.

Die Isolierung und Strukturaufklärung der Pilzmetaboliten aus den Rohextrakten erfolgte durch kombinierte Bearbeitung mit chromatographischen Trenntechniken (LC, SEC, RP-HPLC, etc.) und der subsequenten, intensiven Analyse spektroskopischer ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC, UV/VIS, etc.) und massenspektrometrischer Daten (ESI-MS, EI-MS, etc.). Diese mykochemischen Untersuchungen resultierten in der Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von neun neuen, bisher nicht in der Literatur beschriebenen, sowie 55 bekannten Verbindungen. Zu den neu entdeckten Verbindungen gehören drei Depsidone (Tremateiasidon A - C), ein Depsid (Tremateiasid A), ein Pyranocoumarin (Tremateiajulin A) mit ungewöhnlichem Grundgerüst, ein monosulphatiertes Diketopiperazin ($^3\text{S-Norgliovictin}$), ein Chinon (Tremaquin A) und ein Isochroman (Tremachroman A), sowie ein Butenolid (Lilacinolid A) (Abbildung 5.1.). Des Weiteren repräsentierten die bekannten Verbindungen eine breite Auswahl chemisch diverser Naturstoffklassen (Depsidone, Peptide, Depsipeptide, Cytochalasane, Isocoumarine, Butenolide, Lipide etc.). Einige von diesen Molekülen wurden zudem das erste Mal als Metaboliten für die entsprechende Pilzart bzw. Pilzgattung beschrieben. Acht der neun neuen Verbindungen wurden aus dem schwer zu klassifizierenden Stamm SG8c der Familie der Didymosphaeriaceae (cf. *Tremateia* sp.) gewonnen. Die Hauptmetaboliten waren verschiedene Depsidone. Ein neues Butenolid (Lilacinolid A) wurde aus dem Stamm T26B (*Purpureocillium lilacinum*) isoliert. Weitere strukturell interessante

Verbindungen aus diesem Stamm mit antimikrobieller, insbesondere antiparasitärer Aktivität, waren die Leucinostatine. Das Vorhandensein eines bisher nicht bekannten Leucinostatinderivats (T26BI-106) wurde postuliert. Für den Stamm TS7 (*Xylaria cubensis*) wurden Cytochalasine als bestimmende Strukturklasse der isolierten Verbindungen nachgewiesen. Der Hauptmetabolit war Cytochalasin D. Die Cytochalasine waren maßgeblich für die beobachtete antiproliferative Wirkung des Rohextraktes verantwortlich. Des Weiteren wurde das selten isolierte, zyklische Depsipeptid Hirsutatin A gewonnen und erstmalig als Metabolit der Gattung *Xylaria* beschrieben. Für die Stämme SG1 (*Daldinia* sp.) und SG25 (*Biscogniauxia* sp.) konnten keine neuen Moleküle oder solche mit auffälliger antibakterieller oder zytotoxischer Aktivität erhalten werden. Als Hauptverbindung für SG1 wurde Hept-6-en-2,4,5-triol und ein weiterer für die Gattung *Daldinia* spezifischer Metabolit (Daldiniapyron) gewonnen. Die starke antibakterielle Wirkung des Rohextraktes von Stamm SG25 konnte in der Maßstabsvergrößerung der Kultivierung nicht reproduziert und eine aktive Komponente auch nicht in geringen Mengen isoliert werden. Allerdings wurde ein strukturell interessantes, selten beschriebenes Dinaphtalinonderivat (SG25-112) gewonnen, welches zudem erstmalig für die Gattung *Biscogniauxia* nachgewiesen wurde.

Einige der neuen und bekannten Verbindungen zeigten potente antibakterielle Wirkung gegenüber gram-positiven und gram-negativen Bakterien im niedrigen mikromolaren-Bereich, wie zum Beispiel Tremateiasid A (MIC: 3 μ M, 2 μ M) oder Tremateiasidon B (MIC: 38 μ M, 20 μ M) gegenüber *Bacillus subtilis* bzw. *Pseudomonas agarici*. Sie erzielten damit ähnliche Werte wie das Referenzantibiotikum (Gentamicin, MIC: 2 μ M, 16 μ M) oder übertrafen diese sogar. Bisher nicht verfügbare Kennzahlen (IC₅₀, MIC) zur antibiotischen Wirkung (gegen *B. subtilis* und *P. agarici*) der isolierten aber literaturbekannten Depsidone (z.B. Auranticin A und Auranticin B, Pilobolusone C) wurden ermittelt. Anhand dieser wurden Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der Depsidone aufgezeigt und diskutiert. Die neuen Moleküle wurden ebenfalls auf zytotoxische Effekte gegenüber einer Krebszelllinie (KB-3-1, Zervix-Karzinom) überprüft. Die Wirkung der Verbindungen war jedoch nur sehr schwach (IC₅₀: 50 - 150 μ M) ausgeprägt oder wurden als inaktiv (IC₅₀ > 500 μ M) bewertet. Darüber hinaus wurden weitere Verbindungen mit potenteren zytotoxischen Effekten isoliert. Die Kombination zweier dieser Metaboliten in einer Fraktion (Cytochalasin C, IC₅₀ ~ 0.5 μ g/ml und Griseofulvin, IC₅₀ = 7.1 μ g/ml) zeigten einen ausgeprägten synergistischen Effekt (IC₅₀ = 0.075 μ g/ml).

Zu den isolierten und charakterisierten Verbindungen wurden andere Produktionsorganismen und weitere Bioaktivitäten aufgezeigt, sowie mögliche biologische Funktionen und deren Relevanz für den Organismus diskutiert und im Kontext anderer Naturstoffstudien betrachtet. Die Arbeit konnte zeigen, dass endophytische Pilze eine gute Quelle strukturell neuer und bioaktiver Verbindungen sind und diese in zukünftigen Naturstoffuntersuchungen weiter erforscht werden sollten.

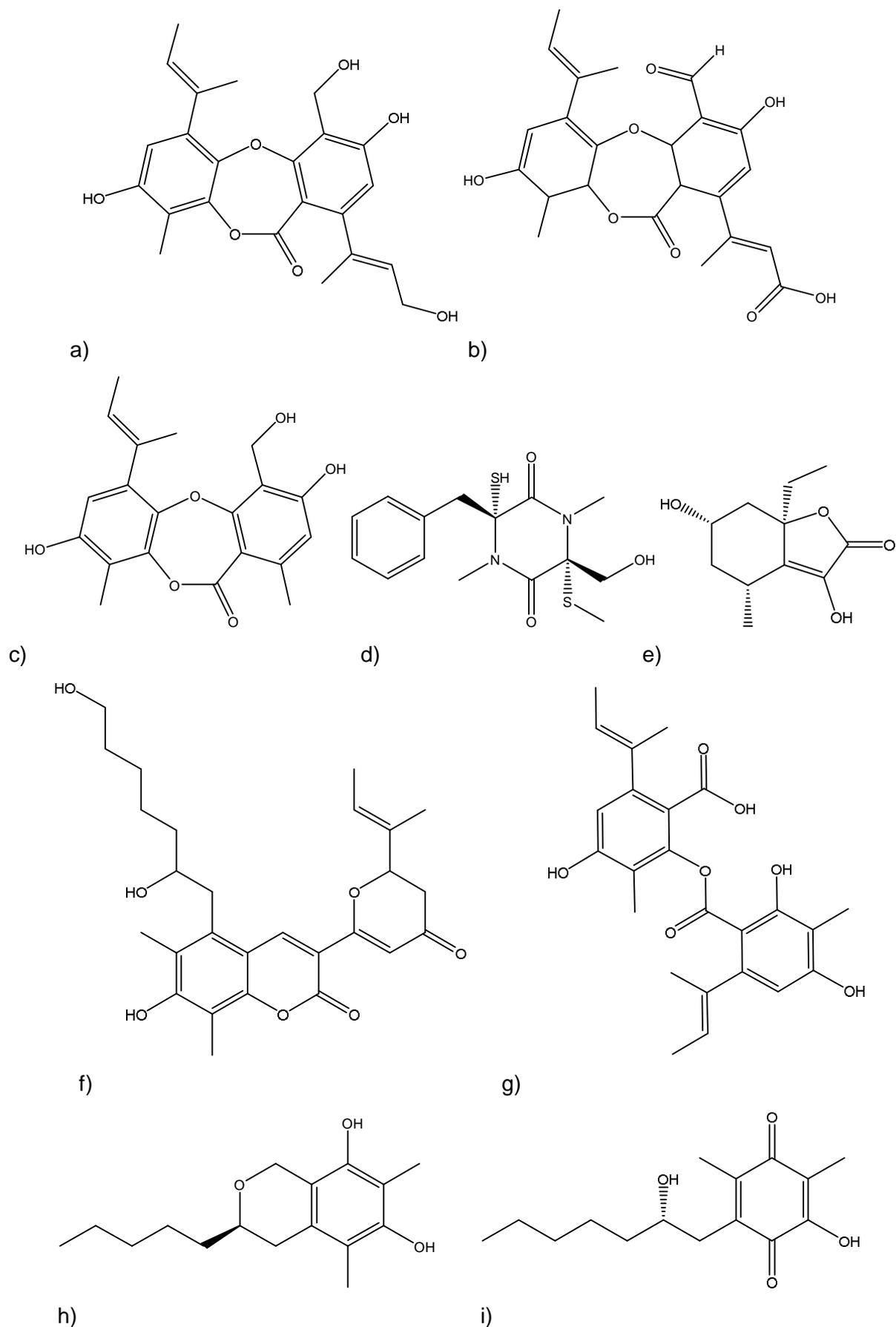


Abbildung 5.1.: Neu isolierte Naturstoffe: a) Tremateiasidon A, b) Tremateiasidon B, c) Tremateiasidon C, d) ³S-Norgliovictin, e) Lilacinolid, f) Tremateiajulin A, g) Tremateiasid A, h) Tremachroman A, i) Tremaquin A.

5.2. Ausblick

Mögliche Verbesserungen für zukünftige Arbeiten auf dem Gebiet der mykochemischen Untersuchungen mit dem Ziel einer erweiterten Metabolitenproduktion und einer umfassenderen Erfassung des Metabolitprofils beinhalten mehrere Bereiche.

Von der Kultivierungs- und Produktionsseite könnten Modifikationen der Kultivierungsbedingungen vorgenommen werden. Abseits einer Optimierung und Modifikation durch Temperatur, Kohlenstoffquelle, Precursor-Zugabe und der Kultivierungsdauer als klassische Parameter zur Produktionsoptimierung für die Gewinnung bestimmter Verbindungen, ist der Einsatz anderer Kultivierungsprinzipien denkbar. Zu diesen gehören unter anderem Methoden, wie OSMAC (one strain many compounds) (vgl. z.B. Paranagama *et al.* 2007, Hewage *et al.* 2014, Gubiani *et al.* 2016) oder die „co-cultivation“ mit einem anderen Mikroorganismus, welcher die vielfältigen mikrobiellen Interaktionen simulieren soll (vgl. z.B. Ola 2014, Schulz *et al.* 2015, Vinale *et al.* 2017). Des Weiteren ergibt sich die Möglichkeit zur Manipulation des Metabolitprofils über den Einsatz von spezifischen Elicitoren und Transkriptionsfaktoren (Nakazawa *et al.* 2012, Du *et al.* 2014). Speziell bei Endophyten besteht zudem eine weitere Maßnahme in der Stimulation der endophytischen Metabolitsynthese durch den Zusatz von Wirtspflanzenextrakt (Eevers *et al.* 2014) oder in „dual-cultur mit der jeweiligen Wirtspflanze (Ding *et al.* 2018). Die genannten Methoden sollen potenziell die Anregung stiller Biosynthesegene ermöglichen.

Unabhängig von den Kultivierungs-abhängigen Methoden sind DNA-basierte Methoden durch "genome mining" wertvolle Werkzeuge bei der Vorhersage und der tieferen Analyse potenziell erwartbarer Naturstoffe. Insbesondere kann diese Methode die chemische Vielfalt bisher unkultivierbarer Stämmen aufdecken und bei der Auswahl von vielversprechenden Stämmen für mykochemische Untersuchungen, vor allem bei Naturstoffklassen mit gut charakterisierten Biosynthesegenclustern (PKS, NRPS, PKS-NRPS), helfen.

Ein anderer Bereich für zukünftige Optimierungen betrifft die verbesserte Identifizierung und Dereplikation der Naturstoffe. Stetige Entwicklungen auf dem Gebiet der Mess- und Trenntechnik reduzieren die für die Analyse notwendige Stoffmenge (z.B. gekühlte Probenköpfe für NMR-Geräte) oder erhöhen die Trennungsleistung bzw. Auflösung der Metaboliten (z.B. Verringerung der Säulenpartikelgröße (UHPLC), Core-Shell-Säulen (Hayes *et al.* 2014)). Ebenso ergänzen Computer-assistierte Programme (z.B. NMRFAM-SPARKY, Lee *et al.* 2015) oder automatisierte Softwarelösungen (z.B.: ACD/Structure Elucidator Suite, ACD 2019) den Strukturaufklärungsprozess. Dies kann bei der Verknüpfung der Informationen aus den einzelnen NMR-Spektren helfen. Weiterentwicklungen in Bezug auf eine bessere Dereplikation existieren auch bei den online-zugängigen Verbindungs-Datenbanken, deren Inhalt und Abfrageparameter konstanten Erweiterungen unterliegen. Wünschenswert wäre die Möglichkeit einer plattformübergreifenden, direkten Einspeisung von spektroskopischen

und spektrometrischen Daten in einer Online-Datenbank mit Spezialisierung auf Naturstoffe als Open-Access-Lösung. Alternative wäre der Aufbau einer lokalen, arbeitsgruppeninternen Datenbank für zukünftige Arbeiten zu forcieren.

Oftmals werden in Publikationen zu neuen Naturstoffen gering modifizierte Verbindungen bereits bekannter Strukturen bzw. Strukturklassen berichtet. Die Entdeckung von neuen Derivaten bekannter chemischer Grundgerüste, unabhängig großer struktureller Neuerungen, ist dennoch wichtig, da bereits minimale Variationen am Molekül zu bedeutenden Änderung in der Aktivität führen können (Pye *et al.* 2018). Zudem sind die möglichen Zielstrukturen und die biologische Interaktion in lebenden Systemen und somit die Nutzung als potenzieller Wirkstoff für die meisten isolierten Metaboliten noch unbekannt.

Die Naturstoffisolierung und Naturstoffcharakterisierung wird demnach weiterhin wichtig für die Wirkstoffforschung bleiben und vielversprechende Verbindungen und Leitstrukturen hervorbringen. Ein weiterer zu betrachtender Punkt ist der Kombinationseffekt von zwei oder mehreren Komponenten eines Extraktes über die Summe der Einzelwirkungen hinaus. Dieser Umstand lässt Extrakte aus kultivierten Mikroorganismen als Objekte zur Wirkstoffgewinnung und Wirkstoffformulierung im Vergleich zu Einzelverbindungen aus synthetischen Substanzbibliotheken, insbesondere wegen der Möglichkeit zur Erstellung einfacher Formulierungen, weiterhin als interessant erscheinen. Zudem sind viele Naturstoffe aufgrund ihrer komplexen Struktur synthetisch schwer zugänglich, sodass deren Produktion und Extraktion innerhalb mikrobieller Kulturen anzustreben sein könnte.

Endophytische Pilze und deren Sekundärmetaboliten sind trotz verstärkter Forschungsanstrengungen immer noch wenig untersucht (Castillo & Strobel 2007, Verma & Gange 2014, Strobel 2018). Sie sind daher eine interessante Gruppe von Organismen mit dem Potenzial zur Bildung einzigartiger Naturstoffe und biologischer Interaktionen und sollten demnach weiter erforscht werden. Viele neue und bioaktive Verbindungen aus endophytischen Pilzen warten auf ihre Entdeckung.

Quellen und Literaturnachweise

- Abdalla, M. A. & Matasyoh, J. C. Endophytes as Producers of Peptides: An overview about the recently discovered peptides from endophytic microbes. *Natural Products and Bioprospecting* **4**, 257–270 (2014).
- Abdalla, M. A. & McGaw, L. J. Natural Cyclic Peptides as an attractive modality for therapeutics: A Mini Review. *Molecules* **23**, (2018).
- Abdou, R., Scherlach, K., Dahse, H.-M., Sattler, I. & Hertweck, C. Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* **71**, 110–116 (2010).
- Abdou, R. Bioactive secondary metabolites from the endophytic microorganisms of the medicinal plant *Bidens pilosa*. Dissertation Friedrich-Schiller-Universität Jena (2011).
- Abe, H., Ouchi, H., Sakashita, C., Kawada, M., Watanabe, T. & Shibasaki, M. Catalytic Asymmetric total synthesis and stereochemical revision of Leucinostatin A: A modulator of tumor-stroma interaction. *Chemistry - A European Journal* **23**, 11792–11796 (2017).
- Abe, H., Kawada, M., Sakashita, C., Watanabe, T. & Shibasaki, M. Structure-activity relationship study of leucinostatin A, a modulator of tumor–stroma interaction. *Tetrahedron* **74**, 5129–5137 (2018).
- Abou-Mansour, E., Couché, E. & Tabacchi, R. Do fungal naphthalenones have a role in the development of Esca symptoms? *Phytopathologia Mediterranea* **43**, (2004).
- Abramson, H. N. & Wormser, H. C. Synthesis of nectriapyrone. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **18**, 363–366 (1981).
- Abreu, L. M., Costa, S. S., Pfenning, L. H., Takahashi, J. A., Larsen, T. O. & Andersen, B. Chemical and molecular characterization of *Phomopsis* and *Cytospora*-like endophytes from different host plants in Brazil. *Fungal Biology* **116**, 249–260 (2012).
- ACD/Structure Elucidator Suite., Advanced Chemistry Development Inc., www.acdlabs.com, (2019).
- Acker, T. E., Brenneisen, P. E. & Tanenbaum, S. W. Isolation, structure, and radiochemical synthesis of 3,6-Dimethyl-4-hydroxy-2-pyrone. *Journal of the American Chemical Society* **88**, 834–837 (1966).
- Adam, H. K., Campbell, I. M. & McCorkindale, N. J. Ergosterol peroxide: a fungal artefact. *Nature* **216**, 397 (1967).
- Ainsworth, G. C. & Bisby, G. R. *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. (Commonwealth Agricultural Bureaux [for the] Commonwealth Mycological Institute, 1971).
- Akiyama, S., Fojo, A., Hanover, J. A., Pastan, I. & Gottesman, M. M. Isolation and genetic characterization of human KB cell lines resistant to multiple drugs. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **11**, 117–126 (1985).
- Aldridge, D. C., Armstrong, J. J., Speake, R. N. & Turner, W. B. The cytochalasins, a new class of biologically active mould metabolites. *Chemical Communications (London)* **26** (1967).
- Ali, T., Inagaki, M., Chai, H., Wieboldt, T., Rapplye, C. & Rakotondraibe, L. H. Halogenated compounds from directed fermentation of *Penicillium concentricum*, an endophytic fungus of the liverwort *Trichocolea tomentella*. *Journal of Natural Products* **80**, 1397–1403 (2017).
- Allport, D. C. & Bu'Lock, J. D. 134. Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*. *Journal of the Chemical Society* 654 (1960).

- Alsenani, F., Ahmed, F., Schenk, P.M. Nutraceuticals from microalgae. In: *Nutraceuticals and functional foods in human health and Disease Prevention*. (CRC Press, 2015).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403–410 (1990).
- Alvi, K. A., Nair, B., Pu, H., Ursino, R., Gallo, C. & Mocek, U. Phomacins: Three novel anti-tumor cytochalasan constituents produced by a *Phoma* sp. *The Journal of Organic Chemistry* **62**, 2148–2151 (1997).
- Aly, A. H., Edrada-Ebel, R., Wray, V., Müller, W. E. G., Kozytska, S., Hentschel, U., Proksch, P. & Ebel, R. Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* **69**, 1716–1725 (2008).
- Aly, A. H., Debbab, A. & Proksch, P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**, 1829–1845 (2011a).
- Aly, A. H., Debbab, A. & Proksch, P. Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity* **50**, 3–19 (2011b).
- Aly, A. H., Debbab, A. & Proksch, P. Fungal endophytes—secret producers of bioactive plant metabolites. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **68**, 499–505 (2013).
- Agatonovic-Kustrin, S. & Morton, D. W. Cosmeceuticals derived from bioactive substances found in marine algae. *Oceanography* **1**, 2 (2013).
- Amagata, T., Morinaka, B. I., Amagata, A., Tenney, K., Valeriote, F. A., Lobkovsky, E., Clardy, J. & Crews, P. A chemical study of cyclic depsipeptides produced by a sponge-derived fungus. *Journal of Natural Products* **69**, 1560–1565 (2006).
- Amand, S., Langenfeld, A., Blond, A., Dupont, J., Nay, B. & Prado, S. Guaiane sesquiterpenes from *Biscogniauxia nummularia* featuring potent antigerminative activity. *Journal of Natural Products* **75**, 798–801 (2012).
- Amarala, L. da S., Rodrigues-Filho, E., Santos, C. A. A., de Abreu, L. M. & Pfenning, L. H. An HPLC evaluation of cytochalasin D biosynthesis by *Xylaria arbuscula* cultivated in different media. *Natural Product Communications* **9**, 1279–1282 (2014).
- Andersen, B., Smedsgaard, J. & Frisvad, J. C. *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 2421–2428 (2004).
- Anderson, J. R., Edwards, R. L. & Whalley, A. J. S. Metabolites of the higher fungi. Part 21. 3-Methyl-3,4-dihydroisocoumarins and related compounds from the ascomycete family xylariaceae. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2185 (1983).
- Anke, H., Stadler, M., Mayer, A. & Sterner, O. Secondary metabolites with nematocidal and antimicrobial activity from nematophagous fungi and Ascomycetes. *Canadian Journal of Botany* **73**, 932–939 (1995).
- Arai, T., Mikami, Y., Fukushima, K., Utsumi, T. & Yazawa, K. A new antibiotic, leucinostatin, derived from *Penicillium lilacinum*. *The Journal of Antibiotics* **26**, 157–161 (1973).
- Araújo, É. J. F. de, Lima, L. K. F., Silva, O. A., JúNior, L. M. R., Gutierrez, S. J. C., Carvalho, F. A. de A., Lima, F. das C. A., Pessoa, C., Freitas, R. M. de & Ferreira, P. M. P. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A, an analog of the Amazon alkalimides from *Aniba riparia* (Lauraceae). *Acta Amazonica* **46**, 309–314 (2016).

- Ariyawansa, H. A., Hyde, K. D., Jayasiri, S. C., Buyck, B., Chethana, K. W. T., Dai, D. Q., Dai, Y. C., Daranagama, D. A., Jayawardena, R. S., Lücking, R., Ghobad-Nejhad, M., Niskanen, T., Thambugala, K. M., Voigt, K., Zhao, R. L., Li, G.-J., Doilom, M., Boonmee, S., Yang, Z. L., Cai, Q., Cui, Y.-Y., Bahkali, A. H., Chen, J., Cui, B. K., Chen, J. J., Dayarathne, M. C., Dissanayake, A. J., Ekanayaka, A. H., Hashimoto, A., Hongsanan, S., Jones, E. B. G., Larsson, E., Li, W. J., Li, Q.-R., Liu, J. K., Luo, Z. L., Maharachchikumbura, S. S. N., Mapook, A., McKenzie, E. H. C., Norphanphoun, C., Konta, S., Pang, K. L., Perera, R. H., Phookamsak, R., Phukhamsakda, C., Pinruan, U., Randrianjohany, E., Singtripop, C., Tanaka, K., Tian, C. M., Tibpromma, S., Abdel-Wahab, M. A., Wanasinghe, D. N., Wijayawardene, N. N., Zhang, J.-F., Zhang, H., Abdel-Aziz, F. A., Wedin, M., Westberg, M., Ammirati, J. F., Bulgakov, T. S., Lima, D. X., Callaghan, T. M., Callac, P., Chang, C.-H., Coca, L. F., Dal-Forno, M., Dollhofer, V., Fliegerová, K., Greiner, K., Griffith, G. W., Ho, H.-M., Hofstetter, V., Jeewon, R., Kang, J. C., Wen, T.-C., Kirk, P. M., Kytövuori, I., Lawrey, J. D., Xing, J., Li, H., Liu, Z. Y., Liu, X. Z., Liimatainen, K., Lumbsch, H. T., Matsumura, M., Moncada, B., Nuankaew, S., Parnmen, S., de Azevedo Santiago, A. L. C. M., Sommai, S., Song, Y., de Souza, C. A. F., de Souza-Motta, C. M., Su, H. Y., Suetrong, S., Wang, Y., Wei, S.-F., Wen, T. C., Yuan, H. S., Zhou, L. W., Réblová, M., Fournier, J., Camporesi, E., Luangsa-ard, J. J., Tسانathai, K., Khonsanit, A., Thanakitpipattana, D., Somrithipol, S., Diederich, P., Millanes, A. M., Common, R. S., Stadler, M., Yan, J. Y., Li, X., Lee, H. W., Nguyen, T. T. T., Lee, H. B., Battistin, E., Marsico, O., Vizzini, A., Vila, J., Ercole, E., Eberhardt, U., Simonini, G., Wen, H.-A., Chen, X.-H., Miettinen, O., Spirin, V. & Hernawati. Fungal diversity notes 111–252—taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Diversity* **75**, 27–274 (2015).
- Arnold, A. E., Maynard, Z., Gilbert, G. S., Coley, P. D. & Kursar, T. A. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse? *Ecology Letters* **3**, 267–274 (2000).
- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N. & Herre, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 15649–15654 (2003).
- Arnold, A. E. & Lutzoni, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology* **88**, 541–549 (2007).
- Arnold, A. E., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F. & Vilgalys, R. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia* **99**, 185–206 (2007).
- Arnone, A., Fronza, G., Mondelli, R. & Pyrek, J. S. ¹³C NMR analysis of anthraquinones as models for anthracycline Antibiotics. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **28**, 69–79 (1977).
- Arumugam, G. K., Srinivasan, S. K., Joshi, G., Gopal, D. & Ramalingam, K. Production and characterization of bioactive metabolites from piezotolerant deep sea fungus *Nigrospora* sp. in submerged fermentation. *Journal of Applied Microbiology* **118**, 99–111 (2015).
- Arunpanichlert, J., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Supaphon, O. & Sakayaroj, J. Xylariphilone: a new azaphilone derivative from the seagrass-derived fungus *Xylariales* sp. PSU-ES163. *Natural Product Research* **30**, 46–51 (2016).
- Ayer, W. A., Browne, L. M. & Lin, G. Metabolites of *Leptographium wageneri*, the causative agent of black stain root disease of conifers. *Journal of Natural Products* **52**, 119–129 (1989).
- Ayer, W. A. & Miao, S. Secondary metabolites of the aspen fungus *Stachybotrys cylindrospora*. *Canadian Journal of Chemistry* **71**, 487–493 (1993).

- Ayer, W. A., Gökdemir, T., Miao, S. & Trifonov, L. S. Leptosphaerones A and B, New Cyclohexenones from *Leptosphaeria herpotrichoides*. *Journal of Natural Products* **56**, 1647–1650 (1993b).
- Babij, N. R., McCusker, E. O., Whiteker, G. T., Canturk, B., Choy, N., Creemer, L. C., Amicis, C. V. D., Hewlett, N. M., Johnson, P. L., Knobelsdorf, J. A., Li, F., Lorsbach, B. A., Nugent, B. M., Ryan, S. J., Smith, M. R. & Yang, Q. NMR chemical shifts of trace impurities: Industrially preferred solvents used in process and green chemistry. *Organic Process Research & Development* **20**, 661–667 (2016).
- Bachmann, B. O., Van Lanen, S. G. & Baltz, R. H. Microbial genome mining for accelerated natural products discovery: is a renaissance in the making? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **41**, 175–184 (2014).
- Bacon, C. W. & White, J. F. in *Biotechnology of endophytic fungi of grasses* 47–56 (CRC Press, 1994).
- Bakiri, A., Hubert, J., Reynaud, R., Lanthony, S., Harakat, D., Renault, J.-H. & Nuzillard, J.-M. Computer-aided ¹³C-NMR chemical profiling of crude natural extracts without fractionation. *Journal of Natural Products* **80**, 1387–1396 (2017).
- Ballio, A., Barcellona, S. & Santurbano, B. 5-Methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin. *Tetrahedron Letters* **7**, 3723–3726 (1966).
- Barbosa-Filho, J. M., Yoshida, M., Gottlieb, O. R., de CSBC Barbosa, R., Giesbrecht, A. M. & Young, M. C. M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry* **26**, 2615–2617 (1987).
- Barnes, E. C., Jumpathong, J., Lumyong, S., Voigt, K. & Hertweck, C. Daldionin, an unprecedented binaphthyl derivative, and diverse polyketide congeners from a fungal orchid endophyte. *Chem. Eur. J.* **22**, 4551–4555 (2016).
- Barrow, R. A. in *Natural Products Isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 391–414 (Humana Press, 2006).
- Becam, J., Walter, T., Burgert, A., Schlegel, J., Sauer, M., Seibel, J. & Schubert-Unkmeir, A. Antibacterial activity of ceramide and ceramide analogs against pathogenic *Neisseria*. *Scientific Reports - Nature* **7**, 17627 (2017).
- Beck, A., Goetsch, L., Dumontet, C. & Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nature Reviews Drug Discovery* **16**, 315–337 (2017).
- Begerow, D., Nilsson, H., Unterseher, M. & Maier, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**, 99–108 (2010).
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. & Kauserud, H. avar. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology* **10**, 189 (2010).
- Belsito, D., Bickers, D., Bruze, M., Calow, P., Greim, H., Hanifin, J. M., Rogers, A. E., Saurat, J. H., Sipes, I. G. & Tagami, H. A toxicologic and dermatologic assessment of salicylates when used as fragrance ingredients. *Food and Chemical Toxicology* **45**, S318–S361 (2007).
- Bene, K., Sinan, K. I., Zengin, G., Diuzheva, A., Jekő, J., Cziáky, Z., Aumeeruddy, M. Z., Xiao, J. & Mahomoodally, M. F. A multidirectional investigation of stem bark extracts of four African plants: HPLC-MS/MS profiling and biological potentials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **168**, 217–224 (2019).
- Bich, T. T. N. & Kato-Noguchi, H. Isolation and identification of a phytotoxic substance from the emergent macrophyte *Centrostachys aquatica*. *Botanical Studies* **55**, 59 (2014).

- Biemann, K. Structuredetermination of natural products by mass spectrometry. *Annual Review of Analytical Chemistry* **8**, 1–19 (2015).
- Binder, M. & Tamm, C. The Cytochalasans: A new class of biologically active microbial metabolites. *Angewandte Chemie International Edition in English* **12**, 370–380 (1973).
- Binder, M., Tamm, C., Turner, W. B. & Minato, H. Nomenclature of a class of biologically active mould metabolites: the cytochalasins, phomins, and zygosporins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1146 (1973).
- Blackwell, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* **98**, 426–438 (2011).
- Bladt, T., Frisvad, J., Knudsen, P. & Larsen, T. Anticancer and Antifungal Compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous Fungi. *Molecules* **18**, 11338–11376 (2013).
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., Medema, M. H. & Weber, T. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research* **47**, W81–W87 (2019).
- Bogner, T. Cryptophycin Analoga: Synthese, Konjugation und biologische Studien. Dissertation Universität Bielefeld (2011).
- Bohlin, L., Göransson, U., Alsmark, C., Weden, C. & Backlund, A. Natural products in modern life science. *Phytochemistry Reviews* **9**, 279–301 (2010).
- Boilard, E., Nigrovic, P. A., Larabee, K., Watts, G. F. M., Coblyn, J. S., Weinblatt, M. E., Massarotti, E. M., Remold-O'Donnell, E., Farndale, R. W., Ware, J. & Lee, D. M. Platelets amplify inflammation in arthritis via collagen-dependent microparticle production. *Science* **327**, 580–583 (2010).
- Bokulich, N. A. & Mills, D. A. Improved selection of internal transcribed spacer-specific primers enables quantitative, ultra-high-throughput profiling of fungal communities. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 2519–2526 (2013).
- Borthwick, A. D. 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews* **112**, 3641–3716 (2012).
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S. & Matern, U. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews* **5**, 293–308 (2006).
- Bouslimani, A., Sanchez, L. M., Garg, N. & Dorrestein, P. C. Mass spectrometry of natural products: current, emerging and future technologies. *Natural Product Reports* **31**, 718 (2014).
- Brahamanage, R., Hyde, K. D., Li, X. H., Zhang, W., Liu, M., Jayawardena, R. S., McKenzie, E. H. C. & Yan, J. Are pathogenic isolates of *Stemphylium* host specific and cosmopolitan? *PPQ* **8**, 153–164 (2018).
- Brenneisen, P. E., Acker, T. E. & Tanenbaum, S. W. Isolation and structure of a Methyltriacetic Lactone from *Penicillium stipitatum*. *Journal of the American Chemical Society* **86**, 1264–1265 (1964).
- Bridge, P. D., Roberts, P. J., Spooner, B. M. & Panchal, G. On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist* **160**, 43–48 (2003).
- Bridge, P. D., Spooner, B. M. & Roberts, P. J. Reliability and use of published sequence data: Letters. *New Phytologist* **161**, 15–17 (2004).
- Brooks, C. J. W., Eglinton, G. & Magrill, D. S. 55. The constitution of an oxidation product of β -ionone. *Journal of the Chemical Society* **0**, 308–310 (1961).

- Brossi, A., Baumann, M. & Burkhardt, F. Syntheseveruche in der Griseofulvinreihe. 5. Mitteilung. Zur Synthese von (-)- und (+)-Griseofulvin und ihrer Diastereomeren. *Helvetica Chimica Acta* **45**, 1292–1297 (1962).
- Bross-Walch, N., Kühn, T., Moskau, D. & Zerbe, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. *Chemistry & biodiversity* **2**, 147–177 (2005).
- Brown, S. S. & Spudich, J. A. Mechanism of action of cytochalasin: evidence that it binds to actin filament ends. *The Journal of Cell Biology* **88**, 487–491 (1981).
- Brzonkalik, D.-B. K. Process development for the production of *Alternaria* toxins in a bioreactor. (2011).
- Burkhardt, I. & Dickschat, J. S. Synthesis and absolute configuration of natural 2-pyrones: *European Journal of Organic Chemistry* **2018**, 3144–3157 (2018).
- Bürki, N., Michel, A. & Tabacchi, R. Naphthalenones and isocoumarins of the fungus *Ceratomyces fimbriata* f. sp. *platani*. *Phytopathologia Mediterranea* **42**, 191–198 (2003).
- Bussmann, R. W. The globalization of traditional medicine in northern Peru: From shamanism to molecules. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2013**, 1–46 (2013).
- Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* **67**, 2141–2153 (2004).
- Buu-Hoï, Ng. Ph. & Lavit, D. 466. 1,8-Dihydroxynaphthalene. *Journal of the Chemical Society* **0**, 2412–2415 (1956).
- Cai, R., Chen, S., Long, Y., Li, C., Huang, X. & She, Z. Depsidones from *Talaromyces stipitatus* SK-4, an endophytic fungus of the mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Phytochemistry Letters* **20**, 196–199 (2017).
- Cambie, R. C., Lal, A. R., Rutledge, P. S. & Woodgate, P. D. Ent-14[S],16 β ,17-trihydroxyatisan-3-one and further constituents from *Euphorbia fidjiana*. *Phytochemistry* **30**, 287–292 (1991).
- Cannell, R. J. P. How to Approach the Isolation of a Natural Product. in *Natural products isolation* (ed. Cannell, R. J. P.) **4**, 1–51 (Humana Press, 1998).
- Cantrell, C. L., Dayan, F. E. & Duke, S. O. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products* **75**, 1231–1242 (2012).
- Cao, S., Lee, A. S. Y., Huang, Y., Flotow, H., Ng, S., Butler, M. S. & Buss, A. D. Agonodepsides A and B: Two new depsides from a filamentous fungus F7524. *Journal of Natural Products* **65**, 1037–1038 (2002).
- Carpenter, R. C., Sotheeswaran, S., Sultanbanwa, M. U. & Balasubramaniam, S. (-)-5-Methylmellein and catechol derivatives from four *Semecarpus* species. *Phytochemistry* **19**, 445–447 (1980).
- Carroll, G. Forest endophytes: pattern and process. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1316–1324 (1995).
- Casella, J. F., Flanagan, M. D. & Lin, S. Cytochalasin D inhibits actin polymerization and induces depolymerization of actin filaments formed during platelet shape change. *Nature* **293**, 302–305 (1981).
- Casi, G. & Neri, D. Antibody-drug conjugates and small molecule-drug conjugates: opportunities and challenges for the development of selective anticancer cytotoxic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **58**, 8751–8761 (2015).
- Castillo, U. & Strobel, G. in *Bioactive Natural Products* (eds. Molyneux, R. & Colegate, S.) 371–390 (CRC Press, 2007).

- Catão, R. M. R., Barbosa-Filho, J. M., de Oliveira Lima, E., do Socorro, M., Pereira, V., Ramos da Silva, M. A., Antunes de Arruda, T. & Pessoa Antunes, R. M. Evaluation of the antimicrobial activity and biological effect by riparins about elimination the resistance of drugs in samples of *Staphylococcus aureus*. *RBAC Revista Brasileira de Análises Clínicas* **42**, 9–14 (2010).
- Chandra, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**, 47–59 (2012).
- Chang, C.-W., Chang, H.-S., Cheng, M.-J., Liu, T.-W., Hsieh, S.-Y., Yuan, G.-F. & Chen, I.-S. Inhibitory effects of constituents of an endophytic fungus *Hypoxylon investiens* on nitric oxide and interleukin-6 production in RAW264.7 macrophages. *Chemistry & Biodiversity* **11**, 949–961 (2014).
- Chang, S. T. & Buswell, J. A. Nutraceuticals from mushrooms. *Biotechnology-Volume VII: Fundamentals in Biotechnology* **7**, 53 (2009).
- Chapla, V. M., Zeraik, M. L., Ximenes, V. F., Zanardi, L. M., Lopes, M. N., Cavalheiro, A. J., Silva, D. H. S., Young, M. C. M., Fonseca, L. M. da, Bolzani, V. S. & Araújo, A. R. Bioactive secondary metabolites from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus from *Senna spectabilis*. *Molecules* **19**, 6597–6608 (2014).
- Chapla, V., Zeraik, M., Cafeu, M., Silva, G., Cavalheiro, A., Bolzani, V., Young, M., Pfenning, L. & Araujo, A. Griseofulvin, diketopiperazines and cytochalasins from endophytic fungi *Colletotrichum crassipes* and *Xylaria* sp., and their antifungal, antioxidant and anticholinesterase activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2018).
- Chaverri, P., Branco-Rocha, F., Jaklitsch, W., Gazis, R., Degenkolb, T. & Samuels, G. J. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia* **107**, 558–590 (2015).
- Chen, Y.-J., Li, Y., Chen, J.-J. & Gao, K. Benzofuran Derivatives from *Gerbera saxatilis*. *Helvetica Chimica Acta* **90**, 176–182 (2007).
- Chen, S., Liu, Z., Liu, Y., Lu, Y., He, L. & She, Z. New depsidones and isoindolinones from the mangrove endophytic fungus *Meyerozyma guilliermondii* (HZ-Y₂) isolated from the South China Sea. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **11**, 1187–1193 (2015).
- Chen, Z., Chen, Y., Huang, H., Yang, H., Zhang, W., Sun, Y. & Wen, J. Cytochalasin P1, a new cytochalasin from the marine-derived fungus *Xylaria* sp. SOF11. *Z. Naturforsch., C, Journal of Biosciences*. **72**, 129–132 (2017).
- Chen, G.-Y., Zhang, B., Zhao, T., Nidhal, N., Jia-Li, W., Zhou, X.-M. & Chun-Yan, D. A new triterpenoid glucoside from *Leucas zeylanica*. *Natural Product Research* 1–5 (2019).
- Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Hsieh, S.-Y., Hsieh, M.-T., Chen, I.-S. & Yuan, G.-F. Constituents of the Endophytic Fungus *Annulohypoxylon boveri* var. *microspora* BCRC 34012. *Helvetica Chimica Acta* **94**, 1108–1114 (2011).
- Cheng, M.-J., Wu, M.-D., Yanai, H., Su, Y.-S., Chen, I.-S., Yuan, G.-F., Hsieh, S.-Y. & Chen, J.-J. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. *Phytochemistry Letters* **5**, 467–472 (2012).
- Chin, Y.-W., Chai, H.-B., Keller, W. J. & Kinghorn, A. D. Lignans and other constituents of the fruits of *Euterpe oleracea* (Açaí) with antioxidant and cytoprotective activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 7759–7764 (2008).
- Cho, J.-Y., Moon, J.-H., Seong, K.-Y. & Park, K.-H. Antimicrobial Activity of 4-Hydroxybenzoic Acid and *trans* 4-Hydroxycinnamic Acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**, 2273–2276 (1998).

- Chomcheon, P., Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Ngamrojanavanich, N., Kengtong, S., Mahidol, C., Ruchirawat, S. & Kittakoop, P. Aromatase inhibitory, radical scavenging, and antioxidant activities of depsidones and diaryl ethers from the endophytic fungus *Corynespora cassiicola* L36. *Phytochemistry* **70**, 407–413 (2009).
- Clark, B., Capon, R. J., Lacey, E., Tennant, S., Gill, J. H., Bulheller, B. & Bringmann, G. Gymnoascolides A–C: Aromatic butenolides from an Australian isolate of the soil Ascomycete *Gymnoascus reessii*. *Journal of Natural Products* **68**, 1226–1230 (2005).
- Clay, K. & Schardl, C. Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **160**, S99–S127 (2002).
- Claydon, N., Grove, J. F. & Pople, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. *Phytochemistry* **24**, 937–943 (1985).
- Colom, O. A., Popich, S. & Bardon, A. Bioactive constituents from *Rollinia emarginata* (Annonaceae). *Natural Product Research* **21**, 254–259 (2007).
- Comby, M., Lacoste, S., Baillieul, F., Profizi, C. & Dupont, J. Spatial and temporal variation of cultivable communities of co-occurring endophytes and pathogens in wheat. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
- Conegero, L. de S., Ide, R. M., Nazari, A. S., Sarragiotto, M. H., Dias Filho, B. P., Nakamura, C. V., Carvalho, J. E. de & Foglio, M. A. Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). *Quimica Nova* **26**, 825–827 (2003).
- Conti, R., Chagas, F. O., Caraballo-Rodriguez, A. M., Melo, W. G. da P., do Nascimento, A. M., Cavalcanti, B. C., de Moraes, M. O., Pessoa, C., Costa-Lotufo, L. V., Krogh, R., Andricopulo, A. D., Lopes, N. P. & Pupo, M. T. Endophytic Actinobacteria from the Brazilian Medicinal Plant *Lychnophora ericoides* MART and the biological potential of their secondary metabolites. *Chemistry & Biodiversity* **13**, 727–736 (2016).
- Cordero, R. J. B. & Casadevall, A. Functions of fungal melanin beyond virulence. *Fungal Biology Reviews* **31**, 99–112 (2017).
- Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**, 3670–3695 (2013).
- Crebelli, R., Carere, A., Conti, G., Conti, L., Rossi, C. & Tuttobello, L. Evaluation of the mutagenic activity of leucinostatins, a novel class of antibiotic peptides produced by *Paecilomyces marquandii*, in the model *Aspergillus nidulans*. *Microbiologica* **11**, 299–305 (1988).
- Crous, P. W., Gams, W., Stalpers, J. A., Robert, V. & Stegehuis, G. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in Mycology* **50**, 19–22 (2004).
- Csermely, P., Radics, L., Rossi, C., Szamel, M., Ricci, M., Mihály, K. & Somogyi, J. The nonapeptide leucinostatin A acts as a weak ionophore and as an immunosuppressant on T lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1221**, 125–132 (1994).
- Cueto, M., Jensen, P. R. & Fenical, W. N-Methylsalsalvamide, a cytotoxic cyclic depsipeptide from a marine fungus of the genus *Fusarium*. *Phytochemistry* **55**, 223–226 (2000).
- Dahiya, J. S. & Rimmer, S. R. Accumulation of flaviolin, 4-hydroxyscytalone and 2-hydroxyjuglone in tricyclazole-treated cultures of *Leptosphaeria maculans*. *Phytochemistry* **27**, 3481–3482 (1988).
- Dai, J., Krohn, K., Flörke, U., Draeger, S., Schulz, B., Kiss-Szikszai, A., Antus, S., Kurtán, T. & van Ree, T. Metabolites from the endophytic fungus *Nodulisporium* sp. from *Juniperus cedre*. *European Journal of Organic Chemistry* **2006**, 3498–3506 (2006).

- Dai, J., Krohn, K., Draeger, S. & Schulz, B. New naphthalene-chroman coupling products from the endophytic fungus, *Nodulisporium* sp. from *Erica arborea*. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 1564–1569 (2009).
- Davidova, A., Landi-Vittory, L. G. & Gramiccioni, L. Salicylamides. *Bollettino Chimico Farmaceutico* **104**, (1965).
- Davis, S. C. & Perez, R. Cosmeceuticals and natural products: wound healing. *Clinics in Dermatology* **27**, 502–506 (2009).
- De Alvarenga, M. A., Fo, R. B., Gottlieb, O. R., de P. Dias, J. P., Magalhães, A. F., Magalhães, E. G., de Magalhães, G. C., Magalhães, M. T., Maia, J. G. S. & Marques, R. Dihydroisocoumarins and phthalide from wood samples infested by fungi. *Phytochemistry* **17**, 511–516 (1978).
- De Carvalho, A. M. R., Rocha, N. F. M., Vasconcelos, L. F., Rios, E. R. V., Dias, M. L., Silva, M. I. G., de França Fonteles, M. M., Filho, J. M. B., Gutierrez, S. J. C. & de Sousa, F. C. F. Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. *Chemico-Biological Interactions* **205**, 165–172 (2013).
- De Medeiros, L. S., Murgu, M., de Souza, A. Q. L. & Rodrigues-Fo., E. Antimicrobial Depsides Produced by *Cladosporium uredinicola*, an endophytic fungus isolated from *Psidium guajava* fruits. *Helvetica Chimica Acta* **94**, 1077–1084 (2011).
- De Queiroz, J. H., Barbosa, L. C., Carvalho, M. R. & Howarth, O. W. Complete ¹H and ¹³C-NMR signal assignments of ergosterol peroxide isolated from *Aspergillus versicolor*. *Ciência & Engenharia* **10**, 14–17 (2001).
- De Sousa, F. C. F., Monteiro, A. P., de Melo, C. T. V., de Oliveira, G. R., Vasconcelos, S. M. M., de França Fonteles, M. M., Gutierrez, S. J. C., Barbosa-Filho, J. M. & Viana, G. S. B. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. *Phytotherapy Research* **19**, 1005–1008 (2005).
- De Sousa, F. C. F., Leite, C. P., de Melo, C. T. V., de Araújo, F. L. O., Gutierrez, S. J. C., Barbosa-Filho, J. M., de Fonteles, M. M. F., de Vasconcelos, S. M. M. & de Barros Viana, G. S. Evaluation of effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauracea) in anxiety models in Mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **30**, 1212–1216 (2007).
- DeCorte, B. L. Underexplored opportunities for natural products in drug discovery: Miniperspective. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 9295–9304 (2016).
- Degenkolb, T., Berg, A., Gams, W., Schlegel, B. & Gräfe, U. The occurrence of peptaibols and structurally related peptaibiotics in fungi and their mass spectrometric identification via diagnostic fragment ions. *Journal of Peptide Science* **9**, 666–678 (2003).
- Demain, A. L. & Zhang, L. Natural Products and Drug Discovery. in *Natural Products - Drug Discovery and Therapeutic Medicine* 3–29 (Humana Press, 2005).
- Deshpande, V., Wang, Q., Greenfield, P., Charleston, M., Porrás-Alfaro, A., Kuske, C. R., Cole, J. R., Midgley, D. J. & Tran-Dinh, N. Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* **108**, 1–5 (2016).
- Dhanasekaran, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N. & Panneerselvam, A. in *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology* (ed. Guevara-Gonzalez, R. G.) (Intech, 2011).
- Dickschat, J. S., Wang, T. & Stadler, M. Volatiles from the xylarialean fungus *Hypoxylon invadens*. *Beilstein The Journal of Organic Chemistry* **14**, 734–746 (2018).
- Dillard, C. J. & German, J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**, 1744–1756 (2000).

- Ding, C., Wang, Q.-B., Guo, S. & Wang, Z. The improvement of bioactive secondary metabolites accumulation in *Rumex gmelini* Turcz through co-culture with endophytic fungi. *Brazilian Journal of Microbiology* **49**, 362–369 (2018).
- Dolomanov, O. V., Bourhis, L. J., Gildea, R. J., Howard, J. A. K. & Puschmann, H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography* **42**, 339–341 (2009).
- Dorn, F. & Arigoni, D. Gliovictin, ein neuer Metabolit von *Helminthosporium victoriae*. *Experientia* **30**, 134–135 (1974).
- Dosio, F., Ricci, M., Brusa, P., Rossi, C. & Cattel, L. Antibody-targeted leucinostatin A. *Journal of Controlled Release* **32**, 37–44 (1994).
- Du, L., King, J. B. & Cichewicz, R. H. Chlorinated polyketide obtained from a *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier Suberoylanilide Hydroxamic Acid. *Journal of Natural Products* **77**, 2454–2458 (2014).
- Dugrand-Judek, A., Olry, A., Hehn, A., Costantino, G., Ollitrault, P., Froelicher, Y. & Bourgaud, F. The distribution of coumarins and furanocoumarins in citrus species closely matches citrus phylogeny and reflects the organization of biosynthetic Pathways. *PLOS ONE* **10**, e0142757 (2015).
- Durham, D. G. Isolation by Ion-Exchange Methods in *Natural products isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 159–183 (Humana Press, 2006).
- Eberhardt, U. in *DNA Barcodes* (eds. Kress, W. J. & Erickson, D. L.) **858**, 183–205 (Humana Press, 2012).
- Edwards, R. L., Maitland, D. J. & Whalley, A. J. S. Metabolites of the higher fungi. Part 26. Cubenic acid, 3,7,11,15-tetra hydroxy-18-(hydroxymethyl)-2,4,6,10,14,16,20-heptamethyldocosa-4E,8E,12E,16E-tetraenoic acid, a novel polysubstituted C22 fatty acid from the fungus *Xylaria cubensis* (Mont.) Fr. with substituents and substitution pattern similar to the macrolide antibiotics. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1411 (1991).
- Eevers, N., Gielen, M., Sánchez-López, A., Jaspers, S., White, J. C., Vangronsveld, J. & Weyens, N. Optimization of isolation and cultivation of bacterial endophytes through addition of plant extract to nutrient media: Optimizing isolation of endophytes. *Microbial Biotechnology* **8**, 707–715 (2015).
- Egger, K. N. Molecular analysis of ectomycorrhizal fungal communities. *Canadian Journal of Botany* **73**, 1415–1422 (1995).
- Ek-Ramos, M. J., Zhou, W., Valencia, C. U., Antwi, J. B., Kalns, L. L., Morgan, G. D., Kerns, D. L. & Sword, G. A. Spatial and temporal variation in fungal endophyte communities isolated from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum*). *PLoS ONE* **8**, e66049 (2013).
- El Amrani, M. Biodiversity analysis of endophytic fungi and chemical investigation of their secondary metabolites. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2016).
- Elbandy, M., Shinde, P. B., Hong, J., Bae, K. S., Kim, M. A., Lee, S. M. & Jung, J. H. α -Pyrones and yellow pigments from the sponge-derived fungus *Paecilomyces lilacinus*. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **30**, 188–192 (2009).
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B. M., Cech, N. B., Pearce, C. J. & Oberlies, N. H. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a Dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of Natural Products* **76**, 1709–1716 (2013).
- El-Hadi, A. A., El-Nour, S. A., Hammad, A., Kamel, Z. & Anwar, M. Optimization of cultural and nutritional conditions for carboxymethylcellulase production by *Aspergillus hortai*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences* **7**, 23–28 (2014).

- Elissawy, A. M., Ebada, S. S., Ashour, M. L., Özkaya, F. C., Ebrahim, W., Singab, A. B. & Proksch, P. Spiroarthrinols a and B, two novel meroterpenoids isolated from the sponge-derived fungus *Arthrinium* sp. *Phytochemistry Letters* **20**, 246–251 (2017).
- Eliwa, E., EL_Metwally, D. M., H. Halawa, A. El-Agrody, A., Bedair, A. H. & Shaaban M. New bioactive metabolites from *Aspergillus flavus* 9AFL. *J. Atoms and Molecules* **7**, 1045 (2017).
- El-Khayat, E. S., Mohamed Ibrahim, S. R. & Mohamed, G. A. Plant endophytes, renewable source of new natural products. *The Natural Products Journal* **2**, 225–234 (2012).
- Elsevier B.V., <https://www.sciencedirect.com> (2019)
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G. & Manyes, L. *Alternaria* Mycotoxins in food and feed: An overview. *Journal of Food Quality* **2017**, 1–20 (2017).
- Espada, A., Rivera-Sagredo, A., de la Fuente, J. M., Hueso-Rodríguez, J. A. & Elson, S. W. New cytochalasins from the fungus *Xylaria hypoxylon*. *Tetrahedron* **53**, 6485–6492 (1997).
- Evidente, A., Andolfi, A., Maddau, L., Franceschini, A. & Marras, F. Biscopyran, a Phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products* **68**, 568–571 (2005).
- Fan, N.-W., Chang, H.-S., Cheng, M.-J., Hsieh, S.-Y., Liu, T.-W., Yuan, G.-F. & Chen, I.-S. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Xylaria cubensis*. *Helvetica Chimica Acta* **97**, 1689–1699 (2014).
- Farag, M. A. & Shakour, Z. T. A. Metabolomics driven analysis of 11 *Portulaca* leaf taxa as analysed via UPLC-ESI-MS/MS and chemometrics. *Phytochemistry* **161**, 117–129 (2019).
- Federhen, S. The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research* **40**, D136–D143 (2012).
- Federhen, S. Type material in the NCBI Taxonomy Database. *Nucleic Acids Research* **43**, D1086–D1098 (2015).
- Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783 (1985).
- Feng, T., Li, Z.-H., Yin, X., Dong, Z.-J., Wang, G.-Q., Li, X.-Y., Li, Y. & Liu, J.-K. New benzene derivatives from cultures of ascomycete *Daldinia concentrica*. *Natural Products and Bioprospecting* **3**, 150–153 (2013).
- Feng, C.-C., Chen, G.-D., Zhao, Y.-Q., Xin, S.-C., Li, S., Tang, J.-S., Li, X.-X., Hu, D., Liu, X.-Z. & Gao, H. New isocoumarins from a cold-adapted fungal strain *Mucor* sp. and their developmental toxicity to zebrafish embryos. *Chemistry & Biodiversity* **11**, 1099–1108 (2014).
- Fesel, P. H. & Zuccaro, A. Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Microbiology* **32**, 103–112 (2016).
- Field, L. D., Sternhell, S. & Kalman, J. R. *Organic structures from spectra*. (John Wiley and Sons Ltd, 2008).
- Figueroa, M., Fajardo-Hernández, C., Villedas, O., Gómez-Lagunas, L. & Aparicio-Cuevas, M. Fluorescent azaphilone pigments from the endophytic fungus *Biscogniauxia* sp. *Planta Medica* **81**, (2015).
- Fisher, P. J. & Petrini, O. A comparative study of fungal endophytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. *Mycological Research* **94**, 313–319 (1990).

- Francis, G. W., Aksnes, D. W. & Holt, Ø. Assignment of the ^1H and ^{13}C -NMR spectra of anthraquinone glycosides from *Rhamnus frangula*. *Magnetic Resonance in Chemistry* **36**, 769–772 (1998).
- Freeman, S. & Rodriguez, R. J. Genetic Conversion of a Fungal Plant Pathogen to a Non-pathogenic, Endophytic Mutualist. *Science* **260**, 75–78 (1993).
- Freitas-Richard, C. M. Bioaktive Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2011).
- Fresta, M., Ricci, M., Rossi, C., Furneri, P. M. & Puglisi, G. Antimicrobial nonapeptide Leucinostatin A-dependent effects on the physical properties of phospholipid model membranes. *Journal of Colloid and Interface Science* **226**, 222–230 (2000).
- Friebolin, H. Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: eine Einführung. (Wiley-VCH-Verl, 1999).
- Fukushima, K., Arai, T., Mori, Y., Tsuboi, M. & Suzuki, M. Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. I. Separation, physico-chemical properties and biological activities of leucinostatins A and B. *The Journal of Antibiotics* **36**, 1606–1612 (1983a).
- Fukushima, K., Arai, T., Mori, Y., Tsuboi, M. & Suzuki, M. Studies on peptide antibiotics, leucinostatins. II. The structures of leucinostatins A and B. *The Journal of Antibiotics* **36**, 1613–1630 (1983b).
- Fulmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., Bercaw, J. E. & Goldberg, K. I. NMR chemical shifts of trace impurities: Common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* **29**, 2176–2179 (2010).
- Galloway, W. R. J. D., Hodgkinson, J. T., Bowden, S., Welch, M. & Spring, D. R. Applications of small molecule activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. *Trends in Microbiology* **20**, 449–458 (2012).
- Gautschi, J. T., Amagata, T., Amagata, A., Valeriote, F. A., Mooberry, S. L. & Crews, P. Expanding the strategies in natural product studies of marine-derived fungi: A chemical investigation of *Penicillium* obtained from deep water sediment. *Journal of Natural Products* **67**, 362–367 (2004).
- Gentzsch, M. Sekundärstoffe aus endophytischen Pilzen mariner Habitats und Abbaureaktionen an Simocyclinon D8. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen (2007).
- Ghimire, S. R. & Hyde, K. D. in *Plant Surface Microbiology* (eds. Varma, A., Abbott, L., Werner, D. & Hampp, R.) 281–292 (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
- Giavasis, I. Bioactive fungal polysaccharides as potential functional ingredients in food and nutraceuticals. *Current Opinion in Biotechnology* **26**, 162–173 (2014).
- Gibbons, S. Introduction to Planar Chromatography in *Natural Products Isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 77–116 (Humana Press, 2006).
- Gogoi, D. K., Deka Boruah, H. P., Saikia, R. & Bora, T. C. Optimization of process parameters for improved production of bioactive metabolite by a novel endophytic fungus *Fusarium* sp. DF2 isolated from *Taxus wallichiana* of North East India. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**, 79–87 (2008).
- Gond, S. K., Verma, V. C., Mishra, A., Kumar, A. & Kharwar, R. N. 15 Role of fungal endophytes in plant protection. *Management of Fungal plant pathogens* 183 (2010).
- González-Menéndez, V., Serrano, R., Muñoz, F., Reyes, F., Genilloud, O. & Tormo, J. Differential induction of secondary metabolite profiles in endophyte fungi by the addition of epigenetic modifiers. *Planta Medica* **81**, (2015).

- Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. & Nudelman, A. NMR Chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *The Journal of Organic Chemistry* **62**, 7512–7515 (1997).
- Gouda, S., Das, G., Sen, S. K., Shin, H.-S. & Patra, J. K. Endophytes: A treasure house of bioactive compounds of medicinal importance. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
- Goutam, J., Singh, R., Vijayaraman, R. S. & Meena, M. in *Fungi and their role in sustainable development: Current perspectives* (eds. Gehlot, P. & Singh, J.) 539–551 (Springer Singapore, 2018).
- Grandclément, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y. & Faure, D. Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews* **40**, 86–116 (2016).
- Gremaud, G. & Tabacchi, R. Relationship between the fungus *Ceratocystis fimbriata coffea* and the canker disease of the coffee tree. *Phytochemistry* **42**, 1547–1549 (1996).
- Gross, J. H. *Massenspektrometrie - Ein Lehrbuch*. (Springer Berlin Heidelberg, 2013).
- Gubiani, J. R., Habeck, T. R., Chapla, V. M., Silva, G., Bolzani, V. da S. & Araújo, A. R. One stain-many compounds (OSMAC) method for production of phenolic compounds using *Camarops* sp., an endophytic fungus from *Alibertia macrophylla* (Rubiaceae). *Quim. Nova* (2016).
- Gulder, T., Hong, H., Correa, J., Egereva, E., Wiese, J., Imhoff, J. & Gross, H. Isolation, Structure elucidation and total synthesis of Lajollamide A from the marine fungus *Asteromyces cruciatus*. *Marine Drugs* **10**, 2912–2935 (2012).
- Guo, B., Wang, Y., Sun, X. & Tang, K. Bioactive natural products from endophytes: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **44**, 136–142 (2008).
- Guo, L. D., Hyde, K. D. & Liew, E. C. Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences: RESEARCH Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis*. *New Phytologist* **147**, 617–630 (2000).
- Guo, L. D., Hyde, K. D. & Liew, E. C. Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **20**, 1–13 (2001).
- Gupta, V. K., Verma, S., Gupta, S., Singh, A., Pal, A., Srivastava, S. K., Srivastava, P. K., Singh, S. C. & Darokar, M. P. Membrane-damaging potential of natural L-(–)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**, 3375–3383 (2012).
- Gvakharia, B. O., Bebas, P., Cymborowski, B. & Giebultowicz, J. M. Disruption of sperm release from insect testes by cytochalasin and beta-actin mRNA mediated interference. *Cellular and Molecular Life Sciences* **60**, 1744–1751 (2003).
- Hadaček, F., Müller, C., Werner, A., Greger, H. & Proksch, P. Analysis, isolation and insecticidal activity of linear furanocoumarins and other coumarin derivatives from *Peucedanum* (Apiaceae: Apioideae). *Journal of Chemical Ecology* **20**, 2035–2054 (1994).
- Haggag, W. M. Role of entophytic microorganisms in bio control of plant diseases. *Life Science Journal* **7**, 57–62 (2010).
- Haidle, A. M. & Myers, A. G. An enantioselective, modular, and general route to the cytochalasins: synthesis of L-696,474 and cytochalasin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 12048–12053 (2004).
- Halabalaki, M., Vougiogiannopoulou, K., Mikros, E. & Skaltsounis, A. L. Recent advances and new strategies in the NMR-based identification of natural products. *Current Opinion in Biotechnology* **25**, 1–7 (2014).

- Hallmann, J., Berg, G. & Schulz, B. Isolation procedures for endophytic microorganisms. in *Microbial root endophytes* 299–319 (Springer, 2006).
- Hallock, Y. F., Clardy, J., Kenfield, D. S. & Strobel, G. De-O-methyl-diaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*. *Phytochemistry* **27**, 3123–3125 (1988).
- Hamdy, A. K., Sheha, M. M., Abdel-Hafez, A. A. & Shouman, S. A. Design, Synthesis, and cytotoxicity valuation of novel Griseofulvin analogues with improved water solubility. *International Journal of Medicinal Chemistry* **2017**, 1–12 (2017).
- Hammon, K. E. & Faeth, S. H. Ecology of plant-herbivore communities: a fungal component? *Natural Toxins* **1**, 197–208 (1992).
- Han, W.-B., Zhai, Y.-J., Gao, Y., Zhou, H.-Y., Xiao, J., Pescitelli, G. & Gao, J.-M. Cytochalasins and an Abietane-Type diterpenoid with allelopathic activities from the endophytic fungus *Xylaria* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . **67**, 3643–3650 (2019).
- Hänsel, R. & Sticher, O. *Pharmakognosie-Phytopharmazie*. (Springer-Verlag, 2009).
- Harris, J. P. & Mantle, P. G. Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* **57**, 165–169 (2001).
- Harvey, A. L., Edrada-Ebel, R. & Quinn, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nature Reviews Drug Discovery* **14**, 111–129 (2015).
- Hawksworth, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited paper presented at the Asian Mycological Congress 2000 (AMC 2000), incorporating the 2nd asia-pacific mycological congress on biodiversity and biotechnology, and held at the university of Hong Kong on 9-13 July 2000. *Mycological research* **105**, 1422–1432 (2001).
- Hawksworth, D. L. 'Misidentifications' in fungal DNA sequence databanks: Letters. *New Phytologist* **161**, 13–15 (2003).
- Hayakawa, S., Matsushima, T., Kimura, T., Minato, H. & Katagiri, K. Zygosporin A, a new antibiotic from *Zygosporium mansonii*. *The Journal of Antibiotics* **21**, 523–524 (1968).
- Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T. & Zhang, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1357**, 36–52 (2014).
- Hector, R. F. An Overview of antifungal drugs and their Use for treatment of deep and superficial mycoses in animals. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* **20**, 240–249 (2005).
- Helaly, S. E., Thongbai, B. & Stadler, M. Diversity of biologically active secondary metabolites from endophytic and saprotrophic fungi of the ascomycete order Xylariales. *Natural Product Reports* **35**, 992–1014 (2018).
- Heller, G. & Kretzschmann, H. 1,8-Dihydroxynaphthalene. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B: Abhandlungen* 1098–1107 (1921).
- Hemström, P. & Irgum, K. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science* **29**, 1784–1821 (2006).
- Hewage, R. T., Aree, T., Mahidol, C., Ruchirawat, S. & Kittakoop, P. One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides, azaphilones, and an isochromanone using the endophytic fungus Dothideomycete sp. *Phytochemistry* **108**, 87–94 (2014).

- Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., Vilgalys, R., Aime, M. C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G. L., Castlebury, L. A., Crous, P. W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D. M., Grif-fith, G. W., Gueidan, C., Hawksworth, D. L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R. A., Hyde, K. D., Ironside, J. E., Kõljalg, U., Kurtzman, C. P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miądlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J. D., Roux, C., Ryvarden, L., Sam-paio, J. P., Schüßler, A., Sugiyama, J., Thorn, R. G., Tibell, L., Untereiner, W. A., Walk-er, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M. M., Winka, K., Yao, Y.-J. & Zhang, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* **111**, 509–547 (2007).
- Higginbotham, S. J., Arnold, A. E., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P. D. & Kursar, T. A. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. *PLoS ONE* **8**, e73192 (2013).
- Higgins, K. L., Arnold, A. E., Miadlikowska, J., Sarvate, S. D. & Lutzoni, F. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **42**, 543–555 (2007).
- Hillenbrand, M., Zapp, J. & Becker, H. Depsides from the petals of *Papaver rhoeas*. *Planta Medica* **70**, 380–382 (2004).
- Ho, Y.-S., Duh, J.-S., Jeng, J.-H., Wang, Y.-J., Liang, Y.-C., Lin, C.-H., Tseng, C.-J., Yu, C.-F., Chen, R.-J. & Lin, J.-K. Griseofulvin potentiates antitumorogenesis effects of noco-dazole through induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *International Journal of Cancer* **91**, 393–401 (2000).
- Hodges, R. & Porte, A. L. The structure of loliolide. *Tetrahedron* **20**, 1463–1467 (1964).
- Hof, H. & Kupfahl, C. Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: an example that mycotoxins are po-tential virulence factors. *Mycotoxin Research* **25**, 123–131 (2009).
- Höller, U., Wright, A. D., Matthee, G. F., König, G. M., Draeger, S., Aust, H.-J. & Schulz, B. Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research* **104**, 1354–1365 (2000).
- Holst-Jensen, A., Vrålstad, T. & Schumacher, T. On reliability: Letters. *New Phytologist* **161**, 11–13 (2003).
- Honda, N. K., Pavan, F. R., Coelho, R. G., de Andrade Leite, S. R., Micheletti, A. C., Lopes, T. I. B., Misutsu, M. Y., Beatriz, A., Brum, R. L. & Leite, C. Q. F. Antimycobacterial activ-ity of lichen substances. *Phytomedicine* **17**, 328–332 (2010).
- Hosoe, T., Iizuka, T., Komai, S., Wakana, D., Itabashi, T., Nozawa, K., Fukushima, K. & Ka-wai, K. 4-Benzyl-3-phenyl-5H-furan-2-one, a vasodilator isolated from *Malbranchea fil-amentosa* IFM 41300. *Phytochemistry* **66**, 2776–2779 (2005).
- Hossain, C. F., Okuyama, E. & Yamazaki, M. A new series of coumarin derivatives having monoamine oxidase inhibitory activity from *Monascus anka*. *Chemical and Pharmaceu-tical Bulletin* **44**, 1535–1539 (1996).
- Hou, G.-M., Xu, X.-M., Wang, Q., Li, D.-Y. & Li, Z.-L. Hybrid of dehydroergosterol and nitrog-enous alternariol derivative from the fungus *Pestalotiopsis uvicola*. *Steroids* **138**, 43–46 (2018).
- Houssen, W. E. & Jaspars, M. in *Natural Products Isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 353–390 (Humana Press, 2006).

- Hsiao, Y., Cheng, M.-J., Chang, H.-S., Wu, M.-D., Hsieh, S.-Y., Liu, T.-W., Lin, C.-H., Yuan, G.-F. & Chen, I.-S. Six new metabolites produced by *Colletotrichum aotearoa* 09F0161, an endophytic fungus isolated from *Bredia oldhamii*. *Natural Product Research* **30**, 251–258 (2016).
- Hu, Z.-X., Xue, Y.-B., Bi, X.-B., Zhang, J.-W., Luo, Z.-W., Li, X.-N., Yao, G.-M., Wang, J.-P. & Zhang, Y.-H. Five New secondary metabolites produced by a marine-associated fungus, *Daldinia eschscholzii*. *Marine Drugs* **12**, 5563–5575 (2014).
- Hu, M., Yang, X.-Q., Zhou, Q.-Y., Li, S.-Q., Wang, B.-Y., Ruan, B.-H., Yang, Y.-B., Zhang, Z.-X., Zhou, H. & Ding, Z.-T. Benzopyran derivatives from endophytic *Daldinia eschscholzii* JC-15 in *Dendrobium chrysotoxum* and their bioactivities. *Natural Product Research* **33**, 1431–1435 (2019).
- Huang, Z., Yang, J., Cai, X., She, Z. & Lin, Y. A new furanocoumarin from the mangrove endophytic fungus *Penicillium* sp. (ZH16). *Natural Product Research* **26**, 1291–1295 (2012).
- Huang, R., Wang, T., Xie, X.-S., Ma, K.-X., Fang, X.-W. & Wu, S.-H. Secondary metabolites from an endophytic fungus *Nigrospora* sp. *Chemistry of Natural Compounds* **52**, 697–699 (2016).
- Huang, L.-H., Yuan, M.-Q., Ao, X.-J., Ren, A.-Y., Zhang, H.-B. & Yang, M.-Z. Endophytic fungi specifically introduce novel metabolites into grape flesh cells in vitro. *PLOS ONE* **13**, e0196996 (2018).
- Hubert, J., Nuzillard, J.-M., Purson, S., Hamzaoui, M., Borie, N., Reynaud, R. & Renault, J.-H. Identification of natural metabolites in mixture: A pattern recognition strategy based on ¹³C NMR. *Analytical Chemistry* **86**, 2955–2962 (2014).
- Hubert, J., Nuzillard, J.-M. & Renault, J.-H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept? *Phytochemistry Reviews* **16**, 55–95 (2017).
- Hung, W.-L., Suh, J. H. & Wang, Y. Chemistry and health effects of furanocoumarins in grapefruit. *Journal of Food and Drug Analysis* **25**, 71–83 (2017).
- Hyde, K. & Soyong, K. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* 163–173 (2008).
- Hyde, K. D., Bahkali, A. H. & Moslem, M. A. Fungi-an unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity* **43**, 1–9 (2010).
- Ibrahim, A., Sørensen, D., Jenkins, H. A., McCarry, B. E. & Sumarah, M. W. New diplosporin and agistatine derivatives produced by the fungal endophyte *Xylaria* sp. isolated from *Vitis labrusca*. *Phytochemistry Letters* **9**, 179–183 (2014).
- Ibrahim, A., Sørensen, D., Jenkins, H. A., Ejim, L., Capretta, A. & Sumarah, M. W. Epoxyne-manione A, nemanifuranones A–F, and nemanilactones A–C, from *Nemania serpens*, an endophytic fungus isolated from Riesling grapevines. *Phytochemistry* **140**, 16–26 (2017).
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Al Haidari, R. A., El-Kholy, A. A. & Zayed, M. F. Potential anti-malarial agents from endophytic fungi: A Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **18**, 1110–1132 (2018a).
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Al Haidari, R. A., El-Kholy, A. A., Zayed, M. F. & Khayat, M. T. Biologically active fungal depsidones: Chemistry, biosynthesis, structural characterization, and bioactivities. *Fitoterapia* **129**, 317–365 (2018b).
- Ichihara, A. et al. Structure, synthesis, and stereochemistry of (+)-Orthosporin, a phytotoxic metabolite of *Rhynchosporium orthosporum*. *Chemistry Letters*. **18**, 1495–1498 (1989).

- Isaka, M., Palasarn, S., Rachtawee, P., Vimuttipong, S. & Kongsaree, P. Unique diketopiperazine dimers from the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 1449. *Organic Letters* **7**, 2257–2260 (2005).
- Isaka, M., Palasarn, S., Sriklung, K. & Kocharin, K. Cyclohexadepsipeptides from the Insect Pathogenic Fungus *Hirsutella nivea* BCC 2594. *Journal of Natural Products* **68**, 1680–1682 (2005).
- Ishiyama, A., Otaguro, K., Iwatsuki, M., Namatame, M., Nishihara, A., Nonaka, K., Kinoshita, Y., Takahashi, Y., Masuma, R., Shiomi, K., Yamada H., Omura S., In vitro and in vivo antitrypanosomal activities of three peptide antibiotics: leucinostatin A and B, alamethicin I and tsushimycin. *The Journal of antibiotics* **62**, 303–308 (2009).
- Isogai, A., Suzuki, A., Higashikawa, S., Kuyama, S. & Tamura, S. Structure of a Peptidal Antibiotic P168 Produced by *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**, 3033–3035 (1980).
- Isogai, A., Suzuki, A., Tamura, S., Higashikawa, S. & Kuyama, S. Structure of a peptidal antibiotic P168 produced by *Paecilomyces lilacinus* (Thorn) Samson. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1405–1411 (1984).
- Isogai, A., Nakayama, J., Takayama, S., Kusai, A. & Suzuki, A. Structural elucidation of minor components of peptidyl antibiotic P168s (leucinostatins) by tandem mass spectrometry. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **56**, 1079–1085 (1992).
- Iwasaki, S., Muro, H., Sasaki, K., Nozoe, S., Okuda, S. & Sato, Z. Isolations of phytotoxic substances produced by *pyricularia oryzae cavara*. *Tetrahedron Letters* **14**, 3537–3542 (1973).
- Jalgaonwala, R. E., Mohite, B. V. & Mahajan, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. *J. Microbiol. Biotech. Res* **1**, 21–32 (2011).
- Jerjian, T. V., Glode, A. E., Thompson, L. A. & O'Bryant, C. L. Antibody-drug conjugates: A clinical pharmacy perspective on an emerging cancer therapy. *Pharmacotherapy* **36**, 99–116 (2016).
- Jia, M., Chen, L., Xin, H.-L., Zheng, C.-J., Rahman, K., Han, T. & Qin, L.-P. A Friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: A systematic review. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
- Jiang, P., Zhang, S.-M., He, L., Wu, Y. & Li, Y. Synthesis of hept-6-en-2,4,5-triols and hept-6-en-2,3,5-triols. *Tetrahedron* **67**, 2651–2660 (2011).
- Jiao, W., Feng, Y., Blunt, J. W., Cole, A. L. J. & Munro, M. H. G. Chaetoglobosins Q, R, and T, three further new metabolites from *Chaetomium globosum*. *Journal of Natural Products* **67**, 1722–1725 (2004).
- Jork, H., *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods*. (VCH, 1990).
- Jouda, J.-B., Tamokou, J.-D., Mbazoa, C. D., Douala-Meli, C., Sarkar, P., Bag, P. K. & Wandji, J. Antibacterial and cytotoxic cytochalasins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. harbored in *Garcinia kola* (Heckel) nut. *BMC Complement Altern Med* **16**, 462 (2016).
- Ju, Z., Qin, X., Lin, X., Wang, J., Kaliyaperumal, K., Tian, Y., Liu, J., Liu, F., Tu, Z., Xu, S. & Liu, Y. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Botryosphaeria* sp. SCSIO KcF6 derived of mangrove plant *Kandelia candel*. *Natural Product Research* **30**, 192–198 (2016).
- Juliano, C. & Magrini, G. Cosmetic ingredients as emerging pollutants of environmental and Health Concern. A Mini-Review. *Cosmetics* **4**, 11 (2017).

- Kamat, S. P., D'Souza, A. M., Paknikar, S. K., Bhadbhade, M. M. & Gonnade, R. G. Unusual KMnO_4 oxidation product of β -ionone. *Indian Journal of Chemistry -Section B* **1038**–1041 (2007).
- Kamauchi, H., Shiraishi, Y., Kojima, A., Kawazoe, N., Kinoshita, K. & Koyama, K. Isoindolinones, phthalides, and a naphthoquinone from the fruiting body of *Daldinia concentrica*. *Journal of Natural Products* **81**, 1290–1294 (2018).
- Katoch, M., Singh, D., Kapoor, K. K. & Vishwakarma, R. A. *Trichoderma lixii* (IIIM-B4), an endophyte of *Bacopa monnieri* L. producing peptaibols. *BMC Microbiol* **19**, 98 (2019).
- Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S.-I., Masuda, T., Momose, I. & Ikeda, D. Leucinostatin A inhibits prostate cancer growth through reduction of insulin-like growth factor-I expression in prostate stromal cells. *International Journal of Cancer* **126**, 810–818 (2010).
- Khan, A., Williams, K. & Nevalainen, H. Testing the nematophagous biological control strain *Paecilomyces lilacinus* 251 for paecilotoxin production. *FEMS Microbiology Letters* **227**, 107–111 (2003).
- Khan, R. Isolation, identification and cultivation of endophytic fungi from medical plants for the production and characterization of bioactive fungal metabolites. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **7**, 316-321 (2007).
- Khan, A. M., Noreen, S., Imran, Z. P., Atta-ur-Rahman & Choudhary, M. I. A new compound, jolynamine, from marine brown alga *Jolyna laminarioides*. *Natural Product Research* **25**, 898–904 (2011).
- Kharwar, R. N., Mishra, A., Gond, S. K., Stierle, A. & Stierle, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural Product Reports* **28**, 1208 (2011).
- Khumkomkhet, P., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K., Hahnvajanawong, C. & Soy-tong, K. Antimalarial and Cytotoxic Depsidones from the Fungus *Chaetomium brasiliense*. *Journal of Natural Products* **72**, 1487–1491 (2009).
- Kim, D. S., Baek, N.-I., Oh, S. R., Jung, K. Y., Lee, I. S., Kim, J. H. & Lee, H.-K. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data. *Archives of Pharmacal Research* **20**, 201–205 (1997).
- Kirby, G. W., Rao, G. V. & Robins, D. J. New co-metabolites of gliotoxin in *Gliocladium virens*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 301 (1988).
- Kirsch, G., Abdelwahab, A. & Chaimbault, P. Natural and synthetic coumarins with effects on inflammation. *Molecules* **21**, 1322 (2016).
- Kitagaki, J., Shi, G., Miyauchi, S., Murakami, S. & Yang, Y. Cyclic depsipeptides as potential cancer therapeutics. *Anticancer Drugs* **26**, 259–271 (2015).
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S. & Yamanaka, K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience* **43**, 143–149 (2002).
- Klaiklay, S., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Buatong, J. & Bussaban, B. Metabolites from the mangrove-derived fungus *Xylaria cubensis* PSU-MA34. *Archives of Pharmacal Research* **35**, 1127–1131 (2012).
- Klaiklay, S., Rukachaisirikul, V., Aungphao, W., Phongpaichit, S. & Sakayaroj, J. Depsidone and phthalide derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG199. *Tetrahedron Letters* **57**, 4348–4351 (2016).
- Kock, I., Draeger, S., Schulz, B., Elsässer, B., Kurtán, T., Kenéz, Á., Antus, S., Pescitelli, G., Salvadori, P., Speakman, J.-B., Rheinheimer, J. & Krohn, K. Pseudoanguillosporin A and B: Two new isochromans isolated from the endophytic fungus *Pseudoanguillospora* sp. *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 1427–1434 (2009).

- Kokubun, T., Veitch, N. C., Bridge, P. D. & Simmonds, M. S. J. Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. *Phytochemistry* **62**, 779–782 (2003).
- Kõljalg, U., Nilsson, R. H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A. F. S., Bahram, M., Bates, S. T., Bruns, T. D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T. M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G. W., Hartmann, M., Kirk, P. M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B. D., Lücking, R., Martín, M. P., Matheny, P. B., Nguyen, N. H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K. G., Peintner, U., Peterson, M., Põldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J. A., Senés, C., Smith, M. E., Suija, A., Taylor, D. L., Telleria, M. T., Weiss, M. & Larsson, K.-H. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology* **22**, 5271–5277 (2013).
- Kongyen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S. & Sakayaroj, J. A new hydronaphthalenone from the mangrove-derived *Daldinia eschscholtzii* PSU-STD57. *Natural Product Research* **29**, 1995–1999 (2015).
- Koshti, N., Naik, S. & Parab, B. Polymer-Bound Cationic Rh(I) Phosphine Catalyst for Homogeneous Asymmetric Hydrogenation. *ChemInform* **37**, (2006).
- Kralj, A., Kehraus, S., Krick, A., van Echten-Deckert, G. & König, G. M. Two new depsipeptides from the marine fungus *Spicellum roseum*. *Planta Medica*. **73**, 366–371 (2007).
- Krings, M., Taylor, T. N., Hass, H., Kerp, H., Dotzler, N. & Hermsen, E. J. Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant: infection pathways, spatial distribution, and host responses. *New Phytologist* **174**, 648–657 (2007).
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**, 1547–1549 (2018a).
- Kumar, A., Kinneer, K., Masterson, L., Ezeadi, E., Howard, P., Wu, H., Gao, C. & Dimasi, N. Synthesis of a heterotrifunctional linker for the site-specific preparation of antibody-drug conjugates with two distinct warheads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **28**, 3617–3621 (2018b).
- Kurdyumov, A., Muñoz, R. & Hsung, R. Total syntheses of Daldiniapyrone, Annularin B, and (±)-Annularin F. *Synthesis* **2006**, 1787–1790 (2006).
- Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S. & Spiteller, M. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces Hypericin. *Journal of Natural Products* **71**, 159–162 (2008).
- Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in Biotechnology* **32**, 297–303 (2014).
- Kuwata, S., Nakanishi, A., Yamada, T. & Miyazawa, T. Total synthesis of Leucinostatin D. *Tetrahedron Letters* **33**, 6995–6998 (1992).
- Laatsch, H. & Wiley-VCH. AntiBase: The Natural Compound Identifier. (2017).
- Lai, D., Wang, A., Cao, Y., Zhou, K., Mao, Z., Dong, X., Tian, J., Xu, D., Dai, J., Peng, Y., Zhou, L. & Liu, Y. Bioactive dibenzo- α -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22. *Journal of Natural Products* **79**, 2022–2031 (2016).
- Lan, X., Zhang, J., Zong, Z., Ma, Q. & Wang, Y. Evaluation of the biocontrol potential of *Purpureocillium lilacinum* QLP12 against *Verticillium dahliae* in eggplant. *BioMed Research International* **2017**, 1–8 (2017).
- Lang, G., Mayhudin, N. A., Mitova, M. I., Sun, L., van der Sar, S., Blunt, J. W., Cole, A. L. J., Ellis, G., Laatsch, H. & Munro, M. H. G. Evolving trends in the dereplication of natural product extracts: new methodology for rapid, small-scale investigation of natural product extracts. *Journal of Natural Products* **71**, 1595–1599 (2008).

- Larsen, T. O., Smedsgaard, J., Nielsen, K. F., Hansen, M. E. & Frisvad, J. C. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports* **22**, 672 (2005).
- Latif, Z. Isolation by preparative High-Performance Liquid Chromatography. In *Natural Products Isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 213–232 (Humana Press, 2006).
- Lee, I.-K., Yun, B., Oh, S., Kim, Y. H., Lee, M.-K. & Yoo, I.-D. 5-Methylmellein and nectriapyrone, two new monoamine oxidase inhibitors. *Medical Science Research* **27**, 463–465 (1999).
- Lee, I.-K., Seok, S.-J., Kim, W.-G. & Yun, B.-S. Diaporthin and Orthosporin from the fruiting body of *Daldinia concentrica*. *Mycobiology* **34**, 38 (2006).
- Lee, W., Tonelli, M. & Markley, J. L. NMRFAM-SPARKY: enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy. *Bioinformatics* **31**, 1325–1327 (2015).
- Lee, Y., Phat, C. & Hong, S.-C. Structural diversity of marine cyclic peptides and their molecular mechanisms for anticancer, antibacterial, antifungal, and other clinical applications. *Peptides* **95**, 94–105 (2017).
- Legaz, E. M., de, R. & Vicente, C. in *Drug Development - A case study based insight into modern strategies* (ed. Rundfeldt, C.) (InTech, 2011).
- Lemmens-Gruber, R., Kamyar, M. R. & Dornetshuber, R. Cyclodepsipeptides - potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Current Medicinal Chemistry* **16**, 1122–1137 (2009).
- Lenta, B. N., Ngatchou, J., Frese, M., Ladoh-Yemeda, F., Voundi, S., Nardella, F., Michalek, C., Wibberg, D., Ngouela, S., Tsamo, E., Kaiser, M., Kalinowski, J. & Sewald, N. Purpureone, an antileishmanial ergochrome from the endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. *Zeitschrift für Naturforschung B* **71**, 1159–1167 (2016).
- Levengood, M. R., Zhang, X., Hunter, J. H., Emmerton, K. K., Miyamoto, J. B., Lewis, T. S. & Senter, P. D. Orthogonal cysteine protection enables homogeneous multi-drug antibody–drug conjugates. *Angewandte Chemie International Edition* **56**, 733–737 (2017).
- Lewer, P. & MacMillan, J. Reinvestigation of a synthesis of (R,S)-mevalonolactone. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1417 (1983).
- Li, J. -y., Strobel, G., Sidhu, R., Hess, W. M. & Ford, E. J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. *Microbiology* **142**, 2223–2226 (1996).
- Li, C., Nitka, M. V., Gloer, J. B., Campbell, J. & Shearer, C. A. Annularins A–H: New polyketide metabolites from the freshwater aquatic fungus *Annulatascus t riseptatus*. *Journal of Natural Products* **66**, 1302–1306 (2003).
- Li, D.-W. *Stachybotrys eucylindrospora*, sp. nov. resulting from a re-examination of *Stachybotrys cylindrospora*. *Mycologia* **99**, 332–339 (2007).
- Li, J. W.-H. & Vederas, J. C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* **325**, 161–165 (2009).
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N. & Lopez, R. The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research* **43**, W580–W584 (2015).
- Li, W., Lee, C., Bang, S. H., Ma, J. Y., Kim, S., Koh, Y.-S. & Shim, S. H. Isochromans and Related constituents from the endophytic fungus *Annulohyphoxylon truncatum* of *Zizania caduciflora* and their anti-inflammatory effects. *Journal of Natural Products* **80**, 205–209 (2017).

- Li, G.-L., Guo, W.-J., Wang, G.-B., Wang, R.-R., Hou, Y.-X., Liu, K., Liu, Y. & Wang, W. Sterols from the green alga *Ulva australis*. *Marine Drugs* **15**, 299 (2017b).
- Li, J., Wang, W.-X., Chen, H.-P., Li, Z.-H., He, J., Zheng, Y.-S., Sun, H., Huang, R., Yuan, Q.-X., Wang, X., Feng, T. & Liu, J.-K. (±)-Xylaridines A and B, highly conjugated alkaloids from the fungus *Xylaria longipes*. *Organic Letters* **21**, 1511–1514 (2019).
- Linstrom, P. NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69. (1997).
- Liu, Q.-A., Shao, C.-L., Gu, Y.-C., Lin, Y.-C. & Wang, C.-Y. Bioactive Hypoxylin A and its five acylates. *Chemistry of Natural Compounds* **51**, 905–909 (2015).
- Liu, S., Dai, H., Heering, C., Janiak, C., Lin, W., Liu, Z. & Proksch, P. Inducing new secondary metabolites through co-cultivation of the fungus *Pestalotiopsis* sp. with the bacterium *Bacillus subtilis*. *Tetrahedron Letters* **58**, 257–261 (2017).
- Lohse, R., Jakobs-Schönwandt, D., Vidal, S. & Patel, A. V. Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of *Beauveria bassiana* in oilseed rape plants. *Biological Control* **88**, 26–36 (2015).
- Luangsa-Ard, J. J., Hywel-Jones, N. L. & Samson, R. A. The polyphyletic nature of *Paecilomyces* sensu lato based on 18S-generated rDNA phylogeny. *Mycologia* **96**, 773–780 (2004).
- Luangsa-ard, J., Houbraken, J., van Doorn, T., Hong, S.-B., Borman, A. M., Hywel-Jones, N. L. & Samson, R. A. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus*: *Purpureocillium*, a new fungal genus for *P. lilacinus*. *FEMS Microbiology Letters* **321**, 141–149 (2011).
- Ludwig-Müller, J. Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production? *Biotechnology Letters* **37**, 1325–1334 (2015).
- Luginbühl, M. & Müller, E. Endophytische Pilze in den oberirdischen Organen von 4 gemeinsam an gleichen Standorten wachsenden Pflanzen (*Buxus*, *Hederá*, *Ilex*, *Ruscus*). in *Sydowia: Annales Mycologici: Editi in Notitiam Scientiae Mycologicae Universalis* 185 (Berger, 1979).
- Lugtenberg, B. J. J., Caradus, J. R. & Johnson, L. J. Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiology Ecology* **92**, fiw194 (2016).
- Machado, F. B., Yamamoto, R. E., Zanolli, K., Nocchi, S. R., Novello, C. R., Schuquel, I. T. A., Sakuragui, C. M., Luftmann, H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V. & de Mello, J. C. P. Evaluation of the antiproliferative activity of the leaves from *Arctium lappa* by a bioassay-guided fractionation. *Molecules* **17**, 1852–1859 (2012).
- MacLean-Fletcher, S. & Pollard, T. D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* **20**, 329–341 (1980).
- Madariaga-Mazón, A., González-Andrade, M., González, M. del C., Glenn, A. E., Cerdá-García-Rojas, C. M. & Mata, R. Absolute configuration of Acremoxanthone C, a potent Calmodulin inhibitor from *Purpureocillium lilacinum*. *Journal of Natural Products* **76**, 1454–1460 (2013).
- Mafud, A. C., Silva, M. P. N., Nunes, G. B. L., de Oliveira, M. A. R., Batista, L. F., Rubio, T. I., Mengarda, A. C., Lago, E. M., Xavier, R. P., Gutierrez, S. J. C., Pinto, P. L. S., da Silva Filho, A. A., Mascarenhas, Y. P. & de Moraes, J. Antiparasitic, structural, pharmacokinetic, and toxicological properties of riparin derivatives. *Toxicology in Vitro* **50**, 1–10 (2018).
- Maggini, V., De Leo, M., Mengoni, A., Gallo, E. R., Miceli, E., Reidel, R. V. B., Biffi, S., Pistelli, L., Fani, R., Firenzuoli, F. & Bogani, P. Plant-endophytes interaction influences the secondary metabolism in *Echinacea purpurea* (L.) Moench: an in vitro model. *Scientific Reports* **7**, (2017).

- Magiatis, P., Melliou, E., Skaltsounis, A.-L., Mitaku, S., Léonce, S., Renard, P., Pierré, A. & Atassi, G. Synthesis and cytotoxic activity of pyranocoumarins of the Seselin and Xanthyletin series. *Journal of Natural Products* **61**, 982–986 (1998).
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L.-D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. & Hyde, K. D. *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity* **50**, 167–187 (2011).
- Makioka, A., Kumagai, M., Kobayashi, S. & Takeuchi, T. Different effects of cytochalasins on the growth and differentiation of *Entamoeba invadens*. *Parasitol. Res.* **93**, 68–71 (2004).
- Malawer, E. G. in *Handbook of size exclusion chromatography* 1–24 (Dekker, 1995).
- Malmstrøm, J., Christophersen, C. & Frisvad, J. C. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochemistry* **54**, 301–309 (2000).
- Manuja, R., Chaudhary, J., Jain, A. & Sachdeva, S. A Comprehensive review on biological activities of p-hydroxy benzoic acid and its derivatives. **22**, (2013).
- Marmann, A. Bioaktive Sekundärmetabolite aus endophytischen Pilzen. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2014).
- Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B. & Proksch, P. Co-cultivation--a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. *Marine Drugs* **12**, 1043–1065 (2014).
- Martin, K. J. & Rygiewicz, P. T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC microbiology* **5**, 28 (2005).
- Martinelli, D., Grossmann, G., Séquin, U., Brandl, H. & Bachofen, R. Effects of natural and chemically synthesized furanones on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *BMC Microbiology* **4**, 25 (2004).
- Martinez, A. F. C. & Moraes, L. A. B. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry characterization of five new leucinostatins produced by *Paecilomyces lilacinus* CG—189. *The Journal of Antibiotics* **68**, 178–184 (2015).
- Martinez-Klimova, E., Rodríguez-Peña, K. & Sánchez, S. Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology* **134**, 1–17 (2017).
- Maschke S., Negera A., Zadzik S.J.S., Sewald N. Publikation in Vorbereitung (2019a)
- Maschke S., Lenta B. N., Sewald N. Publikation in Vorbereitung (2019b)
- Mathan, S., Subramanian, V. & Nagamony, S. Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *European Journal of Experimental Biology* **3**, 138–144 (2013).
- McAlpine, J. B. & Morris, P. Separation by High-Speed Countercurrent Chromatography in *Natural Products Isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 185–211 (Humana Press, 2006).
- McKinnon, A. C., Saari, S., Moran-Diez, M. E., Meyling, N. V., Raad, M. & Glare, T. R. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and bio-control potential. *BioControl* **62**, 1–17 (2017).
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., Weber, T., Takano, E. & Breitling, R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research* **39**, W339–W346 (2011).

- Medina, R. P., Araujo, A. R., Andersen, R. J., Soares, M. A., Silva, F. de A. & Silva, D. H. S. Aromatic compounds produced by endophytic fungi isolated from red alga *Asparagopsis taxiformis* - *Falkenbergia* stage. *Natural Product Research* 1–4 (2018).
- Mehbub, M., Lei, J., Franco, C. & Zhang, W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs* **12**, 4539–4577 (2014).
- Mendoza-Cal, A., Cuevas-Glory, L., Lizama-Uc, G. & Ortiz-Vázquez, E. Naringinase production from filamentous fungi using grapefruit rind in solid state fermentation. *African Journal of Microbiology Research* **4**, 1964–1969 (2010).
- Merdivan, S. & Lindequist, U. Ergosterol Peroxide: A mushroom-derived compound with promising biological activities-A Review. *Int J Med Mushrooms* **19**, 93–105 (2017).
- Merifield, E. & J. Thomas, E. Total synthesis of cytochalasin D: total synthesis and full structural assignment of cytochalasin O. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans. 1* 3269–3283 (1999).
- Meyer, W. & Gams, W. Delimitation of *Umbelopsis* (Mucorales, Umbelopsidaceae fam. nov.) based on ITS sequence and RFLP data. *Mycological Research* **107**, 339–350 (2003).
- Michel, K. H., Chaney, M. O., Jones, N. D., Hoehn, M. M. & Nagarajan, R. Epipolythiopiperazine-dione antibiotics from *Penicillium turbatum*. *The Journal of Antibiotics* **27**, 57–64 (1974).
- Mikami, Y., Yazawa, K., Fukushima, K., Arai, T., Udagawa, S. & Samson, R. A. Paecilotoxin production in clinical or terrestrial isolates of *Paecilomyces lilacinus* strains. *Mycopathologia* **108**, 195–199 (1989).
- Mikami, Y., Fukushima, K., Arai, T., Abe, F., Shibuya, H. & Ommura, Y. Leucinostatins, peptide mycotoxins produced by *Paecilomyces lilacinus* and their possible roles in fungal infection. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* **257**, 275–283 (1984).
- Milne, G. W. A. in *Drugs: synonyms and properties*. (Ashgate, 2000).
- Mishra, A., Gond, S. K., Kumar, A., Sharma, V. K., Verma, S. K., Kharwar, R. N. & Sieber, T. N. Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location. *Microbial Ecology* **64**, 388–398 (2012).
- Mishra, Y., Singh, A., Batra, A. & Sharma, M. M. Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* **s8**, (2014).
- Mitchell, T. N. & Costisella, B. in *NMR-From spectra to structures: an experimental approach*. (Springer, 2007).
- Molnár, K. & Farkas, E. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a review. *Zeitschrift für Naturforschung C* **65**, 157–173 (2010).
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R. & Schaffer, A. A database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* **24**, 1757–1764 (2008).
- Mori, Y., Tsuboi, M., Suzuki, M., Fukushima, K. & Arai, T. Structure of leucinostatin A, new peptide antibiotic from *Paecilomyces lilacinus* A-267. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **94** (1982).
- Mori, Y., Suzuki, M., Fukushima, K. & Arai, T. Structure of leucinostatin B, an uncoupler on mitochondria. *The Journal of Antibiotics* **36**, 1084–1086 (1983).
- Mori, K. & Okada, K. Synthesis of mevalonolactone (hiochic acid lactone) employing asymmetric epoxidation as the key-step. *Tetrahedron* **41**, 557–559 (1985).

- Moroi, K. & Sato, T. Comparison between procaine and isocarboxazid metabolism in vitro by a liver microsomal amidase-esterase. *Biochemical Pharmacology* **24**, 1517–1521 (1975).
- Mostert, L., Crous, P. W., Petrini, O. Endophytic fungi associated with shoots and leaves of *Vitis vinifera*, with specific reference to the *Phomopsis viticola* complex. *Sydowia* **52**: 46–58 (2000)
- Müllbacher, A., Waring, P., Tiwari-Palni, U. & Eichner, R. D. Structural relationship of epipolythiodioxopiperazines and their immunomodulating activity. *Molecular immunology* **23**, 231–235 (1986).
- Müller, E. & Löffler, W. *Mykologie: Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner*. (Thieme, 1992).
- Murata, M., Nakai, Y., Kawazu, K., Ishizaka, M., Kajiwara, H., Abe, H., Takeuchi, K., Ichinose, Y., Mitsuhara, I., Mochizuki, A. & Seo, S. Loliolide, a carotenoid metabolite, is a potential endogenous inducer of herbivore resistance. *Plant Physiol.* **179**, 1822–1833 (2019).
- Muroi, M., Suehara, K., Wakusawa, H., Suzuki, K., Sato, T., Nishimura, T., Otake, N. & Takatsuki, A. Novel blockade of cell surface expression of virus glycoproteins by Leucino-statin A. *The Journal of Antibiotics* **49**, 1119–1126 (1996).
- Mycobank, <http://www.Mycobank.org> (2019)
- Nair, M. & Carey, S. Metabolites of pyrenomycetes II: nectriapyrone, an antibiotic monoterpenoid. *Tetrahedron Letters* **16**, 1655–1658 (1975).
- Nakazawa, T., Ishiuchi, K., Praseuth, A., Noguchi, H., Hotta, K. & Watanabe, K. Overexpressing transcriptional regulator in *Aspergillus oryzae* activates a silent biosynthetic pathway to produce a novel polyketide. *ChemBioChem* **13**, 855–861 (2012).
- Nazir, M., Sultan, M., Riaz, N., Hafeez, M., Hussain, H., Ahmed, I., Schulz, B., Draeger, S., Jabbar, A., Krohn, K., Ashraf, M. & Saleem, M. Depsitinuside: a new depside galactoside from an endophytic fungus isolated from *Viburnum tinus*. *Journal of Asian Natural Products Research* **13**, 1056–1060 (2011).
- Nazari, L., Patteri, E., Terzi, V., Morcia, C. & Rossi, V. Influence of temperature on infection, growth, and mycotoxin production by *Fusarium langsethiae* and *F. sporotrichioides* in durum wheat. *Food Microbiology* **39**, 19–26 (2014).
- Nemec, T., Jernejc, K. & Cimerman, A. Sterols and fatty acids of different *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Letters* **149**, 201–205 (2006).
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **75**, 311–335 (2012).
- Nguyen, H. C., Tran, T. V. A., Nguyen, Q. L., Nguyen, N. N., Nguyen, M. K., Nguyen, N. T. T., Su, C.-H. & Lin, K.-H. Newly isolated *Paecilomyces lilacinus* and *Paecilomyces javanicus* as novel biocontrol agents for *Plutella xylostella* and *Spodoptera litura*. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* **45**, 280 (2017).
- Nicolet, B., Tabacchi, R., Lyr, H., Russell, P. E., Dehne, H. W. & Sisler, H. D. Secondary metabolites produced by *Stagonospora* sp., a potential biocontrol agent against bindweeds. in *12th International Reinhardsbrunn Symposium* 469–476 (1999).
- Nicoletti, R. & Fiorentino, A. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatophyta. *Agriculture* **5**, 918–970 (2015).
- Nielsen, K. F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J. C. & Larsen, T. O. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products* **74**, 2338–2348 (2011).

- Nilsson, R. H., Ryberg, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Larsson, K.-H. & Kõljalg, U. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: A fungal perspective. *PLoS ONE* **1**, e59 (2006).
- Nisa, H., Kamili, A. N., Nawchoo, I. A., Shafi, S., Shameem, N. & Bandh, S. A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis* **82**, 50–59 (2015).
- Nishida, H., Tomoda, H., Cao, J., Okuda, S. & Omura, S. Purpactins, new inhibitors of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium purpurogenum*. II. Structure elucidation of purpactins A, B and C. *The Journal of Antibiotics* **44**, 144–151 (1991).
- Niu, S., Liu, D., Hu, X., Proksch, P., Shao, Z. & Lin, W. Spiromastixones A–O, antibacterial chlorodepsidones from a deep-sea-derived *Spiromastix* sp. Fungus. *Journal of Natural Products* **77**, 1021–1030 (2014).
- Niu, S., Liu, Q., Xia, J.-M., Xie, C.-L., Luo, Z.-H., Shao, Z., Liu, G. & Yang, X.-W. Polyketides from the deep-sea-derived fungus *Graphostroma* sp. MCCC 3A00421 showed potent antifood allergic activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 1369–1376 (2018).
- Noppawan, S., Mongkolthanaruk, W., Suwannasai, N., Senawong, T., Moontragoon, P., Boonmak, J., Youngme, S. & McCloskey, S. Chemical constituents and cytotoxic activity from the wood-decaying fungus *Xylaria* sp. SWUF08-37. *Natural Product Research* 1–10 (2018).
- Nordström, S. A. Endophytic growth of *Clonostachys rosea* in tomato and *Arabidopsis thaliana*. *Master-Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences* 35 (2014).
- Nosanchuk, J. D., Stark, R. E. & Casadevall, A. Fungal melanin: What do we know about structure? *Frontiers in Microbiology* **6**, (2015).
- Notegen, E.-A., Tori, M. & Tamm, C. Partial Synthesis of 3'-Hydroxy-2'-deoxy-2'',3'',4'',5''-tetrahydroverrucarin A. Verrucarins and Roridins, 38th Communication [1]. *Helvetica Chimica Acta* **64**, 316–328 (1981).
- Nunes, G., Policarpo, P., Costa, L., da Silva, T., Militão, G., Câmara, C., Barbosa Filho, J., Gutierrez, S., Islam, M. & de Freitas, R. In vitro antioxidant and cytotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. *Molecules* **19**, 4595–4607 (2014).
- O'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J.-M. & Vilgalys, R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 5544–5550 (2005).
- Okuno, T., Oikawa, S., Goto, T., Sawai, K., Shirahama, H. & Matsumoto, T. Structures and phytotoxicity of metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agricultural and Biological Chemistry* **50**, 997–1001 (1986).
- Ola, A. R. B. Natural products from endophytic fungi: Approaches for activation silent biosynthetic pathways, structure elucidation and bioactivity. Dissertation - Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2014).
- Ondeyka, J., Hensens, O. D., Zink, D., Ball, R., Lingham, R. B., Bills, G., Dombrowski, A. & Goetz, M. L-696,474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. II. Isolation and structure. *The Journal of Antibiotics* **45**, 679–685 (1992).
- Op De Beeck, M., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J. & Colpaert, J. V. Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding Studies. *PLoS ONE* **9**, e97629 (2014).
- Orfali, R. S., Aly, A. H., Ebrahim, W., Rudiyanayah & Proksch, P. Isochroman and isocoumarin derivatives from hypersaline lake sediment-derived fungus *Penicillium* sp. *Phytochemistry Letters* **13**, 234–238 (2015).

- Orfali, R. S., Ebrahim, W. & El-Shafae, A. M. Secondary metabolites from *Alternaria* sp., a fungal endophyte isolated from the seeds of *Ziziphus jujuba*. *Chemistry of Natural Compounds* **53**, 1031–1034 (2017).
- Ortega, H. E., Shen, Y. Y., TenDyke, K., Ríos, N. & Cubilla-Ríos, L. Polyhydroxylated macro-
lide isolated from the endophytic fungus *Pestalotiopsis mangiferae*. *Tetrahedron Letters* **55**, 2642–2645 (2014).
- Otoguro, K., Ui, H., Ishiyama, A., Arai, N., Kobayashi, M., Takahashi, Y., Masuma, R., Shi-
omi, K., Yamada, H. & Omura, S. In vitro antimalarial activities of the microbial metabo-
lites. *The Journal of Antibiotics* **56**, 322–324 (2003).
- Oxford, A. E., Raistrick, H. & Simonart, P. Studies in the biochemistry of micro-organisms:
Griseofulvin, C₁₇ H₁₇ O₆ Cl, a metabolic product of *Penicillium griseo-fulvum* Dierckx.
Biochemical Journal **33**, 240–248 (1939).
- Page, T. J. & Hughes, J. M. Neither molecular nor morphological data have all the answers;
with an example from *Macrobrachium* (Decapoda: Palaemonidae) from Australia.
Zootaxa **2874**, 65 (2011).
- Panda, D., Rathinasamy, K., Santra, M. K. & Wilson, L. Kinetic suppression of microtubule
dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment of
cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Amer-
ica* **102**, 9878–9883 (2005).
- Pansanit, A., Park, E.-J., Kondratyuk, T. P., Pezzuto, J. M., Lirdprapamongkol, K. & Kittak-
oop, P. Vermelhotin, an anti-inflammatory agent, suppresses nitric oxide production in
RAW 264.7 cells via p38 inhibition. *Journal of Natural Products* **76**, 1824–1827 (2013).
- Paranagama, P. A., Wijeratne, E. M. K. & Gunatilaka, A. A. L. Uncovering biosynthetic poten-
tial of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by
Paraphaeosphaeria quadrisepata and *Chaetomium chiversii* (1). *Journal of Natural
Products* **70**, 1939–1945 (2007).
- Park, J.-O., Hargreaves, J. R., McConville, E. J., Stirling, G. R., Ghisalberti, E. L. & Siva-
sithamparam, K. Production of leucinostatins and nematicidal activity of Australian iso-
lates of *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson. *Letters in Applied Microbiology* **38**,
271–276 (2004).
- Park, S., Kim, D., Kim, S., Lorz, L., Choi, E., Lim, H., Hossain, M., Jang, S., Choi, Y., Park,
K., Yoon, K., Kim, J.-H. & Cho, J. Loliolide presents antiapoptosis and antiscratching ef-
fects in human keratinocytes. *IJMS* **20**, 651 (2019).
- Parris, N. A. Non-aqueous reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatog-
raphy A* **157**, 161–170 (1978).
- Pastor, F. J. & Guarro, J. Clinical manifestations, treatment and outcome of *Paecilomyces
lilacinus* infections. *Clinical Microbiology and Infection* **12**, 948–960 (2006).
- Patil, R., Patil, M. & Maheshwari, V. in *Studies in Natural Products Chemistry* **49**, 189–205
(2016).
- Patel, S. Fragrance compounds: The wolves in sheep's clothings. *Medical Hypotheses* **102**,
106–111 (2017).
- Pérez-Fernández, V., Spagnoli, M., Rocco, A., Aturki, Z., Sciubba, F., De Salvador, F. R.,
Engel, P., Curini, R. & Gentili, A. Non-aqueous reversed-phase liquid-chromatography
of tocopherols and tocotrienols and their mass spectrometric quantification in pecan
nuts. *Journal of Food Composition and Analysis* **64**, 171–180 (2017).
- Pero, R. W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D. & Spalding, J. W. Toxicity of metabolites pro-
duced by the 'Alternaria'. *Environ. Health Perspect.* **4**, 87–94 (1973).
- Pesek, J. J., Matyska, M. T., Boysen, R. I., Yang, Y. & Hearn, M. T. W. Aqueous normal-

- phase chromatography using silica-hydride-based stationary phases. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **42**, 64–73 (2013).
- Peters, S., Draeger, S., Aust, H.-J. & Schulz, B. Interactions in dual cultures of endophytic fungi with host and nonhost plant calli. *Mycologia* **90**, 360 (1998).
- Petersen, A. B., Rønneest, M. H., Larsen, T. O. & Clausen, M. H. The Chemistry of Griseofulvin. *Chemical Reviews* **114**, 12088–12107 (2014).
- Petrini, O. & Dreyfuss, M. Endophytische Pilze in epiphytischen Araceae, Bromeliaceae und Orchidaceae. *Sydowia* 135–148 (1981).
- Petrini, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues in *Microbiology of the Phyllosphere* (eds. Fokkema, N. J. & Van Den Heuvel, J.) 175–187 (Cambridge University Press, 1986).
- Petrini, O. in *Microbial Ecology of Leaves* (eds. Andrews, J. H. & Hirano, S. S.) 179–197 (Springer New York, 1991).
- Phainuphong, P., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J., Kanjanasirirat, P., Borwornpinyo, S., Akrimajirachote, N., Yimnual, C. & Muanprasat, C. Depsides and depsidones from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG204. *Tetrahedron* **74**, 5691–5699 (2018).
- Pillmoor, J. B., Wright, K. & Terry, A. S. Natural products as a source of agrochemicals and leads for chemical synthesis. *Pest Management Science* **39**, 131–140 (1993).
- Piovano, M., Garbarino, J. A., Giannini, F. A., Correche, E. R., Feresin, G., Tapia, A., Zaccchino, S. & Enriz, R. D. Evaluation of antifungal and antibacterial activities of aromatic metabolites from lichens. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* **47**, (2002).
- Pita Boente, M. I., Kirby, G. W., Patrick, G. L. & Robins, D. J. Biosynthesis of hyalodendrin and didethiobis (methylthio) hyalodendrin, sulphur-containing 2, 5-dioxopiperazines of the 3 S, 6 S series. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1283–1290 (1991).
- Pittayakhajonwut, P., Suvannakad, R., Thienhirun, S., Prabpai, S., Kongsaree, P. & Tanticharoen, M. An anti-herpes simplex virus-type 1 agent from *Xylaria mellisii* (BCC 1005). *Tetrahedron Letters* **46**, 1341–1344 (2005).
- Pittayakhajonwut, P., Dramaee, A., Madla, S., Lartpornmatulee, N., Boonyuen, N. & Tanticharoen, M. Depsidones from the endophytic fungus BCC 8616. *Journal of Natural Products* **69**, 1361–1363 (2006).
- Poch, G. K. & Gloer, J. B. Auranticins A and B: two new depsidones from a mangrove isolate of the fungus *Preussia aurantiaca*. *Journal of natural products* **54**, 213–217 (1991).
- Podebrad, F., Heil, M., Reichert, S., Mosandl, A., Sewell, A. C. & Böhles, H. 4,5-dimethyl-3-hydroxy-2[5H]-furanone (sotolone)--the odour of maple syrup urine disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **22**, 107–114 (1999).
- Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N. & Sakayaroj, J. Pimarane diterpene and cytochalasin derivatives from the endophytic fungus *Eutypella scoparia* PSU-D44. *Journal of Natural Products* **69**, 856–858 (2006).
- PubMed, National Center for Biotechnology Information (NCBI), U.S. National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> (2019)
- Prendes, L. P., Zchetti, V. G. L., Pereyra, A., Morata de Ambrosini, V. I. & Ramirez, M. L. Water activity and temperature effects on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from Malbec wine grapes. *Journal of Applied Microbiology* **122**, 481–492 (2017).

- Pretsch, E., Bühlmann, P. & Badertscher, M. *Spektroskopische Daten zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen*. (Springer Berlin Heidelberg, 2010). 603. Singh, A. & Del Poeta, M. Sphingolipidomics: An important mechanistic tool for studying fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology* **7**, (2016).
- Priti, V., Ramesha, B. T., Shingh, S., Ravikanth, G., Ganeshiah, K. N., Suryanarayanan, T. S. & Shaanker, R. U. How promising are endophytic fungi as alternative sources of plant secondary metabolites. *Current Science* **Vol. 97**, 477–478 (2009).
- Promptutha, I., Lumyong, S., Dhanasekaran, V., McKenzie, E. H. C., Hyde, K. D. & Jeewon, R. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. *Microbial Ecology* **53**, 579–590 (2007).
- Pye, C. R., Bertin, M. J., Lokey, R. S., Gerwick, W. H. & Linington, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 5601–5606 (2017).
- Qin, D., Wang, L., Han, M., Wang, J., Song, H., Yan, X., Duan, X. & Dong, J. Effects of an endophytic fungus *Umbelopsis dimorpha* on the secondary metabolites of host-plant *Kadsura angustifolia*. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
- Qiu, Z., Wu, X., Zhang, J. & Huang, C. High-temperature induced changes of extracellular metabolites in *Pleurotus ostreatus* and their positive effects on the growth of *Trichoderma asperellum*. *Frontiers in Microbiology* **9**, (2018).
- Quang, D. N., Hashimoto, T., Tanaka, M., Baumgartner, M., Stadler, M. & Asakawa, Y. Chemical constituents of the ascomycete *Daldinia concentrica*. *Journal of Natural Products* **65**, 1869–1874 (2002).
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J. & Oberlies, N. H. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products* **80**, 756–770 (2017).
- Rajachan, O., Kanokmedhakul, S., Kanokmedhakul, K. & Soyong, K. Bioactive depsidones from the fungus *Pilobolus heterosporus*. *Planta Medica* **80**, 1635–1640 (2014).
- Rather, R. A., Srinivasan, V. & Anwar, M. Seasonal deviation effects foliar endophyte assemblage and diversity in *Asparagus racemosus* and *Hemidesmus indicus*. *BMC Ecology* **18**, 52 (2018).
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes* **7**, 355–364 (2007).
- Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E. & Flaws, J. A. Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *Journal of Endocrinology* **233**, R109–R129 (2017).
- Rauf, A., Subhan, H., Abbasi, R., Adhikari, B., Shah, A. H., Rana, U. A., Abbas, Q., Qureshi, I. Z., Hussain, H., Mazhar, K., Badshah, A., Kraatz, H.-B. & Shah, A. Biological activity, pH dependent redox behavior and UV–Vis spectroscopic studies of naphthalene derivatives. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **140**, 173–181 (2014).
- Redecker, D., Kodner, R. & Graham, L. E. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**, 1920–1921 (2000).
- Redman, R. S. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science* **298**, 1581–1581 (2002).
- Rehner, S. A. & Samuels, G. J. Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **98**, 625–634 (1994).
- Reid, R. G. & Sarker, S. D. in *Natural Products Isolation* (eds. Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I.) 117–157 (Humana Press, 2006).

- Ren, J., Qin, J. J., Cheng, X. R., Yan, S. K., Jin, H. Z. & Zhang, W. D. Five new sesquiterpene lactones from *Inula hupehensis*. *Archives of Pharmacal Research* **36**, 1319–1325 (2013).
- Reynertson, K. A., Wallace, A. M., Adachi, S., Gil, R. R., Yang, H., Basile, M. J., D'Armiento, J., Weinstein, I. B. & Kennelly, E. J. Bioactive depsides and anthocyanins from Jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*). *Journal of Natural Products* **69**, 1228–1230 (2006).
- Ribeiro, A. I., Costa, E. S., Thomasi, S. S., Brandão, D. F. R., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., Forim, M. R., Ferreira, A. G., Pascholati, S. F., Gusmão, L. F. P. & da Silva, M. F. das G. F. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Stachybotrys levispora* and its secondary metabolite Griseofulvin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **66**, 7627–7632 (2018).
- Ricci, M., Sassi, P., Nastruzzi, C. & Róssi, C. Liposome-based formulations for the antibiotic nonapeptide Leucinostatin A: Fourier transform infrared spectroscopy characterization and in vivo toxicologic study. *AAPS PharmSciTech* **1**, 9–19 (2000).
- Ricci, M., Basta, G., Calafiore, R., Luca, G., Nastruzzi, C., Giovagnoli, S. & Rossi, C. Leucinostatin-A loaded DL-lactide/glycolide-copolymer nanoparticles: incorporation efficiency and in vivo evaluation. *Acta Technologiae et Legis Medicamenti* 73–79 (2002).
- Ricci, M., Blasi, P., Giovagnoli, S., Perioli, L., Vescovi, C. & Rossi, C. Leucinostatin-A loaded nanospheres: characterization and in vivo toxicity and efficacy evaluation. *International Journal of Pharmaceutics* **275**, 61–72 (2004).
- Riebe, F. Isolierung und Strukturaufklärung bioaktiver Naturstoffe aus schwammassoziierten Pilzen. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2009).
- Robert, V., Vu, D., Amor, A. B. H., van de Wiele, N., Brouwer, C., Jabas, B., Szoke, S., Dridi, A., Triki, M., Daoud, S. B., Chouchen, O., Vaas, L., de Cock, A., Stalpers, J. A., Stalpers, D., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., dos Santos, F. B., Stegehuis, G., Li, W., Wu, L., Zhang, R., Ma, J., Zhou, M., Gorjón, S. P., Eurwilaichitr, L., Ingriswang, S., Hansen, K., Schoch, C., Robbertse, B., Irinyi, L., Meyer, W., Cardinali, G., Hawksworth, D. L., Taylor, J. W. & Crous, P. W. MycoBank gearing up for new horizons. *IMA Fungus* **4**, 371–379 (2013).
- Rodriguez, R. J., Redman, R. S. & Henson, J. M. The Role of Fungal Symbioses in the Adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* **9**, 261–272 (2004).
- Rodriguez, R. J., Henson, J., Van Volkenburgh, E., Hoy, M., Wright, L., Beckwith, F., Kim, Y.-O. & Redman, R. S. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal* **2**, 404–416 (2008).
- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E. & Redman, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* **182**, 314–330 (2009).
- Rojas, E. I., Herre, E. A., Mejia, L. C., Arnold, A. E., Chaverri, P. & Samuels, G. J. Endomeilanconiopsis, a new anamorph genus in the Botryosphaeriaceae. *Mycologia* **100**, 760–775 (2008).
- Roninson, I. B., Chin, J. E., Choi, K. G., Gros, P., Housman, D. E., Fojo, A., Shen, D. W., Gottesman, M. M. & Pastan, I. Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 4538–4542 (1986).
- Root, N. Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus endophytischen Pilzen. Dissertation, Universität Paderbon (2001).
- Rossi, C., Benciari, Z., Casinovi, C. G. & Tuttobello, L. Two phytotoxic, antibiotic peptides produced by submerged cultures of *Paecilomyces marquandii* (Masse) Hughes. *Phytopathologia Mediterranea* **22**, 209–211 (1983).

- Rossi, C., Ricci, M. & Tuttobello, L. Is leucinostatin A a mycotoxin? *Acta Technologiae et Legis Medicamenti* **4**, 1–6 (1993).
- Rothweiler, W. & Tamm, Ch. Isolation and structure of Phomin. *Experientia* **22**, 750–752 (1966).
- Rozengurt, E. & Heppel, L. A. A Specific effect of external ATP on the permeability of transformed 3T3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **67**, 1581–1588 (1975).
- Rukachaisirikul, V., Buadam, S., Sukpondma, Y., Phongpaichit, S., Sakayaroj, J. & Hutadilok-Towatana, N. Indanone and mellein derivatives from the *Garcinia*-derived fungus *Xylaria* sp. PSU-G12. *Phytochemistry Letters* **6**, 135–138 (2013).
- Rusman, Y., Held, B. W., Blanchette, R. A., Wittlin, S. & Salomon, C. E. Soudanones A–G: Antifungal isochromanones from the ascomycetous fungus *Cadophora* sp. isolated from an iron mine. *Journal of Natural Products* **78**, 1456–1460 (2015).
- Sadorn, K., Saepua, S., Boonyuen, N., Laksanacharoen, P., Rachtawee, P., Prabpai, S., Kongsaree, P. & Pittayakhajonwut, P. Allahabadolactones A and B from the endophytic fungus, *Aspergillus allahabadii* BCC45335. *Tetrahedron* **72**, 489–495 (2016).
- Saetang, P., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Preedanon, S., Sakayaroj, J., Borwornpinyo, S., Seemakhan, S. & Muanprasat, C. Depsidones and an α -pyrone derivative from *Simplicillium* sp. PSU-H41, an endophytic fungus from *Hevea brasiliensis* leaf. *Phytochemistry* **143**, 115–123 (2017).
- Saha, D., Fetzner, R., Burkhardt, B., Podlech, J., Metzler, M., Dang, H., Lawrence, C. & Fischer, R. Identification of a polyketide synthase required for alternariol (AOH) and alternariol-9-methyl ether (AME) formation in *Alternaria alternata*. *PLoS ONE* **7**, e40564 (2012).
- Saitou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**, 406–425 (1987).
- Salituro, G. M. & Dufresne, C. Isolation by Low-Pressure Column Chromatography. in *Natural Products Isolation* (ed. Cannell, R. J. P.) **4**, 111–140 (Humana Press, 1998).
- Sánchez Márquez, S., Bills, G.F. & Zabalgoceazcoa, I. Diversity and structure of the fungal endophytic assemblages from two sympatric coastal grasses. *Fungal Diversity* **33**, 87–100 (2008).
- Santiago, R. F., de Brito, T. V., Dias, J. M., Dias, G. J., da Cruz, J. S., Batista, J. A., Silva, R. O., Souza, M. H. L. P., de Albuquerque Ribeiro, R., Gutierrez, S. J. C., Freitas, R. M., Medeiros, J.-V. R. & dos Reis Barbosa, A. L. Riparin B, a synthetic compound analogue of Riparin, inhibits the systemic inflammatory response and oxidative stress in mice. *Inflammation* **38**, 2203–2215 (2015).
- Santos, L. M. & Faria, L. R. R. The taxonomy's new clothes: a little more about the DNA-based taxonomy. *Zootaxa* **3025**, 66 (2011).
- Sarker, S. D., Latif, Z. & Gray, A. I. Natural product isolation, in: *Natural Products Isolation – 2nd ed.* / edited by Satyajit D. Sarker, Zahid Latif, Alexander I. Gray. p. cm. – (Methods in biotechnology; 20), Humana Press, (2006).
- Sato, M., Beppu, T. & Arima, K. Properties and Structure of a novel peptide antibiotic No. 1907. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**, 3037–3040 (1980).
- Sato, Y., Oda, T. & Saito, H. Microbial transformation of (+)- and (-)-dehydrogriseofulvin by *Streptomyces* species analyzed by ²H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **29**, 2313–2321 (1981).
- Sauman, I. & Berry, S. J. Cytochalasin-D treatment triggers premature apoptosis of insect ovarian follicle and nurse cells. *Int. J. Dev. Biol.* **37**, 441–450 (1993).

- Savard, M. E., Miller, J. D., Blais, L. A., Seifert, K. A. & Samson, R. A. Secondary metabolites of *Penicillium bilaii* strain PB-50. *Mycopathologia* **127**, 19–27 (1994).
- Sawadsitang, S., Mongkolthanaruk, W., Suwannasai, N. & Sodngam, S. Antimalarial and cytotoxic constituents of *Xylaria* cf. *cubensis* PK108. *Natural Product Research* **29**, 2033–2036 (2015).
- Sawadsitang, S., Suwannasai, N., Mongkolthanaruk, W., Ahmadi, P. & McCloskey, S. A new amino amidine derivative from the wood-decaying fungus *Xylaria* cf. *cubensis* SWUF08-86. *Natural Product Research* **32**, 2260–2267 (2017).
- Schaffner-Barbero, C., Martín-Fontecha, M., Chacón, P. & Andreu, J. M. Targeting the Assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules. *ACS Chemical Biology* **7**, 269–277 (2012).
- Schardl, C. L., Leuchtman, A. & Spiering, M. J. Symbioses of grasses with seedborne fungal endophytes. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 315–340 (2004).
- Schardl, C. L., Grossman, R. B., Nagabhyru, P., Faulkner, J. R. & Mallik, U. P. Loline alkaloids: Currencies of mutualism. *Phytochemistry* **68**, 980–996 (2007).
- Scherlach, K., Boettger, D., Remme, N. & Hertweck, C. The chemistry and biology of cytochalasans. *Natural Product Reports* **27**, 869 (2010).
- Schlörke, O. Isolierung, Strukturaufklärung und Biosynthese von Sekundärmetaboliten endophytischer Pilze aus Algen und Pflanzen mariner Habitats. Dissertation, Universität Göttingen (2005).
- Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J. & Theoduloz, C. Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **21**, 27–32 (2005).
- Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Lima, B., Pertino, M., Sortino, M., Zacchino, S., Arias, A. R. de & Feresin, G. E. A new antifungal and antiprotozoal depside from the andean lichen *Protousnea poeppigii*. *Phytotherapy Research* **22**, 349–355 (2008).
- Schmit, J. P. & Mueller, G. M. An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation* **16**, 99–111 (2007).
- Schneider, G., Anke, H. & Sterner, O. New secondary metabolites from a mycophilic *Hansfordia* species. *Natural Product Letters* **10**, 133–138 (1997).

- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Bolchacova E., Voigt K., Crous P.W., Miller A.N., Wingfield M.J., Aime M.C., An K.D., Bai F.Y., Barreto R.W., Begerow D., Bergeron M.J., Blackwell M., Boekhout T., Bogale M., Boonyuen N., Burgaz A.R., Buyck B., Cai L., Cai Q., Cardinali G., Chaverri P., Coppins B.J., Crespo A., Cubas P., Cummings C., Damm U., de Beer Z.W., de Hoog G.S., Del-Prado R., Dentinger B., Diéguez-Uribeondo J., Divakar P.K., Douglas B., Dueñas M., Duong T.A., Eberhardt U., Edwards J.E., El-shahed M.S., Fliegerova K., Furtado M, García M.A., Ge Z.W., Griffith G.W., Griffiths K., Groenewald J.Z., Groenewald M., Grube M., Gryzenhout M., Guo L.D., Hagen F., Hambleton S., Hamelin R.C., Hansen K., Harrold P, Heller G., Herrera C., Hirayama K., Hirooka Y., Ho H.M., Hoffmann K., Hofstetter V., Högnabba F., Hollingsworth P.M., Hong S.B., Hosaka K., Houbraken J., Hughes K., Huhtinen S, Hyde K.D., James T., Johnson E.M., Johnson J.E., Johnston P.R., Jones E.B., Kelly L.J., Kirk P.M., Knapp D.G., Kõljalg U., Kovács G.M., Kurtzman C.P., Landvik S., Leavitt S.D., Liggenstoffer A.S., Liimatainen K., Lombard L., Luangsa-Ard J.J., Lumbsch H.T., Maganti H., Maharachchikumbura S.S., Martin M.P., May T.W., McTaggart A.R., Methven A.S., Meyer W, Moncalvo J.M., Mongkolsamrit S., Nagy L.G., Nilsson R.H., Niskanen T., Nyilasi I., Okada G., Okane I., Olariaga I., Otte J., Papp T., Park D., Petkovits T., Pino-Bodas R., Quaedvlieg W., Raja H.A., Redecker D., Rintoul T.L., Ruibal C., Sarmiento-Ramírez J.M., Schmitt I., Schüßler A., Shearer C., Sotome K., Stefani F.O., Stenroos S., Stielow B., Stockinger H., Suetrong S., Suh S.O., Sung G.H., Suzuki M., Tanaka K., Tedersoo L., Telleria M.T., Tretter E., Untereiner W.A., Urbina H., Vágvölgyi C., Vialle A., Vu T.D., Walther G., Wang Q.M, Wang Y., Weir B.S., Weiß M., White M.M, Xu J., Yahr R., Yang Z.L., Yurkov A., Zamora J.C., Zhang N., Zhuang W.Y., Schindel D.. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6241–6246 (2012).
- Schulz, B., Wanke, U., Draeger, S. & Aust, H.-J. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological research* **97**, 1447–1450 (1993).
- Schulz, B., Sucker, J., Aust, H. J., Krohn, K., Ludewig, K., Jones, P. G. & Döring, D. Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycological Research* **99**, 1007–1015 (1995).
- Schulz, B., Guske S., Dammann U. & Boyle, C. Endophyte- host interactions II. Defining symbiosis of the endophyte-host interaction. *Symbiosis* **25**, 213–227 (1998).
- Schulz, B., Römmert, A.-K., Dammann, U., Aust, H.-Jür. & Strack, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research* **103**, 1275–1283 (1999).
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.-K. & Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* **106**, 996–1004 (2002).
- Schulz, B. & Boyle, C. The endophytic continuum. *Mycological Research* **109**, 661–686 (2005).
- Schulz, B. & Boyle, C. What are Endophytes? in *Microbial root endophytes* (eds. Schulz, B. J. E., Boyle, C. J. C. & Sieber, T. N.) **9**, 1–13 (Springer Berlin Heidelberg, 2006).
- Schulz, B., Haas, S., Junker, C., Andrée, N. & Schobert, M. Fungal endophytes are involved in multiple balanced antagonisms. *Current Science* **109**, 39–45 (2015).
- Schwindl, S., Kraus, B. & Heilmann, J. Secondary metabolites from the leaves of *Juglans regia* L. *Biochemical Systematics and Ecology* **83**, 130–136 (2019).
- SciFinder; Chemical Abstracts Service (CAS): Columbus, <https://scifinder.cas.org> (2019)

- Sekita, S., Yoshihira, K., Natori, S., Udagawa, S., Sakabe, F., Kurata, H. & Umeda, M. Chaetoglobosins, cytotoxic 10-(indol-3-yl)-[13]cytochalasins from *Chaetomium* spp. I. production, isolation and some cytological effects of chaetoglobosins A-J. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **30**, 1609–1617 (1982).
- Selim, K. A., El-Beih, A. A., Abdel-Rahman, T. M. & El-Diwany, A. Biology of endophytic fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* **2**, 31–82 (2012).
- Selim, K., Elkhateeb, W., Tawila, A., El-Beih, A., Abdel-Rahman, T., El-Diwany, A. & Ahmed, E. Antiviral and antioxidant potential of fungal endophytes of egyptian medicinal plants. *Fermentation* **4**, 49 (2018).
- SDBSWeb, (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, <https://sdfs.db.aist.go.jp>) (2019)
- Shang, Z., Raju, R., Salim, A. A., Khalil, Z. G. & Capon, R. J. Cytochalasins from an Australian marine sediment-derived *Phomopsis* sp. (CMB-M0042F): Acid-mediated intramolecular cycloadditions enhance chemical diversity. *The Journal of Organic Chemistry* **82**, 9704–9709 (2017).
- Shao, C., She, Z., Guo, Z., Peng, H., Cai, X., Zhou, S., Gu, Y. & Lin, Y. ¹H and ¹³C NMR assignments for two anthraquinones and two xanthenes from the mangrove fungus (ZSUH-36). *Magnetic Resonance in Chemistry* **45**, 434–438 (2007).
- Shao, J. & Bao, J. Rice phenolics and other natural products. in *Rice: chemistry and technology* 4.ed. (2018).
- Sharif, A., Ahmed, E., Malik, A., Mukhtar-UI-Hassan, Munawar, M., Farrukh, A., Nagra, S., Anwar, J., Ashraf, M. & Mahmood, Z. Antimicrobial constituents from *Aerva javanica*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* **33**, 439–443 (2011).
- Sheldrick, G. M. A short history of SHELX. *Acta Crystallographica Section A Foundations of Crystallography* **64**, 112–122 (2008).
- Sheldrick, G. M. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C Structural Chemistry* **71**, 3–8 (2015).
- Shen, L., Luo, Q., Shen, Z.-P., Li, L.-Y., Zhang, X.-J., Wei, Z.-Q., Fu, Y., Song, Y.-C. & Tan, R.-X. A new cytochalasin from endophytic *Phomopsis* sp. IFB-E060. *Chinese Journal of Natural Medicines* **12**, 512–516 (2014).
- Shen, B. A new golden age of natural products drug discovery. *Cell* **163**, 1297–1300 (2015).
- Shi, L.-M. & Zhan, Z.-J. Structural revision of 19,20-Epoxycholesterol D and its cytotoxic activity. *Journal of Chemical Research* **3**, 144-145 (2007).
- Shi, X.-S., Wang, D.-J., Li, X.-M., Li, H.-L., Meng, L.-H., Li, X., Pi, Y., Zhou, X.-W. & Wang, B.-G. Antimicrobial polyketides from *Trichoderma koningiopsis* QA-3, an endophytic fungus obtained from the medicinal plant *Artemisia argyi*. *RSC Advances* **7**, 51335–51342 (2017).
- Shin, J. & Fenical, W. Isolation of gliovictin from the marine deuteromycete *Asteromyces cruciatus*. *Phytochemistry* **26**, 3347 (1987).
- Shrestha, G. & St. Clair, L. L. Lichens: a promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews* **12**, 229–244 (2013).
- Shrestha, G. Exploring the antibacterial, antioxidant, and anticancer properties of lichen metabolites. Dissertation Brigham Young University (2015).
- Sieber, T. N. & Dorworth, C. E. An ecological study about assemblages of endophytic fungi in *Acer macrophyllum* in British Columbia: in search of candidate mycoherbicides. *Canadian Journal of Botany* **72**, 1397–1402 (1994).

- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J. D. & Higgins, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* **7**, 539–539 (2014).
- Silva, G. H., Oliveira, C. M. de, Teles, H. L., Bolzani, V. da S., Araujo, A. R., Pfenning, L. H., Young, M. C. M., Costa-Neto, C. M., Haddad, R. & Eberlin, M. N., Cytochalasins produced by *Xylaria* sp., an endophytic fungus from *Piper aduncum*. *Química Nova* **33**, 2038–2041 (2010).
- Silva, R. O., Damasceno, S. R. B., Silva, I. S., Silva, V. G., Brito, C. F. C., Teixeira, A. É. A., Nunes, G. B. L., Camara, C. A., Filho, J. M. B., Gutierrez, S. J. C., Ribeiro, R. A., Souza, M. H. L. P., Barbosa, A. L. R., Freitas, R. M. & Medeiros, J. V. R. Riparin A, a compound from *Aniba riparia*, attenuate the inflammatory response by modulation of neutrophil migration. *Chemico-Biological Interactions* **229**, 55–63 (2015).
- Silverman Kitchin, J. E., Pomeranz, M. K., Pak, G., Washenik, K. & Shupack, J. L. Rediscovering mycophenolic acid: A review of its mechanism, side effects, and potential uses. *Journal of the American Academy of Dermatology* **37**, 445–449 (1997).
- Smetanina, O. F., Yurchenko, A. N., Ivanets, E. V., Gerasimenko, A. V., Trinh, P. T. H., Ly, B. M., Nhut, N. D., Van, T. T. T., Yurchenko, E. A. & Afiyatullo, Sh. Sh. Aromatic metabolites of marine fungus penicillium sp. KMM 4672 Associated with a brown alga *Padina* sp. *Chemistry of Natural Compounds* **53**, 600–602 (2017).
- Smith, G., C. Y. Liew, E. & Hyde, K. The Xylariales: A monophyletic order containing 7 families. *Fungal Diversity* 185-218. (2003).
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. (Wiley, 2010).
- Solhaug, A., Eriksen, G. S. & Holme, J. A. Mechanisms of action and toxicity of the mycotoxin Alternariol: A Review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **119**, 533–539 (2016).
- Song, Q.-Y., Nan, Z.-B., Gao, K., Song, H., Tian, P., Zhang, X.-X., Li, C.-J., Xu, W.-B. & Li, X.-Z. Antifungal, Phytotoxic, and Cytotoxic Activities of Metabolites from *Epichloë bromicola*, a Fungus Obtained from *Elymus tangutorum* Grass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 8787–8792 (2015).
- Song, P.-P., Zhao, J., Liu, Z.-L., Duan, Y.-B., Hou, Y.-P., Zhao, C.-Q., Wu, M., Wei, M., Wang, N.-H., Lv, Y. & Han, Z.-J. Evaluation of antifungal activities and structure-activity relationships of coumarin derivatives: Evaluation of antifungal activities and structure-activity relationships of coumarin derivatives. *Pest Management Science* **73**, 94–101 (2017).
- Song, R.-Y., Wang, X.-B., Yin, G.-P., Liu, R.-H., Kong, L.-Y. & Yang, M.-H. Isocoumarin derivatives from the endophytic fungus, *Pestalotiopsis* sp. *Fitoterapia* **122**, 115–118 (2017b).
- Sorres, J., Nirma, C., Touré, S., Eparvier, V. & Stien, D. Two new isopimarane diterpenoids from the endophytic fungus *Xylaria* sp. SNB-GTC2501. *Tetrahedron Letters* **56**, 4596–4598 (2015).
- Souza, J. J. de, Vieira, I. J. C., Rodrigues-Filho, E. & Braz-Filho, R. Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules* **16**, 10604–10618 (2011).
- Spatafora, J. W., Sung, G.-H., Sung, J.-M., Hywel-Jones, N. L. & White, J. F. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes. *Molecular Ecology* **16**, 1701–1711 (2007).

- Stadler, M., Fournier, J., Quang, D. N. & Akulov, A. Y. Metabolomic studies on the chemical ecology of the Xylariaceae (Ascomycota). *Natural Product Communications* **2**, 287–304 (2007).
- Stadler, M. Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for. *CREAM* **1**, 75–133 (2011).
- Stadler, M., Læssøe, T., Fournier, J., Decock, C., Schmieschek, B., Tichy, H.-V. & Peršoh, D. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae)1. *Studies in Mycology* **77**, 1–143 (2014).
- Stead, P. Isolation by Preparative HPLC. In: *Natural Products Isolation* (ed. Cannell, R. J. P.) **4**, 165–208 (Humana Press, 1998).
- Steinbeck, C. & Kuhn, S. NMRShiftDB – compound identification and structure elucidation support through a free community-built web database. *Phytochemistry* **65**, 2711–2717 (2004).
- Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Irinyi, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A. M. S., Damm, U., Yilmaz, N., Houbraken, J., Lombard, L., Quaedvlieg, W., Binder, M., Vaas, L. A. I., Vu, D., Yurkov, A., Begerow, D., Roehl, O., Guerreiro, M., Fonseca, A., Samerpitak, K., van Diepeningen, A. D., Dolatabadi, S., Moreno, L. F., Casaregola, S., Mallet, S., Jacques, N., Roscini, L., Egidi, E., Bizet, C., Garcia-Hermoso, D., Martín, M. P., Deng, S., Groenewald, J. Z., Boekhout, T., de Beer, Z. W., Barnes, I., Duong, T. A., Wingfield, M. J., de Hoog, G. S., Crous, P. W., Lewis, C. T., Hambleton, S., Moussa, T. A. A., Al-Zahrani, H. S., Almaghrabi, O. A., Louis-Seize, G., Assabgui, R., McCormick, W., Omer, G., Dukik, K., Cardinali, G., Eberhardt, U., de Vries, M. & Robert, V. One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* **35**, 242–263 (2015).
- Stierle, A. A., Upadhyay, R., Hershenhorn, J., Strobel, G. A. & Molina, G. The phytotoxins of *Mycosphaerella fijiensis*, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains. *Experientia* **47**, 853–859 (1991).
- Stillwell, M. A., Magasi, L. P. & Strunz, G. M. Production, isolation, and antimicrobial activity of hyalodendrin, a new antibiotic produced by a species of *Hyalodendron*. *Canadian Journal of Microbiology* **20**, 759–764 (1974).
- Stone, J. K., Bacon, C. W. & White, J. F. in *Microbial endophytes* (eds. Bacon, C. W. & White, J. F.) **1**, 3–29 (Marcel Dekker, 2000).
- Stone, J. K., Polishook, J. D. & White, J. F. in *Biodiversity of Fungi* (eds. Mueller, G. M., Bills, G. F. & Foster, M. S.) 241–270 (Academic Press, 2004).
- Stork, G., Nakahara, Y., Nakahara, Y. & Greenlee, W. J. Total synthesis of cytochalasin B. *Journal of the American Chemical Society* **100**, 7775–7777 (1978).
- Strobel, G. A., Hess, W. M., Ford, E., Sidhu, R. S. & Yang, X. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. *Journal of Industrial Microbiology* **17**, 417–423 (1996).
- Strobel, G. A., Torczynski, R. & Bollon, A. *Acremonium* sp.—a leucinostatin A producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science* **128**, 97–108 (1997).
- Strobel, G. A. & Hess, W. M. Glucosylation of the peptide leucinostatin A, produced by an endophytic fungus of European yew, may protect the host from leucinostatin toxicity. *Chemistry & Biology* **4**, 529–536 (1997).
- Strobel, G. & Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**, 491–502 (2003).

- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. & Harper, J. Natural products from endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products* **67**, 257–268 (2004).
- Strobel, G., Daisy, B. & Castillo, U. Novel natural products from rainforest endophytes in *Natural Products* 329–351 (Springer, 2005).
- Strobel, G., In: *Fungal Endophytes in Plants*. (MDPI, 2018).
- Strunz, G. M., Kakushima, M., Stillwell, M. A. & Heissner, C. J. Hyalodendrin: a new fungitoxic epidithiodioxopiperazine produced by a *Hyalodendron* species. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 2600 (1973).
- Strunz, G. M., Heissner, C. J., Kakushima, M. & Stillwell, M. A. Metabolites of *Hyalodendron* sp.: Bisdethiodi(methylthio)hyalodendrin. *Canadian Journal of Chemistry* **52**, 325–326 (1974).
- Strunz, G. M., Kakushima, M. & Stillwell, M. A. An Epitetrathiodioxopiperazine with 3 S,6 S configuration from *Hyalodendron* sp. *Canadian Journal of Chemistry* **53**, 295–297 (1975).
- Studzińska-Sroka, E. & Dubino, A. Lichens as a source of chemical compounds with anti-inflammatory activity. *Herba Polonica* **64**, 56–64 (2018).
- Su, Y.-Y., Guo, L.-D. & Hyde, K. D. Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in inner mongolia steppe, China. *Fungal Diversity* **43**, 93–101 (2010).
- Sumarah, M. W., Puniani, E., Blackwell, B. A. & Miller, J. D. Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. *Journal of Natural Products* **71**, 1393–1398 (2008).
- Sun, P.-H., Yang, Z.-Q., Li, M.-K., Chen, W.-M., Liu, Q. & Yao, X.-S. 3D-QSAR Study of synthetic furanones as inhibitors of quorum sensing by using CoMFA and CoMSIA Approach. *LDDD* **6**, 568–574 (2009).
- Sun, X. & Guo, L.-D. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. *Mycology* **3**, 65–76 (2012).
- Sun, Y., Wang, H., Guo, G., Pu, Y., Yan, B. & Wang, C. Isolation, purification, and identification of antialgal substances in green alga *Ulva prolifera* for antialgal activity against the common harmful red tide microalgae. *Environmental Science and Pollution Research* **23**, 1449–1459 (2016).
- Sureram, S., Wiyakrutta, S., Ngamrojanavanich, N., Mahidol, C., Ruchirawat, S. & Kittakoop, P. Depsidones, aromatase inhibitors and radical scavenging agents from the marine-derived fungus *Aspergillus unguis* CRI282-03. *Planta Medica* **78**, 582–588 (2012).
- Suryanarayanan, T. S. & Thennarasan, S. Temporal variation in endophyte assemblages of *Plumeria rubra* leaves. *Fungal Diversity* 197–204 (2004).
- Suryanarayanan, T. S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M. B., Sasse, F., Jansen, R. & Murali, T. S. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews* **23**, 9–19 (2009).
- Sutton, J. C., Liu, W., Ma, J., Brown, W. G., Stewart, J. F. & Walker, G. D. Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Hort.* 279–286 (2008).
- Sy-Cordero, A. A., Graf, T. N., Adcock, A. F., Kroll, D. J., Shen, Q., Swanson, S. M., Wani, M. C., Pearce, C. J. & Oberlies, N. H. Cyclodepsipeptides, sesquiterpenoids, and other cytotoxic metabolites from the filamentous fungus *Trichothecium* sp. (MSX 51320). *Journal of Natural Products* **74**, 2137–2142 (2011).

- Talontsi, F. M., Douanla-Meli, C. & Laatsch, H. Depsidones from an endophytic fungus *Chaetomium* sp. associated with *Zanthoxylum leprieurii*. *Zeitschrift für Naturforschung B* **68**, 1259–1264 (2013).
- Tamura, K. & Nei, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular biology and evolution* **10**, 512–526 (1993).
- Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 11030–11035 (2004).
- Tan, R. X. & Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports* **18**, 448–459 (2001).
- Tan, N., Tao, Y., Pan, J., Wang, S., Xu, F., She, Z., Lin, Y. & Gareth Jones, E. B. Isolation, structure elucidation, and mutagenicity of four alternariol derivatives produced by the mangrove endophytic fungus No. 2240. *Chemistry of Natural Compounds* **44**, 296–300 (2008).
- Tanaka, K., Hirayama, K., Yonezawa, H., Sato, G., Toriyabe, A., Kudo, H., Hashimoto, A., Matsumura, M., Harada, Y., Kurihara, Y., Shirouzu, T. & Hosoya, T. Revision of the Massarineae (Pleosporales, Dothideomycetes). *Studies in Mycology* **82**, 75–136 (2015).
- Tang, F., Yang, Y., Tang, Y., Tang, S., Yang, L., Sun, B., Jiang, B., Dong, J., Liu, H., Huang, M., Geng, M.-Y. & Huang, W. One-pot N-glycosylation remodeling of IgG with non-natural sialylglycopeptides enables glycosite-specific and dual-payload antibody–drug conjugates. *Organic & Biomolecular Chemistry* **14**, 9501–9518 (2016).
- Tao, L., Zhang, J., Liang, Y., Chen, L., Zheng, L., Wang, F., Mi, Y., She, Z., To, K. K. W., Lin, Y. & Fu, L. Anticancer effect and structure-activity analysis of marine products isolated from metabolites of mangrove fungi in the south china sea. *Marine Drugs* **8**, 1094–1105 (2010).
- Teixeira, C. P. L., de Melo, C. T. V., de Araújo, F. L. O., de Carvalho, A. M. R., Silva, M. I. G., Barbosa-Filho, J. M., Macêdo, D. S., de Barros Viana, G. S. & de Sousa, F. C. F. Anti-depressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system: Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **27**, 129–137 (2013).
- Teles, A. P. C. & Takahashi, J. A. Paecilomide, a new acetylcholinesterase inhibitor from *Paecilomyces lilacinus*. *Microbiological Research* **168**, 204–210 (2013).
- Tennakoon, D. Taxonomy and phylogenetic appraisal of *Montagnula jonesii* sp. nov. (Didymosphaeriaceae, Pleosporales). *Mycosphere* **7**, 1346–1356 (2016).
- Teuscher, F. Bioaktive Naturstoffe aus marinen endophytischen und schwammassoziierten Pilzen des Indischen und Pazifischen Ozeans. Dissertation, Heinrich Heine Universität Düsseldorf (2005).
- Thines, E., Daußmann, T., Sterner, O., Semar, M. & Anke, H. Fungal melanin biosynthesis inhibitors: introduction of a test system based on the production of Dihydroxynaphthalene (DHN) melanin in agar cultures. *Zeitschrift für Naturforschung C* **50**, 813–819 (1995).
- Thines, E., Anke, H. & Sterner, O. Scytalols A, B, C, and D and other modulators of melanin biosynthesis from *Scytalidium* sp. 36-93. *The Journal of Antibiotics* **51**, 387–393 (1998).
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**, 4673–4680 (1994).

- Thongsandee, W., Matsuda, Y. & Ito, S. Temporal variations in endophytic fungal assemblages of *Ginkgo biloba* L. *Journal of Forest Research* **17**, 213–218 (2012).
- Tian, Y., Amand, S., Buisson, D., Kunz, C., Hachette, F., Dupont, J., Nay, B. & Prado, S. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit. *Phytochemistry* **108**, 95–101 (2014).
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S. & Sato, H. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental Samples. *PLoS ONE* **7**, e40863 (2012).
- TRBA 460, Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe. Technische Regeln für Biologische Arbeitsstoffe 460, Einstufung von Pilzen in Risikogruppen.
- Trémouillaux-Guiller, J., Rohr, T., Rohr, R. & Huss, V. A. Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *American journal of botany* **89**, 727–733 (2002).
- Trendowski, M. Using cytochalasins to improve current chemotherapeutic approaches. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **15**, 327–335 (2015).
- Trendowski, M., Christen, T. D., Acquafondata, C. & Fondy, T. P. Effects of cytochalasin congeners, microtubule-directed agents, and doxorubicin alone or in combination against human ovarian carcinoma cell lines in vitro. *BMC Cancer* **15**, 632 (2015).
- Tsueng, G. & Lam, K. S. Stabilization effect of resin on the production of potent proteasome inhibitor NPI-0052 during submerged fermentation of *Salinispora tropica*. *The Journal Of Antibiotics* **60**, 469 (2007).
- Turkkan, M., Andolfi, A., Zonno, M., Erper, İ., Perrone, C., Cimmino, A., Vurro, M. & Evidente, A. Phytotoxins produced by *Pestalotiopsis guepinii*, the causal agent of hazelnut twig blight. *Phytopathologia Mediterranea* **50**, 154–158 (2011).
- U'Ren, J. M., Lutzoni, F., Miadlikowska, J., Laetsch, A. D. & Arnold, A. E. Host and geographic structure of endophytic and endolichenic fungi at a continental scale. *American Journal of Botany* **99**, 898–914 (2012).
- Uchida, I. & Kuriyama, K. The π - π circular dichroism of $\delta\beta$ -unsaturated γ -lactones. *Tetrahedron Letters* **15**, 3761–3764 (1974).
- Van Goietsenoven, G., Mathieu, V., Andolfi, A., Cimmino, A., Lefranc, F., Kiss, R. & Evidente, A. *In vitro* growth inhibitory effects of cytochalasins and derivatives in cancer cells. *Planta Medica* **77**, 711–717 (2011).
- Varughese, T., Rios, N., Higginbotham, S., Elizabeth Arnold, A., Coley, P. D., Kursar, T. A., Gerwick, W. H. & Rios, L. C. Antifungal depsidone metabolites from *Cordyceps dipterigena*, an endophytic fungus antagonistic to the phytopathogen *Gibberella fujikuroi*. *Tetrahedron Letters* **53**, 1624–1626 (2012).
- Venugopala, K. N., Rashmi, V. & Odhav, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *BioMed Research International* **2013**, 1–14 (2013).
- Vergnolle, O., Hahn, F., Baerga-Ortiz, A., Leadlay, P. F. & Andexer, J. N. Stereoselectivity of isolated dehydratase domains of the Borrelidin polyketide synthase: Implications for cis double bond formation. *ChemBioChem* **12**, 1011–1014 (2011).
- Verma, V.C. & Gange A.C. (Herausgeber), Advances in endophytic research. (Springer India, 2014).
- Vilcinskas, A., Götz, P. & Matha, V. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmatocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Insect Physiology* **43**, 1149–1159 (1997).

- Vilgalys, R. & Hester, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of bacteriology* **172**, 4238–4246 (1990).
- Vilgalys, R. Taxonomic misidentification in public DNA databases: Commentary. *New Phytologist* **160**, 4–5 (2003).
- Vinale, F., Nicoletti, R., Borrelli, F., Mangoni, A., Parisi, O. A., Marra, R., Lombardi, N., Lacatena, F., Grauso, L., Finizio, S., Lorito, M. & Woo, S. L. Co-Culture of plant beneficial microbes as source of bioactive metabolites. *Scientific Reports - Nature* **7**, 14330 (2017).
- Wakana, D., Hosoe, T., Itabashi, T., Fukushima, K. & Kawai, K. Two new furanone glycosides, malfilamentosides A and B, from *Malbranchea filamentosa*. *Mycotoxins* **58**, 1–6 (2008).
- Walker, L. B. The black moulds (Mucoraceae). *Transactions of the American Microscopical Society* **32**, 113 (1913).
- Walton, J. D., Panaccione, D. G. & Hallen, H. E. Peptide synthesis without ribosomes. in *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine* (eds. Tkacz, J. S. & Lange, L.) 127–162 (Springer US, 2004).
- Wang, H., Gloer, K. B., Gloer, J. B., Scott, J. A. & Malloch, D. Anserinones A and B: New antifungal and antibacterial benzoquinones from the coprophilous fungus *Podospora anserina*. *Journal of Natural Products* **60**, 629–631 (1997).
- Wang, J.-F., Zhang, Y.-J., Huang, Y.-J., Su, W.-J., Lu, Y., Zhao, Y.-F. & Ng, S. W. Methyl 8-hydroxy-(S)-3-methyl-1-oxoisochromane-5-carboxylate (5-methoxycarbonylmellein). *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online* **59**, o1233–o1234 (2003).
- Wang, F. & Liu, J.-K. A Pair of Novel heptentriol stereoisomers from the Ascomycete *Daldinia concentrica*. *Helvetica Chimica Acta* **87**, 2131–2134 (2004).
- Wang, H., Gloer, K. B., Gloer, J. B., Scott, J. A. & Malloch, D. [Erratum] Anserinones A and B: new antifungal and antibacterial benzoquinones from the coprophilous fungus *Podospora anserina*. *Journal of Natural Products* **67**, 1637–1637 (2004).
- Wang, J., Yu, C.-G., Jiang, G.-C. & Vrijmoed, L. L. P. The secondary metabolites of the marine fungus No. 2492 from the mangrove *Phragmites australis* of the South China Sea. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* **44**, 132–134 (2005).
- Wang, Y., Liu, X. & Zheng, R. Four new species records of *Umbelopsis* (Mucoromycotina) from China. *Journal of Mycology* **2013**, 1–6 (2013).
- Wang, G., Liu, Z., Lin, R., Li, E., Mao, Z., Ling, J., Yang, Y., Yin, W.-B. & Xie, B. Biosynthesis of antibiotic Leucinostatins in bio-control fungus *Purpureocillium lilacinum* and their inhibition on *Phytophthora* revealed by genome mining. *PLOS Pathogens* **12**, e1005685 (2016).
- Wang, J., He, W., Kong, F., Tian, X., Wang, P., Zhou, X. & Liu, Y. Ochracenes A–I, Humulane-derived sesquiterpenoids from the antarctic fungus *Aspergillus ochraceopetaliformis*. *Journal of Natural Products* **80**, 1725–1733 (2017).
- Wang, Y., Liu, H.-X., Chen, Y.-C., Sun, Z.-H., Li, H.-H., Li, S.-N., Yan, M.-L. & Zhang, W.-M. Two new metabolites from the endophytic fungus *Alternaria* sp. A744 derived from *Morinda officinalis*. *Molecules* **22**, 765 (2017b).
- Wang, W.-X., Li, Z.-H., Feng, T., Li, J., Sun, H., Huang, R., Yuan, Q.-X., Ai, H.-L. & Liu, J.-K. Curtachalasin A and B, two cytochalasins with a tetracyclic skeleton from the endophytic fungus *Xylaria curta* E10. *Organic Letters* **20**, 7758–7761 (2018).

- Wang, J., Xu, C.-C., Tang, H., Su, L., Chou, Y., Soong, K., Li, J., Zhuang, C.-L., Luo, Y.-P. & Zhang, W. Osteoclastogenesis inhibitory polyketides from the sponge-associated fungus *Xylaria feejeensis*. *Chemistry & Biodiversity* **15**, e1800358 (2018b).
- Wang, W.-X., Lei, X., Ai, H.-L., Bai, X., Li, J., He, J., Li, Z.-H., Zheng, Y.-S., Feng, T. & Liu, J.-K. Cytochalasans from the endophytic fungus *Xylaria* cf. *curta* with resistance reversal activity against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *Organic Letters* **21**, 1108–1111 (2019).
- Way, E. L., Takemori, A. E., Smith, G. E., Anderson, H. H. & Brodie, D. C. The toxicity and analgetic activity of some congeners of salicylamide. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **108**, 450 (1953).
- Weber, D., Sterner, O. & Anke, T. Mollisianitrile, a new antibiotic from *Mollisia* sp. A59-96. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences* **62**, 567–570 (2007).
- Wei, H., Xu, Y., Espinosa-Artiles, P., Liu, M. X., Luo, J.-G., U'Ren, J. M., Elizabeth Arnold, A. & Leslie Gunatilaka, A. A. Sesquiterpenes and other constituents of *Xylaria* sp. NC1214, a fungal endophyte of the moss *Hypnum* sp. *Phytochemistry* **118**, 102–108 (2015).
- Weinstein, R. N., Montiel, P. O. & Johnstone, K. Influence of Growth Temperature on Lipid and Soluble carbohydrate synthesis by fungi isolated from fellfield soil in the maritime antarctic. *Mycologia* **92**, 222 (2000).
- Wen, L., Cai, X., Xu, F., She, Z., Chan, W. L., Vrijmoed, L. L. P., Jones, E. B. G. & Lin, Y. Three metabolites from the mangrove endophytic fungus *Sporothrix* sp. (#4335) from the South China Sea. *The Journal of Organic Chemistry* **74**, 1093–1098 (2009).
- Wendt, L., Sir, E. B., Kuhnert, E., Heitkämper, S., Lambert, C., Hladki, A. I., Romero, A. I., Luangsa-ard, J. J., Srikitikulchai, P., Peršoh, D. & Stadler, M. Resurrection and emendation of the Hypoxylaceae, recognised from a multigene phylogeny of the Xylariales. *Mycol Progress* **17**, 115–154 (2018).
- Wentrup, C., Bender, H. & Gross, G. Benzothiet-2-ones: synthesis, reactions, and comparison with benzoxet-2-ones and benzazetin-2-ones. *The Journal of Organic Chemistry* **52**, 3838–3847 (1987).
- Wheeler, D. L., Dung, J. K. S. & Johnson, D. A. From pathogen to endophyte: an endophytic population of *Verticillium dahliae* evolved from a sympatric pathogenic population. *New Phytol* **222**, 497–510 (2019).
- Whisenant, J., Vinson, D., Blanco, M., Hughes, C. & David, S. Novel total synthesis of anserinone A and B. *Synthetic Communications* **47**, 268–272 (2017).
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. in *PCR Protocols* 315–322 (Elsevier, 1990).
- Wille, P. A., Aeschbacher, R. A. & Boller, T. Distribution of fungal endophyte genotypes in doubly infected host grasses. *The Plant Journal* **18**, 349–358 (1999).
- Wilson, D. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* **73**, 274 (1995).
- Wu, C. *Handbook of size exclusion chromatography*. (Dekker, 1995).
- Wu, X., Lin, S., Zhu, C., Zhao, F., Yu, Y., Yue, Z., Liu, B., Yang, Y., Dai, J. & Shi, J. Studies on constituents of cultures of fungus *Phellinus igniarius*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **36**, 874–880 (2011).
- Wu, M.-D., Cheng, M.-J., Chen, I.-S., Su, Y.-S., Hsieh, S.-Y., Chang, H.-S., Chang, C.-W. & Yuan, G.-F. Phytochemical investigation of *Annulohyphoxylon ilanense*, an endophytic fungus derived from *Cinnamomum* Species. *Chemistry & Biodiversity* **10**, 493–505 (2013).

- Wu, C., Zacchetti, B., Ram, A. F. J., van Wezel, G. P., Claessen, D. & Hae Choi, Y. Expanding the chemical space for natural products by *Aspergillus-Streptomyces* co-cultivation and biotransformation. *Scientific Reports* **5**, 10868 (2015).
- Wu, Z., Wang, Y., Liu, D., Proksch, P., Yu, S. & Lin, W. Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedron* **72**, 50–57 (2016).
- Wu, B., Wiese, J., Schmaljohann, R. & Imhoff, J. Biscogniauxone, a New Isopyrrolonaphthoquinone compound from the fungus *Biscogniauxia mediterranea* isolated from deep-sea sediments. *Marine Drugs* **14**, 204 (2016b).
- Wu, J.-T., Zheng, C.-J., Zhang, B., Zhou, X.-M., Zhou, Q., Chen, G.-Y., Zeng, Z.-E., Xie, J.-L., Han, C.-R. & Lyu, J.-X. Two new secondary metabolites from a mangrove-derived fungus *Cladosporium* sp. JJM22. *Natural Product Research* **33**, 34–40 (2019).
- Xiao, Z., Lin, S., Tan, C., Lu, Y., He, L., Huang, X. & She, Z. Asperlones A and B, Dinaphthalenone derivatives from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. 16-5C. *Marine Drugs* **13**, 366–378 (2015).
- Xing, J.-G., Deng, H.-Y. & Luo, D.-Q. Two new compounds from an endophytic fungus *Pestalotiopsis heterocornis*. *Journal of Asian Natural Products Research* **13**, 1069–1073 (2011).
- Xu, X.-H., Su, Z.-Z., Wang, C., Kubicek, C. P., Feng, X.-X., Mao, L.-J., Wang, J.-Y., Chen, C., Lin, F.-C. & Zhang, C.-L. The rice endophyte *Harpophora oryzae* genome reveals evolution from a pathogen to a mutualistic endophyte. *Scientific Reports - Nature* **4**, 5783 (2014).
- Xue, C., Li, T., Deng, Z., Fu, H. & Lin, W. Janthinolide A-B, two new 2,5-piperazinedione derivatives from the endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from the soft coral *Dendronephthya* sp. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences* **61**, 1041–1044 (2006).
- Yang, N., Ma, Q., Huang, S., Dai, H., Guo, Z., Lu, X., Wang, Y., Yu, Z. & Zhao, Y. Chemical constituents from cultures of the fungus *Marasmiellus ramealis* (Bull.) Singer. *Journal of the Brazilian Chemical Society* (2015).
- Yang, F., Shi, X., Ma, K., Cai, Y., Zhao, X., Zhao, X., Tang, Y. & Wang, Y. Fermentation medium for improving *Purpureocillium lilacinum* Leucinostatin production. Patentnummer: CN 106967769 (2017).
- Yang, W.-C., Bao, H.-Y., Liu, Y.-Y., Nie, Y.-Y., Yang, J.-M., Hong, P.-Z. & Zhang, Y. Depsidone derivatives and a cyclopeptide produced by marine fungus *Aspergillus unguis* under chemical induction and by its plasma induced mutant. *Molecules* **23**, 2245 (2018).
- Yang, L.-J., Liao, H.-X., Bai, M., Huang, G.-L., Luo, Y.-P., Niu, Y.-Y., Zheng, C.-J. & Wang, C.-Y. One new cytochalasin metabolite isolated from a mangrove-derived fungus *Daldinia eschscholtzii* HJ001. *Natural Product Research* **32**, 208–213 (2018b).
- Yoon, H., Eom, S.-L., Hyun, J.-Y., Jo, G.-H., Hwang, D.-S., Lee, S.-H., Yong, Y.-J., Park, J.-C., Lee, Y.-H. & Lim, Y.-H. ¹H and ¹³C-NMR data on hydroxy/methoxy flavonoids and the effects of substituents on chemical shifts. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **32**, 2101–2104 (2011).
- Yoshida, T., Kato, T., Kawamura, Y., Matsumoto, K. & Itazaki, H. Aldose reductase inhibitors from the fermentation products of *Chaetomella circinoseta*. Patentnummer: EP557939A1 (1993).
- Yu, N., Guo, S., Xiao, S. & Xie, F. Studies on second metabolites of an endophytic fungus (II). *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **27**, 204–206 (2002).
- Yuan, C. et al. Metabolites of endolichenic fungus *Elaphocordyceps* sp. *Weishengwuxue Tongbao* **41**, 857–861 (2014).

- Zajdel, S. M., Graikou, K., Głowniak, K. & Chinou, I. Chemical analysis of *Penstemon campanulatus* (Cav.) Willd. - Antimicrobial activities. *Fitoterapia* **83**, 373–376 (2012).
- Zeilinger, S. Peptaibiotics and peptaibols from fungi in *Fungal Biomolecules* (eds. Gupta, V. K., Mach, R. L. & Sreenivasaprasad, S.) 101–113 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015).
- Zengin, G., Uysal, A., Diuzheva, A., Gunes, E., Jekő, J., Cziáky, Z., Picot-Allain, C. M. N. & Mahomoodally, M. F. Characterization of phytochemical components of *Ferula halophila* extracts using HPLC-MS/MS and their pharmacological potentials: a multi-functional insight. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **160**, 374–382 (2018).
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology* **7**, 203–214 (2000).
- Zhang, Y., Liu, S., Liu, H., Liu, X. & Che, Y. Cycloaspeptides F and G, cyclic pentapeptides from a *Cordyceps* - Colonizing isolate of *Isaria farinosa*. *Journal of Natural Products* **72**, 1364–1367 (2009).
- Zhang, Q.-H., Zhou, L.-D., Lu, X., Wu, H.-H., Tian, L. & Pei, Y.-H. Chemical constituents from the marine *Nigrospora sphaerica* (II). *Shenyang Yaoke Daxue Xuebao* **27**, 618–622 (2010).
- Zhang, Y. L., Zhang, J., Jiang, N., Lu, Y. H., Wang, L., Xu, S. H., Wang, W., Zhang, G. F., Xu, Q., Ge, H. M., Ma, J., Song, Y. C. & Tan, R. X. Immunosuppressive polyketides from mantis-associated *Daldinia eschscholzii*. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 5931–5940 (2011).
- Zhang, Y., Han, T., Ming, Q., Wu, L., Rahman, K. & Qin, L. Alkaloids produced by endophytic fungi: A Review. *Natural Product Communications* **7**, 963–968 (2012a).
- Zhang, Z., Jia, C., Hu, Y., Sun, L., Jiao, J., Zhao, L., Zhu, D., Li, J., Tian, Y., Bai, H., Li, R. & Hu, J. The estrogenic potential of salicylate esters and their possible risks in foods and cosmetics. *Toxicology Letters* **209**, 146–153 (2012b).
- Zhang, X., Gao, H., Zhang, L., Liu, D. & Ye, X. Extraction of essential oil from discarded tobacco leaves by solvent extraction and steam distillation, and identification of its chemical composition. *Industrial Crops and Products* **39**, 162–169 (2012c).
- Zhang, Y., Mu, J., Feng, Y., Wen, L. & Han, J. Four chlorinated depsidones from a seaweed-derived strain of *Aspergillus unguis* and their new biological activities. *Natural Product Research* **28**, 503–506 (2014a).
- Zhang, W., Xu, L., Yang, L., Huang, Y., Li, S. & Shen, Y. Phomopsidone A, a novel depsidone metabolite from the mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. A123. *Fitoterapia* **96**, 146–151 (2014b).
- Zhang, P., Li, X.-M., Wang, J.-N., Li, X. & Wang, B.-G. New butenolide derivatives from the marine-derived fungus *Paecilomyces variotii* with DPPH radical scavenging activity. *Phytochemistry Letters* **11**, 85–88 (2015).
- Zhang, J.-L., Wang, W.-J., Xu, X.-M., Li, D.-Y., Hua, H.-M., Ma, E.-L. & Li, Z.-L. From macrocyclic to linear and further: naturally degradable polyesters from the fungus *Ascotricha* sp. ZJ-M-5. *Tetrahedron* **72**, 4895–4901 (2016).
- Zhang, A. H., Tan, R., Jiang, N., Yusupu, K., Wang, G., Wang, X. L. & Tan, R. X. Selesconol, a fungal polyketide that induces stem cell differentiation. *Organic Letters* **18**, 5488–5491 (2016b).
- Zhang, J.-C., Chen, G.-Y., Li, X.-Z., Hu, M., Wang, B.-Y., Ruan, B.-H., Zhou, H., Zhao, L.-X., Zhou, J., Ding, Z.-T. & Yang, Y.-B. Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Natural Product Research* **31**, 2745–2752 (2017).

- Zhang, J., Liang, J.-H., Zhao, J.-C., Wang, Y.-L., Dong, P.-P., Liu, X.-G., Zhang, T.-Y., Wu, Y.-Y., Shang, D.-J., Zhang, Y.-X. & Sun, C.-P. Xylarianins A-D from the endophytic fungus *Xylaria* sp. SYPF 8246 as natural inhibitors of human carboxylesterase 2. *Bioorganic Chemistry* **81**, 350–355 (2018).
- Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X. & Gao, X. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. *Current Research Technology and Education Tropics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* **1**, 567–576 (2010).
- Zhao, Y., Liu, D., Proksch, P., Yu, S. & Lin, W. Isocoumarin derivatives from the sponge-associated fungus *Peyronellaea glomerata* with Antioxidant Activities. *Chemistry & Biodiversity* **13**, 1186–1193 (2016).
- Zhao, Z.-Z., Chen, H.-P., Huang, Y., Zhang, S.-B., Li, Z.-H., Feng, T. & Liu, J.-K. Bioactive polyketides and 8,14-seco-ergosterol from fruiting bodies of the ascomycete *Daldinia childiae*. *Phytochemistry* **142**, 68–75 (2017a).
- Zhao, H., Chen, G.-D., Zou, J., He, R.-R., Qin, S.-Y., Hu, D., Li, G.-Q., Guo, L.-D., Yao, X.-S. & Gao, H. Dimericbiscognienyne A: A meroterpenoid dimer from *Biscogniauxia* sp. with new skeleton and its activity. *Organic Letters* **19**, 38–41 (2017b).
- Zhao, H., Wang, M., Chen, G., Hu, D., Li, E., Qu, Y., Zhou, L., Guo, L., Yao, X. & Gao, H. Dimericbiscognienynes B and C: New diisoprenyl-cyclohexene-type meroterpenoid dimers from *Biscogniauxia* sp. *Chinese Chemical Letters* **30**, 51–54 (2019).
- Zhou, D. & Hyde, K. D. Host-specificity, host-exclusivity, and host-recurrence in saprobic fungi. *Mycological Research* **105**, 1449–1457 (2001).
- Zhou, L., Cao, X., Yang, C., Wu, X. & Zhang, L. Endophytic fungi of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* and steroid analysis in the fungi. *Natural Product Research and Development*. **16**, 198–200 (2004).
- Zhou, B., Kong, C.-H., Li, Y.-H., Wang, P. & Xu, X.-H. Crabgrass (*Digitaria sanguinalis*) Allelochemicals that interfere with crop growth and the soil microbial community. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **61**, 5310–5317 (2013).
- Zhuang, C., Guan, X., Ma, H., Cong, H., Zhang, W. & Miao, Z. Small molecule-drug conjugates: A novel strategy for cancer-targeted treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry* **163**, 883–895 (2019).
- Ziaee, A., Zia, M., Bayat, M., & Hashemi, J. Identification of Mucorales isolates from soil using morphological and molecular methods. *Current Medical Mycology* **2**, 13–19 (2016).