

**Screening entomopathogener Pilze in
Zytotoxizitäts-Assays – Identifizierung von
Sekundärmetaboliten aus *Isaria catenulata***



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
– Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Susann Haase
aus Sinzing

2010

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Februar 2006 bis Juli 2010 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann am Institut für Pharmazie an der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Chemie und Pharmazie – der Universität Regensburg.

Promotion eingereicht im Juli 2010

Mündliche Prüfung am 27. September 2010

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Armin Buschauer (Vorsitzender)
Prof. Dr. Jörg Heilmann (1. Gutachter)
Prof. Dr. Matthias Hamburger (2. Gutachter)
Prof. Dr. Joachim Wegener (3. Prüfer)

1 Einleitung	1
1.1 Bioaktive Substanzen aus natürlichen Quellen	1
1.1.1 Historische Nutzung natürlicher Quellen zur Behandlung von Krankheiten	1
1.1.2 Eigenschaften der Naturstoffe	2
1.1.3 Biodiversität	2
1.2 Entomopathogene Pilze	4
1.2.1 Verbreitung und Wirtsorganismen	4
1.2.2 Pilzinfektion und Interaktionen zwischen Pilz und Wirt	4
1.2.3 Sekundärmetabolite und ihre biologische Aktivität	7
1.2.4 Traditionelle Chinesische Medizin	12
1.2.5 Ökologische Schädlingsbekämpfung	12
1.3 Bösartige Neubildungen und Chemotherapie	14
1.3.1 Bedeutung bösartiger Neubildungen	14
1.3.2 Chemotherapie	14
1.4 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Extrakte des Zytotoxizitäts-Screenings	17
2.1.1 Pilzstämme	17
2.1.2 Extrakte der entomopathogenen Pilzstämme	18
2.2 Pilzkultur und Extraktherstellung	20
2.2.1 Medien für die Pilzkultur	20
2.2.2 Stammhaltung	21
2.2.3 Pilzkultivierung	21
2.2.4 Extraktion	21
2.3 Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays	22
2.3.1 Medien, Puffer und Reagenzien für die Zellkultur	22
2.3.2 Herkunft und Kultivierung der Zelllinien	23
2.3.3 Zellzahlbestimmung	24
2.3.4 MTT-Assays	24
2.3.5 WST-1-Assays	25
2.3.6 Proliferations-Assay	26
2.3.7 ECIS-Zytotoxizitäts-Assay	26

2.3.8 Statistische Analysen	27
2.4 Isolierungsmethoden.....	28
2.4.1 Vorfraktionierung	28
2.4.2 Fraktionierungen	28
2.4.3 Isolierungen.....	29
2.5 Analytische Methoden.....	32
2.5.1 Dünnschichtchromatographie.....	32
2.5.2 Hochleistungsflüssigchromatographie.....	33
2.5.3 UV/Vis-Spektroskopie	34
2.5.4 NMR-Spektroskopie	34
2.5.5 Massenspektrometrie	35
2.5.6 Polarimetrie	35
2.5.7 Schmelzpunktbestimmung	35
2.5.8 Energieminimierung dreidimensionaler Strukturmodelle	35
2.6 Geräte und Chemikalien.....	36
2.6.1 Geräte und Software	36
2.6.2 Chemikalien und Reagenzien	37
2.6.3 Stationäre Phasen und Trennsäulen.....	38
2.6.4 Steriles Verbrauchsmaterial	39
3 Ergebnisse und Diskussion.....	40
3.1 Screening der Pilzextrakte	40
3.1.1 Zytotoxizitäts-Assays der Extrakte aus der Extraktbibliothek	40
3.1.2 Herstellung vergleichbarer Pilzextrakte	44
3.1.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen.....	45
3.1.4 Zytotoxizitäts-Assays der hergestellten Pilzextrakte	47
3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion der Screening-Ergebnisse	48
3.2 Fraktionierung des <i>Isaria catenulata</i>-Extrakts.....	50
3.2.1 Isolierung von Lateritin, dessen Diastereomer, Beauvericin A und J	50
3.2.2 Isolierung und Identifizierung weiterer Inhaltsstoffe	50
3.3 Charakterisierung und Strukturaufklärung	53
3.3.1 Spektroskopische und spektrometrische Daten	53
3.3.2 Polarimetrische Daten	70
3.3.3 Chromatographische Daten	71

3.3.4 Schmelzpunkt.....	72
3.3.5 Zusammenfassung der Strukturaufklärung	72
3.4 Biologische Aktivität	75
3.4.1 Zytotoxizitäts-Assays.....	75
3.4.2 Proliferations-Assay	76
3.4.3 ECIS-Assay	77
3.4.4 Diskussion der Assay-Ergebnisse	79
4 Zusammenfassung	81
5 Summary	83
6 Abkürzungen.....	85
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	85
6.2 Symbolverzeichnis	86
7 Literaturverzeichnis.....	87

1 Einleitung

1.1 Bioaktive Substanzen aus natürlichen Quellen

Entomopathogene Pilze sind als Quelle neuer Naturstoffe sehr interessant und noch wenig untersucht. Diese Organismen sind Vertreter aus ökologischen Nischen. Sie zeigen komplexe Wechselwirkungen mit ihren Wirtsorganismen, wobei die infizierten Arthropoden meist an der Pilzinfektion zugrunde gehen, und sind stark an die Umweltbedingungen angepasst. Aus diesen Gründen kann man im Spektrum der Sekundärmetabolite von entomopathogenen Pilzen bioaktive Substanzen erwarten. Interessanterweise sind zwei Vertreter dieser hochspezialisierten Pilze in der chinesischen Pharmakopoe monographiert und werden seit Jahrhunderten in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) als geschätzte Heilmittel angewendet.

Aufbauend auf diesen Aspekten wurden zahlreiche entomopathogene Pilze kultiviert, aus den Myzelien und Kulturfiltraten Extrakte hergestellt, die Zytotoxizität dieser Extrakte *in vitro* bestimmt und in den Extrakten von ausgewählten, entomopathogenen Pilze nach neuen, zytotoxischen Sekundärmetaboliten gesucht.

1.1.1 Historische Nutzung natürlicher Quellen zur Behandlung von Krankheiten

Aufgrund fossiler Funde datiert man den ersten Einsatz von Pflanzen als Heilmittel auf eine Zeit vor etwa 60.000 Jahren.^[1] Schriftstücke aus den frühen Kulturen in China, Indien, Nordafrika und im Nahen Osten belegen die Nutzung von Arzneimitteln natürlichen Ursprungs wie Tieren, Pflanzen und Mineralien zur Behandlung verschiedener Erkrankungen.^[2,3]

Nachdem pflanzliche Zubereitungen Jahrhunderte lang empirisch angewandt wurden, konnten erstmals die aktiven Prinzipien isoliert werden. So entdeckte man 1785 Digoxin in Fingerhutblättern und im frühen 19. Jahrhundert die Alkaloide Chinin aus Chinarinde und Morphin aus Opium. Weitere biologisch aktive Substanzen aus anderen natürlichen Quellen, wie Penicillin aus Schimmelpilzen, wurden entdeckt. Diese Entwicklung stand für den Beginn der modernen Naturstoffforschung. Es brach eine neue Ära an, in der die Nutzung natürlicher Quellen und ihrer Inhaltsstoffe als Wirkstoffe sowie als molekulare Werkzeuge zur Erforschung von biochemischen Vorgängen und Krankheiten im Vordergrund stand. Erst nach 1945 verschob sich das Interesse der pharmazeutischen Industrie hin zu synthetisch hergestellten Substanzen, wobei viele Naturstoffe als Leitstrukturen dienten.^[2,4]

Der Erfolg synthetisch hergestellter Substanzen in der Entwicklung neuartiger Arzneistoffe blieb hinter den Erwartungen zurück, da die Strukturdiversität dieser Verbindungen oft zu niedrig ist. Aus diesem Grund erfuhr die Naturstoffforschung in den letzten Jahren neues Interesse.^[4] Auch die Nachfrage nach Arzneimitteln natürlichen, insbesondere pflanzlichen, Ursprungs stieg stetig an.^[2] Von zwanzig der 1999 meist verkauften, nicht auf Proteinen basierenden Arzneistoffe waren neun entweder Naturstoffe oder von diesen abgeleitete Substanzen.^[5]

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) geht davon aus, dass fast 65% der Weltbevölkerung natürliche Arzneimittel in ihrer grundlegenden Gesundheitsversorgung systematisch nutzen und teilweise auf diese angewiesen sind.^[1] Vor diesem Hintergrund bleiben natürliche Quellen unentbehrlich für die Arzneistoffentwicklung und -versorgung.

1.1.2 Eigenschaften der Naturstoffe

Biologisch aktive Naturstoffe sind oft Substanzen aus dem Sekundärstoffwechsel der Organismen. Sie entstanden vermutlich aufgrund der Anpassung an den Lebensraum und die Umweltbedingungen, so dass sie dem Organismus einen Selektionsvorteil bieten (z. B. UV-Schutz, Fraßschutz oder Anlockung von Bestäubern). Sekundärstoffe richten sich damit schon *per se* gegen ein biologisches Target und sind somit bioaktiv. Gleichzeitig sind es meist niedermolekulare Verbindungen ($M_r < 1500$), die vom menschlichen Körper resorbiert und metabolisiert werden können, so dass ihre Weiterentwicklung zu Arzneimitteln für eine orale Darreichung mit weniger Kosten verbunden sind, als das bei biotechnologischen Produkten oder den der kombinatorischen Chemie entstammenden Substanzen der Fall ist. Ein weiterer Vorteil ist die größere strukturelle Vielfalt von Naturstoffen, die in der Biodiversität begründet ist.^[5]

1.1.3 Biodiversität

Alle potentiellen Quellen von Naturstoffen sind noch unzureichend pharmakologisch und phytochemisch erforscht. Von den geschätzten 250.000 bis 300.000 höheren Pflanzenspezies wurden bisher etwa 6% auf Bioaktivität geprüft und etwa 15% phytochemisch untersucht.^[1] Unter den etwa 6.000 namentlich erwähnten Bakterienspezies, den geschätzten 1,5 Millionen Pilzspezies und den geschätzten 1,5 Millionen Algen- und Prokaryotenspezies wurden erst 1% kultiviert und experimentell untersucht, obwohl sich Mikroorganismen als außergewöhnlich reiche Arzneistoffquelle erwiesen haben. So begann die Antibiotikaforschung 1928 mit Alexander Flemings Entdeckung des Penicillins aus *Penicillium chrysogenum* var. *chrysogenum* THOM (Trichocomaceae, Synonym: *P. notatum*). Wichtige Arzneistoffe aus Pilzen sind das Immunsuppressivum Cyclosporin A aus *Tolypocladium niveum* (ROSTR.) BISSETT (Ophiocordycipitaceae) und das in der Krebstherapie eingesetzte Anthracyclin Daunorubicin aus *Streptomyces peucetius* GREIN ET AL. (Streptomycetaceae).^[6-8] Neue Mikrotubuli-stabilisierende Metabolite, die Epothilone, konnten im Myxobakterium *Sorangium cellulosum* (Synonym: *Polyangium cellulosum* (EX IMSHENETSKI & SOLNTSEVA) BROCKMAN, Polyanginaceae) gefunden werden. Hiervon ist ein Analogon Ixaberilon 2007 zur Krebstherapie zugelassen worden. Des Weiteren sind marine Organismen ins Interesse der Forschungen gerückt. Im 70% der Erdoberfläche bedeckenden Meer werden über 10 Millionen Arten der Makrofauna erwartet. Aus dieser Organismengruppe wurde erstmals die Leitstruktur für den antiviralen Arzneistoff Aciclovir aus einem Schwamm isoliert.^[5-8]

Die strukturelle Vielfalt von Naturstoffen ist aufgrund der Biodiversität und ihrem teilweise noch ungeahnten Umfang gegenüber jeder noch so großen kombinatorischen Datenbank überlegen.

Deshalb sollte die Natur in die zukünftige Forschung nach neuen Arzneistoffen, pharmakologischen Werkzeugen und Leitstrukturen für die Wirkstoffentwicklung noch stärker einbezogen werden. Erfolgversprechend erscheint hier die Auswahl der Organismen zur Testung mit Hilfe ethnomedizinischer, systematischer und ökologischer Informationen im Gegensatz zum Zufallsprinzip.^[9]

1.2 Entomopathogene Pilze

Entomopathogene Pilze sind eine kleine Gruppe hochspezialisierter Organismen, die sich im Laufe der Koevolution an ihre Arthropodenwirte angepasst haben. Das lebende Tier stellt aus ökologischer Sicht durch seine zahlreichen Abwehrmechanismen ein Extremhabitat für die Mikroorganismen dar. Sie zeigen spezifische, komplexe Interaktionsmuster mit ihren jeweiligen Wirtsorganismen. So ändern infizierte Gliederfüßer oft ihr Verhalten.^[10]

Beide, die Pathogene und ihre Wirte, sind taxonomisch vielfältig. Von den über 700 bekannten entomopathogenen Pilzspezies sind wenige auf ihre sekundären Inhaltsstoffe und deren biologische Aktivität untersucht worden. Jedoch konnte mit Hilfe von morphologischen und molekularbiologisch-phylogenetischen Analysen das Reich der Pilze (Fungi) in eine neue systematische Ordnung gebracht werden. Danach befinden sich die meisten entomopathogenen Pilze in den Abteilungen Zygomycota und Ascomycota. Vertreter der formellen Klasse Hyphomycetes wurden als Anamorphe der Abteilung Ascomycota erkannt.^[10-13]

Entomopathogene Pilze sind geschätzte Naturheilmittel in der TCM und werden als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel eingesetzt.^[14-16]

1.2.1 Verbreitung und Wirtsorganismen

Sowohl in tropischen, subtropischen und gemäßigten Klimazonen als auch in Wüstenregionen kommen entomopathogene Pilze vor. Sie sind mit Gliederfüßern (Abteilung Arthropoda), die verschiedene Lebensräume wie das Wasser, die Erde, die Erdoberfläche oder die Luft bewohnen, assoziiert.^[12,17]

Entomopathogene Pilze sind weltweit die natürlichen Feinde von Arthropoden und sind in der Lage Insektenpopulationen zu kontrollieren. Praktisch alle Insektenordnungen sind anfällig für Pilzerkrankungen. Meist gehören Insekten in den Larven-, Puppen- und adulten Stadien sowie auch Spinnen zum Wirtsspektrum.^[10,18,19]

1.2.2 Pilzinfektion und Interaktionen zwischen Pilz und Wirt

Wie bereits erwähnt, gehören die meisten und wichtigsten entomopathogenen Pilze in die Abteilungen Zygomycota und Ascomycota (s. Tabelle 1), wobei die Spezies der Entomophthorales obligat pathogen und jeweils auf eine kleine Auswahl von Wirtsspezies angepasst sind. Sie sind charakteristisch biotroph und lassen ihre Wirte am Leben bis alle Ressourcen aufgebraucht sind. Toxine sind hier nicht verantwortlich für das Fortschreiten der Infektion. Die Vertreter der Hypocreales und Eurotiales sind hingegen fakultativ pathogen und können ohne weiteres saprotroph leben. Sie sind hemibiotroph und können aus der parasitischen Phase im Hämozöl des Wirts nach dessen Tod in die saprotrophe Phase übergehen und den gesamten Kadaver besiedeln. Hier wird der Wirt bei einer Infektion mit den aggressivsten Pilzstämmen durch Sekundärmetabolite getötet.^[10,17]

Tabelle 1. Ausgewählte Gattungen der entomopathogenen Pilze und ihre systematische Einordnung.^[7,8,10]

Abteilung	Klasse	Ordnung	Familie	Gattung
Zygomycota	Zygomycetes	Entomophthorales	Entomophthoraceae	<i>Entomophaga</i> <i>Zoophthora</i> <i>Strongwellsea</i>
Ascomycota	Dothideomycetes	Capnodiales	Davidiellaceae	<i>Cladosporium</i> ^{a,*}
	Sordariomycetes	Hypocreales	Clavicipitaceae	<i>Metarhizium</i> ^a <i>Nomuraea</i> ^a
			Cordycipitaceae	<i>Akanthomyces</i> ^a <i>Beauveria</i> ^a <i>Cordyceps</i> <i>Isaria</i> ^a <i>Lecanicillium</i> ^a
			Nectriaceae	<i>Fusarium</i> ^a <i>Gibberella</i> <i>Septofusidium</i> ^a
			Ophiocordycipitaceae	<i>Hirsutella</i> ^a <i>Ophiocordyceps</i> <i>Tolypocladium</i> ^a
			—	<i>Trichothecium</i> ^{a,*}
		—	Plectosphaerellaceae	<i>Verticillium</i> ^a
Eurotiomycetes	Eurotiales	Trichocomaceae		<i>Paecilomyces</i> ^a

^a : Anamorph; – : nicht zugeordnet; * : sekundäres Entomopathogen oder Saprobiot.

Die Infektion der Wirtsorganismen erfolgt meist über Konidiosporen. Diese heften sich an das Integument und keimen bei ausreichender Feuchtigkeit, verfügbarer Nahrung, der Erkennung eines geeigneten Wirts und einer durchdringbaren Eintrittspforte zu einem Appressorium aus. Mit Hilfe von Enzymen wie Chitininasen, Proteasen und Lipasen durchdringt ein Keimschlauch die äußere Hülle des Wirts. Der Pilz ist also beim Eindringen in den Wirtsorganismus nicht auf die Aufnahme mit der Nahrung angewiesen. Werden alle Mechanismen zur Abwehr des Pathogens überwunden, breitet sich der Pilz in Form von einzelligen oder vielzelligen Strukturen, wie Protoplasten, hefeartigen Blastosporen und Hyphenkörpern, aus. Er nutzt seinen Wirt als

Nahrungsquelle und tötet ihn letztendlich, um neue Konidien zur Krankheitsübertragung zu produzieren oder Überdauerungsformen zu bilden. Die Vertreter der Entomophthorales haben verschiedene Verbreitungsarten für ihre Konidien ausgebildet. Diese reichen von sich zerteilenden, aktiv abgegebenen Konidien, die nach dem Tod des Wirts produziert werden, bis zu Spezies die den aktiven Wirt zur Verbreitung der Konidien nutzen (s. Abbildung 1a). Bei den Spezies, die zu den Ordnungen der Hypocreales und Eurotiales gehören, werden die Konidien nicht aktiv verbreitet. Überdauerungsformen wie sexuelle und asexuelle Dauersporen, Chlamydosporen und mumifizierte Wirtsorganismen kennt man aus beiden Ordnungen. Diese sichern das Überleben der entomopathogenen Pilze in Abwesenheit eines neuen Wirts.^[10,17]

Die starke Anpassung der entomopathogenen Pilze an ihre jeweiligen Wirtsorganismen spiegelt sich in den mannigfaltigen Wechselwirkungen wider. So verursachen *Beauveria bassiana* (BALS.-CRIV.) VUILL. und *Nomuraea rileyi* (FARL.) SAMSON die Abnahme von Appetit und Verdauungsleistung bei den befallenen Insekten. Wahrscheinlich sind Toxine und fortschreitende Gewebezerstörung für diese Effekte verantwortlich. Im Gegensatz dazu beeinflussen Spezies der Entomophthorales die Nahrungsaufnahme ihrer Wirte erst kurz vor deren Tod. Dies geschieht, um den Wirt möglichst lange wachsen zu lassen und so das Wachstum und das Fortpflanzungspotential des Pathogens zu maximieren.^[7,8,10]

Ein weiteres Beispiel ist die direkte und indirekte Beeinflussung der Fruchtbarkeit der Wirte durch den Pilz. Infizierte Insekten haben eine verringerte Nachkommenschaft, für die Sekundärmetabolite der Pilze verantwortlich sein können. Änderungen im Verhalten der Insekten können die Anzahl der Nachkommen reduzieren. Beispielsweise legen infizierte Insekten ihre Eier in einem für die Larven ungeeigneten Lebensraum ab. Dagegen werden männliche Fliegen durch Weibchen, die durch die Pilzinfektion gestorben sind, stärker angezogen als durch gesunde. Während des Kontakts mit dem Kadaver werden die Konidien auf das Männchen und später auf dessen gesunde Geschlechtspartner übertragen. Es ist noch unklar, ob und welche visuellen und chemischen Eigenschaften neben dem vergrößerten Hinterleib zur gesteigerten Attraktivität der Kadaver führen. Bei weiblichen Motten, die mit *Zoophthora radicans* (BREF.) A. BATKO infiziert sind, wurde eine Reduktion der Pheromonproduktion festgestellt. Ebenso erfolgt eine Abnahme der Reaktion auf die Pheromone bei den infizierten Männchen.^[7,8,10]

Durch die Pilzinfektion ändern die Wirte ihr Verhalten oft zugunsten des Pathogens. Viele Insekten klettern in ihren letzten Lebensstunden an erhöhte Positionen. Diese Änderung des Verhaltens bezeichnet man als "summit disease" (s. Abbildung 1b). Nach dem Tod der Wirtsinsekten stellt der Pilz das Anheften des Wirts durch eigene Haftorgane sicher oder bewirkt vor dem Todeseintritt, dass sich der Wirt mit seinen Beinen oder Mundwerkzeugen festhält (s. Abbildung 1c). Es wird angenommen, dass für diese Verhaltensänderungen unter anderem neurotoxische Pilzmetabolite verantwortlich sind.^[20] Bei im Boden lebenden, nachtaktiven Insektenlarven beobachtet man beispielsweise bei einer Infektion mit *Entomophaga aulicae* (E. REICHARDT) HUMBER, dass diese tagsüber an die Oberfläche kommen und auf Pflanzen klettern. Auch der tageszeitabhängige Todeseintritt kann bei Infektionen mit Spezies der Entomophthorales beobachtet werden. Diese beiden Effekte, die Exposition der infizierten Tiere und der Todeseintritt bei günstigen

Umweltbedingungen für die Konidienbildung und -verbreitung, fördern die Übertragung der Krankheit. Das Trennen von der Gruppe kann bei manchen Insekten ebenfalls als vorteilhaft für die anderen Individuen angesehen werden. Diese Verhaltensänderungen derselben Wirtsspezies treten jedoch vor der Bildung von Überdauerungsformen nicht in diesem Maße auf. In Abhängigkeit von der abnehmenden Tageslänge bewirkt der Pilz kurz vor dem Tod, dass im Boden lebende Wirte lethargisch werden oder dass sich Blattläuse in die Borke des befallenen Baumes zurückziehen. Hier produziert der Pilz seine Dauersporen für den Winter. Bei einer Infektion mit den Vertretern der Hypocreales hingegen sterben die Wirtsinsekten oft nach wenigen Tagen in ihrer natürlichen Umgebung. So werden die Wirte von *Cordyceps*-Spezies oft im Boden getötet. Daraus wachsen große, gut sichtbare Fruchtkörper zur Verbreitung der Sporen an die Oberfläche (s. Abbildung 1d).^[10]

Diese vielfältigen Wechselwirkungen zwischen Pilz und Wirt sowie die starke Anpassung im Laufe der Koevolution lassen auf eine große Diversität im Spektrum der Sekundärmetabolite der entomopathogenen Pilze schließen. Vor allem in der Ordnung der scheinbar weniger spezialisierten Hypocreales und Eurotiales sind zytotoxische Verbindungen zu finden. Diese Pilze töten ihre Wirte relativ rasch. So spielen die Metabolite von *Metarhizium anisopliae* (METSCHN.) SOROKIN, die Destruxine, eine wichtige Rolle im Krankheitsprozess und führen zum Tod des Wirtsorganismus.^[7,8,21-24]

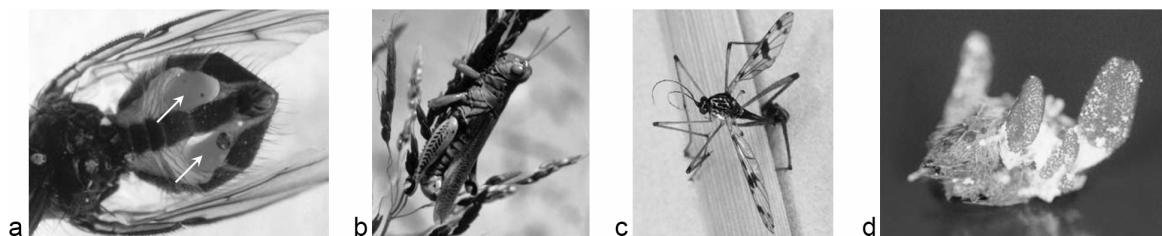


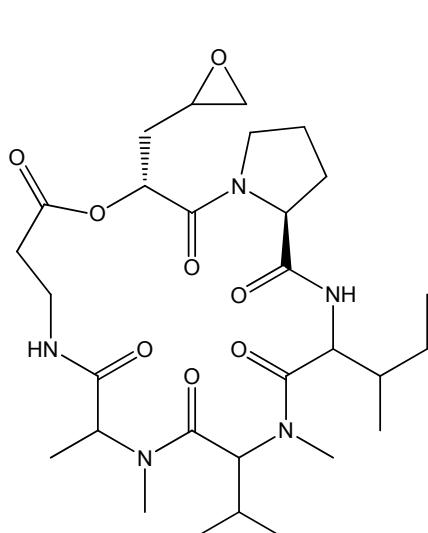
Abbildung 1. a) Ausgewachsene, lebende Fliege verteilt durch die Löcher (Pfeile) im Hinterleib die Konidien einer *Strongwellsea* sp. A. BATKO & WEISER; b) tote, mit *Entomophaga grylli* (FRESEN.) A. BATKO infizierte Heuschrecke zeigt "summit disease"; c) tote, mit *Entomophaga ptychopterae* (S. KELLER & EILENBERG) A. E. HAJEK & EILENBERG infizierte Mücke ist mit ihren Beinen an der Vegetation befestigt; d) durch *Cordyceps militaris* (L.) LINK getötete Schmetterlingspuppe mit orangefarbenen Fruchtkörpern des Pilzes.^[7,8,10]

1.2.3 Sekundärmetabolite und ihre biologische Aktivität

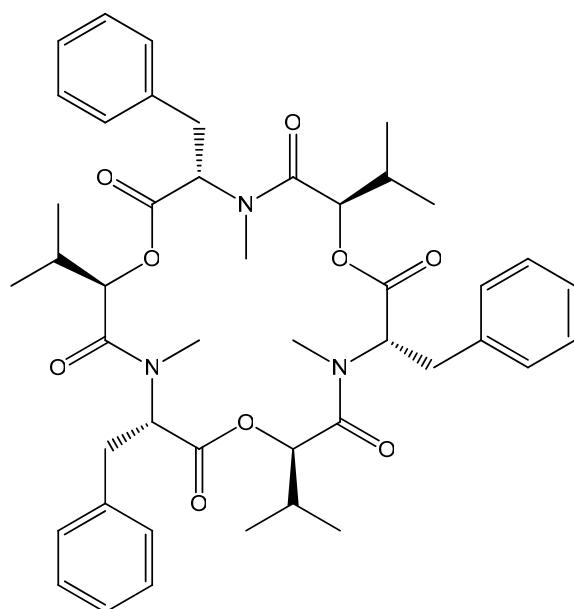
Die in der TCM und in der biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzten entomopathogenen Pilze wurden bis heute am intensivsten auf ihre Inhaltsstoffspektren untersucht. Viele niedermolekulare Verbindungen aus entomopathogenen Pilzen sind biologisch aktiv. Jedoch sind bisher wenige Substanzen aus den Vertretern der Zygomycota bekannt. Die wichtigsten Sekundärmetabolite sind cyclische Depsipeptide, cyclische und lineare Peptide, Cytochalasine, Trichothecene sowie Trichothecane, Pyridonalkaloide und strukturverwandte Tetramärsäuren.^[21]

Depsipeptide

Cyclodepsipeptide zeigen ein interessantes Spektrum an biologischen Aktivitäten. Die Verbindungen dieser Strukturklasse sind potentielle Arzneistoffe und können als Leitstrukturen in der Arzneistoffentwicklung dienen. Cyclodepsipeptide sind Ionophore.^[25] Die pharmakologisch relevanten Eigenschaften basieren auf Wechselwirkungen mit verschiedenen Zellstrukturen und Signaltransduktionswegen. Antivirale, insektizide, zytotoxische und antiproliferative Eigenschaften sind bekannt, ebenso die Wirkung gegen Plasmodien und Mycobakterien. Antimycotische und andere antibakterielle Wirkungen sind meist nur moderat. Bislang konnten Cyclodepsipeptide aus Schwämmen, Bakterien und Pilzen identifiziert werden.^[26] *In vivo* werden diese Strukturen, cyclische Peptide wie Cyclosporine und auch lineare Peptide an Multienzymkomplexen synthetisiert. Dabei werden die Komponenten Aminosäuren und/oder Carbonsäuren nach Aktivierung mit ATP als Thioester gebunden. In diesem Stadium können Epimerisierungen und N-Methylierungen stattfinden. Die Komponenten werden durch den Enzymkomplex zur Sequenz verknüpft und cyclisiert oder terminal modifiziert.^[27,28]



Destruxin E



Beauvericin

Abbildung 2. Strukturformeln der Cyclodepsipeptide Destruxin E und Beauvericin.

Die Destruxine bilden die größte Gruppe an Cyclodepsipeptiden. 25 Verbindungen dieses Typs sind bisher aus *M. anisopliae* isoliert worden. Diese Sekundärmetabolite wurden auch in phytopathogenen Pilzen gefunden.^[21,29-34] Die am häufigsten untersuchten sind die Destruxine A, B und E.^[22,24,35,36] Destruxin E (s. Abbildung 2) hemmt unter anderem die Synthese von zellulären Makromolekülen wie DNS und Proteinen.^[37] Des Weiteren bewirken Destruxine den intrazellulären Anstieg von Calciumionen und die Zunahme von phosphorylierten Proteinen in Insektenzellen.^[38,39] Die Bildung von Amyloid β , welches bei der Alzheimer-Demenz eine Rolle

spielt, wird durch Destruxin E *in vitro* reduziert.^[40] Desmethyldestruxin B2 zeigt antivirale Eigenschaften gegen Hepatitis B-Erreger.^[25]

Aus den Gattungen *Beauveria*, *Isaria*, *Fusarium*, *Cordyceps* und *Paecilomyces* sind die zytotoxischen Beauvericine, eine weitere Klasse von Cyclodepsipeptiden, isoliert worden (s. Abbildung 2). Neben der Wirkung gegen Plasmodien und Mycobakterien sind Beauvericine in der Lage die antimycotische Wirkung von Miconazol zu verstärken.^[41-50]

Die Beauverolide sind aus *B. bassiana*, *B. brongniartii* (SACC.) PETCH (Synonym: *B. tenella*) und *Paecilomyces fumosoroseus* (WIZE) A. H. S. BR. & G. SM. bekannt. Sie genießen gesteigertes Interesse wegen ihres Potentials bei Arteriosklerose auftretende Läsionen zu reduzieren, indem sie die Synthese von Cholesterolestern in Makrophagen inhibieren.^[7,8,51-56] Als weitere Cyclodepsipeptide sind Bassianolide, Hirsutellide A, die Isariine und Isaridine sowie die Enniatine bekannt. Diese wurden teilweise ebenfalls aus im Boden vorkommenden und phytopathogenen Pilzen isoliert.^[19,57-59]

Zu den kleineren Depsipeptiden aus je einer Aminosäure- und Hydroxycarbonsäureeinheit gehören Bassiatin und Lateritin. Sie wurden aus *B. bassiana* bzw. *Gibberella baccata* (WALLR.) SACC. (Synonyme: *F. lateritium*, *G. lateritium*) und *Isaria japonica* YASUDA isoliert. Bassiatin, ein lineares Depsipeptid, inhibiert die ADP-induzierte Plättchenaggregation. Das Cyclodepsipeptid Lateritin hingegen induziert die Apoptose und hemmt wie die Beauverolide die Cholesterolesterproduktion.^[7,8,60-62]

Peptide

Cyclische und lineare Peptide, die Leucinostatine, Cyclosporin A und die Efrapeptine, wurden aus *Paecilomyces lilacinus* (THOM) SAMSON und *Paecilomyces marquandii* (MASSEE) S. HUGHES bzw. *T. niveum* isoliert. Das cyclische Peptid Cyclosporin A ist ein wichtiges Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin.

Die linearen Verbindungen zeigen neben der insektiziden auch antibakterielle, antimycotische und zytotoxische Wirkungen. Die Efrapeptine sind ATPase-Inhibitoren. Leucinostatin A (s. Abbildung 3) zeigt hingegen *in vitro* eine stärkere Aktivität gegen Plasmodien als Artemether. Interessanterweise konnte für Leucinostatin A eine Wachstumshemmung von Prostatakrebszellen festgestellt werden, wobei diese über die Reduktion der Expression von Wachstumsfaktoren aus Gewebszellen vermittelt wird.^[7,8,63-69]

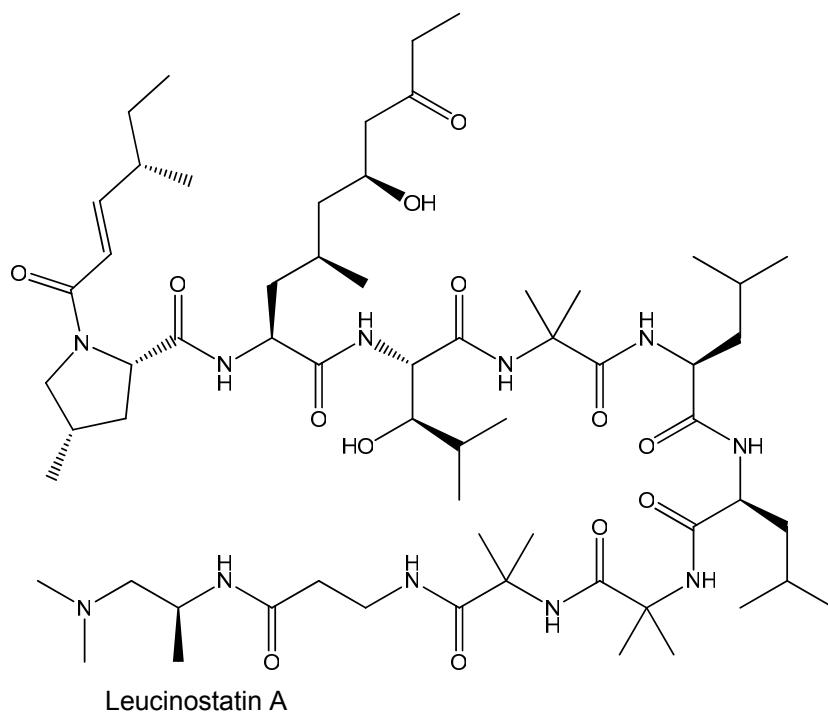


Abbildung 3. Strukturformel des linearen Peptids Leucinostatin A.

Cytochalasine

Cytochalasine konnten ebenfalls aus *M. anisopliae* isoliert werden (s. Abbildung 4). Diese Stoffe sind geschätzte Werkzeuge bei der Untersuchung von zellbiologischen Prozessen, die mit dem Zytoskelett in Verbindung stehen. Cytochalasine verhindern die Verlängerung des Aktinstrangs und führen zu dessen Abbau.^[35,70,71]

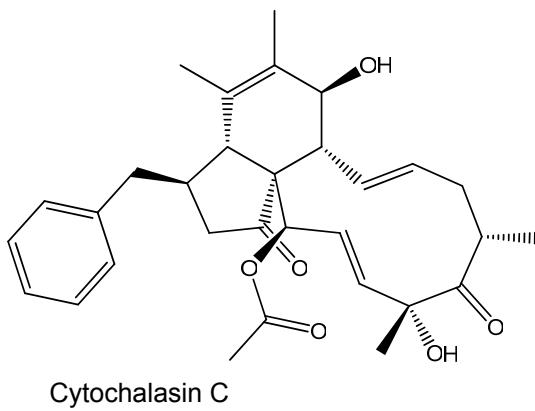


Abbildung 4. Strukturformel von Cytochalasin C.

Trichothecene und Trichothecane

Trichothecene sind Sesquiterpenmycotoxine, die durch phytopathogene *Fusarium*-Spezies gebildet werden. Diese konnten neben Trichothecanen (s. Abbildung 5) und strukturverwandten Spiroverbindungen aus *Paecilomyces tenuipes* (PECK) SAMSON isoliert werden. Die Trichothecene induzieren in verschiedenen Zelllinien die Apoptose. Im Gegensatz dazu aktivieren die

Trichothecane und Spiroverbindungen die Biosynthese von neurotrophen Verbindungen in Gliazellen. Diese Verbindungen scheinen potentielle Arzneistoffe und Leitstrukturen bei der Entwicklung von Medikamenten gegen Erkrankungen des zentralen Nervensystems zu sein. [7,8,72-75]

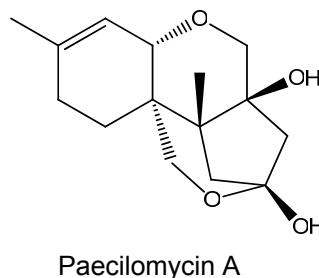


Abbildung 5. Strukturformel des Trichothecans Paecilomycin A.

Pyridonalkaloide und Tetramssäuren

Pyridonalkaloide und strukturverwandte Tetramssäuren wurden in Spezies der Gattungen *Beauveria*, *Paecilomyces*, *Cordyceps* und *Akanthomyces* gefunden (s. Abbildung 6). Die Pigmente Bassianin und Tenellin wirken antibakteriell, ebenso Paecilosetin und Akanthomycin. Die Cordypyridone A und B sind gegen Plasmodien wirksam und zeigen eine vergleichsweise schwache Zytotoxizität. Hingegen konnte bei einigen Militarinonen und Farinosone A *in vitro* eine neuritogene Wirkung gezeigt werden. [76-84]

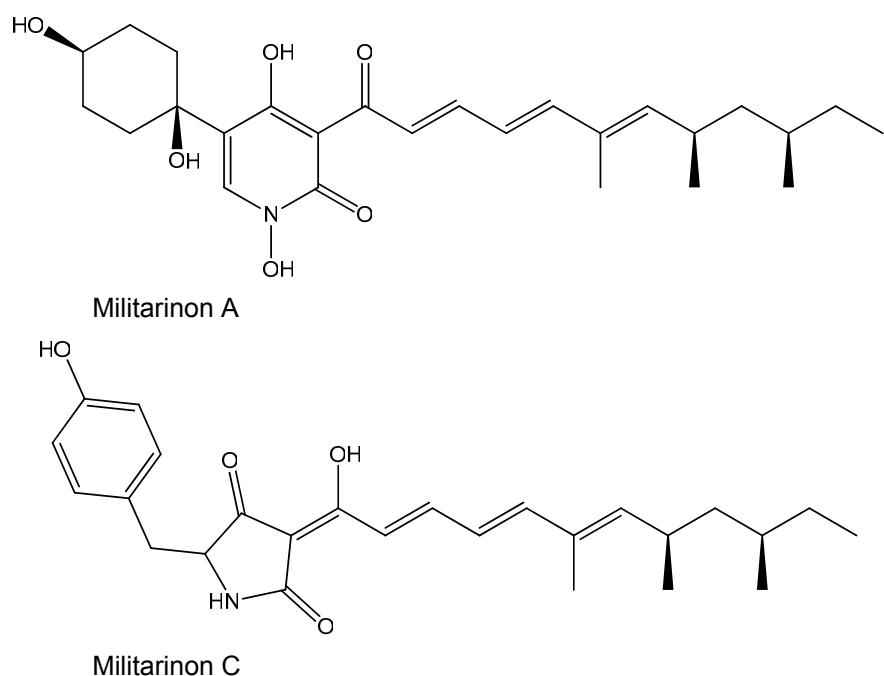


Abbildung 6. Strukturformeln des Pyridonalkaloids Militarinon A und der Tetramssäure Militarinon C.

Neben den genannten Verbindungsklassen, die in entomopathogenen Pilzen bisher gefunden wurden, sind weitere Substanzen verschiedener Strukturen und biologischen Aktivitäten bekannt. Dies sind beispielsweise Naphthochinone, Bioxanthracene, schwefelhaltige Diketopiperazine und Alkaloide.^[19]

1.2.4 Traditionelle Chinesische Medizin

Die TCM ist eine der ältesten Heilkunden. Sie ist eine ganzheitliche Medizin, in der Kräuterheilkunde, Akupunktur, Moxibustion, Massagen, Diäten und Körperübungen zur Anwendung kommen.^[85] Die Droge *Cordyceps* (Dongchong xiacao) ist seit Jahrhunderten ein geschätztes Naturheilmittel der TCM. Sie besteht aus *Ophiocordyceps sinensis* (BERK.) G. H. SUNG, J. M. SUNG, HYWEL-JONES & SPATAFORA (Synonym: *Cordyceps sinensis*) und seinem toten Wirt, einer Insektenlarve. In der TCM wird diese Droge als Tonikum, bei Atemwegs-, Herz-, Leber- und renalen Erkrankungen ebenso wie bei verminderter Libido und Impotenz, Hyperglykämie und Hyperlipidämie eingesetzt. Unter den bioaktiven Verbindungen sind Polysaccharide sowie 3'-Deoxyadenosin. Des Weiteren ist die Droge als diätetisches Lebensmittel in China, Japan und anderen asiatischen Ländern bekannt. Wegen der großen Nachfrage sind daneben auch Produkte aus dem fermentiertem Myzel anderer entomopathogener Pilzspezies und dessen Extrakte auf dem Markt.^[7,8,14,86-88]

Eine weitere Droge kennt das Chinesische Arzneibuch, die aus der toten Seidenraupe und dem entomopathogenen Pilz *B. bassiana* besteht: *Bombyx batryticatus* (Jiangcan). Sie wird in der TCM bei Krämpfen, Halsschmerzen, Juckreiz, Lymphknotenentzündungen und Gesichtslähmungen eingesetzt.^[15]

1.2.5 Ökologische Schädlingsbekämpfung

Weltweit sind Arthropoden als Schädlinge und Krankheitsüberträger bekannt. Blutsaugende Insekten und Spinnentiere übertragen Krankheiten wie Malaria und Frühsommer-Meningo-enzephalitis, pflanzenschädigende Insekten vermindern die Ernteerträge und Termiten schwächen die Bausubstanz von Häusern.

Nachdem das Risiko der uneingeschränkten Nutzung von chemischen Pestiziden im Ackerbau und in der Forstwirtschaft erkannt wurde, suchte man nach biologischen Schädlingsbekämpfungs-mitteln. Unter anderem stellte man Formulierungen mit entomopathogenen Pilzen her. Heute sind Produkte mit *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *M. anisopliae*, *P. fumosoroseus* und *Lecanicillium lecanii* (ZIMM.) ZARE & GAMS auf dem Markt. Die eingesetzten Pilze haben ein breites Wirtsspektrum und können durch die Fähigkeit zu überdauern für längeren Schutz vor erneutem Befall sorgen. Bisher haben die Schadinsekten keine Resistenzen entwickelt, wie sie bei den chemischen Insektiziden entstehen. Es sind wenige Wirkungen auf andere Organismen bekannt, somit scheinen sie eine sicherere Alternative zu chemischen Insektiziden zu sein. Zum Naturschutz werden die entomopathogenen Pilze zur Eindämmung von schädigenden Insektenpopulationen eingesetzt. Da sie

diese jedoch nicht völlig ausrotten, stören sie das ökologische Gleichgewicht nicht. Die Population wird lediglich minimiert und der Verlust an Ernteertrag bleibt akzeptabel.^[7,8,16]

Versuche, entomopathogene Pilze gegen krankheitsübertragende Insekten wie die *Anopheles*-Mücke einzusetzen, sind vielversprechend. Jedoch fehlen langzeitwirksame Formulierungen für Anwendungen auf Oberflächen im Haus. Außerdem sind in den Dritte-Welt-Ländern neue Risikobewertungen für die eingesetzten entomopathogenen Pilze im Hinblick auf die steigende Anzahl der Menschen mit Infektionskrankheiten wie AIDS unerlässlich.^[89,90]

1.3 Bösartige Neubildungen und Chemotherapie

Unter dem Begriff Krebs ist eine große Zahl an bösartigen Neubildungen in allen Körperbereichen zusammengefasst. Diese entstammen einer einzigen Körperzelle, die unter Einwirkung verschiedener Faktoren, wie ultravioletter und ionisierender Strahlung, bestimmter Chemikalien und gewisser Infektionskrankheiten sowie genetischer Faktoren, zur Tumorzelle wird. Durch eine hohe Zellteilungsrate und die verhinderte Apoptose entstehen weitere abnormale Zellen und der Tumor wächst rasch. Hierbei spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle bei der Versorgung der Krebszellen. In späteren Phasen breiten sich Tumorzellen durch die Bildung von Metastasen in anderen Organen aus.

Vorbeugung und Früherkennung können das Auftreten neuer Krankheitsfälle verhindern bzw. bessere Heilungschancen bieten. Die wichtigsten, kurativen Therapiemaßnahmen sind Operation, Bestrahlung und Chemotherapie, wobei die Chemotherapie auch als adjuvante oder palliative Therapie eingesetzt werden kann.^[91]

1.3.1 Bedeutung bösartiger Neubildungen

Krebs ist eine der führenden Todesursachen weltweit. Im Jahr 2000 gab es rund 6,2 Millionen Tote und 2004 waren es schon 7,4 Millionen Todesfälle. Es wird erwartet, dass dieser Aufwärtstrend bestehen bleibt und im Jahr 2030 weltweit mit 12 Millionen Todesfällen zu rechnen ist. In den Ländern mit hohem Einkommen stehen bösartige Neubildungen aufgrund der steigenden Lebenserwartung an zweiter Stelle aller Todesursachen.^[91-93]

Zu den wichtigsten Krebsarten mit hoher Mortalität zählen bösartige Neubildungen der Lunge, des Magens, von Kolon und Rektum, der Leber und der Brust. Bei früher Erkennung haben Krebspatienten bei einigen der Krebsarten wie Brustkrebs und bösartigen Neubildungen des lymphatischen und des blutbildenden Systems gute Heilungschancen. Oft jedoch ist die Behandlung bestenfalls lebensverlängernd und/oder verbessert die Lebensqualität des Patienten.^[91,94] Nach neuen Medikamenten und Angriffspunkten für die Therapie der Krebserkrankungen wird verstärkt gesucht. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Forschung auf dem Gebiet neuer zytotoxischer Substanzen.

1.3.2 Chemotherapie

Die Chemotherapie hat in der Krebstherapie einen Stellenwert hinter Operation und Strahlentherapie. In der Tumortherapie werden Chemotherapeutika insbesondere bei generalisierten bösartigen Neubildungen, bei Metastasen und bei inoperablen Tumoren eingesetzt. Neben der Verwendung zur Heilung werden Chemotherapeutika zur adjuvanten Therapie bei einer Operation oder Strahlentherapie und als palliative Maßnahme angewandt. Die Kombination mehrerer Chemotherapeutika verbessert den therapeutischen Erfolg. Molekulare Ziele der Zytostatika sind die DNS und die Topoisomerasen I und II sowie die Enzyme der DNS- oder RNS-Synthese und die Mikrotubuli. Deshalb wirken sie stärker auf die sich schnell teilenden

Tumorzellen. Sie betreffen daneben andere Zellen mit hoher Teilungssrate wie im Knochenmark, in den Gonaden, im Gastrointestinaltrakt und in den Haarwurzeln und verursachen somit starke Nebenwirkungen.^[94]

Interferone und Interleukine werden aufgrund ihrer antiproliferativen und immunmodulatorischen Eigenschaften in der Tumortherapie angewandt. Hormone und monoklonale Antikörper werden je nach Rezeptor- und Antigenausstattung der Tumorart gezielt eingesetzt. Neuerdings werden Antikörper auch mit radioaktiven Isotopen oder stark zytotoxischen Substanzen verknüpft. Neuere Zielstrukturen stellen die Tyrosin-Kinasen und mTOR (mammalian target of rapamycin), eine Serin/Threonin-Protein-Kinase, dar. Sie sind an der Signaltransduktion beteiligt, die die Proliferation der Tumorzellen fördert und die Apoptose unterbindet. Ein weiterer Angriffspunkt ist die Unterbindung der Angiogenese.^[94,95]

Substanzen aus natürlichen Quellen sind seit über einem Jahrhundert für die Wirkstoffentwicklung in der Krebstherapie bedeutend. Im vergangenen Jahrzehnt verloren natürliche Quellen an Bedeutung und die Forschung auf den Gebieten der monoklonalen Antikörper und die synthetisch hergestellten Kinase-Inhibitoren traten in den Vordergrund. Trotz der neuen zielgerichteten Therapie mit diesen Substanzen bleiben die herkömmlichen Zytostatika in der Therapie unentbehrlich. Nur etwa 11% der wichtigsten 175 Chemotherapeutika sind Antikörper, andere biotechnologisch hergestellte und körpereigene Stoffe. Weitere 24% sind synthetische Substanzen und 65% sind Naturstoffe, deren Derivate sowie synthetisch hergestellte Verbindungen, bei denen ein Naturstoff als Leitstruktur diente.^[96]

Im Jahr 2007 wurden erstmals wieder zwei semisynthetische Naturstoffe und ein Naturstoff zur Therapie zugelassen: Ixabepilone, Tensirolimus und Trabectedin. Ixabepilone, ein semisynthetisches Analogon der Epothilone aus *Sorangium cellulosum*, stabilisiert die Mikrotubuli und ist im Vergleich zu den Taxanderivaten vermutlich weniger anfällig für Resistenzen. Tensirolimus, ein Analogon von Sirolimus (Synonym: Rapamycin, ein Immunsuppressivum), ist ein mTOR-Inhibitor. Dieser Wirkstoff unterbricht einen wichtigen Signaltransduktionsweg für die Zellproliferation und die Unterbindung der Apoptose in den Tumorzellen. Er stellt somit den Übergang von den stark zytotoxischen Naturstoffen zu den zielgerichteten Chemotherapeutika mikrobiellen Ursprungs dar. Trabectedin ist ein Tetrahydroisochinolinalkaloid, welches aus dem marinen Organismus *Ecteinascidia turbinata* HERDMAN (Perophoridae) isoliert wurde. Dieser Wirkstoff alkyliert die DNS nur an bestimmten Stellen und beeinflusst so die Zellproliferation.^[8,97]

Resistenzentwicklungen gegenüber Zytostatika sind bekannt. Dafür ist maßgeblich ein P-Glycoprotein verantwortlich, welches die Substanzen aus dem Zytoplasma ausschleust. Ebenso wurden viele schwerwiegende Nebenwirkungen sowohl bei der Zytostatikatherapie als auch bei den zielgerichteten Therapien, beispielsweise mit Antikörpern, beobachtet.

Der Bedarf an neuen Substanzen, die nicht nur eine bessere Wirksamkeit aufweisen, sondern auch weniger Nebenwirkungen haben, weniger zu Resistenzen führen und einfacher zu verabreichen sind, ist hoch. Zytotoxische Substanzen aus Mikroorganismen und marinen Lebensformen gewinnen auf dem Gebiet der Wirkstoffentwicklung und der Aufdeckung neuer Wirkmechanismen wieder an Bedeutung.^[94,95,97]

1.4 Zielsetzung

Das Spektrum der Sekundärmetabolite entomopathogener Pilze ist bisher wenig untersucht. Diese Pilze sind stark an die Wirtsorganismen und die Umwelt angepasst. Dies zeigt sich vor allem in den vielfältigen Interaktionsmustern mit den Arthropodenwirten und der häufigen Letalität der Infektionen. Es wird vermutet, dass die Sekundärmetabolite der Pilze eine entscheidende Rolle in der Beeinflussung des Verhaltens der Wirte spielen. In einigen Fällen ist es bewiesen, dass sie zum Fortschreiten der Krankheit beitragen und den Tod des Wirts verursachen. Unter den bisher bekannten Verbindungen wirken einige ebenfalls auf humane Zelllinien zytotoxisch.

Aufgrund der gerade genannten Informationen, insbesondere der ökologischen Eingrenzung, und der Nutzung zweier entomopathogener Pilze in der TCM sollte ein Zytotoxizitäts-Screening der Extrakte von ausgewählten entomopathogenen Pilzen durchgeführt werden. Grund des gewählten Screenings ist die große Nachfrage nach neuen zytotoxischen Substanzen für die Arzneistoffentwicklung bzw. zur Aufklärung neuer Wirkmechanismen in der Krebstherapie. In Zukunft scheinen unter anderem besonders Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen wie Pilzen hierbei eine große Rolle zu spielen.

Basierend auf der zytotoxischen Aktivität der getesteten Extrakte aus einer Extraktbibliothek auf humane Zelllinien sollten die entsprechenden entomopathogenen Pilze kultiviert und vergleichbare Extrakte hergestellt werden. Anschließend sollten die aktiven Substanzen eines zytotoxischen Extraks einer wenig untersuchten Pilzspezies unter Verwendung klassischer Extraktions- und Trennmethoden isoliert werden. Die Strukturen der isolierten Einzelsubstanzen sollten mit Hilfe unterschiedlicher spektroskopischer, spektrometrischer und anderer Analysemethoden aufgeklärt und die Substanzen physikochemisch charakterisiert werden. Die zytotoxische Aktivität der isolierten Verbindungen sollte in Zytotoxizitäts-Assays an verschiedenen Zelllinien untersucht werden um Einblicke in ihr Wirkpotential zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Extrakte des Zytotoxizitäts-Screenings

Die getesteten 263 Extrakte von 73 entomopathogenen Pilzstämmen aus zehn verschiedenen Gattungen wurden von Herrn Prof. Dr. M. Hamburger von der Universität Basel (Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.1.1 Pilzstämmme

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten, entomopathogenen Pilzstämmme aus der Abteilung Ascomycota wurden zur Herstellung der Extrakte verwandt. Sie stammen aus einer Kultursammlung (Seriennr.: RCEF mit vierstelliger Nummer) der Anhui Agricultural University der Provinz Anhui (China).

Tabelle 2. Übersicht der entomopathogenen Pilzstämmme, aus denen die getesteten Extrakte hergestellt wurden.^[7,8] Zur taxonomischen Einordnung siehe außerdem Tabelle 1 auf Seite 5. Die Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite.

Seriennr. RCEF	Pilzspezies ^a	Autor(en)	Familie
0288, 0621	<i>Beauveria amorpha</i>	(HÖHN.) SAMSON & H. C. EVANS	Cordycipitaceae
0024, 0029, 0031, 0039, 0045, 0059, 0136, 0226	<i>Beauveria bassiana</i>	(BALS.-CRIV.) VUILL.	Cordycipitaceae
0048, 0049, 0052, 0092, 0385	<i>Beauveria brongniartii</i>	(SACC.) PETCH	Cordycipitaceae
0117, 0119, 0121, 0122, 0123, 0251, 0252, 0253, 0254, 0256, 0258	<i>Cladosporium</i> sp.*	LINK	Davidiellaceae
0273	<i>Hirsutella</i> sp.	PAT.	Ophiocordycipitaceae
0109, 0110, 0112, 0113, 0188, 0189, 0283, 0512, 0525, 0530	<i>Isaria catenulata</i>	(Z. Q. LIANG) SAMSON & HYWEL-JONES	Cordycipitaceae

^a : Anamorph; * : sekundäres Entomopathogen oder Saprobiot.

Fortsetzung von Tabelle 2. Übersicht der entomopathogenen Pilzstämme, aus denen die getesteten Extrakte hergestellt wurden.^[7,98] Zur taxonomischen Einordnung siehe außerdem Tabelle 1 auf Seite 5.

Seriennr. RCEF	Pilzspezies ^a	Autor(en)	Familie
0569, 0571	<i>Isaria catenobliqua</i>	(Z. Q. LIANG) SAMSON & HYWEL-JONES	Cordycipitaceae
0191	<i>Isaria cicadae</i>	MIQ.	Cordycipitaceae
0193, 0387, 0576, 0734	<i>Metarhizium anisopliae</i>	(METSCHN.) SOROKIN	Clavicipitaceae
0290, 0291, 0292, 0302	<i>Nomuraea rileyi</i>	(FARL.) SAMSON	Clavicipitaceae
0284	<i>Paecilomyces</i> sp.	BAINIER	Trichocomaceae
0103, 0104, 0445, 0453, 0623, 0625, 0627, 0649, 0697	<i>Paecilomyces farinosus</i>	(HOLMSK.) A. H. S. BR. & G. SM.	Trichocomaceae
0197, 0742	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	(WIZE) A. H. S. BR. & G. SM.	Trichocomaceae
0720, 0721	<i>Paecilomyces militaris</i>	Z. Q. LIANG	Trichocomaceae
0210, 0429, 0438, 0562	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	(PECK) SAMSON	Trichocomaceae
0712, 0724	<i>Septofusidium bifusisporum</i>	ZOU Y. LIU, Z. Q. LIANG & A. Y. LIU	Nectriaceae
0286	<i>Trichothecium roseum</i> *	(PERS.) LINK	nicht zugeordnet
0221, 0268, 0572, 0573	<i>Verticillium</i> sp.	NEES	Plectosphaerellaceae

^a : Anamorph; * : sekundäres Entomopathogen oder Saprobiot.

2.1.2 Extrakte der entomopathogenen Pilzstämme

Die aufgeführten entomopathogenen Pilzstämme wurden mindestens 14 Tage auf SDA-Y-Agar bzw. PDA vorkultiviert. Danach wurden 10 bis 15 Myzelstanzstücke aus der Vorkultur in je zwei Medien über 20 Tage als Schüttelkultur bei 120 rpm und 25 °C kultiviert. Die beiden Flüssigmedien waren je 400 mL Czapek-Dox-Nährlösung mit 1% Hefeextrakt und Sabouraud-2% Dextrose-Nährlösung mit 1% Malzextrakt, jeweils auf pH 6,5 eingestellt, in 1 L-Erlenmeyerkolben.^[99]

Nach der Kultivierung wurden Myzel und Kulturfiltrat jeweils mittels Büchnertrichter getrennt. Sie wurden gefriergetrocknet und mit je 150 mL Methanol bei Raumtemperatur 24 h bei 120 rpm

extrahiert. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und, in wenig destilliertem Wasser suspendiert, gefriergetrocknet.

Die so gewonnenen methanolischen Extrakte waren für die Extraktbibliothek in der Konzentration 10 mg/mL in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Diese Extrakte aus der Extraktbibliothek wurden dem Zytotoxizitäts-Screening zugeführt. Bei den Pilzstämmen, bei denen nicht alle vier Extrakte vorhanden waren, sind die Extrakte für das Screening in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3. Pilzstämme und die jeweiligen Extrakte für das Zytotoxizitäts-Screening. Bei den hier nicht aufgeführt Pilzstämmen waren alle vier Extrakte a, b, c und d vorhanden. Extrakte aus a: Myzel und b: Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Czapek-Dox-Nährlösung mit 1% Hefeextrakt, c: Myzel und d: Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Sabouraud-2% Dextrose-Nährlösung mit 1% Malzextrakt.

Pilzspezies				Pilzspezies				Pilzspezies						
Seriennr.		Extrakte		Seriennr.		Extrakte		Seriennr.		Extrakte				
RCEF				RCEF				RCEF						
<i>B. bassiana</i>				<i>P. fumosoroseus</i>				<i>S. bifusisporum</i>						
0045	a	-	c	-	0742	a	-	c	-	0712, 0724	a	-	c	-
0059	-	b	-	d	<i>P. militaris</i>				<i>T. roseum</i>					
<i>B. brongniartii</i>				0720, 0721	a	-	c	-	0286	a	b	-	d	
0048	-	b	c	d	<i>P. tenuipes</i>				<i>Verticillium</i> sp.					
<i>Cladosporium</i> sp.				0210, 0429,					0572, 0573	a	-	c	-	
0256	a	b	c	-	0438, 0562	a	-	c	-					

2.2 Pilzkultur und Extraktherstellung

Die entomopathogenen Pilzstämme (siehe Tabelle 4) wurden von Herrn Prof. Dr. M. Hamburger von der Universität Basel (Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 4. Übersicht der entomopathogenen Pilzstämme und der Medien, welche für die Kultivierung verwandt wurden.

Seriennr. RCEF	Pilzspezies	Medium
0288	<i>Beauveria amorpha</i>	Sabouraud
0136	<i>Beauveria bassiana</i>	Czapek
0109, 0112, 0113, 0525, 0530	<i>Isaria catenariannulata</i>	Czapek
0110	<i>Isaria catenariannulata</i>	Sabouraud
0569	<i>Isaria catenobliqua</i>	Czapek
0193	<i>Metarrhizium anisopliae</i>	Sabouraud
0104	<i>Paecilomyces farinosus</i>	Sabouraud
0197, 0742	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Sabouraud
0721	<i>Paecilomyces militaris</i>	Sabouraud
0210, 0438	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	Czapek

2.2.1 Medien für die Pilzkultur

SDAY-Agar

40 g/L	Saccharose	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D
10 g/L	Pepton	(Bacto Peptone) BD, Sparks, MD, USA
10 g/L	Hefeextrakt	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D
20 g/L	Agar-Agar	(Bacto Agar) BD, Sparks, MD, USA

Czapek-Medium (Czapek-Dox-Nährlösung mit 1% Hefeextrakt)

1,3 g/L	$K_2HPO_4 \times 3 H_2O$	p. a., Merck, Darmstadt, D
0,01 g/L	$FeSO_4 \times 7 H_2O$	p. a., Merck, Darmstadt, D
0,5 g/L	KCl	p. a., Merck, Darmstadt, D
0,5 g/L	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Ph. Eur., Merck, Darmstadt, D
3,0 g/L	$NaNO_3$	p. a., Merck, Darmstadt, D
30 g/L	Saccharose	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D
10 g/L	Hefeextrakt	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D
pH 6,5		

Sabouraud-Medium (Sabouraud-2% Dextrose-Nährlösung mit 1% Malzextrakt)

10 g/L	Pepton	(Bacto Peptone) BD, Sparks, MD, USA
22 g/L	D(+)-Glucose x H ₂ O	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D
10 g/L	Malzextrakt	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D
pH 6,5		

2.2.2 Stammhaltung

Zur Lagerung wurden Myzelstücke aus einer zehntägigen Vorkultur auf SDAY-Agar in steriles Wasser in Kryoröhrchen und auf SDAY-Agar in Schrägagarröhrchen bei 4 °C aufbewahrt. Ebenso wurden Myzelstücke in steriles, 10%igem Glycerol (hergestellt aus 87%igem Glycerol, p. a., Merck, Darmstadt, D) in Kryoröhrchen bei -32 °C und bei -80 °C eingefroren.

2.2.3 Pilzkultivierung

Die in Tabelle 4 aufgeführten, entomopathogenen Pilzstämme wurden auf SDAY-Agar (25 mL pro Petrischale) zehn Tage bei 25 °C vorkultiviert. Je 15 Myzelstanzstücke ($d = 1$ cm) wurden in einen 1 L-Erlenmeyerkolben mit 400 mL des in Tabelle 4 aufgeführten Mediums überführt. Diese Pilze wurden als Schüttelkultur bei 120 rpm 20 Tage bei 25 °C kultiviert. Die gleiche Anzahl Myzelstanzstücke des jeweiligen Pilzstamms wurde in einen Fernbachkolben mit 400 mL des entsprechenden Mediums überführt. Diese Pilze wurden in den Fernbachkolben als Standkultur 20 Tage bei 25 °C kultiviert.

Zur Untersuchung der Inhaltsstoffe von *I. catenulata* RCEF 0525 wurde zur Produktion einer ausreichenden Masse des methanolischen Myzelextrakts der Pilzstamm wie bereits beschrieben als Standkultur in 18 Fernbachkolben kultiviert.

2.2.4 Extraktion

Nach der Kultivierung der Pilze als Submers- oder Emerskultur wurden Myzel und Kulturfiltrat mittels Filtration über einen Büchnertrichter getrennt, jeweils gefriergetrocknet und in 150 mL Methanol 24 h bei 25 °C unter schütteln bei 120 rpm extrahiert. Den filtrierten Extrakten wurde am Rotationsverdampfer das Extraktionsmittel entzogen und der Rückstand, nach Suspension in wenig Wasser, gefriergetrocknet. Die so erhaltenen methanolischen Extrakte wurden bei -32 °C gelagert.

Für das Extrakt-Screening und die dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen wurden Lösungen der Konzentration 10 mg/mL in DMSO und in Methanol hergestellt.

2.3 Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays

2.3.1 Medien, Puffer und Reagenzien für die Zellkultur

Die Medien, Zusätze und Pufferlösungen für die Kultivierung der Zelllinien HeLa und Jurkat wurden hauptsächlich von Biochrom (Berlin, D) bezogen. In diesem Fall ist im Folgenden die Bestellnummer aufgeführt, andernfalls wurde die Bezugsquelle angegeben.

Kultur- und Versuchsmedium für HeLa-Zellen

500 mL	MEM Earle's	F 0315
50 mL	FBS	Fetal bovine serum, S 0115
5 mL	L-Glutamin	200 µM, K 0283
5 mL	NEA	Non essential amino acids, K 0293
5 mL	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/10.000 µg/mL, A 2212
0,8 mL	Amphotericin B	250 µg/mL, A 2612

Versuchsmedium für HeLa-Zellen im ECIS-Assay

500 mL	MEM Earle's	ohne Phenolrot, F 0385
50 mL	FBS	Fetal bovine serum, S 0115
5,7 mL	NaHCO ₃	7,5% (m/V), L 1713
5 mL	L-Glutamin	200 µM, K 0283
5 mL	NEA	Non essential amino acids, K 0293
5 mL	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/10.000 µg/mL, A 2212
0,8 mL	Amphotericin B	250 µg/mL, A 2612

Kultur- und Versuchsmedium für Jurkat-Zellen im WST-1-Assay

500 mL	RPMI 1640	F 1215
50 mL	FBS	Fetal bovine serum, S 0115
5 mL	L-Glutamin	200 µM, K 0283
5 mL	Penicillin/Streptomycin	10.000 U/10.000 µg/mL, A 2212
0,8 mL	Amphotericin B	250 µg/mL, A 2612

Kulturmedium für Jurkat-Zellen

500 mL	RPMI 1640	F 1215
50 mL	FBS	Fetal bovine serum, S 0115
5 mL	HEPES	1 M, L 1613
5 mL	L-Glutamin	200 µM, K 0283
5 mL	Natriumpyruvat	100 mM, L 0473
1,375 g	D(+)-Glucose x H ₂ O	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D

Versuchsmedium für Jurkat-Zellen

500 mL	RPMI 1640	ohne Phenolrot, F 1275
50 mL	FBS	Fetal bovine serum, S 0115
5 mL	HEPES	1 M, L 1613
5 mL	L-Glutamin	200 µM, K 0283
5 mL	Natriumpyruvat	100 mM, L 0473
1,375 g	D(+)-Glucose x H ₂ O	für die Mikrobiologie, Merck, Darmstadt, D

Pufferlösungen, Lösungen und Reagenzien

PBS	PBS Dulbecco, L 1825
Trypsin/EDTA-Lösung	0,5%/0,2%, L 2153, 10% in PBS
Trypanblaulösung	Trypanblau, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D, 0,4% (m/V) in PBS, sterilfiltriert
SDS-Lösungen	Natriumdodecylsulfat, 99%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D, 10% und 20% (m/V) in Reinstwasser, sterilfiltriert
Citratlösung	Natriumcitrat, DAB, Merck, Darmstadt, D, 0,1 M Natriumcitratlösung 1:1 mit Ethanol
Kollagen G-Lösung	4 mg/mL, L 7213, 0,01 mg/mL in kaltem PBS
MTT-Reagenz	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium- bromid (MTT), 98%, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D, 0,4% (m/V) in PBS, sterilfiltriert
WST-1-Reagenz	(Cell Proliferation Reagent WST-1) Roche Diagnostics, Mannheim, D
Kristallviolett-Reagenz	Kristallviolett, Merck, Darmstadt, D, 0,5% (m/V) in 20%igem Methanol

2.3.2 Herkunft und Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien HeLa^[100,101] (humane, epitheliale Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie, CCL-17 und CCL-2 von ATCC, Manassas, VA, USA) und Jurkat^[102] (humane, akute T-Lymphozyten-Leukämie-Zelllinie von CLS, Eppelheim, D und TIB-152 von ATCC, Manassas, VA, USA) wurden im jeweiligen Kulturmedium im Inkubator bei 5% CO₂-Gehalt und 37 °C kultiviert.

Bei der Zelllinie HeLa handelt es sich um adhärente Zellen. Zweimal in der Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:6 passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung 5 bis 10 min inkubiert. Das Trypsin wurde mit 5 mL Medium inaktiviert und die abgelösten Zellen wurden mit Hilfe einer serologischen Pipette suspendiert. Zur Entfernung des Trypsins wurde die Suspension bei 800 rcf 5 min

zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 3 mL Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 0,5 mL in 19,5 mL Medium in einer neuen Zellkulturflasche weiter kultiviert.

Bei der Zelllinie Jurkat handelt es sich um Suspensionszellen. Zweimal in der Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 passagiert. Hierzu wurde die gesamte Zellsuspension bei 500 rcf 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 5 mL Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde 1 mL in 14 mL Medium weiter kultiviert.

2.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Assays wurden jeweils mit einer bestimmten Zellzahl durchgeführt. Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot der beim Passagieren erhaltenen Zellsuspension 1:1 mit Trypanblaulösung gemischt (Färbung toter Zellen). Diese Mischung wurde im Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer betrachtet. Die ungefärbten, vitalen Zellen wurden gezählt. Durch das definierte Volumen in der Kammer wurde die Anzahl der lebenden Zellen pro mL Zellsuspension berechnet und die Suspension für die Assays entsprechend verdünnt.

2.3.4 MTT-Assays

Zum Zytotoxizitäts-Screening an HeLa-Zellen wurden die Extrakte in den Konzentrationen 100, 50 und 25 μ g/mL in zwei parallelen Ansätzen in einer 96-Well-Zellkulturtestplatte direkt mit 11x 10^3 Zellen pro Well inkubiert. Das Gesamtvolumen in einem Well betrug 150 μ L und die maximale Endkonzentration an DMSO somit 1%. Die Zellen wurden 72 h mit den Extrakten inkubiert. Danach wurde jedem Well 15 μ L MTT-Reagenz zugesetzt und weitere 4 h inkubiert. Das Medium mit dem überschüssigen MTT über den entstandenen violetten Formazankristallen wurde abgenommen und 150 μ L einer 10%igen SDS-Lösung in jedes Well pipettiert. Nach 24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln waren die Kristalle gelöst und die Absorption wurde im Zellkulturtestplattenphotometer bei 560 nm gemessen.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte von zytotoxischen Extrakten wurde jeweils eine Verdünnungsreihe beginnend mit 100 μ g/mL mit acht 1:1-Verdünnungsschritten in mindestens zwei parallelen Ansätzen und drei unabhängigen Versuchen getestet. Von den Reinsubstanzen wurden 0,01 M Lösungen in Ethanol hergestellt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurden Verdünnungsreihen beginnend bei 100 bzw. 25 μ M mit sieben 1:1-Verdünnungsschritten in mindestens zwei parallelen Ansätzen und drei unabhängigen Versuchen getestet. Die maximale Endkonzentration an Ethanol betrug 1%.

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte an Jurkat-Zellen wurden die Extrakte und Reinsubstanzen in den gleichen Konzentrationen wie für die HeLa-Zelltests beschrieben getestet. Hierbei wurden 15x 10^3 Jurkat-Zellen pro Well direkt mit den Extrakten oder Substanzen inkubiert. Das Gesamtvolumen in einem Well betrug 100 μ L. Nach 72 h Inkubationszeit wurden 10 μ L MTT-Reagenz pro Well zugesetzt und weitere 4 h inkubiert. Im Anschluss wurden 50 μ L einer 20%igen SDS-Lösung in

jedes Well pipettiert. Im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Formazankristalle innerhalb 24 h gelöst und anschließend die Absorption bei 560 nm gemessen.

Die Zellviabilität wurde im Verhältnis zu einer unbehandelten Zellkontrolle (= 100%-Wert) berechnet, dafür wurden in derselben Zellkulturtestplatte Zellen ohne Extrakt oder Substanz inkubiert. Für den Blindwert wurden Wells nur mit Medium gefüllt. Bei diesen Wells wurden die gleichen Arbeitschritte wie bei den Wells mit behandelten Zellen durchgeführt.

Die Zellviabilität wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellviabilität in \%} = \frac{A_{\text{Probe}} - A_{\text{Blindwert}}}{A_{\text{100\% - Wert}} - A_{\text{Blindwert}}} \cdot 100$$

Die Zytotoxizität wurde als Inhibitionskonzentration der Extrakte oder Substanzen bei 50% Zellviabilität (IC₅₀-Wert) berechnet. Dazu wurde jeweils mittels GraphPad Prism 4 eine sigmoidale Regression der Daten durchgeführt, wobei die Konzentration auf einer logarithmischen Skala gegen die Zellviabilität aufgetragen wurde.

Zusätzlich wurde das MTT-Reagenz mit den Extrakten und Substanzen in den höchsten Endkonzentrationen, die beim Assay eingesetzt wurden, untersucht um eine zellunabhängige Umsetzung auszuschließen. Hierbei wurde der Test unter den jeweiligen Testbedingungen ohne Zellen durchgeführt. Um Lösungsmitteleinflüsse auf die Viabilität der Zellen ausschließen zu können, wurde der Assay mit den Konzentrationen 1, 0,5 und 0,25% DMSO durchgeführt.

2.3.5 WST-1-Assays

Zum Zytotoxizitäts-Screening an Jurkat-Zellen wurden die Extrakte in den Konzentrationen 100, 50 und 25 µg/mL in zwei parallelen Ansätzen in einer 96-Well-Zellkulturtestplatte direkt mit 20x 10³ Zellen pro Well inkubiert. Jedes Well enthielt das Gesamtvolumen von 150 µL und die maximale Endkonzentration an DMSO betrug 1%. Die Zellen wurden 72 h mit den Extrakten inkubiert. Danach wurden 10 µL WST-1-Reagenz pro Well zugesetzt und weitere 2 h inkubiert. Die Testplatte wurde unverzüglich im Zellkulturtestplattenphotometer 1 min geschüttelt und die Absorption bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 690 nm gemessen.

Zur Bestimmung der IC₅₀-Werte von zytotoxischen Extrakten wurde jeweils eine Verdünnungsreihe beginnend mit 100 µg/mL und acht 1:1-Verdünnungsschritten in mindestens zwei parallelen Ansätzen und drei unabhängigen Versuchen getestet. Die Bestimmung der 100%-Werte und Blindwerte erfolgte wie beim MTT-Assay, ebenso die Berechnungen der Zellviabilität und der IC₅₀-Werte.

Zusätzlich wurde das WST-1-Reagenz mit den Extrakten und Substanzen in den höchsten Endkonzentrationen, die beim Assay eingesetzt wurden, untersucht um eine zellunabhängige Umsetzung auszuschließen. Hierbei wurde der Test unter den jeweiligen Testbedingungen ohne Zellen durchgeführt. Um Lösungsmitteleinflüsse auf die Viabilität der Zellen ausschließen zu können, wurde der Assay mit den Lösungsmittelkonzentrationen 1, 0,5 und 0,25% DMSO durchgeführt.

2.3.6 Proliferations-Assay

Um zu ermitteln, ob es sich bei einer festgestellten Zytotoxizität an HeLa-Zellen um eine zytostatische Aktivität der isolierten Substanz handelt, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt. Hierzu wurden zum Vergleich die beiden Testsysteme Kristallviolett- und MTT-Assay verwandt. Für den Kristallviolett-Assay wurden in zwei 96-Well-Zellkulturtestplatten 11×10^3 HeLa-Zellen pro Well in je 150 μL Medium inkubiert. In gleicher Weise wurde eine Zellkulturtestplatte für den MTT-Assay vorbereitet. Nach der Inkubationszeit von 24 h, in der sich die Zellen absetzten und an den Boden anheften konnten, wurde das Medium in allen drei Zellkulturtestplatten über den Zellen abgenommen. In zwei der Zellkulturtestplatten wurden 150 μL Substanzlösung in Medium beginnend bei der Konzentration 100 μM in sieben 1:1-Verdünnungen in sechs Parallelens zu den Zellen pipettiert. Die maximale Endkonzentration an Ethanol betrug 1%. Für den 100%-Wert wurden unbehandelte Zellen mit 150 μL Medium in derselben Zellkulturtestplatte 48 h wie die behandelten Zellen inkubiert.

Mit der dritten Zellkulturtestplatte wurden die Startbedingungen für den Kristallviolett-Assay bestimmt, indem die Zellen mit 50 μL Kristallviolett-Reagenz pro Well 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 200 μL Reinstwasser gewaschen und trocknen gelassen. Ebenso wurden die Zellen in einer der weiteren Zellkulturtestplatten nach 48 h Inkubationszeit und Abnehmen des Mediums behandelt. Die Zellen wurden mit 100 μL Citratlösung pro Well lysiert und die Absorption der entstandenen violetten Lösung bei 560 nm im Zellkulturtestplattenphotometer gemessen. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden Wells ohne Zellen ebenso behandelt. Die Proliferation wurde mit derselben Formel wie die Zellviabilität im MTT-Assay berechnet.

Mit der verbleibenden Zellkulturtestplatte wurde der MTT-Assay durchgeführt, indem jedem Well 15 μL MTT-Reagenz zugegeben wurden. Der Überstand wurde nach 4 h Reaktionszeit im Inkubator abgenommen und durch 150 μL 10%ige SDS-Lösung ersetzt. Nach 24 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur waren die Formazankristalle gelöst und die Absorption der Lösung wurde bei 560 nm gemessen. Die Bestimmung der 100%-Werte und Blindwerte erfolgte wie beim MTT-Assay, ebenso die Berechnungen der Zellviabilität und der IC_{50} -Werte unter diesen Versuchsbedingungen. Kristallviolett- und MTT-Assay wurden jeweils parallel in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

2.3.7 ECIS-Zytotoxizitäts-Assay

Um für den ECIS-Assay einen konfluenten Monolayer aus HeLa-Zellen auf der Arbeitselektrode innerhalb von 24 h zu erzeugen, wurden in einem Vorversuch die Zellzahlen 5, 6, 7 und 8×10^4 Zellen pro cm^2 in einer 96 Well-Zellkulturtestplatte getestet. Hierfür wurden die Wells mit je 50 μL Kollagen G-Lösung für 30 min bei 37 °C und 5% CO_2 beschichtet. Danach wurde die überstehende Flüssigkeit abgenommen und durch je 100 μL Versuchsmedium für die HeLa-Zellen im ECIS-Assay ersetzt. Die Kulturtestplatte wurde weitere 24 h äquilibriert um Fragmente des Kollagen G aus der Schicht zu lösen. Nach dem Entfernen der Lösung wurden je 150 μL

Zellsuspensionen mit den verschiedenen Zellzahlen pro Well zugegeben und die Zellen für 24 h inkubiert. Die Auswertung, ob die Zellen zu einem konfluenten Monolayer gewachsen waren, erfolgte mikroskopisch.

Für den ECIS-Versuch wurden die Wells der 8-Well-Elektrodenarrays mit je 200 μL Kollagen G-Lösung wie oben beschrieben beschichtet und anschließend mit je 400 μL Medium äquilibriert. Um einen konfluenten Monolayer zu erzeugen, wurden nach dem Entfernen der Lösung 44x 10^3 HeLa-Zellen pro Well in 400 μL Versuchsmedium 24 h inkubiert. Die Impedanzmessungen wurden am Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg durch Herrn Prof. Dr. J. Wegener durchgeführt. Zu Beginn des ECIS-Versuchs wurde das Medium jeweils durch 200 μL frisches Versuchsmedium ersetzt und die Zellen äquilibriert, um den Impedanzwert der unbehandelten Zellen zu ermitteln. Danach wurden je 200 μL der folgenden Lösungen zu den einzelnen Wells pipettiert: Für die Lösungsmittelkontrolle 1% Ethanol und die zu testende Substanz in den Konzentrationen 8, 40 und 100 μM jeweils in Versuchsmedium. Somit lagen die Konzentrationen im Versuch bei 0,5% Ethanol bzw. 4, 20 und 50 μM der zu testenden Substanz. Der ECIS-Assay wurde in vier unabhängigen Versuchen durchgeführt, bei denen für jedes Well die Impedanz bei verschiedenen Frequenzen über den gesamten Messzeitraum ermittelt wurde.

Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Normierung der bei einer Frequenz von 64.000 Hz gemessenen Impedanzen auf die Ausgangswerte der unbehandelten, äquilibrierten Zellen und die graphische Darstellung über den Zeitraum der Messung.

2.3.8 Statistische Analysen

Die genaue Anzahl der parallelen Ansätze auf einer Platte und die Anzahl der durchgeführten, unabhängigen Versuche sind beim jeweiligen Versuch angegeben. Die Daten wurden mit Microsoft Excel ausgewertet und das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung ermittelt.

Zum Vergleich der Mittelwerte zweier unabhängiger Versuche wurde ein t-Test und zum Vergleich mehrerer Gruppen von Mittelwerten mit einem Kontrollwert eine einfache Varianzanalyse mit anschließendem Dunnett-Test mittels GraphPad Prism 4 durchgeführt.

2.4 Isolierungsmethoden

Die schematische Darstellung der Fraktionierung und Isolierungen ist auf Seite 51 skizziert. Je nach chromatographischem Verhalten der zu trennenden Substanzgemische wurden die folgenden Trennsysteme für die Fraktionierungen und die Isolierungen der Einzelsubstanzen entwickelt, die in Tabelle 5 auf Seite 31 zusammengefasst sind. Die Trennsysteme, die zur dünnsschichtchromatographischen Analyse der in den Fraktionen erhaltenen Inhaltsstoffe verwandt wurden, sind im Kapitel 2.5.1 beschrieben.

2.4.1 Vorfraktionierung

Die Vorfraktionierung von 13,17 g des methanolischen Myzelextrakts der Standkultur von *I. catenianulata* RCEF 0525 erfolgte mittels Normalphasen-MPLC (Trennsystem V1). Dafür wurden mehrfach jeweils eine SuperVarioPrep D40-Säule mit 90 g und eine SuperVarioFlash D26-Vorsäule mit 17 g Kieselgel 60 gefüllt. Nach Konditionierung der Säulenfüllungen mit dem Startfließmittel wurden ca. 1,9 g des Extraks in Methanol gelöst und nach dem Adsorbieren an 5 g Kieselgel auf die Vorsäule aufgetragen. Der Extrakt wurde mit dem folgenden Fließmittelsystem getrennt: Gradientenelution bei einem Fluss von 20 mL/min mit den Fließmitteln A Cyclohexan und B Ethylacetat-Methanol-32%ige Ammoniaklösung (90:10:1); 0 – 10 min 2 → 5% B, 10 – 100 min 5 → 100% B, 100 – 120 min 100% B. Die Detektion erfolgte bei der Wellenlänge 280 nm und nach dünnsschichtchromatographischer Analyse mit dem Trennsystem DC2. Zur Vorfraktion 1 wurden die Fraktionen vereinigt, die zwischen 22 und 58 min aufgefangen wurden, zur Vorfraktion 2 zwischen 58 und 83 min und zur Vorfraktion 3 zwischen 83 und 120 min. Nach erfolgter Vorfraktionierung wurden den erhaltenen Substanzgemischen die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entzogen und diese anschließend nach Suspendierung in wenig Wasser gefriergetrocknet.

2.4.2 Fraktionierungen

Die Vorfraktion 2 (413,3 mg) wurde mittels Umkehrphasen-MPLC (Trennsystem F1) weiter fraktioniert. Hierfür wurde eine SuperVarioPrep D40 RP-18-Säule und eine SuperVarioFlash D26-Vorsäule gefüllt mit 9 g Kieselgel RP-18 verwandt. Nach Konditionierung der Säulenfüllungen mit dem Startfließmittel wurde das Substanzgemisch in Methanol gelöst und nach dem Adsorbieren an 0,5 g Kieselgel RP-18 auf die Vorsäule aufgetragen. Mit dem folgenden Fließmittelsystem wurde das Substanzgemisch getrennt: Gradientenelution bei einem Fluss von 30 mL/min mit den Fließmitteln A Reinstwasser und B Methanol; 0 – 15 min 50% B, 15 – 45 min 50 → 100% B, 45 – 75 min 100% B. Die Detektion erfolgte bei der Wellenlänge 225 nm und nach dünnsschichtchromatographischer Analyse mit dem Trennsystem DC2. Die Fraktion 2a wurde von 3,5 bis 6,5 min, 2b bis 13 min, 2c bis 31 min und 2d bis 75 min gesammelt. Die erhaltenen vier Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend gefriergetrocknet. Danach wurde die Alkaloide enthaltende Fraktion 2d (305,7 mg) über 155 g des mit Fließmittel

konditionierten Sephadex LH-20 ($h_{\text{stat. Phase}} = 54,0 \text{ cm}$) in einer Glassäule ($d = 3,5 \text{ cm}$, $h = 70 \text{ cm}$) bei einem Fluss von 4 mL Methanol pro min getrennt (Trennsystem F2). So wurden die Alkaloide von den Begleitstoffen separiert. Zur Probenvorbereitung wurde das Substanzgemisch im Fließmittel gelöst und durch einen Membranfilter (0,20 μm) filtriert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Die gesammelten Fraktionen wurden nach dünnenschichtchromatographischer Analyse mit dem Trennsystem DC2 zu den vier Fraktionen 2d1 von 41 bis 59 min, 2d2 bis 64 min, 2d3 bis 87 min und 2d4 bis 109 min vereinigt und diese eingeengt.

Die lipophile Vorfraktion 1 (1,14 g) wurde mittels Gelchromatographie an Sephadex LH-20 weiter fraktioniert (Trennsystem F3) und bei unzureichender Trennung wurden einzelne Fraktionen rechromatographiert. Dafür wurde das Substanzgemisch in Dichlormethan gelöst und über 45 g des mit Fließmittel konditionierten Sephadex LH-20 ($h_{\text{stat. Phase}} = 68,5 \text{ cm}$) in einer geschlossenen Glassäule ($d = 1,6 \text{ cm}$, $h = 90 \text{ cm}$) bei einem Fluss von 2 mL Dichlormethan pro min getrennt. Nach abgeschlossener Elution mit Dichlormethan wurden an der stationären Phase adsorbierte Substanzen mit Aceton eluiert. Das Eluat wurde mit Hilfe eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die erhaltenen Fraktionen wurden dünnenschichtchromatographisch mit den Trennsystemen DC2 und DC3 untersucht. Diese Fraktionen wurden durch Elution mit Dichlormethan erhalten: 1a von 10 bis 15 min, 1b bis 27 min, 1c bis 40 min, 1d bis 61 min, 1e bis 95 min, 1f bis 100 min, 1g bis 113 min, 1h bis 152 min, 1i bis 195 min, 1j (Carbonsäurengemisch) bis 282 min und 1k bis 297 min. Danach wurden die Fraktionen 1l und 1m mit Aceton zwischen 10 und 20 min bzw. 20 und 90 min eluiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entzogen.

2.4.3 Isolierungen

Die Alkaloide (Verbindungen **1** bis **4**) wurden mit der präparativen HPLC-Anlage an Kieselgel RP-18 mit dem Fließmittel Methanol-Reinstwasser (8:2) isoliert (Trennsystem I1). Dafür wurden die präparative sowie zur Rechromatographie die semipräparative HPLC-Säule verwandt und eine isokratische Elution bei 10,0 bzw. 4,7 mL/min durchgeführt. Zur Probenvorbereitung wurde das Substanzgemisch (175,5 mg) im Fließmittel gelöst und durch einen Membranfilter (0,20 μm) filtriert um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Das Injektionsvolumen betrug bei beiden Säulen 1,5 mL. Mit der präparativen Säule bei einem Fluss von 10,0 mL/min eluierten die Substanzen zwischen 12,9 und 14,5 min (**1**), 15,9 und 17,4 min (**2a/2b**), 17,8 und 20,7 min (**3**) und 21,1 und 23,3 min (**4**), mit der semipräparativen bei 4,7 mL/min zwischen 18,6 und 21,3 min (**1**), 23,1 und 24,5 min (**2a/2b**), 25,4 und 27,8 min (**3**) und 29,0 und 31,3 min (**4**).

Die Isolierung von Squalen erfolgte an 76 g Kieselgel 60 ($h_{\text{stat. Phase}} = 23,0 \text{ cm}$) in einer Glassäule ($d = 3,0 \text{ cm}$, $h = 30 \text{ cm}$) aus der lipophilen Fraktion 1b (505,0 mg). Mit dem Fließmittel Dichlormethan bei einem Fluss von 30 mL/min (Trennsystem I2) wurden vier Fraktionen nach dünnenschichtchromatographischer Analyse mit dem Trennsystem DC3 erhalten: 1b1 von 40 bis 120 mL, 1b2 bis 200 mL, 1b3 bis 700 mL und 1b4 von 1281 bis 2040 mL. Anschließend wurde die Fraktion 1b1 (51,0 mg) an 3 g Kieselgel 60 ($h_{\text{stat. Phase}} = 18,0 \text{ cm}$) in einer Glassäule ($d = 0,7 \text{ cm}$, $h = 30 \text{ cm}$) mit dem Fließmittel Hexan-Dichlormethan (99:1) bei einem Fluss von 1 mL/min

aufgereinigt (Trennsystem I3). Die Detektion erfolgte nach dünnenschichtchromatographischer Analyse mit dem Trennsystem DC3. Die zwei Fraktionen 1b1a und 1b1b (Squalen) wurden von 4 bis 9 mL bzw. von 13 bis 27 mL gesammelt.

Die Fraktion 1d (79,6 mg) wurde zur Isolierung von Ergosterol im Fließmittel gelöst und an 61 g des mit Fließmittel konditionierter Sephadex LH-20 ($h_{\text{stat. Phase}} = 92,9$ cm) in einer Glassäule ($d = 1,6$ cm, $h = 120$ cm) bei einem Fluss von 0,9 mL Dichlormethan pro min rechromatographiert (Trennsystem I4). Hierbei wurden die Inhaltsstoffe des mit einem Fraktionssammler aufgefangenen Eluats ebenfalls dünnenschichtchromatographisch mit dem Trennsystem DC3 analysiert. Die drei Fraktionen 1d1 bis 1d3 wurden zwischen 200 und 260 min, 260 und 340 min (1d2, Ergosterol) sowie 340 und 500 min gesammelt und eingeengt.

Für die Gewinnung von 4,4-Dimethylcholesta-7,14-dien-3-ol wurde das mit Aceton von der Sephadex LH-20-Phase eluierte Substanzgemisch 1m (129,8 mg) im Fließmittel Dichlormethan-Aceton (85:15) gelöst und mit dem Trennsystem I5 chromatographiert. Dafür wurden 61 g des mit Fließmittel konditionierten Sephadex LH-20 ($h_{\text{stat. Phase}} = 90,8$ cm) in einer Glassäule ($d = 1,6$ cm, $h = 120$ cm) bei einem Fluss von 2 mL/min verwandt. Das Eluat wurde mit einem Fraktionssammler aufgefangen. Die Detektion erfolgte nach dünnenschichtchromatographischer Analyse mit dem Trennsystem DC2. Die fünf Fraktionen 1m1 bis 1m5 wurden folgendermaßen gesammelt und anschließend eingeengt: 1m1 von 80 bis 125 min, 1m2 bis 180 min, 1m3 bis 235 min, 1m4 bis 255 min und 1m5 (4,4-Dimethylcholesta-7,14-dien-3-ol) bis 335 min.

Tabelle 5. Trennsysteme und Trennparameter für Vorfraktionierung (V), Fraktionierungen (F) und Isolierungen (I).

Trenn- system	Stationäre Phase	Chromatographie und Säule(n)*	Fließmittel	Elution und Fließmittel- zusammensetzung
V1	Kieselgel 60 90 g 17 g	MPLC SVP D40 Vorsäule SVF D26	A: Cyclohexan B: Ethylacetat- Methanol- NH ₃ (32%ig) (90:10:1)	20 mL/min Gradientenelution 0 – 10 min 2 → 5% B, 10 – 100 min 5% B → B, 100 – 120 min B
F1	Kieselgel RP-18 9 g	MPLC SVP D40 RP-18 Vorsäule SVF D26	A: Reinstwasser B: Methanol	30 mL/min Gradientenelution 0 – 15 min 50% B, 15 – 45 min 50% B → B, 45 – 75 min B
F2	Sephadex LH-20 155 g	Säulenchromatographie offene GS (3,5; 70)	Methanol	4 mL/min
F3	Sephadex LH-20 45 g	Säulenchromatographie geschl. GS (1,6; 90)	Dichlormethan (Aceton)	2 mL/min
I1	HPLC C18	präparative HPLC präparative und semipräparative HPLC-Säule	A: Methanol B: Reinstwasser (8:2)	10,0 mL/min bzw. 4,7 mL/min
I2	Kieselgel 60 76 g	Säulenchromatographie offene GS (3,0; 30)	Dichlormethan	30 mL/min
I3	Kieselgel 60 3 g	Säulenchromatographie offene GS (0,7; 30)	A: Hexan B: Dichlormethan (99:1)	1 mL/min
I4	Sephadex LH-20 61 g	Säulenchromatographie geschl. GS (1,6; 120)	Dichlormethan	0,9 mL/min
I5	Sephadex LH-20 61 g	Säulenchromatographie geschl. GS (1,6; 120)	A: Dichlormethan B: Aceton (85:15)	2 mL/min

* : SVP: SuperVarioPrep; SVF: SuperVarioFlash; GS: Glassäule (d; h, beide in cm).

2.5 Analytische Methoden

Zur Detektion, Reinheitsprüfung, Strukturaufklärung und Charakterisierung der isolierten Verbindungen wurden chromatographische (Dünnschicht- und Hochleistungsflüssigchromatographie), spektroskopische sowie spektrometrische (UV/Vis-, NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie) und chiropische Methoden (Polarimetrie) angewandt. Weiterhin wurde zur Charakterisierung der Schmelzpunkt bestimmt.

2.5.1 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde an Kieselgel 60- und an Kieselgel 60 RP-18-Fertigplatten mit verschiedenen Fließmitteln durchgeführt. Sowohl die Auftragung als auch die Dokumentation erfolgte bei der Ermittlung der R_f -Werte mit Hilfe von DC-Geräten. Vor der Auftragung wurden die in Methanol gewaschenen DC-Platten im Kaltluftstrom aktiviert und nach der Auftragung ebenso getrocknet. Die Chromatogramme wurden in DC-Kammern mit Kammersättigung über eine Laufstrecke von 8 cm entwickelt. Die Detektion erfolgte bei UV-Licht mit den Wellenlängen 366 und 254 nm. Als Sprühreagenzien wurden Anisaldehyd-Reagenz (nach Besprühen 5 min bei 110 °C erhitzt) und Dragendorffs Reagenz zur Detektion bei Tageslicht verwandt. In Tabelle 6 auf der folgenden Seite sind die entwickelten Trennsysteme zusammengefasst.

Mit Hilfe des Trennsystems DC1 wurde der Umfang des Inhaltsstoffspektrums der Extrakte aus der Extraktbibliothek und der Vergleichsextrakte ermittelt.^[81] Von jedem Extrakt der Bibliothek wurden 100 μ L entnommen, mit 400 μ L Reinstwasser verdünnt und diese Mischungen gefriergetrocknet, um das für die Dünnschichtchromatographie ungeeignete Lösungsmittel DMSO zu entfernen. Anschließend wurde der Rückstand in 100 μ L Methanol gelöst. Die Detektion der aufgetrennten Inhaltsstoffe dieser Extraktlösungen wurde mit Vanillin/Schwefelsäure- (nach Besprühen 10 min bei 110 °C erhitzt) statt mit Anisaldehyd-Reagenz durchgeführt.

Für die dünnenschichtchromatographische Analyse bei den Fraktionierungen und den Isolierungen wurden die Trennsysteme DC2 und DC3 angewendet. Die Reinsubstanzen wurden mit den Trennsystemen DC2 und DC4 analysiert und deren R_f -Werte bestimmt.

Anisaldehyd-Reagenz

170 mL	Methanol	p. a., Merck, Darmstadt, D
16 mL	Essigsäure	100%, p. a., Merck, Darmstadt, D
10 mL	konzentrierte Schwefelsäure	p. a., Merck, Darmstadt, D
2 mL	Anisaldehyd	zur Synthese, Merck, Darmstadt, D

Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz

1.	98 mL	Ethanol	99%, Merck, Darmstadt, D
	2 mL	konzentrierte Schwefelsäure	p. a., Merck, Darmstadt, D
2.	2 g	Vanillin	Ph. Eur., Fluka, Taufkirchen, D
	100 mL	Ethanol	99%, Merck, Darmstadt, D

Dragendorffs Reagenz

50 mL	Ethylacetat	p. a., Acros Organics, Geel, B
25 mL	Essigsäure	100%, p. a., Merck, Darmstadt, D
12 mL	Stammlösung	

Stammlösung für Dragendorffs Reagenz

2,6 g	basisches Bismutcarbonat	reinst, Merck, Darmstadt, D
7 g	Natriumnitrit	p. a., Merck, Darmstadt, D
25 mL	Essigsäure	100%, p. a., Merck, Darmstadt, D
100 mL	Ethylacetat	p. a., Acros Organics, Geel, B

Tabelle 6. Trennsysteme und Trennparameter für die DC (Trennstrecke jeweils 8 cm).

Trenn-system	DC-Fertigplatte	Fließmittel
DC1	Kieselgel 60 F ₂₅₄	Dichlormethan-Methanol-Reinstwasser (80:18:2)
DC2		Toluol-Ethylacetat-Methanol (7:2:1)
DC3		Dichlormethan
DC4	Kieselgel 60 RP-18 F ₂₅₄ S	Methanol-Wasser (85:15)

2.5.2 Hochleistungsflüssigchromatographie

Die Reinheitsprüfung der Substanzen erfolgte an der analytischen HPLC-Anlage (VWR Elite LaChrom) mit einer Detektionswellenlänge von 208 nm. Dafür wurden die Verbindungen in Acetonitril gelöst und durch einen Membranfilter filtriert. Für die Chromatographie wurde die analytische HPLC C18-Säule bei 25 °C Säulentemperatur verwandt. Die Substanzen wurden an der Umkehrphase mit der mobilen Phase Methanol-Reinstwasser (8:2) bei einem Fluss von 1 mL/min chromatographiert. Diese Messung wurde für jede Substanz dreifach durchgeführt.

2.5.3 UV/Vis-Spektroskopie

Die molaren Absorptionskoeffizienten ε der isolierten Reinsubstanzen wurden bei den jeweiligen Absorptionsmaxima mittels UV/Vis-Photospektrometer (Wellenlängenbereich 190 – 800 nm) unter Verwendung einer Quarzküvette bestimmt. Hierbei wurden Lösungen in den fünf Konzentrationen 5, 10, 15, 20 und 25 mg/L mit vorheriger Basislinienkorrektur mit dem Lösungsmittel Acetonitril gemessen. Die Lösungen wurden aus jeweils einer Stammlösung der Konzentration 700 mg/L oder 300 mg/L hergestellt.

2.5.4 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektren wurden in der Zentralen Analytik der Universität Regensburg mit NMR-Geräten der Firma Bruker aufgenommen. Sie wurden mit Hilfe der Software Topspin 2.1 ausgewertet. Zur Vorbereitung wurden die Reinsubstanzen in deuteriertem Lösungsmittel gelöst und die Lösungen in NMR-Röhrchen überführt. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und sind auf Signale des nicht-deuterierten Lösungsmittelanteils oder des Tetramethylsilans als externen Standard bezogen.

Zur Strukturaufklärung wurden eindimensionale (^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie) und zweidimensionale NMR-Messungen, die auf homonuklearen (COSY, NOESY, ROESY) und auf heteronuklearen (HSQC, HMBC) Spin-Kopplungssystemen beruhen, durchgeführt. Aus den eindimensionalen Spektren wurden die chemischen Verschiebungen und bei den ^1H -Spektren zusätzlich die Aufspaltungsmuster, Kopplungskonstanten und Integrale ermittelt. Diese geben Aufschluss über die in den Molekülen enthaltenen Strukturelemente. Mit Hilfe der HSQC-Spektren (heteronuclear single quantum coherence) wurden die Protonen den direkt gebundenen Kohlenstoffkernen zugeordnet. Die Korrelation von Protonen zu Kohlenstoffkernen über zwei, drei und seltener vier Bindungen wurde mit dem HMBC-Experiment (heteronuclear multiple bond correlation) sichtbar gemacht. Mit dem zweidimensionalen, homonuklearen Verfahren COSY (correlated spectroscopy) wurden über zwei, drei und vier Bindungen miteinander koppelnde Protonen ermittelt. Die Protonenkopplungen, die auf der räumlichen Nähe von Protonen beruhen, wurden mit den Experimenten NOESY (nuclear Overhauser enhancement spectroscopy) und ROESY (rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy) detektiert.

Bei der Angabe der ermittelten Werte wie der chemischen Verschiebung δ (in ppm), der Anzahl der Protonen und der Kopplungskonstante J (in Hz) sind die Multiplizitäten der Protonensignale folgendermaßen abgekürzt: s für Singulett, d für Dublett, t für Triplet, dd für Dublett eines Doublets, m für Multiplett. Bei Überlagerung von Signalen ist das letztgenannte mit * gekennzeichnet und br steht für ein breites Signal. Die Versuchsbedingungen sind jeweils bei den ermittelten Werten aufgeführt.

2.5.5 Massenspektrometrie

Zur Bestimmung der relativen Molekülmassen der isolierten Substanzen und zur Identifizierung anhand der Fragmentierungsmuster wurden Massenspektren in der Zentralen Analytik der Universität Regensburg an verschiedenen Massenspektrometern aufgenommen. Es wurden niedrig und hochauflöste Spektren mit Hilfe der Massenspektrometrie (MS) mit Elektronenstoßionisierung (EI) bei 70 eV Beschleunigungsenergie gemessen. Weitere niedrig aufgelöste Spektren wurden mit der Elektrosprayionisierung (ESI) aufgenommen. Dafür wurden den Verbindungen Methanol und Ammoniumacetat als Ionisierungsmittel zugesetzt. Die Messungen erfolgten im positiven Modus.

Die Signale der Molekülionen und der Fragmente sind als Masse-Ladungs-Verhältnis m/z mit der relativen Intensität in % angegeben.

2.5.6 Polarimetrie

Zur Ermittlung der spezifischen Drehung $[\alpha]_D^{20}$ der optisch aktiven Substanzen wurden diese in Acetonitril, Methanol bzw. Chloroform gelöst. Der Drehwinkel der jeweiligen Substanzlösung wurde am Polarimeter mit dem Lösungsmittel als Kompensationsflüssigkeit gemessen. Die Messungen erfolgten bei der Wellenlänge 589,3 nm (D-Linie des Natriumlichts) bei 20 °C. Bei der Angabe der spezifischen Drehungen sind die Konzentration in % (m/V) und das Lösungsmittel der gemessenen Lösung aufgeführt.

2.5.7 Schmelzpunktbestimmung

Bei kristallinen Reinsubstanzen wurde der Schmelzpunkt als weiteres Charakteristikum mit Hilfe eines Schmelzpunktmessgeräts bestimmt. Die Verbindung wurde dafür kompakt in eine Schmelzpunktkapillare gefüllt. Bei einer Heizrate von 1,0 °C/min wurde die gefüllte Kapillare erhitzt und der Temperaturbereich ermittelt, bei dem die Substanz zu schmelzen beginnt bis sie komplett geschmolzen ist.

2.5.8 Energieminimierung dreidimensionaler Strukturmodelle

Um einen Einblick in die dreidimensionale Struktur der Verbindungen zu erhalten und für Vergleiche mit den experimentellen Daten, wurden mit Hilfe des Chem & Bio Office 2010-Programms Chem3D Pro 12.0 energieminierte, dreidimensionale Modelle erzeugt. Die Konformation der Morphinringe und der daran gebundenen Substituenten wurde analysiert. Zusätzlich wurden die Abstände zwischen ausgewählten Wasserstoffatomen ermittelt.

2.6 Geräte und Chemikalien

2.6.1 Geräte und Software

Autoklaven	Autoklav 23, Melag, Berlin, D
	Varioklav 500, H+P, Obeschleißheim, D
DC-Geräte	Auftragegerät Linomat 5, Dokumentation Reprostar 3, Software WinCATS 1.4.2, Doppeltrogkammern 10 cm x 10 cm und 20 cm x 10 cm, Camag, Muttenz, CH
	Auftragegerät AS 30, Heizplatte Thermoplate S, Dokumentation CabUVIS, Software ProViDok 4, Desaga, Wiesloch, D
Dreidimensionale Darstellungen und Energieminimierungen	Chem3D Pro, CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA
ECIS-Geräte	ECIS 1600 R, Software ECIS Z-Theta, Applied BioPhysics, Troy, NY, USA
Gefriertrocknungsanlage	P 10 mit Pumpe PK8D, Ilmvac, Ilmenau, D
Gelchromatographieanlage	Kühler für Isopropanolbad EK 30, Haake, Karlsruhe, D
	Pumpe Peristaltic Pump P1, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S
	Fraktionssammler Multirac 2111, LKB, Bromma, S
HPLC-Anlage, analytisch	Elite LaChrom: Autosampler L-2200, Pumpe L-2130, Säulenofen L-2350, Dioden-Array-Detektor L-2455, Software EZChrom Elite 3.1.3, VWR, Darmstadt, D
HPLC-Anlage, präparativ	ProStar: Autosampler 410, zwei Pumpen 210, Detektor 335, Fraktionskollektor 701, Software Galaxie Chromatography Data System, Varian, Darmstadt, D
Inkubator	400596, New Brunswick, Edison, NJ, USA
Massenspektrometer	Finnigan MAT 95 und Finnigan MAT SSQ 710A (EI-MS), ThermoQuest Finnigan TSQ 7000 (ESI-MS), Varian, Darmstadt, D
Mikroskop	CK X 41 SF, Olympus, Hamburg, D
MPLC	Spot Liquid Chromatography Flash, Software Armen Glider Flash V2.3, Armen, Saint Ave, F
NMR-Anlagen	Avance 600 Kryo, Avance 400, Avance 300, Software Topspin 2.1, Bruker, Ettlingen, D
pH-Meter	inoLab pH Level 1, Elektrode SenTix Mic, WTW, Weilheim, D
Polarimeter	241, Perkin Elmer, Monza, I
	Unipol L1000, Schmidt+Haensch, Berlin, D

Reinstwasseranlage	Milli-Q UF Plus, Millipore, Schwalbach, D
	Aufbereitungsmodul 193-0003, MembranPure, Bodenheim, D
Rotationsverdampfer	Laborota 4003 control, MR 3004 safety S, Rotavac vario control, Heidolph, Schwabach, D
Schmelzpunktmessgerät	Melting Point B-545, Büchi, Essen, D
Schüttler	Lab-Shaker Modell Kühner, BBraun, Melsungen, D
	SM 25, Bühler, Tübingen, D
Sicherheitswerkbänke	danLAF VFR 906, Claus Damm, Fredensborg, DK
	CBH 1800, Faster, Cornaredo, I
	Medicin AB, Assab, Stockholm, S
Trockenschrank	771 364, Memmert, Schwabach, D
UV/Vis-Spektrophotometer	Cary 50 Scan UV-Visible Spectrophotometer, Software Cary WinUV, Varian, Darmstadt, D
	UV mini-1240 UV-Vis Spectrophotometer, Shimadzu, Duisburg, D
Waagen	R 160 P und MC1 Laboratory LC 6200 S, Sartorius, Göttingen, D
Wasserbad	WB 22, Memmert, Schwabach, D
Zählkammer	Neubauer improved, Brand, Wertheim, D
Zellkulturtestplattenphotometer	SpectraFluor Plus, Software Xfluor4 V 4.40, Tecan, Crailsheim, D
Zentrifuge	MegaFuge 1.0, Heraeus Sepatech, Osterode, D

2.6.2 Chemikalien und Reagenzien

Die Lösungsmittel für analytische Verfahren entsprachen p. a.-Qualität und wurden von Merck (Darmstadt, D) und Acros Organics (Geel, B) bezogen. Für die HPLC wurden Reinstwasser und Methanol mit der Qualität für die Flüssigkeitschromatographie von Merck (Darmstadt, D) verwendet. Bei der UV/Vis-Spektroskopie und Polarimetrie wurden die Lösungsmittel Acetonitril und Methanol mit der Qualität für die Flüssigkeitschromatographie von Merck (Darmstadt, D) eingesetzt. Die deuterierten Lösungsmittel für die NMR-Messungen (Aceton-d₆, Chloroform-d₁ und Methanol-d₄, jeweils 99,8%) wurden von Deutero (Kastellaun, D) bezogen.

Für die Zell-Assays wurden als Lösungsmittel für die Extrakte und Substanzen Dimethylsulfoxid (p. a.) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D) und Ethanol (absolut, p. a.) von Baker (Griesheim, D) eingesetzt. Weitere Chemikalien und Reagenzien sowie deren Qualität und Hersteller wurden bei den jeweiligen Methoden aufgelistet, in denen diese verwandt wurden.

2.6.3 Stationäre Phasen und Trennsäulen

Stationäre Phasen für die Säulenfüllung

Kieselgel 60	Gelduran Si 60 für die Säulenchromatographie (Partikelgröße 0,063 - 0,200 mm), Merck, Darmstadt, D
Kieselgel RP-18	LiChroprep RP-18 (Partikelgröße 25 - 45 µm), Merck, Darmstadt, D
Sephadex LH-20	(Partikelgröße 25 - 100 µm), Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S

MPLC-Säulen

leere Vorsäule	SuperVarioFlash 26D, Merck, Darmstadt, D
leere Säule	SuperVarioPrep D40, Merck, Darmstadt, D
Kieselgel RP-18-Säule	SuperVarioPrep D40 RP-18 (Partikelgröße 20 - 45 µm), Merck, Darmstadt, D

Sephadex LH-20-Säulen

geschlossene Glassäulen	($d = 1,6$ cm, $h = 90$ cm) und ($d = 1,6$ cm, $h = 120$ cm), Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, S
offene Glassäule	($d = 3,5$ cm, $h = 70$ cm), Glasbläserei der Universität Regensburg, Regensburg, D

HPLC-Säulen

präparativ	Eurosphere 100 C18 (Partikelgröße 7 µm, $d = 16$ mm, $h = 250$ mm), Knauer, Berlin, D
semipräparativ	Pursuit XR _s C18 Dynamax column (Partikelgröße 5 µm, $d = 10$ mm, $h = 250$ mm) mit Vorsäule Pursuit XR _s C18 Dynamax guard column (Partikelgröße 5 µm, $d = 10$ mm, $h = 50$ mm), Varian, Darmstadt, D
analytisch	Pursuit XR _s C18 (Partikelgröße 5 µm, $d = 4,6$ mm, $h = 250$ mm) mit Vorsäule Pursuit XR _s C18 (Partikelgröße 5 µm, $d = 4,6$ mm, $h = 10$ mm), Varian, Darmstadt, D

Kieselgel 60-Säulen

offene Glassäulen	($d = 3,0$ cm, $h = 30$ cm) und ($d = 0,7$ cm, $h = 30$), Glasbläserei der Universität Regensburg, Regensburg, D
-------------------	---

DC-Platten

Kieselgel 60 F ₂₅₄	DC-Aluminiumfolie, Merck, Darmstadt, D
Kieselgel 60 RP-18 F _{254S}	DC-Aluminiumfolie, Merck, Darmstadt, D

2.6.4 Steriles Verbrauchsmaterial

Einmalspritzen	Inject Luer Solo, BBraun, Melsungen, D
8-Well-Elektrodenarray	8W1E ($d_{\text{Arbeitselektrode}} = 250 \mu\text{m}$), Applied BioPhysics, Troy, NY, USA
Kryoröhrchen	Cryovial T310-2A, Simport, Bernard-Pilon, CDN
Membranfilter (0,20 μm)	Minisart 16534, Sartorius, Göttingen, D
Petrischalen	Cellstar Zellkulturschalen ($d = 94 \text{ mm}$), Greiner, Frickenhausen, D
Serologische Pipetten	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturflaschen (75 cm^2)	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturtestplatten	96 F, TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, CH

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Screening der Pilzextrakte

Mikroorganismen sind Produzenten wichtiger Wirkstoffe und Leitstrukturen für die Krebstherapie. Dazu gehören die Anthracycline, Bleomycin, Mitomycin, Taxol und die Epothilone.^[6] Bislang konnten auch zytotoxische Effekte an humanen Zelllinien bei einigen Sekundärstoffen aus entomopathogenen Pilzen nachgewiesen werden.^[37,46,48,62,72,78,81]

Auf der Suche nach neuartigen zytotoxischen Metaboliten wurde mit 263 Pilzextrakten einer Extraktbibliothek (s. Kapitel 2.1) ein Zytotoxizitäts-Screening an den humanen Zelllinien HeLa^[100,101] und Jurkat^[102] durchgeführt. Bei der HeLa-Zelllinie handelt es sich um adhärente, epithelialartig zum Monolayer wachsende Zellen, die einem Zervixadenokarzinom entstammen. Im Gegensatz dazu sind Jurkat-Zellen in Suspension wachsende Zellen. Es handelt sich hierbei um T-Lymphozyten, die von einem Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie stammen. Beides sind weit verbreitete Zelllinien, die sich unter standardisierten Bedingungen durch gleichmäßiges Wachstum und dadurch reproduzierbare Ergebnisse in Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays auszeichnen.

3.1.1 Zytotoxizitäts-Assays der Extrakte aus der Extraktbibliothek

Die Zytotoxizität der Extrakte aus der Extraktbibliothek an HeLa- und Jurkat-Zellen wurde mit Hilfe des von Mosmann erstmals beschriebenen MTT-Tests ermittelt.^[103] Es handelt sich um einen kolorimetrischen Assay, bei dem das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch zelluläre Dehydrogenasen und Oxidasen zum wasserunlöslichen, violetten Formazan reduziert wird (s. Abbildung 7). Diese Reduktion unter Spaltung des Tetrazoliumrings erfolgt vor allem durch die in vitalen Zellen aktiven mikrosomalen NAD(P)H-benötigenden Enzyme und die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase. Bei Beachtung verschiedener Einflussfaktoren besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten Formazanfarbstoffs und der Anzahl der lebenden Zellen. Die Absorption des Formazans wird nach Lösen mittels Detergens photometrisch bei einer Wellenlänge zwischen 550 und 600 nm bestimmt.^[103-107]

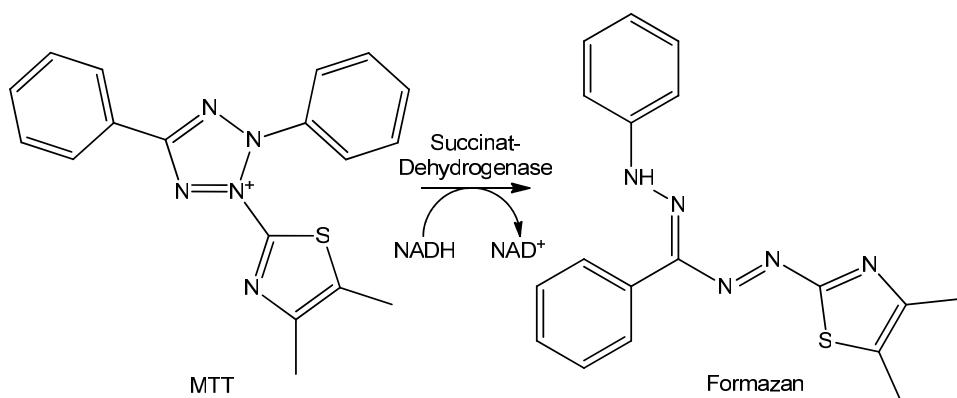


Abbildung 7. Reduktion des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumsalzes (MTT) zum Formazan, verändert nach Roche.^[107]

Um die Zytotoxizität der Extrakte an Jurkat-Zellen zu bestimmen wurde neben dem MTT-Assay auch ein Versuchsregime mit WST-1-Reagenz durchgeführt. Beim WST-1 handelt es sich um das Tetrazoliumsalz 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-tetrazolio]-1,3-benzodisulfonat, welches in lebenden Zellen in Gegenwart eines Elektronentransporters (im Reagenz enthalten) reduktiv zum Formazan gespalten wird (s. Abbildung 8). Diese reduktive Spaltung hängt neben der enzymatischen Aktivität der lebenden Zellen vor allem vom Vorhandensein von NAD(P)H ab. Hier besteht ebenfalls bei Beachtung verschiedener Einflussfaktoren ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des gebildeten Formazanfarbstoffs und der Anzahl der lebenden Zellen. Jedoch entsteht aus dem hellroten Tetrazoliumsalz ein dunkelrotes, wasserlösliches Formazan. Somit entfällt der Schritt des Lösens mittels Detergents. Am Ende der Reaktionszeit wird die Absorption bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.^[106,108,109]

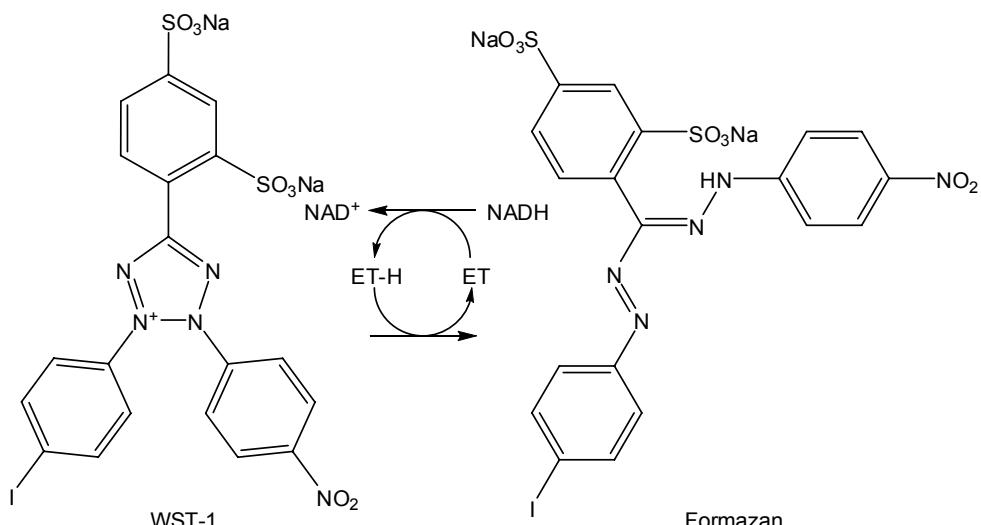


Abbildung 8. Reduktion des 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-tetrazolio]-1,3-benzodisulfonat (WST-1) zum Formazan in Gegenwart eines Elektronentransporters (ET), verändert nach Roche.^[109]

Für den preiswerteren MTT-Assay mit Jurkat-Zellen wurde das Protokoll des Tests mit HeLa-Zellen entsprechend adaptiert. Dazu waren Vorversuche zur Bestimmung einer geeigneten Zellzahl für auswertbare Daten (Absorptionen des Formazanfarbstoffs im linearen Bereich) und reproduzierbare Ergebnisse nötig. Als optimal erwies sich die Zellzahl von 15×10^3 Jurkat-Zellen pro Well.

Die Durchführung der Assays unter Einsatz von MTT und WST-1 mit HeLa- und Jurkat-Zellen ist in den Kapiteln 2.3.4 und 2.3.5 detailliert beschrieben. Im Screening kamen die Extraktkonzentrationen 100, 50 und 25 $\mu\text{g/mL}$ im MTT-Assay mit HeLa-Zellen und im WST-1-Assay mit Jurkat-Zellen zum Einsatz. Wenn sich beim Nachweis der zytotoxischen Aktivität eines Extrakts ein IC_{50} -Wert unter 50 $\mu\text{g/mL}$ abzeichnete, folgte die Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration der Zellviabilität (IC_{50} -Wert). Ergab sich aus den Daten keine auswertbare sigmoidale Zellviabilitäts-Konzentrations-Kurve, erfolgte die Einordnung in die Kategorien I und II. In Kategorie I wurden Extrakte mit einer Viabilität unter 50% bei einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/mL}$ Extrakt eingeordnet. Bei einer 50%igen Viabilität zwischen den Konzentrationen 25 und 50 $\mu\text{g/mL}$ erfolgte die Zuordnung in die Kategorie II. Von den potentesten Extrakten der interessantesten Stämme (siehe unten) wurde zusätzlich der MTT-Assay mit Jurkat-Zellen durchgeführt.

Eine Umsetzung der Reagenzien MTT und WST-1 mit den Extrakten fand beim zellfreien Versuch nicht statt. Die Lösungsmitteleinflüsse auf die Viabilität der Zellen konnten mit Hilfe einer Kontrolle bis zu einer Konzentration von 0,5% des Lösungsmittels im jeweiligen Assay sowohl für HeLa- als auch für Jurkat-Zellen ausgeschlossen werden. Deshalb blieben die gewonnenen Daten für 100 $\mu\text{g/mL}$ unberücksichtigt.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays sind in Tabelle 7 aufgeführt. Es lässt sich zusammenfassen, dass 27% der 263 Extrakte aus der Bibliothek eine zytotoxische Aktivität zeigen. Der Großteil mit 86% der aktiven Extrakte sind Myzelextrakte (a und c), der andere Teil sind Kulturfiltratextrakte (b und d). Des Weiteren sind 63% der aktiven Extrakte aus Kultivierungen mit Sabouraud-Medium (c und d) hervorgegangen, bei den übrigen wurde Czapek-Medium (a und b) verwendet. Sämtliche von den Spezies *Hirsutella* sp., *Isaria cicadae* und *Nomuraea rileyi* gewonnene Extrakte sind inaktiv.

Beim MTT-Assay mit HeLa-Zellen ergeben sich mehr positive Ergebnisse als im WST-1-Assay mit Jurkat-Zellen. Hier scheinen die HeLa-Zellen empfindlicher auf die zytotoxischen Inhaltsstoffe der Extrakte zu reagieren. Im Vergleich der Assays mit den Jurkat-Zellen scheint der WST-1-Assay der empfindlicher zu sein, da geringere IC_{50} -Werte gefunden werden. Jedoch lassen sich die Testsysteme aufgrund der unterschiedlichen Durchführung nur bedingt vergleichen und es kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen im jeweiligen Testsystem unterschiedlich auf die verschiedenen Inhaltsstoffe der Extrakte reagieren.

Aufgrund der gefundenen Zytotoxizität mehrerer Extrakte oder hoher zytotoxischer Aktivität eines Extrakts wurden 16 Pilzstämme für eine Kultivierung zur Extraktgewinnung ausgewählt: *B. bassiana* RCEF 0136, *B. amorpha* RCEF 0288, *I. catenulata* RCEF 0109, 0110, 0112, 0113, 0525 und 0530, *I. catenobliqua* RCEF 0569, *M. anisopliae* RCEF 0193, *P. farinosus* RCEF 0104, *P. fumosoroseus* RCEF 0197, 0742, *P. militaris* RCEF 0721 und *P. tenuipes* RCEF 0210, 0438.

Tabelle 7. Zusammenfassung der Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Screenings mittels MTT- und WST-1-Assay (n = 3, HeLa-Zellen 11×10^3 , Jurkat-Zellen 15×10^3 im MTT-Assay und 20×10^3 Zellen/Well im WST-1-Assay, Inkubationszeit 72 h). Die Fortsetzung folgt auf der nächsten Seite.

Pilzspezies	Ser.-nr.	MTT-Assay		WST-1-Assay	
		HeLa	Jurkat	IC ₅₀ µg/mL	Jurkat
	RCEF				
<i>Beauveria amorpha</i>	0288	I ^a ; 3,5±0,8 ^c ; II ^d	n.d. ^{a,b+d}	II ^c	
	0621	-	n.d.	-	
<i>Beauveria bassiana</i>	0024	I ^c	n.d.	-	
	0029	II ^c	n.d.	II ^c	
	0031	I ^a ; I ^c	n.d.	-	
	0039	I ^a ; II ^c	n.d.	-	
	0045	II ^a , n.d. ^{b+d} , I ^c	n.d.	n.d. ^{b+d}	n.d. ^{a+c}
	0059	n.d. ^{a+c}	n.d.	n.d.	n.d. ^{a+c}
	0136	I ^a ; I ^c	I ^a , n.d. ^{b+d}	I ^a , II ^c	
	0226	I ^a	n.d.	-	
<i>Beauveria brongniartii</i>	0048	n.d. ^a	n.d.	n.d. ^a	
	0049	I ^a	n.d.	-	
	0052	II ^d	n.d.	II ^c , I ^d	
	0092	I ^c	n.d.	I ^c , II ^d	
	0385	-	n.d.	-	
<i>Cladosporium</i> sp.	0117	-	n.d.	-	
	0119	-	n.d.	-	
	0121	II ^c	n.d.	I ^c ; II ^d	
	0122	-	n.d.	-	
	0123	-	n.d.	I ^c	
	0251	-	n.d.	-	
	0252	II ^c	n.d.	II ^a ; I ^c ; I ^d	
	0253	-	n.d.	-	
	0254	II ^a	n.d.	-	
	0256	n.d. ^d	n.d.	n.d. ^d	
	0258	-	n.d.	-	
<i>Hirsutella</i> sp.	0273	-	n.d.	-	
<i>Isaria catenariannulata</i>	0109	I ^a	II ^a ; n.d. ^{b-d}	12,5±0,7 ^a	
	0110	I ^c	n.d. ^{a,b+d} ; II ^c	14,4±1,1 ^c	
	0112	10,8±2,6 ^b ; II ^c	n.d. ^{a,c+d} ; 12,5±1,0 ^b	6,9±1,2 ^b ; I ^c	
	0113	5,2±1,1 ^a ; II ^c	6,5±1,1 ^a ; n.d. ^{b-d}	3,0±0,2 ^a ; I ^c ; II ^d	
	0188	-	n.d.	II ^a	
	0189	II ^c	n.d.	I ^c	
	0283	II ^c	n.d.	II ^a ; I ^c	
	0512	I ^a	n.d.	-	
	0525	8,7±3,5 ^a , II ^c	13,6±1,7 ^a ; n.d. ^{b-d}	17,2±4,5 ^a , II ^c	
<i>Isaria catenobliqua</i>	0530	7,0±1,4 ^a , I ^c	8,7±2,2 ^a ; n.d. ^{b-d}	5,8±0,1 ^a ; II ^c	
	0569	I ^a ; I ^c	n.d. ^{b-d}	II ^a	
	0571	I ^c	n.d.	-	
<i>Isaria cicadae</i>	0191	-	n.d.	-	
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0193	5,8±1,1 ^d	n.d. ^{a-c} ; 15,8±1,1 ^d	I ^c ; 13,2±1,0 ^d	
	0387	-	n.d.	-	
	0576	II ^a	n.d.	-	
	0734	-	n.d.	-	
<i>Nomuraea rileyi</i>	0290	-	n.d.	-	
	0291	-	n.d.	-	
	0292	-	n.d.	-	
	0302	-	n.d.	-	
<i>Paecilomyces</i> sp.	0284	II ^c	n.d.	-	

I: Kategorie I ($IC_{50} \leq 25 \mu\text{g/mL}$), II: Kategorie II ($25 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$); Extrakte aus ^a Myzel und ^b Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Czapek-Medium, ^c Myzel und ^d Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Sabouraud-Medium; n.d.: Assay nicht durchgeführt; - : keine Zytotoxizität detektierbar ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$).

Fortsetzung von Tabelle 7. Zusammenfassung der Ergebnisse des Zytotoxizitäts-Screenings mittels MTT- und WST-1-Assay ($n = 3$, HeLa-Zellen 11×10^3 , Jurkat-Zellen 15×10^3 im MTT-Assay und 20×10^3 Zellen/Well im WST-1-Assay, Inkubationszeit 72 h).

Pilzspezies	Ser.-nr.	MTT-Assay		WST-1-Assay	
		HeLa	Jurkat	Jurkat	Jurkat
	RCEF		IC ₅₀ µg/mL		
<i>Paecilomyces farinosus</i>	0103	-	n.d.	-	-
	0104	II ^a ; $13,7 \pm 1,0^c$	n.d. ^{a,b+d} ; $15,5 \pm 2,7^c$	I ^a ; $10,3 \pm 1,2^c$	-
	0445	-	n.d.	-	-
	0453	-	n.d.	-	-
	0623	-	n.d.	-	-
	0625	-	n.d.	-	-
	0627	-	n.d.	-	-
	0649	-	n.d.	-	-
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	0697	-	n.d.	-	-
	0197	II ^a ; $6,8 \pm 2,1^c$	n.d. ^{a,b+d}	-	-
	0742	n.d. ^{b+d} ; $10,3 \pm 2,1^c$	n.d. ^{a,b+d} ; I ^c	n.d. ^{b+d} ; $18,0 \pm 4,5^c$	n.d. ^{b+d}
<i>Paecilomyces militaris</i>	0720	n.d. ^{b+d} ; I ^c	n.d.	n.d.	n.d. ^{b+d}
	0721	I ^a ; n.d. ^{b+d} ; $7,7 \pm 2,2^c$	n.d. ^{a,b+d} ; I ^c	n.d.	n.d. ^{b+d}
<i>Paecilomyces tenuipes</i>	0210	$6,9 \pm 0,6^a$; n.d. ^{b+d} ; II ^c	$8,8 \pm 1,1^a$; n.d. ^{b-d}	$6,0 \pm 0,1^a$; n.d. ^{b+d} ; I ^c	-
	0429	n.d. ^{b+d} ; $8,7 \pm 1,6^c$	n.d.	n.d. ^{b+d} ; $4,7 \pm 0,6^c$	-
	0438	$11,1 \pm 0,9^a$; n.d. ^{b+d} ; I ^c	$10,4 \pm 1,0^a$; n.d. ^{b-d}	$4,8 \pm 1,3^a$; n.d. ^{b+d} ; I ^c	-
	0562	n.d. ^{b+d}	n.d.	n.d.	n.d. ^{b+d}
	0712	n.d. ^{b+d} ; II ^c	n.d.	n.d.	n.d. ^{b+d}
<i>Septofusidium bifusisporum</i>	0724	I ^a ; n.d. ^{b+d} ; II ^c	n.d.	n.d.	n.d. ^{b+d}
	0286	n.d. ^c ; I ^d	n.d.	n.d.	n.d. ^c
<i>Trichothecium roseum</i>	0221	-	n.d.	II ^c ; II ^d	-
<i>Verticillium</i> sp.	0268	-	n.d.	II ^c	-
	0572	II ^a ; n.d. ^{b+d} ; II ^c	n.d.	n.d. ^{b+d}	-
	0573	n.d. ^{b+d}	n.d.	n.d. ^{b+d}	-

I: Kategorie I ($IC_{50} \leq 25 \mu\text{g/mL}$), II: Kategorie II ($25 \mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$); Extrakte aus ^a Myzel und ^b Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Czapek-Medium, ^c Myzel und ^d Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Sabouraud-Medium; n.d.: Assay nicht durchgeführt; - : keine Zytotoxizität detektierbar ($IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$).

3.1.2 Herstellung vergleichbarer Pilzextrakte

Um vergleichbare Pilzextrakte zu erzeugen, wurden die Kultivierungsbedingungen wie bei den jeweiligen Extrakten der ausgewählten Pilzstämme mit der höchsten zytotoxischen Aktivität gewählt. Es wurde jeweils eine Schüttelkultur, wie bei der Herstellung der Bibliotheksextrakte, und parallel zusätzlich eine Standkultur im Fernbachkolben (größere Flüssigkeitsoberfläche) hergestellt. Da in der Literatur keine Angaben über die Lichtverhältnisse vorlagen, fand die Inkubation der entomopathogenen Pilze unter Ausschluss von Tageslicht statt.

Nach Trennung und anschließender Gefriertrocknung von Myzel und Kulturfiltrat erfolgten die Extraktion mit Methanol und die Einengung des Extraks zur Trockne. Die genauen Bedingungen der Kultivierung und Extraktion sind im Kapitel 2.2 beschrieben. Je Pilzstamm konnten vier Extrakte gewonnen werden. Diese sind e: Myzel- und f: Kulturfiltratextrakt der Schüttelkultur sowie g: Myzel- und h: Kulturfiltratextrakt der Standkultur. Aus den Trockenextrakten wurden methanolische Lösungen für die dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen und Lösungen in DMSO für die Zytotoxizitäts-Assays hergestellt.

Die Extraktionsausbeute lag bei den Myzelextrakten bei 0,1 bis 1,2 g und bei den Kulturfiltratextrakten zwischen 2,1 und 13,3 g. Ein Unterschied in den Extrakterträgen zwischen Submerskultur und Emerskultur wurde nicht festgestellt.

Für einen direkten Vergleich der Inhaltsstoffspektren der gewonnenen Extrakte mit den Extrakten aus der Bibliothek wurde eine dünnsschichtchromatographische Analyse durchgeführt.

3.1.3 Dünnschichtchromatographische Untersuchungen

Die zytotoxischen für die Reproduktion gewählten Extrakte aus der Bibliothek (s. Tabelle 8) wurden unter Verwendung des Trennsystems DC1 zur Auftrennung mittelpolarer Verbindungen dünnsschichtchromatographisch untersucht. Das erhaltene Chromatogramm (s. Abbildung 9) zeigt bei den meisten dieser Extrakte eine Vielzahl von Inhaltsstoffen. Auffällig sind die in den *I. catenianulata*-Extrakten (Bahn 3 bis 8) und in einigen *Paecilomyces*-Extrakten (Bahn 11, 13, 15 und 16) enthaltenen Alkaloide, die mit Dragendorffs Reagenz detektierbar sind. Die Zonen dieser Alkaloide befinden sich im R_f -Bereich um 0,8. Das gehäufte Auftreten bei der Spezies *I. catenianulata* sowie die gleichzeitige Detektion im UV-Licht bei 366 und 254 nm einiger dieser Zonen lässt auf strukturell ähnliche Substanzen schließen. Da Alkaloide oft eine starke physiologische Wirkung auf humane Zellen zeigen, könnten diese für die zytotoxische Wirkung verantwortlich sein. Diese Aussage wird durch den Mangel an weiteren ähnlichen Zonen in Bahn 3 im Vergleich mit den Bahnen 4 bis 8 bestätigt.

Eine weitere interessante Zone tritt bei sämtlichen Myzelextrakten (Bahn 1 bis 9 und 11 bis 16) bei einem R_f -Wert von 0,86 auf und kann bei 366 nm detektiert werden. In größerer Quantität der entsprechenden Substanz lässt sich die Zone ebenfalls mit Vanillin/Schwefelsäure-Reagenz anfärbten und löscht die Fluoreszenz des Indikators bei 254 nm. Hierbei scheint es sich um eine ubiquitär in den Myzelien vorhandene Verbindung zu handeln.

Beim dünnsschichtchromatographischen Vergleich der Bibliotheksextrakte mit den Myzel- und Kulturfiltratextrakten der Submers- und Emerskultur fällt auf, dass der Myzelextrakt der Standkultur g häufig besser dem jeweiligen Myzelextrakt (Schüttelkultur) aus der Bibliothek entspricht als der Schüttelkulturextrakt e (s. Tabelle 8). In den zwei Fällen von *B. bassiana* RCEF 0136 und *P. fumosoroseus* RCEF 0197 stimmen die Inhaltsstoffe der beiden hergestellten Myzelextrakte mit dem jeweiligen Bibliotheksextrakt überein. Die Extrakte mit deutlich abweichendem Gehalt einiger Inhaltsstoffe sind in Tabelle 8 in Klammern aufgeführt. Wie erwartet ist der Kulturfiltratextrakt der Submerskultur d von *M. anisopliae* RCEF 0193 in seinem Inhaltsstoffspektrum mit dem Extrakt f übereinstimmend, nicht jedoch mit Extrakt h. Hier und bei den Spezies *B. amorpha*, *I. catenioliqua* und *P. tenuipes* scheint das Schütteln bei der Kultivierung einen größeren Einfluss auf die Bildung der Inhaltsstoffe zu haben als bei den anderen Pilzspezies, bei denen ein Myzelextrakt als Vergleichsextrakt gewonnen wurde.

Des Weiteren ist beim Kulturfiltratextrakt b von *I. catenianulata* RCEF 0112 keine Ähnlichkeit mit den gewonnenen Kulturfiltratextrakten zu finden, jedoch mit dem Myzelextrakt der Standkultur g. Im Chromatogramm der Extrakte a bis d dieses Pilzstamms stimmen a und d sowie b und c überein.

Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Extrakt b eher um den Myzelextrakt a handelt und umgekehrt. Die mit Dragendorffs Reagenz detektierten Alkaloide in den Bibliotheksextrakten sind, außer bei *P. tenuipes* RCEF 0210, ebenfalls in den vergleichbaren, hergestellten Extrakten enthalten.

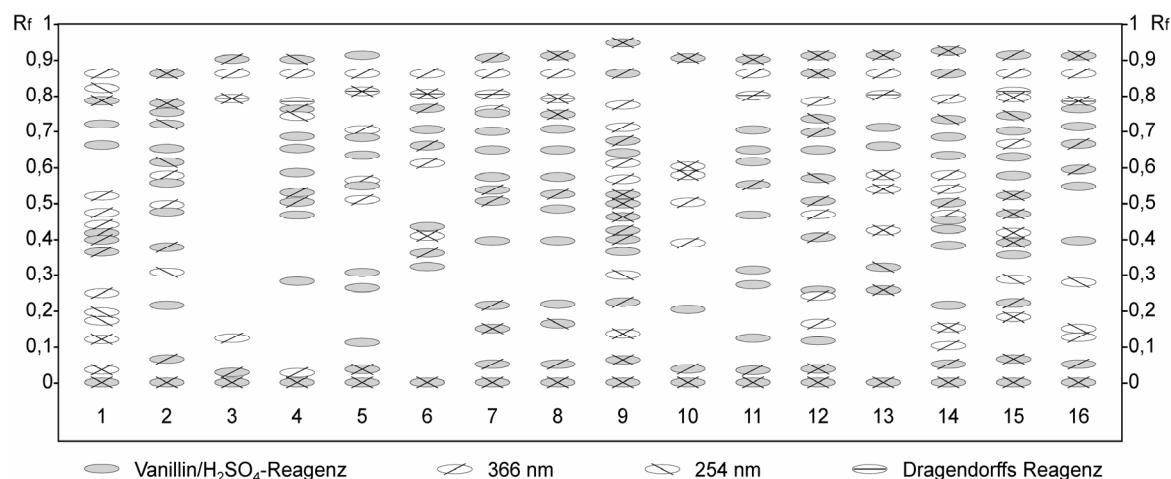


Abbildung 9. Schematische Darstellung des Chromatogramms der Extrakte aus der Bibliothek nach der Dünnschichtchromatographie mit dem Trennsystem DC1. Zur Zuordnung der Bahnnummern zu den Extrakten siehe Tabelle 8.

Tabelle 8. Zusammenfassung des dünnschichtchromatographischen Vergleichs der Extrakte aus der Bibliothek mit den hergestellten Pilzextrakten.

DC	Pilzspezies	Ser.-nr. RCEF	Bibliotheks-extrakt	vergleichbarer Extrakt	Alkaloide
Bahnnr.					
1	<i>Beauveria amorpha</i>	0288	c	e, (g)	
2	<i>Beauveria bassiana</i>	0136	a	e, g	
3	<i>Isaria catenariannulata</i>	0109	a	g	+
4		0110	c	g	+
5		0112	b°	g	+
6		0113	a	g, (e)	+
7		0525	a	g	+
8		0530	a	g, (e)	+
9	<i>Isaria catenobliqua</i>	0569	a	e, (g)	
10	<i>Metarhizium anisopliae</i>	0193	d	f	
11	<i>Paecilomyces farinosus</i>	0104	c	g, (e)	+
12	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	0197	c	e, g	
13		0742	c	g	+
14	<i>Paecilomyces militaris</i>	0721	c	g, (e)	
15	<i>Paecilomyces tenuipes</i>	0210	a	e, (g)	a +, e und g -
16		0438	a	e, (g)	+

Bibliotheksextrakte aus a: Myzel und b: Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Czapek-Medium, c: Myzel und d: Kulturfiltrat des Pilzstamms kultiviert in Sabouraud-Medium (jeweils Schüttelkultur); vergleichbare Extrakte aus e: Myzel und f: Kulturfiltrat des Pilzstamms aus der Schüttelkultur, g: Myzel des Pilzstamms aus der Standkultur (Medium der Kultivierung jeweils identisch mit dem zugehörigen Bibliotheksextrakt); °: wahrscheinlich Myzelextrakt a (Verwechslung).

Der dünnenschichtchromatographische Vergleich der Extrakte zeigt, dass für jeden Bibliotheksextrakt mindestens ein Extrakt mit nahezu übereinstimmendem Inhaltsstoffspektrum erzeugt werden konnte. Abweichende Metabolitenspektren, speziell der Gehalt der Komponenten und das Fehlen der Alkaloide bei den Extrakt e und g von *P. tenuipes* RCEF 0210, können durch unterschiedliche Kulturbedingungen, beispielsweise die Lichtverhältnisse, bedingt sein. Nach diesem dünnenschichtchromatographischen Vergleich folgte die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der gewonnenen Extrakte.

3.1.4 Zytotoxizitäts-Assays der hergestellten Pilzextrakte

Die Zytotoxizitäts-Assays der gewonnenen Extrakte wurden analog zu denen des Screenings durchgeführt. Hierbei wurden die Extrakte der Pilzspezies mit noch weitgehend unbekanntem Inhaltsstoffspektrum wie *B. amorpha*, *I. catenianulata* und *I. catenobliqua* in allen drei Systemen getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

In den gewonnenen Myzelextrakten e und g aus *B. amorpha* RCEF 0288 konnte die zytotoxische Aktivität von Extrakt c im Assay mit HeLa-Zellen nicht reproduziert werden. Jedoch zeigen beide Extrakte in allen Assays eine moderate bis schwache Aktivität, so auch im MTT-Assay mit Jurkat-Zellen im Gegensatz zu Extrakt c.

In Extrakt g von *I. catenianulata* RCEF 0109 kann die moderate Zytotoxizität von Extrakt a wieder gefunden werden. Hingegen konnten in den Extrakt e und g von *I. catenianulata* RCEF 0110, 0112 und 0113 nur schwache bis moderate zytotoxische Aktivitäten festgestellt werden. Die IC₅₀-Werte der vergleichbaren Extrakte der Bibliothek wurden nicht erreicht.

Einen im MTT-Assay mit HeLa-Zellen vergleichbaren IC₅₀-Wert mit $6,0 \pm 0,7 \mu\text{g/mL}$ gegenüber $8,7 \pm 3,5 \mu\text{g/mL}$ (s. Tabelle 7), jedoch signifikant niedrigere IC₅₀-Werte mit $8,2 \pm 0,9$ bzw. $8,1 \pm 2,7 \mu\text{g/mL}$ gegenüber $13,6 \pm 1,7$ bzw. $17,2 \pm 4,5 \mu\text{g/mL}$ in den Assays mit Jurkat-Zellen wurden für Extrakt g von *I. catenianulata* RCEF 0525 erhalten. Für den Extrakt g von *I. catenianulata* RCEF 0530 wurde ebenfalls im MTT-Assay jedoch mit Jurkat-Zellen ein vergleichbarer IC₅₀-Wert mit $5,6 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ gegenüber $8,7 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$ bestimmt. In den anderen beiden Assays wurde hingegen jeweils ein signifikant höherer Wert erhalten. Diese beiden Extrakte zeigen die höchste zytotoxische Aktivität unter den hergestellten Extrakt.

Der Extrakt g von *I. catenobliqua* RCEF 0569 zeigt in allen drei Testsystemen eine moderate Aktivität (Kategorie I), Extrakt e eine schwache in den MTT-Assays (Kategorie II). Der mit Extrakt g vergleichbare Extrakt a der Bibliothek wirkt hingegen im MTT-Assay mit HeLa-Zellen moderat und im WST-1-Assay mit Jurkat-Zellen schwach zytotoxisch.

Als zytotoxische Verbindungen sind die Beauvericine und die Bassianolide aus *B. bassiana*^[46,48,110], Paecilosetin, Farinosone B und N-Deoxymilitarinon A aus *P. farinosus*^[83,84], Militarinon D aus *P. militaris*^[81] sowie die Beauvericine und Acetoxyscirpenole aus *P. tenuipes*^[44,72] bekannt. In *P. fumosoroseus* wurde die insektizide und reizend wirkende Dipicolinsäure^[111] gefunden. Da die genannten zytotoxischen und weiteren Substanzen aus diesen kultivierten Pilzspezies bereits bekannt sind und damit die Isolierung neuer Substanzen unwahrscheinlich ist,

wurde von einer weiteren Behandlung dieser Spezies und somit auch vom Zytotoxizitätstest der hergestellten Extrakte abgesehen.

Tabelle 9. Zusammenfassung der Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays mit den hergestellten Extrakten (n = 3, HeLa-Zellen 11x 10³, Jurkat-Zellen 15x 10³ im MTT-Assay und 20x 10³ Zellen/Well im WST-1-Assay, Inkubationszeit 72 h).

Pilzspezies	Ser.-nr.	MTT-Assay		WST-1-Assay	
		HeLa	Jurkat	Jurkat	Jurkat
		IC ₅₀ µg/mL			
	RCEF				
<i>Beauveria amorpha</i>	0288	I ^e ; II ^g	I ^e ; I ^g		II ^e ; I ^g
<i>Isaria catenulata</i>	0109	18,7±0,8 ^g	I ^g		II ^e ; 17,6±1,3 ^g
	0110	-	II ^g		II ^e
	0112	II ^g	II ^g		II ^e ; I ^g
	0113	II ^e ; I ^g	II ^g		II ^e ; II ^g
	0525	6,0±0,7 ^g	8,2±0,9 ^g		II ^e ; 8,1±2,7 ^g
	0530	10,0±1,2 ^g	5,6±1,0 ^g		II ^e ; 14,0±2,4 ^g
<i>Isaria catenulata</i>	0569	II ^e ; I ^g	II ^e ; I ^g		I ^g

I: Kategorie I (IC₅₀ ≤ 25 µg/mL), II: Kategorie II (25 µg/mL ≤ IC₅₀ ≤ 50 µg/mL); Extrakte aus ^e Myzel des Pilzstamms aus der Schüttelkultur, ^g Myzel des Pilzstamms aus der Standkultur; - : keine Zytotoxizität detektierbar (IC₅₀ > 50 µg/mL).

3.1.5 Zusammenfassung und Diskussion der Screening-Ergebnisse

Das Zytotoxizitäts-Screening von 263 Extrakten aus einer Extraktbibliothek, gewonnen aus 73 Stämmen 18 entomopathogener Pilzspezies, führte zur Identifizierung von mehreren interessanten Pilzstämmen. Die 16 interessantesten Stämme wurden als Submers- und als Emerskultur kultiviert, um die Extrakte mit der höchsten zytotoxischen Aktivität zu reproduzieren.

Der dünnenschichtchromatographische Vergleich bestätigt die gelungene Reproduktion der Extrakte. Jedoch entspricht das meist vielfältige Inhaltsstoffspektrum der Myzelextrakte aus der Bibliothek, obwohl sie aus einer Schüttelkultur hervorgegangen sind, häufig besser den Standkulturextrakten. Vermutlich sind Unterschiede in den Bedingungen bei der Kultivierung für die abweichenden Inhaltsstoffe und Quantitäten zwischen den Schüttelkulturextrakten aus Bibliothek und Kultivierung verantwortlich. Hier ist der Ausschluss von Tageslicht anzuführen. Dieser könnte sich hemmend auf das Wachstum ausgewirkt und so die Bildung einiger Sekundärmetabolite verzögert haben. Ebenso könnte das Schütteln im Gegensatz zur Standkultur das Wachstum und die Synthese von Sekundärmetaboliten beeinflusst haben.

Für die Emerskultur in Fernbachkolben steht den Pilzen eine große Flüssigkeitsoberfläche zur Verfügung, so dass anfänglich ein schnelles Wachstum stattfinden konnte. Ab einem gewissen Bewuchs trat eine Unterversorgung in einigen Teilen der Myzeldecke auf, worauf das Myzel differenzierte und seine jeweiligen spezifischen Sekundärmetabolite nach Umstellung der Genexpression synthetisierte.^[112]

Da eine Suche nach neuen zytotoxischen Inhaltsstoffen in den entomopathogenen Pilzspezies besonders erfolgversprechend ist, für die keine Metabolite mit dieser Aktivität in der Literatur bekannt sind, wurden die hergestellten Extrakte von *B. amorpha*, *I. catenulata* und *I. catenulata* in den Zytotoxizitäts-Assays getestet. Alle getesteten Myzelextrakte zeigen eine zytotoxische Aktivität in mindestens einem der Assays, die jedoch meist nur moderat bis schwach ausgeprägt war. Beim Vergleich der Tabellen 8 und 9 wird deutlich, dass auch die weniger

vergleichbaren Extrakte einen zytotoxischen Effekt besitzen, jedoch meist eine niedrigere Aktivität zeigten. Die Aktivität der hergestellten Extrakte ist häufig geringer als die der Bibliotheksextrakte. Eine Ausnahme bildet die zytotoxische Aktivität der Extrakte g von *I. catenulata* RCEF 0525 und 0530 im MTT-Assay mit Jurkat-Zellen und beim Extrakt von Stamm RCEF 0525 ebenso im WST-1-Assay. Aufgrund der chromatographischen Auftrennung beider Extrakte mit identischen Zonen (s. R_f -Werte 0,05, 0,39, 0,54, 0,57, 0,65, 0,70 und 0,80 in Abbildung 9) ist von einem ähnlichen und vielfältigen Inhaltsstoffspektrum auszugehen. Da jedoch der Myzelextrakt der Standkultur g von *I. catenulata* RCEF 0525 die niedrigeren IC_{50} -Werte in zwei der drei Zytotoxizitäts-Assays aufwies, wurde dieser für eine Untersuchung auf seine aktiven Prinzipien ausgewählt.

3.2 Fraktionierung des *Isaria cateniannulata*-Extrakts

In Anlehnung an die Dünnschichtchromatographie mit Normalphase mit den Trennsystemen DC2 und DC3 wurde das Trennsystem V1 für die MPLC-Fraktionierung des Extraks g entwickelt (s. Kapitel 2.4). Der Extrakt wurde aus einem Großansatz von *I. cateniannulata* RCEF 0525 erhalten (s. Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Im Trennsystem V1 wurden die lipophilen Komponenten von DC2 und DC3 Toluol bzw. Dichlormethan durch das toxikologisch weniger bedenkliche Cyclohexan ersetzt, dessen Elutionskraft außerdem geringer ist. Dem hydrophileren Fließmittelanteil, einem Ethylacetat-Methanol-Gemisch, wurde Ammoniaklösung zugesetzt, um eine partielle Adsorption der schon dünnschichtchromatographisch detektierten Alkaloide an der stationären Phase Kieselgel 60 auszuschließen. Im Hinblick auf die Struktur der Alkaloide ist dieser Zusatz nicht nötig gewesen, da es sich bei den isolierten Verbindungen um neutrale Amide handelt (s. Kapitel 3.3). Durch die Vorfraktionierung wurden die Fraktion 1 mit den lipophileren Komponenten, die alkaloidhaltige Fraktion 2 und die Fraktion 3 mit den relativ hydrophilen Komponenten gewonnen (s. Abbildung 10 und Kapitel 2.4). Die Fraktionen 1 und 2 wurden weiter fraktioniert, um die Verbindungen mit einer zytotoxischen Aktivität zu isolieren. Für die Fraktion 3 wurde eine solche Aktivität nicht gefunden.

3.2.1 Isolierung von Lateritin, dessen Diastereomer, Beauvericin A und J

Da die Alkaloide wahrscheinlich maßgeblich zur zytotoxischen Wirkung des Extraks beitragen, wurden Beauvericin J (**1**), ein Diastereomer des Lateritin als Gemisch zweier Konformationsisomere (**2a/2b**), Lateritin (**3**) und Beauvericin A (**4**) mit Hilfe der entwickelten Trennsysteme isoliert (s. Kapitel 2.4).

Aus der Fraktion 2 der Vorfraktionierung wurden durch Umkehrphasen-MPLC die Alkaloide in der Hauptfraktion 2d angereichert. Die dünnschichtchromatographische Untersuchung dieser Fraktion ergab jedoch, dass neben den Alkaloiden andere Komponenten enthalten waren. Durch eine Gelchromatographie an Sephadex LH-20 wurden die Begleitstoffe weitgehend von den Alkaloiden abgetrennt. Durch die Verwendung von Methanol als mobile Phase verhält sich Sephadex LH-20 ähnlich einer Umkehrphase.^[113] In einer präparativen Umkehrphasen-HPLC der erhaltenen Fraktion 2d1 wurden die Alkaloide **1**, **2a/2b**, **3** und **4** gewonnen und diese zur Reinigung an einer semipräparativen Säule rechromatographiert (s. Abbildung 10).

3.2.2 Isolierung und Identifizierung weiterer Inhaltsstoffe

In Fraktion 1 aus der Vorfraktionierung wurden ebenfalls zytotoxische Substanzen erwartet. Zur Isolierung von Reinsubstanzen wurden die im Kapitel 2.4 beschriebenen Trennsysteme entwickelt. Hierzu wurden dünnschichtchromatographische Vorversuche an Kieselgel mit den Fließmitteln Aceton, Ethylacetat und Dichlormethan durchgeführt. Dichlormethan wurde als mobile Phase für die Trennung an Sephadex LH-20 ausgewählt, da sich bei ähnlich guter dünnschichtchromato-

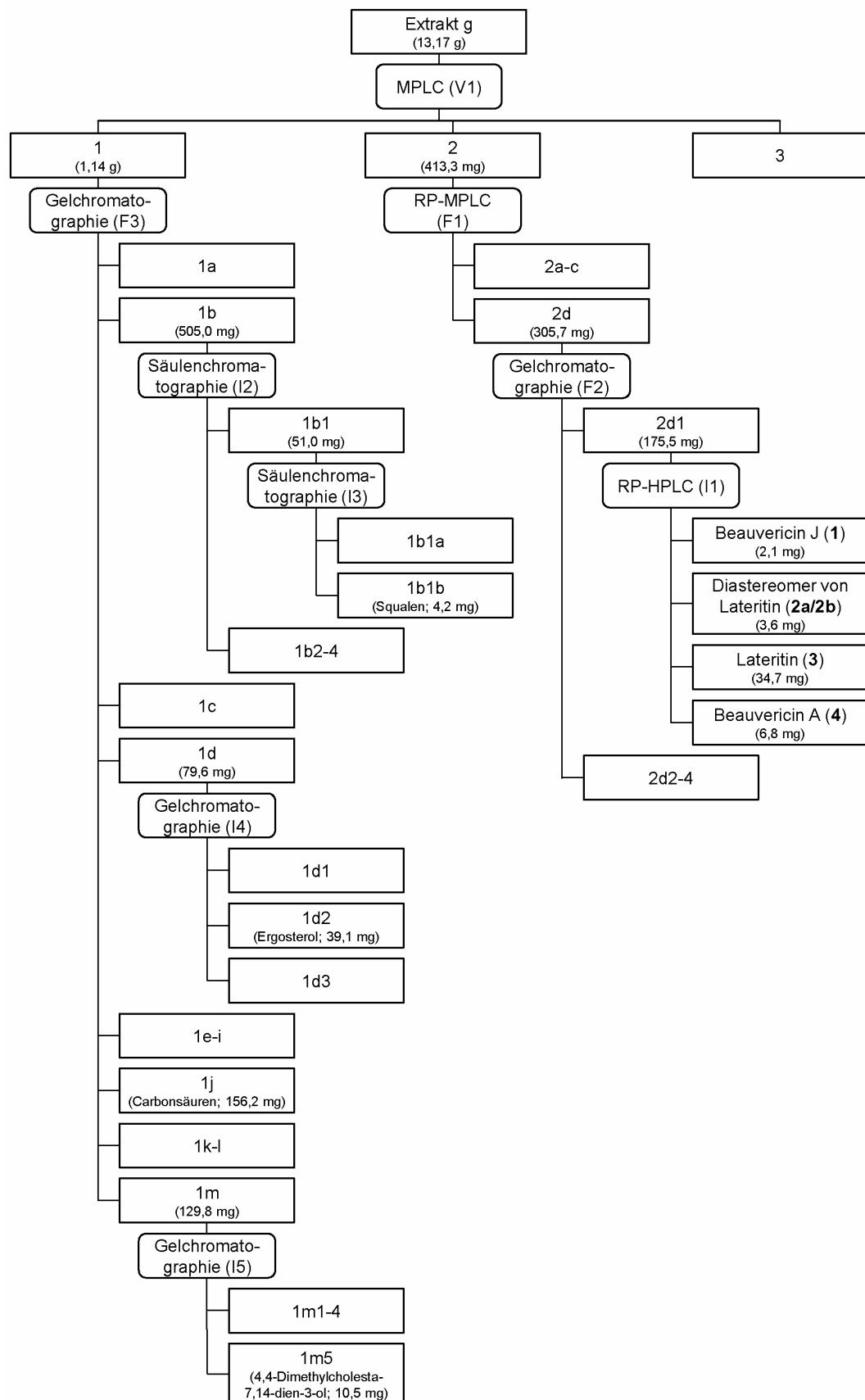


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Fraktionierung des *I. catenulata*-Extrakts und der Isolierung der Reinsubstanzen (s. Kapitel 2.4). Die angewandten Trennsysteme aus Tabelle 5 sind jeweils hinter der Chromatographiemethode in Klammern aufgeführt.

graphischer Trennung Dichlormethan neben Ethylacetat als geeignetes Lösungsmittel für Fraktion 1 erwies. Aceton als starkes Eluens wurde nach der Elution der Fraktionen 1a bis 1k zur Elution der adsorbierten Substanzen verwandt. So wurden die Fraktionen 1l und 1m gewonnen. Bei unzureichender Abtrennung der Substanzen aus benachbarten Fraktionen wurde mit dem gleichen Trennsystem rechromatographiert, da sich die Substanzverschleppung aufgrund von Überladungseffekten ergeben hatte.

Mit diesem Trennsystem wurde aus der Fraktion 1 ein Gemisch aus fünf Carbonsäuren (1j) erhalten. Durch EI-MS wurden mit Hilfe eines Datenbankenvergleichs^[114,115] die Hauptkomponenten Linolsäure und Palmitinsäure sowie als Nebenkomponenten Pentadecansäure, Ölsäure und Stearinsäure identifiziert. Hierbei konnte die Stereochemie mit Hilfe der Massenspektrometrie nicht geklärt werden, so dass es sich bei den ungesättigten Verbindungen auch um die *E*-Stereoisomere handeln könnte. Diese sind in entomopathogenen Pilze allerdings bisher nicht gefunden worden, weshalb es wahrscheinlich ist, dass es sich um die *Z*-Stereoisomere handelt.

Aus der Fraktion 1b wurde durch Chromatographie an Normalphase mit den Trennsystemen I2 und I3 die Fraktion 1b1b erhalten. Durch den Vergleich des EI-MS-Spektrums mit Referenzspektren aus Datenbanken wurde die Substanz als Squalen identifiziert.^[114,115] Die Fraktion 1d wurde durch Gelchromatographie an Sephadex LH-20 mit dem Trennsystem I4 in drei Fraktionen aufgetrennt. Aufgrund des EI-MS-Spektrums und des Ergebnisses der hochauflösenden EI-MS (m/z 396,3392, berechnet für $C_{28}H_{44}O$ 396,3392) wurde die Fraktion 1d2 als Ergosterol erkannt.^[113,115] Die gelchromatographische Trennung von Fraktion 1m mit dem Trennsystem I5 führte zu fünf Fraktionen. In Fraktion 1m5 wurde anhand des EI-MS-Spektrums 4,4-Dimethylcholesta-7,14-dien-3-ol als Hauptkomponente nachgewiesen.^[116]

Bei den langkettigen, teilweise ungesättigten Carbonsäuren, Squalen und Ergosterol handelt es sich um ubiquitär in Pilzen vorkommende Substanzen. Wobei Squalen die Vorläufersubstanz aller Steroide ist, aus der über die Zwischenstufe Lanosterol auch Ergosterol als das Hauptsteroid der Pilze hervorgeht. Das ebenfalls aus Lanosterol entstehende 4,4-Dimethyl-5 α -cholesta-7,14-dien-3 β -ol ist jedoch nur als Intermediat aus der Cholesterolsynthese bei Tieren bekannt. Möglicherweise ist es auch hier eine Vorstufe von Cholesterin, welches ebenfalls in Pilzen gefunden wurde. Eine Erklärung für die Akkumulation dieser Substanz könnte sein, dass sie Intermediat eines wenig favorisierten Metabolisierungswegs mit geringem Turnover ist oder das Endprodukt einer metabolischen Sackgasse bildet. Ein Indiz für die zuletzt genannten These könnte das bei Hefen fehlende Enzym für die Demethylierung an C-4 sein, wenn in Position 7 eine Doppelbindung vorhanden ist.^[117,118]

Die isolierten Carbonsäuren und Ergosterol sind als Bestandteile von Biomembranen bekannt. Squalen und 4,4-Dimethylcholesta-7,14-dien-3-ol sind Vorläufersubstanz bzw. Intermediat der Steroidsynthese. Aus diesen Gründen wurde bei diesen Substanzen von einer Testung auf Zytotoxizität abgesehen und somit konnte aus Fraktion 1 keine zytotoxische Substanz isoliert werden. Für die isolierten Verbindungen aus Fraktion 2 hingegen folgten nun die physikochemische Charakterisierung, die Strukturaufklärung und die Zytotoxizitätstests.

3.3 Charakterisierung und Strukturaufklärung

Zur Charakterisierung der isolierten Verbindungen **1** bis **4** wurden verschiedene physikochemische Parameter erfasst. Diese Daten, jedoch vor allem die Daten aus MS und NMR, wurden zur Strukturaufklärung genutzt, welche im folgenden Kapitel dargestellt ist. Die Strukturformeln von Beauvericin J (**1**) und A (**4**), Lateritin (**3**) und ein zugehöriges Diastereomer als Konformerengemisch (**2a/2b**) sind in Abbildung 24 zusammengefasst.

3.3.1 Spektroskopische und spektrometrische Daten

Die isolierten Verbindungen Beauvericin A (**4**) und J (**1**) sowie Lateritin (**3**) und dessen Diastereomer (**2a/2b**) sind farblos und absorbieren Licht nur im ultravioletten Bereich (λ_{\max} bei 205 nm und lokale Maxima zwischen 240 und 280 nm). Dies lässt auf das Vorhandensein relativ kleiner Chromophore, wie die in den Strukturen vorhandenen Phenyl- und Carbonylgruppen, schließen. Hierbei verursachen sowohl die Amid- und Esterbindung als auch die Phenylgruppe die starke Absorption bei 205 nm, wie in Tabelle 10 ersichtlich ist. Die feinstrukturierte, schwache Bande zwischen 240 und 280 nm gibt weitere Elektronenübergänge in der Phenylgruppe wieder (aromatische Nebenbande).

Tabelle 10. Absorptionsmaxima und Logarithmen der molaren Absorptionskoeffizienten ϵ der Verbindungen gelöst in Acetonitril (5, 10, 15, 20 und 25 mg/L).

Verbindung	λ_{\max} (log ϵ)		
	nm		
Beauvericin J (1)	205 (4,45)	248 (3,30)	254 (3,24)
Diastereomer von Lateritin (2a/2b)	205 (3,97)	248 (2,77)	254 (2,71)
Lateritin (3)	205 (4,07)	249 (2,59)	258 (2,42)
Beauvericin A (4)	205 (4,57)	249 (3,09)	258 (2,94)

Die hochauflösende Massenspektrometrie (HR EI-MS) ergab für Lateritin (**3**) und für dessen Diastereomer (**2a/2b**) das Masse-Ladungs-Verhältnis m/z 261,1365 bzw. 261,1362. Dies entspricht dem Molekülion $[M]^+$ mit der Summenformel $C_{15}H_{19}NO_3$ (m/z berechnet 261,1365). Die ungeradzahlige relative Molekülmasse 261 lässt auf eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül schließen.

Auch die massenspektrometrischen Fragmentierungen bei der EI-MS geben Aufschluss über die Strukturen, die in den Molekülen enthalten sind. Für die Verbindungen **2a/2b** und **3** sind die folgenden m/z und relativen Intensitäten in % für die Molekülionen und Fragmente bestimmt worden: (**2a/2b**) 261 $[M]^+$ (21), 170 (26), 142 (35), 91 (100), 42 (93) und (**3**) 261 $[M]^+$ (47), 243 (12), 228 (21), 170 (38), 142 (42), 133 (11), 131 (17), 116 (15), 92 (12), 91 (100), 69 (19), 42 (64), 41 (14). Ein Schlüsselfragment stellt das Tropyliumion mit m/z 91 dar. Es steht für eine Benzylgruppe im Molekül, die durch eine Tropyliumspaltung abgetrennt wurde. Ebenso ist das

Kation mit der Massendifferenz von der Abspaltung des Benzylradikals bei m/z 170 sichtbar. Aus einer Alkylspaltung geht das Kation $[\text{CH}_3\text{--CH}=\text{CH}_2]^+$ mit m/z 42 hervor und deutet auf eine Isopropylgruppe im Molekül hin. Des Weiteren ist die Abspaltung von H_2O aus dem Molekülion mit dem Massenverlust von 18 unter anderem für Ketone typisch, genauso die Abspaltung von CO. Die Letztere ist die Folgespaltung der Tropyliumspaltung aus dem Fragment mit m/z 170 mit der Massendifferenz 28.

Für die Beauvericine **1** und **4** war die Ermittlung der hochaufgelösten Masse-Ladungs-Verhältnisse der Molekülionen (HR FAB-MS) aufgrund von Fragmentierungsreaktionen nicht erfolgreich. Mit Hilfe der ESI-MS wurden m/z 800 $[\text{M}+\text{H}]^+$ für Beauvericin J (**1**) und 798 $[\text{M}+\text{H}]^+$ für Beauvericin A (**4**) bestimmt. Im Fragmentierungsspektrum (ESI-MS/MS) treten für **1** die folgenden Signale und relativen Intensitäten in % zwischen m/z 850 und 100 auf: m/z 800 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (27), 782 (23), 742 (27), 539 (6), 523 (21), 521 (17), 481 (7), 360 (6), 278 (18), 262 (83), 260 (41), 244 (100), 220 (8), 202 (14). Auch hier liegt eine ungerade Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül vor, da es eine ungeradzahlige relative Molekülmasse von 799 aufweist. An den Fragmenten m/z 539 und 278 ist der Verlust von m/z 261 und 2x 261 aus dem Molekülion nachvollziehbar. Im Molekül sind demnach zwei Gruppen mit der relativen Molekülmasse von Verbindung **2a/2b** bzw. **3** enthalten (s. auch m/z 262) und eine weitere Gruppe die eine um 16 (278 – 262) höhere Masse hat. Das bestätigen die Fragmente mit m/z 523 (800 – 277) und 278 (800 – 2x 261). Dies deutet auf ein zusätzliches Sauerstoffatom in Form einer Hydroxygruppe im massereicheren Fragment hin. Des Weiteren tritt häufig die Differenz m/z 18 auf, welche für die Abspaltung von H_2O etwa aus Ketonen oder Alkoholen steht. Beispiele hierfür sind m/z 262 – 244 und 278 – 260.

Für **4** ergeben sich im Fragmentierungsspektrum die folgenden Signale mit den relativen Intensitäten in %: m/z 798 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (30), 637 (10), 537 (10), 523 (6), 441 (4), 376 (5), 276 (46), 262 (79), 258 (56), 244 (100). Aufgrund der ungeradzahligen relativen Molekülmasse 797 kann man von einer ungeraden Anzahl an Stickstoffatomen im Molekül ausgehen. Wie beim Beauvericin J (**1**) werden hier Fragmente m/z 261 und 2x 261 aus dem Molekülion abgespalten und es entstehen solche mit m/z 537 und 276. Ebenso entstehen die Fragmente mit m/z 523 und 262, bei denen die Massendifferenzen 275 und 275 + 261 zum Molekülion zu beobachten sind. Die Abspaltung von H_2O mit der Differenz von 18 wird bei den Signalen mit m/z 276 – 258 bzw. 262 – 244 deutlich. Die Ergebnisse für **4** lassen sich als Molekül mit zwei Gruppen der Masse 261 und einer Gruppe mit 275 zusammenfassen. Die Differenz zwischen den verschiedenen Strukturelementen von 14 könnte eine zusätzliche Methylengruppe im massereicheren Fragment der Verbindung verursachen.

Die ein- und zweidimensionalen NMR-Experimente trugen grundlegend zur Strukturaufklärung der Verbindungen **1** bis **4** bei. Die ^1H -Spektren der Verbindungen weisen ähnliche Verschiebungen auf, so dass es sich, wie aufgrund der MS-Ergebnisse vermutet, um strukturell ähnliche Verbindungen handelt. So konnte als Hauptalkaloid das bereits aus *I. japonica* und *G. baccata* bekannte Lateritin (**3**), welches in den Abbildungen 11 und 13 dargestellt ist, identifiziert werden.^[60,62] Die NMR-Daten wurden in verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen und sind in den Tabellen 11, 12 und 14 zusammengestellt. Im Folgenden wurden zur Strukturaufklärung die Daten in Tabelle 11 herangezogen.

Lateritin (**3**)

Im ^1H -NMR-Spektrum von Verbindung **3** wurden die Signale für 19 nicht austauschbare Protonen bestimmt. Die Anzahl entspricht somit denen der Wasserstoffatome im Molekül, die mittels HR EI-MS ermittelt wurden. Die Auswertung der ^{13}C -NMR-, HSQC- und HMBC-Spektren bestätigt die Existenz von 15 Kohlenstoffatomen. Deren Zuordnung ergab zunächst drei Methylgruppen, eine Methylengruppe mit magnetisch nicht äquivalenten Protonen, drei Methingruppen, einen unsubstituierten Phenylrest und zwei Carbonylgruppen.

Vor allem auf Basis der zweidimensionalen Techniken COSY, HMBC und NOESY wurde die Struktur von Verbindung **3** erstellt. Deshalb sind die mit diesen Experimenten ermittelten Signale in den Abbildungen 12 und 14 zum besseren Verständnis an der Strukturformel dargestellt.

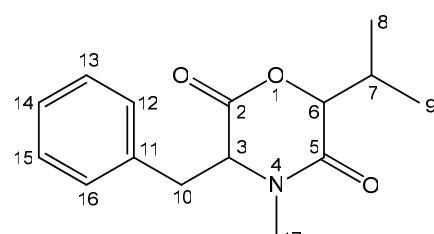


Abbildung 11. Struktur von 3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dion (Verbindungen **2a/2b** und **3**) mit den Positionen der Kohlenstoffatome, ohne Angabe der Stereochemie.^[60]

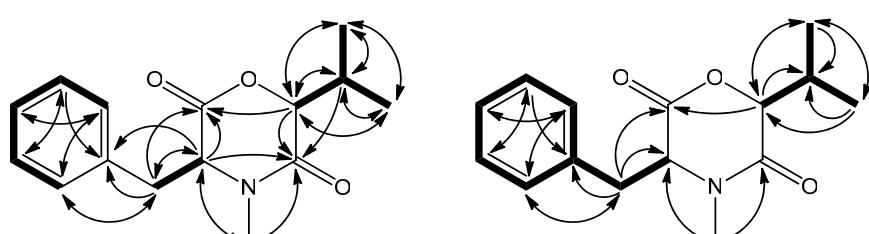


Abbildung 12. Darstellung der COSY- (—) und HMBC-Signale (↔) für Lateritin (**3**), links gemessen in Methanol-d₄ und rechts gemessen in Chloroform-d₁.

Tabelle 11. NMR-Daten von Lateritin (**3**) gelöst in Methanol-d₄, ¹H gemessen bei 600 MHz, ¹³C bei 150 MHz, 300 K. Die jeweils korrelierenden Kohlenstoffkerne sind in der Spalte für HMBC- und die korrelierenden Protonen in den Spalten für COSY- und NOESY-Spektrum angegeben.

Pos.	δ_c Multiplizität ppm	δ_h Multiplizität (J) ppm; (Hz)	HMBC		COSY	NOESY
2	170,9; qC					
3	57,8; CH	5,78; dd (4,6; 12,7)	2, 5, 10, 11, 17	10a, 10b	10a, 10b, 12, 16	
5	173,1; qC					
6	77,2; CH	4,84; d (9,0)	2, 5, 7, 8, 9	7	7, 8, 9, 17	
7	31,2; CH	1,80; m	5, 6, 8, 9	6, 8, 9	6, 8, 9	
8	19,1; CH ₃	0,84; d (6,6)	6, 7, 9	7	6, 7, 9, 12, 13, 15, 16	
9	17,2; CH ₃	0,26; d (6,9)	6, 7, 8	7	6, 7, 8, 10b, 12, 13, 15, 16, 17	
10a	35,4; CH ₂	3,38; dd (14,7; 4,6)	2, 3, 11, 12, 16	3, 10b	3, 10b, 12, 13, 15, 16	
10b		3,03; dd (14,7; 12,7)		3, 10a	3, 9, 10a, 12, 13, 15, 16, 17	
11	138,0; qC					
12, 16	129,8; CH	7,24; m*	10, 12, 14, 16	13, 14, 15	3, 8, 9, 10a, 10b, 14, 17	
13, 15	129,7; CH	7,25; m*	11, 13, 15	12, 14, 16	8, 9, 10a, 10b, 14, 17	
14	128,0; CH	7,18; m	12, 16	12, 13, 15, 16	12, 13, 15, 16	
17	32,3; N-CH ₃	3,13; s	3, 5	-	6, 9, 10b, 12, 13, 15, 16	

qC: quartärer Kohlenstoff; s: Singulett; d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; m: Multiplett; * : Signalüberlagerung; graue Schrift bei NOESY: Signale geringer Intensität.

Die Methylgruppen C-8 und C-9 im hohen Feld wurden mit Hilfe von COSY- und HMBC-Spektren der Methingruppe C-7 (Isopropylrest C-7, -8 und -9) und diese als Nachbar von C-6 zugeordnet. Die Methylgruppen des Isopropylrests weisen unterschiedliche Verschiebungen auf. Sie sind diastereotop, somit ist das Molekül chiral. Durch die Kopplungen mit den Protonen in den Positionen H-6, H-8 und H-9 bildet sich für den Wasserstoffkern an C-7 ein Multiplett. Der Torsionswinkel zwischen den beiden vicinalen Protonen in Position 6 und 7 kann jedoch anhand der Kopplungskonstante des Protons in Position 6 bestimmt werden. Mit $^3J = 9,0$ Hz stehen die Protonen an C-6 und C-7 nach der Karplus-Beziehung in einem Diederwinkel von ca. 150°. Die geringe chemische Verschiebung von 0,26 ppm im Gegensatz zu ca. 0,9 ppm für aliphatische Methylgruppen lässt auf die Lage der Methylgruppe C-9 im Abschirmungskegel der Carbonylgruppe in Position 5 schließen.

Ein weiteres Methyldoppelpeak (H-17, 3H) erscheint im ^1H -NMR-Spektrum als Singulett. Es wurde neben der Verschiebung ins tiefe Feld über die HMBC-Kreuzsignale dem Stickstoffatom in Position 4 zugeordnet.

Der Phenylrest wurde über die HMBC-Daten der Methylengruppe C-10 zugeordnet. Dies weist auf das Vorliegen einer Benzylfunktion hin, die schon im EI-MS als Tropyliumion das Signal mit m/z 91 ergab. In Übereinstimmung mit dem COSY-Spektrum wurde weiterhin die Bindung zwischen C-10 und C-3 bestimmt. Die Kopplungskonstanten der Protonen in den Positionen 10 und 3 bestätigen die Nachbarschaft von C-3 und C-10. Ebenfalls charakterisiert das ABX-Spinsystem die diastereotopen Protonen 10a und 10b an C-10 als geminal koppelnde Wasserstoffkerne ($^2J = 14,7$ Hz), die jeweils vicinale Kopplungskonstanten zum Proton an Position 3 zeigen. Für Proton 10a ergibt sich nach der Kopplungskonstante $^3J = 4,6$ Hz mittels Karplus-Beziehung ein Diederwinkel von ca. 60° zum Proton an Position 3, für Proton 10b mit 12,7 Hz ein Torsionswinkel von ca. 180° . Ausgehend von den Methinprotonen in Position 6 und 3, deren Signale durch die Nachbarschaft zu den Heteroatomen ins tiefe Feld verschoben sind, wurden HMBC-Signale zu den Carbonylkohlenstoffen C-2 und C-5 gefunden. Da ebenso HMBC-Signale von den Protonen in Position 7 zu C-5, 10 zu C-2 und C-3 sowie von 17 zu C-3 und C-5 vorhanden sind, wurde ein Morphin-2,5-dion als Grundstruktur formuliert. Insgesamt handelt es sich bei Verbindung **3** um ein Cyclodepsipeptid bestehend aus je einem Molekül Hydroxyisovaleriansäure und N-Methylphenylalanin.

Die in deuteriertem Chloroform aufgenommenen NMR-Daten wurden mit den Daten für Lateritin bei Oh *et al.* und Beauvericin (s. Abbildung 2) in Tabelle 12 verglichen. Die ^{13}C -NMR-Signale von Lateritin und Beauvericin entsprechen den Signalen von Verbindung **3** mit einer geringen Abweichung von etwa 0,2 ppm.^[62] Besonders die Verschiebungen für C-2, C-3, C-5 und C-6 bestätigen das Vorliegen einer Amid- und einer Esterbindung im Molekül. Ebenso sind die Verschiebungen der Protonen bei Lateritin vergleichbar mit Abweichungen von höchstens 0,02 ppm, wobei durch die Aufnahme des ^1H -Spektrums von Substanz **3** bei 600 MHz und die HSQC- und HMBC-Daten eine Zuordnung der Protonensignale in den Positionen 12, 16 und 13, 15 möglich war. Bei Beauvericin weichen die ^1H -NMR-Daten hingegen teilweise von den Werten für Verbindung **3** ab. Der weitere Vergleich der Daten mit denen bei Hasumi *et al.* und Pettit *et al.* bestätigten die Identität von Verbindung **3** als Lateritin.^[60,119] Somit handelt es sich bei Verbindung **3** um das in Abbildung 13 dargestellte (*3R,6R*)-3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dion (IUPAC).

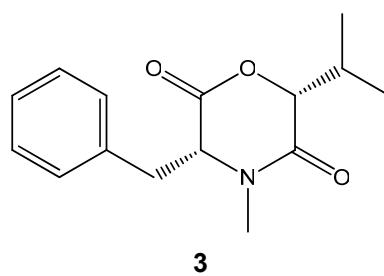


Abbildung 13. Struktur von Lateritin (**3**), (*3R,6R*)-3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dion.^[62]

Tabelle 12. ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Lateritin (**3**) gelöst in Chloroform-d₁, ^1H gemessen bei 600 MHz, ^{13}C bei 150 MHz, 298 K. Zum Vergleich die Literaturwerte für Lateritin^[62] und für Beauvericin^[41,43], beide gelöst in Chloroform-d₁. Die Korrelationen, die im COSY-Spektrum auftreten, sind in Abbildung 12 dargestellt.

Pos.	δ_c Multiplizität ppm	δ_h Multiplizität (J) ppm; (Hz)	HMBC	Lateritin ^[62]		Beauvericin ^[41,43]	
				δ_c	δ_h	δ_c	δ_h
				ppm	ppm	ppm	ppm
2	170,0; qC			170,2		169,9°	
3	57,3; CH	5,46 br; m	-	57,6	5,47	57,3	5,60
5	169,4; qC			169,5		169,3°	
6	75,5; CH	4,92; d (8,2)	2, 7, 8	75,7	4,92	75,4	4,87
7	29,7; CH	2,00 br; m	-	29,9	2,02	29,7	1,95
8	18,3; CH ₃	0,79; d (6,6)	6, 7, 9	18,5	0,80	18,3	0,8
9	17,5; CH ₃	0,43 br; d (6,1)	6, 7, 8	17,8	0,42	17,5	0,4
10a	34,7; CH ₂	3,37; dd (14,2; 4,3); 2,96, dd (14,2; 12,1)	2, 3, 11, 12, 16	35,0	3,36;	34,7	3,39;
10b					2,98		3,02
11	136,6; qC			136,9		136,6	
12, 16	128,8; CH	7,22; m	10, 12, 14, 16	129,1	7,23- 7,26	128,9°	7,25
13, 15	128,6; CH	7,26; m	11, 13, 15	128,8	7,23- 7,26	128,5°	7,25
14	126,8; CH	7,17; m	12, 16	127,0	7,17	126,7°	7,25
17	32,3; N-CH ₃	2,99; s	3, 5	32,6	3,00	32,4	3,04

qC: quartärer Kohlenstoff; s: Singulett; d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; m: Multiplett; ° : Signale möglicherweise vertauscht.

Die in der Literatur angegebenen NMR-Daten von Bassiatin, dem (3S,6R)-Stereoisomer von Lateritin, sind stark verschieden von denen von Lateritin (**3**). Die chemischen Verschiebungen von C-3 und C-6 in Bassiatin sind in der Literatur beispielsweise mit 62,8 und 81,3 ppm angegeben. Weitere Unterschiede sind das fehlende HMBC-Signal vom Proton in Position 6 und C-2 und das Triplet des Protons in Position 3.^[61] Aufgrund dieser Befunde und der Ergebnisse von Oh *et al.* mit dem Hydrolyseprodukt von Lateritin sind diese NMR-Daten für Bassiatin stattdessen dem N-Hydroxyisovaleryl-N-methylphenylalanin zuzuordnen, bei dem keine Esterbindung vorliegt.^[62] Ähnliche, auf ringoffene Strukturen hinweisende Werte sind für die synthetisch hergestellten 3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dione bei Kagamizono *et al.*^[61] sowie Huges und Sleebs^[120] zu finden. Zu einer mit Lateritin identischen relativen Molekülmasse führte wahrscheinlich eine weitgehende Dehydratisierung von Bassiatin während der Verdampfung bei der EI-MS. Bei Oh *et al.*^[62] wurde die $m/z = 278$ [M-H]⁻ mit Hilfe der milden Methode ESI-MS im negativen Modus gefunden.

Interessanterweise konnte von Kagamizono *et al.*^[61] mit einer röntgenkristallographischen Analyse die Morpholindionstruktur gefunden werden. Ob diese Esterbindung im Lösungsmittelgemisch Hexan-Ethylacetat gebildet wird, ist fraglich, da die Veresterung eher durch starke Säuren und reversibel katalysiert wird. Hier könnten ebenso andere Ester entstehen, so auch Ethylester und

Acetate. Die Kristallbildung aus eventuell entstandenen Morpholindionen wäre demnach nur möglich, wenn diese Substanz im Lösungsmittel die geringste Löslichkeit besitzt. Es könnte auch eine Verunreinigung der Probe mit einer Base zur irreversiblen Esterspaltung vor der NMR geführt haben. Dies ist jedoch wenig wahrscheinlich, wenn man den folgenden Vergleich anstellt: Die NMR-Werte für sämtliche ringoffene Amide bei Huges und Sleebs^[120] sind nahezu identisch mit denen der synthetisierten Morpholindione.

Da die NMR-Werte von Bassiatin auf eine ringoffene Struktur hindeuten, wurden sie für einen weiteren Vergleich mit den Morpholindionen **2a/2b** und **3** nicht berücksichtigt. Die Verbindungen Lateritin und dessen Stereoisomere wurden bislang nicht synthetisiert, wobei die beiden Diastereomere von Lateritin für einen Vergleich mit den Verbindungen **2a** und **2b** von Bedeutung sind.

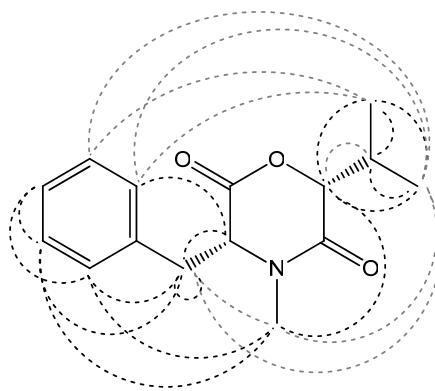


Abbildung 14. Darstellung der NOESY-Signale (normaler bis starker Intensität ⚡⚡⚡ und geringer Intensität ⚡⚡) für Lateritin (**3**), gemessen in Methanol-d₄ (s. Tabelle 11).

Zur Aufklärung der absoluten Stereochemie sollte eine Röntgenstrukturanalyse durchgeführt werden, jedoch blieben die Kristallisationsversuche von Lateritin (**3**) in unterschiedlichen Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen bei verschiedenen Temperaturen erfolglos. So konnten in Methanol-Wasser-Gemischen nur dünne, ineinander gewachsene Nadeln erzeugt werden, die beim Vereinzeln zerbrachen. Es konnte kein Kristall mit den erforderlichen Maßen erhalten werden. Methanol, Aceton, Ethylacetat und Dichlormethan erwiesen sich als gute Lösungsmittel und waren somit für eine Kristallisation von Verbindung **3** ungeeignet.

Um trotzdem Aussagen zur Stereochemie von Substanz **3** machen zu können, wurden mit Hilfe des Programms Chem3D Pro 12.0 energieminierte, dreidimensionale Strukturmodelle von (3*R*,6*R*)-3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dion erzeugt. Die Konformation des Morphinol rings ist in den gefundenen Energieminima nahezu eine Wannenform, wobei die Ester- und die Amidbindung etwa in einer Ebene liegen. Dabei stehen der Benzyl- und der Isopropylrest beinahe axial am jeweiligen Ende der Wannenform, wie in Abbildung 15 dargestellt ist. Der Benzylrest und die am Morphinolring benachbarte Methylgruppe am Stickstoff sind raumerfüllende Substituenten. Durch das freie Elektronenpaar am Stickstoff ist die Methylgruppe sehr beweglich und es kann leicht zum Positionswechsel mit dem freien Elektronenpaar kommen (Schirmeffekt).

Die Benzylgruppe kann durch die nahezu axiale Stellung der beweglichen Methylgruppe und der Carbonylgruppe ausweichen. Die Wannenform als energetisch günstige Konformation für das Morpholindion scheint ebenso durch die axiale Isopropylgruppe, die ihrerseits der benachbarten Carbonylgruppe ausweicht, festgelegt zu sein.

Zusätzlich wurden die geringsten Abstände in dieser dreidimensionalen Struktur zwischen den Wasserstoffatomen ermittelt, bei denen wichtige NOESY-Signale (s. Tabelle 11) auftreten. Der Kern-Overhauser-Effekt zwischen den Protonen ist meist bei Abständen unter 5 Å besser unter 3 Å zu beobachten und gibt damit Aufschluss über die Stereochemie.^[121] Für die Wasserstoffatome in Position 3 und 10a, 10b bzw. 16 ergeben sich die Abstände 2,5, 3,1 bzw. 2,8 Å aus der Strukturformel, zwischen Position 9 und 10b bzw. 12 sind sie 3,5 und 3,0 Å. Sowohl die NOESY-Signale zwischen den Methylprotonen in Position 8 sowie 9 und den Protonen der Benzylgruppe als auch die ermittelten Abstände unter 5 Å lassen auf die relative Stereochemie schließen, bei der diese Gruppen wie im Modell auf der gleichen Seite des Morphinrings gebunden sind. Die NOESY-Kreuzsignale bestätigen auch im Fall der Protonen in Position 17 die erstellte Struktur durch die folgenden Abstände unter 5 Å zu den Wasserstoffkernen in Position 6, 9, 10b, 12, 13, 15 und 16: 4,7, 3,7, 3,8, 3,0, 4,0, 4,0 und 3,1 Å. Obwohl für die Protonen in Position 3 und 17 sowie in 7 und 10 die Abstände 2,3 und 2,0 Å gefunden wurden, sind keine NOESY-Signale vorhanden. Das Fehlen eines Kreuzsignals kann jedoch an einem Ausgleich positiver und negativer NOE liegen.

Die Daten aus dem dreidimensionalen Modell und der Vergleich mit den NOESY-Signalen deuten darauf hin, dass Lateritin in dieser Raumstruktur vorliegt. Somit konnten die Konformation des Rings und die relative Stereochemie bestätigt werden. Die absolute Stereochemie konnte auf diese Weise nicht ermittelt werden, da beim Enantiomer von Lateritin (**3**) eine energieminierte dreidimensionale Struktur mit ähnlichen Abständen der entsprechenden Wasserstoffatome resultiert.

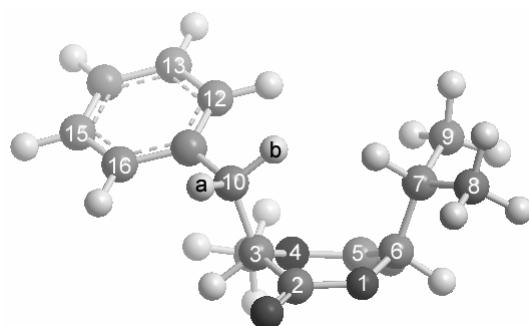


Abbildung 15. Perspektivische Darstellung der energieminierten dreidimensionalen Struktur von Lateritin (**3**).

Diastereomer von Lateritin (**2a/2b**)

Bei den Verbindungen **2a/2b** handelt es sich um ein Diastereomer von Lateritin, dessen mögliche Strukturen in Abbildung 16 dargestellt sind. Es wurde als Substanzgemisch zweier Konformationsisomere per Umkehrphasen-HPLC von Lateritin (**3**) getrennt (s. Kapitel 2.4.3).

Zur Strukturaufklärung wurden die in Tabelle 13 aufgelisteten NMR-Daten verwandt. Mit Hilfe der zweidimensionalen Methoden HSQC, HMBC, COSY und NOESY erhält man zwei unabhängige Sets von Signalen. Bei Integration der jeweiligen ^1H -Signale weisen sie die gleichen Flächeninhalte auf. Die Daten lassen auf zwei Verbindungen schließen, die die gleiche planare Strukturformel wie Lateritin besitzen und zudem in gleicher Menge im Gemisch vorliegen. Da auch die identische Summenformel wie für Verbindung **3** mittels MS bestimmt wurde, wurden die ^1H -NMR-Werte von Lateritin (**3**) in Tabelle 14 zum Vergleich herangezogen. Dabei ergeben sich für die Protonen in Position 8, 10a und im Phenylrest der Verbindung **2a** ähnliche Verschiebungen wie für Lateritin. Die Verschiebungen der Protonen in Position 9, 10b und 17 von Substanz **2b** entsprechen ebenfalls den Werten für Lateritin. In beiden Fällen abweichende Werte ergeben sich hingegen für die Wasserstoffkerne in den Positionen 3, 6 und 7. Für den Vergleich der ^1H -NMR-Daten mit den Literaturwerten für Lateritin wurde ein Spektrum des Substanzgemischs in Chloroform-d₁ (400 MHz, 300 K) aufgenommen. Für Verbindung **2a** ergeben sich beispielsweise für die Protonen in den Positionen 8, 9 und 17 die chemischen Verschiebungen 0,79, 0,29 und 3,16 ppm, für Substanz **2a** hingegen 0,89, 0,45 und 2,97 ppm. Der Vergleich mit den Verschiebungen 0,80, 0,42 und 3,00 ppm bei Oh *et al.* ergibt keine Übereinstimmung mit einer der Substanzen.^[62] Mit diesen beiden Vergleichen und aufgrund der physikochemischen Eigenschaften ist bewiesen, dass es sich weder bei Substanz **2a** noch bei Substanz **2b** um Lateritin (**3**) handelt.

Weitere Unterschiede zwischen den Verbindungen **2a/2b** und **3** treten in den zweidimensionalen Spektren auf. Für die Aufklärung der relativen Stereochemie dieser Morpholindione ist der Vergleich der NOESY-Kreuzsignale in den Tabellen 13 und 14 von Bedeutung. So fehlt das Signal zwischen den Protonen der Methylgruppe in Position 9 und den Benzylprotonen 10b und 12, 16. Dieses Signal ist bei Verbindung **3** ein Beweis der relativen Stereochemie mit Benzyl- und Isopropylgruppe auf derselben Seite des Morpholinrings (s. oben). Das Fehlen bekräftigt also die Stereochemie mit entgegengesetzt stehenden Substituenten am Morpholinring für die Verbindungen **2a** und **2b**. Da keine Literatur über die Diastereomere von Lateritin zum Vergleich der Daten bekannt ist, blieb die absolute Stereochemie der Konformationsisomere **2a** und **2b** ungeklärt.

Der Grund für die Verschiebungsunterschiede der beiden Verbindungen für alle Protonen und Kohlenstoffkerne muss in unterschiedlichen räumlichen Strukturen gesucht werden. So ist es wahrscheinlich, dass zwei energetisch begünstigte Konformationen des Morpholinrings nebeneinander vorliegen, beispielsweise Wannen- und Sesselform (s. Abbildung 19). Bei diesen Konformationen könnten Benzyl- und Isopropylgruppe den Carbonylsauerstoffen und der Methylgruppe am Stickstoff ausweichen, indem die Benzylgruppe oder beide eine axiale Stellung einnehmen. Die Amid- und die Esterbindung blieben so parallel zueinander wie es auch beim dreidimensionalen Modell von Lateritin in Abbildung 15 zu sehen ist.

Bei einer NMR-Messreihe unter Temperaturänderung von 283 bis 323 K konnte keine Koaleszenz der Signale für die Verbindungen **2a** und **2b** festgestellt werden, somit ist wahrscheinlich eine hohe Aktivierungsenergie zur Überführung von einem in das andere Konformationsisomer nötig.

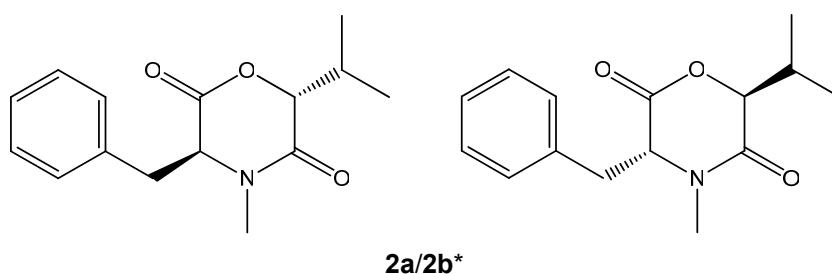


Abbildung 16. Strukturen der Diastereomere von Lateritin links (*3S,6R*)-3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dion und rechts (*3R,6S*)-3-Benzyl-6-isopropyl-4-methylmorpholin-2,5-dion *als mögliche Strukturen für das Diastereomer **2a/2b**.

Tabelle 13. NMR-Daten des Diastereomers von Lateritin (Konformationsisomere **2a** und **2b**) gelöst in Aceton-d₆, ¹H gemessen bei 600 MHz, ¹³C bei 150 MHz, 298 K.

Pos.	2a		2b		HMBC	COSY	NOESY
	δ_c	δ_h	δ_c	δ_h			
	Multiplizität	(J)	Multiplizität	(J)			
	ppm	ppm; (Hz)	ppm	ppm; (Hz)			ROESY
2	170,5; qC		170,6; qC				
3	57,3; CH	5,58; dd (4,3; 11,5)	57,7; CH	5,52; dd (4,4; 11,1)		10a, 10b	10a, 10b, 13, 15, 17
5	170,7; qC		169,7; qC				
6	75,1; CH	5,10; d (9,1)	75,2; CH	5,18; d (8,8)	2, 7, 8, 9	7	7, 8, 9, 17
7	30,5; CH	1,92; m	30,6; CH	2,06; m	6	6, 8, 9	6, 8, 9
8	18,4; CH ₃	0,78; d (6,8)	18,5; CH ₃	0,82; d (6,6)	6, 7, 9	7	6, 7, 9
9	17,4; CH ₃	0,36; d (6,8)	17,9; CH ₃	0,45; d (6,7)	6, 7, 8	7	6, 7, 8, 17
10a	35,4; CH ₂	3,30; dd (14,1; 4,3)	34,8; CH ₂	3,27; dd (14,8; 4,4)	11, 12, 16	12, 16	12, 16, 17
10b		3,11; dd (14,1; 11,5)		3,09; dd (14,8; 11,1)	3, 11, 12, 16	3, 10a	3, 10a, 12, 16
11	138,0; qC		138,5; qC				
12, 16	129,8; CH	7,30; m*	130,2; CH	7,36; m*	12, 14, 16	10a, 13, 15	10a, 10b, 13 - 15, 17
13, 15	129,22; CH	7,26; m*	129,19; CH	7,28; m*	11, 13, 15	12, 14, 16	3, 12, 14, 16
14	127,5; CH	7,18; m*	127,3; CH	7,22; m*	12, 16	13, 15	12, 13, 15, 16
17	32,4; N-CH ₃	3,16; s	32,6; N-CH ₃	3,05; s	3, 5	-	3, 6, 9, 10a, 12, 16

qC: quartärer Kohlenstoff; s: Singulett; d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; m: Multiplett; * : Signalüberlagerung; graue Schrift bei NOESY/ROESY: Signale geringer Intensität.

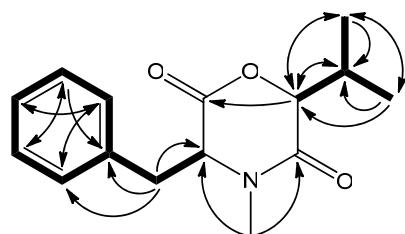


Abbildung 17. Darstellung der COSY- (—) und HMBC-Signale (—) für das Konformationsisomerengemisch des Diastereomers von Lateritin (**2a/2b**), gemessen in Aceton-d₆ (s. Tabelle 13).

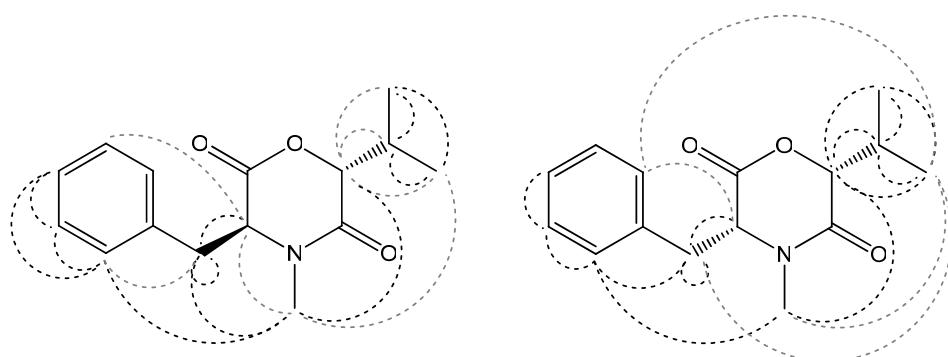


Abbildung 18. Darstellung der NOESY/ROESY-Signale (normaler bis starker Intensität und geringer Intensität) für das Konformationsisomerengemisch des Diastereomers von Lateritin (**2a/2b**) links exemplarisch am (3S,6R)-Stereoisomer gezeigt und die NOESY-Signale für Lateritin (**3**) rechts, gemessen in Aceton-d₆ (s. Tabellen 13 und 14).

Tabelle 14. ¹H- und NOESY-Daten von Lateritin (**3**) gelöst in Aceton-d₆, gemessen bei 600 MHz, 298 K.

Position	δ_{H} Multiplizität (J) ppm; (Hz)	NOESY
3	5,43; dd (4,8; 11,4)	10a, 10b, 12, 16
6	5,03; d (8,4)	7, 8, 9, 17
7	1,97; m	6, 8, 9
8	0,78; d (6,7)	6, 7, 9
9	0,46; d (6,8)	6, 7, 8, 10b, 12, 16, 17
10a	3,29; dd (-14,5; 4,8);	3, 10b, 12, 16
10b	3,07, dd (-14,5; 11,4)	3, 9, 10a, 12, 16
12, 16	7,30; m*	3, 9, 10a, 10b, 13, 15, 17
13, 15	7,26; m*	12, 14, 16
14	7,18; m	13, 15
17	3,06; s	6, 9, 12, 16

s: Singulett; d: Dublett; dd: Dublett eines Dubletts; m: Multiplett; * : Signalüberlagerung; graue Schrift bei NOESY: Signale geringer Intensität.

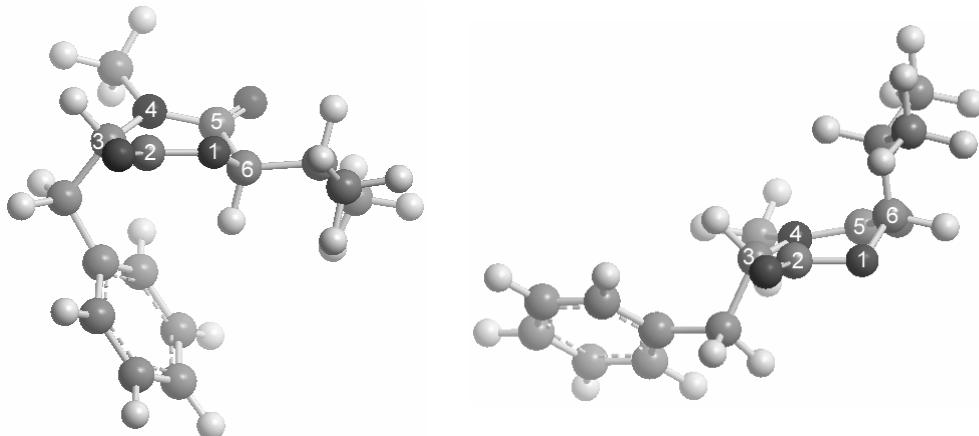


Abbildung 19. Perspektivische Darstellung der energieminierten, dreidimensionalen Strukturen des links in der Wannen- und rechts in der Sesselkonformation gezeigten Diastereomers von Lateritin, hier beispielhaft das (3S,6R)-Stereoisomer.

Beauvericin J (1)

In Anlehnung an die strukturverwandten Beauvericine, die erstmals aus *B. bassiana* isoliert wurden, wird Verbindung **1** als Beauvericin J bezeichnet.^[41-50,120] Der Unterschied zum Beauvericin liegt in einer zusätzlichen Hydroxygruppe in Position 3 einer der Hydroxyisovaleriansäuren im Molekül. Diese 2-Hydroxycarbonsäure ist demnach durch eine 2,3-Dihydroxyisovaleriansäure ersetzt. Solche 2,3-Dihydroxysäurederivate sind bereits aus der Klasse der Enniatine bekannt.^[19] Im Cyclodepsipeptid sind je drei Hydroxycarbonsäuren und Aminosäuren alternierenden angeordneten. Substanz **1** besteht aus einer Einheit 2,3-Dihydroxyisovaleriansäure (Dhiv), zwei Einheiten 2-Hydroxyisovaleriansäure (Hiv) und drei Einheiten N-Methylphenylalanin (NMePhe) wie in Abbildung 20 dargestellt ist. Die Stereochemie von Verbindung **1** ist von den natürlich vorkommenden Beauvericinen mit (S) für die Stereozentren in den N-Methylphenylalanylresten und (R) für die Stereozentren in der Säurekomponente übernommen. Somit handelt es sich nach der IUPAC-Nomenklatur um (3S,6R,9S,12R,15S,18R)-3,9,15-tribenzyl-6-(2-hydroxypropan-2-yl)-12,18-diisopropyl-4,10,16-trimethyl-1,7,13-trioxy-4,10,16-triazacyclooctadecan-2,5,8,11,14,17-hexaon. Zur Vereinfachung der Zuordnung der NMR-Daten in Tabelle 15 sind in dieser Abbildung für die sich wiederholenden Strukturelemente verschiedene Nummerierungen gewählt. Die Ergebnisse aus den COSY- und HMBC-Spektren sind in Abbildung 21 an je einem der Strukturelemente dargestellt.

Die chemischen Verschiebungen der Protonen in den Hydroxyisovaleriansäure- und N-Methylphenylalaninkomponenten in Verbindung **1** stimmen weitgehend mit denen von Lateritin (**3**) und Beauvericin (s. Tabellen 12 und 14) überein. Im ¹H-Spektrum von Beauvericin J sind drei weitere Singulets enthalten. Sie haben Verschiebungen ins tiefere Feld im Vergleich zu entsprechenden Protonen im Hydroxyisovaleriansäurerest, was auf ein Heteroatom in ihrer Nachbarschaft hindeutet. Wie bereits mittels MS aufgeklärt, handelt es sich um ein zusätzliches Sauerstoffatom, welches in Position 3 als Hydroxygruppe verknüpft ist. Beweise für die Verknüpfung an Position 3 sind die chemische Verschiebung des C-3 ins tiefere Feld und die HMBC-Kreuzsignale der Protonen

in Position 2, 4 und 5 mit C-3. Die HMBC-Signale vom Proton in Position 2 zu den nächsten Carbonylkohlenstoffen C-1 und C-1" sichern durch die weiteren Korrelationen mit den Carbonylkohlenstoffatomen die Einordnung in das Cyclodepsipeptid. Die Konfiguration der asymmetrischen Kohlenstoffatome im 18-gliedrigen Ring von Beauvericin kann für Beauvericin J (**1**) durch die NOESY-Analyse bestätigt werden. Hier werden dieselben Korrelationen wieder gefunden: starke Korrelationen der α -Protonen der Säurekomponenten (Positionen 2 und 2') mit den N-Methyl-

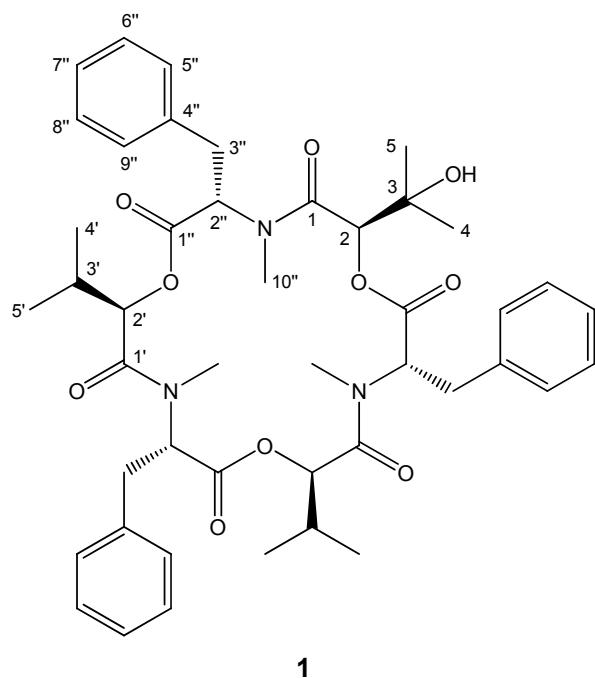


Abbildung 20. Struktur von Beauvericin J (**1**) mit Angabe der Positionen der Kohlenstoffatome in den sich wiederholenden Strukturelementen.

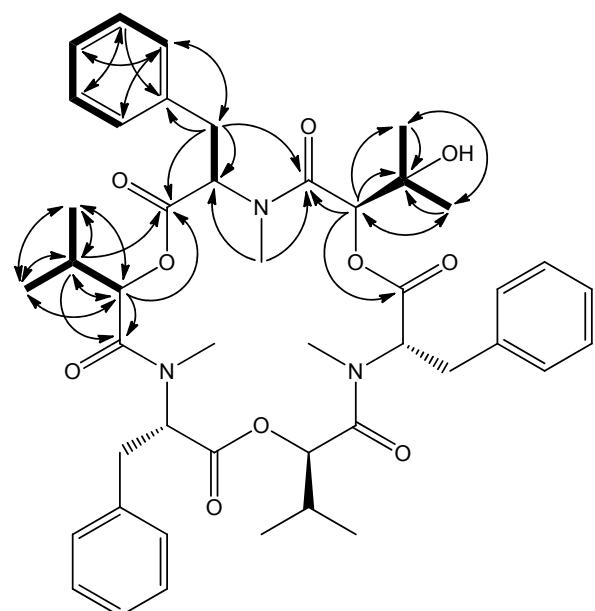


Abbildung 21. Darstellung der COSY- (—) und HMBC-Signale (↔) von Beauvericin J (**1**) gelöst in Aceton-d₆.

protonen (Position 10") und schwache Signale zwischen den α -Protonen des Phenylalaninrests (Position 2") und den N-Methylprotonen. Dies deutet auf die ebenfalls in der Kristallstruktur von Beauvericinkomplexen gefundene Stereochemie hin. Bei dieser stehen die α -Protonen der Säurereste auf derselben Seite des 18-gliedrigen Rings wie die N-Methylgruppe. Die α -Protonen des Phenylalanins befinden sich hingegen auf der gegenüber liegenden Seite des Rings.^[123]

Tabelle 15. NMR-Daten von Beauvericin J (1) gelöst in Aceton-d₆ und in Chloroform-d₁, ¹H jeweils gemessen bei 600 MHz, ¹³C bei 150 MHz, 298 K. Zu den Positionen der Kohlenstoffatome siehe Abbildung 20.

Pos.	Aceton-d ₆			Chloroform-d ₁	
	δ_c	δ_h	NOESY	δ_h	Multiplizität (J)
	Multiplizität ppm	Multiplizität (J) ppm; (Hz)	ROESY	ppm	(Hz)
1x Dhiv					
1	170,0; qC				
2	74,8; CH	5,20; s	4, 5, 10"	5,37; s	
3	71,5; qC				
4	26,0; CH ₃	1,01; s	2, 5, 2", 10"	0,88; s	
5	27,3; CH ₃	0,90; s	2, 4, 2", 10"	0,87; s	
2x Hiv					
1'	169,7; 170,3; qC				
2'	75,3; 75,4; CH	5,07; d (8,9); 5,11; d (8,8)	4', 5', 10"	5,02° br; m; 5,14° br; m	
3'	30,5; 30,6; CH	1,93; 2,01; m*	4', 5'	1,96; 2,01; m*	
4'	18,5; 18,4; CH ₃	0,82; 0,78; d (6,7)	2', 3', 5', 2"	0,85; d (6,2); 0,78; d (6,7)	
5'	17,5; 17,9; CH ₃	0,38; 0,47; d (6,8)	2', 3', 4', 2", 10"	0,32 br; m; 0,47 br; m	
3x NMePhe					
1"	170,7; 170,6; 170,4; qC				
2"	57,5; 58,2; 59,5; CH	5,54; dd (11,5; 4,0); 5,44; dd (3,0; 9,9); 5,17 br; m	4, 5, 4', 5', 3", 5", 6", 8", 9", 10"	5,68° br; m; 5,45° br; m; 5,25° br; m	
3"	35,3; 35,0; 35,5; CH ₂	3,30; 3,10; 3,29; 3,08; 3,28; 3,04; m*	2", 3", 5", 6", 8", 9", 10"	3x 3,25 - 3,40; 3x 2,93 - 3,04; m*	
4"	138,4; 138,2; 139,0; qC				
5", 9"	130,1; 130,0; 129,8; CH	6x 7,35; m*	2", 3", 6", 7", 8", 10"	6x 7,25; m*	
6", 8"	3x 129,2; CH	6x 7,27; m*	2", 3", 5", 7", 9", 10"	6x 7,30; m*	
7"	127,36; 2x 127,40; CH	3x 7,19; m*	5", 6", 8", 9"	3x 7,20; m*	
10"	32,5; 32,6; 32,9; N-CH ₃	3,12; 3,04; 3,09; s	2, 4, 5, 2', 5', 2", 3", 5", 6", 8", 9"	3,12; 3,04; 3,09; s	

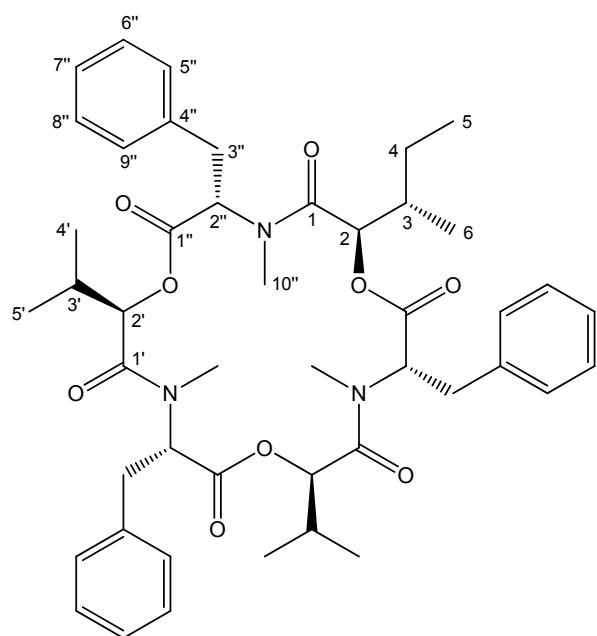
qC: quartärer Kohlenstoff; br: breites Signal; s: Singulett; d: Dublett; dd: Dublett eines Doublets; m: Multiplett;

*: Signalüberlagerung; °: Signale möglicherweise vertauscht.

Beauvericin A (4)

Bei Verbindung **4** handelt es sich um das erstmals aus *B. bassiana* isolierte Beauvericin A.^[43] Neben den Komponenten N-Methylphenylalanin (3x NMePhe) und Hydroxyisovaleriansäure (2x Hiv) ist eine 2-Hydroxy-3-methylvaleriansäureeinheit (Hmv) in diesem sechsgliedrigen Cyclodepsipeptid enthalten. In Abbildung 22 ist die Struktur von Beauvericin A (IUPAC: (3S,6R,9S,12R,15S,18R)-3,9,15-tribenzyl-6-((S)-sec-butyl)-12,18-diisopropyl-4,10,16-trimethyl-1,7,13-trioxa-4,10,16-triazacyclooctadecan-2,5,8,11,14,17-hexaon) dargestellt. Die Nummerierung der Kohlenstoffatome erfolgte analog Beauvericin J zur vereinfachten Zuordnung der Komponenten zu den NMR-Daten in Tabelle 16. Die Ergebnisse aus den HMBC- und COSY-Experimenten sind in Abbildung 23 an jeweils einem Strukturelement dargestellt.

Zur Strukturaufklärung wurden die NMR-Daten mit denen von Lateritin (**3**) und Beauvericin verglichen (s. Tabellen 12 und 14). Für die Komponenten Hydroxyisovaleriansäure und N-Methylphenylalanin sind die Werte nahezu identisch. Das zusätzliche Set von fünf ¹H- und sechs ¹³C-Signalen wurde zwei Methylgruppen, einer Methylengruppe, zwei Methingruppen und einer Carbonylgruppe zugeordnet. Die Carbonylgruppe und die chemischen Verschiebungen der Methingruppe in Position 2, mit ähnlichen Werten wie der in Position 2', lassen auf eine weitere 2-Hydroxycarbonsäure schließen. Wie schon durch die MS ermittelt, befindet sich in diesem Strukturelement des Cyclodepsipeptids eine zusätzliche Methylengruppe. Durch das Triplet der Protonen in Position 5, die COSY- und HMBC-Experimente ist die Methylengruppe in Position 4 einzuordnen. Es handelt sich somit um eine 2-Hydroxy-3-methylvaleriansäure als weitere Komponente des Cyclodepsipeptids. Dieses Depsipeptid ist als Beauvericin A bekannt. Um die Identität von Verbindung **4** zu bestätigen, wurden die NMR-Daten verglichen.^[43,124] Die Werte von Verbindung **4** in Tabelle 16 stimmen mit den Literaturwerten von Beauvericin A in Tabelle 17 mit Abweichungen von höchstens 0,2 ppm bei den ¹³C- und 0,05 ppm bei den ¹H-Werten überein. Die Konfiguration der asymmetrischen Kohlenstoffatome im 18-gliedrigen Ring von Beauvericin kann auch hier wie für Beauvericin J (**1**) durch die NOESY-Analyse bestätigt werden (s. oben).^[123] Es handelt sich bei Verbindung **4** somit um Beauvericin A.



4

Abbildung 22. Struktur von Beauvericin A (4) mit Angabe der Positionen der Kohlenstoffatome in den sich wiederholenden Strukturelementen.^[43,124]

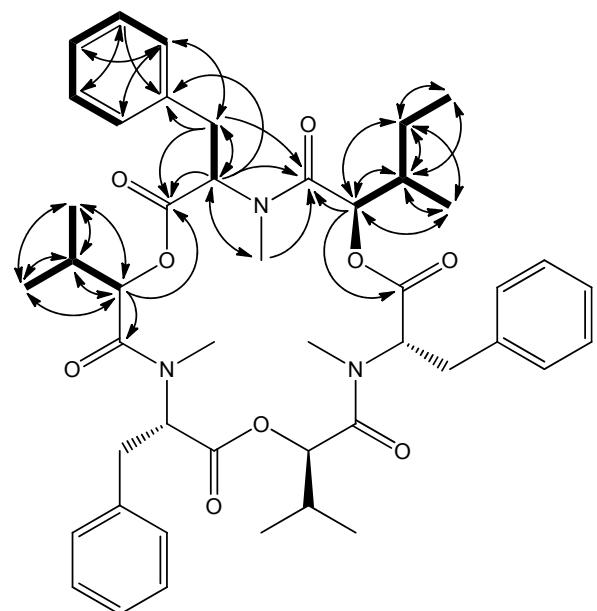


Abbildung 23. Darstellung der COSY- (—) und HMBC-Signale (→) von Beauvericin A (4) gelöst in Aceton-d₆.

Tabelle 16. NMR-Daten von Beauvericin A (4) gelöst in Aceton-d₆ und in Chloroform-d₁, ¹H jeweils gemessen bei 600 MHz, ¹³C bei 150 MHz, 298 K. Zu den Positionen der Kohlenstoffatome siehe Abbildung 22.

4	Aceton-d ₆			Chloroform-d ₁		
	Pos.	δ _C	δ _H	NOESY	δ _C	δ _H
		Multiplizität ppm	Multiplizität (J) ppm; (Hz)	ROESY	Multiplizität ppm	Multiplizität (J) ppm; (Hz)
1x Hmv						
1		169,9; qC			169,4; qC	
2		74,5; CH	5,10; d (7,9)	3, 4, 5, 6, 10"	74,3; CH	5,03; d (7,3)
3		36,8; CH	1,73; m	2, 4, 5, 6	35,8; CH	1,73; m
4		25,0; CH ₂	0,73; m*	2, 3, 5	24,5; CH ₂	0,74; m*
5		11,6; CH ₃	0,66; t (7,0)	2, 3, 4, 6	11,3; CH ₃	0,67; t (6,9)
6		14,6; CH ₃	0,75; d (6,9)	2, 3, 5, 10"	14,3; CH ₃	0,76; d (6,7)
2x Hiv						
1'		2x 169,8; qC			2x 169,4; qC	
2'		75,7; 75,6; CH	5,01; d (8,6); 5,04; d (8,5)	3', 4', 5', 10"	2x 75,5; CH	4,92; d (8,4); 4,94; d (8,2)
3'		30,57; 30,59; CH	2x 1,97; m*	2', 4', 5'	29,6; 29,7; CH	2x 1,99; m*
4'		2x 18,5; CH ₃	0,76; d (7,0); 0,79; d (6,7)	2', 3', 5', 10"	2x 18,2; CH ₃	0,77; d (6,7); 0,80; d (6,6)
5'		17,87; 17,90; CH ₃	0,44; 0,46; d (6,8)	2', 3', 4', 10"	2x 17,5; CH ₃	0,43; 0,45; d*
3x NMePhe						
1"		170,70; qC 170,69; 170,6;			3x 169,9; qC	
2"		57,9; 58,1; CH 58,0;	5,47; 5,43; 5,44; m*	3", 5", 9", 10"	57,4; CH 2x 57,7;	3x 5,45 br; m
3"		35,3; 35,41; CH ₂ 35,36;	3,29; 2x 3,27; 3x 3,057; m*	2", 3", 5", 9", 10"	2x 34,6; CH ₂ 34,8;	3x 3,36; 3x 2,97; m*
4"		138,06; qC 138,14; 138,2;			3x 136,6; qC	
5",		129,93; CH	6x 7,29; m*	2", 3", 6", 7", 8", 10"	3x 128,8; CH	6x 7,23; m*
9"		2x 129,91;				
6",		129,1; CH	6x 7,26; m*	5", 7", 9", 10"	2x 128,55; CH	6x 7,26; m*
8"		2x 129,2;				
7"		127,40; CH 2x 127,38;	3x 7,18; m*	5", 6", 8", 9" 5", 6", 8", 9"	3x 126,8; CH	3x 7,18; m*
10"		32,5; N-CH ₃ 2x 32,6;	3,04; 3,061; 3,056; s	2, 6, 2', 4', 5', 2", 3", 5", 6", 8", 9"	3x 32,3; N-CH ₃	2,96; 2x 2,99; s

qC: quartärer Kohlenstoff; br: breites Signal; s: Singulett; d: Dublett; t: Triplet; dd: Dublett eines Dubletts; m: Multiplett;

* : Signalüberlagerung.

Tabelle 17. Literaturwerte für Beauvericin A^[43] gelöst in Chloroform-d₁.

Position	δ_c Multiplizität ppm	δ_h ppm
1x Hmv		
1	169,2°; qC	
2	74,2; CH	5,04
3	35,8; CH	1,78
4	24,5; CH ₂	0,70
5	11,3; CH ₃	0,68
6	14,3; CH ₃	0,76
2x Hiv		
1'	169,2°; qC	
2'	75,4; CH	4,93; 4,96
3'	29,7; CH	2x 2,04
4'	18,3; CH ₃	0,77; 0,81
5'	17,5; CH ₃	0,43; 0,45
3x NMePhe		
1"	169,9°; qC	
2"	57,3; 57,5; CH	3x 5,43
3"	34,7; 34,8; CH ₂	3x 3,35; 3x 2,99
4"	136,6; qC	
5" - 9"	126,8; 128,5; 128,9; CH	15x 7,22
10"	32,4; N-CH ₃	2,95; 2x 2,99

qC: quartärer Kohlenstoff; ° : Signale möglicherweise vertauscht.

3.3.2 Polarimetrische Daten

Aufgrund der Chiralitätszentren in den Molekülen sind die Verbindungen optisch aktiv. Die ermittelten spezifischen Drehungen sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Das Diastereomer von Lateritin (**2a/2b**) hat mit $[\alpha]^{20}_D = -9$ ($c = 0,03$; Acetonitril) eine geringe spezifische Drehung. Oh *et al.* ermittelten die spezifische Drehung $[\alpha]^{23}_D = -48,8$ ($c = 0,43$; Chloroform) für Lateritin.^[62] In Übereinstimmung mit den NMR-Daten wurde in Chloroform für Verbindung **3** eine ähnliche spezifische Drehung wie für Lateritin gefunden. Es handelt sich somit um Lateritin. Interessanterweise kann auch bei Lateritin der Effekt der Vorzeichenumkehr beim Wechsel des Lösungsmittels beobachtet werden, wie er für Beauvericin mit $[\alpha]^{28}_D = +69$ ($c = 1,08$; Methanol) und $[\alpha]^{25}_D = -15$ ($c = 2,1$; Chloroform) bekannt ist.^[44]

Im Lösungsmittel Acetonitril ist die spezifische Drehung für Beauvericin A (**4**) $[\alpha]^{20}_D = +39$ ($c = 0,07$) bestimmt worden. Die spezifische Drehung $[\alpha]^{29}_D = +66$ ($c = 0,05$; Methanol)^[44] ist bekannt.

Aufgrund der geringen Substanzmasse wurde jedoch auf die Ermittlung eines Vergleichswertes mit dem Lösungsmittel Methanol verzichtet.

Die spezifische Drehung von Beauvericin J (**1**) im Lösungsmittel Acetonitril ist im Gegensatz zu Lateritin (**3**) und Beauvericin A (**4**) gering. Die Hydroxygruppe in der Nähe des asymmetrischen Kohlenstoffatoms scheint einen negativen Beitrag zur optischen Aktivität der Verbindung zu haben.

Tabelle 18. Polarimetrische Daten der isolierten Verbindungen.

Verbindung	$[\alpha]^{20}_D$		
	(c; Acetonitril)	(c = 0,2; Methanol)	(c = 1,0; Chloroform)
Beauvericin J (1)	+7 (0,07)	-	-
Diastereomer von Lateritin (2a/2b)	-9 (0,03)	-	-
Lateritin (3)	+37 (0,07)	+65,0	-23,9
Beauvericin A (4)	+39 (0,07)	-	-

3.3.3 Chromatographische Daten

Mit den Trennsystemen DC2 und DC4 wurden die gewonnenen Minorkomponenten **1**, **2a/2b** und **4** dünnsschichtchromatographisch getrennt und erstmals mit Dragendorffs Reagenz detektiert (s. Tabelle 19). Die Konzentration dieser Verbindungen war im Extrakt und in den Fraktionen zu gering gewesen, so dass nur Verbindung **3** detektiert wurde. Vermutlich blieben aufgrund der geringen Empfindlichkeit von Dragendorffs Reagenz weitere Alkaloidminorkomponenten im Übersichtschromatogramm der Bibliotheksextrakte (Abbildung 9) unentdeckt.

Zur Bestimmung des Reinheitsgrads der Verbindungen für die Zytotoxizitätstests wurde eine analytische HPLC-Methode in Anlehnung an die semipräparative Methode entwickelt (s. Kapitel 2.5.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Die verschiedenen dreidimensionalen Strukturen der stereoisomeren Verbindungen **2a/2b** und **3** führen zu einem unterschiedlichen chromatographischen Verhalten dieser Substanzen. Dabei ist Lateritin (**3**) im analytischen RP-18-HPLC-Trennsystem deutlich lipphiler, hingegen hat es in den Normalphasen-DC-Trennsystemen stärkere adsorptive Eigenschaften als Verbindung **2a/2b**.

Tabelle 19. Chromatographische Daten der isolierten Verbindungen.

Trennsystem	HPLC, analytisch		DC2	DC4
	Verbindung	t_R (Reinheit) min (%)	R_f -Wert	R_f -Wert
Beauvericin J (1)		14,2 (94,9)	0,29	0,31
Diastereomer von Lateritin (2a/2b)		19,1 (99,1)	0,38	0,25
Lateritin (3)		22,8 (99,4)	0,32	0,22
Beauvericin A (4)		29,6 (99,4)	0,35	0,20

3.3.4 Schmelzpunkt

Die Verbindungen **1**, **2a/2b** und **4** sind aus dem Lösungsmittel Methanol als amorphe, farblose Substanzen erhalten worden. Aufgrund des amorphen Charakters und der geringen Masse der Isolate wurde bei diesen Substanzen auf eine Bestimmung des Schmelzpunkts verzichtet. Lediglich Lateritin (**3**) kristallisiert aus dem Lösungsmittel Methanol in farblosen Nadeln aus. Dieser Feststoff weist einen Schmelzbereich von 92 bis 95 °C auf. Für einen Vergleich sind in der Literatur jedoch keine Werte angegeben.

3.3.5 Zusammenfassung der Strukturaufklärung

Aus *I. catenulata* konnten vier strukturverwandte Verbindungen, deren Formeln in Abbildung 24 zusammengefasst sind, mit ähnlichen NMR- und UV-Spektren isoliert werden. Auf strukturelle Analogien deuten ebenfalls die durch MS ermittelten relativen Molekülmassen 261 von den Substanzen **2a/2b** und **3** sowie die bei den Verbindungen **1** und **4** resultierenden ungeladenen Fragmente der gleichen Masse (s. Massendifferenzen) und die Fragmentionen mit *m/z* 262 hin. Die beiden Substanzen **1** und **2a/2b** sind bisher unbekannt. Die Verbindungen **3** und **4**, Lateritin und Beauvericin A, sind bereits aus verschiedenen entomopathogenen Pilzen jedoch bisher nicht aus *I. catenulata* isoliert worden.

Verbindung **3** konnte vor allem mit Hilfe der MS, der NMR, der Polarimetrie und dem Vergleich mit den Werten in der Literatur als Lateritin identifiziert werden.^[60,62] Weiterhin konnte die Struktur eines Diastereomers von Lateritin (**2a/2b**) mittels MS und NMR aufgeklärt werden, dessen absolute Stereochemie aufgrund fehlender Referenzen ungelöst blieb. Durch die ein- und zweidimensionalen NMR-Spektren kann man jedoch zwei Konformationsisomere beobachten, die etwa in gleichen Teilen in der Lösung vorliegen. Bei Temperaturänderungen im Bereich zwischen 283 und 323 K koaleszieren die Signale weder durch Mittelung der Verschiebungen bei schneller Konformationsänderung noch ändert sich das Verhältnis zugunsten einer bevorzugten Konformation. Das Diastereomer von Lateritin liegt wahrscheinlich als einzelnes Stereoisomer vor, da eine spezifische Drehung ungleich Null ermittelt wurde und das Racemat der Diastereomere keine optische Aktivität zeigen würde.

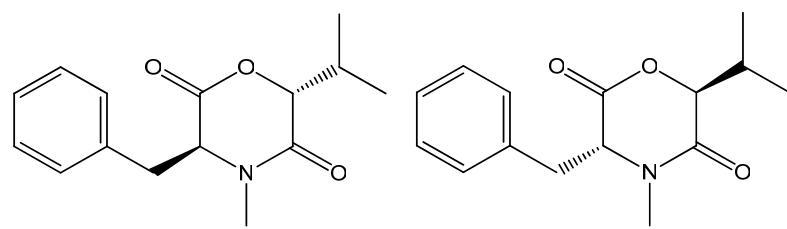
Verbindung **4** konnte anhand der NMR-Daten und dem Vergleich mit den Literaturwerten als Beauvericin A identifiziert werden.^[43,124] Des Weiteren wurde die Struktur eines Hydroxybeauvericins aufgeklärt, welches in Anlehnung an die Substanzgruppe der Beauvericine Beauvericin J (**1**) genannt wurde. Anhand der NMR-Spektren wurde im Vergleich mit Beauvericin statt einer 2-Hydroxyisovaleriansäure eine 2,3-Dihydroxyisovaleriansäure als Strukturelement des Cyclodepsipeptids festgestellt. Durch die stereospezifische Biosynthese der bekannten Beauvericine (s. unten) ist es wahrscheinlich, dass die Substrate (*S*)-Phenylalanin und die (*R*)-Hydroxsäuren im Beauvericin J in dieser Konfiguration erhalten bleiben.

Die Biosynthese von Beauvericin erfolgt stereospezifisch an einem Multienzymkomplex^[28,122], an dem die Substrate L-(*S*)-Phenylalanin und D-(*R*)-2-Hydroxyisovaleriansäure nach Aktivierung mit ATP als Thioester gebunden werden. In diesem gebundenen Zustand wird der Stickstoff der

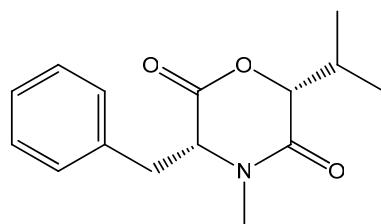
Aminosäure mit Hilfe von S-Adenosylmethionin methyliert. Das Substrat (*R*)-2-Hydroxyisovaleriansäure wird in Pilzen ausschließlich durch die 2-Ketoisovalerat-Reduktase gebildet.^[122] In den bekannten Beauvericinen ist die Stereochemie der Substrate beibehalten. Bei der Biosynthese anderer nicht-ribosomaler Peptide wie einiger Polypeptidantibiotika kann die Aminosäure während der Bindung am Enzym epimerisiert werden.^[21,28] Aus *Aspergillus fumigatus* FRESEN. (Trichocomaceae) ist die Brevianamide F-Synthetase bekannt, die das Cyclodipeptid Brevianamide F aus je einem Molekül (S)-Tryptophan und (S)-Prolin bildet.^[7,8,125]

Falls die isolierten Morpholindione durch ähnlich arbeitende Enzyme gebildet werden, könnte eine Epimerisierung des (S)-Phenylalanins für die Synthese des (3*R*,6*R*)-Hauptmetabolits Lateritin (**3**) verantwortlich sein. Im Gegensatz dazu erfolgt wahrscheinlich bei der Biosynthese des Diastereomers (**2a/2b**) an einem ähnlichen Enzym keine Epimerisierung. Somit würde aus den natürlich vorkommenden Komponenten (S)-Phenylalanin und (*R*)-2-Hydroxyisovaleriansäure das (3*S*,6*R*)-Produkt gebildet.

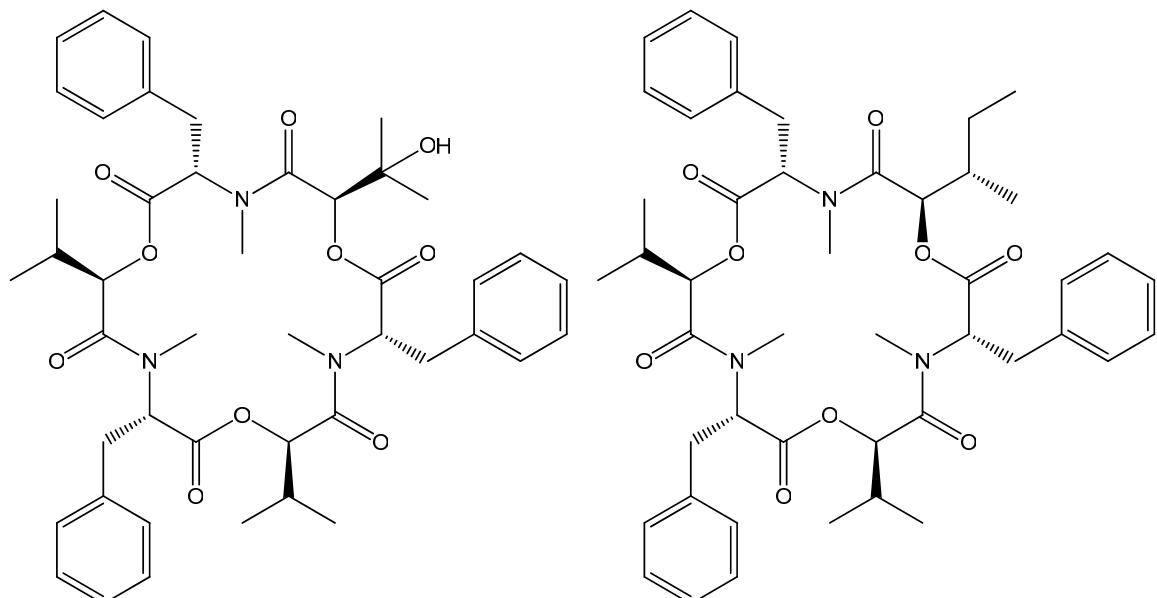
Die absolute Stereochemie der isolierten Verbindungen **2a/2b** und **3** oder die der Komponenten bei den Verbindungen **1** und **4** könnte mit Hilfe einer Hydrolyse der jeweiligen Substanzen mit anschließender Analyse der Chiralität der Produkte aufgeklärt werden. Eine solche Methode ist durch Fukuda *et al.* für die Beauvericine entwickelt worden: Saure Hydrolyse der Verbindung in der Gasphase und HPLC-Analyse der Produkte an einer chiralen stationären Phase im Vergleich mit Referenzsubstanzen.^[126] Eine weitere Möglichkeit die Konfiguration der Chiralitätszentren aufzuklären liegt in der Synthese der Verbindungen und aller Stereoisomere. Jedoch ist die Cyclisierung zu den Morpholindionen bislang nicht gelungen.^[61,62,120] Ebenso ist die Bildung von Esterbindungen in der Festphasensynthese ineffizient und der Ringschluss bei der chemischen Synthese von Makrolaktonen problematisch.^[122]



mögliche Strukturen des Diastereomers von Lateritin (2a/2b)



Lateritin (3)



Beauvericin J (1)

Beauvericin A (4)

Abbildung 24. Strukturformeln der aus *I. catenulata* isolierten Verbindungen.

3.4 Biologische Aktivität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der isolierten Verbindungen **1** bis **4** wurden MTT-Assays mit HeLa- und Jurkat-Zellen durchgeführt. Bei diesen Assays wurde analog der MTT-Assays zum Screening der Bibliotheksextrakte und der Vergleichsextrakte verfahren. Die zytotoxische Aktivität des Hauptmetabolits **3** wurde weiterhin im Proliferations- und im ECIS-Assay untersucht.

3.4.1 Zytotoxizitäts-Assays

Die IC_{50} -Werte der isolierten Verbindungen Beauvericin J (**1**) und A (**4**), Lateritin (**3**) sowie dessen Diastereomer (**2a/2b**) wurden, wie im Kapitel 2.3.4 beschrieben, an den Zelllinien HeLa und Jurkat mittels MTT-Assay (s. Kapitel 3.1.1) bestimmt. Die ermittelten Werte sind in Tabelle 20 zusammengefasst. Für die unbekannten Verbindungen Beauvericin J (**1**) und das Diastereomer von Lateritin (**2a/2b**) wurden die IC_{50} -Werte 9,5 bzw. 16,7 μ M für HeLa-Zellen und 6,0 bzw. 12,8 μ M für Jurkat-Zellen ermittelt. Damit wirkt das Diastereomer von Lateritin deutlich schwächer als Lateritin (**3**) auf die ausgewählten Zelllinien in diesem Assay. Die Stereochemie steht also in Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung dieser Substanzen.

Tabelle 20. Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Assays (IC_{50} -Werte) mit den isolierten Verbindungen ($n = 3$, HeLa-Zellen 11×10^3 , Jurkat-Zellen 15×10^3 Zellen/Well, Inkubationszeit 72 h).

Verbindung	MTT-Assay	
	HeLa	
	IC_{50}	Jurkat
Beauvericin J (1)	$9,5 \pm 0,9$	$6,0 \pm 0,6$
Diastereomer von Lateritin (2a/2b)	$16,7 \pm 2,5$	$12,8 \pm 0,6$
Lateritin (3)	$4,5 \pm 0,3$	$6,8 \pm 1,1$
Beauvericin A (4)	$1,4 \pm 0,3$	$1,3 \pm 0,2$

Die zytotoxische Wirkung von Lateritin ist bekannt, es induziert die Apoptose in der humanen Leukämiezellen HL-60. Oh *et al.* färbten die Zellkerne um die für die Apoptose charakteristischen morphologischen Veränderungen, wie Chromatinkondensation und DNS-Fragmentierung, fluoreszenzmikroskopischen und durchflusszytometrischen zu untersuchen.^[62] Pettit *et al.* fanden in sechs humanen Tumorzelllinien ein verminderter Zellwachstum mit Hilfe des Sulforhodamin B-Assays und erhielt IC_{50} -Werte von 6,5 bis 7,7 μ M.^[119] Diese Werte sind mit den gefundenen Werten für Verbindung **3** vergleichbar, jedoch wurden die Assays unterschiedlich durchgeführt und andere Zelllinien benutzt.

Eine zytotoxische Wirkung ist ebenfalls für die Beauvericine bekannt. Für Beauvericin A (**4**) wurde von Nilanonta *et al.* der IC_{50} -Wert 3,1 μ M an HeLa-Zellen (Synonym: KB-Zellen) mit dem Sulforhodamin B-Assay ermittelt.^[44] Dieser ist mit dem für Beauvericin A ermittelten Wert 1,4 μ M

vergleichbar, wobei auch hier ein Vergleich durch die Verwendung eines anderen Assays und abweichender Kultivierungsbedingungen der Zellen erschwert wird.

3.4.2 Proliferations-Assay

Um zu ermitteln, ob es sich bei der festgestellten Zytotoxizität an HeLa-Zellen eher um eine zytostatische Aktivität des isolierten Hauptmetabolits **3** handelt, wurde ein Proliferations-Assay durchgeführt. Hierzu wurden die Ergebnisse der folgenden beiden Testsysteme verglichen: MTT- und Kristallviolett-Assay (s. Kapitel 2.3.6). Anders als beim MTT-Assay, bei dem die metabolische Aktivität der Zellen mit Hilfe der Formazanbildung gemessen wird (s. Kapitel 3.1.1), handelt es sich beim Kristallviolett-Assay um einen violetten kationischen Farbstoff, der den Zellkern färbt, indem er mit den anionischen Nukleinsäuren interagiert. Die Färbung wird unter zellfixierenden Bedingungen durchgeführt. Nach dem Auswaschen des Farbstoffüberschusses werden die Zellen lysiert und das gebundene Kristallviolett gelöst. Die Absorption der entstandenen Lösung wird bei einer Wellenlänge zwischen 550 und 590 nm gemessen. Beim Kristallviolett-Assay stehen die Zellzahl und die gemessene Absorption in linearem Zusammenhang.^[127]

Der ermittelte IC_{50} -Wert im MTT-Assay ist mit $21,9 \pm 3,1 \mu\text{M}$ verschieden vom oben aufgeführten Wert, da hier die Zellen einen Tag am Well-Boden adhärieren und proliferieren konnten. Erst anschließend wurden sie zwei Tage mit Verbindung **3** inkubiert. So waren die HeLa-Zellen nicht sofort nach dem Stress bedeutenden Zentrifugieren und Resuspendieren der Substanz ausgesetzt und daher weniger empfindlich auf den zytotoxischen Reiz. Des Weiteren konnten sich die Zellen innerhalb des ersten Tages teilen, so dass die Zellzahl bei der Zugabe der Substanz schon höher war als beim MTT-Assay, der im Kapitel 2.3.4 beschrieben ist.

Zur Auswertung der Kristallviolett-Assays wurde das in Abbildung 25 dargestellte Säulendiagramm erstellt. Anhand der Säulen, die kleiner als der 24 h-Kontrollwert sind, ist ersichtlich, dass alle Konzentrationen von Lateritin (**3**) über dem IC_{50} -Wert zytotoxisch für die Zellen sind. Wäre die Wirkung der Substanz hingegen in diesem Konzentrationsbereich zytostatisch, sollten sich die Werte nicht von der 24 h-Kontrolle unterscheiden, so wie dies bei der Konzentration $12,5 \mu\text{M}$ zu beobachten ist. Hier unterscheidet sich die Proliferation nicht signifikant von der 24 h-Kontrolle. Das bedeutet, dass die Zellzahl im Vergleich mit der Ausgangszellzahl nahezu konstant geblieben ist. Bei den Konzentrationen unter $3,12 \mu\text{M}$ ist nur noch eine geringe Abweichung zum 72 h-Kontrollwert, der 100% Proliferation entspricht, zu erkennen.

Die zytotoxische Wirkung von Lateritin ist mit diesem Proliferations-Assay von einer antiproliferativen, also zytostatischen, abgrenzbar. Die gefundene zytotoxische Wirkung wird durch die Apoptoseinduzierende Wirkung von Lateritin bestätigt.^[62] Ein weiteres Ergebnis dieses Vergleichs-Assays ist, dass im Konzentrationsbereich der halbmaximalen Hemmkonzentration der metabolischen Aktivität der Zellen, die mit dem MTT-Assay bestimmt wird, die mit Kristallviolett färbbare Erbsubstanz reduziert ist. Also steht in diesem Konzentrationsbereich von Substanz **3** eine relativ hohe metabolische Aktivität, wahrscheinlich aufgrund der DNS-Fragmentierung während der Apoptose, wenig färbbarer DNS gegenüber.

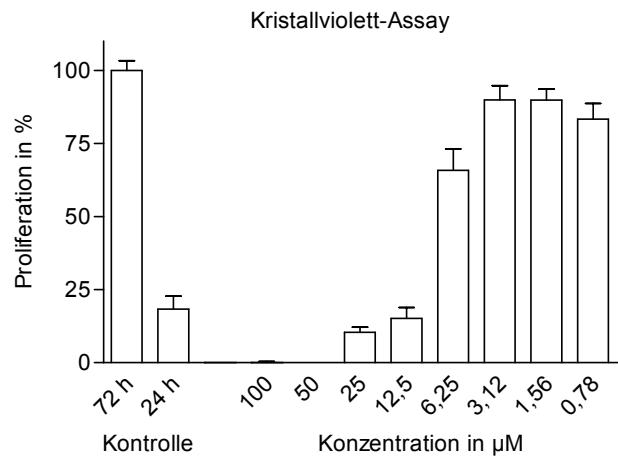


Abbildung 25. Säulendiagramm des Kristallviolett-Assays mit den Kontrollen der unbehandelten HeLa-Zellen nach der gesamten Inkubationszeit (72 h), vor der Substanzzugabe (24 h) und den mit Lateritin (3) in verschiedenen Konzentrationen behandelten Zellen ($n = 3, 11 \times 10^3$ Zellen/Well).

3.4.3 ECIS-Assay

Bei der 1984 von Giaever und Keese entwickelten ECIS-Technik (electric cell-substrate impedance sensing), handelt es sich um eine labelfreie, nicht-invasive und zeitaufgelöste Methode zur Untersuchung adhärenter Zellen *in vitro*, die auf einer Messung der elektrischen Impedanz (Wechselstromwiderstand) einer mit Zellen bewachsenen Filmelektrode basiert (s. Abbildung 26).^[128,129] Die Fläche dieser Elektrode beträgt $5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ neben der größeren Referenzelektrode mit $0,15 \text{ cm}^2$, die ebenfalls mit Zellen bewachsen ist. Aufgrund des Größenunterschiedes wird die Impedanz des Zweielektrodenystems von der Impedanz der Arbeitselektrode dominiert. Die Zellen auf der Arbeitselektrode verhalten sich wie dielektrische Partikel. Daher kann beim Anlegen eines die Zellen nicht beeinflussenden Wechselstroms die Impedanz bei einer oder mehreren Frequenzen in Abhängigkeit der Zeit gemessen werden.

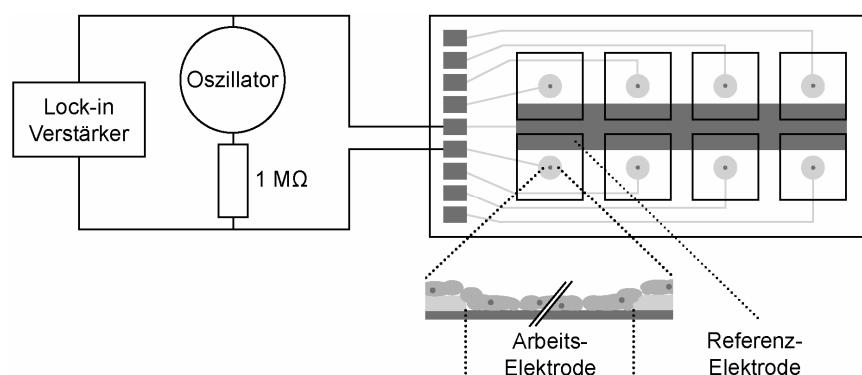


Abbildung 26. Schematische Darstellung der ECIS-Messanordnung mit Vergrößerung der mit einer Zellschicht belegten Arbeitselektrode, verändert nach Wegener *et al.*^[132]

Bei einer konfluenten Zellschicht auf der Elektrode zwingen die isolierenden Eigenschaften der Plasmamembranen den Strom um die Zellen herum zu fließen und erhöhen so den gemessenen Impedanzwert im Vergleich zu einer zellfreien Elektrode maßgeblich. Dieser Impedanzwert bleibt bei einer unbehandelten Zellpopulation, bis auf Fluktuationen, die die Motilität der vitalen Zellen widerspiegeln, konstant. Nimmt die Membranintegrität der Zellen durch einen nekrotischen Stimulus ab oder ändert sich die Zellmorphologie von einer an der Elektrode flach anliegenden in Richtung Kugelform, so ändern sich die Stromwege durch und um die Zellen und die gemessene Impedanz nimmt ab. Diese submikroskopischen Veränderungen der Zellen bei zytotoxischen, wie nekrotischen und apoptotischen, Ereignissen werden durch die ECIS-Technik zeitaufgelöst wiedergegeben.^[130,131]

Die Messanordnung besteht aus einem 8 Well-Elektrodenarray mit einer Arbeits- und einer Referenzelektrode im Boden jedes Wells, das im Inneren eines Inkubators (37 °C, 5% CO₂) platziert wird, dem Impedanzmessgerät sowie der computergestützten Steuerung und Datenverarbeitung (s. Abbildung 26).

Für dieses Experiment, welches im Kapitel 2.3.7 detailliert beschrieben ist, wurden die Konzentrationen 50, 20 und 4 µM gewählt, um bei der höchsten Konzentration von Lateritin (3) sicher einen zytotoxischen Effekt zu detektieren. Die zweite Konzentration wurde aufgrund des IC₅₀-Wertes im Proliferations-Assay festgelegt, da hier die HeLa-Zellen ebenfalls innerhalb von 24 h am Well-Boden adhärieren. Dabei wachsen sie bei der experimentell ermittelten Zahl von 44x 10³ HeLa-Zellen pro Well zu einer konfluenten Zellschicht auf den Arbeitselektroden. So wird eine relativ hohe und reproduzierbare Ausgangsimpedanz erhalten. In der kleinsten Konzentration sollte die Substanz höchstens einen geringen Effekt auslösen.

In Abbildung 27 sind die Ergebnisse aus den ECIS-Versuchen zusammengefasst. Bei der höchsten Konzentration von 50 µM Lateritin (3) erkennt man innerhalb von 12 h nach Substanzzugabe den Abfall der normierten Impedanz auf den Wert einer unbelegten Arbeitselektrode. Dieser beginnt unmittelbar nach der Substanzzugabe, was auf einen nekrotischen Effekt hindeutet. Jedoch stagniert der Impedanzabfall nach etwa einer Stunde wieder und setzt sich nur verzögert fort. Ein späterer Abfall bis 35 h ist bei der zweiten Konzentration von 20 µM zu beobachten, wobei dieser Abfall erst nach etwa 18 h Inkubationszeit beginnt. Diese langsamen und spät einsetzenden Effekte deuten auf apoptotische Vorgänge hin, da im Verhältnis dazu nekrotische Prozesse, bei denen die Zellen ihr Membranpotential verlieren, innerhalb weniger Stunden ablaufen. Bei der kleinsten Konzentration 4 µM ist, wie erwartet, kein Unterschied zur Kontrolle zu erkennen. Die detektierten Fluktuationen innerhalb der Impedanzverläufe kommen wie erwähnt aufgrund der Motilität der vitalen Zellen zustande und nehmen beim Annähern an die Werte der zellfreien Arbeitselektrode erwartungsgemäß ab.^[129-132]

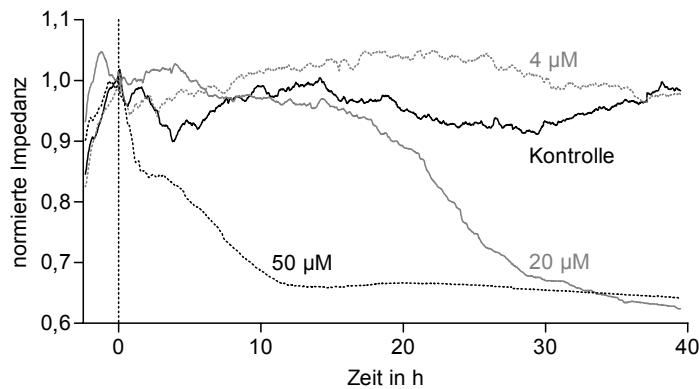


Abbildung 27. Zeitlicher Verlauf der normierten Impedanz (Mittelwerte ohne Standardabweichung) in den ECIS-Assays bei einer Messfrequenz von 64 kHz nach Zugabe (0 h) von Lateritin (3) in verschiedenen Konzentrationen und der Lösungsmittelkontrolle ($n = 4$, 44×10^3 Zellen/Well).

3.4.4 Diskussion der Assay-Ergebnisse

Die isolierten Verbindungen **1** bis **4** wirken im unteren μM -Bereich zytotoxisch. Ein deutlicher Unterschied der IC_{50} -Werte ist zwischen Lateritin (**3**) und dessen Diastereomer (**2a/2b**) zu erkennen. Somit ist das Ausmaß des zytotoxischen Effekts von der Stereochemie abhängig. Lateritin besitzt die entsprechend geeignete Konfiguration, um diesen Effekt beispielsweise über die Interaktion mit einem Protein, einem Rezeptor oder Enzym, auszulösen. Durch den Proliferations-Assay konnte für Lateritin die zytotoxische im Gegensatz zu einer ausschließlich zytostatischen Aktivität bestätigt werden. Die von Oh. *et al.* untersuchte apoptoseinduzierende Wirkung von Lateritin deuten sich im ECIS-Assay ebenfalls an.^[62] Daneben besitzt Lateritin eine partielle nekrotische Wirkung auf HeLa-Zellen in der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 μM .

Im MTT-Assay mit HeLa- als auch mit Jurkat-Zellen ist Beauvericin A (**4**) die potenteste Verbindung. Beauvericin J (**1**) wirkt in diesen Testsystemen weniger zytotoxisch. Durch die hydrophile Hydroxygruppe in Beauvericin J kommt es zum Wirkverlust, da sich diese Substanz weniger gut in den lipophilen Zellmembranen löst. Die Beauvericine sind Ionophore, die mehrfach geladene Kationen wie Calciumionen in Form von Komplexen durch Membranen transportieren können.^[25] Jow *et al.* untersuchten an der humanen Leukämiezelllinie CCRF-CEM die Induktion der Apoptose, die bei Beauvericin durch den Anstieg der Calciumionen im Zellinneren und die Freigabe von Cytochrom c aus den Mitochondrien vermittelt wird. Zusätzlich stellten sie die Aktivierung von Caspase 3, einem Effektorenzym in der Apoptose, fest und beobachteten daneben die partielle Beteiligung nekrotischer Effekte mit dem Laktat-Dehydrogenase-Assay. Diese Differenzierung zur Apoptose ist möglich, da das zytoplasmatische Enzym Laktat-Dehydrogenase nur bei der Zellyse ins Medium abgegeben wird. Im Gegensatz dazu kommt es bei der Apoptose nicht oder nur in geringem Umfang zur Lyse.^[48] Tang *et al.* stellten für Beauvericin einen Calciumionen-aktivierten Chloridionenstrom fest. Der Zelltod in *Xenopus*-Eizellen (Krallenfrosch) wird hierbei über den Einstrom von extrazellulären Calciumionen induziert, wobei ebenfalls die von Jow *et al.* postulierte Freigabe von Calciumionen aus intrazellulären Quellen eine Rolle spielt.^[49]

Neben der apoptoseinduzierenden Aktivität ist auch die Wirkung von Beauvericin als Migrationsinhibitor in einem Assay mit der metastatischen Prostatazelllinie PC-3M für einen vielversprechenden Einsatz als Leitstruktur oder Wirksubstanz in der Krebstherapie von Bedeutung.^[122] Somit sind die beiden Effekte, Induktion der in Krebszellen unterdrückten Apoptose und Verminderung von Metastasen, für die Beauvericine und ihre Derivate interessant.

Als für die Wirkung wichtige strukturelle Merkmale der Cyclodepsipeptide **1** bis **4** sind die N-Methylierung, die aromatische Substitution und die (makro-)cyclische Verknüpfung zu nennen. Häufig nehmen Makrocyclen die für die Rezeptorbindung nötige Struktur einfacher als flexiblere Acyclen ein, da sie eine geringere Konformationsentropie besitzen. Makrocyclen wie makrocyclische Peptide haben häufig eine bessere Stabilität gegenüber Peptidasen. Die hydrophoben Seitenketten schützen die Bindungen außerdem vor Hydrolyse, erhöhen die Membranpermeabilität und die Bioverfügbarkeit.^[123]

Die zytotoxische Aktivität und die strukturellen Vorteile der isolierten Cyclodepsipeptide machen sie für weitere Untersuchungen im Hinblick auf ihre Wirkungsweise und einen Einsatz in der Krebsforschung interessant.

4 Zusammenfassung

Die bisher wenig untersuchten entomopathogenen Pilze als Organismen, die Extremhabitata bewohnen, sind interessant als Quelle neuer bioaktiver Naturstoffe. Besonders weil diese Organismen an ihre Arthropodenwirte gut angepasst sind und die Infektion nicht selten zum Tod der Wirte führt, kann man auf die Beteiligung zytotoxischer oder allgemeiner ausgedrückt biologisch aktiver Pilzmetabolite am Infektionsverlauf schließen. In der Krebsforschung besteht eine große Nachfrage nach neuen zytotoxischen Substanzen für die Arzneistoffentwicklung und zur Aufklärung neuer Wirkmechanismen. Besonders Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen wie Pilzen sind im Fokus der Forschung als Leitstrukturen und Wirkstoffe.

Mit dem gezielten Screening von Extrakten aus ausgewählten entomopathogenen Pilzen wurde systematisch nach zytotoxischen Sekundärmetaboliten gesucht. Die Tests resultierten in einer Vielzahl von Extrakten mit zytotoxischer Aktivität, deren intensivere Bearbeitung lohnt. Somit bestätigen die Befunde die Annahme, dass entomopathogene Pilze als Quelle zytotoxischer Substanzen angesehen werden können. Ebenso gelang es, diese Exakte mit einem entsprechenden Inhaltsstoffspektrum und einer vergleichbaren Aktivität zu reproduzieren. Im Dünnschichtchromatogramm konnten Alkaloide bei mehreren der zytotoxisch wirkenden Exakte detektiert werden, die für diese Aktivität verantwortlich sein könnten.

Unter den bisher wenig untersuchten Pilzspezies lieferte *I. catenianulata* RCEF 0525 einen in den MTT- und WST-1-Assays mit HeLa- bzw. Jurkat-Zellen zytotoxisch wirkenden Myzelextrakt aus der Emerskultur. Aus diesem Extrakt konnten mit Hilfe chromatographischer Verfahren vier zytotoxische Verbindungen isoliert werden, von denen zwei bisher unbekannte Naturstoffe darstellen. Die Strukturaufklärung dieser Verbindungen erfolgte mittels spektroskopischer und spektrometrischer Verfahren, vor allem jedoch mit zweidimensionalen hetero- sowie homonuklearen NMR-Methoden und MS. Zur Charakterisierung der isolierten Substanzen kamen die UV/Vis-Spektroskopie, die Polarimetrie, chromatographische Analysen und die Schmelzpunktbestimmung zum Einsatz. Die Sekundärmetabolite konnten als Cyclodepsipeptide identifiziert werden, die alternierend aus je einer oder drei N-Methylphenylalanin- und verzweigten 2-Hydroxycarbonsäureeinheiten aufgebaut sind. Zwei dieser Verbindungen, Beauvericin A (**4**) und Lateritin (**3**), wurden bereits aus anderen entomopathogenen Pilzen, beispielsweise *B. bassiana* bzw. *I. japonica* jedoch nicht aus *I. catenianulata*, isoliert. In Anlehnung an die Substanzgruppe der Beauvericine wurde das erstmals isolierte Hydroxyderivat mit Beauvericin J (**1**) bezeichnet. Eine weitere Substanz ist ein Diastereomer von Lateritin (**2a/2b**), dessen absolute Stereochemie nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Da der Extrakt in den Zytotoxizitäts-Assays Wirkung an den eingesetzten Zelllinien HeLa und Jurkat zeigte, wurden die isolierten Reinsubstanzen auf ihre zytotoxische Aktivität untersucht. Für die bisher bekannten Beauvericine und Lateritin ist eine vorwiegend apoptotische Wirkung auf humane Tumorzelllinien bekannt. Alle isolierten Verbindungen zeigen eine zytotoxische Aktivität in unteren μM -Bereich. Die potente Verbindung ist Beauvericin A (**4**), gefolgt von Lateritin (**3**) und

Beauvericin J (**1**). Das Diastereomer von Lateritin (**2a/2b**) hat eine deutlich schwächere Aktivität als Lateritin. Die Stereochemie steht demnach in Zusammenhang mit der zytotoxischen Wirkung dieser Substanzen, die somit wahrscheinlich über chirale Moleküle wie Rezeptoren oder Enzyme vermittelt wird.

Die Hauptkomponente Lateritin wurde im Proliferations-Assay auf eine zytostatische Aktivität geprüft, jedoch wurde die eindeutig zytotoxische Wirkung bei Konzentrationen über dem IC_{50} -Wert mit diesem Assay bestimmt. Im ECIS-Zytotoxizitäts-Assay wurde die apoptoseinduzierende Wirkung von Lateritin, die schon von Oh *et al.* beschrieben wurde, bestätigt.^[62] Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 50 μ M kommt es außerdem partiell zu nekrotischen Prozessen. Der Wirkmechanismus von Lateritin ist bisher wenig untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Vielzahl der Extrakte aus entomopathogenen Pilzen als zytotoxisch identifiziert und damit diese als Quelle neuer zytotoxischer Sekundärmetabolite erschlossen. Mit der Charakterisierung und Strukturaufklärung der gefundenen Substanzen gelang es erstmals, zwei unbekannte Verbindungen zusätzlich zu zwei bekannten Verbindungen aus der wenig naturstoffchemisch untersuchten Spezies *I. catenianulata* zu isolieren. Jede dieser Substanzen zeigt eine zytotoxische Wirkung, weshalb diese als Leitstrukturen in der Krebsforschung von pharmazeutischem Interesse sein könnten. Ein weiterer Aspekt zukünftiger Grundlagenforschung könnte die Aufklärung des Wirkmechanismus von Lateritin sein.

5 Summary

So far, little is known about entomopathogenic fungi as source of new cytotoxic agents. These organisms inhabit extreme habitats and are well adapted to their arthropod hosts. Because of the lethality of most fungal infections, it is discussed that cytotoxic or conceived in a more general term bioactive constituents synthesized by the fungi are involved in the progression of the infection. However, there is a great interest in new cytotoxic compounds in cancer research for drug development and investigations of new mechanisms of action. Natural products of microorganisms like fungi play an important role in further investigations as lead and active compounds.

In this systematic screening study, new cytotoxic metabolites were found in extracts of selected entomopathogenic fungi. A substantial number of bioactive extracts have already been identified by cytotoxicity assays. The bioactivity of these extracts has been reproduced to receive comparable constituents and similar activities. Alkaloids, which are discussed to be the active principles, were detected in many of these extracts by thin layer chromatography.

Cultivation of the strain *I. catenianulata* RCEF 0525 resulted in a mycelial extract, which shows effects in the cytotoxicity assays. Four cytotoxic compounds were isolated from this extract by chromatographic methods and characterised using UV/Vis spectroscopy, polarimetry, chromatographic analysis and melting point. The structures of these compounds were elucidated by means of spectroscopic and spectrometric methods, especially two dimensional homo- and heteronuclear NMR and MS. The compounds are cyclodepsipeptides composed of alternating N-methylphenylalanines (one or three) and branched 2-hydroxycarbonic acids (one or three). Two of these substances, beauvericin A (**4**) and lateritin (**3**), are already known from other entomopathogenic fungi, for example *B. bassiana* and *I. japonica* respectively, but not from *I. catenianulata*. Two compounds were isolated and identified in this study for the first time. The first is a hydroxyl derivative of beauvericin and was named beauvericin J (**1**). The second is a diastereomer of lateritin (**2a/2b**), whose absolute configuration remains still unclear.

The toxicity of the extract in assays with HeLa and Jurkat cells concluded us to test the isolated substances for their cytotoxic properties. The induction of apoptosis in human tumour cell lines of beauvericins and lateritin (**3**) is already known. Accordingly, all isolated compounds showed cytotoxic activity in lower μM range with beauvericin A (**4**) being the most cytotoxic compound, followed by lateritin (**3**) and beauvericin J (**1**). However, the diastereomer of lateritin (**2a/2b**) revealed significant lower activity in comparison to lateritin, showing that the stereochemistry influences the toxic effect. This results leads to the conclusion that the cytotoxic pathway is connected with chiral molecules like receptors or enzymes.

In ongoing investigations on the antiproliferative action of the major compound, lateritin (**3**) showed no cytostatic but cytotoxic properties in concentrations above the IC_{50} value. The results of the ECIS assays confirm the apoptosis-inducing action of lateritin, previously detected by Oh *et al.*^[62] In concentrations of 50 μM , partial necrotic effects could be observed. Up to now, the mechanism of action of lateritin is not fully understood.

In this study, a substantial number of cytotoxic extracts produced of entomopathogenic fungi were identified. The results show that these fungi can be a source of new natural compounds with cytotoxic effects. The characterisation and structure elucidation of compounds isolated from the mycelial extract of the less investigated *I. catenulata* resulted in two known and two unknown substances. Each compound isolated showed pronounced cytotoxic properties that make them maybe interesting as lead in cancer research. As further prospective, investigations on the cytotoxic signal pathway of lateritin are an interesting aspect to study.

6 Abkürzungen

6.1 Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
CLS	Cell Lines Service
COSY	correlated spectroscopy
DAB	Deutsches Arzneibuch
DC	Dünnschichtchromatographie
Dhiv	2,3-Dihydroxyisovaleriansäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECIS	electric cell-substrate impedance sensing
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoßionisierung
ESI	Elektronensprayionisierung
FAB	fast atom bombardment
FBS	fötales Kälberserum (fetal bovine serum)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure
Hiv	2-Hydroxyisovaleriansäure
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
Hmv	2-Hydroxy-3-methylvaleriansäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high performance liquid chromatography)
HR	high resolution
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration (inhibition concentration)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
MEM	Minimalmedium (minimal essential medium)
M _r	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
mTOR	eine Serin/Threonin-Protein-Kinase (mammalian target of rapamycin)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid
NAD(P)H	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid(phosphat)s (Abkürzung)
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren (non essential amino acids)
NMePhe	N-Methylphenylalanin
NMR	Kernresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
NOE	nuclear Overhauser enhancement/effect

NOESY	nuclear Overhauser enhancement spectroscopy
p. a.	Qualität für die Analyse (pro analysi)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PDA	Kartoffel-Dextrose-Agar (potato dextrose agar)
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch (Pharmacopoea Europaea)
rcf	relative Zentrifugalkraft (relative centrifugal force)
RNS	Ribonukleinsäure
ROESY	rotating frame Overhauser enhancement spectroscopy
RP-18	Umkehrphase, Kieselgel modifiziert mit Octadecylgruppen (reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro min (rotations per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SDAY	Sabouraud-Dextrose-Agar mit Hefeextrakt
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
TCM	Traditionelle Chinesische Medizin
UV/Vis	ultraviolet/visible
WHO	Weltgesundheitsorganisation (World Health Organization)
WST-1	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-tetrazolio]-1,3-benzodisulfonat

6.2 Symbolverzeichnis

<i>A</i>	Absorption
$[\alpha]^{20}_D$	spezifische Drehung
<i>d</i>	Durchmesser
δ	chemische Verschiebung, bezogen auf einen Standard
ε	molarer Absorptionskoeffizient
<i>h</i>	Höhe
nJ	Kopplungskonstante über <i>n</i> Bindungen
λ	Wellenlänge
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
<i>t_R</i>	Retentionszeit
<i>R_f</i>	Retardierungsfaktor

7 Literaturverzeichnis

- [1] Fabricant, D S; Farnsworth, N R: The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Persp* 106(Supp 1) (2001), 69-75.
- [2] Hamburger, M; Hostettmann K: Bioactivity in plants : The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30 (1991), 3864-3874.
- [3] Phillipson, J D: Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56 (2001), 237-243.
- [4] Rishton, G M: Natural products as a robust source of new drugs and drug leads : Past successes and present day issues. *Am J Cardiol* 101 (2008), 43D-49D.
- [5] Harvey, A: Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discov Today* 5 (2000), 294-300.
- [6] Demain, A L; Sanchez, S: Microbial drug discovery : 80 years of progress. *J Antibiot* 62 (2009), 5-16.
- [7] CABI Bioscience; CBS; Landcare Research (eds): Index fungorum. URL <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (UTC 2010-01-09, 14.00).
- [8] Bisby, F A; Roskov, Y R; Orrell, T M; Nicolson, D; Pagliarwa, L E; Bailly, N et al. (eds): Species 2000 & ITIS catalogue of life : 2009 annual checklist. URL <http://www.catalogueoflife.org/search.php> (UTC 2010-01-09, 14.00).
- [9] Cragg, G M; Newman, D J; Snader, K M: Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60 (1997), 52-60.
- [10] Roy, H E; Steinkraus, D C; Eilenberg, J; Hajek, A E; Pell, J K: Bizarre interactions and endgames : Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annu Rev Entomol* 51 (2006), 331-357.
- [11] Hibbett, D S; Binder, M; Bischoff, J F; Blackwell, M; Cannon, P F; Eriksson, O E et al.: A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res* 111 (2007), 509-547.
- [12] Glare, T R; Milner, R J: Ecology of entomopathogenic fungi. In: Arora, D K; Ajello, L; Mukerji, K G (eds): *Handbook of applied mycology : Humans, animals, and insects*. New York: Dekker (1991), 547-612.
- [13] Sung, G-H; Hywel-Jones, N L; Sung, J-M; Luangsa-ard, J J; Shrestha, B; Spatafora, J W: Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol* 57 (2007), 5-59.
- [14] State Pharmacopoeia Commission of the PRC (ed): *Cordyceps*. In: *Pharmacopoeia of the PRC 1*. People's Medical Publishing House (2005), 36.
- [15] State Pharmacopoeia Commission of the PRC (ed): *Bombyx batryticatus*. In: *Pharmacopoeia of the PRC 1*. Beijing: People's Medical Publishing House (2005), 6-7.
- [16] Shah, P A; Pell, J K: Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl Microbiol Biot* 61 (2003), 413-423.
- [17] Hajek, A E; St. Leger, R J: Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annu Rev Entomol* 39 (1994), 293-322.

- [18] Evans, H C: Entomogenous fungi in tropical forest ecosystem : An appraisal. *Ecol Entomol* 7 (1982), 47-60.
- [19] Isaka, M; Kittakoop, P; Kirtikara, K; Hywel-Jones, N L; Thebtaranonth, Y: Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Acc Chem Res* 38 (2005), 813-823.
- [20] Evans, H C: Mycopathogens of insects of epigeal and aerial habitants. In: Wilding, N; Collins, N M; Hammond, P M; Webber, J F (eds): *Insect-fungus interactions*. London: Acad Press (1989), 205-237.
- [21] Anke, H; Sterner, O: Insecticidal and nematicidal metabolites from fungi. In: Esser, K; Bennett, J K (eds): *The mycota : A comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research : Industrial application 10*. Berlin: Springer (2002), 109-128.
- [22] Huxham, I M; Lackie, A M; McCorkindale, N J: Inhibitory effects of cyclodepsipeptides, destruxins, from the fungus *Metarhizium anisopliae*, on cellular immunity in insects. *J Insect Physiol* 35 (1989), 97-105.
- [23] Vey, A; Quiot, J M: Effet cytotoxique *in vitro* et chez l'insecte hôte des destruxines, toxines cyclodepsipeptidiques produites par le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae*. *Can J Microbiol* 35 (1989), 1000-1008.
- [24] Cerenius, L; Thörnqvist, P-O; Vey, A; Johansson, M W; Söderhäll, K: The effect of the fungal toxin destruxin E on isolated crayfish haemocytes. *J Insect Physiol* 36 (1990), 785-789.
- [25] Benz, R: Alkali ion transport through lipid Bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. *J Membrane Biol* 43 (1978), 367-394.
- [26] Lemmens-Gruber, R; Kamyar, M R; Dornetshuber, R: Cyclodepsipeptides – potential drugs and lead compounds in the drug development process. *Curr Med Chem* 16 (2009), 1122-1137.
- [27] Peeters, H; Zocher, R; Kleinkauf, H: Synthesis of beauvericin by a multifunctional enzyme. *J Antibiot* 41 (1988), 352-359.
- [28] Kleinkauf, H; Döhren, H: Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *Eur J Biochem* 192 (1990), 1-15.
- [29] Roberts, D W: Toxins from the entomogenous fungus *Metarrhizium anisopliae* : Isolation of destruxins from submerged cultures. *J Invertebr Pathol* 14 (1969), 82-88.
- [30] Suzuki, A; Taguchi, H; Tamura, S: Isolation and structure elucidation of three new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarrhizium anisopliae*. *Agr Biol Chem* 34 (1970), 813-816.
- [31] Païs, M; Das, B C; Ferron, P: Depsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 20 (1981), 715-723.
- [32] Gupta, S; Roberts, D W; Renwick, J A A: Preparative isolation of destruxins from *Metarhizium anisopliae* by high performance liquid chromatography. *J Liq Chromatogr* 12 (1989), 383-395.
- [33] Jegorov, A; Matha, V; Sedmera, P; Roberts, D W: Dihydrodestruxin A: A natural destruxin from *Metarhizium anisopliae*. *Phytochemistry* 31 (1992), 2669-2670.
- [34] Wahlman, M; Davidson, B S: New destruxins from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *J Nat Prod* 56 (1993); 643-647.

- [35] Vilcinskas, A; Matha, V; Götz, P: Effect of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmocytes isolated from the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol* 43 (1997), 1149-1159.
- [36] Loutelier, C; Cherton, J-C; Lange, C; Traris, M; Vey, A: Studies on the dynamics of the production of destruxins by *Metarhizium anisopliae* : Direct high-performance liquid chromatographic and fast atom bombardment mass spectrometric analysis correlated with biological activity tests. *J Chromatogr A* 738 (1996), 181-189.
- [37] Odier, F; Vey, A; Bureau, J P: *In vitro* effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells : Study of destruxins A, B and E. *Biol Cell* 74 (1992), 267-271.
- [38] Samuels, R I; Reynolds, S E; Charnley, A K: Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Comp Biochem Physiol* 90C (1988), 403-412.
- [39] Dumas, C; Matha, V; Quiot, J-M; Vey, A: Effects of destruxins, cyclic depsipeptide mycotoxins, on calcium balance and phosphorylation of intracellular proteins in lepidopteran cell lines. *Comp Biochem Physiol* 114C (1996), 213-219.
- [40] Itoh, N; Okochi, M; Tagami, S; Nishitomi, K; Nakayama, T; Yanagida, K et al.: Destruxin E decreases beta-amyloid generation by reducing colocalization of beta-amyloid-cleaving enzyme 1 and beta-amyloid protein precursor. *Neurodegener Dis*, published online (2009-09-09), 1-10.
- [41] Hamill, R L; Higgens, C E; Boaz, M E; Gorman, M: The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett* 49 (1969), 4255-4258.
- [42] Žižka, J; Weiser, J: Effect of beauvericin, a toxic metabolite of *Beauveria bassiana*, on the ultrastructure of *Culex pipiens autogenicus* larvae. *Cytobios* 75 (1993), 13-19.
- [43] Gupta, S; Montllor, C; Hwang, Y-S: Isolation of novel beauvericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. *J Nat Prod* 58 (1995), 733-738.
- [44] Nilanonta, C; Isaka, M; Kittakoop, P; Palittapongarnpim, P; Kamchonwongpaisan, S; Pittayakhajonwut, D et al.: Antimycobacterial and antiplasmodial cyclodepsipeptides from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Planta Med* 66 (2000), 756-758.
- [45] Calò, L; Fornelli, F; Nenna, S; Tursi, A; Caiaffa, M F; Macchia, L: Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9. *J Appl Genet* 44 (2003), 515-520.
- [46] Calò, L; Fornelli, F; Ramires, R; Nenna, S; Tursi, A; Caiaffa, M F; Macchia, L: Cytotoxic effects of the mycotoxin beauvericin to human cell lines of myeloid origin. *Pharmacol Res* 49 (2004), 73-77.
- [47] Fukuda, T; Arai, M; Yamaguchi, Y; Masuma, R; Tomoda, H; Ōmura, S: New beauvericins, potentiators of antifungal miconazol activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366 : I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot* 57 (2004), 110-116.
- [48] Jow, G-M; Chou, C-J; Chen, B-F; Tsai, J-H: Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukaemia cells through cytochrom c release, caspase 3 activation : The causative role of calcium. *Cancer Lett* 216 (2004), 165-173.
- [49] Tang, C-Y; Chen, Y-W; Jow, G-M; Chou C-J; Jeng, C-J: Beauvericin activates Ca^{2+} -activated Cl^- currents and induces cell deaths in *Xenopus* oocytes via influx of extracellular Ca^{2+} . *Chem Res Toxicol* 18 (2005), 825-833.

- [50] Luangsa-ard, J J; Berkaew, P; Ridkaew, R; Hywel-Jones, N L; Isaka, M: A beauvericin hot spot in the genus *Isaria*. *Mycol Res* 113 (2009), 1389-1395.
- [51] Elsworth, J F; Grove, J F: Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals. : Part 1. Beauverolides H and I. *J Chem Soc Perk T 1* (1977), 270-273.
- [52] Elsworth, J F; Grove, J F: Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana*. : Part 2. Beauverolides A to F and their relationship to isaroide. *J Chem Soc Perk T 1* (1980), 1795-1799.
- [53] Grove, J F: Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana*. : Part 3. The isolation of Beauverolides Ba, Ca, Ja, and Ka. *J Chem Soc Perk T 1* (1980), 2878-2880.
- [54] Mochizuki, K; Ohmori, K; Tamura, H; Shizuri, Y; Nichiyama, S; Miyoshi, E; Yamamura, S: The structure of bioactive cyclodepsipeptides, beauveriolides I and II, metabolites of entomopathogenic fungi *Beauveria* sp. *Bull Chem Soc Jpn* 66 (1993), 3041-3046.
- [55] Jegorov, A; Sedmera, P; Matha, V; Šimek, P; Zahradníčková, H; Landa, Z; Eyal, J: Beauverolides L and La from *Beauveria tenella* and *Paecilomyces fumosoroseus*. *Phytochemistry* 37(1994), 1301-1303.
- [56] Tomoda, H; Doi, T: Discovery and combinatorial synthesis of fungal metabolites beauveriolides, novel antiatherosclerotic agens. *Accounts Chem Res* 41 (2008), 32-39.
- [57] Suzuki, A; Kanaoka, M; Isogai, A; Murakoshi, S; Ichinoe, M; Tamura, S: Bassianolide, a new insecticidal cyclodepsipeptide from *Beauveria bassiana* and *Verticillium lecanii*. *Tetrahedron Lett* 25 (1977), 2167-2170.
- [58] Deol, B S; Ridley, D D; Singh, P: Isolation of cyclodepsipeptides from plant pathogenic fungi. *Aust J Chem* 31 (1978), 1397-1399.
- [59] Sabareech, V; Ranganayaki, R S; Raghothama, S; Bopanna, M P; Balaram, H; Srinivasan, M C; Balaram, P: Identification and characterization of a library of microheterogeneous cyclohexadepsipeptides from the fungus *Isaria*. *J Nat Prod* 70 (2007), 715-729.
- [60] Hasumi, K; Shinohara, C; Iwanaga, T; Endo, A: Lateritin, a new inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Gibberella lateritium* IFO 7188. *J Antibiot* 46 (1993), 1782-1787.
- [61] Kagamizono, T; Nishino, E; Matsumoto, K; Kawashima, A; Kishimoto, M; Sakai, N et al.: Bassiatin, a new platelet aggregation inhibitor produced by *Beauveria bassiana* K-717. *J Antibiot* 48 (1995), 1407-1412.
- [62] Oh, H; Kim, T; Oh, G-S; Pae, H-O; Hong, K-H; Chai, K-Y et al.: (3R,6R)-4-Methyl-6-(1-methylethyl)-3-phenylmethyl-perhydro-1,4-oxazine-2,5-dione: An apoptosis-inducer from the fruiting bodies of *Isaria japonica*. *Planta Med* 68 (2002), 345-348.
- [63] Isogai, A; Suzuki, A; Higashikawa, S; Kuyama, S; Tamura, S: Isolation and biological activity of a peptidal antibiotic P168. *Agric Biol Chem* 45 (1981), 1023-1024.
- [64] Rossi, C; Tuttobello, L; Ricci, M; Casinovi, C G; Radics, L: Leucinostatin D, a novel peptide antibiotic from *Paecilomyces marquandii*. *J Antibiot* 40 (1987), 130-133.
- [65] Radics, L; Kajtar-Peredy, M; Casinovi, C G; Rossi, C; Ricci, M; Tuttobello, L: Leucinostatins H and K, two novel peptide antibiotics with tertiary amine-oxide terminal group from *Paecilomyces marquandii* : Isolation, structure and biological activity. *J Antibiot* 40 (1987), 714-716.

- [66] Otoguro, K; Ui, H; Ishiyama, A; Arai, N; Kobayashi, M; Takahashi, M et al.: In vitro antimalarial activities of the microbial metabolites. *J Antibiot* 56 (2003), 322-324.
- [67] 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. *Int J Cancer* 126 (2010), 810-818.
- [68] Krasnoff, S B; Gupta, S; St. Leger, R J; Renwick, J A A; Roberts, D W: Antifungal and insecticidal properties of the efrapeptins : Metabolites of the fungus *Tolypocladium niveum*. *J Invertebr Pathol* 58 (1991), 180-188.
- [69] Gupta, S; Krasnoff, S B; Roberts, D W; Renwick, J A A; Brinen, L S; Clardy, J: Structure of efrapeptins from the fungus *Tolypocladium niveum*: Peptide inhibitors of mitochondrial ATPase. *J Org Chem* 57 (1992), 2306-2313.
- [70] Aldridge, D C; Turner, W B: Structures of cytochalasins C and D. *J Chem Soc C* (1969), 924-928.
- [71] Fujii, Y; Tani, H; Ichinoe, M; Nakajima, H: Zygosporin D and two new cytochalasins produced by the fungus *Metarrhizium anisopliae*. *J Nat Prod* 63 (2000), 132-135.
- [72] Lee, D H; Park, T; Kim, H W: Induction of apoptosis by disturbing mitochondrial-membrane potential and cleaving PARP in Jurkat T cells through treatment with acetoxyssirpenol mycotoxins. *Biol Pharm Bull* 29 (2006), 648-654.
- [73] Kikuchi, H; Miyagawa, Y; Sahashi, Y; Inatomi, S; Haganuma, A; Nakahata, N et al.: Novel trichothecanes, paecilomycine A, B, and C, isolated from entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. *Tetrahedron Lett* 45 (2004), 6225-6228.
- [74] Kikuchi, H; Miyagawa, Y; Sahashi, Y; Inatomi, S; Haganuma, A; Nakahata, N et al.: Novel spirocyclic trichothecanes, spirotenuipesine A and B, isolated from entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. *J Org Chem* 69 (2004), 352-356.
- [75] Kikuchi, H; Miyagawa, Y; Nakamura, K; Sahashi, Y; Inatomi, S; Oshima, Y: A novel carbon skeletal trichothecane, tenuipesine A, isolated from an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes*. *Org Lett* 6 (2004), 4531-4533.
- [76] Jeffs, L B; Khachatourians, G G: Toxic properties of *Beauveria* pigments on erythrocyte membranes. *Toxicon* 35 (1997), 1351-1356.
- [77] Takahashi, S; Uchida, K; Kakinuma, N; Hashimoto, R; Yanagisawa, T; Nakagawa, A: The structures of pyridovericin and pyridomacrolidin, new metabolites from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *J Antibiot* 51 (1998), 1051-1054.
- [78] Isaka, M; Tantcharoen, M; Kongsaeree, P; Thebtaranonth, Y: Structures of cordypyridones A-D, antimalarial N-hydroxy- and N-methoxy-2-pyridones from the insect pathogenic fungus *Cordyceps nipponica*. *J Org Chem* 66 (2001), 4803-4808.
- [79] Schmidt, K; Günther, W; Stoyanova, S; Schubert, B; Li, Z; Hamburger, M: Militarinone A, a neurotrophic pyridine alkaloid from *Paecilomyces militaris*. *Org Lett* 4 (2002), 197-199.
- [80] Wagenaar, M M; Gibson, D M; Clardy, J: Akanthomycin, a new antibiotic pyridine from the entomopathogenic fungus *Akanthomyces gracilis*. *Org Lett* 4 (2002), 671-673.
- [81] Schmidt, K; Riese, U; Li, Z; Hamburger, M: Novel tetramic acids and pyridone alkaloids, militarinones B, C, and D, from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces militaris*. *J Nat Prod* 66 (2003), 378-383.

- [82] Cheng, Y; Schneider, B; Riese, U; Schubert, B; Li, Z; Hamburger, M: Farinosones A-C, neurotrophic alkaloidal metabolites from the entomogenous deuteromycete *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod* 67 (2004), 1854-1858.
- [83] Lang, G; Blunt, J W; Cummings, N J; Cole, A L J; Munro, M H G: Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod* 68 (2005), 810-811.
- [84] Cheng, Y; Schneider, B; Riese, U; Schubert, B; Li, Z; Hamburger, M: (+)-N-Deoxymilitarinone A, a neuritogenic pyridine alkaloid from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod* 69 (2006), 436-438.
- [85] Tang, J-L; Liu, B-Y; Ma, K-W: Traditional Chinese medicine. *Lancet* 372 (2008), 1938-1940.
- [86] Zhou, X; Gong, Z; Su, Y; Lin, J; Tang, K: Cordyceps fungi : Natural products, pharmacological functions and developmental products. *J Pharm Pharmacol* 61 (2009), 279-291.
- [87] Zhu, J-S; Halpern, G M; Jones, K: The scientific rediscovery of an ancient Chinese herbal medicine: *Cordyceps sinensis* : Part I. *J Altern Complem Med* 4 (1998), 289-303.
- [88] Zhu, J-S; Halpern, G M; Jones, K: The scientific rediscovery of a precious ancient Chinese herbal regimen: *Cordyceps sinensis* : Part II. *J Altern Complem Med* 4 (1998), 429-457.
- [89] Scholte, E-J; Knols, B G J; Samson, R A; Takken, W: Entomopathogenic fungi for mosquito control : A review. *J Insect Sci* 4 (2004), 1-24.
- [90] Kanzok, S M; Jacobs-Lorena, M: Entomopathogenic fungi as biological insecticides to control malaria. *Trends Parasitol* 22 (2006), 49-51.
- [91] World Health Organisation (ed): Fact sheet No 297 : Cancer. (2009-02), URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> (UTC 2010-01-18, 16.00).
- [92] Parkin, D M; Bray, F; Ferlay, J; Pisani, P: Estimating the world cancer burden : Globocan 2000. *Int J Cancer* 94 (2001), 153-156.
- [93] World Health Organisation (ed): Fact sheet No 310 : The top ten causes of death. (2008-11), URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> (UTC 2010-01-18, 16.00).
- [94] Lüllmann, H; Mohr, K: Antineoplastische Wirkstoffe. In: *Pharmakologie und Toxikologie : Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen*. 14. Auflage. Stuttgart: Thieme (1999), 452-463.
- [95] Balducci, L: Molecular insights in cancer treatment and prevention. *Int J Biochem Cell Biol* 39 (2007), 1329-1336.
- [96] Butler, M S; Newman, D J: Mother nature's gifts to diseases of man : The impact of natural products on anti-infective, anticholesteremics and anticancer drug discovery. In: Petersen, F; Amstutz, R: *Progress in drug research 65: Natural compounds as drugs I*. Basel: Birkhäuser (2008), 3-44.
- [97] Bailly, C: Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochem Pharmacol* 77 (2009), 1447-1457.
- [98] Liang, Z Q; Han, Y F; Chu, H L; Liu, A Y: Studies on the genus *Paecilomyces* in China. I. *Fungal Divers* 20 (2005), 83-101.

- [99] Schmidt, K; Li, Z; Schubert, B; Huang, B; Stoyanova, S; Hamburger, M: Screening of entomopathogenic deuteromycetes for activities on targets involved in degenerative diseases of the central nervous system. *J Ethnopharmacol* 89 (2003), 251-260.
- [100] Gey, G O; Coffman, W D; Kubicek, M T: Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res* 12 (1952), 264-265.
- [101] Scherer, W F; Syverton, J T; Gey, G O: Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses : IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97 (1953), 685-710.
- [102] Gillis, S; Watson, J: Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules : V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med* 152 (1980), 1709-1719.
- [103] Mosmann, T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1983), 55-63.
- [104] Liu, Y; Peterson, D A; Kimura, H; Schubert, D: Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthialol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69 (1997), 581-593.
- [105] Bruggisser, R; von Daeniken, K; Jundt, G; Schaffner, W; Tullberg-Reinert, H: Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med* 68 (2002), 445-448.
- [106] Berridge, M V; Tan, A S; McCoy, K D; Wang, R: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* 4 (1996), 14-19.
- [107] Roche Applied Science: Cell proliferation kit I (MTT). Pack Insert. Mannheim: Roche Diagnostics (2005-09).
- [108] Ishiyama, M; Tominaga, H; Shiga, M; Sasamoto, K; Ohkura, Y; Ueno, K et al.: Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produces a water-soluble formazan dye. *In Vitro Toxicol* 8 (1995), 187-190.
- [109] Roche Applied Science: Cell proliferation reagent WST-1. Pack Insert. Mannheim: Roche Diagnostics (2005-07).
- [110] Jirakkakul, J; Punya, J; Pongpattanakitshot, S; Paungmoung, P; Vorapreeda, N; Tachaleat, A et al.: Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria* sp. BCC1067. *Microbiol* 154 (2008), 995-1006.
- [111] Asaff, A; Cerdá-García-Rojas, C; de la Torre, M: Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68 (2005), 542-547.
- [112] Fritsche, W: Wachstum und Differenzierung der Pilze. In: *Mikrobiologie*. 1. Auflage. Jena: Gustav Fischer (1990), 267-268.
- [113] Henke, H: Mobile Phasen. In: *Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20*. Obernburg: Henke (1994), 101-178.
- [114] U.S. Secretary of Commerce on behalf of the United States of America (ed): NIST Chemistry WebBook : NIST Standard Reference Database Number 69. URL <http://webbook.nist.gov/chemistry/#Search> (UTC 2010-04-17, 20.00).

- [115] National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST): Spectral Database for Organic Compounds SDBS. URL http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi (UTC 2010-04-17, 20.30).
- [116] Paik, Y-K; Trzaskos, J M; Shafiee, A; Gaylor, J L: Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from Lanosterol : Characterization, solubilization, and partial purification of NADPH-dependent $\Delta^{8,14}$ -steroid 14-reductase. *J Biol Chem* 295 (1984), 13413-13423.
- [117] Weete, J D: Sterols of the fungi : distribution and biosynthesis. *Phytochemistry* 12 (1973), 1843-1864.
- [118] Schroepfer, G J, Jr: Sterol Biosynthesis. *Ann Rev Biochem* 51 (1982), 555-585.
- [119] Pettit, R K; Pettit, G R; Xu, J-P; Weber, C; Richert, L A: Isolation of human cancer cell growth inhibitory, antimicrobial lateritin from a mixed fungal culture. *Planta Med* 76 (2010), 500-501.
- [120] Huges, A B; Sleefs, M M: Total synthesis of bassiatin and its stereoisomers : Novel divergent behavior of substrates in Mitsunobu cyclization. *J Org Chem* 70 (2005), 3079-3088.
- [121] Friebolin, H: Kern-Overhauser-Effekt : Experimentelle Aspekte. In: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie : Eine Einführung. 4. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH (2006), 303-304.
- [122] Xu, Y; Wijeratne, E M K; Espinosa-Artiles, P; Gunatilaka, A A L; Molnár, I: Combinatorial mutasynthesis of scrambled beauvericins, cyclooligomer depsipeptide cell migration inhibitors from *Beauveria bassiana*. *Chembiochem* 10 (2009), 345-354.
- [123] Farlie, D P; Abbenante, G; March, D R: Macro cyclic peptidomimetics : Forcing peptides into bioactive conformations. *Current Med Chem* 2 (1995), 654-686.
- [124] Nilanonta, C; Isaka, M; Kittakoop, P; Trakulanleamsai, S; Tanticharoen, M; Thebtaranonth, Y: Precursor-directed biosynthesis of beauvericin analogs by the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Tetrahedron Lett* 58 (2002), 3355-3360.
- [125] Maiya, S; Grundmann, A; Li, S-M; Turner, G: The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus* : Identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem* 7 (2006), 1062-1069.
- [126] Fukuda, T; Arai, M; Tomoda, H; Ōmura, S: New beauvericins, potentiators of antifungal miconazol activity, produced by *Beauveria* sp. FKI-1366 : II. Structure elucidation. *J Antibiot* 57 (2004), 117-124.
- [127] Gillies, R J; Didier, N; Denton, M: Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159 (1986), 109-113.
- [128] Giaever, I; Keese, C R: Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (1984), 3761-3764.
- [129] Giaever, I; Keese, C R: A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 336 (1993), 591-592.
- [130] Keese, C R; Karra, N; Dillon, B; Goldberg, A M; Giaever, I: Cell-substratum interactions as a predictor of cytotoxicity. *In Vitro Mol Toxicol* 11 (1998), 183-192.
- [131] Rädler, U; Wegener, J: Impedanzbasiertes Screening adhärenter Zellen. *Biospektrum* 15 (2009), 474-476.

- [132] Wegener, J; Keese, C R; Giaever, I: Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a non-invasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res* 259 (2000), 158-166.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2006 bis Juli 2010 am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Institut für Pharmazie der Universität Regensburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Jörg Heilmann angefertigt. Bei ihm bedanke ich mich besonders für die Vergabe des interessanten Themas, die konstruktiven Diskussionen und die Schaffung der angenehmen Arbeitsbedingungen.

Herrn Prof. Dr. Matthias Hamburger (Abteilung Pharmazeutische Biologie, Pharmazeutisches Institut der Universität Basel, Schweiz) danke ich für die Bereitstellung der Extrakte aus der Extraktbibliothek sowie der entomopathogenen Pilzstämme, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, und für seine Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Joachim Wegener (Institut für Analytische Chemie, Chemo- und Biosensorik der Universität Regensburg) für die zeitaufwendigen Durchführungen der ECIS-Assays und die hilfreichen Diskussionen zur Auswertung. Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. Bärbel Schubert (Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena) für die Hinweise zur Kultivierung der Pilze und zur Extraktherstellung und Herrn Dr. Helmut Besl (Institut für Botanik der Universität Regensburg) für die Überlassung zahlreicher Fernbachkolben und die Anregung zur Kultivierung in diesen, Frau Dr. Birgit Kraus und Herrn Dr. Guido Jürgenliemk für die zahlreichen wertvollen Anregungen und die Unterstützung im Zusammenhang mit dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Zentralen Analytik der Universität Regensburg sei hier für die Aufnahmen der NMR- und Massenspektren gedankt. Für ihre Unterstützung bei den praktischen Arbeiten möchte ich den Wahlpflichtpraktikanten Sonja Weißmüller und Sara Wennige sowie den Chemicolaboratenlehrlingen Sabrina Michalski und Alexandra Firmberger danken.

Sarah Sutor, Anne Freischmidt, Magdalena Motyl und Rosmarie Scherübl danke ich für die kritische Durchsicht der Dissertationsschrift.

All meinen Kollegen, ehemaligen Kollegen und Freunden am Lehrstuhl und an den Nachbarlehrstühlen danke ich für die sehr freundliche Arbeitsatmosphäre und ihre stetige Diskussionsbereitschaft, die fortwährend ein fruchtbare Nährboden für meine Arbeit waren und mir in guter Erinnerung bleiben werden.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Lebensgefährten Uwe Conrad und bei meiner Familie, die mich über den gesamten Zeitraum motivierend unterstützt und viel Verständnis, vor allem in der Schlussphase, für mich aufgebracht haben.

Ferner gilt mein Dank allen, die, ohne namentlich erwähnt zu sein, zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.