

**Untersuchungen zum
Primär- und Sekundärstoffinventar
von Kaltwasserschwämmen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich
Geowissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Michael Holzwarth

aus Bretten

Hamburg, 2005

Als Dissertation angenommen vom Fachbereich Geowissenschaften der Universität Hamburg

auf Grund der Gutachten von Prof. Dr. Walter Michaelis
(Universität Hamburg)

und Prof. Dr. Volker Thiel
(Universität Göttingen)

Hamburg, den 14.07.2005

Prof. Dr. H. Schleicher

Dekan
des Fachbereichs Geowissenschaften

Danksagung	V
Abkürzungen	VI
1 Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Einleitung	1
1.1.1 Entwicklung der Naturstoffchemie.....	1
1.1.2 Substanzen mariner Herkunft als Wirkstoffe	3
1.2 Zielsetzung	7
1.2.1 Forschungsgegenstand	7
1.2.2 Aufgabenstellung	7
2 Theoretische Grundlagen	9
2.1 Phylogenie und Physiologie von Porifera.....	9
2.1.1 Phylogenetische Einordnung der Schwämme.....	9
2.1.2 Klassifizierung von Schwämmen	10
2.1.3 Physiologie und Ökologie von Schwämmen.....	11
2.2 Chemische Differenzierung biogener Substanzen.....	13
2.2.1 Primärstoffe	13
2.2.2 Sekundärstoffe	14
2.3 Naturstoffscreening.....	22
2.3.1 Chemisches und physikochemisches Screening	22
2.3.2 Biologisches Screening	23
3 Ergebnisse und Diskussion.....	24
3.1 Analytische Methodenauswahl.....	24
3.2 Chemische Analyse von <i>Plakortis simplex</i>	26
3.2.1 Fettsäureinventar	26
3.2.2 Fraktion 1	31
3.2.3 Fraktion 2a	35
3.2.4 Fraktion 2b.....	36
3.2.5 Fraktion 3	50
3.3 Chemische Analyse von <i>Axinella rugosa</i>	67
3.3.1 Fettsäureinventar	67
3.3.2 Fraktion 1	73
3.3.3 Fraktion 2/3.....	74

4	Experimentelles	88
4.1	Herkunft und Beschreibung der Proben	88
4.1.1	Herkunft des Probenmaterials	88
4.1.2	Probenbeschreibung	90
4.2	Analytische Methoden.....	91
4.2.1	Chemikalien und Lösungsmittel	91
4.2.2	Manuelle und apparative Techniken	91
4.2.3	Probenbearbeitung	94
4.2.4	Bestimmung von Fettsäureverteilungen	96
4.3	Isolierung von Naturstoffen.....	100
4.3.1	Cyclische Peroxide aus <i>Plakortis simplex</i>	100
4.3.2	Tryptophanamide aus <i>Plakortis simplex</i>	100
4.3.3	Terpenoide aus <i>Axinella rugosa</i>	101
5	Zusammenfassung	102
6	Literatur.....	104
7	Anhang.....	113
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	113
7.1.1	Abbildungen.....	113
7.1.2	Tabellen	116
7.2	Relative Mengenanteile und <i>ECL</i> -Werte von Lipiden.....	117
7.2.1	Membranlipide von <i>Plakortis simplex</i>	117
7.2.2	Membranlipide von <i>Axinella rugosa</i>	118
7.3	IR-Transmissionsspektren.....	119
7.3.1	Standards	119
7.3.2	Fettsäuremethylester aus <i>Plakortis simplex</i>	119
7.4	NMR-Spektren	120
7.4.1	(3 <i>R</i> *,6 <i>S</i> *, <i>Z</i>)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-ensäuremethylester (50).....	120
7.4.2	(3 <i>R</i> *,6 <i>S</i> *, <i>Z</i>)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylester (51).....	124
7.4.3	<i>N</i> -(2,4-Diethyloct-3-enyl)tryptophanmethylester (76).....	128
7.4.4	<i>N</i> -(2,4-Diethylnon-3-enyl)tryptophanmethylester (77)	131
7.4.5	(4 <i>S</i> *,5 <i>R</i> *,6 <i>S</i> *,7 <i>S</i> *)-1-Isocyanoaromadendran (115)	135
7.4.6	8(17),14-Labdadien-13-ol (116).....	139
7.5	Veröffentlichung.....	143

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Walter Michaelis für die interessante Themenstellung, seine stete Diskussionsbereitschaft sowie die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Volker Thiel danke ich für die Einführung in den Themenkomplex „Porifera“ sowie seine Hilfsbereitschaft besonders bei massenspektrometrischen Angelegenheiten.

Für seine Unterstützung und insbesondere auch die durch seine gesamte Arbeitsgruppe danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Francke. Herrn Dr. Stefan Franke möchte ich für die Anfertigung hochaufgelöster Massenspektren ebenso danken, wie Herrn Dr. Volker Sinnwell und seinem Team für die Durchführung NMR-spektroskopischer Experimente. Herrn Prof. Dr. Pierre Albrecht und Herrn Dr. Jean-Michel Trendel (*Université Strasbourg*), die mich gleichermaßen mit der Anfertigung von Massen- und NMR-Spektren unterstützten, sei ebenfalls gedankt.

Ein besonderer Dank geht an meine Kollegen Dr. Martin Blumenberg und Dr. Thomas Pape für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen zu denen sie jederzeit bereit waren und die wesentlichen Einfluss auf diese Arbeit genommen haben. Darüber hinaus danke ich Dr. T. Pape für seine ausgezeichneten Dienste zur Projektkoordination und Dr. M. Blumenberg für viele technische Hilfestellungen sowie die massenspektrometrische Bestimmung von Isotopenverhältnissen.

Mein herzlicher Dank geht auch an Gabriele Thal, die das Manuskript dieser Arbeit redigierte.

Für eine überaus angenehme Arbeitsatmosphäre zeichnen sich alle ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen verantwortlich, mit denen ich eine gemeinsame Zeit in der Arbeitsgruppe verbringen durfte. Dies sind Dr. Eva Annweiler, Peggy Bartsch, Sabine Beckmann, Dr. Martin Blumenberg, Dr. Sabine Brasse, Dr. Oliver Christof, Dr. Nikolai Delling, Dr. Siegmund Ertl, Jan-Hendrik Klock, Phillip Kölle, Dr. Ralf Lendt, Dr. Thomas Pape, Dr. Richard Seifert, Ariane Seraphin, Claudia Sill, Dr. Alfred Steinbach, Dr. Gerardus Versteegh, Stefan Weber und Dr. Andrea Wieland. Ihnen allen möchte ich herzlich danken, besonders aber S. Beckmann für die vorbildliche Organisation des Laborbetriebes sowie Dr. O. Christof und P. Bartsch für viele freundschaftliche Aufmunterungen abseits der Wissenschaft.

Weiterer Dank gebührt meinen Projektkollegen der Arbeitsgruppe Prof. W. Francke, namentlich Karsten Fehler, Dr. Sven Possner und Dr. Susanne Sölter, die mir mit zahlreichen Diensten bei chemischen Problemstellungen zur Seite standen.

Schließlich möchte ich meiner gesamten Familie für ihr beständiges Vertrauen und ihre anhaltende Unterstützung auf meinem Lebensweg innigst danken.

Mein abschließender Dank gilt meiner Tochter Helena Sophie, die mein Leben fortwährend um so viele schöne Erfahrungen bereichert.

Abkürzungen

<i>ai</i>	<i>anteiso</i> (ω 3-methylverzweigt)
BHT	Bacteriohopan-32,33,34,35-tetrol
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BOSMAN	Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CH ₃ CN	Acetonitril
CoA	Coenzym A
COSY	zweidimensionale korrelierte Spektroskopie (<i>correlated spectroscopy</i>)
d	Dublett
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindo-dihydrochlorid
DBE	Doppelbindungsäquivalente (<i>double bond equivalents</i>)
DEPT	zerstörungsfreie Verstärkung durch Polarisationstransfer (<i>distortionless enhancement by polarisation transfer</i>)
ECL	äquivalenter Kettenlängenwert (<i>equivalent chain length</i>)
<i>et al.</i>	und weitere (<i>et alii</i>)
EI	Elektronenstoßionisation (<i>electron impact</i>)
EIMS	Massenspektrometrie mit Elektronenstoßionisation
Et ₂ O	Diethylether
EtOH	Ethanol
FABMS	Massenspektrometrie mit Ionisation durch schnellen Atombeschuss (<i>fast atom bombardement mass spectrometry</i>)
FAME	Fettsäuremethylester (<i>fatty acid methyl ester</i>)
FID	Flammenionisationsdetektor (<i>flame ionisation detector</i>)
GC	Gaschromatographie
GC/C/IRMS	Gaschromatographie mit Isotopenverhältnismassenspektrometrie über eine Verbrennungseinheit gekoppelt (<i>gas chromatography / combustion / isotope ratio mass spectrometry</i>)
GC/MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie gekoppelt
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HMBC	Heteronukleare mehrfache Bindungskohärenz (<i>heteronuclear multiple bond correlation</i>)
HMQC	Heteronukleare mehrfache Quantenkohärenz (<i>heteronuclear multiple quantum coherence</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRFABMS	Hochaufgelöste FABMS (<i>high resolution FABMS</i>)
HRMS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (<i>high resolution mass spectrometry</i>)

Abkürzungen

HSQC	Heteronukleare einfache Quantenkohärenz (<i>heteronuclear single quantum coherence</i>)
<i>i</i>	<i>iso</i> (ω 2-methylverzweigt)
IC_{50}	halbmaximale inhibitorische Konzentration (halbmaximale Hemmkonzentration, 50 % <i>inhibitory concentration</i>)
IR	Infrarot, Infrarotspektroskopie
IRMS	Isotopenverhältnismassenspektrometrie (<i>isotope ratio mass spectrometry</i>)
i.Vak.	im Vakuum
<i>J</i>	Kopplungskonstante
$^xJ_{A,B}$	NMR-Kopplung zwischen einem Atom A und einem Atom B über x Bindungen
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>liquid chromatography</i>)
<i>m</i>	mittkettig methylverzweigt
m	Multiplett
M	Molekülmasse
M ⁺ •	Molekülion
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Verhältnis von Masse zu Ladung
N	Äquivalentkonzentration (normale Konzentration, Normalität)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMR	magnetische Kernresonanzspektroskopie (<i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (<i>nuclear Overhauser effect</i>)
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt Spektroskopie (<i>nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
PENDANT	<i>polarisation enhancement that is nurtured during attached nucleus testing</i>
ppm	Teile pro Million (<i>parts per million</i>)
q	Quadruplett
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SPE	Festphasenextraktion (<i>solid phase extraction</i>)
t	Triplett
TIC	Totalionenstrom (<i>total ion current</i>)
TMCS	Trimethylchlorsilan
TP	Teilprojekt (im Verbundprojekt BOSMAN)
u	atomare Masseneinheit (<i>atomic mass unit</i>) entspricht dem zwölften Teil der Masse eines Atoms des Kohlenstoffisotops ¹² C (= 1.660566 x 10 ⁻²⁴ g)
UV/VIS	Spektralphotometrie im ultravioletten und sichtbaren (<i>visible</i>) Bereich des Lichts
<i>v</i>	Nahe der Carbonylfunktion methylverzweigt
VPDB	Vienna PeeDee Belemnite (¹³ C/ ¹² C-Isotopenstandard)

Abkürzungen

$\gamma(A-B)$	Deformationsschwingungen aus der Ebene (<i>out of plane</i>) der Bindung zwischen den Atomen A und B
δ_A	chemische Verschiebung eines Atoms A
$\delta(A-B)$	Deformationsschwingungen (Beugeschwingungen) in der Ebene (<i>in plane</i>) der Bindung zwischen den Atomen A und B
Δ	Positonsbezeichnung von Kohlenstoffatomen in Fettsäuren nach Zählweise, ausgehend vom Carbonylkohlenstoffatom
$\nu(A-B)$	Valenzschwingungen (Streckschwingungen) der Bindung zwischen den Atomen A und B
ν	Wellenzahl ($1/\lambda$)
ω	Positonsbezeichnung von Kohlenstoffatomen nach Zählweise ausgehend vom Kettenende

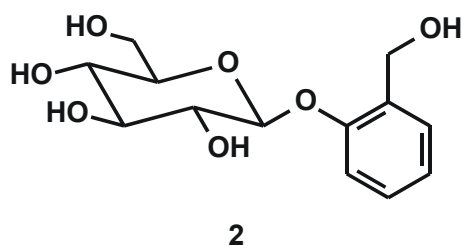
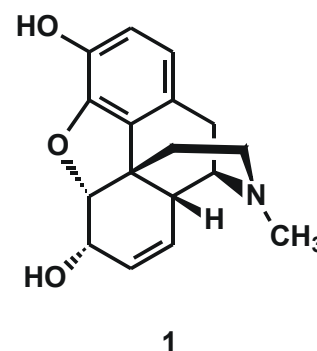
1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

1.1.1 Entwicklung der Naturstoffchemie

Das Interesse der Menschheit an Wirkstoffen besteht schon seit frühester Zeit. Bereits in der Steinzeit wurde die Tollkirsche als Pfeilgift genutzt. In der chinesischen Heilkunde wurden Pflanzenextrakte aus Sternanis, Campher und Ginseng vermutlich schon um 3700 v. Chr. verwandt. Erste schriftliche Belege für den gezielten Einsatz von Naturstoffen finden sich im auf etwa 1550 v. Chr. datierten Papyrus Ebers, dem umfangreichsten Papyrus der alt-ägyptischen Medizin. In diesem sind die Zubereitungen vieler Heilmittel überwiegend pflanzlicher Quellen sowie ihre Anwendung zur Behandlung unterschiedlicher Krankheiten beschrieben.

Bis in die Neuzeit beschränkte sich die Nutzung von Naturstoffen auf den Einsatz der gewonnenen Extrakte und Mischungen, ohne tiefere Kenntnis um die chemische Zusammensetzung dieser Zubereitungen. Die schmerzlindernde und fiebersenkende Wirkung der Weidenrinde etwa war schon im Altertum bekannt. Mönche stellten aus ihr eine Lösung her, die als Analgetikum (Schmerzmittel) diente. Der dabei angereicherte Wirkstoff selbst blieb zunächst noch lange unbekannt. Erst mit der Entwicklung analytischer Methoden zu Beginn des 19. Jahrhunderts gelang die Reindarstellung einzelner Naturpräparate. In dieser Zeit wurde der Begriff der „Organischen Chemie“ geprägt. Nach der „Vitalkraft-Theorie“ war dies die Chemie der Stoffe, die ausschließlich aus lebender Materie



gebildet werden können. 1806 wurde von Sertürner erstmals reines Morphin (1) aus Roh-Opium gewonnen, und der schon zuvor erwähnte Wirkstoff der Weidenrinde, das Salicin (2), wurde 1828 von Buchner isoliert. Im selben Jahr gelang Wöhler die Synthese des organischen Harnstoffs aus dem anorganischen

Ammoniumcyanat. Er widerlegte damit die bereits oben erwähnte Vitaltheorie, auf der die Organische Chemie bis dahin basierte. Um 1850 begann die Entwicklung der klassischen Strukturlehre und damit auch die „Formelsprache der Organischen Chemie“, wie sie heute etabliert ist. Ein weiterer Höhepunkt dieser Entwicklung war beispielsweise die Entdeckung der Vierwertigkeit des Kohlenstoffs durch Kekulé und Couper im Jahre 1858. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über einige ausgewählte Etappen in der Entwicklung der Naturstoffchemie.

Steinzeit		Einsatz von Pfeilgift aus der Tollkirsche
~ 1550 v. Chr.	Altägyptische Medizin	Zubereitung und Einsatz versch. Heilmittel nach dem Papyrus Ebers
1806	Friedrich Wilhelm Sertürner	Isolation von Morphin aus Opium als erstes Alkaloid
1819	Carl Friedrich Wilhelm Meissner	Isolation von Veratrin (Begriffsprägung „Alkaloid“)
1820	Jöns Jacob Berzelius	Begriffsprägung der „Organischen Chemie“
1820	Heinrich Emanuel Merck	Morphin mit Reinheitsgarantie
1828	Johann Andreas Buchner	Isolation von Salicin
1828	Friedrich Wöhler	Harnstoffsynthese (Widerlegung der „Vitalkrafttheorie“)
1860	Albert Niemann	Isolation von Kokain
1898	Richard Martin Willstätter	Konstitutionsaufklärung von Kokain
1902	Richard Martin Willstätter	Synthese von Kokain
1926	Robert Robinson Clemens Schöpf	Strukturaufklärung des Morphins
1928	Alexander Flemming	Entdeckung des Penicillins
1945	Robert Burns Woodward	Strukturaufklärung von Penicillin G
1952	Frederick Sanger	Strukturaufklärung von Insulin (als erstes Protein)
1954	Robert Burns Woodward	Totalsynthese von Strychnin über 30 Stufen

Tabelle 1.1 Einige herausragende Ereignisse in der Geschichte der Naturstoffchemie (NUHN, 1997; HABERMEHL und HAMMANN, 2003)

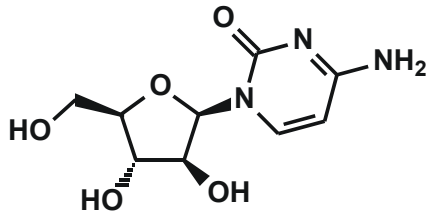
Mitte des 20. Jahrhunderts gewann die organische Chemie in ihrer Gesamtheit entscheidend an Bedeutung. Bis 1935 waren nur rund 350.000 Organische Verbindungen bekannt (FALBE und REGNITZ, 1999). Inzwischen ist diese Zahl vermutlich auf etwa 50 Millionen registrierte organische Verbindungen angewachsen (BEYER und WALTER, 2004). Ein hoher Anteil der erstmals beschriebenen Verbindungen war zwar noch immer auf Synthesen zurückzuführen, doch auch die Suche nach unbekanntem Substanzen aus der belebten Materie lieferte nun ständig neue Strukturen. Es ist nahe liegend, dass zunächst hauptsächlich an Land nach interessanten Naturstoffen gesucht wurde, sind deren Produzenten doch entschieden einfacher zu erreichen. Technische Hilfsmittel, die aquatische Organismen insgesamt leichter zugänglich machen, wie kommerziell erhältliche Atemgeräte für Taucher oder Tauchboote, waren lange nicht verfügbar. Wissenschaftliche Untersuchungen beschränkten sich jedoch keinesfalls auf terrestrische Organismen. Tatsächlich treten Publikationen zu Naturstoffquellen mariner Herkunft wie beispielsweise Fische, Algen, Korallen oder Schwämme (Poriferen) ebenfalls in beachtlicher Zahl auf.

1.1.2 Substanzen mariner Herkunft als Wirkstoffe

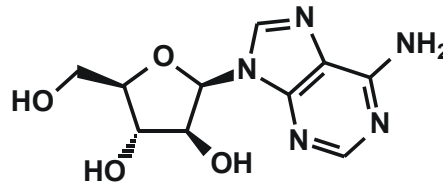
Insbesondere seit den 1970er Jahren stehen Verbindungen marinen Ursprungs im Fokus vieler Naturstoffchemiker. Ein Grund hierfür ist sicherlich die Erkenntnis, dass Inhaltsstoffe von Meeresorganismen oft keine Analoga im terrestrischen Milieu haben. Die Untersuchungen biologischen Materials aus den Meeren und Ozeanen führten vielfach zur Erschließung neuer Substanzklassen. Motivation war nicht nur Neugier, sondern auch die Hoffnung, die Entdeckungen völlig neuartiger Substanzen könnten die Tore zu bislang unbekanntem Aktivitäten und hohen Wirkungsgraden aufstoßen. Die Ursache für die ausgeprägten Charakterunterschiede zwischen terrestrischen und marinen Naturstoffen ist insofern leicht verständlich, als dass diese Lebensräume völlig verschiedene Anforderungen an ihre Bewohner stellen. Kann es für einen von atmosphärischer Luft umgebenen Organismus wichtig sein, leichtflüchtige Signal- und Abwehrstoffe zu produzieren, sind im Vergleich dazu bei marinen Lebewesen die hochpolaren Eigenschaften wasserlöslicher Substanzen erforderlich, um ähnlichen Aufgaben gerecht zu werden.

Auch wenn die Anzahl der neu identifizierten Naturstoffe aus dem aquatischen Lebensraum seit über 30 Jahren stetig zunimmt, haben terrestrische Wirkstoffe zumindest in Bezug auf ihre pharmazeutische Verwertung noch einen klaren Vorsprung. Bislang ist nur eine sehr geringe

Anzahl von Naturstoffen, deren Geschichte mit der Entdeckung von Substanzen mariner Quellen begann, als Arzneimittel zugelassen. Inhaltsstoffe von Meeresorganismen, die sich strukturell unverändert in Pharmazeutika wiederfinden, sind bisher nicht existent.



3

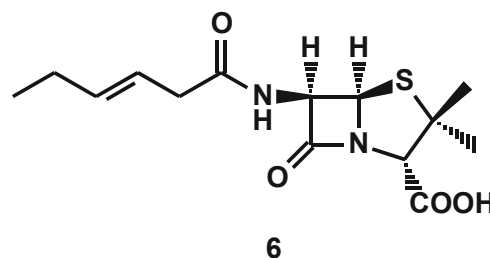
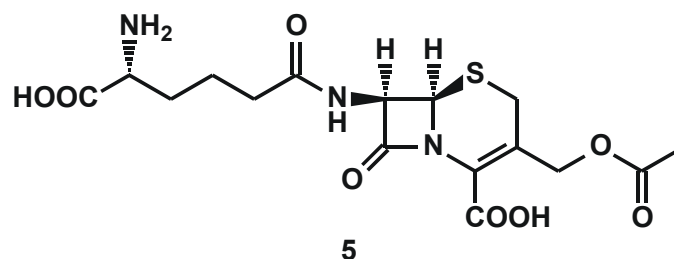


4

Als wichtige Vertreter der indirekt auf marine Produzenten zurückzuführenden Medikamente sind die Nucleoside Adeninarabinosid (**3**) und Cytosinarabinosid (**4**) zu nennen. Ihre Nutzung ist der Isolation der drei Metaboliten Spongothymidin, Spongosin und Spongouridin aus Poriferen der Spezies *Cryptotethya crypta* zu verdanken (BERGMANN und FEENEY, 1951; BERGMANN und BURKE, 1955; BERGMANN und BURKE, 1956). Grundsätzlich spielen Nucleoside als Bausteine des genetischen Materials eine zentrale Rolle bei der Zellvermehrung und sind somit in allen Organismen ungeachtet ihres Lebensraumes anzutreffen. Bei entsprechender Verfügbarkeit können Arabinoside wegen ihrer strukturellen Verwandtschaft zu den in menschlichen Zellen vorhandenen Nucleosiden leicht als deren Ersatz in den Biosynthesepfad der Nucleinsäuren gelangen. Die geringe, aber entscheidende Differenz dieses „Antimetaboliten“ zu seinem „Original“ bewirkt letztlich den Abbruch der Biosynthese. Auf diesem Effekt beruht die Wirkung von **3** und **4**, die schon seit den 1970er Jahren als Virostatikum bzw. Zytostatikum auf dem Markt etabliert sind.

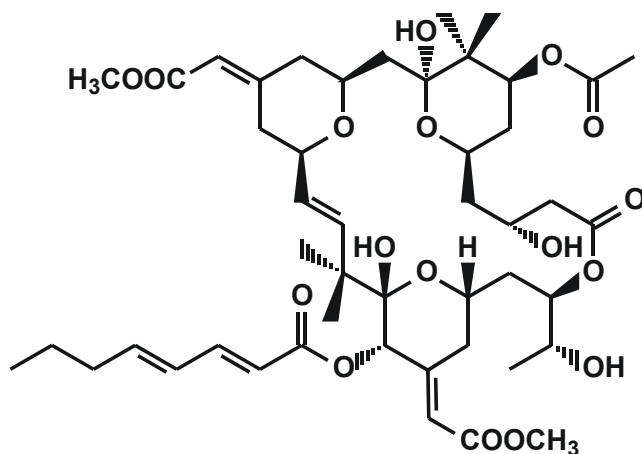
Eine zweite Gruppe kommerziell genutzter Substanzen, die sich von Metaboliten aus Meeresorganismen ableiten, stellen die Cephalosporine dar. Wegen ihrer antibakteriellen Wirkung fielen die ersten Vertreter dieser β -Lactame bereits 1948 als Inhaltsstoffe eines Wildstammes des marinen Pilzes *Cephalosporium acremonium* auf. Die Isolation der aktiven Substanzen wurde wenig später dokumentiert (BURTON und ABRAHAM, 1951). Angehörige dieser Substanzklasse wie das Cephalosporin C (**5**) nehmen heute eine wichtige Rolle als Antibiotikum neben den Penicillinen ein. Zu ihnen besteht eine enge strukturelle Verwandtschaft, die hier beispielhaft im Vergleich zum Penicillin F (**6**) illustriert werden soll. Aufgrund dieser Ähnlichkeit verwundert es nicht, dass die biologischen Wirkungen beider Stoffgruppen mit der Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese auf einem gemeinsamen Mechanismus basieren.

Für viele wirkungsvolle Substanzen marinen Ursprungs entwickelten sich in den letzten Jahren gute Perspektiven, nicht nur als Leitstruktur vermarktet zu werden. Das Bryostatin 1 (7) beispielsweise, von dem bis heute 19 weitere Analoga bekannt sind, befindet sich derzeit in Phase I mehrerer klinischer Studien im Einsatz gegen Leukämie und andere Krebsarten. Ferner wird es in Phase II als Antitumormittel für nicht kleinzelligen Lungenkrebs erprobt (NEWMAN

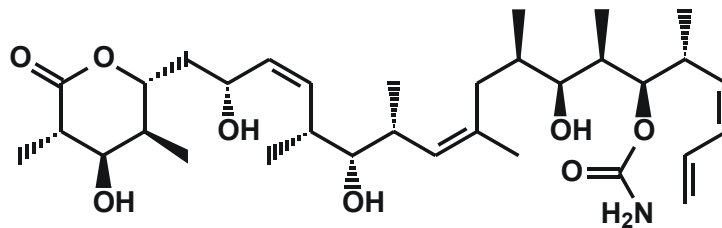


und CRAGG, 2004). Die für diese viel versprechende Entwicklung notwendigen Anstrengungen waren allerdings immens. Allein zur Isolation und Strukturaufklärung dieses makrocyclischen Lactons, war die Beschaffung und Extraktion von 500 kg des Moostierchens *Bugula neritina* notwendig (PETTIT *et al.*, 1982). Für die ersten klinischen Versuche mit 18 g Bryostatin 1 mussten sogar 13 t des organischen Materials geborgen werden. Nicht immer ist es wie in diesem Fall möglich, ausreichende Mengen der Produzenten mariner Naturstoffe zu beschaffen. Dieser Umstand definiert bis heute ein Kernproblem der marinen Wirkstoffforschung (FAULKNER, 2000). Da gerade die oft großen und komplex funktionalisierten Moleküle der Unterwasserwelt für Synthesechemiker große Herausforderungen sind, gibt es

häufig keine Alternativen zu den natürlichen Ressourcen. Bis zur Zulassung eines neuen Medikaments werden in den verschiedenen Erprobungsstufen oft Substanzmengen von mehr als einem Kilogramm benötigt. Kann kein ausreichender Nachschub des Wirkstoffes gewährleistet werden, droht selbst aussichtsreichen Kandidaten die Einstellung der klinischen Tests.



Einen weitaus günstigeren Verlauf nimmt die Erprobung des Discodermolids (8). Auf der Grundlage von Synthesen verschiedener Arbeitsgruppen publizierten Mitarbeiter des Pharmakonzerns Novartis einen Totalsyntheseplan über 21 Stufen, der den Vorrat ihres in Lizenz genommenen Naturpräparates gewährleisten soll (FRANCAVILLA *et al.*, 2003). Dieses wurde 1990 durch Gunasekera *et al.* an der Harbor Branch Oceanographic Institution (Fort Pierce, Florida, USA) aus einem Schwamm der Art *Discodermia dissoluta* gewonnen (GUNASEKERA *et al.*, 1990b; GUNASEKERA *et al.*, 1991) und befindet sich derzeit ebenfalls in der klinischen Erprobung zur Bekämpfung von Tumoren (NEWMAN und CRAGG, 2004).



8

Die genannten Beispiele stellen nur eine kleine Auswahl der Substanzen dar, die aber den inzwischen unbestrittenen Wert der marinen Umwelt als Quelle potenzieller Wirkstoffe unterstreichen. Dass aus der großen Menge aktiver Metaboliten von Meeresorganismen bisher noch keine Verbindung als Pharmakon Marktreife erlangt hat, ist auf verschiedene Umstände zurückzuführen. Die bereits erwähnten Probleme bei der Beschaffung ausreichender Probenmengen führten in der Vergangenheit zu einer nur langsamen Entfaltung der Naturstoffchemie aus diesem Lebensraum. Durch die äußerst langen Zeiträume, die für vorklinische und klinische Tests benötigt werden, können bis zu 20 Jahre von einer ersten Naturstoffbeschreibung bis zur Markteinführung als Medikament vergehen (NEWMAN und CRAGG, 2004). Die stetig ansteigende Zahl bekannter mariner Wirkstoffe kann sich demnach nur mit erheblicher Verzögerung auch in den letzten klinischen Erprobungsphasen auswirken. Inzwischen befinden sich jedoch etwa 40 Substanzen marinen Ursprungs in verschiedenen Stadien der klinischen Erprobung oder zumindest in der vorklinischen Untersuchung (NEWMAN und CRAGG, 2004). Die Zulassungen einiger Wirkstoffe mit originären Strukturen natürlicher Sekundärmetaboliten werden daher schon in recht naher Zukunft erwartet.

1.2 Zielsetzung

1.2.1 Forschungsgegenstand

Obwohl die Ozeane und Meere der weitaus größte Lebensraum der Erde sind, ist vergleichsweise wenig über die verschiedenen aquatischen Ökosysteme bekannt. Es liegt auf der Hand, dass Untersuchungen zur Artenvielfalt zunächst primär an Land betrieben wurden. Gerade die Erforschung der Habitate großer Tiefen war lange nicht möglich. Trotz technischen Fortschritts sind Erkundungsvorhaben der Unterwasserwelt noch heute eine besondere Herausforderung an Mensch und Material. Als Beitrag zur Erschließung dieses noch weitgehend unbekanntes Lebensbereichs wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung das Schwerpunktprogramm „Meeresforschung“ aufgenommen, dem seit Oktober 1997 auch die Maßnahme „Marine Naturstoffforschung“ angehört. Ziel dieser Förderung war es, den bisher kaum untersuchten Lebensraum unterhalb des Meeresspiegels auch im Hinblick auf neue biologisch aktive Naturstoffe zu untersuchen. Als Vorhaben mit besonderer Orientierung auf Meeresschwämme aus Kaltwassergebieten platzierte sich das Verbundprojekt „Boreale Schwämme als marine Naturstoffquelle“ (BOSMAN) im Juli 1999 innerhalb dieses Programms. Wissenschaftler unterschiedlicher Disziplinen wie Geobiologen, Taxonomen, Mikrobiologen, Biogeochemiker, Chemiker und Pharmazeutische Chemiker wurden zur Klärung sich überschneidender Fragestellungen in diesem Projekt vereint. Ein wesentliches Ziel war dabei die Suche nach neuen Naturstoffen und ihre Strukturaufklärung. Das äußerst umfangreiche Probenmaterial, das im Zuge von BOSMAN gewonnen werden konnte, wurde in dieser Hinsicht zwischen den chemisch orientierten Projektpartnern aufgeteilt.

1.2.2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation und Strukturaufklärung von Naturstoffen der Schwammspezies *Plakortis simplex* (Ordnung Homosclerophorida, Familie Plakinidae, Schulze, 1880) und *Axinella rugosa* (Ordnung Halichondrida, Familie Axinellidae, Schmidt, 1975). Hierzu wurden diese zunächst einem chemischen Screening unterzogen, um einen Überblick über ihr chemisches Inventar zu gewinnen. Als hauptsächliche Analysetechniken wurden gaschromatographische (*gas chromatography*, GC) Methoden mit und ohne massenspektrometrischer (*mass spectrometry*, MS) Kopplung eingesetzt. Nach einer Bestandsaufnahme bekannter Primär- und Sekundärstoffe, galt das besondere Interesse den unbekanntes

Verbindungen. Mit dem Ziel der Identifikation, wurden Substanzen ausgewählt, deren ersichtliche chemische Klassifizierung ein Wirkstoffpotenzial vermuten ließen. Weitere chromatographische Trenntechniken wie insbesondere die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) wurden zur Anreicherung und schließlich zur Isolation der betreffenden Naturstoffe als Reinsubstanzen eingesetzt. Nachfolgende Untersuchungen mittels magnetischer Kernresonanzspektroskopie (*nuclear magnetic resonance spectrometry*, NMR) dienten der Aufklärung der vollständigen chemischen Strukturen. Die in ausreichender Menge verfügbaren Substanzen wurden hinsichtlich biologischer Aktivitäten untersucht. Mit der Oncotest GmbH (Freiburg) sowie dem Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung e.V. (IBWF, Kaiserslautern) konnten hierzu zwei externe Auftragnehmer in Anspruch genommen werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Phylogenie und Physiologie von Porifera

2.1.1 Phylogenetische Einordnung der Schwämme

Die Biosphäre wird nach WOESE *et al.* (1990) in drei Domänen unterteilt. Den Bakterien (Bacteria) und den Archaeen (Archaea) ist gemeinsam, dass sie sich aus Organismen zusammensetzen, die aus nur einer Zelle bestehen und keinen von einer Membran umschlossenen Zellkern haben. Daher werden diese Domänen auch als so genannte Prokaryonten (Prokarya) zusammengefasst. Ihnen werden die Eukaryonten (Eukarya), denen alle Organismen angehören, die echte Zellkerne besitzen, als dritte Domäne des Lebens gegenübergestellt

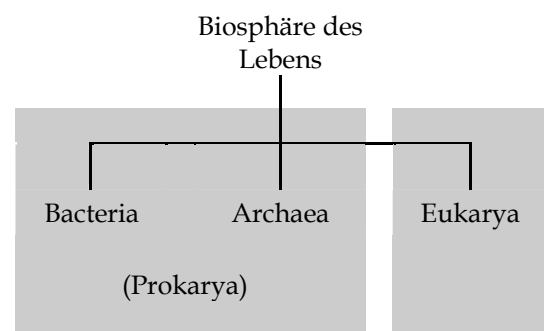


Abbildung 2.1 Unterteilung des gesamten Lebens in drei Domänen nach WOESE *et al.* (1990)

(Abbildung 2.1). Unter den Eukaryonten werden wiederum (mindestens) die vier Reiche der Tiere (Animalia), der Pflanzen (Plantae), der Pilze (Fungi) sowie der Protisten (Protista) unterschieden (Abbildung 2.2). Den Mehrzellern (Metazoa), einem Unterreich der Tiere, gehört der Stamm der Schwämme (Porifera) an. Diese gelten neben den Placozoa als

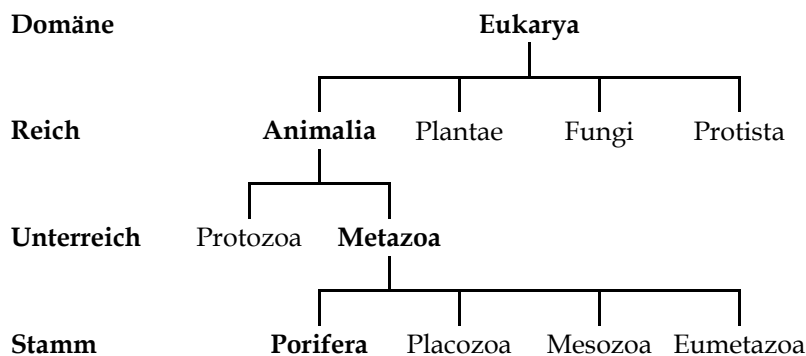


Abbildung 2.2 Phylogenetische Zugehörigkeit der Porifera im Stammbaum der Eukarya (vereinfacht)

einfachste Mehrzeller (HOOPER und VAN SOEST, 2002). Dennoch liegt ihnen offenbar ein äußerst erfolgreiches Prinzip zugrunde, das ihnen dazu verholfen hat, mehrere hundert Millionen Jahre ohne wesentliche Veränderungen in Aufbau und

Funktion zu überdauern (LEHMANN und HILLMER, 1997). Hinweise auf die Präsenz von Porifera lassen sich bis ins Präkambrium datieren (REITNER und MEHL, 1996; LI *et al.*, 1998). Damit gehören sie zu den ältesten Vertretern ihres Unterreichs und zählen zu den so genannten „lebenden Fossilien“.

2.1.2 Klassifizierung von Schwämmen

Eine zuverlässige Abschätzung der Anzahl aller heute existenten Schwammarten ist nach derzeitigem Kenntnisstand nicht möglich (GRELL *et al.*, 1993; VAN SOEST, 1996). Die Literatur dokumentiert bis zum heutigen Zeitpunkt rund 7000 rezente Spezies (HOOPER und VAN SOEST, 2002). Eine Einteilung in die drei Klassen der Porifera (Abbildung 2.3) erfolgt vornehmlich anhand ihres stützenden Skelettes, das zumeist aus Silikat- oder Kalknadeln, den so genannten Skleren (Spiculae) besteht.

Kalkschwämme (Calcarea)

Die Calcarea zeichnen sich durch ein hartes Kalkskelett aus, das aus extrazellulär gebildeten Calciumcarbonatskleren besteht. Diese sind ein- bis vierstrahlig (mon-, di-, tri- und tetractin) und zeigen eine, drei oder vier Achsen (mon-, tri-, bzw. tetraxon) (MÖHN, 1984; VAN SOEST, 1996). Dieser im Schelfgebiet gemäßigter und wärmerer Regionen verbreiteten Schwammklasse gehören etwa 500 Arten an.

Glasschwämme (Hexactinellida)

Die etwa 400 rezenten Arten der Hexactinellida weisen triaxone und meist sechsstrahlige (hexactine) intrazellulär gebildete Kieselspiculae aus amorphem Silikat auf (MÖHN, 1984; VAN SOEST, 1996), aus denen ihr Stützskelett aufgebaut ist. Glasschwämme leben überwiegend in der Tiefsee, sind aber auch aus einigen weiteren Verbreitungsgebieten, wie beispielsweise Schelfgebieten der Arktis oder vor British Columbia bekannt (VAN SOEST, 1996).

Hornkieselschwämme (Demospongiae)

Die Demospongiae bilden mit einem Anteil von vermutlich mehr als 90 % aller Schwammspezies die größte und wichtigste rezente Klasse der Porifera (HOOPER und VAN SOEST, 2002). Ihre zwar meist vorhandenen, aber nicht obligaten Kieselspiculae

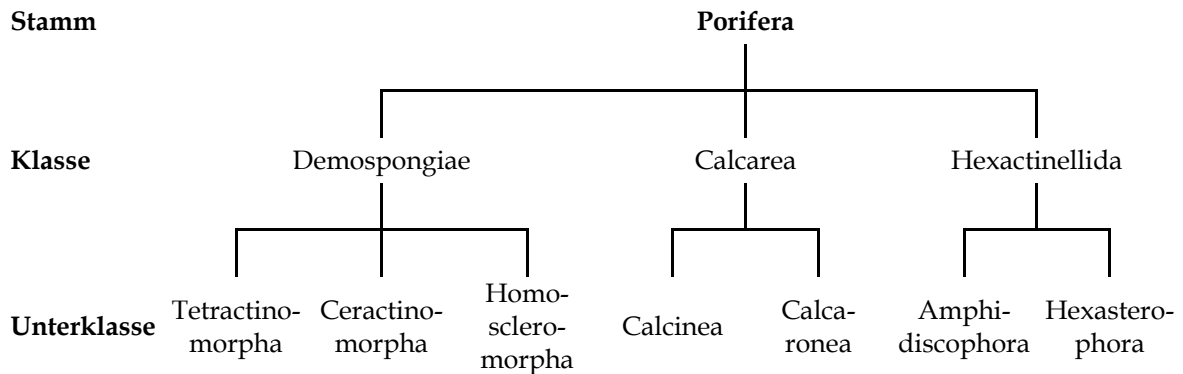


Abbildung 2.3 Systematik des Stammes der Porifera nach HOOPER und VAN SOEST, (2002)

lassen sich in Mega- und Mikroskleren unterscheiden (VAN SOEST, 1996; HOOPER und VAN SOEST, 2002). Die Megaskleren sind mon- oder tetraxon und werden intrazellulär gebildet (MÖHN, 1984; VAN SOEST, 1996). Oft ist ein stützendes Gerüst aus Spongin, einem ausschließlich bei Schwämmen auftretendem hornartigem Kollagen vorhanden. Demospongiae sind sehr weit verbreitet und weisen als einzige der drei Klassen auch einige Süßwasserarten auf (VAN SOEST, 1996).

2.1.3 Physiologie und Ökologie von Schwämmen

Schwämme sind ausschließlich aquatische Organismen, die vorrangig in den Ozeanen und Meeren benthisch sessil leben. Ein Individuum kann je nach Art eine Größe von wenigen Millimetern bis etwa 2 Meter aufweisen (MÖHN, 1984; GRELL *et al.*, 1993). Ihre äußere Gestalt folgt keiner einheitlichen Regel und ihr Aufbau ist verhältnismäßig primitiv (LEHMANN und HILLMER, 1997), da sie kein Nervensystem oder abgegrenzte Organe besitzen. Ein Schwammkörper besteht aus einer recht lose organisierten Ansammlung verschiedener Zellen, die innerhalb einer gallertartigen Matrix, dem Mesohyl, nahezu frei beweglich sind und sich entsprechend ihrer Aufgaben ordnen. Nach außen wird der Organismus durch das so genannte Pinacoderm, eine einlagige Zellschicht, begrenzt. In dieser Oberfläche befinden sich zahlreiche mikroskopisch kleine Poren (Ostia), über die Umgebungswasser in ein Kanalsystem, das den Schwammkörper durchzieht, eingestrudelt wird. Spezielle Kragengeißelzellen (Choanocyten) sind dabei für die Erzeugung des gerichteten Wasserstroms verantwortlich. Sie sind zu diesem Zweck mit jeweils einer Geißel (Flagellum) ausgerüstet, deren koordinierte Bewegung die Strömung erzeugt. Das Wasser strömt über die Ostien und die weiterführenden Kanäle in Kragengeißelkammern, bevor es den Organismus über das abführende Kanalsystem wieder verlässt. Im Inneren des Schwammes werden Kleinstlebewesen (Pico- und Nanoplankton)

und anderes organisches Material, die zur Versorgung mit Nährstoffen benötigt werden, aus dem Wasser gefiltert. Viele Schwammspezies besitzen vereinzelt größere Ausströmöffnung, die Osculi genannt werden. Die Wassermenge, die ein Schwamm täglich durch sein Kanalsystem filtert, kann dem Zwanzigtausendfachen seines eigenen Volumens entsprechen (ALTHOFF *et al.*, 1998).

Zahlreiche Untersuchungen belegen, dass mit Schwämmen assoziiert häufig dichte Populationen von Prokaryonten leben. Ihr Anteil an der Gesamtmasse einer solchen Gemeinschaft ist sehr unterschiedlich, wird jedoch in vielen Fällen als den Schwammzellen etwa gleichwertig eingeschätzt.

2.2 Chemische Differenzierung biogener Substanzen

Das Material eines Organismus kann aus diversen Blickwinkeln, etwa nach ökologischen, chemischen oder biochemischen Gesichtspunkten, differenziert werden. Dabei werden die Aufgaben der Stoffe für den Produzenten, ihre chemischen Strukturen und funktionellen Gruppen oder ihre Bildungsprozesse berücksichtigt. Eine äußerst gängige Vorgehensweise zur chemischen Klassifizierung biologischer Materie besteht in der Unterscheidung von Primär- und Sekundärstoffen. Unter Primärstoffen sind die Produkte des Grund- oder Primärstoffwechsels zu verstehen, die als Träger unmittelbar lebenserhaltender Funktionen für die Existenz des Organismus erforderlich sind. Zu ihnen gehören Proteine, Kohlenhydrate, Nucleinsäuren und Lipide. Gelegentlich werden auch weitere Stoffe wie beispielsweise Hormone zu den Primärmetaboliten gezählt. Alle anderen Stoffe, die höchstens mittelbar zum Überleben beitragen, werden unter den Sekundärstoffen zusammengefasst.

Zwischen den Metaboliten des Primär- und Sekundärstoffwechsels bestehen enge Beziehungen, die sich in einigen Überschneidungen ihrer Biosynthesewege zeigen. So werden üblicherweise Intermediate des Primärstoffwechsels zur Bildung von Sekundärstoffen herangezogen. Auch wenn daher diese Unterscheidung oftmals nicht zweifelsfrei möglich ist, lässt sich der weit überwiegende Teil vom Naturstoffinventar eines Lebewesens einer der beiden Stoffgruppen sinnvoll zuordnen.

2.2.1 Primärstoffe

Da sich die grundsätzlichen Vorgänge in den Grundstoffwechseln verschiedener Lebewesen nur unwesentlich unterscheiden, sind die oben genannten Primärstoffklassen ubiquitär vertreten. Je nach Art der Produzenten sind allerdings zum Teil äußerst charakteristische Kennzeichen in den chemischen Strukturen einzelner Verbindungen zu erwarten. Ihre Aufgaben sind definitionsgemäß von lebensnotwendigem Charakter und betreffen somit beispielsweise den Aufbau einer Zelle, die Verwendung als Baustoff des gesamten Organismus, die Funktion als molekulare Einheit des genetischen Materials oder den Einsatz als Energiespeicher.

In der Primärstoffchemie von Schwämmen haben sich besonders Membranlipide wie Fettsäuren und verschieden funktionalisierte Steroide als interessante Stoffe erwiesen. Einige Vertreter haben zum Teil spezifische Strukturmerkmale und werden deshalb als Biomarker

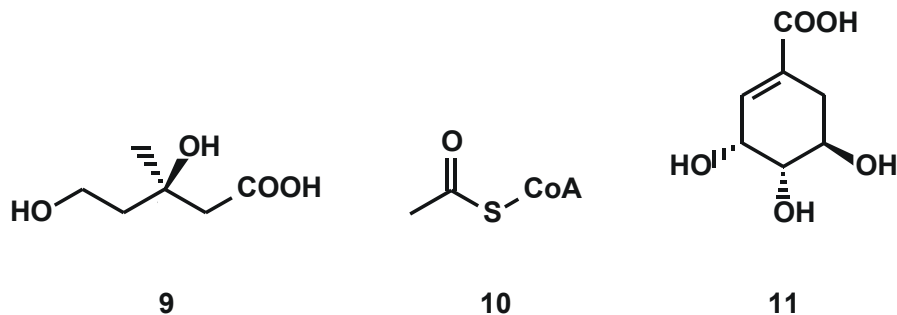
genutzt. Während die Fettsäuren der meisten Metazoa Kohlenstoffketten von C_{14} bis C_{22} aufweisen (HAHN *et al.*, 1988), sind solche mit langen Kohlenstoffketten von C_{24} bis C_{28} sowie zwei Unättigungen an den Positionen 5 und 9 ($\Delta^{5,9}$) chemotaxonomisches Merkmal der Demospongiae und Hexactinellida. LITCHFIELD *et al.* (1976) haben für diese Fettsäuren den Begriff „*demospongiac acids*“ eingeführt. Studien belegen, dass sie aus kurzkettigen Fettsäuren durch C_2 -Verlängerungen und anschließender Dehydrierung gebildet werden (HAHN *et al.*, 1988; DJERASSI und LAM, 1991). Daher spiegeln sich in *demospongiac acids* oft die Strukturmerkmale kurzkettiger Fettsäuren wider, die im selben Organismus zu finden sind (BLUMENBERG, 2003; PAPE, 2004; HOFFMANN *et al.*, 2005). Solche Merkmale können Substituenten der Alkylkette oder weitere Unättigungen sein. In den Kultivaten von Bakterien werden gewöhnlich Fettsäuren mit Alkylketten kleiner als C_{20} beobachtet. Daher wird angenommen, dass die Fettsäuren schwammassoziierter Bakterien einen signifikanten Anteil an den in Schwämmen enthaltenen Fettsäuren bis C_{19} ausmachen. Ferner wird vermutet, dass diese bakteriellen Lipide zum Aufbau mittel- und langkettiger Fettsäuren durch den Wirtsorganismus herangezogen werden. Hinsichtlich der Konfigurationen an den beiden Doppelbindungen von *demospongiac acids* wurden lange ausschließlich (5Z,9Z)-Isomere nachgewiesen, bis CARBALLEIRA und SHALABI (1990) in Proben von *Plakortis halichondroides* eine Reihe von $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren mit (5E,9E)-Konfiguration identifizierten. Nachfolgend ist jedoch nicht von weiteren Entdeckungen zweifach ungesättigter *trans*-,*trans*-konfigurierter Fettsäuren aus Schwämmen berichtet worden. Oft werden hingegen *iso*- und *anteiso*-Fettsäuren (*i*-, *ai*-) beobachtet. Diese Komponenten verfügen über Methylverzweigungen an ihren Kettenenden, d.h. in $\omega 2$ - (*iso*-) bzw. $\omega 3$ - (*anteiso*-) Position.

2.2.2 Sekundärstoffe

Der Sekundärmetabolismus differiert im Gegensatz zum Primärstoffwechsel bei verschiedenen Organismen fundamental. Er ist ein kennzeichnendes Merkmal einer phylogenetischen Gruppe, da er an ihren spezifischen Bedarf angepasst ist. Die Funktionen, die sekundäre Naturstoffe für ihre Produzenten ausüben können, sind äußerst vielfältig. So werden sie oft als Abwehrstoffe gegen äußere Bedrohungen, wie beispielsweise Fraßfeinde, oder bei sessilen Organismen auch zum Schutz gegen Überwuchs eingesetzt. Sie werden aber auch als Angriffsstoffe zur Schädigung oder zumindest Schwächung einer Beute bzw. eines Wirtes verwendet. Andere Sekundärstoffe nehmen Aufgaben zur Kommunikation wahr oder sind einfach überschüssige Abfall- bzw. Nebenprodukte. Dies betrifft vorrangig Organismen ohne

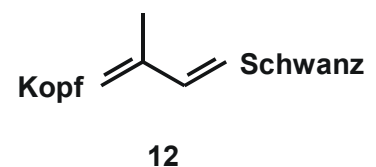
aktiven Ausscheidungsmechanismus wie Pflanzen oder Pilze, die sich als ergiebige Sekundärstoffquellen erwiesen haben. Da viele Eumetazoa dazu in der Lage sind, unnötige Intermediate durch Exkretion aktiv zu entsorgen, treten Sekundärstoffe in ihnen nur vereinzelt auf (NUHN, 1997). Eine weitere Erklärung für die genannten Differenzen im Vorkommen von Sekundärmetaboliten ist in der Mobilität ihrer Produzenten zu finden. Eine ortsgebundene Lebensweise wie die von Plantae, Fungi und vielen marinen Invertebraten (Wirbellosen) erfordert besonders effektive Verteidigungsstrategien. Wie bereits erwähnt, spielt dabei der Einsatz von Sekundärstoffen eine wichtige Rolle.

Die Biosynthesen solcher Naturstoffe stützen sich weitgehend auf Ausgangsmoleküle, die über den Grundstoffwechsel verfügbar sind. Prominente Primärmetaboliten sind in dieser Hinsicht die (*R*)-Mevalonsäure (**9**), das Acetyl-Coenzym A (**10**) und die Shikimisäure (**11**). Von ihnen gehen bedeutende Biosynthesepfade aus, die in verschiedenen Organismen zwar sehr ähnlich ablaufen, aber dennoch zu teilweise völlig unterschiedlichen Produkten führen. Viele Metaboliten lassen sich auf einen dieser Pfade zurückführen. Daher werden die Sekundärstoffe auf der Grundlage ihrer Bildungswege in verschiedene Naturstoffklassen unterteilt. Die wohl wichtigsten Gruppen bilden dabei die Terpene, die Polyketide und die Alkaloide.



Terpene

Formale Grundeinheit dieser Stoffklasse ist das 2-Methyl-1,3-butadien (**12**, Isopren). Durch die Verknüpfung von zwei Isoprenmolekülen entstehen die eigentlichen Terpene mit zehn Kohlenstoffatomen, die auch Monoterpene genannt werden. Dementsprechend werden alle höheren Terpene aus vier Isopreneinheiten (C₂₀) als Diterpene, solche mit C₃₀ als Triterpene und diejenigen mit 40 Kohlenstoffatomen als Tetraterpene bezeichnet. Diese Reihe ließe sich theoretisch beliebig fortführen, in der Praxis jedoch spricht man bei Terpenen aus mehr als acht Isopreneinheiten von



Polyterpenen. Erwähnenswert sind noch die Terpene mit ungerader Anzahl von Kohlenstoffatomen, wie die Sesquiterpene (C_{15}) aus drei Isoprenmolekülen und die Sesterpene (C_{25}), die allerdings deutlich seltener gefunden werden. Aus der Fülle von Verknüpfungsmöglichkeiten resultiert eine große Anzahl bekannter Terpene, die überwiegend aus dem Pflanzenreich stammen (BREITMAIER, 1999).

Den prinzipiellen Biosyntheseweg von Terpenen zeigt schematisch Abbildung 2.4 (BREITMAIER, 1999). Ausgangspunkt ist die (*R*)-Mevalonsäure (**9**), die als Diphosphat (**13**) nach Decarboxylierung und Wasserabspaltung das Isopent-3-enylpyrophosphat (**14**) bildet. Durch den Einfluss einer Isomerase wird **14** zum Teil in das stabilere γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat (**15**) umgelagert. Ausgehend von seinem nucleophilen Kopf kann **14** in einer Additionsreaktion an **15** zur Bildung von Geranylpyrophosphat (**16**) geknüpft werden. Durch Hydrolyse dieses Produktes wird der acyclische Monoterpenalkohol Geraniol freigesetzt, der auch als Vorstufe für weitere Terpene gilt. Als Allylderivat ist **16** weiterhin ein möglicher elektrophiler Reaktionspartner für das Nucleophil **14**. Auf diese Weise werden acyclische Terpene in Kopf-Schwanz-, aber auch in Kopf-Kopf- und Schwanz-Schwanz-Kondensationen aufgebaut. Die Möglichkeit intramolekularer Reaktionen führt zusätzlich zu einer hohen Anzahl cyclischer Terpene. Nach gleichem Prinzip verläuft der Aufbau von Steroiden, Hopanoiden und ähnlichen Verbindungen. Daher werden diese Primärstoffe zusammen mit den Terpenen auch als Isoprenoide bzw. Mevalogenine bezeichnet.

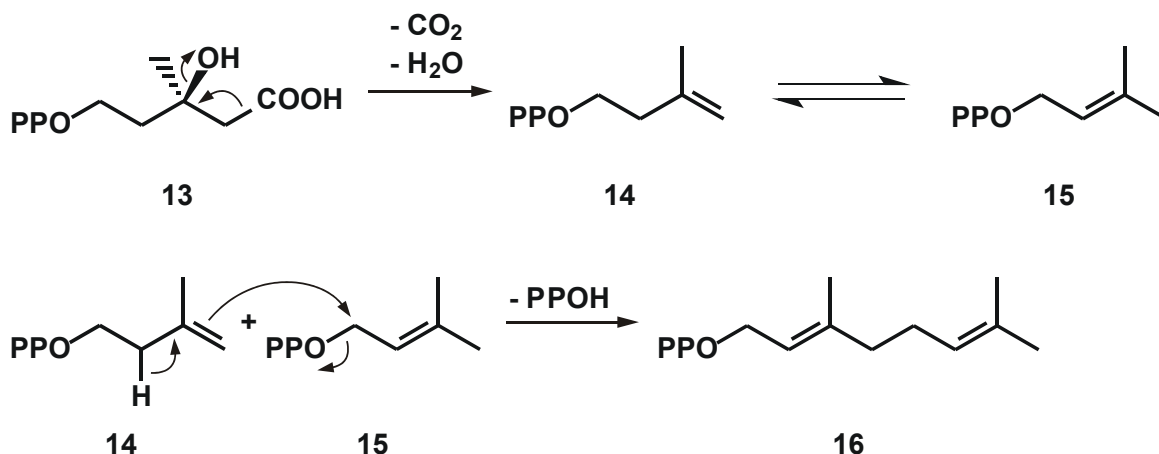
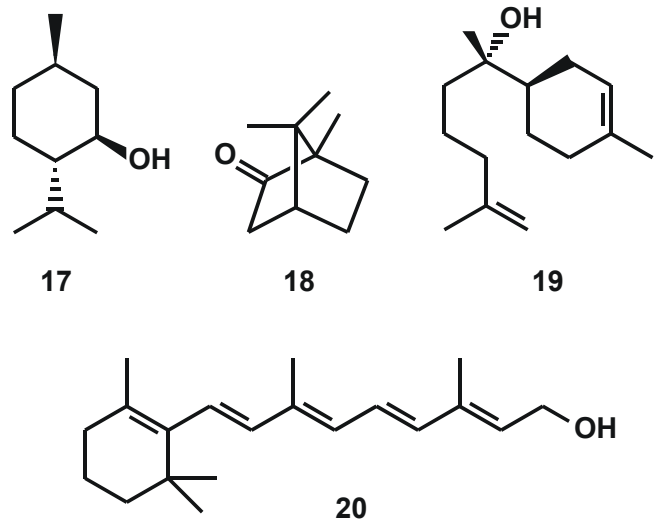


Abbildung 2.4 Biosyntheschema zur Bildung von Geranylpyrophosphat (**16**) aus (*R*)-Mevalonsäurediphosphat (**13**) über die aktiven Zwischenprodukte Isopent-3-enylpyrophosphat (**14**) und γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat (**15**)

PPO = Pyrophosphatgruppe (Diphosphat)

Ein bekanntes Terpenoid ist beispielsweise das Menthol (17), das viele verschiedene Wirkungen wie blutdrucksteigernde oder juckreizstillende Effekte hat. Der bicyclische Campher (18) wirkt antiseptisch (keimtötend), anti-phlogistisch (entzündungshemmend), spasmolytisch (krampflösend) und analeptisch (kreislaufanregend). Als Beispiel für die weit verbreiteten Sesquiterpenoide sei hier das α -Bisabolol (19) genannt, das ebenfalls antiphlogistisch und spasmolytisch aktiv ist. Das Diterpenoid Retinol (20, Vitamin A₁) gehört zu den körpereigenen Stoffen des Menschen und spielt für das Wachstum sowie beim Sehprozess eine wichtige Rolle.



Polyketide

Obwohl Polyketide eine extreme Strukturvielfalt vorweisen, liegt ihrer Biosynthese ein gemeinsames Prinzip zugrunde (STAUNTON und WILKINSON, 1998; STAUNTON und WEISSMAN, 2001). Meist wird vom Acetyl-Coenzym A (10) ausgehend mit einem Malonyl-Coenzym A (21) in einer decarboxylativen Kondensation die so genannte „Diketideinheit“ Acetessigsäure-Coenzym A (22) gebildet (Abbildung 2.5). Alternativ zur Essigsäure, die als Coenzym 10 in der Funktion einer C₂-Starteinheit auftritt, werden auch andere kleine Carbonsäuren wie die Propionsäure als C₃- oder die Buttersäure als C₄-Ausgangsmolekül genutzt. Darüber hinaus kann die Zimtsäure zur Biosynthese von Flavonoiden oder die *n*-Capronsäure als

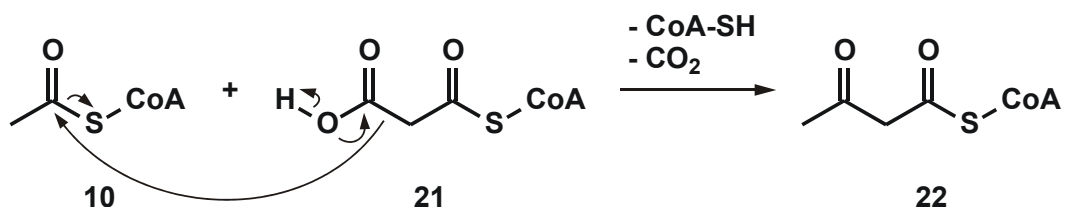


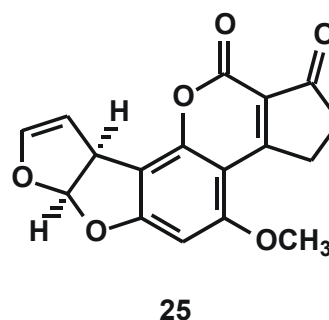
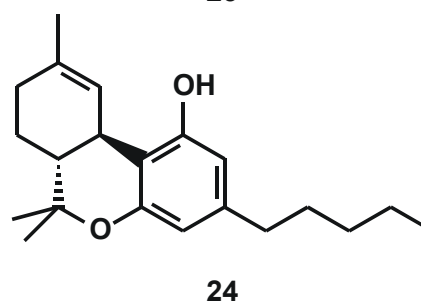
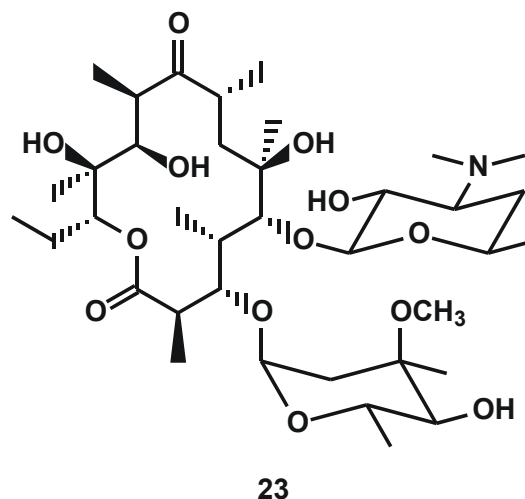
Abbildung 2.5 Biosyntheseschema des Initialschrittes einer Polyketidsynthese durch Bildung der Diketideinheit Acetessigsäure-Coenzym A (22) aus Acetyl-Coenzym A (10) und Malonyl-Coenzym A (21)

CoA = Coenzym A-Gruppe

Ausgangspunkt für die Cannabinoide dienen. Die nach dem in Abbildung 2.5 gezeigten Prinzip gebildeten β -Ketosäuren werden in einem cyclischen Prozess durch schrittweise Kondensation mit weiteren Malonyl-Coenzymen A (**21**) zu Poly- β -ketosäureketten aufgebaut. Aufgrund dieses Bildungswegs können die Polyketide formal als Polymerisationsprodukte des Ketens ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$) verstanden werden, woraus sich der Name dieser Naturstoffklasse ableitet. Durch Modifizierungen der Poly- β -ketosäuren wie Reduktionen oder intramolekulare Kondensationen werden schließlich hochdiverse Strukturelemente gebildet, die oft aromatischen Charakter haben. In starker Analogie zu diesem Bildungsmechanismus verläuft die Biogenese der Fettsäuren im Primärstoffwechsel. In beiden Synthesen werden zunächst β -Ketosäuren wie beschrieben als Intermediate gebildet. Im Fall der Fettsäuresynthese findet allerdings innerhalb des Kreislaufs zur Kettenverlängerung eine mehrstufige Reduktion der β -Ketosäuren zu Fettsäuren statt.

Die Polyketide bilden mit zahlreichen strukturell komplexen Verbindungen eine der größten Naturstoffklassen. Zu ihnen gehören Verbindungen wie das Aglykon (zuckerfreier Teil) des Makrolid-Antibiotikums Erythromycin A (**23**), oder der Marihuana-Wirkstoff Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (**24**, THC). Überdies sind die aromatischen Aflatoxine, wie das hier gezeigte Aflatoxin B₁ (**25**), ebenfalls Vertreter dieser äußerst wichtigen Gruppe von Naturstoffen. Bekanntheit haben die Aflatoxine als Kontaminanten von Lebensmitteln wie Nüssen und Getreide erlangt.

Die meisten bekannten Polyketide sind Metaboliten von Bacteria. Außer in diesen Organismen sind sie nur noch in einigen Pflanzen, Pilzen sowie in marinen Invertebraten zu finden. Da Letztere oft mit Bakterien assoziiert sind, werden die Polyketide aus solchen Gemeinschaften überwiegend als bakterielle Produkte diskutiert. Ein erster Nachweis wurde jedoch



erst kürzlich für eine Gruppe von Polyketiden aus dem Schwamm *Theonella swinhoei* erbracht (PIEL *et al.*, 2004). Durch molekulargenetische Methoden wurde gezeigt, dass als Erzeuger der in diesem Schwamm gefundenen Sekundärstoffe nur ein prokaryontischer Organismus in Frage kommt.

Alkaloide

Die Alkaloide sind eine Gruppe stickstoffhaltiger Naturstoffe, die besonders stark im Reich der Plantae, aber auch begrenzt in anderen Phyla verbreitet sind. Wie der Name dieser Stoffklasse bereits andeutet, reagieren viele ihrer Angehörigen alkalisch. Als unerlässliches Kennzeichen der Alkaloide wird diese Eigenschaft allerdings nicht angesehen. Nach der historischen Definition zählen jedoch ausschließlich pflanzliche Metaboliten mit basischem Charakter zu den Alkaloiden. Wenig später ist zumindest noch eine cyclische Struktur obligates Merkmal dieser Substanzen. Auch heute fällt es schwer, eine exakte Definition für die Alkaloide zu formulieren, und so ist dies eher eine unscharf von Stickstoffheterocyclen und Arylethylaminen abgegrenzte Naturstoffklasse (BREITMAIER, 1997). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die große Anzahl bekannter Alkaloide in sinnvolle Gruppen einzuteilen. So werden diese Naturstoffe z.B. nach phylogenetischen Kategorien ihrer Quellen oder nach strukturellen Merkmalen unterschieden. Da längst nicht alle Alkaloide einen gemeinsamen Biosynthesepfad haben, bietet sich auch dieses Kriterium als Hilfe zur Differenzierung an. Demzufolge lassen sich „echte Alkaloide“ biosynthetisch von Aminosäuren ableiten und verfügen über ein cyclisch gebundenes Stickstoffatom, während die biogenen Amine nicht cyclisch gebundenen Stickstoff aufweisen. Sie werden verschiedentlich auch gar nicht zu den Alkaloiden gezählt, sondern als Decarboxylierungsprodukte von Aminosäuren und deren Derivate aufgefasst. Die Bildungswege der „Pseudoalkaloide“ wiederum stehen in keinem Zusammenhang mit Aminosäuren, sondern verlaufen über den Bildungsweg der Isoprenoide oder der Polyketide. Unter dem Begriff der „Peptidalkaloide“ wird wiederum eine Gruppe basischer Oligopeptide zusammengefasst.

Ein wichtiges Intermediat beim Aufbau vieler Alkaloide, die sich von Aminosäuren ableiten („echte Alkaloide“ und biogene Amine), ist die Shikimisäure (**11**), deren Biosynthese in Abbildung 2.6 dargestellt ist (NUHN, 1997). Ihre Vorläufer sind das Phosphoenolpyruvat (**26**) und das Erythrose-4-phosphat (**27**). In mehreren Schritten kommt es vorab zur Synthese der 5-Dehydrochinasäure (**28**), aus der durch weitere Umbildungen schließlich **11** gewonnen wird.

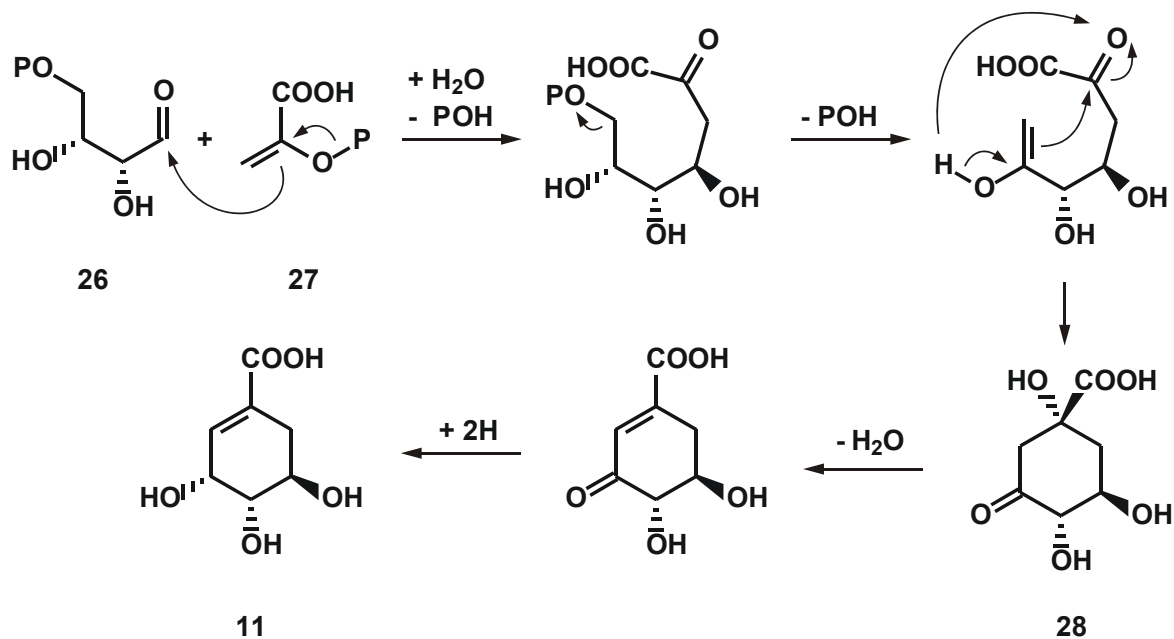


Abbildung 2.6 Biosyntheschema des Shikimisäurewegs zur Bildung der Shikimisäure (11) aus Phosphoenolpyruvat (26) und Erythrose-4-phosphat (27) über das Intermediat 5-Dehydrochinasäure (28).

PO = Phosphatgruppe

Die Shikimisäure spielt bei den Bildungswegen vieler Primär- und Sekundärstoffe eine zentrale Rolle. Von ihr leiten sich über die Chorisminsäure (29) z.B. die Aminosäuren Tryptophan (32), Tyrosin (34) und Phenylalanin (35) ab (Abbildung 2.7). Insbesondere das Tryptophan sowie sein Vorläufer Indol (31) werden ihrerseits zum Aufbau zahlreicher Alkaloide genutzt. Ein bekanntes Indolalkaloid ist beispielweise das Psilocin (36), das u.a. für die halluzinogene Wirkung der „mexikanischen Zauberpilze“ *Psilocybe mexicana* verantwortlich ist. Das Säugetierhormon Melatonin (37) gehört ebenfalls zu den Abkömmlingen des Indols und Tryptophans. Diesem Sekret der Epiphyse (Zirbeldrüse) werden beruhigende und temperaturregulierende Funktionen zugeschrieben. Außerdem wirkt 37 im Organismus als Antioxidanz. Es wird vermutet, dass der Alterungsprozess im Zusammenhang mit der nachlassenden Produktion des Melatonins steht.

Auch das Phenylalanin und das Tyrosin dienen als Vorläufer zur Biosynthese einer Reihe von Alkaloiden. Neben dem vermutlich bekanntesten Beispiel für einen Metaboliten des Tyrosins, dem Morphin (1), sei das Adrenalin (38) genannt, das als Neurotransmitter stark blutdrucksteigernd wirkt und als Hormon den Abbau von Glykogen in der Leber erhöht.

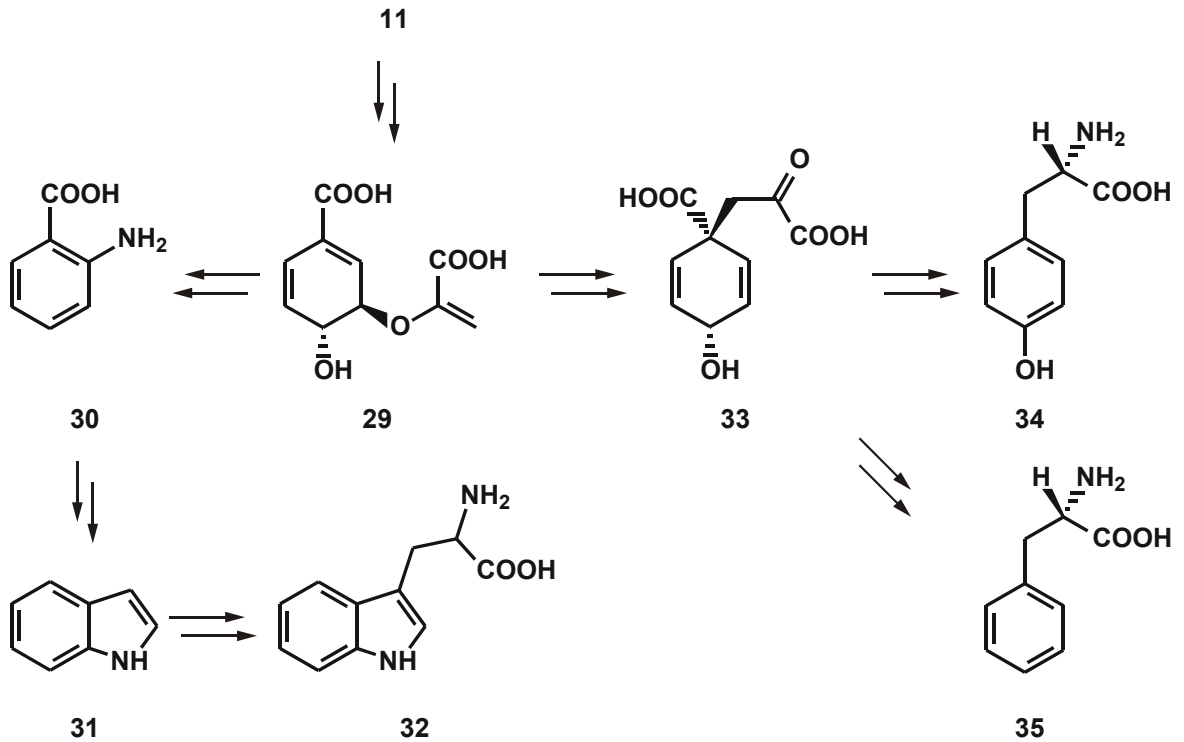
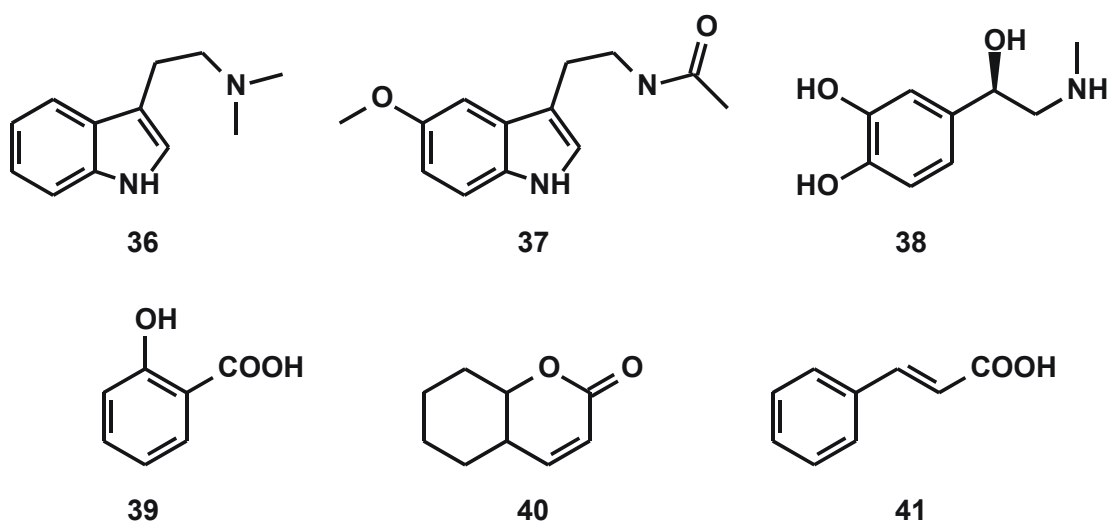


Abbildung 2.7 Stark vereinfachtes Biosyntheschema zur enzymatischen Bildung von Indol (31) und der Aminosäure Tryptophan (32) über Chorisminsäure (29) und Anthranilsäure (30) sowie zur Bildung der Aminosäuren Tyrosin (34) und Phenylalanin (35) über die Prephensäure (33)

Der hohe Stellenwert der Shikimisäure als Intermediat in den Biosynthesen von Naturstoffen wird dadurch unterstrichen, dass auch andere Naturstoffe als Alkaloide einen Bezug zum Shikimisäureweg haben. Von der Prephensäure (33) etwa leiten sich u.a. die Salicylsäure (39), das Cumarin (40) und die Zimtsäure (41) ab. Letztere wurde zuvor schon als Startmolekül des Polyketidwegs zu den Flavonoiden erwähnt (siehe Seite 17).



2.3 Naturstoffscreening

Die Suche nach neuen Naturstoffen mit biologischem Wirkstoffpotenzial beginnt klassischerweise mit der Gewinnung eines möglichst vollständigen Extraktes aller im Probenorganismus frei verfügbaren, d.h. chemisch ungebundenen Substanzen. Zur weiteren Vorgehensweise stehen verschiedene etablierte Strategien zur Verfügung. Alle haben ihre individuellen Vor- und Nachteile, so dass keiner dieser Wege als unfehlbar eingestuft werden kann. Die Auswahl der eigenen Strategie wird daher in der Regel maßgeblich von der vorhandenen Infrastruktur sowie der Verfügbarkeit der erforderlichen Methoden bestimmt. Nachfolgend werden zwei Vorgehensweisen erläutert, die im Rahmen des Projektes BOSMAN zur Anwendung kamen.

2.3.1 Chemisches und physikochemisches Screening

Bei der als „Chemisches Screening“ (im engeren Sinne) bezeichneten Vorgehensweise wird versucht, über den Einsatz verschiedener Reagenzien Anhaltspunkte für das Vorhandensein von Sekundärstoffen zu gewinnen. Üblicherweise werden dazu Extrakte der untersuchten Proben zunächst einfachen chromatographischen Prozessen wie Flüssigkeitschromatographie (*liquid chromatography*, LC) oder Dünnschichtchromatographie (DC oder *thin layer chromatography*, TLC) unterzogen. Anschließend wird versucht, die Inhaltsstoffe durch universelle Farbreaktionen zu visualisieren. Im weiteren Sinne wird unter dem Chemischen Screening auch oft das so genannte „Physikochemische Screening“ verstanden. Dieses bedient sich zusätzlich weiterführender Trenntechniken wie GC, HPLC oder Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) sowie apparativer Detektionsmöglichkeiten wie Spektralphotometrie (*ultra-violet/visible spectroscopy*, UV/VIS), Infrarot- (*infrared spectroscopy*, IR) und NMR-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie. Ein direkter Rückschluss von den in diesen Verfahren auffällig gewordenen Substanzen auf eventuelle biologische Aktivitäten ist dabei nicht möglich. Die Steuerung der Trennschritte lässt sich nur durch das Auftreten „außergewöhnlicher“ Strukturen leiten. Hierbei fließen allerdings vorhandene Erfahrungswerte zum Wirkstoffpotenzial bereits bekannter Stoffklassen mit ein. Ob eine gefundene Substanz jedoch tatsächlich biologisch aktiv ist, kann nur durch den Einsatz biologischer Testverfahren geklärt werden.

2.3.2 Biologisches Screening

Unter dem „Biologischen Screening“ wird der Einsatz biologischer Testsysteme schon zu Beginn der Wirkstoffsuche verstanden. Bei den oft auch als „Bioassays“ bezeichneten Versuchen werden die Einflüsse der Testsubstanzen oder Extrakte auf eine definierte Bakterien-, Pilz- oder Zellkultur untersucht. Diese Versuche werden derart konzipiert, dass ein objektives Messergebnis produziert wird. Dieses kann beispielsweise ein ausgemessener Hemmhofradius oder eine mit Hilfe von Farbreaktionen bzw. Fluoreszenzmarkierungen ausgezählte Zellanzahl sein. Üblicherweise werden in der ersten Testinstanz zunächst unfraktionierte oder nur grob unterteilte Gesamtextrakte auf mögliche Wirkungen hin untersucht und bei entsprechender Indikation Unterfraktionen davon erzeugt. Diese werden in einer weiteren Testgeneration erneut auf Aktivität getestet und ggf. abermals fraktioniert. So ergibt sich die unter dem Begriff „*bioassay guided fractionation*“ bekannte Strategie, mit der gezielt bioaktive Substanzen in Proben isoliert werden. Die Gültigkeit jedes Testergebnisses beschränkt sich allerdings immer auf die gewählten Testbedingungen wie beispielsweise die Extraktzusammensetzung, die Wirkstoffkonzentration und die Art des Testsystems. So ist es möglich, dass synergetische Effekte mehrerer Stoffe eine Wirkung erzeugen, die nach Auftrennung des Extraktes nicht mehr festzustellen ist. Umgekehrt ist es offensichtlich, dass ein vorhandenes Wirkstoffpotenzial möglicherweise zunächst konzentrationsbedingt unauffällig bleibt und im Falle einer fraktionierungsbedingten Anreicherung erst in einer späteren Testgeneration erkannt wird.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Analytische Methodenauswahl

Die für diese Arbeit gewählten analytischen Methoden richten sich nach zwei grundsätzlichen Fragestellungen. Zunächst wurden die Membranlipide der Proben analysiert, wozu ein Aufschluss der in Phospholipiden gebundenen Fettsäuren notwendig war. Nachfolgend wurde durch chemisches Screening ein Überblick über die vorliegenden Sekundärstoffe gewonnen.

Zur Analyse der Fettsäuren wurden möglichst einfache Methoden der Extraktion und chemischen Bearbeitung angewandt. Außerdem sollten daraus resultierende Lipidextrakte das Fettsäureinventar der Proben in hohen Ausbeuten möglichst naturgetreu widerspiegeln. Eine unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen geeignete Methode wird in Kapitel 4.2.3 (Seite 95) beschrieben. Dieses kombinierte Verfahren von Extraktion und Transveresterung durch Trimethylchlorsilan (TMCS) in Methanol ist schnell durchführbar und äußerst einfach anzuwenden. Die ursprünglich in Phospholipiden estergebundenen Fettsäuren liegen nach dieser Umsetzung in Form von Methylestern (*fatty acid methyl ester*, FAME) frei vor. Frühere Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Prof. W. Michaelis (IfBM, Universität Hamburg) zeigen, dass mit dieser Methode gewonnene Fettsäureverteilungen von den Resultaten anderer etablierter Verfahren wie Hydrolysen durch Chlorwasserstoff oder Bortrifluorid in Methanol nur geringfügig abweichen (BLUMENBERG, 2003). Auf diesen Ergebnissen basierend wurde die oben genannte Reaktion mit TMCS auch für die Analysen dieser Arbeit eingesetzt. Die erzeugten Extrakte der als Methylester freigesetzten Fettsäuren werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit vereinfacht als FAME-Extrakte bezeichnet.

Die Doppelbindungspositionen in ungesättigten Fettsäuren wurden anhand von GC/MS-Studien derivatisierter FAME bestimmt. Hierbei kamen Methoden von WALKUP *et al.* (1981), die eine Amidierung mit Pyrrolidin vorsieht sowie die Addition von Dimethyldisulfid (DMDS) nach BUSER *et al.* (1983) zum Einsatz. Beide Verfahren werden nachfolgend in Kapitel 4.2.3 (Seite 96) beschrieben.

Für die Untersuchungen der Sekundärstoffe wurden Extrakte erstellt, die möglichst das vollständige Inventar freier, niedermolekularer Substanzen aufweisen sollten. Dazu wurden aus

den Schwammproben nach der in Kapitel 4.2.3 (Seite 94) beschriebenen Arbeitsvorschrift jeweils ein organisch löslicher Gesamtextrakt erstellt, der im Folgenden vereinfacht als Gesamtextrakt bezeichnet wird. Anschließend wurden die Gesamtextrakte wie in Kapitel 4.2.3 (Seite 94) beschrieben flüssigkeitschromatographisch in vier Fraktionen (Fraktion 1, 2a, 2b und 3) verschieden polarer Inhaltsstoffe getrennt (Kapitel 4.2.3, Seite 94).

Die Analysen der erzeugten Extrakte und Fraktionen wurden mit Hilfe von GC und GC/MS durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen zur Klärung spezifischer Fragestellungen wie Strukturanalysen des Sekundärstoffinventars basierten auf einer individuellen Auswahl der Methodik.

3.2 Chemische Analyse von *Plakortis simplex*

3.2.1 Fettsäureinventar

Den FAME-Extrakt von *Plakortis simplex* (Ordnung Homosclerophorida, Familie Plakinidae, Schulze, 1880) zeigt das in Abbildung 3.1 dargestellte GC/MS-Chromatogramm (*total ion current*, TIC). Nach identischem Verfahren erstellte Extrakte anderer Schwämme enthalten meist die im Blickpunkt dieser Untersuchungen stehenden FAME als Hauptbestandteile. Die hier untersuchte Probe weist allerdings zwei quantitativ deutlich

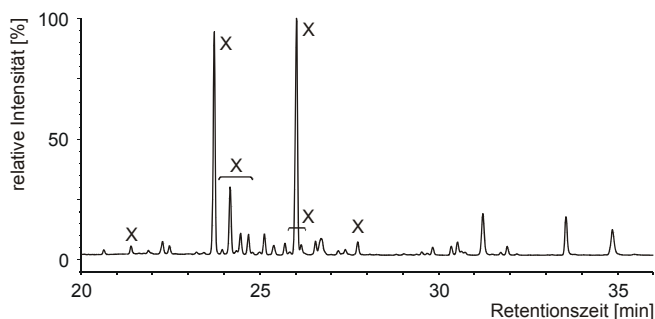


Abbildung 3.1 GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes von *Plakortis simplex* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

x = Substanzen, die nicht dem Fettsäureinventar angehören (Sekundärstoffe)

hervortretende Substanzen auf, deren Massenspektren auf eine andere Stoffklasse schließen lassen. Die Integration der Signalflächen eines mit Flammenionisationsdetektion (FID) erstellten Gaschromatogramms ergab, dass die zwei Hauptkomponenten in der Summe etwa 52 % des gesamten Extraktes betragen. Wie weiterführende Untersuchungen zeigen, handelt es sich bei diesen Verbindungen um Sekundärstoffe, die ebenfalls in Fraktion 2b des Gesamtextraktes auftreten und daher in Kapitel 3.2.4 (ab Seite 36) eingehend diskutiert werden. Bei späten Retentionszeiten (> 45 min) wurden ferner einige Kohlenwasserstoffe identifiziert, die auch in Fraktion 1 des Gesamtextraktes zu finden sind. Ihre nähere Beschreibung wird in Kapitel 3.2.2 (ab Seite 31) vorgenommen. Im FAME-Extrakt nehmen sie einen Anteil von unter 1 % ein. Weitere Inhaltsstoffe, deren Massenspektren auf den Hauptkomponenten ähnlichen Strukturen hindeuten, sind mit insgesamt 11 % vertreten. Nur etwas mehr als ein Drittel dieses Extraktes (36 %) stellen die FAME. Das intensivste Signal ihrer Vertreter wird von Methylestern mittkettig methylverzweigter C₁₉-Fettsäuren (*m*-19) erzeugt. In einem angepassten Ausschnitt des Chromatogramms ist die FAME-Verteilung der Probe zu erkennen (Abbildung 3.2). Eine zusammenfassende Übersicht der als FAME nachgewiesenen Membranlipide zeigt Tabelle 3.1.

Die identifizierten Komponenten umfassen die FAME mit Kettenlängen von C₁₄ bis C₂₁ unter Einbezug von Strukturen mit Verzweigungen und verschiedenen Unsättigungsmustern.

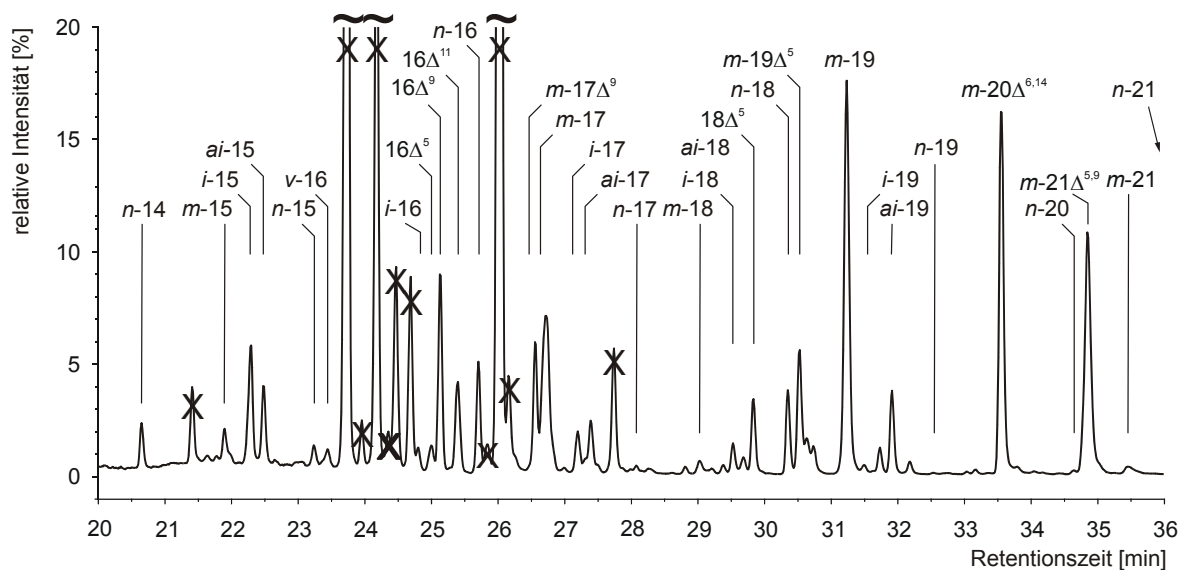


Abbildung 3.2 Vergrößerter Ausschnitt aus dem GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes aus *Plakortis simplex* [GC-Temperaturprogramm: 80°C (3min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

Gekennzeichnet sind die Anzahlen der C-Atome der FAME abzgl. ihres Methylsterkohlenstoffs

n- unverzweigter FAME

i- iso-verzweigter FAME (ω 2-methylverzweigt)

ai- anteiso- verzweigter FAME (ω 3-methylverzweigt)

m- mittkettig verzweigter FAME

v- nahe der Carbonylfunktion verzweigter FAME

Δ^a FAME mit Unsatigung(en) an den Positionen *a*

X Substanzen die nicht dem Fettsäureinventar angehören (Sekundärstoffe)

Gesättigte methylverzweigte Komponenten (*i*-, *ai*-, *m*- und *v*-) finden sich vorwiegend in den Molekülgrößen zwischen C_{15} und C_{19} . Unter Abzug des jeweiligen C-Atoms der Methylseiten- gruppe sind dies die Kettenlängen C_{14} bis C_{18} . Im selben Bereich sind auch die geradlinig ge- bauten FAME lückenlos präsent. Darüber hinaus wurden geringe Mengen der gesättigten un- verzweigten C_{20} -Säure (*n*-20) sowie Spuren der *n*-19 und *n*-21 nachgewiesen. Die Letztge- nannten sind im gezeigten Chromatogramm (Abbildung 3.2) nicht als Signal zu erkennen, sondern nur durch eine gezielte Suche nach charakteristischen Ionen ($M^{+\bullet}$, $m/z = 74$ und $m/z = 87$) im TIC aufzufinden.

Interessant ist das Auftreten eines verzweigten C_{16} -FAME, dessen *equivalent chain length* (ECL, siehe Kapitel 4.2.4, Seite 97) darauf schließen lässt, dass die Methylverzweigung dieses Lipids nahe an der funktionellen Gruppe lokalisiert ist (*v*-FAME). Auffallend ist auch die quanti- tative Dominanz der Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen in ihrer linearen Kette. Diese zeigt sich auch in den Lipiden mit olefinischem Charakter, da die einzig ungesättigten FAME mit ungerader Kohlenstoffanzahl (*m*-17 Δ^5 und *m*-19 Δ^5) zusätzlich mittkettig methylver- zweigt sind. Die Signatur einer Δ^5 -Unsatigung wurde somit ausschließlich in den Fettsäuren

mit Kettenlängen von C₁₆ und C₁₈ jeweils in Strukturen mit und ohne Methylverzweigung beobachtet. FAME mit längeren Ketten als C₁₉ wurden nur wenige gefunden. Neben den bereits erwähnten *n*-20 und *n*-21 sind auch *m*-21-FAME in geringen Mengen vertreten. Die doppelt ungesättigten *m*-20 Δ ^{6,14} und *m*-21 Δ ^{5,9} sind allerdings mit Anteilen von 13,5 % bzw. 12,2 % an den identifizierten Fettsäuren Hauptbestandteile des FAME-Extraktes (siehe Anhang, Kapitel 7.2.1, Seite 117). Längere Kohlenstoffketten als C₂₁ wurden in diesem Extrakt nicht nachgewiesen.

Modifikation	Anzahl von Kohlenstoffatomen							
	14	15	16	17	18	19	20	21
<i>n</i> -	●	○	●	○	●	○	○	○
<i>i</i> -		●	○	●	○	●		
<i>ai</i> -		●		●	○	●		
<i>m</i> -/ <i>v</i> -		●	○	●	○	●		○
Δ_1			●	● ^a	●	● ^a		
Δ_2							● ^a	● ^a

Tabelle 3.1 Übersicht der im FAME-Extrakt von *Plakortis simplex* nachgewiesenen FAME

<i>n</i> -	unverzweigter FAME
<i>i</i> -	<i>iso</i> -verzweigter FAME (ω 2-methylverzweigt)
<i>ai</i> -	<i>anteiso</i> - verzweigter FAME (ω 3-methylverzweigt)
<i>m</i> -/ <i>v</i> -	mittkettig bzw. nahe der Carbonylfunktion verzweigter FAME
Δ_1/Δ_2	FAME mit 1 bzw. 2 Unsatigungen
●	mittlere bis hohe Anteile (≥ 1 % der Lipide)
○	geringe Anteile (< 1 % der Lipide)
◦	in Spuren nachweisbar
^a	zusätzlich mittkettig methylverzweigter FAME

Da die Synthese von Δ ^{5,9}-Fettsäuren größer als C₂₄ (*demospongiac acids*) ein chemotaxonomisches Merkmal der Klasse der Demospongiae ist (LITCHFIELD *et al.*, 1976), stellt ihre Abwesenheit in *P. simplex* eine Besonderheit dar. Von Untersuchungen anderer Schwämme der Unterklasse der Homoscleromorpha (siehe Abbildung 2.3, Seite 11), der auch *P. simplex* angehört, ist allerdings ebenfalls das Fehlen von *demospongiac acids* bekannt (BERGQUIST *et al.*, 1984; CARBALLEIRA und SHALABI, 1990). Eine solche Lipidverteilung wurde in den beiden anderen Unterklassen der Demospongiae (Tetractinomorpha und Ceractinomorpha) nicht beobachtet, wodurch die diskutierte Sonderstellung der Homoscleromorpha unterstrichen wird. Vorrangig wegen ihrer von anderen Demospongien abweichend verlaufenden Fortpflanzung, bei der kleine, einfach aufgebaute Larven (Amphiblastula) gebildet werden, stellen REITNER und MEHL (1996) die Homoscleromorpha als eigenständiges Taxon in die phylogenetische Nähe der Calcarea. Während für Demospongiae die Bildung komplexer Larven mit fast adulter Zusammensetzung (Parenchymula) charakteristisch ist, verläuft die Vermehrung bei den Calcarea, einer Unterklasse der Calcarea (siehe Abbildung 2.3, Seite 11), ebenfalls über Amphiblastula (MÖHN, 1984). Die Resultate der vorliegenden Lipiduntersuchungen sprechen für eine Ausnahmeposition der Homoscleromorpha innerhalb der Demospongiae. Einerseits unterstützt

das Fehlen der langkettigen $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren, wie sie auch in den Lipidanalysen von BERGQUIST *et al.* (1984) sowie CARBALLEIRA und SHALABI (1990) festgestellt wurden, die Abgrenzung der Homoscleromorpha von den Demospongiae. Andererseits ergeben sich aber durch den Vergleich von Literaturdaten mit den Ergebnissen dieser Arbeit keine Hinweise auf eine nähere phylogenetische Verwandtschaft zu den Calcarea. Eher spricht die Präsenz der m -21 $\Delta^{5,9}$ noch gegen eine solche Zugehörigkeit, denn als Erzeuger dieser Doppelbindungssignatur sind nur Demospongiae und Hexactinellida, nicht aber Calcarea bekannt (THIEL *et al.*, 2002).

Neben seiner chemotaxonomischen Aussagekraft ist der Fund von m -21 $\Delta^{5,9}$ auch hinsichtlich eines weiteren Aspektes bemerkenswert. Bislang ist das natürliche Vorkommen von 21 $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren nur von wenigen Organismen bekannt. So erwies sich die Seeanemone *Stoichactis helianthus* ebenso als Quelle der unverzweigten 21 $\Delta^{5,9}$ (CARBALLEIRA und MEDINA, 1994) wie auch die Krustenanemone *Palythoa caribaeorum* (CARBALLEIRA und REYES, 1995). Proben des Schwammes *Erylus formosus* (Unterklasse Tetractinomorpha) beinhalteten hingegen i - und ai -21 $\Delta^{5,9}$ (CARBALLEIRA und NEGRÓN, 1991). Dieselben Verbindungen wurden auch in zwei Süßwasserschwämmen der Gattung *Baicalospongia* (Unterklasse Ceractinomorpha) gefunden (DEMBITSKY *et al.*, 1993). Als Teil einer Reihe *trans,trans*-konfigurierter Fettsäuren wurde die i -21 $\Delta^{5,9}$ erstmals aus *Plakortis halichondroides* isoliert (CARBALLEIRA und SHALABI, 1990). Die Autoren geben für sie einen ECL von 20,46 an. Aus dem Retentionsverhalten der in *P. simplex* nachgewiesenen 21 $\Delta^{5,9}$ (ECL = 20,16) geht allerdings hervor, dass sie eine mittkettige Methylverzweigung besitzt.

Der geführte Nachweis von m -20 $\Delta^{6,14}$ ist aus lipidchemischer Sicht ebenfalls interessant. Lediglich in einer Untersuchung gelang bisher die Identifikation einer C₂₀-Fettsäure mit dem Unättigungsmuster $\Delta^{6,14}$ als biosynthetisches Produkt. In der bereits genannten Erstbeschreibung einer natürlichen i -21 $\Delta^{5,9}$ aus *P. halichondroides* wurde auch die unverzweigte 20 $\Delta^{6,14}$ (ECL = 19,80) beschrieben. Der ECL von 19,52 für die in *P. simplex* gefundene 20 $\Delta^{6,14}$ Säure deutet auch hier eine Methylverzweigung an, die nicht am Kettenende lokalisiert ist. Somit enthält die vorliegende Probe zwei bislang unbeschriebene natürliche Fettsäuren m -20 $\Delta^{6,14}$ und m -21 $\Delta^{5,9}$.

Wie bereits erwähnt, bestimmten CARBALLEIRA und SHALABI (1990) die Konfigurationen mehrerer doppelt ungesättigter Fettsäuren aus *P. halichondroides*. Mehrere Lipide mit 21–23 Kohlenstoffatomen wurden als (5*E*,9*E*)-Diene deklariert. In dieser Studie wurde ferner die Konfiguration der bereits genannten 20 $\Delta^{6,14}$ als 6*E*,14*E* bestimmt. Dies ist der bislang einzige

Bericht über *trans,trans*-konfigurierte Fettsäuren aus der Natur. Um der Frage nach der Konfiguration der doppelt ungesättigten Lipide von *P. simplex* nachzugehen, wurde der FAME-Extrakt einer GC/IR-Analyse unterzogen.

Ein Vergleich mit den Spektren kommerziell erhältlicher Standards sollte Auskunft über die Substitutionsmuster an den Doppelbindungen der in *P. simplex* enthaltenen *m*-20 Δ ^{6,14}- und *m*-21 Δ ^{5,9}-FAME geben. Als Vergleichskomponenten wurden jeweils *E*- und *Z*-konfigurierte *n*-16 Δ ⁹- und *n*-18 Δ ¹¹-FAME verwandt. Abbildung 3.3 zeigt die IR-Transmissionspektren der beiden Isomere (*Z*)-*n*-16 Δ ⁹ und (*E*)-*n*-16 Δ ⁹ sowie das der *m*-21 Δ ^{5,9}. Die IR-Spektren aller vier Standards sowie die der beiden doppelt ungesättigten FAME aus *P. simplex* sind im Anhang (Kapitel 7.3, Seite 119) abgebildet. In den Spektren der Standards sind die Valenzschwingungen (Streckschwingungen) von C-H-Bindungen $\nu(\text{C-H})$ bei Wellenzahlen geringfügig unterhalb von 3000 cm^{-1} sowie von der jeweiligen Carbonylgruppe $\nu(\text{C=O})$ bei $\nu = 1759 \text{ cm}^{-1}$ zu erkennen. Weiterhin treten Deformationsschwingungen der Carbonylfunktionen $\delta(\text{C=O})$ sowie der C-O-Bindungen zu den Methylestergruppen $\delta(\text{C-O})$ mit Signalen bei etwa $\nu = 1440 \text{ cm}^{-1}$ bzw. $\nu = 1170 \text{ cm}^{-1}$ auf. Die beiden *trans*-Isomere erzeugen außerdem scharfe Signale bei $\nu = 966 \text{ cm}^{-1}$, die auf Deformationsschwingungen der vinyli-schen C-H-Bindungen $\gamma(\text{=C-H})$ aus der planaren Doppelbindungsebene zurückzuführen sind. Dementsprechende Signale der *cis*-Isomere

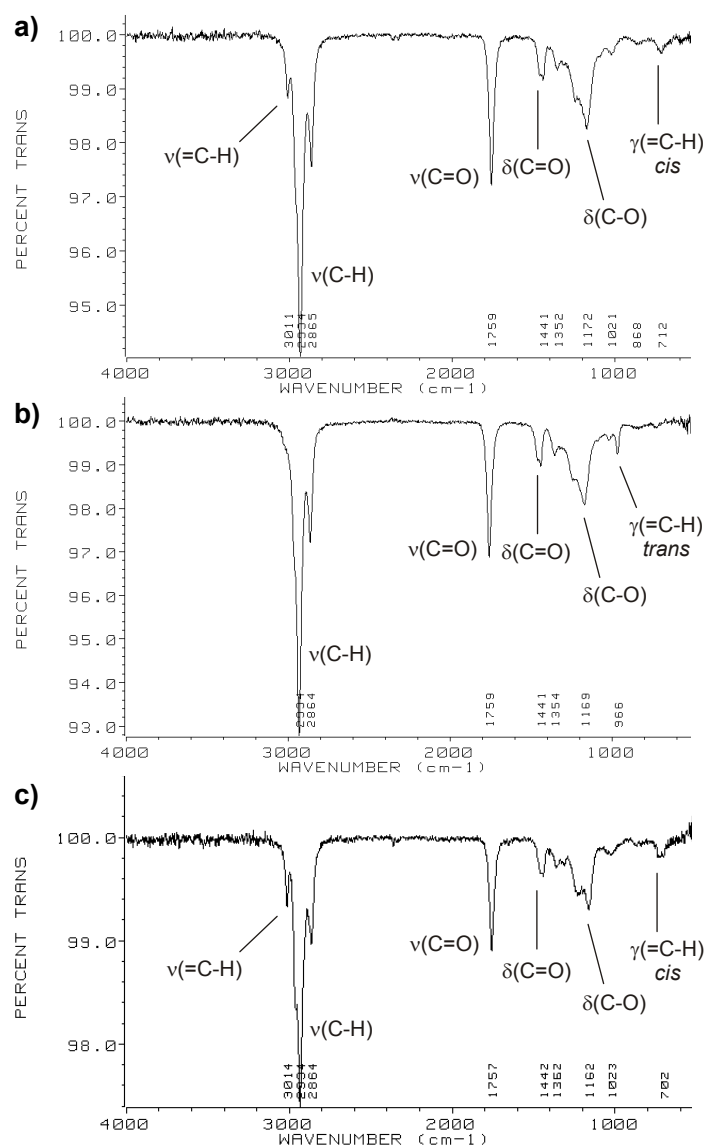
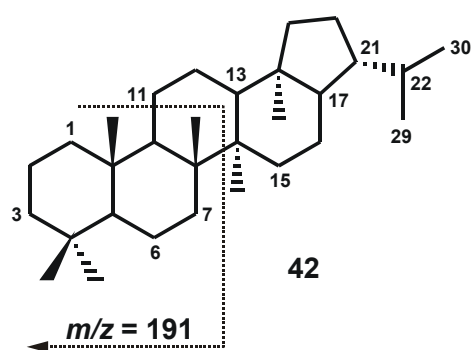


Abbildung 3.3 Infrarot-Transmissionspektren der Fettsäuremethylester a) (*Z*)-*n*-16 Δ ⁹ (Standard), b) (*E*)-*n*-16 Δ ⁹ (Standard) und c) *m*-21 Δ ^{5,9} aus *Plakortis simplex*

zeigen sich bei etwa $\nu = 710 \text{ cm}^{-1}$ als breitere Banden. Darüber hinaus ist bei den FAME mit *Z*-Konfigurationen je ein weiteres $\nu(\text{C-H})$ -Signal knapp oberhalb von 3000 cm^{-1} zu beobachten, das bei den *E*-Isomeren nicht ersichtlich ist. In den Transmissionsspektren der FAME aus *P. simplex* finden sich alle gemeinsamen Merkmale der Standards wieder. Zusätzlich ist dort das spezifische Kennzeichen der Kohlenstoffketten mit *cis*-Konfiguration $\gamma(\text{C-H})$ zu erkennen sowie die ausschließlich bei den (*Z*)-Standards aufgetretene $\nu(\text{C-H})$ Schwingung bei $\nu > 3000 \text{ cm}^{-1}$. Da hingegen im Bereich um $\nu = 966 \text{ cm}^{-1}$ kein ähnliches $\gamma(\text{C-H})$ -Signal wie bei den untersuchten *trans*-Isomeren zu erkennen ist, wird angenommen, dass in *P. simplex* die Fettsäuren (6*Z*,14*Z*)-*m*-20 $\Delta^{6,14}$ - und (5*Z*,9*Z*)-*m*-21 $\Delta^{5,9}$ enthalten sind.

3.2.2 Fraktion 1

Das Chromatogramm der GC/MS-Analyse von Fraktion 1 des Gesamtextraktes (Abbildung 3.4) zeigt zwei Signalgruppen, die sich konkreten Substanzklassen zuordnen lassen. Im Retentionszeitbereich zwischen 13 min und 18 min treten Verbindungen auf, deren Molekülonen bei $m/z = 202$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{22}$), $m/z = 204$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) und $m/z = 208$ ($\text{C}_{15}\text{H}_{28}$) erscheinen. Des Weiteren geben einige häufig bei Sesquiterpenen beobachtete Fragmentationen Hinweise auf diese Naturstoffklasse. Die Aufklärung der vorliegenden Strukturen ist auf der Grundlage der Massenspektren und des Retentionsverhaltens nicht möglich.



Ab Retentionszeiten von etwa 49 min eluierte eine Gruppe weiterer Komponenten, von denen zwei (**A** und **B**) quantitativ in den Vordergrund treten. Ihre Massenspektren zeigen mit einigen Fragmenten, wie etwa ihrem Basispeak bei $m/z = 191$ sowie ihren Molekülonen bei $m/z = 410$ (Abbildung 3.5), typische Merkmale der Hopanoide. Diese Primärstoffklasse umfasst die Abkömmlinge des pentacyclischen Triterpens Hopan (**42**). Ein Abgleich der Massenspektren von **A** und **B** mit Literaturdaten lässt darauf schließen, dass es sich bei diesen Verbindungen um

Neohop-13(18)-en (**43**) und Hop-22(29)-en (**44**, Diplopten) handelt. Unterstützt wird diese Annahme durch die Vergleiche von GC-Retentionszeiten und Massenspektren des Probenmaterials mit kommerziell erhältlichen Standards der genannten Substanzen. Des Weiteren

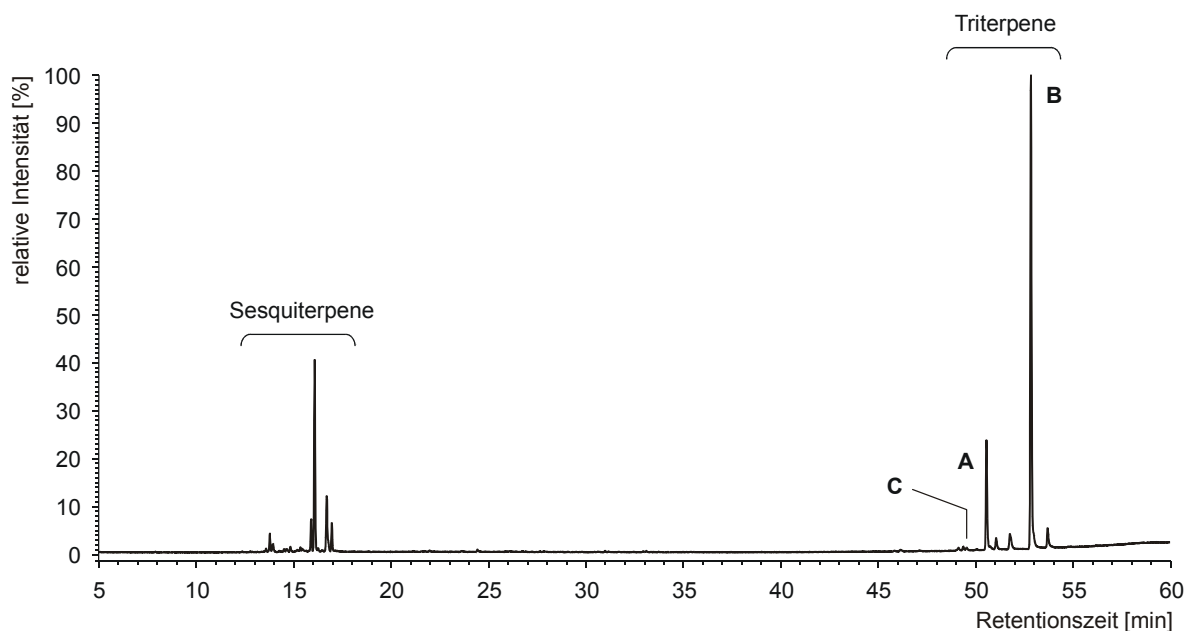


Abbildung 3.4 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 1 (Kohlenwasserstoffe) aus *Plakortis simplex* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

wurde die im TIC nur untergeordnet zu erkennende Verbindung **C** anhand eines solchen Vergleichs als Hop-17(21)-en (**45**) identifiziert.

Das Auftreten dieser Verbindungen in dem zuvor diskutierten FAME-Extrakt (Kapitel 3.2.1, ab Seite 26) lässt einen Vergleich der Konzentrationen von **43–45** mit denen der Fettsäuren im Organismus zu. Auf der Basis dieser Abschätzung ist das Vorkommen der drei Hopanoide in *Plakortis simplex* verglichen mit anderen Poriferen, bei denen diese Substanzen oft nicht oder nur in Spuren auftreten, als ungewöhnlich hoch zu bewerten (PAPE, 2004).

Als Produzenten von Hopanoiden sind, neben Pflanzen, wie Gräsern und Farnen, sowie einigen Flechten und Pilzen, vorwiegend Bakterien bekannt (OURISSON und ROHMER, 1992). Entsprechend der Funktion von Steroiden in den Zytoplasmamembranen von Eukaryonten werden ihnen membranstabilisierende Eigenschaften zugesprochen (OURISSON *et al.*, 1979). Da ihre chemische Grundstruktur **42** gegen Biodegradation weitgehend resistent ist, sind sie innerhalb erdgeschichtlicher Zeiträume als „Geohopanoide“ in Sedimenten, Mineralien und in Erdöl akkumuliert (MYCKE *et al.*, 1987). Inzwischen erlangten diese „molekularen Fossilien“ eine nicht unwichtige Bedeutung für die Archäologie und Petrochemie (OURISSON und ALBRECHT, 1992).

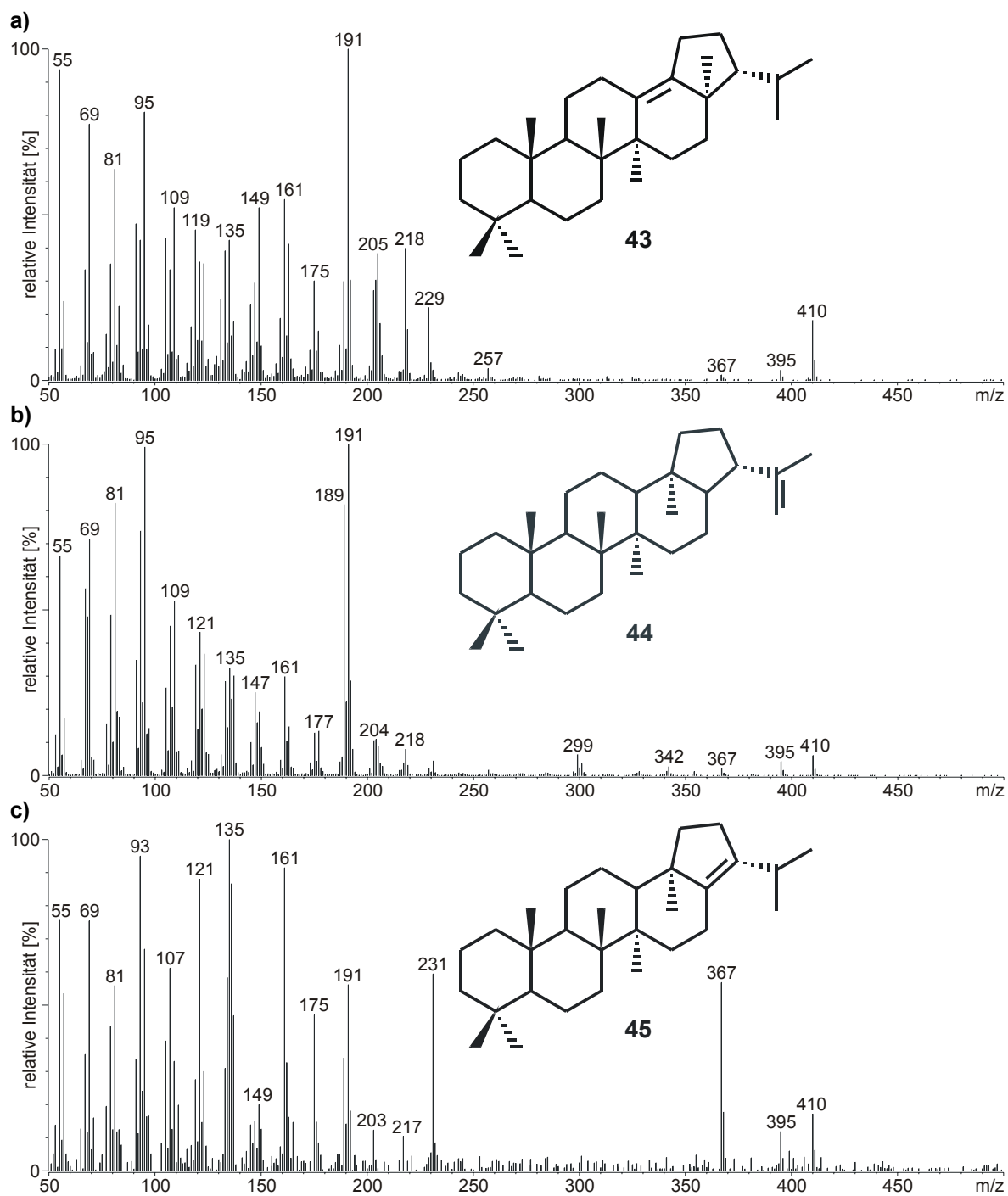


Abbildung 3.5 EI-Massenspektren von a) Neohop-13(18)-en (**43**), b) Hop-22(29)-en (**44**, Diplopten) und c) Hop-17(21)-en (**45**) aus *Plakortis simplex*

Im Gegensatz zu den Hopanoiden der Eukarya, deren Moleküle im Allgemeinen nicht mehr als 30 Kohlenstoffatome besitzen, zeigen Bakteriohopanoide häufig größere Substituenten an der Position 21 und somit Molekülgrößen über C_{30} . Gerade im marinen Lebensraum sind daher höhermolekulare Hopanoide ($> C_{30}$) zuverlässige Biomarker für Bacteria.

Auf dieser Tatsache gründet die Annahme, dass in der hier untersuchten Probe von *P. simplex* eine dichte Population assoziierter Bakterien vorliegen muss. Diese würde die relativ hohen Konzentrationen an Hopanoiden in der Probe erklären. In der Tat stützen die mikrobiologischen Untersuchungen von Partnern innerhalb des Projektes BOSMAN die Vermutung einer hohen Bakteriendichte in *P. simplex*. DNA-Färbungen an Schwammgewebeschnitten, die Mitarbeiter des BOSMAN-Teilprojektes (TP) 2 durch Einsatz von 4',6-Diamidino-2-phenylindodihydrochlorid (DAPI) anfertigten (Abbildung 3.6), belegen dies in einer optischen Abschätzung. Darüber hinaus zeigen die Berechnungen auf Grundlage von Zellauszählungen durch Mitarbeiter im TP 5 ebenfalls eine hohe Dichte an Bakterien in *P. simplex*. Hierzu wurde Schwammgewebe homogenisiert und durch Membranfiltration von ungelösten Bestandteilen befreit. Die enthaltenen Bakterienzellen wurden nach Anfärbung durch DAPI in Lösungen verschiedener Verdünnungen gezählt und auf eine Populationsdichte von etwa 10^{12} Zellen pro Gramm Schwammgewebe zurückgerechnet.

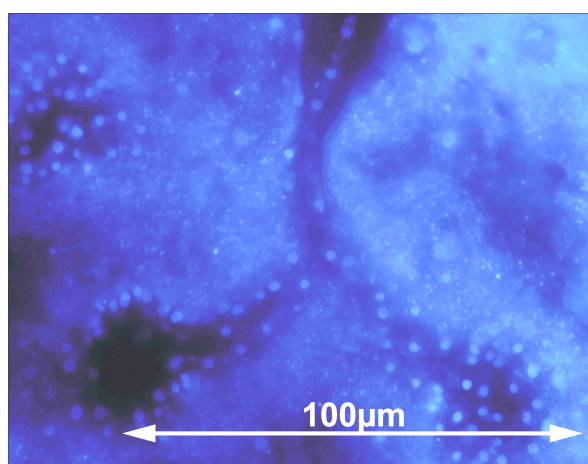
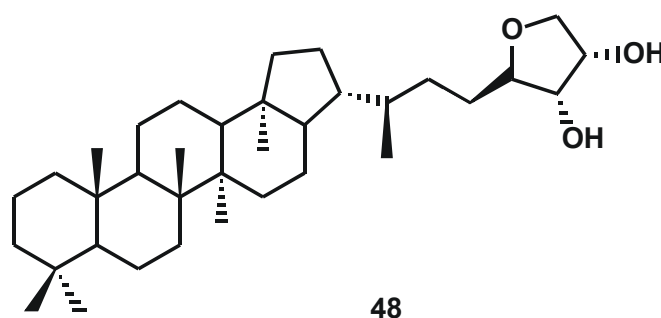
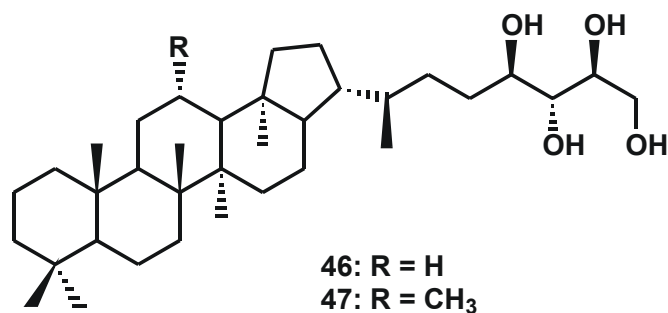


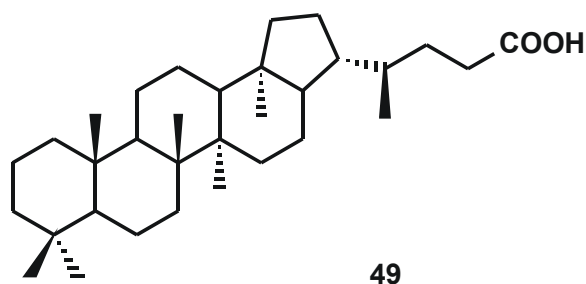
Abbildung 3.6 DAPI-Färbung von Bakterien (blau) im Gewebe einer Porifere der Spezies *Plakortis simplex* (Bildmaterial: TP2, AG Prof. Dr. J. Reitner, Universität Göttingen)

Der erste Nachweis von Hopanoiden in Schwammproben wurde erst vor wenigen Jahren erbracht. Aus einem bei den Bahamas entnommen Individuum der Spezies *P. simplex* wurde das bereits bekannte Bacteriohopan-32,33,34,35-tetrol (**46**, BHT) sowie das bis dahin unbekannte 12-Methyl-BHT (**47**) isoliert und identifiziert (COSTANTINO *et al.*, 2000). Wenig später dokumentierten COSTANTINO *et al.* (2001) die Strukturaufklärung von 32,35-Anhydrobacteriohopantetrol (**48**, Anhydro-BHT), das in derselben Probe hochkonzentriert auftritt. Aus genannten Gründen können als Produzenten des BHT (C_{35}) mit hoher Sicherheit die im Schwamm assoziierten Bakterien angesehen werden. Obwohl das 12-Methyl-BHT (**47**) ein C_{36} -Grundgerüst besitzt, wird die Möglichkeit diskutiert, dass *P. simplex* diese Verbindung aus dem BHT (**46**) bilden könnte (COSTANTINO *et al.*, 2000). Ähnliche Methylierungen bakterieller Komponenten durch Poriferen sind im Falle von Fettsäuren (DJERASSI und LAM, 1991) und Steroiden (KERR und BAKER, 1991; AIELLO *et al.*, 1999) bekannt.

Höhere polare Hopanoide wie die mehrfachen Alkohole **46–48** werden wegen ihrer geringen Flüchtigkeit ohne vorhergehende Derivatisierung mit der in dieser Arbeit angewandten gaschromatographischen Untersuchungsmethode nicht erfasst. Da geklärt werden sollte, ob der vorliegende Schwamm dieselben Verbindungen enthält wie der karibische Vertreter gleicher Gattung, wurde ein Aliquot des organisch löslichen Gesamtextraktes einer Acetylierung zugeführt (siehe Kapitel 4.2.3, Seite 96) und die Produktlösung mittels



GC/MS analysiert. Das Chromatogramm dieser Untersuchung zeigt ein Signal, das auf das (acetylierte) Anhydro-BHT (**48**) zurückzuführen ist. Dies belegen Vergleiche der Retentionszeit von **48** mit der von authentischem Referenzmaterial (*A. Mangoni, Università di Napoli, Italien; M. Rohmer, Université Louis Pasteur, Frankreich; P. Albrecht, Ecole Européenne de Chimie, Strasbourg, Frankreich*) sowie die Vergleiche ihrer Massenspektren. Darüber hinaus wurde in



dem in Kapitel 3.2.1 (ab Seite 26) diskutierten FAME-Extrakt der Methyl ester der 17β(H),21β(H)-bishomo-Hopansäure (**49**) als spät eluierende Verbindung gefunden. Die Strukturidentität und Stereochemie wurde von PAPE (2004) im Rahmen einer Dissertation verifiziert.

3.2.3 Fraktion 2a

Die Gesamtextraktfraktion 2a enthält eine Vielzahl gering funktionalisierter Verbindungen (Abbildung 3.7), deren Strukturen allein auf der Grundlage massenspektrometrischer Analysen nicht zu identifizieren sind. Der Anteil dieser Fraktion an der Masse aller vier Fraktionen beträgt 7 %. Die Aussichten auf die Isolation von Substanzmengen, die zur

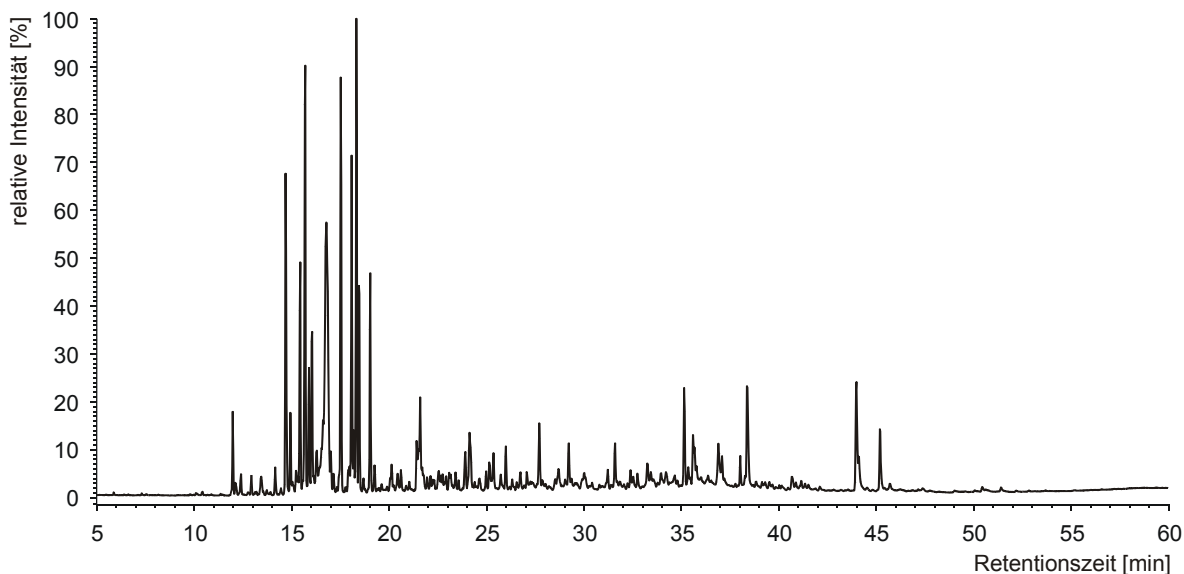


Abbildung 3.7 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 2a (semipolare Substanzen) aus *Plakortis simplex* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

Strukturaufklärung mit Hilfe von NMR-Spektroskopie ausreichen, wurden bei anderen Fraktionen weitaus günstiger eingeschätzt. Arbeiten zur Erzeugung von Reinsubstanzen aus dieser Fraktion wurden daher nicht durchgeführt.

3.2.4 Fraktion 2b

Eine diskrete Gruppe von Verbindungen wurde im GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Gesamtextraktfraktion 2b (Abbildung 3.8) beobachtet. Der in Kapitel 3.2.1 (ab Seite 26) diskutierte FAME-Extrakt enthält diese Substanzen ebenfalls als Hauptkomponenten. Wie bereits beschrieben, wurde ihr Anteil an diesem Lipidextrakt durch GC/FID auf über 60 % bestimmt. Daher ist für diese Metaboliten eine hohe Relevanz für den Organismus zu vermuten. Der auf alle Gesamtextraktfraktionen bezogene Massenanteil dieser Verbindungen beträgt 24 %.

Ein Vergleich der Fragmentmassen aus den GC/MS-Untersuchungen dieser Fraktion mit Literaturdaten lässt den Schluss zu, dass es sich bei diesen Inhaltsstoffen um cyclische Peroxide handelt. Verbindungen dieser Substanzklasse sind bereits aus zahlreichen Untersuchungen als Metaboliten von Schwämmen der Gattung *Plakortis* bekannt (z.B. STIERLE und FAULKNER, 1980; BRAEKMAN *et al.*, 1998; FONTANA *et al.*, 1998; PETTIT *et al.*, 2004). Die beiden Hauptkomponenten dieser Fraktion, **D** und **E**, wurden durch den Einsatz von

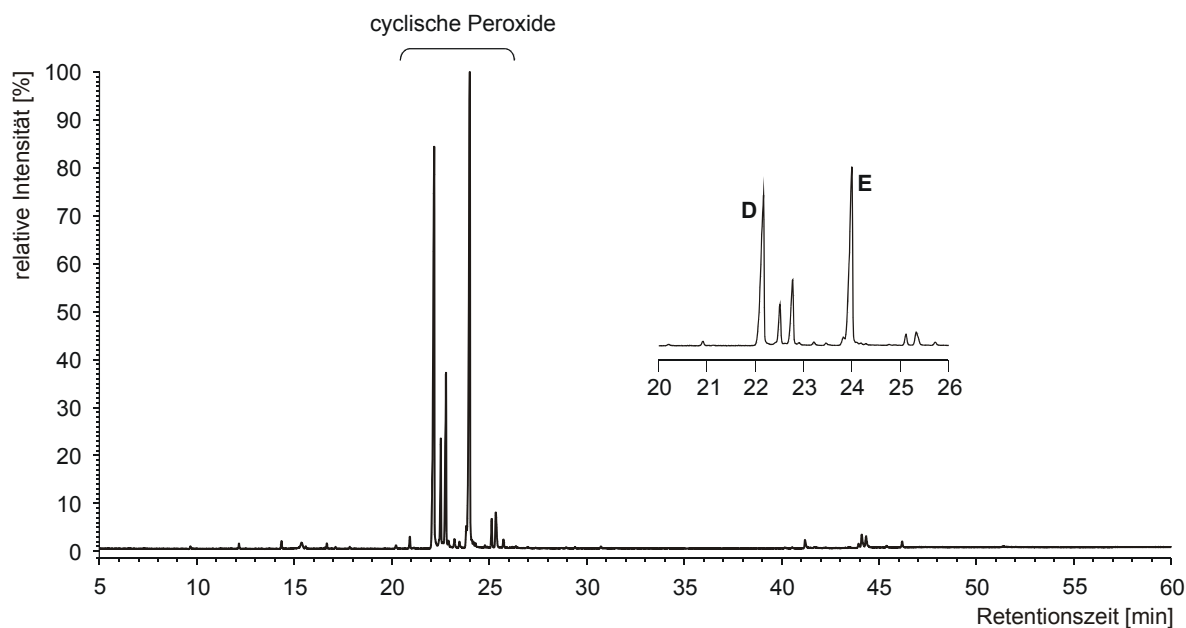


Abbildung 3.8 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 2b (semipolare Substanzen) aus *Plakortis simplex* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

Umkehrphasen-HPLC für weiterführende Untersuchungen als Reinsubstanzen isoliert (siehe Kapitel 4.3.1, Seite 100).

Die Massenspektren der beiden Substanzen zeigen unter Elektronenstoßionisation (*electron impact ionisation*, EI) als Signale ihrer höchsten Massen Fragmente bei $m/z = 266$ bzw. $m/z = 280$ (Abbildung 3.9). Dass es sich dabei nicht um Molekülionen-Peaks handelt, wird durch das Auftreten der Pseudomolekülionen-Peaks $[M+NH_4]^+$ bei $m/z = 302$ für **D** und $m/z = 316$ für **E** unter chemischer Ionisation (*chemical ionisation*, CI) mit Ammoniak als Reaktandgas deutlich. Im hochaufgelösten positiven FABMS (Massenspektrometrie mit Ionisation durch schnellen Atombeschuss, *fast atom bombardement mass spectrometry*) sind ebenfalls Pseudomolekülionen-Peaks des Typs $[M+H]^+$ bei $m/z = 285,2058$ für **D** und $m/z = 299,2218$ für **E** zu beobachten. Die Summenformeln der beiden Verbindungen wurden dadurch als $C_{16}H_{28}O_4$ (berechnete Masse für $[C_{16}H_{28}O_4+H]^+ = 285,2060$) und $C_{17}H_{30}O_4$ (berechnete Masse für $[C_{17}H_{30}O_4+H]^+ = 299,2217$) bestimmt. Die genannten Fragmentionen im EIMS bei $m/z = 266$ (**D**) und $m/z = 280$ (**E**) lassen sich aufgrund ihrer Differenz zu den ermittelten Molekülmassen von jeweils 18 u den Produkten einer Wasserabspaltungsreaktion zuweisen.

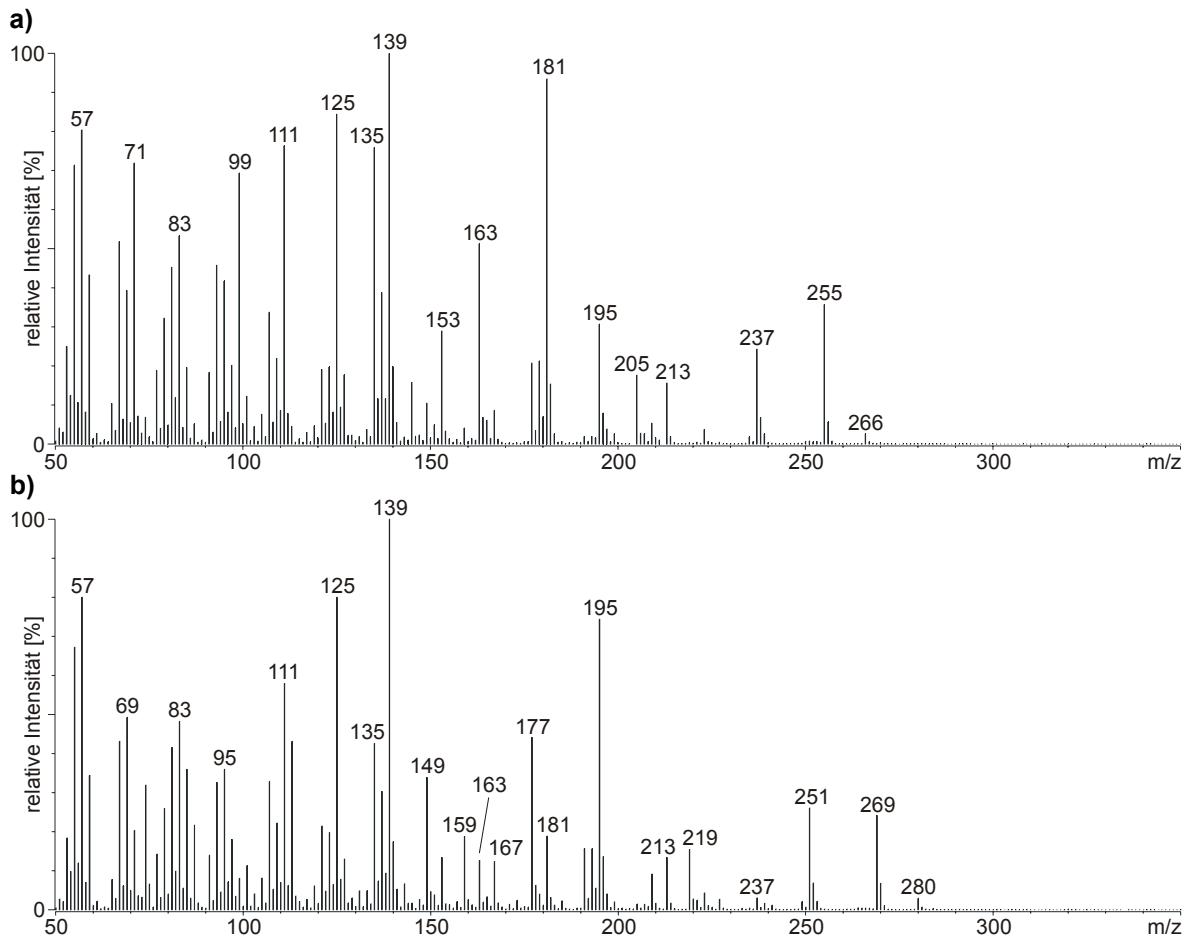


Abbildung 3.9 EI-Massenspektren der isolierten Substanzen a) **D** und b) **E** aus *Plakortis simplex*

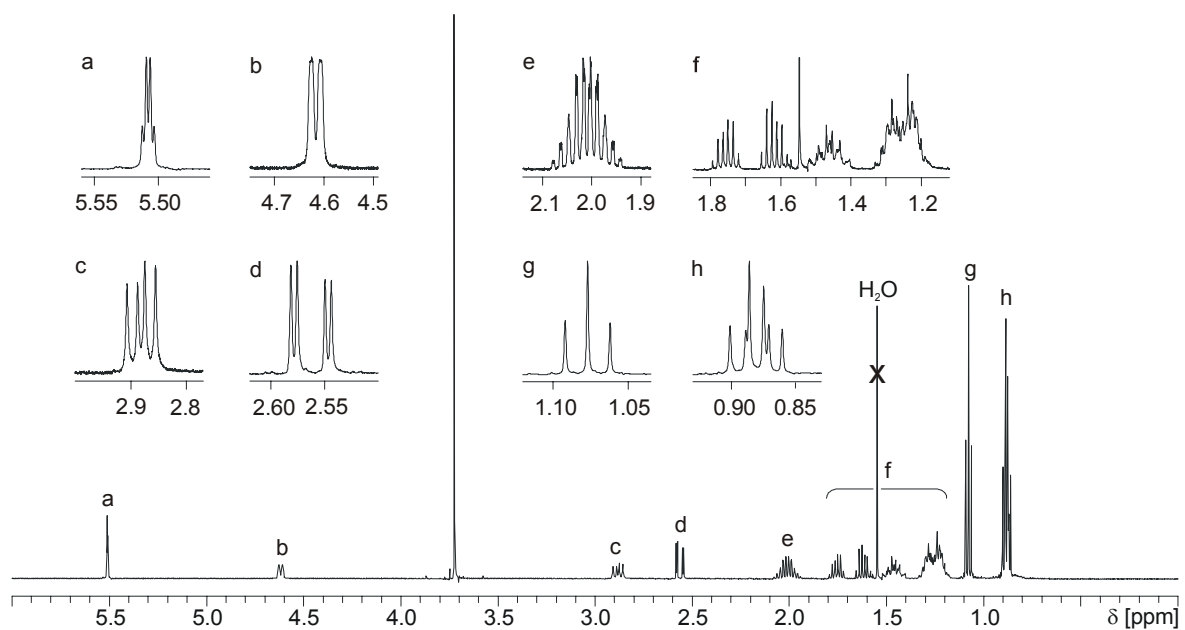


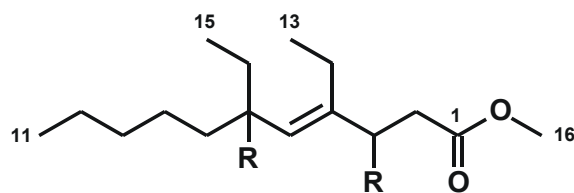
Abbildung 3.10 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Substanz **D** (in CDCl_3) aus *Plakortis simplex*

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **D** (Abbildung 3.10) zeigt Signale von insgesamt 28 Protonen (siehe Tabelle 3.2), wovon zwölf Protonen Methylgruppen angehören. Drei Methyltripletts treten bei $\delta_{\text{H}} = 0,87$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 0,89$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 1,08$ ppm auf, während ein Methylsingulett bei $\delta_{\text{H}} = 3,72$ ppm erscheint. Außerdem befinden sich zwei Signale, deren Integrale jeweils einem Proton entsprechen, zum Tieffeld verschoben. Eines dieser Signale zeigt ein vinyllisches Proton bei $\delta_{\text{H}} = 5,51$ ppm, während das zweite bei $\delta_{\text{H}} = 4,62$ ppm auftritt. Die verbleibenden 14 Protonen sind Bestandteile von sieben Methylenheiten, wovon drei im Bereich zwischen $\delta_{\text{H}} = 1,15$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 1,35$ ppm resonieren und die übrigen bei $\delta_{\text{H}} = 1,46$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 1,62/1,76$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 2,01$ ppm sowie $\delta_{\text{H}} = 2,56/2,88$ ppm zu finden sind. Übereinstimmend treten im $^{13}\text{C-NMR}$ - (siehe Anhang, Kapitel 7.4.1, Seite 120) und DEPT(*distortionless enhancement by polarisation transfer*)-Spektrum sieben Methylen-, sechs Methyl- und Methin- sowie drei quartäre Kohlenstoffatome auf (Tabelle 3.2 und Tabelle 3.3).

C ₁ -Gruppen	C	H
3 x C	3	-
2 x CH	2	2
7 x CH ₂	7	14
4 x CH ₃	4	12
Σ C ₁₆ H ₂₈	16	28

Tabelle 3.2 Summierung der nach C₁-Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus den $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und DEPT-Spektren der Substanz **D** aus *Plakortis simplex*

Aus dem HSQC(*heteronuclear single quantum coherence*)-Spektrum (siehe Anhang, Kapitel 7.4.1, Seite 121) folgen die Zuordnungen der Protonen zu den direkt gebundenen Kohlenstoffatomen ($^1J_{\text{C,H}}$). Aufgrund der Überlagerung ihrer Resonanzen im ^1H -Spektrum sind die Kopplungen der drei Protonen zwischen $\delta_{\text{H}} = 1,15$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 1,35$ ppm nicht voneinander zu unterscheiden. Unter Berücksichtigung der Summenformel, die das Fehlen anderer Heteroatome als Sauerstoff belegt, deutet das quartäre Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 171,6$ ppm auf eine Carbonylfunktion hin. Im HMBC(*heteronuclear multiple bond correlation*)-Spektrum (siehe Anhang, Kapitel 7.4.1, Seite 123) tritt eine starke Kopplung dieses C-Atoms mit dem Methylsingulett bei $\delta_{\text{H}} = 3,72$ ppm auf, wodurch ein klarer Hinweis auf einen Methylester gegeben ist. Ausgehend von dieser Methylestergruppe lässt sich das Kohlenstoffgerüst des Moleküls durch die Kopplungen in den HMBC- und H,H-COSY(*correlated spectroscopy*)-Spektren (siehe



50a

Anhang, Kapitel 7.4.1, Seite 122) eindeutig festlegen. Die somit erhaltene Teilstruktur (**50a**) besteht aus einer Undec-4-ensäuremethylestereinheit, die an den Positionen C-4 und C-6 jeweils eine Ethylgruppe trägt. Mit Ausnahme von zwei Sauerstoffatomen

C-Pos	D		E	
	δ_C	δ_H (Multiplizität; $J_{H,H}$)	δ_C	δ_H (Multiplizität; $J_{H,H}$)
1	171,6	-	171,7	-
2	36,9	2,88 (dd; 16,0; 9,5) 2,56 (dd; 16,0; 3,0)	37,0	2,88 (dd; 16,0; 9,5) 2,56 (dd; 16,0; 3,0)
3	76,6	4,62 (m)	76,7	4,61 (m)
4	137,6	-	137,7	-
5	124,7	5,51 (m)	124,8	5,51 (m)
6	82,4	-	82,5	-
7	34,8	1,46 (m)	34,9	1,46 (m)
8	22,9	1,15-1,35	23,4 ^a	1,15-1,35
9	32,2	1,15-1,35	29,8 ^a	1,15-1,35
10	22,4	1,15-1,35	31,6 ^b	1,15-1,35
11	14,0	0,87 (t; 7,0)	22,7 ^b	1,15-1,35
12	24,9	2,01 (m),	14,1	0,88 (t; 7,0)
13	11,7	1,08 (t; 7,5)	25,0	2,01 (m)
14	29,6	1,76 (dq; 14,0 ; 7,5) 1,62 (dq; 14,0 ; 7,5)	11,8	1,08 (t; 7,5)
15	7,9	0,89 (t; 7,5)	29,8	1,76 (dq; 14,0 ; 7,5) 1,62 (dq; 14,0 ; 7,5)
16	51,8	3,72 (s)	8,0	0,89 (t; 7,5)
17	-	-	52,0	3,72 (s)

Tabelle 3.3 ¹H- und ¹³C-NMR-Daten der Substanzen **D** und **E** (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*

^{a,b} Angaben mit gleicher Kennzeichnung sind austauschbar

enthält Teilstruktur **50a** bereits alle Atome der durch HRMS (hochauflösende Massenspektrometrie, *high resolution mass spectrometry*) bestimmten Summenformel (C₁₆H₂₉O₄) von **D**. Somit liegt es nahe, dass die zwei noch offenen Bindungen an C-3 und C-6 durch eine Peroxidbrücke miteinander verknüpft sind. Durch das ¹³C-NMR-Signal von C-3 bei $\delta_C = 76,6$ ppm sowie die Resonanz des Protons an dieser Position bei $\delta_H = 4,62$ ppm sind in der Tat Hinweise gegeben, dass sich diese CH-Gruppe in Nachbarschaft zu einem Sauerstoffatom befindet. Gleiches gilt für die ¹³C-NMR-Resonanz des quartären Kohlenstoffatoms bei $\delta_C = 82,4$ ppm. In der Konsequenz bedeutet dies das Vorliegen eines sechsgliedrigen Rings, in den eine Peroxidfunktion integriert ist. Substanz **D** kann folglich mit der Struktur des (3*R**,6*S**,*Z*)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxundeca-4-ensäuremethylesters (**50**) beschrieben werden.

Die relative Konfigurationen der chiralen Zentren an den Positionen C-3 und C-6 ergeben sich aus den NOESY (*nuclear Overhauser effect spectroscopy*)-Signalen. Kopplungen können hierbei zwischen H-3 und H-15 wie auch zwischen H-3 und einem der Protonen am C-14 beobachtet werden. Weiterhin treten Kopplungen zwischen Protonen aus der Gruppe H-8/H-9/H-10

D			E		
H-Pos	H,H-COSY ^a	HMBC ^b	H-Pos	H,H-COSY ^a	HMBC ^b
2	3	1,3,4	2	3	1,3,4
3	2,5	1,2,4,5,12	3	2,5	1,2,4,5
5	3,12	3,4,6,7,12	5	3,13	3,4,6,7,13
7	[8/9/10] ^c	5,6,8,9	7	[8/9/10/11] ^c	5,6,8,9
[8/9/10] ^c	7, 11	7,8,9,10,11	[8/9/10/11] ^c	7,12	7,8,9,10,11,12
11	[8/9/10] ^c	9,10	12	[8/9/10/11] ^c	10,11
12	5,13	3,4,5,13	13	5,14	3,4,5,14
13	12	4,12	14	13	4,13
14	15	5,6,7,15	15	16	5,6,7,16
15	14	6,14	16	15	6,15
16	-	1	17	-	1

Tabelle 3.4 H,H-COSY- und HMBC-Kopplungen der Substanzen **D** und **E** (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*

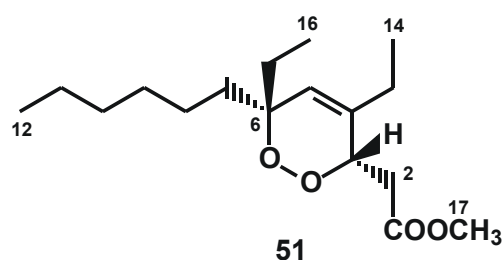
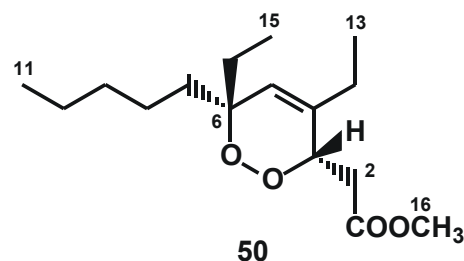
^a Korrelation von Protonen der Spalte „H-Pos“ zu den angegebenen Protonen

^b Korrelation von Protonen der Spalte „H-Pos“ zu den angegebenen ¹³C-Atomkernen

^c Korrelationen von oder zu einem oder mehreren in Klammern genannten Protonen

und einem Proton H-2 auf, wodurch die relative Konfiguration von **50** (**D**) als 3*R*,6*S* festgelegt werden kann.

Die NMR-Daten der Substanz **E** unterscheiden sich von denen der Verbindung **50** (**D**) nur durch eine zusätzliche Methyleinheit ($\delta_{\text{H}} = 1,15\text{--}1,35$ ppm). Alle anderen Regionen der Spektren stimmen vollständig überein. Das Kohlenstoffgerüst wird somit als Dodec-4-ensäuremethylesterinheit identifiziert. Damit ergibt sich für **E** die Struktur **51** des (3*R**,6*S**,*Z*)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylesters.



Da der Gesamtextrakt der Schwammprobe unter Verwendung von Methanol hergestellt wurde, galt es klären, ob die Methylestergruppen von **50** und **51** auf Artefaktbildung bei der Extraktion zurückzuführen sind. Dazu wurde ein Extrakt der Probe mit Aceton angefertigt und auf die Präsenz von **50** und **51** untersucht. Hierbei ergab sich, dass beide

Verbindungen auch im Acetonextrakt auftreten und somit als Methylester in der Probe enthalten sein müssen.

Anhand der Interpretation der EI-Massenspektren von **50** und **51** (Abbildung 3.8, Seite 37) auf der Grundlage der Strukturen **50** und **51** lassen sich diese auf Plausibilität überprüfen. Wie bereits zuvor beschrieben, treten in den EI-Massenspektren dieser cyclischen Peroxide als höchste Fragmentmassen die Signale $m/z = 266$ bzw. $m/z = 280$ auf. Ihre Differenz von jeweils 18 u zu den Molekülmassen gibt darüber Auskunft, dass sie die Produkte einer Wasserabspaltung vom jeweiligen Molekölion sind. Durch den Verlust eines Moleküls mit gerader Elektronenzahl bleibt der radikalische Charakter des Molekölions in seinen Tochterionen erhalten. Die instabilen Eigenschaften solcher Ionen decken sich mit der Beobachtung relativ geringer Signalintensitäten der Dehydratisierungsprodukte. Intensivere Ionen, wie $m/z = 255$ oder $m/z = 237$ (**50**) bzw. $m/z = 269$ oder $m/z = 251$ (**51**) sowie $m/z = 213$ und $m/z = 195$, können

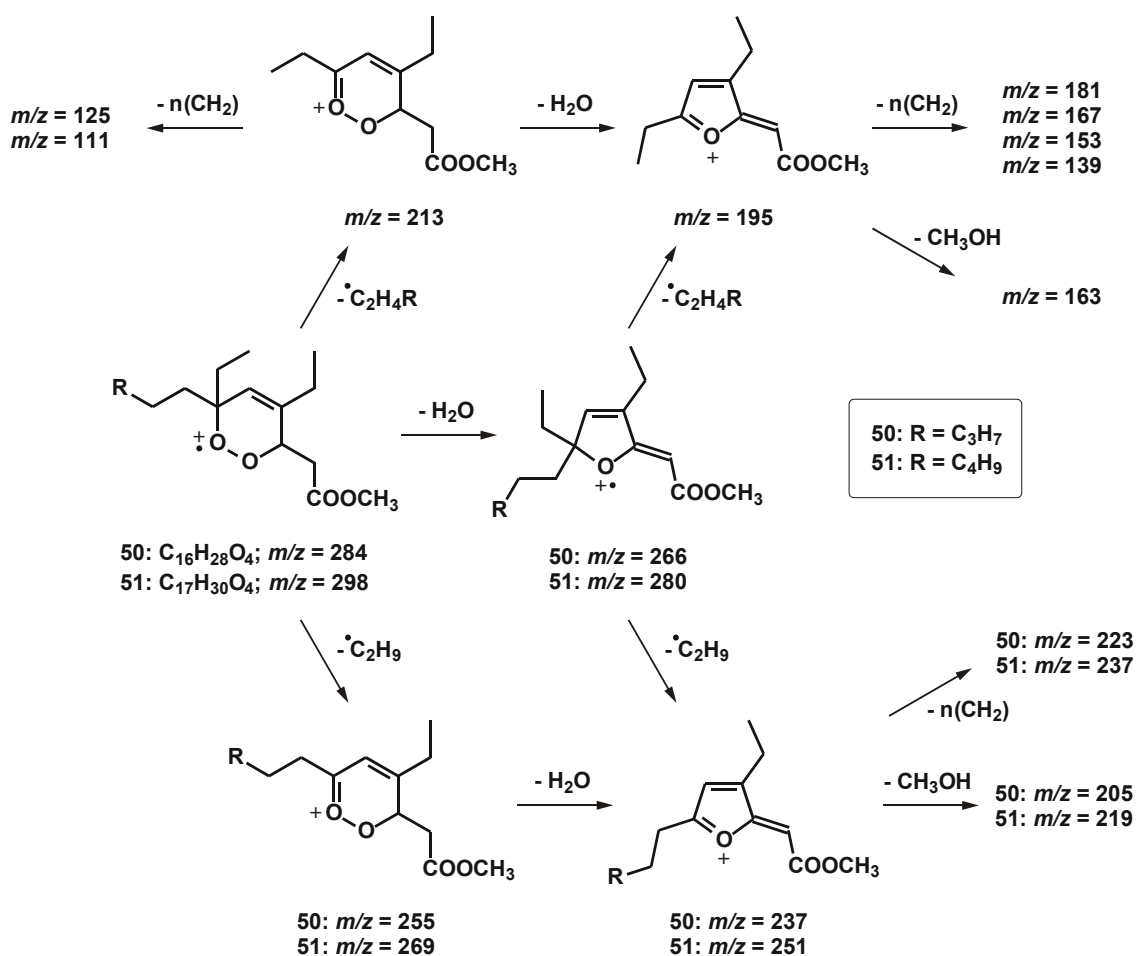


Abbildung 3.11 Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema (EIMS) der Substanzen **50** und **51** aus *Plakortis simplex*

mit je einem der vorliegenden Radikationen (inklusive der Molekülionen) durch Abspaltung von Alkylsubstituenten mit ungerader Elektronenanzahl erklärt werden. Das dabei zugrunde liegende Fragmentierungsschema (Abbildung 3.11) wird durch das Auftreten des Ions $m/z = 139$ als intensivstes Signal (Basispeak) gestützt. Es wird angenommen, dass dieses der zu erwartenden ringförmigen Struktur entspricht, die nach Eliminierung von Wasser und vollständiger Dealkylierung zurückbleibt (Abbildung 3.12).

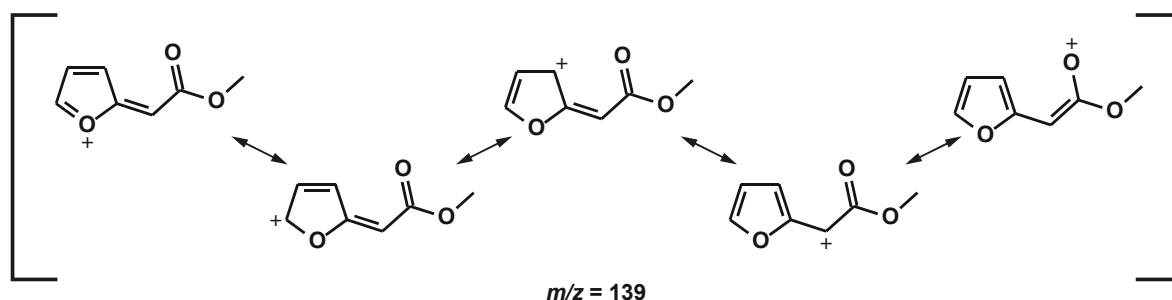


Abbildung 3.12 Resonanzstabilisierung der hypothetischen Struktur des Fragmentions $m/z = 139$ im EIMS der Substanzen **50** und **51** aus *Plakortis simplex*

Auf der Grundlage dieser Interpretationen werden die Strukturen **50** und **51** als diejenigen der isolierten Substanzen **D** und **E** bekräftigt. Sie sind in der Literatur bisher unbeschriebene Verbindungen und wurden im Rahmen der vorliegenden Studie als Naturstoffe aus *P. simplex* publiziert (HOLZWARTH *et al.*, 2005) siehe Anhang, Kapitel 7.5, Seite 143).

Biologische Aktivität

Beide Reinsubstanzen wurden von der Firma Oncotest GmbH, Freiburg, *in-vitro* mit sechs verschiedenen Krebszelllinien auf antitumorale Wirkungen untersucht. Dazu wurden die in einer einlagigen Schicht (*monolayer*) gewachsenen Zellen mit unterschiedlich verdünnten Testsubstanzlösungen (1 ng/mL bis 10 µg/mL) versetzt. Die nach einer Inkubationszeit von vier Tagen überlebenden Zellen wurden mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und in Relation zu einem Referenzversuch ohne Wirkstoffexposition quantifiziert (DENGLER *et al.*, 1995). Aus den Ergebnissen der Versuche mit unterschiedlichen Verdünnungen wurde für jede Testsubstanz die so genannte IC_{50} (halbmaximale Hemmkonzentration, 50 % *inhibitory concentration*) ermittelt. Die IC_{50} ist diejenige Wirkstoffkonzentration, bei der das Zellwachstum des Testsystems verglichen mit dem Referenzversuch um 50 % gehemmt wird. Die hierbei eingesetzten Zelllinien stammen von menschlichen Karzinomen, die subkutan, d.h. unter der Haut wachsend, auf Nacktmäuse transplantiert wurden. Als Tumortypen wurden

Krebszell- typen	50						IC_{50}^a [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	51						IC_{50}^a [$\mu\text{g}/\text{mL}$]
	T/C [%] bei							T/C [%] bei						
	Testkonzentrationen von [$\mu\text{g}/\text{mL}$]							Testkonzentrationen von [$\mu\text{g}/\text{mL}$]						
	0,001	0,01	0,1	1	10		0,001	0,01	0,1	1	10			
GXF 251L	99	107	106	111	94	> 10	100	103	108	98	41	8,26		
LXFL 529L	96	100	96	103	99	> 10	98	104	105	100	24	7,72		
MAXF 401NL	105	107	102	122	104	> 10	107	122	143	142	34	14,94 ^b		
MEXF 462NL	94	99	95	98	94	> 10	113	89	94	99	23	7,23		
RXF 486L	117	113	117	122	113	> 10	111	111	110	112	71	14,35 ^b		
UXF 1138L	114	119	113	117	111	> 10	112	110	117	105	70	14,11 ^b		

Tabelle 3.5 *In-vitro*-Aktivitäten von **50** und **51** gegenüber menschlichen Tumorzelllinien in Monolayer-Assays (Oncotest GmbH, Freiburg)

T/C (*Test/Control*) = relatives Zellwachstum gegenüber einer Referenz ohne Wirkstoffexposition

IC_{50} = halbmaximale Hemmkonzentration (50 % *inhibitory concentration*)

^a publizierte Werte (HOLZWARTH *et al.*, 2005)

^b extrapolierter Wert

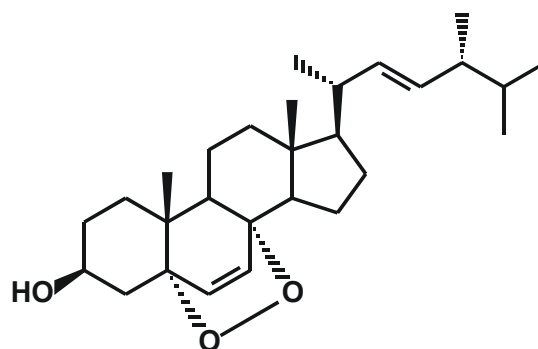
Magen- (GXF 251L), nicht kleinzellige Bronchial- (LXFL 529L), Brust- (MAXF 401NL), Haut- (MEXF 462NL), Nieren- (RXF 486L) und Gebärmutterkrebszellen (UXF 1138L) eingesetzt. Die Verdoppelungszeiten dieser Zelllinien variieren zwischen 24 h (± 1 h) für MEXF 462NL und 35 h (± 2 h) im Falle von MAXF 401NL (DENGLER *et al.*, 1995; MAIER und FIEBIG, 2002).

Bei den Tests zeigt **51** moderate Aktivitäten gegenüber allen sechs Zelllinien, wogegen **50** keine Hemmung der Zellvermehrung bewirkte (HOLZWARTH *et al.*, 2005). Gegenüber den Magen-, den nicht kleinzelligen Lungen- sowie den Hautkrebszellen zeigt **51** selektive Hemmwirkungen mit IC_{50} unter der maximal getesteten Konzentration von 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Für die drei weiteren Zelllinien wurden die IC_{50} extrapoliert. Die ausführlichen Testergebnisse sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Diskussion

Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten Substanzen **50** und **51** haben als auffälligstes Strukturmerkmal eine Epidioxyfunktion zwischen den Kohlenstoffatomen 3 und 6. Diese führt zum Ringschluss der Struktur, wodurch diese Naturstoffe vereinfacht als cyclische Peroxide bezeichnet werden können. Peroxide sind keinesfalls selten als Metaboliten von Organismen nachweisbar. Naturstoffe mit dieser Funktionalität wurden in häufig als Inhaltsstoffe terrestrischer und mariner Lebewesen beschrieben. Fast ausnahmslos tritt dabei die

Peroxidfunktion als Teil einer Ringstruktur oder als Hydroperoxidgruppe (-OOH) auf (CASTEEL, 1992; CASTEEL, 1999). Insbesondere unter den Peroxiden terrestrischen Ursprungs sind Terpenstrukturen aus ein bis vier Isopren-einheiten bekannt. Als peroxidische Metaboliten mariner Organismen bilden speziell Steroidalkohole eine große Gruppe. Als Beispiel sei hier das auch an Land weit verbreitete Ergosterolperoxid (**52**) genannt, das zunächst

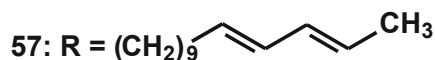
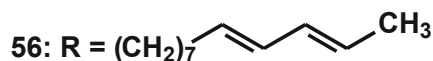
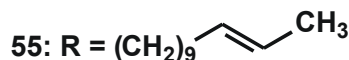
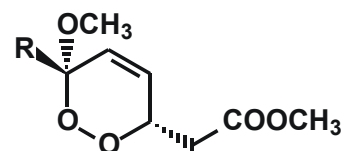
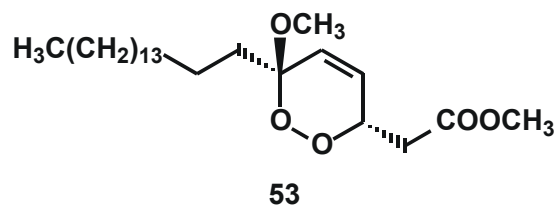


52

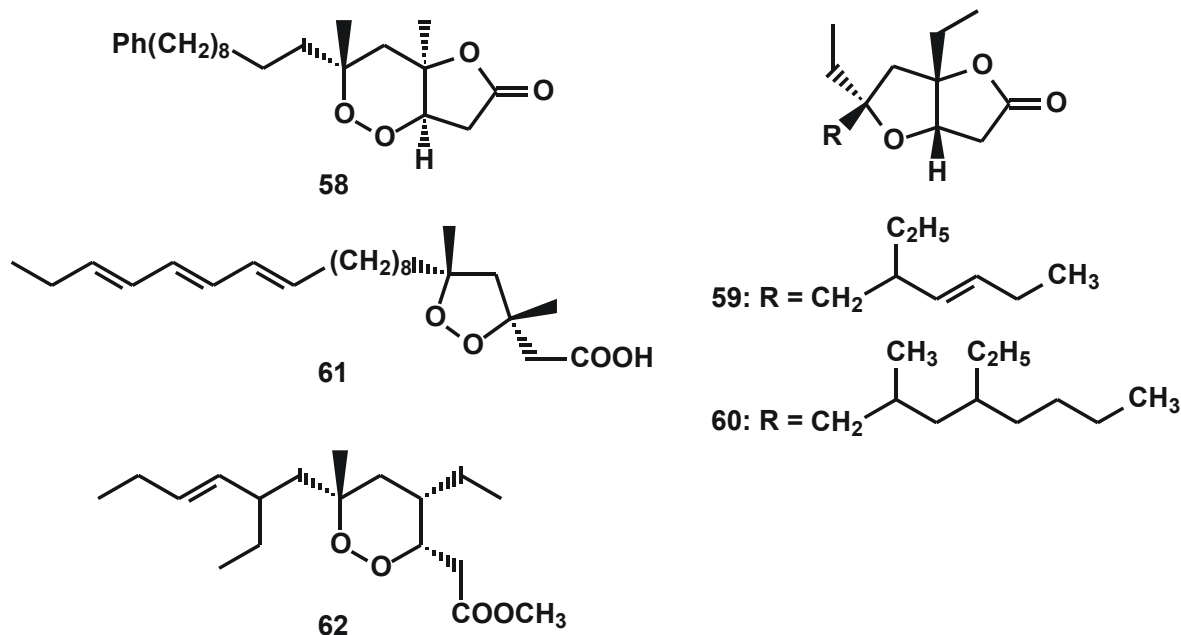
aus *Aspergillus fumigatus* isoliert wurde und inzwischen als Produkt einer Vielzahl unterschiedlicher Organismen dokumentiert ist (CASTEEL, 1992; CASTEEL, 1999). Vergleichende stereochemische Untersuchungen von Ergosterolperoxid, welches aus Pilzen isoliert wurde, und durch Photooxidation erzeugtem **52** zeigen identische Verhältnisse der jeweils gebildeten Stereoisomere an der Epidioxybrücke (ARDITTI *et al.*, 1972). Es wurde daher angenommen, dass dieses Peroxid kein Produkt enzymatischer Prozesse, sondern auf Artefaktbildung zurückzuführen ist. Spätere Untersuchungen konnten jedoch belegen, dass derartige Peroxide auch auf enzymatischen Wege erzeugt werden.

Naturstoffe, deren Grundgerüst sich, wie das der beiden in dieser Arbeit beschriebenen Substanzen **50** und **51**, von aliphatischen Carbonsäuren ableiten lässt und eine 3,6-Epidioxybrücke vorweist, wurden ebenfalls schon recht zahlreich publiziert. Oft erwiesen sie sich als potente Wirkstoffe. In den meisten Fällen wurden sie in Schwämmen gefunden. So ist das Chondrillin (**53**) als erstes cyclisches Peroxid dieser Gruppe auch in einer Porifere (*Chondrilla* sp.) nachgewiesen worden (WELLS, 1976). Die stereochemischen Konfigurationen der beiden chiralen Zentren im Ring von **53** blieben in der Studie von Wells *et al.* (1976) ungeklärt. Allerdings wurde für das Chondrillin eine optische Aktivität ermittelt und als Argument für seine enzymatische Bildung angeführt. Später wurde diese Verbindung ebenfalls aus *Plakortis lita* isoliert (SAKEMI *et al.*, 1987; DE GUZMAN und SCHMITZ, 1990). Ungewöhnlich erschien SAKEMI *et al.* (1987), dass in beiden Arten, zwischen denen keine nähere phylogenetische Verwandtschaft besteht, Chondrillin als Hauptmetabolit auftritt. In *P. lita* wurden zudem untergeordnete Mengen der Verbindungen **54–57** gefunden (SAKEMI *et al.*, 1987). Die stereochemischen Konfigurationen von **54–57** erwiesen sich interessanterweise als zu der des Chondrillins (**53**) entgegengesetzt. In Antitumor-Assays wurden IC_{50} der Substanzen **53–57** gegen P 388-Leukämiezellen ermittelt (SAKEMI *et al.*, 1987). Dabei war jede einzelne der Verbindungen **54–57** mit IC_{50} unter

0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ deutlich aktiver als das Chondrillin ($IC_{50} = 5 \mu\text{g}/\text{mL}$). Die Metaboliten **54–57** unterscheiden sich von **53** außer in der relativen Konfiguration auch in der Länge ihrer aliphatischen Seitenkette, und drei von ihnen zudem im Un sättigungsgrad. Dennoch führten die Autoren die beobachteten Aktivitätsdifferenzen ausschließlich auf die stereochemischen Unterschiede zurück. Auf der Grundlage dieser Annahme sind für die Epimere der Verbindungen **50** und **51** deutlich höhere anti-tumorale Aktivitäten denkbar als für **50** und **51** selbst. Die relativen Konfigurationen zwischen C-3 und C-6 entsprechen der des Chondrillins, bei der die jeweils längste Alkylkette in *cis*-Stellung zum Substituenten mit der Esterfunktion steht.



Beispiele für Naturstoffgruppen, deren Vertreter dem Chondrillin strukturverwandt sind und in Poriferen der Familie Plakinidae nachgewiesen wurden, sind die Strukturen **58–62**. Angehörigen dieser Gruppen wurden verschiedene Wirkungen wie antifungische (GUNASEKERA *et al.*, 1990a), antibakterielle (HIGGS und FAULKNER, 1978) oder zytotoxische (HARRISON und CREWS, 1998) zugesprochen. Außerdem haben einige dieser Substanzen verhältnismäßig spezielle Eigenschaften, wie antiplasmodiale (GOCHFELD und HAMANN, 2001; FATTORUSSO *et al.*, 2002), antileishmaniale (COMPAGNONE *et al.*, 1998) oder für die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase aktivierende (MURAYAMA *et al.*, 1989; PATIL *et al.*, 1996a; PATIL *et al.*, 1996b) Effekte. Das bicyclische Lacton Plakortolide E (**58**) aus *Plakortis* sp. zeigte *in-vitro* einen IC_{50} -Wert unter $1 \mu\text{mol}/\text{mL}$ gegen Haut- und Brustkrebszelllinien (VAROGLU *et al.*, 1995), während die nicht peroxidischen Plakortone E (**59**) und F (**60**), aus *P. simplex* IC_{50} von $8,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ bzw. $11,0 \mu\text{g}/\text{mL}$ gegen Fibrosarcoma-Zelllinien (WEHI 164) aufwiesen (CAFIERI *et al.*, 1999b). Die Beobachtung, dass unter den Lactonen **59** und **60** die gesättigte Verbindung weniger aktiv ist als die ungesättigte, hatten die Autoren unmittelbar zuvor schon für zwei andere Verbindungen gemacht. Für das aus *Plakortis halichondrioides* bereits bekannte Peroxid Plakortin (**62**; HIGGS und FAULKNER, 1978) konnten sie IC_{50} von $7 \mu\text{g}/\text{mL}$ gegen WEHI 164-Zellen ermitteln, während sein gesättigtes Analogon mit einem IC_{50} -Wert von $> 20 \mu\text{g}/\text{mL}$ vergleichsweise



gering aktiv war (CAFIERI *et al.*, 1999a). Beide Metaboliten wurden von Cafieri *et al.* aus einer Porifere der Spezies *P. simplex* isoliert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass **50** und **51** mit ihren vollständig gesättigten Ringsubstituenten möglicherweise weniger wirksam sind, als es Homologe mit ungesättigten Seitenketten wären. Für das aus *Plakinastrella* sp. isolierte pentacyclische Peroxid **61** wurden schließlich antifungizide Aktivitäten gegenüber *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* gefunden (CHEN *et al.*, 2001).

Aus biosynthetischer Sicht gehören die zuvor genannten Sekundärstoffe **53–62** zur Gruppe der Polyketide (vergleiche Kapitel 2.2.2, Seite 17). Neben dieser prinzipiellen Gemeinsamkeit ist eine engere biosynthetische Verwandtschaft dieser Verbindungen sehr wahrscheinlich. Ein enzymatischer Umbau des Naturstoffes **63** zu dem Furanderivat **64** wurde von COMPAGNONE *et al.* (1998) zur Diskussion gestellt (Abbildung 3.13). Beide Substanzen sind als Inhaltsstoffe von *Plakortis* aff. *angulospiculatus* identifiziert. Frühere Hypothesen über biosynthetische

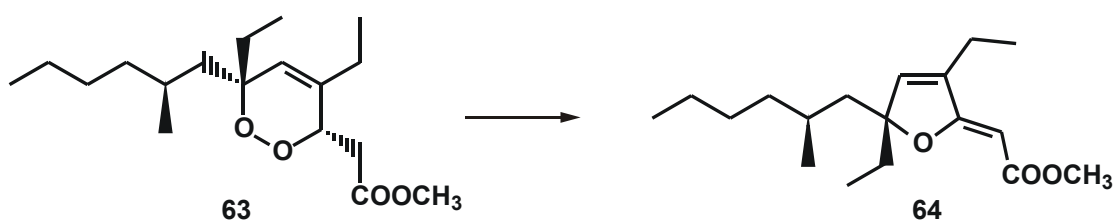


Abbildung 3.13 Transformation des Peroxids **63** zu dem Furanderivat **64** (COMPAGNONE *et al.*, 1998)

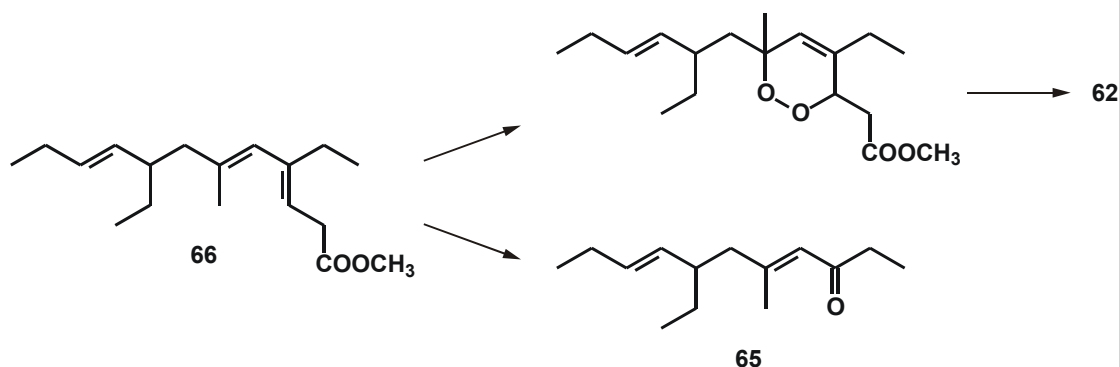


Abbildung 3.14 Vorgeschlagene biosynthetische Beziehung zwischen dem hypothetischen Vorläufer **66** und dem Plakortin **62** sowie dem Keton **65** aus *Plakortis simplex*

Zusammenhänge ähnlich strukturierter Verbindungen wurden von HIGGS und FAULKNER (1978) aufgestellt. Sie beobachteten im identischen Organismus, aus dem sie auch das Plakortin (**62**) isolierten, das strukturell eng verwandte Keton **65**. Es wurde vermutet, dass der verzweigte und zweifach ungesättigte Carbonsäuremethylester **66** ein biosynthetischer Vorläufer dieser zwei Substanzen ist (Abbildung 3.14). Das Vorkommen von **66** in der biologischen Probe konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zwei diesem Ester (**66**) analoge Strukturen, **67** und **68**, lassen sich auch als mögliche Vorläufer für die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Peroxide **50** und **51** annehmen (Abbildung 3.15). Darüber hinaus ist zu vermuten, dass der hier untersuchte Organismus auch die dem Keton **65** entsprechenden Analoga **69** und **70** aufweist. Bei den Untersuchungen der erstellten Extrakte des Probenstücks ergaben sich jedoch keine Hinweise, die für das Vorhandensein dieser Metaboliten sprechen.

Polyketide sind bisher hauptsächlich als Metaboliten von Bakterien, aber auch von Pilzen, Pflanzen und marinen Invertebraten bekannt. Unklar ist, ob die letztgenannten Organismen die Biosynthesen solcher Strukturen selbst

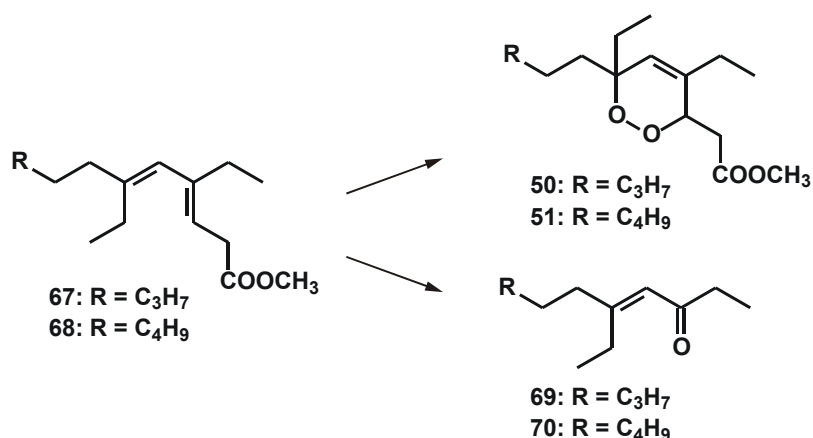


Abbildung 3.15 Biosynthetische Beziehung der hypothetischen Vorläufer **67** und **68**, den theoretischen Metaboliten **69** und **70** sowie den identifizierten Peroxiden **50** und **51** aus *Plakortis simplex*

durchführen. Oft werden als Produzenten für die in ihnen enthaltenen Polyketide assoziierte Bakterien vermutet. Der Gedanke, die auffallend hohe Dichte von Mikroorganismen in dieser Schwammspezies (siehe Kapitel 3.2.2, Seite 34) könnte im Zusammenhang mit den beobachteten hohen Konzentrationen der Peroxide **50** und **51** (siehe Seite 36) stehen, liegt dabei nicht fern.

Auf der Suche nach den Erzeugern dieser Verbindungen wurde mittels einer Kohlenstoffisotopenanalyse versucht, Anhaltspunkte für eine Zuordnung zu den Poriferen oder den Bakterien zu gewinnen. Mit Hilfe von GC/C/IRMS (*GC-Combustion/Isotope ratio mass spectrometry*) konnten die Verhältnisse stabiler Kohlenstoffisotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in den Einzelkomponenten des FAME-Extraktes von *P. simplex*, in der auch die Verbindungen **50** und **51** auftraten (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 26), analysiert werden. Methylester der Fettsäuren, die bakteriell sind, wurden solchen gegenübergestellt, die als typische Membranbestandteile von Porifera angesehen werden. Hintergründe und Kriterien für eine derartige Zuordnung wurden in Kapitel 2.2.1 (Seite 14) erläutert.

Die gefundenen kurzkettigen FAME *i*-15, *ai*-15 und *m*-17 deuten auf Bakterien hin. Ein Mischsignal aus Komponenten, die vom Schwamm und von Bakterien erzeugt werden, gilt dagegen für die drei Vertreter der Kohlenstoffanzahl 19 als wahrscheinlich. Es ist jedoch anzunehmen, dass zumindest ein Großteil dieser Verbindungen bakteriell sind. Für die beiden FAME *m*-20 Δ ^{6,14} und *m*-21 Δ ^{5,9} werden Schwammzellen als Produzenten vermutet. Insbesondere die in der Natur seltene Doppelbindungssignatur Δ ^{5,9} deutet auf die Bildung durch ein

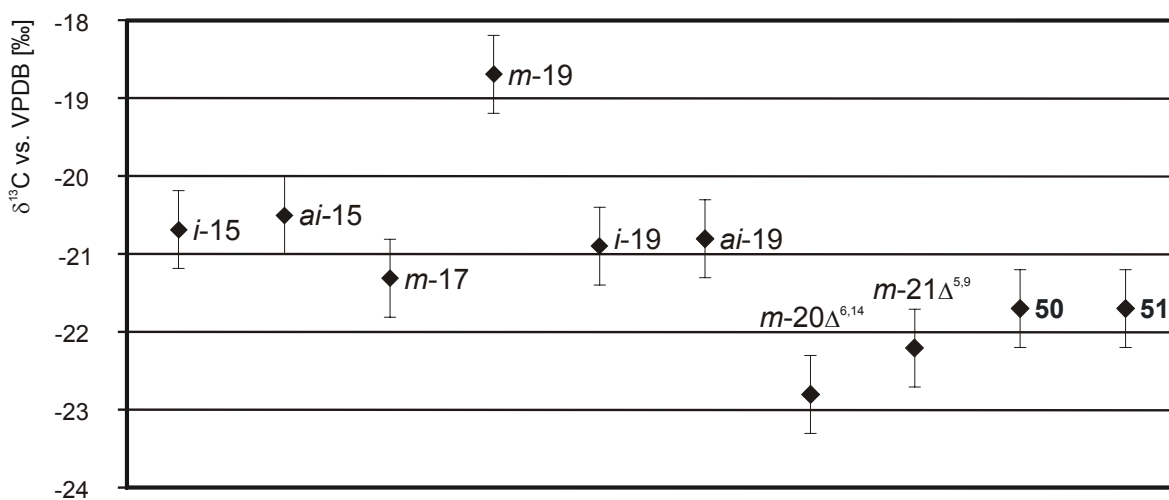


Abbildung 3.16 Isotopenverhältnisse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB [‰ \pm 0,5]; Mittelwerte aus drei Messungen) einiger Fettsäuren als Methylester sowie der Peroxide **50** und **51** aus *Plakortis simplex*

Enzymsystem (Δ^5 -Dehydrogenase) hin, das dem zur Bildung von *demospongiac acids* benötigten entspricht. Unter den *iso*- und *anteiso*-verzweigten Methylestern zeigt sich ein recht einheitliches Isotopenverhältnis (Abbildung 3.16), während die beiden FAME *m*-C₁₇ und *m*-C₁₉ um etwa 2,5 ‰ differieren. Der FAME *m*-C₁₇ hat dabei eine ähnliche Isotopensignatur wie die der endständig verzweigten. Für den *m*-C₁₉-FAME wurde hingegen ein relativ hoher Anteil an ¹³C-Isotopen bestimmt. Die Ursache hierfür könnten exklusive Vorläufer der *m*-C₁₉-Fettsäure sein, die bereits einen relativ hohen Anteil an ¹³C aufweisen. Eine weitere Erklärung wäre eine Isotopenfraktionierung des Produzenten, die sich von der anderer Fettsäuren unterscheidet. Das hier gezeigte Bild einer differenten Isotopensignatur des *m*-C₁₉-FAME wurde auch im Inventar eines anderen Wirtsorganismus (*Geodia barretti*) gefunden (PAPE, 2004). Die tatsächliche Ursache für dieses von den übrigen FAME abweichende Verhältnis ist bisher allerdings ungeklärt. Die beiden Sekundärmetaboliten **50** und **51** sind im Vergleich zu den hier betrachteten bakteriellen Lipiden an ¹³C etwas stärker angereichert (beide $\delta^{13}\text{C} = 21,7 \text{ ‰}$). Noch geringere Anteile des schwereren Kohlenstoffisotops wurden in den Methylestern der langkettigen und doppelt ungesättigten Schwammfettsäuren nachgewiesen.

Es lässt sich feststellen, dass **50** und **51** nach der Verteilung ihrer Kohlenstoffisotope weder den Schwammlipiden noch den bakteriellen Komponenten zweifelsfrei näher stehen. Für die Methylester der Fettsäuren beider Organismengruppen konnten Isotopenverhältnisse ermittelt werden, die sich unter Berücksichtigung der messbedingten Standardabweichung mit denen von **50** und **51** überschneiden. Nicht zuletzt, weil noch zu viele Rahmenparameter unbekannt sind, wie die tatsächlichen Vorläufer der Peroxide **50** und **51** oder Kenntnisse über die isotopische Fraktionierung bei der Biosynthese dieser Sekundärstoffe, können auf der Basis der hier ermittelten Werte keine Argumente vorgebracht werden, die für oder gegen die assoziierten Bakterien als Produzenten von **50** und **51** sprechen.

3.2.5 Fraktion 3

Die Fraktion 3 des Gesamtextraktes enthielt als Essigsäureethylester-Eluat der chromatographischen Trennung polarere Verbindungen, als die zuvor behandelten. Während das GC/MS-Chromatogramm dieser Fraktion (Abbildung 3.17) im Retentionszeitbereich zwischen 20 min und 40 min verschiedene Verbindungen zeigt, die sich anhand der vorliegenden Informationen keinen Substanzklassen zuordnen lassen, wurden in der Gruppe bei Retentionszeiten zwischen 40 min und 45 min die Verbindungen **F**, **G**, **H**, **I** und **J** als Sterine

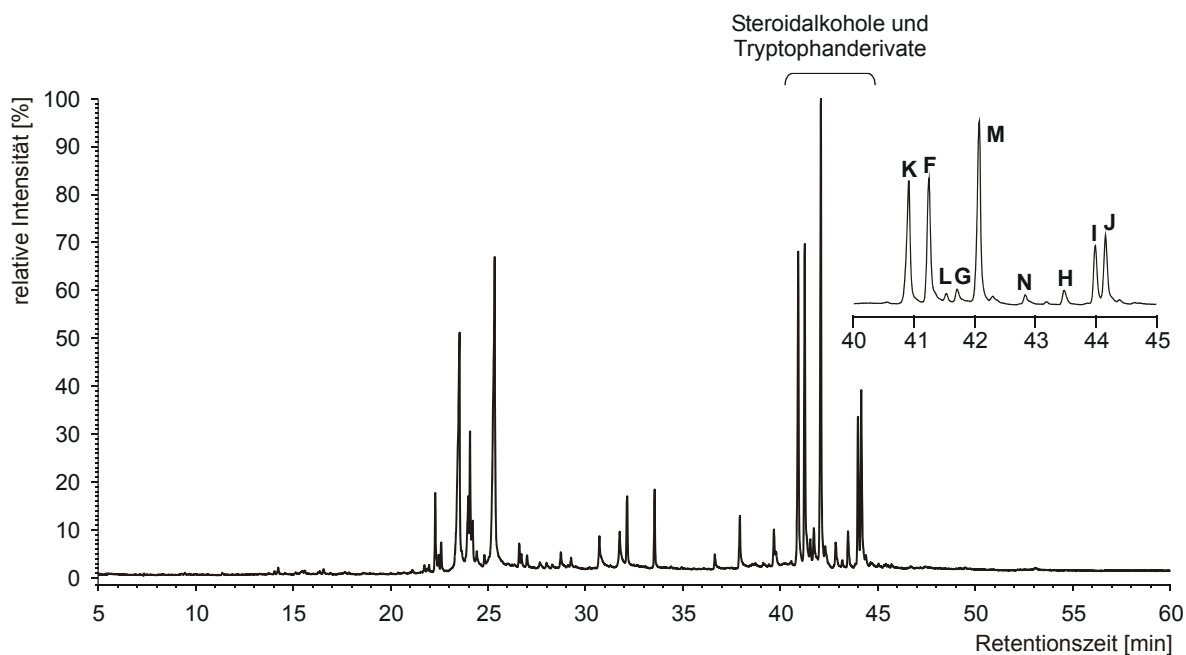
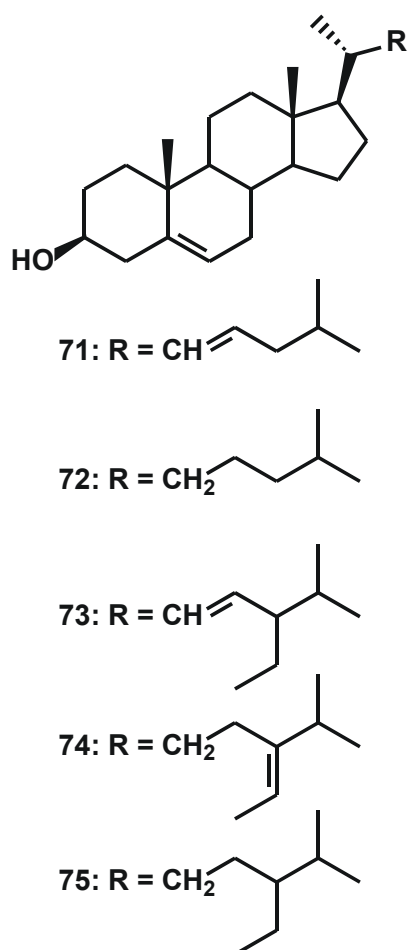


Abbildung 3.17 GC/MS Chromatogramm (TIC) der Fraktion 3 (polare Substanzen) aus *Plakortis simplex* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]



(Steroidalkohole, Sterole) identifiziert. Durch Vergleiche ihrer GC-Retentionszeiten und Massenspektren mit kommerziell erhältlichen Standards wurden ihnen die Strukturen 71–75 zugewiesen.

Bei diesen Primärstoffen handelt es sich um (22*E*)-Cholesta-5,22-dien-3β-ol (22-Dehydrocholesterin, 71, F), Cholesta-5-en-3β-ol (Cholesterin, 72, G), (22*E*)-Stigmasta-5,22-dien-3β-ol (Stigmasterin, 73, H), (24*E*)-Stigmasta-5,24(28)-dien-3β-ol (Fucosterin, 74, I) und Stigmasta-5-en-3β-ol (Sitosterin, 75, J). Sterine sind Bestandteile der Zellmembrane vieler Organismengruppen, für die dort eine stabilisierende Funktion angenommen wird. Auch als Inhaltsstoffe von Poriferen kommen sie ubiquitär vor und zeigen dabei oftmals eine besonders große Strukturvielfalt. Die hier identifizierten Sterine sind jedoch weit verbreitete Vertreter dieser Stoffklasse, weshalb ihnen keine chemotaxonomische Aussagekraft zukommt.

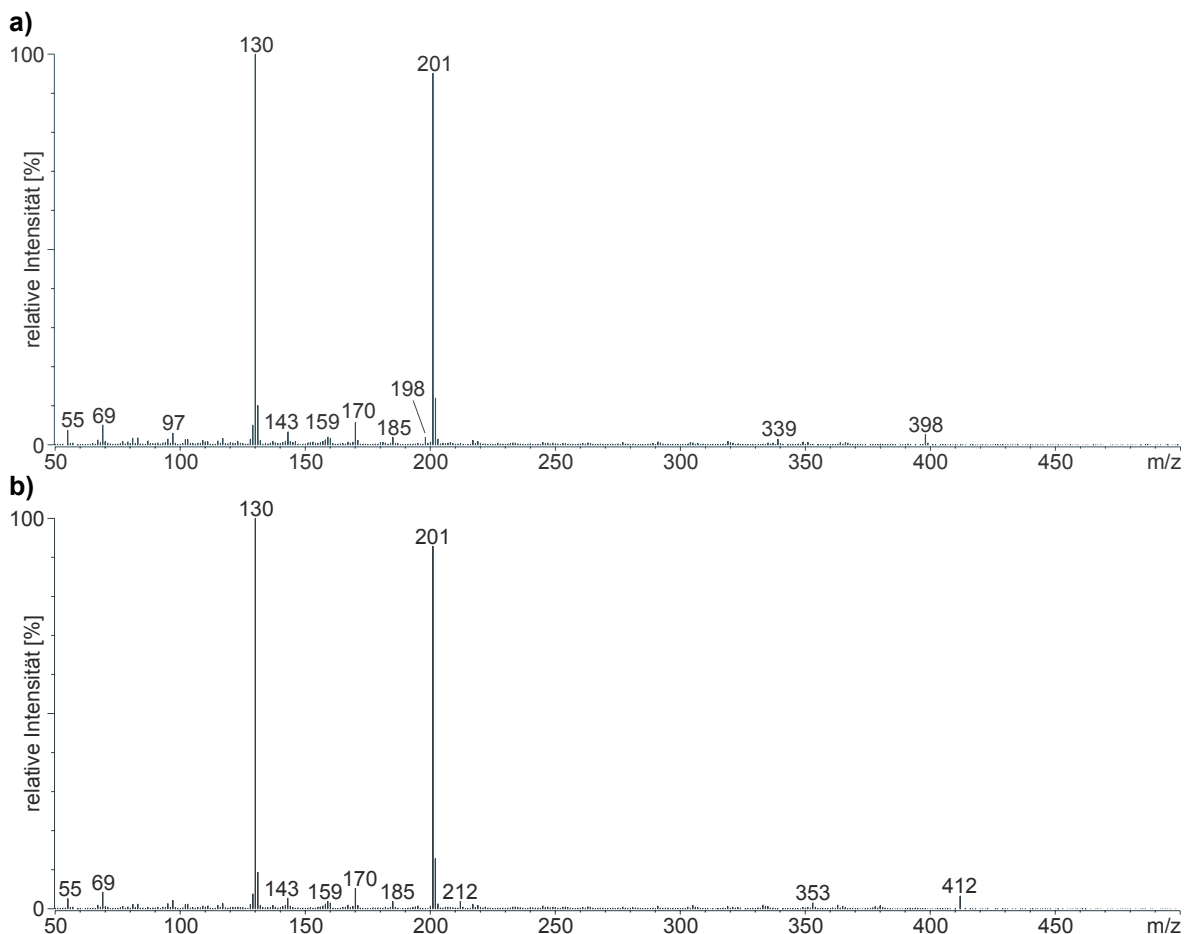


Abbildung 3.18 EI-Massenspektren der isolierten Substanzen a) **K** und b) **M** aus *Plakortis simplex*

Die Massenspektren der vier Verbindungen **K**, **L**, **M** und **N** zeichnen sich durch ein ungewöhnliches und weitgehend einheitliches Bild aus. Abbildung 3.18 veranschaulicht dies am Beispiel von **K** und **M**. Neben den Signalen von zwei Hauptfragmenten bei $m/z = 130$ und $m/z = 201$ treten nur wenige weitere Fragmente mit weitaus geringerer Intensität auf. Ein vorherrschendes Signal bei $m/z = 130$ ist als diagnostisches Merkmal substituierter Indol-derivate bekannt. Darüber hinaus fiel im Vergleich mit einer MS-Spektrenbibliothek (*National Institute of Standards and Technology*, NIST) auf, dass das Fragmentation mit $m/z = 201$ speziell bei den Amiden der Methylester von Tryptophan auftritt. Daher wurde angenommen, dass die in Abbildung 3.19 gezeigte Teilstruktur **76a** Bestandteil von **K-N** ist.

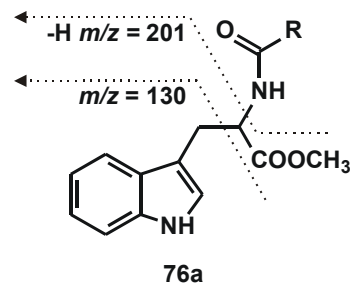


Abbildung 3.19 Bildung der Fragmentionen $m/z = 130$ und $m/z = 201$ aus Amiden von Tryptophanmethylestern

In einer weiteren GC/MS-Analyse wurden hoch aufgelöste EI-Massenspektren von **K** und **M** erzeugt. Dabei ergaben sich als $M^{+\bullet}$ für **K** $m/z = 398,2537$ (berechnete Masse für $C_{24}H_{34}N_2O_3^+ = 398,2564$) sowie $m/z = 412,2729$ ($C_{25}H_{36}N_2O_3^+ = 412,2720$) für **M**. Zusätzlich wurden die Hauptfragmente beider Verbindungen mit $m/z = 130,0658$ ($C_9H_8N^+ = 130,0651$) sowie $m/z = 201,0804$ ($C_{12}H_{11}NO_2^+ = 201,0784$) für **K** sowie $m/z = 130,0652$ und $m/z = 201,0778$ für **M** bestimmt. Die angenommenen Strukturen von $m/z = 130$ und $m/z = 201$ (siehe Abbildung 3.19) ließen sich durch die Bestimmung der elementaren Zusammensetzungen stützen.

Die Substanzen **K** und **M** wurden für weitere Untersuchungen durch Umkehrphasen-HPLC als Reinstoffe isoliert. Eine Isolierung der Verbindungen **L** und **N** in Mengen, wie sie für NMR-Untersuchungen zur Strukturaufklärung notwendig sind, war aufgrund ihrer geringen Konzentrationen nicht möglich.

Im 1H -NMR-Spektrum der Substanz **K** (Abbildung 3.20) befinden sich die Signale von insgesamt 34 Protonen. Zwölf Protonen gehören vier Methylgruppen an. Zwei Methyltripletts überlagern sich bei $\delta_H = 0,86$ ppm, ein weiteres zeigt sich bei $\delta_H = 0,75$ ppm und ein Methylsingulett tritt bei $\delta_H = 3,62$ ppm auf. Von $\delta_H = 1,17$ – $1,37$ ppm zeigt sich ein Multiplett von drei Methylengruppen, während zwei Methylenheiten zwischen $\delta_H = 1,92$ und $\delta_H = 2,00$ ppm sowie eine weitere bei $\delta_H = 3,14/3,23$ ppm auftreten. Fünf Protonen, die einem aromatischen

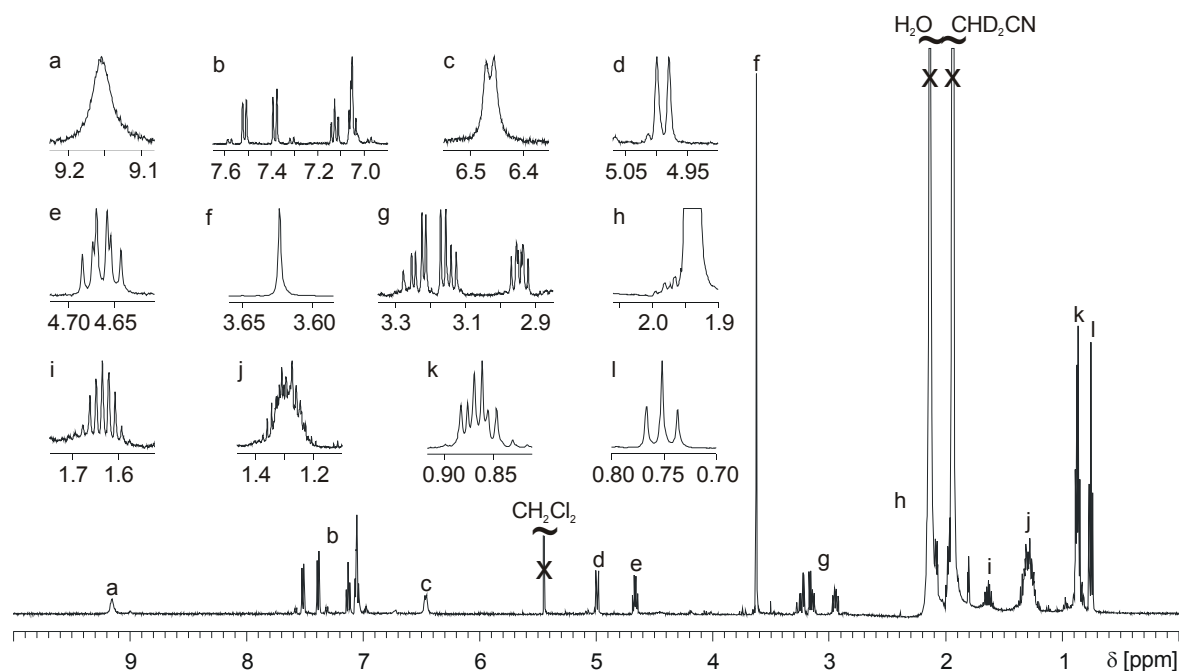


Abbildung 3.20 1H -NMR-Spektrum der isolierten Substanz **K** (in CD_3CN) aus *Plakortis simplex*

System angehören, befinden sich bei $\delta_{\text{H}} = 7,05$ ppm (2 Protonen), $\delta_{\text{H}} = 7,12$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 7,38$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 7,51$ ppm (jeweils 1 Proton). Ein weit ins Tieffeld verschobenes Signal bei $\delta_{\text{H}} = 9,15$ ppm gehört einem Proton an, das an das Stickstoffatom des Heteroaromaten gebunden ist. Bei $\delta_{\text{H}} = 6,46$ ppm zeigt sich ein zweites stickstoffgebundenes Proton. Die Integrale von Signalen bei $\delta_{\text{H}} = 2,94$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 4,66$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 4,98$ ppm weisen jeweils auf weitere Methinprotonen hin. Mit Ausnahme der Region zwischen $\delta_{\text{H}} = 1,92$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 2,00$ ppm, bei der sich für **M** eine weitere Methylengruppe zeigt, stimmen die ^1H -NMR-Spektren von **K** und **M** überein.

Aufgrund geringer Absolutmengen, die von beiden Substanzen isoliert werden konnten, war die Aufnahme von ^{13}C -NMR-Spektren nicht möglich. Aus den zweidimensionalen HMQC (*heteronuclear multiple quantum coherence*)- und HMBC-Korrelationsspektren lassen sich jedoch die chemischen Verschiebungen der ^{13}C -Kerne vollständig ermitteln. Die Anzahl direkt gebundener Wasserstoffatome ergibt sich zusammen mit den ^1H -NMR-Spektren unter Berücksichtigung der Signalvorzeichen aus den $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplungen. Auf diese Weise sind sechs quartäre, acht tertiäre, sechs sekundäre und vier primäre Kohlenstoffatome von Substanz **K** zu identifizieren. Eine Zusammenfassung aller in den NMR-Spektren bestimmten C_1 - und N_1 -Gruppen von **K** zeigt Tabelle 3.6.

C_1 - und N_1 -Gruppen		C	H	N
6 x	C	6	-	-
8 x	CH	8	8	-
6 x	CH_2	6	12	-
4 x	CH_3	4	12	-
2 x	NH	-	2	2
Σ	$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{N}_2$	24	34	2

Tabelle 3.6 Summierung der nach C_1 - und N_1 -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffatome aus dem ^1H -NMR-Spektrum sowie den Korrelationsspektren HMQC und HMBC von **K** aus *Plakortis simplex*

Mit Ausnahme eines weiteren sekundären Kohlenstoffatoms und seinen Protonen ergibt sich für Verbindung **M** eine identische Verteilung (siehe Tabelle 3.7). Auf der Basis der durch HRMS ermittelten Summenformeln von **K** und **M** lassen sich beiden Verbindungen jeweils neun Doppelbindungsäquivalente (*double bond equivalents, DBE*) zuordnen. Gestützt durch die Signale bei $m/z = 130$ ($\text{C}_8\text{H}_9\text{N}^+$) und $m/z = 201$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2^+$) in den EI-Massenspektren beider Substanzen belegen die H,H-COSY- und HMBC-Spektren (siehe Tabelle 3.8 und Anhang, Kapitel 7.4.3, Seiten 129–130) von **K** die Existenz eines Indolgrundkörpers. Darüber hinaus ist aus den H,H-COSY- und HMBC-Spektren die Substitution der Indolstruktur an Position 3 zu erkennen. Grundlage hierfür sind die Kopplungen der Methylenprotonen des Aminosäuresubstituenten bei $\delta_{\text{H}} = 3,14$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 3,23$ ppm zu mehreren Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffkernen des Heterocyclus.

Pos-Nr.	K		M	
	δ_C	δ_H (Multiplizität; J)	δ_C	δ_H (Multiplizität; J)
1	-	9,15 (s)	-	9,15 (s)
2	124,5 ^a	7,05 (m)	124,6 ^a	7,05 (m)
3	110,6 ^b	-	110,6 ^b	-
3a	128,4 ^b	-	128,3 ^b	-
4	118,8 ^a	7,51 (d; 7,9)	119,1 ^a	7,51 (d; 7,9)
5	120,1 ^a	7,05 (ddd; 7,9; 7,2)	119,9 ^a	7,05 (ddd; 7,9; 7,0)
6	122,3 ^a	7,12 (dd; 8,0; 7,2)	122,5 ^a	7,13 (dd; 8,2; 7,0)
7	112,4 ^a	7,38 (d; 8,0)	112,2 ^a	7,38 (d; 8,2)
7a	137,4 ^b	-	137,3 ^b	-
8	28,5 ^a	3,14 (dd; 14,5; 7,3) 3,23 (dd; 14,5; 5,5)	28,1 ^b	3,14 (dd; 14,5; 7,3) 3,23 (dd; 14,5; 5,4)
9	53,4 ^a	4,66 (ddd; 7,4; 7,3; 5,5)	53,7 ^a	4,66 (ddd; 7,4; 7,3; 5,5)
10	173,4 ^b	-	173,4 ^b	-
11	-	6,46 (d; 7,4)	-	6,46 (d; 7,4)
12	52,6 ^a	3,62 (s)	52,6 ^a	3,62 (s)
1'	174,6 ^b	-	174,7 ^b	-
2'	47,7 ^a	2,94 (ddd; 9,8; 7,6; 6,6)	47,6 ^a	2,94 (ddd; 9,8; 7,6; 6,6)
3'	123,6 ^a	4,98 (d; 9,8)	123,6 ^a	4,99 (d; 9,8)
4'	145,4 ^b	-	145,4 ^b	-
5'	36,8 ^a	1,94-2,00 (m)	36,8 ^b	1,94-2,00 (m)
6'	30,7 ^a	1,17-1,37 (m)	30,5 ^b	1,17-1,37 (m)
7'	23,3 ^a	1,17-1,37 (m)	32,2 ^b	1,17-1,37 (m)
8'	14,3 ^b	0,86 (t; 7,1)	23,2 ^b	1,17-1,37 (m)
9'	27,0 ^a	1,17-1,37 (m) 1,63 (dq; 13,5; 7,4; 6,6)	14,3 ^a	0,86 (t; 7,1)
10'	12,0 ^a	0,75 (t; 7,4)	27,0 ^b	1,17-1,37 (m) 1,63 (dq; 13,5; 7,4; 6,6)
11'	23,8 ^b	1,92-1,99 (m)	11,9 ^a	0,75 (t; 7,4)
12'	13,7 ^b	0,86 (t; 7,5)	23,7 ^b	1,92-1,99 (m)
13'	-	-	13,7 ^a	0,86 (t; 7,6)

Tabelle 3.7 ¹H- und ¹³C-NMR-Daten von Tryptophanamid **K** und **M** (in CD₃CN) aus *Plakortis simplex*

^a chemische Verschiebung aus HMQC-Spektrum

^b chemische Verschiebung aus HMBC-Spektrum

Die ³J_{C,H}-Kopplungen zwischen den Protonen des Methylsingulets bei $\delta_H = 3,62$ ppm mit dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 173,4$ ppm deuten auf die Existenz einer Methylesterfunktion in **K** hin. Durch die H,H-COSY- und HMBC-Kopplungen unter Beteiligung des stickstoffgebundenen Protons bei $\delta_H = 6,46$ ppm lässt sich die Konstitution des Moleküls zwischen dem aromatischen Kern und einer Aminosäurefunktion festlegen. Die chemische Verschiebung des quartären C-Atoms bei $\delta_C = 174,6$ ppm zeigt ein Carbonylkohlenstoffatom einer Amidfunktion an. Hinweise hierzu sind ebenfalls in der chemischen Verschiebung von

H- Pos	K		H- Pos	M	
	H,H-COSY ^a	HMBC ^b		H,H-COSY ^a	HMBC ^b
1	-	-	1	-	-
2	8	3a,7a	2	8	3,3a,7a
4	5,6,7	-	4	5,6,7	6,7a
5	4,6,7	3a	5	4,6,7	3a,4,7
6	4,5,7	7a	6	4,5,7	4,7a
7	4,5,6	3a	7	4,5,6	3a,5
8	2,9	2,3,3a,9,10	8	2,9	2,3,3a,9,10
9	8,11	-	9	8,11	3,8,10
11	9	-	11	9	-
12	-	10	12	-	10
2'	3',[6'/7'/9'] ^c	1'	2'	3',[6'/7'/8'/10'] ^c	1',3',4',10'
3'	2',5'	-	3'	2',5'	2',5',12'
5'	3',[6'/7'/9'] ^c	4'	5'	3',[6'/7'/8'/10'] ^c	3'
[6'/7'/9'] ^c	2',5',8',10'	7'	[6'/7'/8'/10'] ^c	2',5',9',11'	5',7',8',9'
8'	[6'/7'/9'] ^c	6',7'	9'	[6'/7'/8'/10'] ^c	7',8'
10'	[6'/7'/9'] ^c	2',9'	11'	[6'/7'/8'/10'] ^c	2',10'
11'	12'	3',4',5',12'	12'	13'	3',4',5',13'
12'	11'	4',11'	13'	12'	4'

Tabelle 3.8 H,H-COSY- und HMBC-Kopplungen der Substanzen **K** und **M** (in CD₃CN) aus *Plakortis simplex*

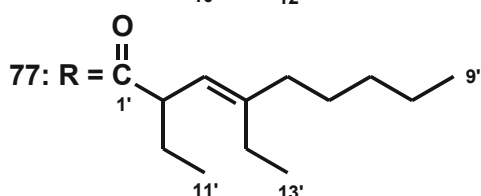
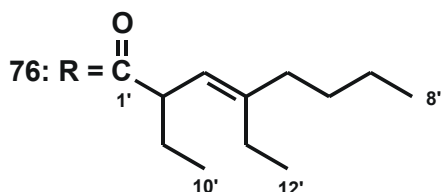
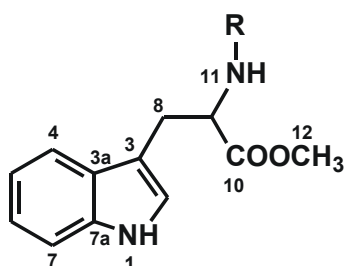
^a Korrelation von Protonen der linken Spalte zu den angegebenen Protonen

^b Korrelation von Protonen der linken Spalte zu den angegebenen ¹³C-Atomkernen

^c Korrelationen von oder zu einem oder mehreren in Klammern genannten Protonen

$\delta_{\text{H}} = 6,46$ ppm für das Proton am Stickstoffatom der Aminosäuregruppe zu finden. Da Aminprotonen weniger weit ins Tieffeld verschoben sind, lässt sich das Vorliegen eines alkylsubstituierten Stickstoffatoms ausschließen. Daher erweist sich Teilstruktur **76a** (Abbildung 3.19, Seite 52) als tatsächliches Strukturelement von **K**. Für den Säurerest an der Amidfunktion verbleibt demnach ein quartäres Kohlenstoffatom, zwei Methin-, drei Methyl- sowie fünf Methylengruppen bei einem *DBE*.

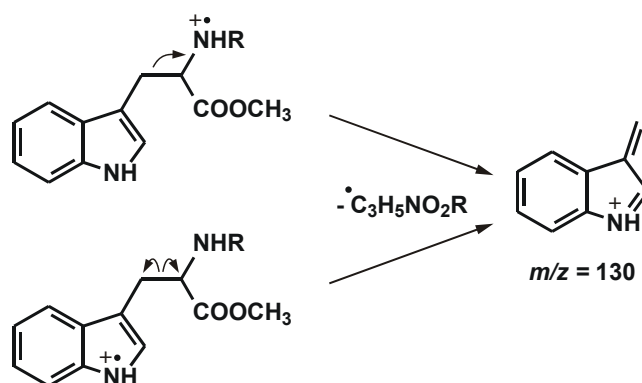
Die chemische Verschiebung des tertiären Kohlenstoffatoms bei $\delta_{\text{C}} = 123,6$ ppm kennzeichnet zusammen mit dem Signal des daran gebundenen Protons bei $\delta_{\text{H}} = 4,98$ ppm sowie dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 145,4$ ppm die Unsattheit des Säurerests. Aus den H,H-COSY- und HMBC-Spektren folgt schließlich die gesamte Konstitution dieses Molekülteils, woraus sich die vollständige Struktur der Verbindungen **K** ergibt. Es handelt sich um *N*-(2,4-Diethyloct-3-enyl)tryptophanmethylester (**76**). Die NMR-Spektren von **M** stimmen mit den zuvor beschriebenen von **76**, mit Ausnahme einer zusätzlichen Methylengruppe bei



$\delta_H = 1,17-1,37\text{ppm}$, überein. Somit trägt **M** am quartären C-Atom des Säurerests einen Pentylsubstituenten anstelle der Butylkette von **76**. Daraus ergibt sich für **M** die Struktur des *N*-(2,4-Diethylnon-3-enyl)-tryptophanmethylesters (**77**).

Durch die Untersuchung eines Probenextraktes mit Aceton wurde überprüft, ob die Methylesterfunktionen der Substanzen **76** und **77** infolge einer Artefaktbildung während der Extraktion mit Methanol auftreten. Beide Verbindungen wurden auch im alkoholfreien Extrakt als Methylester identifiziert, so dass von der Biosynthese der gezeigten Strukturen ausgegangen werden kann.

Die Hauptfragmente in den Massenspektren von **76** und **77** (Abbildung 3.18, Seite 52) bei $m/z = 130$ und $m/z = 201$ werden durch die in Abbildung 3.19 (Seite 52) gezeigten Bindungsbrüche innerhalb der Teilstruktur **76a** erzeugt. Entsprechende Fragmentierungsmechanismen werden in Abbildung 3.21 und Abbildung 3.22 vorgeschlagen. Die Bildung des Ions bei $m/z = 130$ geht demnach von einem Molekülion aus, dessen Ladung an einem der beiden Stickstoffatome lokalisiert ist. Ein kationisches Stickstoffradikal der Amidgruppe führt nach Abbildung 3.21 zu einer heterolytischen Spaltung zwischen Position 8 und 9 der Tryptophanteilstruktur. Alternativ ist eine Lokalisierung der Ladung am Stickstoffatom des aromatischen Kerns denkbar, die eine Stabilisierung des Ions über einen homolytischen Bruch derselben Bindung nach sich zieht. Beide Fragmentierungsreaktionen führen unter Abspaltung eines radikalischen Neutralteilchens zum Ion $m/z = 130$. Die relativ hohe Stabilität dieses Ions



76: R = C₁₂H₂₁O; $m/z = 398$

77: R = C₁₃H₂₃O; $m/z = 412$

Abbildung 3.21 Vorgeschlagene Bildungsmechanismen des Fragmentions $m/z = 130$ der Substanzen **76** und **77** aus *Plakortis simplex*

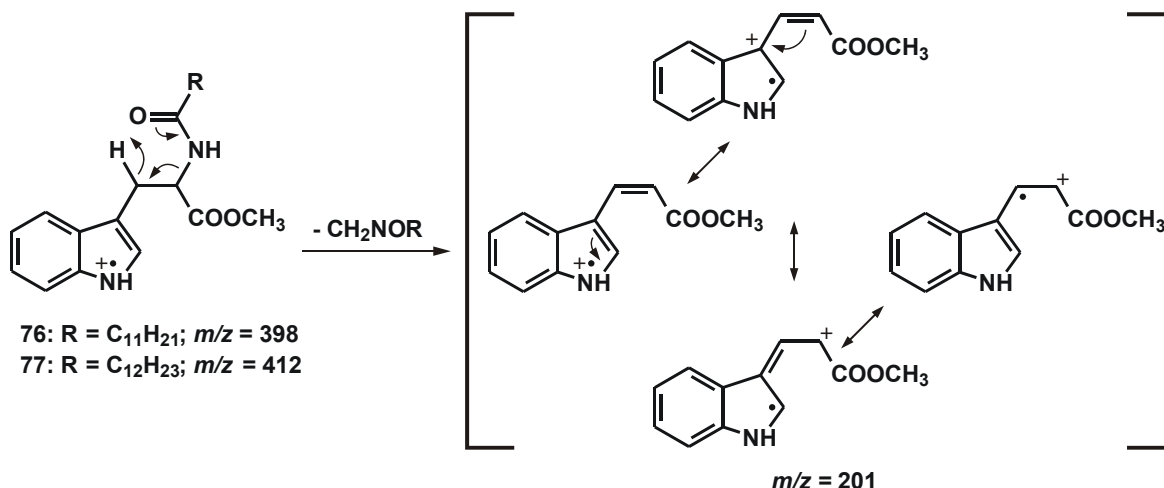


Abbildung 3.22 Vorgeschlagener Bildungsmechanismus und Resonanzstabilisierung des Fragmentions $m/z = 201$ der Substanzen **76** und **77** aus *Plakortis simplex*

begründet sich mit der Delokalisierung der positiven Ladung in die Allylposition des Aromaten am verbliebenen Methylensubstituenten.

Die Entstehung des Ions $m/z = 201$ aus **76** und **77** bedingt einen Wasserstofftransfer vom neu gebildeten Kation auf ein abgespaltenes Neutralteilchen mit gerader Elektronenzahl. In einem konzertierten Vorgang über einen sechsgliedrigen cyclischen Übergangszustand ist eine

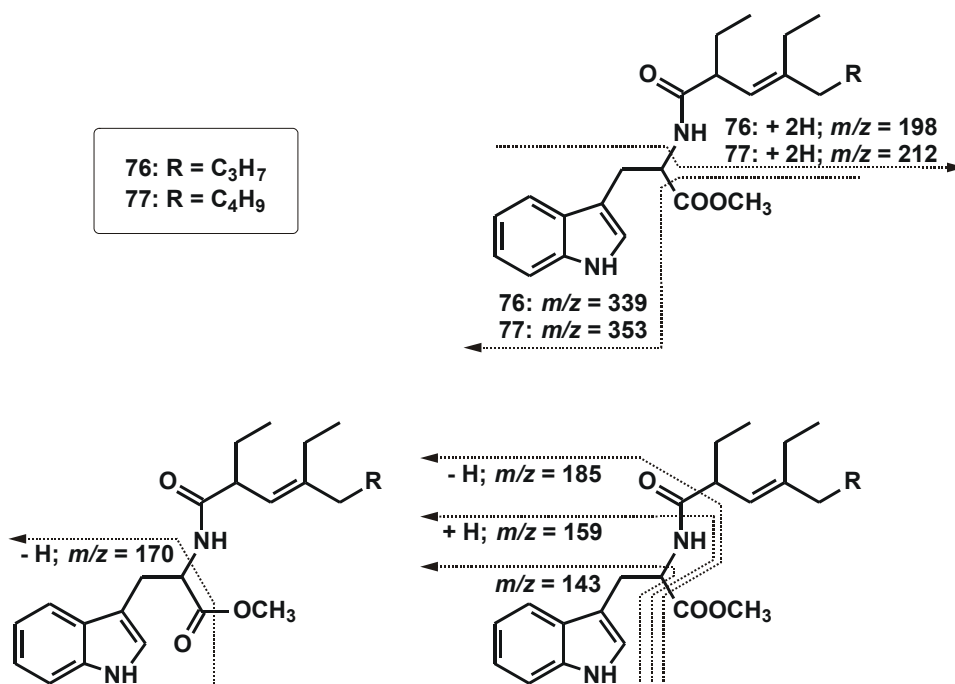


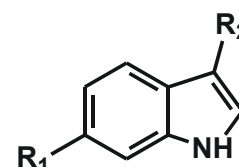
Abbildung 3.23 Erklärungen für die im EIMS beobachteten Fragmente der Substanzen **76** und **77** aus *Plakortis simplex*

derartige Spalt- und H-Transferreaktion möglich (Abbildung 3.22). Sie verläuft unter Beteiligung des Sauerstoffatoms an der Amidfunktion. Eine Bildung des Ions $m/z = 201$ ist auf diesem Wege ausschließlich aus Amidinen des Tryptophanmethylesters möglich, obwohl die Amidfunktion selbst in dem entstehenden Ion nicht enthalten bleibt. Eine ähnliche Konstellation wie bereits für $m/z = 130$ diskutiert, spricht auch für das intensive Auftreten des Fragments $m/z = 201$. Die Ausdehnung des aromatischen π -Elektronensystems bis zur Carbonylfunktion des Methylesters führt auch hier zur Delokalisierung der Ladung sowie des ungepaarten Elektrons.

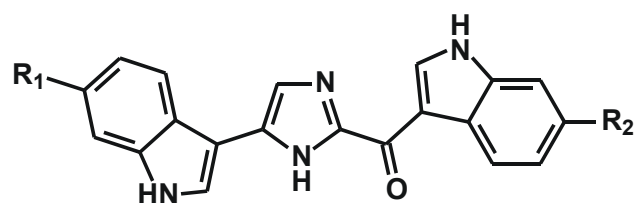
Weitere Signale deutlich geringerer Intensität, die in den EIMS zu erkennen sind, lassen sich durch die in Abbildung 3.23 gezeigten Bindungsbrüche in **76** und **77** erklären.

Diskussion

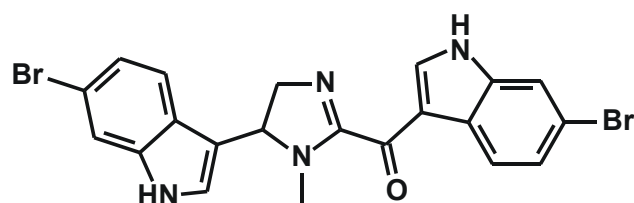
Als Quellen von Indolalkaloiden wurden bereits viele Organismen identifiziert. Wie bei Alkaloiden im Allgemeinen (vergleiche Kapitel 2.2.2, Seite 19) sind diese vorwiegend Pflanzen, aber auch Vertreter anderer Organismengruppen. Darunter befinden sich auch marine Spezies, wie der Schwamm *Ircinia spinulosa*, in dem das bereits aus Pflanzen bekannte Tryptophol (**78**) gefunden wurde (ERDOGAN *et al.*, 2000). Bereits zuvor wurde **78** zusammen mit den strukturell ähnlichen



- 78:** R₁ = H, R₂ = CH₂CH₂OH
79: R₁ = H, R₂ = CHO
80: R₁ = Br, R₂ = CHO

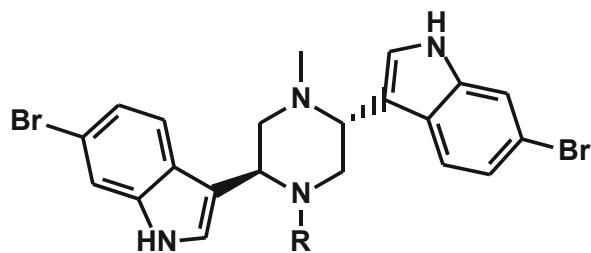


- 81:** R₁ = H, R₂ = H
82: R₁ = H, R₂ = OH
83: R₁ = Br, R₂ = OH

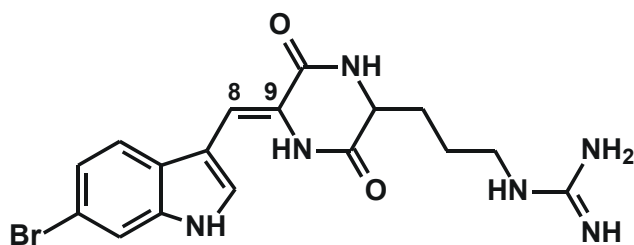


84

Aldehyden **79** und **80** aus dem Extrakt einer unbekannt Art der Gattung *Halichondria* isoliert (LI *et al.*, 1994) und als fungizid beschrieben. Eine Gruppe von Indolalkaloiden ausschließlich marinen Ursprungs stellen die Topsentine dar, für die stellvertretend hier die Strukturen **81–84** dargestellt sind. Die Topsentine A (**81**), B1 (**82**) und B2 (**83**) wurden als erste dieser Bis(indolyl)imidazole aus einer Probe der Schwammart *Topsentia genitrix* isoliert (BARTIK *et al.*, 1987). Wegen ihrer toxischen



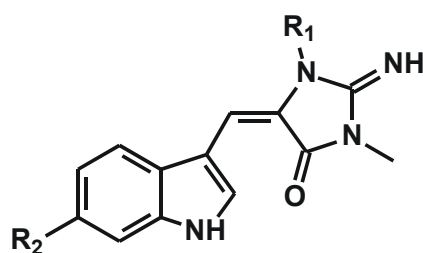
85: R = H
86: R = CH₃



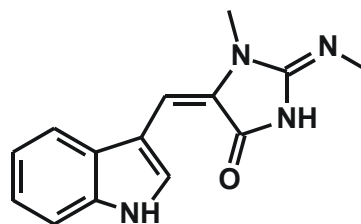
87

Eigenschaften für Fische, vermuteten die Autoren eine Fraßschutzfunktion dieser Verbindungen für ihren Produzenten. Seit der Entdeckung dieser Substanzen wurden ähnliche Strukturen auch für andere marine Invertebraten aufgeklärt. Beispielsweise wurde das Topsentin C (84) als Inhaltsstoff von Poriferen der Gattung *Hexadella* identifiziert (MORRIS und ANDERSEN, 1990). Weitere Metaboliten dieser Schwämme sind die Dragmacidone A (85) und B (86), die im Vergleich zu den Topsentinen anstelle der Ketoimidazolgruppe eine Piperazinstruktur zwischen den Indolylresten besitzen (MORRIS und ANDERSEN, 1990). In Zytotoxizitätstests erweist sich 85 *in-vitro* als aktiv gegen L 1210-Krebszelllinien.

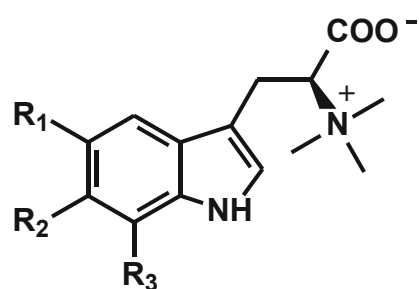
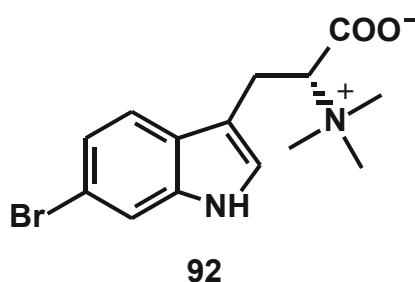
Ein Indolalkaloid mit der Teilstruktur eines Diketopiperazins ist das Baretin 87. Nach der ersten Isolation dieses Naturstoffes aus dem Schwamm *Geodia barretti* durch LIDGREN und BOHLIN (1986) wurde die publizierte Struktur wenig später durch eine unabhängige Studie widerlegt (LIEBERKNECHT und GRIESSER, 1987). Im Rahmen des Projektes BOSMAN klärten SÖLTER *et al.* (2002) die korrekte Struktur des Baretins auf, die von der Arbeitsgruppe der Erstbeschreibung bestätigt wurde (SJÖGREN *et al.*, 2004). Wie die letztgenannte Studie zeigt, weist sowohl 87 als auch ein an den Positionen 8 und 9 gesättigtes Analogon starke Antifouling-Aktivitäten auf, die den Schwamm vor Überwuchs von Fremdorganismen schützt.



88: R₁ = CH₃, R₂ = H
89: R₁ = H, R₂ = H
90: R₁ = H, R₂ = Br



91

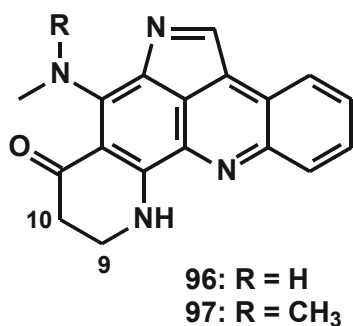


93: R₁ = H, R₂ = H, R₃ = I

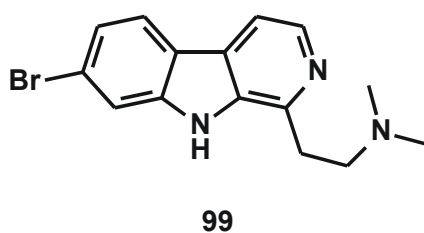
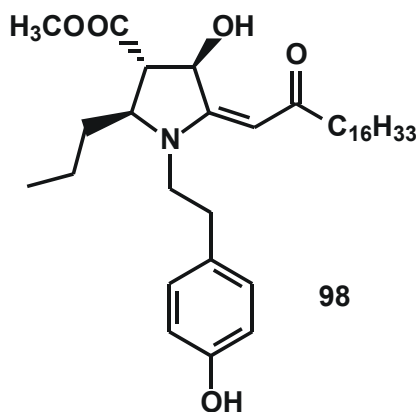
94: R₁ = H, R₂ = I, R₃ = I

95: R₁ = I, R₂ = H, R₃ = I

Eine weitere Gruppe von Indolalkaloiden mit einer Imidazolgruppe, sind die Aplysinopsine, deren Angehörige ebenfalls aus diversen marinen Invertebraten isoliert wurden. Zunächst hatten zwei unabhängige Arbeitsgruppen nahezu zeitgleich das Aplysinopsin (**88**) in Schwämmen der Familie Aplysinidae nachgewiesen (HOLLENBEAK und SCHMITZ, 1977; KAZLAUSKAS *et al.*, 1977). Später wurden sehr ähnliche Verbindungen wie beispielsweise **89** und **90** (DJURA und FAULKNER, 1980) auch in anderen Organismen gefunden. Eine Untersuchung von *Aplysina* sp. durch KONDO *et al.* (1994) führte neben einer weiteren Isolation des Aplysinopsins (**88**) zur Strukturaufklärung des Isoplysins A (**91**) sowie des D-6-Bromhypaphorins (**92**). Zytotoxizitätstests der genannten Studie ergaben IC_{50} -Werte von 11,5 $\mu\text{g/ml}$ für **91** und 2,3 $\mu\text{g/ml}$ für **88** gegen L 1210-Lymphknotenkrebs sowie 6,4 $\mu\text{g/ml}$ von **88** gegen KB-Hautkrebszellen. Die durchgeführten Bioassays offenbarten keine biologische Aktivität des bromierten Hypaphorins **92**. Zusammen mit verwandten Strukturen stellt diese Verbindung allerdings eine weitere Gruppe von Alkaloiden, die unter anderem aus Schwämmen bekannt ist. Das zu **92** enantiomere L-6-Bromhypaphorin wurde bereits 1977 in Proben von *Pachymatisma johnstoni* gefunden (RAVERTY *et al.*, 1977). Ein karibisches Individuum von *Plakortis simplex* erwies sich zudem als Quelle für die iodierten Plakohypaphorine A (**93**), B (**94**) und C (**95**, CAMPAGNUOLO *et al.*, 2003).



Andere Alkaloide aus Poriferen der Gattung *Plakortis* sind die pentacyclischen Plakinidine A (**96**) und B (**97**) sowie das Plakinidin C, das sich von **96** durch eine Doppelbindung zwischen den Positionen 9 und 10 unterscheidet (INMAN *et al.*, 1990; WEST *et al.*, 1990). Weiterhin wurden das Plakoridin A (**98**) (TAKEUCHI *et al.*, 1994), das sich von Tyrosin (**34**, siehe Seite 21) ableiten lässt sowie das Plakortamin A (**99**) und drei

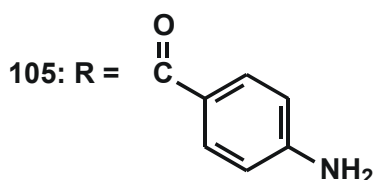
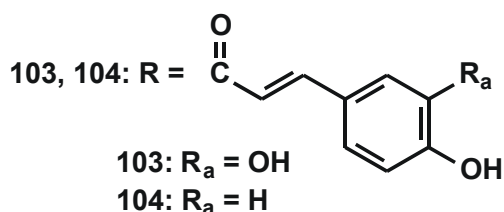
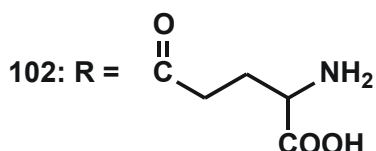
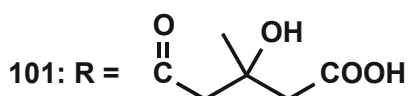
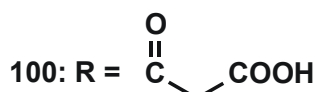
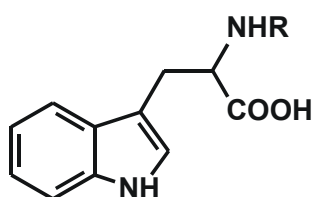


weitere Plakortamine (B–D) ähnlicher Strukturen (SANDLER *et al.*, 2002) aus Schwämmen dieser phylogenetischen Gruppe identifiziert. Andere Alkaloide aus *Plakortis* sind in der Literatur nicht zu finden. Somit sind die Plakohypaphorine A–C (93–95) die einzigen Tryptophanalkaloide, die bisher als Inhaltsstoffe dieser Gattung berichtet wurden.

Von natürlichen Substanzen, die den in dieser Studie identifizierten Alkaloiden 76 und 77 strukturell ähnlicher sind, als die bereits erwähnten, wurde nur selten berichtet. So ist bekannt, dass in diversen Pflanzen das *N*-Malonyltryptophan (100) auftritt (MARKOVA und GAMBURG, 1995; MARKOVA und GAMBURG, 1997). Weitere natürliche Tryptophanamide von Dicarbonsäuren sind das Achillamid (101), das in den Wurzeln

des Schmetterlingsblütlers *Astragalus trojanus* gefunden wurde (BEDIR *et al.*, 1999) sowie das *N*-(γ -Glutamyl)tryptophan (102), das in den Samen der Buchenart *Fagus silvatica purpurea* enthalten ist (KASAI *et al.*, 1978). Darüber hinaus wurden auch Tryptophanamide aromatischer Säuren identifiziert. In den späten 1980er Jahren wurde das *N*-(Kaffeoyl)tryptophan (103) aus Kaffeebohnen von *Coffea canephora* var. *robusta* isoliert (MORISHITA *et al.*, 1987). Inzwischen ist dieser Naturstoff auch von anderen Kaffeearten (OKADA *et al.*, 1997) sowie von dem Farn *Athyrium filix-femina* (ADAM, 1995) bekannt. Außerdem konnte das entsprechende Amid der Zimtsäure (104) ebenfalls in Kaffeebohnen nachgewiesen werden (MURATA *et al.*, 1995). Das *N*-(4-Aminobenzoyl)tryptophan (105) ist erst seit kurzem als Metabolit des Schleimpilzes *Fuligo candida* bekannt (NAKATANI *et al.*, 2004). Natürliche Tryptophanamide aliphatischer oder alicyclischer Carbonsäuren ohne weitere Funktionalisierung kommen in der Literatur bisher nicht vor.

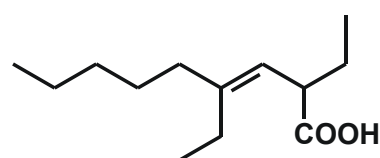
Neben der Neuartigkeit der Verbindungen 76 und 77 als natürliche Produkte ist ein weiterer Aspekt auffallend. Die Säureteilstrukturen dieser Amide sind mit der 2,4-Diethyloct-3-ensäure bzw. mit der um eine Methyleneinheit längeren 2,4-Diethylnon-3-ensäure (106) zu beschreiben. Abbildung 3.15 (Seite 48) zeigt die potenziellen Vorläufer 67 und 68 für die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Substanzen 50 und 51. Im Vergleich von 106 mit der von dem Ester 68 abgeleiteten freien Säure 107 fällt eine starke Ähnlichkeit beider Strukturen auf. Diese



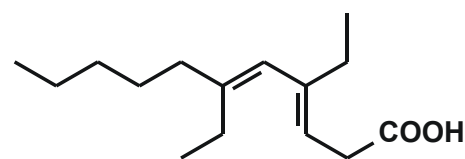
ierlich aufgebaut. Im Unterschied zur Bildung von Polyketiden ist dabei ein mehrstufiger Reduktionsprozess der primär gebildeten β -Ketosäuren (siehe auch Abbildung 2.5, Seite 17) fester Bestandteil des Kreislaufs. Der formale Ablauf einer derartigen Kettenverlängerung ist mit den dabei auftretenden Zwischenprodukten in Abbildung 3.24 dargestellt. In dieser Abfolge werden aus den β -Ketosäuren zunächst β -Hydroxysäuren gebildet, die durch eine sich

zeigt sich zum einen in der Gemeinsamkeit einer Diethylsubstitution mit identischen Abstand der Substituenten zueinander. Zudem stimmt die relative Lage der in **106** vorhandenen Doppelbindung zu den Ethylsubstituenten mit einer Unättigung von **107** überein. Weiterhin ist der jeweils längste Alkylsubstituent an diesen Doppelbindungen von **106** und **107** identisch. Die hier gezeigte Verwandtschaft der Säureteilstrukturen führt zu der Vermutung, dass ein biosynthetischer Zusammenhang zwischen den beiden Substanzklassen besteht. Dementsprechend ist es vorstellbar, dass die Carbonsäureeinheiten der Tryptophanamide weitgehend parallel zu den hypothetischen Vorläufern der cyclischen Peroxide gebildet werden. Es ist sogar denkbar, dass durch eine Verlängerung der in dem Tryptophanamid **77** enthaltenen Partialstruktur **106** der für das cyclische Peroxid **50** angenommene Vorläufer **107** gebildet wird.

Wie in Kapitel 2.2.2 (Seite 18) erwähnt, verläuft die Biosynthese von Fettsäuren in starker Analogie zur Polyketidsynthese. Sie werden in einem cyclischen Prozess durch C₂-Verlängerungsschritte kontinuierlich



106



107

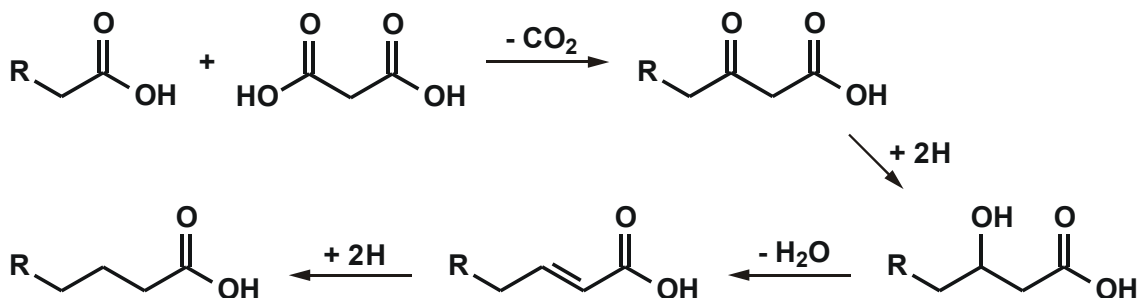


Abbildung 3.24 schematische Darstellung formaler Prozesse und Zwischenprodukte bei der C_2 -Kettenverlängerung bei der Biosynthese von Fettsäuren

anschließende Dehydratisierung zu α,β -ungesättigten Fettsäuren transformiert werden. Schon im nächsten Schritt kommt es zur Auflösung der zuletzt gebildeten Unsättigung.

Eine nach diesem Syntheseprinzip durchgeführte Verlängerung der Carbonsäure **106** (Abbildung 3.25) führte nach der decarboxylativen Kondensation mit Malonsäure zu der β -Ketosäure **108**. Die im weiteren Verlauf daraus gebildete β -Hydroxysäure **109** ließe sich anschließend unter Eliminierung von Wasser in eine Diensäure überführen. Die Struktur **110** entspricht dem dabei zu formulierenden Zwischenprodukt mit einer zur Carbonylfunktion konjugierten Doppelbindung. Im Gegensatz zur Transformation einer gesättigten und unverzweigten Fettsäure ist in dem hier betrachteten Fall das alternative Dehydratisierungsprodukt (**107**) thermodynamisch stabiler als die α,β -ungesättigte Fettsäure (**110**). Neben einer ebenfalls

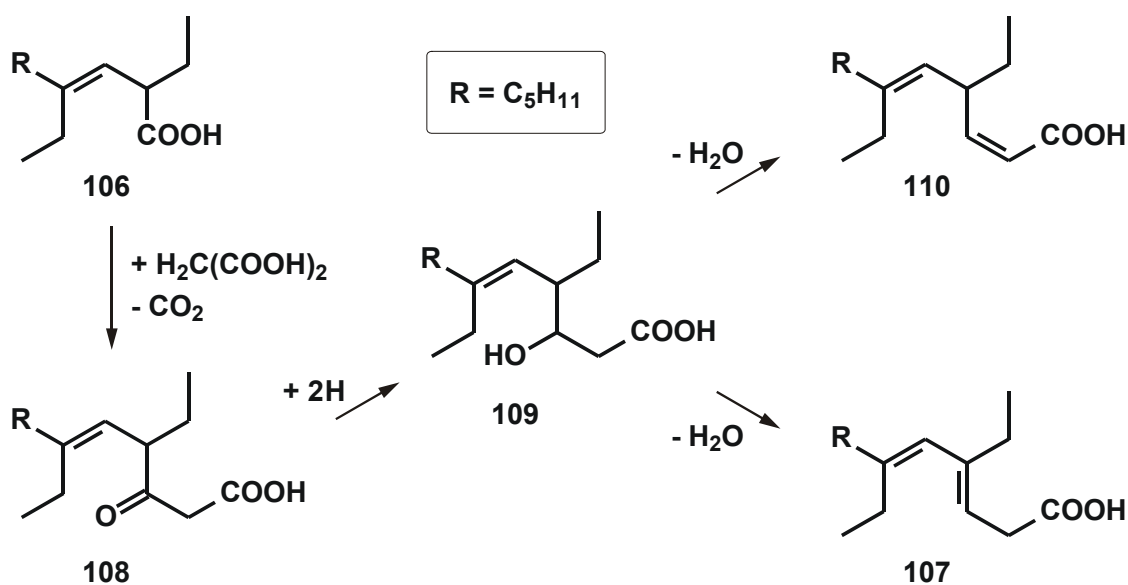


Abbildung 3.25 Schematische Darstellung eines möglichen Bildungsweges der Carbonsäure **107** durch Kettenverlängerung der Carbonsäure **106**

vorhandenen Konjugation der neu eingeführten Doppelbindung ist diese höher alkylsubstituiert als bei **110**. Die Annahme, dass eine der Fettsäuresynthese analog verlaufende Kettenverlängerung von **106** zur Struktur **107** führen könnte, erscheint vor diesem Hintergrund plausibel.

Es wird daher vermutet, dass die in *Plakortis simplex* enthaltenen cyclischen Peroxide sowie die Tryptophanamide gemeinsame biosynthetische Vorläufer haben. Für das Tryptophanamid **77** und das cyclische Peroxid **50** wäre dies die 2,4-Diethylnon-3-ensäure **106** (Abbildung 3.26). Eine Amidierung dieser Säure mit Tryptophanmethylester führte direkt zur in dieser Studie gefundenen Substanz **77**. Durch eine Kettenverlängerung, wie sie zur konventionellen Fettsäuresynthese in allen Organismen stattfindet, könnte aus der Säure **106** die zweifach ungesättigte Carbonsäure **107** gebildet werden. Unter Addition von Sauerstoff wäre daraus die Bildung der Substanz **50** möglich.

Wie im Fall der cyclischen Peroxide sind die Produzenten der Tryptophanamide unbekannt. Möglicherweise sind für die Bildung der beiden Naturstoffgruppen unterschiedliche Organismen verantwortlich. Als Polyketide, die typische Metaboliten von Bakterien sind, könnten cyclische Peroxide, wie die im Zuge dieser Arbeit identifizierten Vertreter **50** und **51**, ebenfalls von (schwammassoziierten) Bakterien gebildet werden. Davon unabhängig könnten die

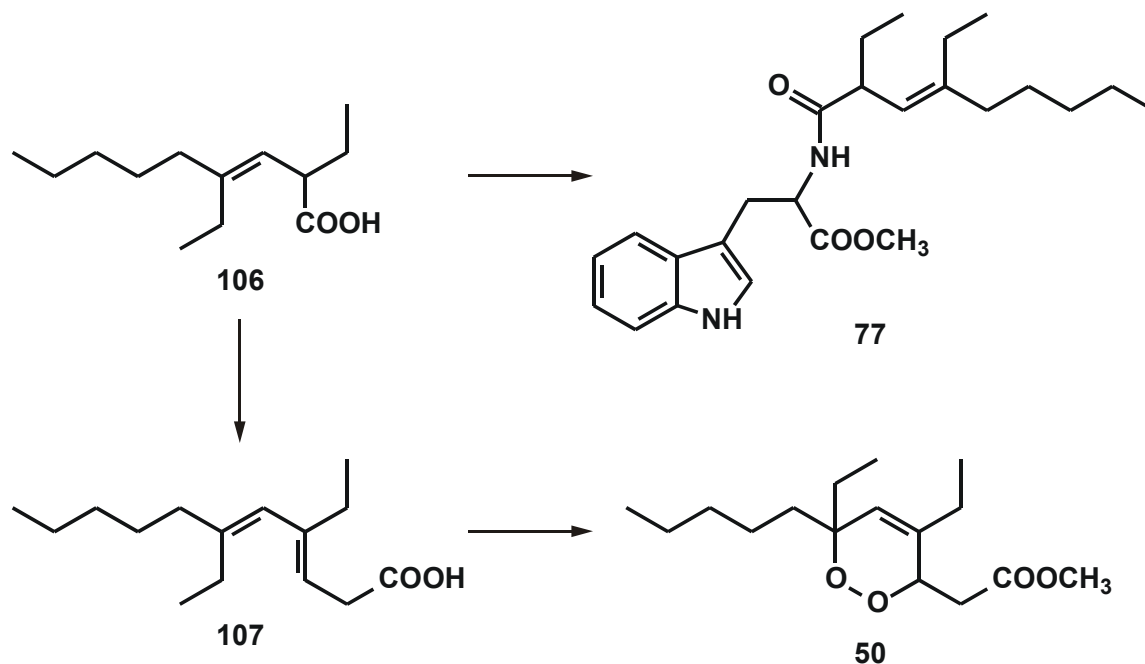


Abbildung 3.26 Vermuteter Zusammenhang zwischen den Biosynthesewegen des Tryptophanamids **77** und dem cyclischen Peroxid **50** aus *Plakortis simplex*

Tryptophanamide Erzeugnisse des Schwammes sein. In diesem Fall wäre es nicht ausgeschlossen, dass ein Organismus die Metaboliten des anderen (z.B. der Schwamm die von Bakterien produzierte Carbonsäure **106**) zur Synthese der eigenen Produkte nutzt.

GC/C/IRMS-Analysen ergaben für die beiden Naturstoffe **76** und **77** Isotopensignaturen von $\delta^{13}\text{C} = -22,2 \text{ ‰}$ bzw. $\delta^{13}\text{C} = -23,3 \text{ ‰}$ (vs. VPDB [$\pm 0,5 \text{ ‰}$]; Mittelwerte aus drei Messungen). Im Vergleich zu den Isotopenverhältnissen der cyclischen Peroxide **50** und **51** (beide $\delta^{13}\text{C} = 21,7 \text{ ‰}$) zeigen diese Werte einen nur unwesentlich höheren Anteil des Kohlenstoffisotops ^{12}C an. Unter Berücksichtigung der bei diesen Messungen auftretenden Standardabweichung (s.o.) sind sie als nahezu gleichwertig zu beurteilen. Konkrete Aussagen zu den Quellen von **76** und **77** zu treffen ist aus den gleichen Gründen nicht möglich, wie sie bereits für **50** und **51** genannt wurden (siehe Kapitel 3.2.4, Seite 50). Die ähnlichen Isotopenverhältnisse der vier untersuchten Naturstoffe sind jedoch als zusätzliches Indiz dafür zu bewerten, dass einen biosynthetischer Zusammenhang zwischen den beiden Substanzklassen besteht.

Ebenso unbekannt wie die Erzeuger dieser Naturstoffe ist die Funktion der Substanzen für den produzierenden Organismus. Eventuell sind die Verbindungen einer der beiden Naturstoffgruppen lediglich die Transformationsprodukte überschüssiger Metaboliten auf dem Biosyntheseweg der anderen Naturstoffe. Untersuchungen zur Klärung dieser Fragen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

3.3 Chemische Analyse von *Axinella rugosa*

3.3.1 Fettsäureinventar

Die GC/MS-Untersuchungen des FAME-Extraktes von *Axinella rugosa* (Ordnung Halichondrida, Familie Axinellidae, Schmidt, 1975) zeigten neben dem Inventar an Fettsäuren einige weitere Verbindungen. Ihre Massenspektren deuten darauf hin, dass ihre Strukturen auf verschiedenen Grundgerüsten von Sesquiterpenen basieren. Diese Substanzen treten ebenfalls in Gesamtextraktfraktionen auf und werden daher später noch eingehend diskutiert. Da in vielen Fällen Einzelsubstanzen des komplexen FAME-Inventars mit einigen dieser Verbindungen koeluieren, war eine Identifikation aller FAME aus diesem Extrakt nicht direkt möglich. Eine Trennung der FAME von anderen Inhaltsstoffen des Extraktes wurde durch die in Kapitel 4.2.3 (Seite 95) beschriebene Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE) erreicht. Das GC/MS-Chromatogramm der auf diese Weise erzeugten Fraktion ist in Abbildung 3.27 dargestellt. Auffällig sind die im Retentionszeitbereich ab 50 min auftretenden hochkonzentrierten Substanzen, die als bromierte zweifach ungesättigte Fettsäuren identifiziert wurden.

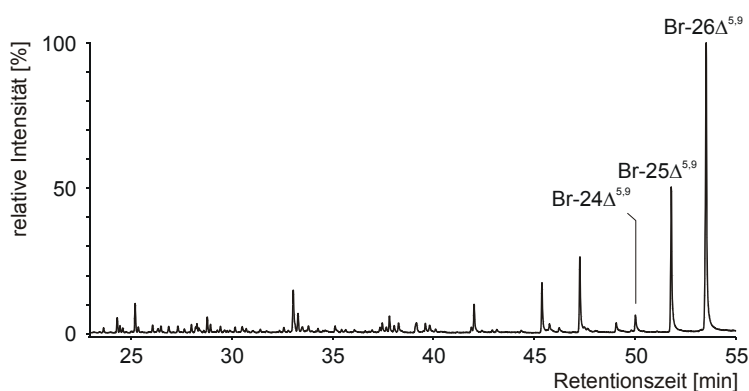


Abbildung 3.27 GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes von *Axinella rugosa* [GC-Temperaturprogramm: 80°C (3°C isotherm), 4°C/min bis 310°C]

Ihre auf der Basis von GC/FID-Untersuchungen ermittelten Mengenanteile in dieser Fraktion des FAME-Extraktes betragen zusammen etwas mehr als 50 %. Die chemische Zuordnung der drei Substanzen erfolgte vorrangig auf der Basis ihrer Massenspektren. In diesen treten die jeweiligen Moleküle als Dubletten geringer Intensität mit einer Massendifferenz von 2 u auf, die auf

das Vorkommen der stabilen Bromisotope ^{79}Br und ^{81}Br in nahezu ausgeglichenem Verhältnis zurückzuführen ist. Unter Verlust des Bromsubstituenten wird jeweils ein Fragmention (m/z bei M-79 bzw. M-81) gebildet, dessen m/z im Vergleich zum Molekülion des unbromierten FAME-Analogon um eine Masseneinheit geringer ist. Ein weiteres Indiz für die Halogenierung der Komponenten sind ihre Signale bei GC-Untersuchungen mit

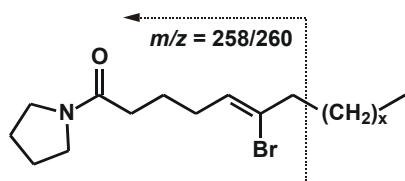


Abbildung 3.28 EIMS-Fragmentierung von Δ^5 -FAME-Pyrrolidinderivaten mit 6-Bromsubstitution

Elektroneneinfangdetektor (*electron capture detector*, ECD). Die Positionen der beiden Doppelbindungen wurden mit den in Kapitel 4.2.4 (Seite 98 und Seite 99) beschriebenen Verfahren für alle drei bromierten Fettsäuren als $\Delta^{5,9}$ bestimmt. In den EI-Massenspektren der hierzu hergestellten Pyrrolidinderivate treten neben den für eine Δ^5 -Unsättigung typischen Fragmenten bei $m/z = 126$ und $m/z = 180$ auch zwei gleich intensive Signale bei $m/z = 258$

und $m/z = 260$ auf. Diese Dubletten deuten auf Fragmente hin, in denen die Bromierung noch erhalten ist. Eine Erklärung für die Strukturen dieser Fragmente ist in Abbildung 3.28 am Beispiel einer an Position 6 bromierten Δ^5 -FAME gezeigt. Das Auftreten dieser Fragmentationen in den EI-Massenspektren, grenzt die Substituierungen der drei bromierten FAME auf die Positionen 2–7 ein.

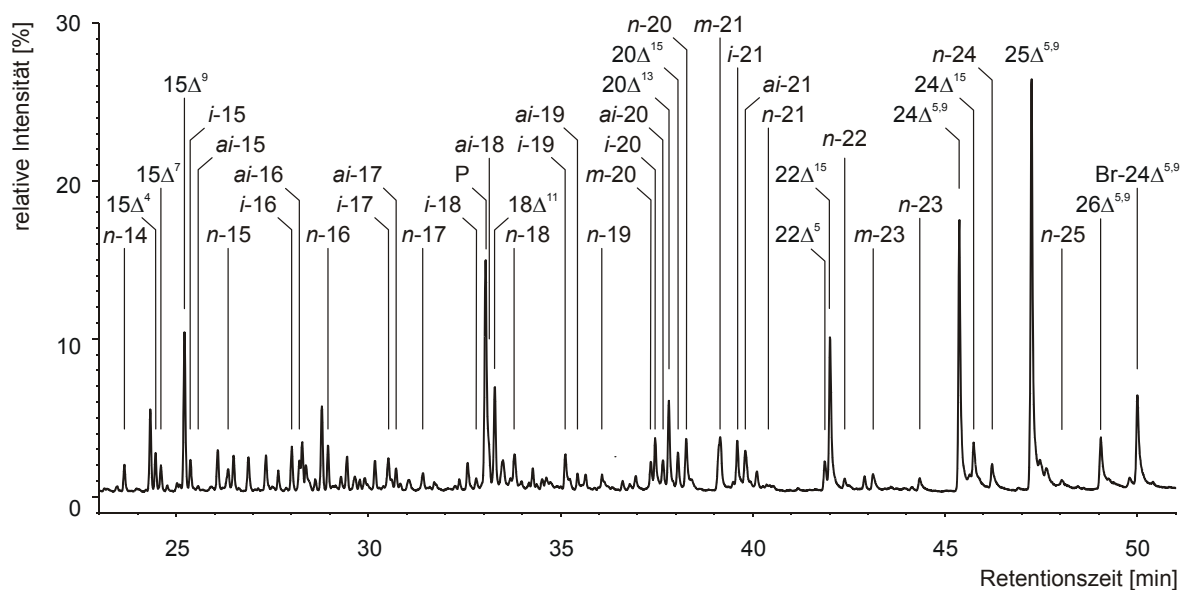


Abbildung 3.29 Vergrößerter Ausschnitt aus dem GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes aus *Axinella rugosa* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 °C isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

Gekennzeichnet sind die Anzahlen der C-Atome der FAME abzügl. ihres Methylsterkohlenstoffs

- n*- unverzweigter FAME
- i*- *iso*-verzweigter FAME (ω 2-methylverzweigt)
- ai*- *anteiso*- verzweigter FAME (ω 3-methylverzweigt)
- m*- mittkettig verzweigter FAME
- Δ^a FAME mit Unsättigung(en) an den Positionen *a*
- Br- bromierter FAME
- P Phytansäuremethylester (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäuremethylester)

Darüber hinaus wurde festgestellt, dass sich als Produkte der Umsetzung mit DMDS (siehe 4.2.4, Seite 98) nicht die für $\Delta^{5,9}$ -FAME typischen cyclischen Derivate (Abbildung 4.7, Seite 99) bildeten. Offenbar kommt es bei dieser Reaktion lediglich zur Addition eines DMDS-Moleküls an die Δ^9 -Doppelbindung. Es liegt daher nahe, dass der sterische Einfluss des Bromsubstituenten die Bildung cyclischer Thioether verhindert. Eine Verhinderung des Ringschlusses zwischen C-6 und C-9 ist insbesondere dann möglich, wenn der voluminöse Bromsubstituent an einer der beiden genannten Positionen lokalisiert ist. Auf der Basis dieser Überlegungen wird eine Substitution in unmittelbarer Nähe der Δ^5 -Unsättigung angenommen.

Eine Vergrößerung des Retentionszeitbereichs von 23 min bis 51 min aus dem in Abbildung 3.27 dargestellten TIC zeigt die Verteilung der weiteren FAME dieser Probe (Abbildung 3.29). Eine Übersicht der identifizierten FAME ist in Tabelle 3.9 gegeben. Unverzweigte gesättigte Fettsäuren sind von C₁₄ bis C₂₅ nachzuweisen. Diese zeigen ein quantitatives Übergewicht der geradzahligen FAME, wie es schon bei *Plakortis simplex* beobachtet wurde (siehe Tabelle 3.9 und Anhang, Kapitel 7.2.2, Seite 118). Unter den verzweigten FAME wurde ein Vorrang von Ketten mit ungerader Kohlenstoffanzahl allerdings nicht beobachtet. Dagegen wurden *i*-FAME nahezu ausnahmslos mit höheren Anteilen, als die jeweiligen *ai*-FAME ermittelt. Die Kettenlängen dieser endständig methylverzweigten Lipide umfassen den Bereich von

Modifikation	Anzahl von Kohlenstoffatomen												
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
<i>n</i> -	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	
<i>i</i> -		●	●	●	○	●	●	●					
<i>ai</i> -		○	○	○	○	○	●	●					
<i>m</i> -							●	●		●			
Δ_1		●	○		●		●		●		●		
$\Delta^{5,9}$											●	●	●
Br- $\Delta^{5,9}$											●	●	●

Tabelle 3.9 Übersicht der in *Axinella rugosa* enthaltenen Fettsäuren

- n*- unverzweigter FAME
- i*- *iso*-verzweigter FAME (ω 2-methylverzweigt)
- ai*- *anteiso*- verzweigter FAME (ω 3-methylverzweigt)
- m*- mittkettig verzweigter FAME
- Δ_1 FAME mit einer Unsättigung
- $\Delta^{5,9}$ FAME mit Unsättigungen an den Positionen 5 und 9
- Br- $\Delta^{5,9}$ bromierte FAME mit Unsättigungen an den Positionen 5 und 9
- mittlere bis hohe Anteile ($\geq 0,4$ % der Lipide)
- geringe Anteile ($< 0,4$ % der Lipide)
- in Spuren nachweisbar

C₁₅ bis C₂₁. Mittkettige Methylverzweigungen wurden nur bei C₂₀-, C₂₁- und C₂₃-FAME festgestellt. Neben verschiedenen einfach ungesättigten Verbindungen, die sich nicht auf einen bestimmten Kettenlängenbereich einschränken lassen, wurden zweifach ungesättigte FAME von C₂₄ bis C₂₆ identifiziert. Die Positionen ihrer Doppelbindungen sind 5 und 9. Fettsäuren ab einer Kettenlänge von C₂₄ mit diesem Un sättigungsmuster ($\Delta^{5,9}$) sind, wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 2.2.1, Seite 13), Biomarker für die Hexactinellida und Demospongiae (*demospongiac acids*). Unter diesem Aspekt ist *A. rugosa* somit ein typischer Vertreter seiner Schwammklasse (Demospongiae).

Deutlich weniger verbreitet als *demospongiac acids* sind die in dieser Probe gefundenen bromierten Fettsäuren. Dabei stellen Bromierungen in Substanzen mariner Herkunft keine Seltenheit dar. Obwohl Chloridionen mit etwa 500 mmol/L deutlich höhere Konzentrationen in Meerwasser aufweisen als Bromidionen mit rund 1 mmol/L (BUTLER und WALKER, 1993), werden bromierte Substanzen weitaus häufiger als Metaboliten mariner Organismen gefunden als chlorierte (BLUNT *et al.*, 2005, und frühere Berichte dieser Serie). Als Beispiele für die vielen bromierten Sekundärstoffe, die aus marinen Invertebraten bekannt sind, wurden in Kapitel 3.2.5 (ab Seite 59) bereits einige Indolalkaloide genannt. Interessanterweise wurden bisher nur relativ wenige Fettsäuren mit Halogensubstitution in marinen Quellen gefunden (LAM *et al.*, 1989). Darunter sind einige vicinale Chlorhydroxyfettsäuren der Kettenlängen C₁₆ und C₁₈, die als Inhaltsstoffe einer taxonomisch nicht näher bestimmten Schirmqualle (Klasse Scyphozoa) identifiziert wurden (WHITE und HAGER, 1977). Nachfolgend wurden in Schwämmen der Gattung *Xestospongia* einige bromierte Fettsäuren verschiedener Kettenlängen gefunden, die sich durch diverse Doppel- und Dreifachbindungen auszeichnen (SCHMITZ und GOPICHAND, 1978; QUINN und TUCKER, 1985; HIRSH *et al.*, 1987; QUINN und TUCKER, 1991; LI *et al.*, 1995). Auffällig ist ihre Gemeinsamkeit von mindestens einem Bromsubstituenten am terminalen Kohlenstoffatom des olefinischen Kettenendes. Eine geminale Dibromierung am ungesättigten Kettenende besitzt zudem auch die Δ^8 -Nonensäure aus *Xestospongia* sp. (HIRSH *et al.*, 1987). Alle zuvor genannten halogenierten Fettsäuren waren allerdings nicht als Phospholipide gebunden, sondern frei extrahierbar. Als Membranlipide wurden dagegen bromierte langkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren in verschiedenen Demospongiae nachgewiesen. Mit wenigen Ausnahmen (CARBALLEIRA und EMILIANO, 1993; BARNATHAN *et al.*, 1994; BLUMENBERG, 2003) beschränkt sich dabei das Vorkommen dieser Verbindungen auf Porifera der Ordnungen Haplosclerida und Halichondrida (WIJEKOON *et al.*, 1984; LAM *et al.*, 1989; CARBALLEIRA und SHALABI, 1993; GARSON *et al.*, 1994; LI *et al.*, 1995; BLUMENBERG, 2003). Neben der charakteristischen Doppelbindungssignatur $\Delta^{5,9}$ ist diesen Verbindungen offenbar

ein weiteres Merkmal gemeinsam. Alle Untersuchungen zur Lokalisierung des Halogensubstituenten in der Kohlenstoffkette zeigten eine Bromierung an Position 6 an.

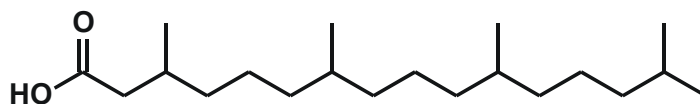
Somit besitzen alle bisher bekannten Bromfettsäuren aus marinen Organismen die Struktureinheit eines Vinylbromids (LAM *et al.*, 1989). Wie zuvor schon beschrieben, wurden in den Untersuchungen dieser Studie die Positionen der Bromierungen nicht ermittelt. Allerdings wurden sie auf die Kohlenstoffatome 2-7 eingeschränkt, und es gilt darüber hinaus als wahrscheinlich, dass sich die Substitution nahe der Position 6 bzw. direkt am C-6 befindet. Vor diesem Hintergrund sowie aufgrund der genannten Befunde aus bisher identifizierten Bromfettsäuren mariner Organismen wird angenommen, dass sich die Halogensubstituenten der in *A. rugosa* gefundenen Br- $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren jeweils am C-6 befinden.

Bezüglich der Funktion dieser Verbindungen wird angenommen, dass sie in den Zellmembranen des Organismus zur Regulation der Fluidität und Permeabilität eingesetzt werden (LAM *et al.*, 1989; BLUMENBERG, 2003). Im Rahmen des Projektes BOSMAN durchgeführte Untersuchungen an *Phakellia ventilabrum*, einer Spezies aus der gleichen Familie (Axinellidae) wie *A. rugosa*, zeigten, dass das Verhältnis bromierter *demospongiac acids* zu unbromierten in exponierten Schwammteilen geringer ist als in basalen Stücken des Schwammes (BLUMENBERG, 2003). Dieser Befund deutet zumindest darauf hin, dass eine Verwendung dieser Verbindungen gegen Fraßfeinde unwahrscheinlich ist, da die basalen Bereiche in dieser Hinsicht tendenziell weniger gefährdet sind als am Rande liegende Schwammteile.

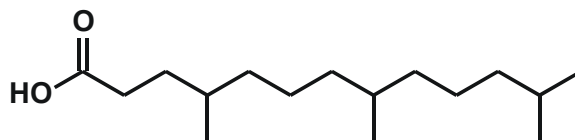
In anderen Untersuchungen konnte für die Porifere *Amphimedon terpenensis* nachgewiesen werden, dass bromierte langkettige $\Delta^{5,9}$ -Fettsäuren in den Schwammzellen lokalisiert sind, und nicht in assoziierten Bakterien (GARSON *et al.*, 1994). Auch die nahe liegende Biosynthese dieser Verbindungen aus unbromierten *demospongiac acids* konnte für einen Schwamm der Axinellidae eindeutig belegt werden (LAM *et al.*, 1989). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen im Fettsäureinventar von *A. rugosa* drei unbromierte $\Delta^{5,9}$ -FAME mit den gleichen Kettenlängen (C₂₄ bis C₂₆) wie die identifizierten Br- $\Delta^{5,9}$ -FAME. Es ist daher zu vermuten, dass diese auch in der hier untersuchten Spezies als Vorläufer der bromierten *demospongiac acids* herangezogen werden.

Eine weitere Auffälligkeit des FAME-Extraktes von *A. rugosa* stellt der Nachweis der 3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäure (**111**, Phytansäure) dar. Diese Isoprenoidsäure wurde erstmals 1981 als Lipidbestandteil eines Schwammes (*Aplysina fistularis*) nachgewiesen (WALKUP *et al.*, 1981). Seither wurde sie ebenso wie die 4,8,12-Trimethyltridecansäure (**112**) in diversen

Schwämmen gefunden. Beide Substanzen kommen im marinen Milieu, neben einer Reihe weiterer acyclischer Isoprenoide, vorrangig in marinen Sedimenten vor. Sie gelten als Abbauzwischenprodukte der Chlorophylle a und b sowie des Bakteriochlorophyll a, welche Phytylseitenketten besitzen (DIDYK *et al.*, 1978; GILLAN und JOHNS, 1980). Eine Aufnahme von



111



112

111 und **112** durch Schwämme ist daher denkbar, wenngleich auch die Eigenproduktion nicht ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass im Schwamm assoziierte Mikroorganismen für die Synthese dieser Säuren bzw. ihre Vorläufer verantwortlich sind und der Wirtsorganismus diese zum Aufbau eigener Phospholipide nutzt. Da Biosynthesen isoprenoider Strukturen von Bacteria unbekannt sind, können Organismen dieser Domäne als Produzenten ausgeschlossen werden. Die Lipide der Archaea (vergleiche Abbildung 2.1, Seite 9) hingegen bestehen ausschließlich aus Isoprenoiden (LANGWORTHY, 1985). Aus einigen Untersuchungen geht hervor, dass sich Archaeen an den Gemeinschaften von Mikroorganismen und Schwämmen beteiligen (PRESTON *et al.*, 1996; MARGOT *et al.*, 2002; PAPE, 2004). Als mögliche Quellen der identifizierten Phytansäure sind demzufolge, neben dem Schwamm selbst, assoziierte Archaeen sowie ein externer Eintrag von Chlorophyll-Abbauprodukten zu nennen.

Im Rahmen einer Dissertation verfolgte BLUMENBERG (2003) zwei verschiedene Wege, um einen Beitrag zur Klärung der Quellen von **111** in Schwämmen zu liefern. So sollten stereochemische Untersuchungen helfen, die Herkunft der Phytansäure einzugrenzen. Während eine abiotische Degradation von Chlorophyll zu einem Racemat der Isomere 3-(R)-**111** und 3-(S)-**111** führt (MACKENZIE *et al.*, 1982), wird für einen größeren Anteil des 3-(S)-Isomers in Sedimentproben ein biotischer Chlorophyllabbau diskutiert (MACLEAN *et al.*, 1968). Dem entgegen wurde bereits 1967 von einer stereospezifischen Synthese des 3-(R)-Isomers durch ein Archaeum berichtet (KATES *et al.*, 1967). Ein Übergewicht der Phytansäure mit 3-(R)-Konfiguration wurde jedoch auch schon auf den Chlorophyllabbau durch Cyanobakterien zurückgeführt (MACLEAN *et al.*, 1968; GOLUBIC und AWRAMIK, 1974). Das Phytansäureinventar der Schwammspezies *Phakellia ventilabrum* zeigte allerdings größere Anteile des

3-(S) konfigurierten Isoprenoids. Weitere Erkenntnisse sollten durch *In-vivo*-Experimente mit einzelnen Individuen dieser Spezies erhalten werden. Diese Versuche zeigten, dass die ^{13}C -markierten Phitylreste einer aus Archaea bekannten Lipidkomponente (Archaeol) zum Aufbau schwammeigener Lipide genutzt wird. Als Resultate dieser Studie ergab sich folglich, dass die stereochemischen Befunde eine Beteiligung von Archaea am Vorkommen von **111** in Schwämmen nicht unterstützen, wenngleich die Tracerversuche mit isotopisch markiertem Archaeol zumindest die prinzipielle Möglichkeit einer solchen Beziehung andeuten.

Aus weiteren Untersuchungen diverser Schwammspezies ergab sich der Befund des gehäuften und intensiven Auftretens von Phytansäure in Schwämmen der Ordnung Halichondria (BLUMENBERG, 2003), der auch *A. rugosa* angehört. Allerdings ist die Phytansäure weder ein obligates noch ein exklusives Merkmal dieser Ordnung, weshalb ihr nur eine eingeschränkte chemotaxonomische Funktion zukommt.

3.3.2 Fraktion 1

Die Gesamtextraktfraktion 1 von *Axinella rugosa* ist von äußerst geringer Absolutmenge und zeigt in ihrem GC/MS-Chromatogramm einige leichtflüchtige Komponenten. Eine Zuordnung zu der Naturstoffgruppe der Sesquiterpene wurde anhand ihrer Massenspektren

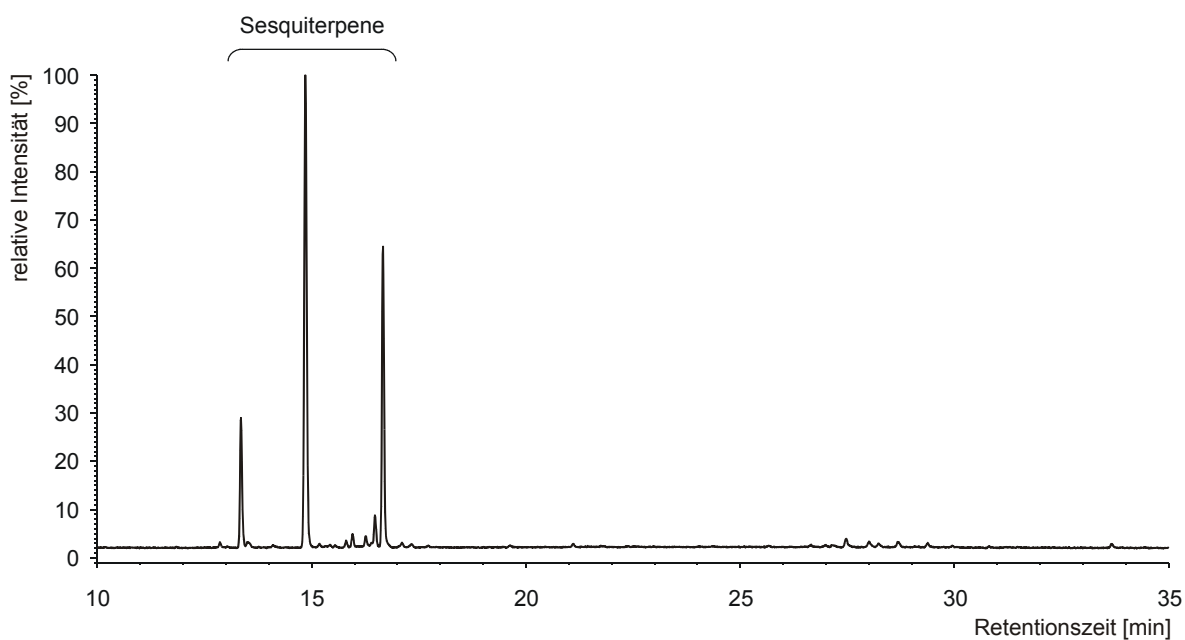


Abbildung 3.30 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 1 (Kohlenwasserstoffe) aus *Axinella rugosa* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (10 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

durchgeführt. Die wichtigsten Anhaltspunkte sind dabei die Molekülionen bei $m/z = 204$, die für Substanzen der Kohlenwasserstofffraktion auf die Summenformel $C_{15}H_{24}$ schließen lassen. Darüber hinaus zeigen die Massenspektren dieser Verbindungen viele Übereinstimmungen mit denen bekannter Sesquiterpene. So sind einige für Terpene diagnostische Fragmentationen, wie beispielsweise $m/z = 105$, $m/z = 119$ oder $m/z = 161$, für alle Inhaltsstoffe der Fraktion 1 mit signifikanter Intensität zu beobachten. Vergleiche der Massenspektren mit Literaturdaten ließen unter Berücksichtigung des Retentionsverhaltens keine eindeutige Zuordnung zu bekannten Strukturen zu. Wegen der geringen Konzentrationen dieser Verbindungen wurden keine Arbeiten zu ihrer Isolation durchgeführt.

3.3.3 Fraktion 2/3

In den Gesamtextraktfraktionen 2a, 2b und 3 zeigten die GC/MS-Untersuchungen jeweils geringe Anzahlen verschiedener Inhaltsstoffe. Darüber hinaus war mit der Auftrennung des Gesamtextraktes in diese Unterfraktionen (vergleiche Kapitel 4.2.3, Seite 94) im Hinblick auf weitere Arbeitsschritte keine zweckmäßige Teilung des chemischen Inventars verbunden. Die genannten Fraktionen wurden daher vereint und werden im Folgenden als gemeinsame Fraktion 2/3 behandelt. Abbildung 3.31 zeigt das GC/MS-Chromatogramm dieser Fraktion, in dem die Hauptbestandteile O–Y gekennzeichnet sind. Die Massenspektren dieser

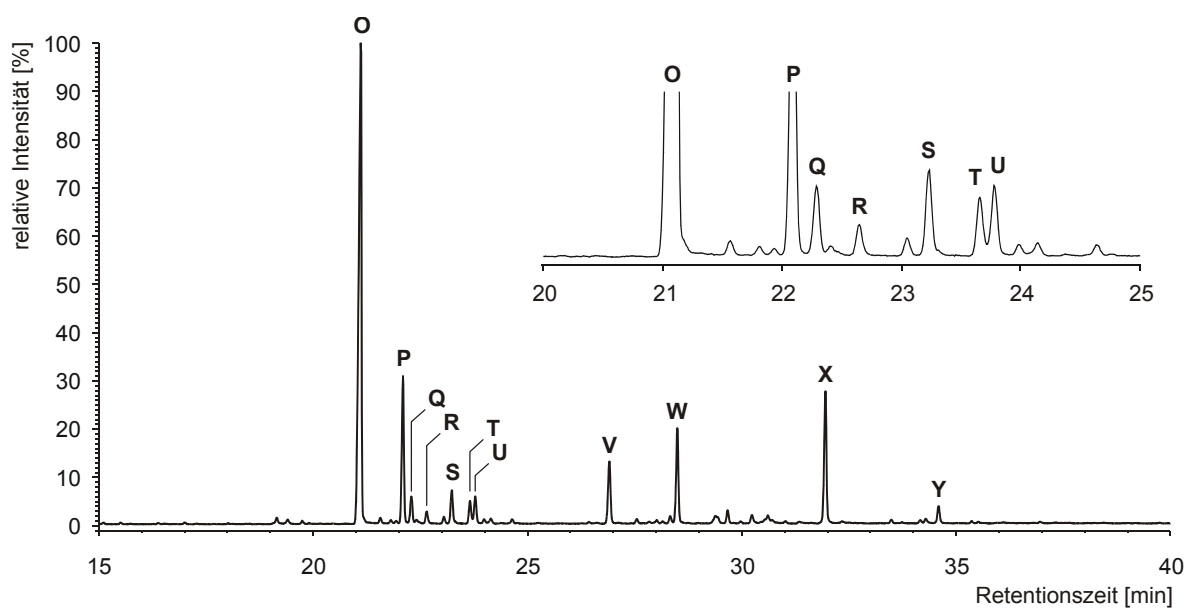


Abbildung 3.31 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 2/3 (semipolare und polare Substanzen) aus *Axinella rugosa* [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]

Verbindungen deuten auf funktionalisierte Terpene hin. Beispiele hierfür sind die in Abbildung 3.32 gezeigten Massenspektren von **O**, **V** und **X**.

Durch GC/HRMS-Untersuchungen konnten die elementaren Zusammensetzungen der Substanzen **O**, **P**, **S**, **U**, **V**, **W** und **X** bestimmt werden. Auf diese Weise ergeben sich für einzelne

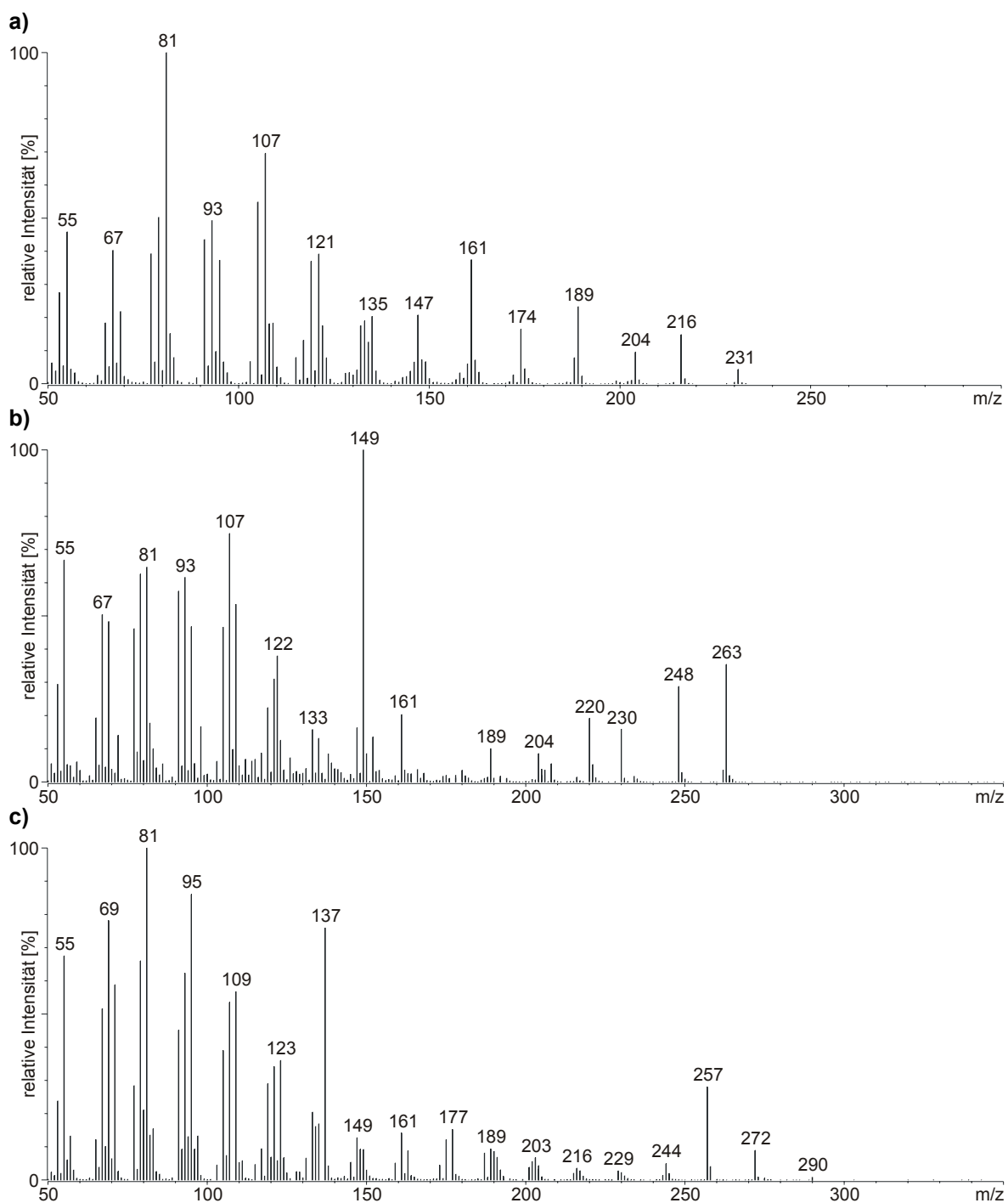


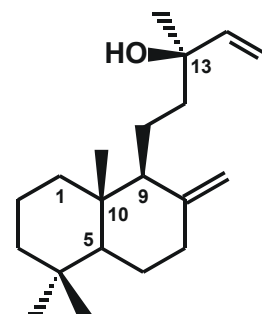
Abbildung 3.32 EI-Massenspektren der Substanzen a) **O** und b) **V** und c) **X** aus *Axinella rugosa*

Verbindungen die Summenformeln $C_{16}H_{25}N$ (**O** und **U**), $C_{16}H_{25}NO$ (**P** und **S**), $C_{16}H_{25}NS$ (**V** und **W**) sowie $C_{20}H_{34}O$ (**X**). Aus diesen Zusammensetzungen lassen sich die funktionellen Gruppen der Substanzen stark eingrenzen sowie die Molekülgrößen der zugrunde liegenden Terpengerüste ableiten. So ergeben sich für **O**, **Q**, **R**, **T**, **U** und **Y** Cyanid- (-CN) oder Isocyanidgruppen (-NC). Die Substanzen **P** und **S** weisen dagegen Cyanat- (-OCN) oder Isocyanatsubstituenten (-NCO) auf, während **V** und **W** Thiocyanat- (-SCN) oder Isothiocyanatfunktionen (-NCS) haben. Die Grundstrukturen von **O-W** sind somit den Sesquiterpenen (C_{15}) zuzuordnen, während **X** und **Y** auf Diterpengerüsten (C_{20}) basieren. Substanzen, deren Summenformeln durch HRMS nicht zu bestimmen waren (**Q**, **R**, **T**, **Y**), wurden auf der Basis ihrer Molekülmassen jeweils einer dieser Gruppen zugeordnet. Da die jeweiligen Substituentenpaare (-CN/-NC, -OCN/-NCO und -SCN/-NCS) in der Summe eine identische elementare Zusammensetzung vorweisen, ist ihre Unterscheidung auf der Grundlage ihrer Masse nicht möglich. Aus zahlreichen Untersuchungen sind besonders Schwämme der Familie Axinellidae als Quellen von Sesquiterpenen mit Isocyanid-, Isocyanat- und Isothiocyanatsubstituenten bekannt (z.B. CAFIERI *et al.*, 1973; CIMINIELLO *et al.*, 1987; CAPON und MACLEOD, 1988). Es ist daher anzunehmen, dass auch die vorliegenden Substanzen **O-W** und **Y** jeweils eine dieser funktionellen Gruppen besitzen. Substanz **X** hat als einzige Verbindung kein Stickstoffatom. Ein vorhandenes Sauerstoffatom lässt jedoch auf die Gegenwart einer Hydroxyl-, Ether- oder Carbonylfunktion schließen. Das Auftreten eines Signals bei $m/z = 272$ ($M^{+} - 18$) im EI-Massenspektrum von **X** zeigt eine Dehydratisierung des Moleküls an. Daher wurde das Vorliegen einer Hydroxylgruppe angenommen. Eine Übersicht der aufgrund dieser Befunde vorgenommenen Zuordnung ist Tabelle 3.10 zu entnehmen.

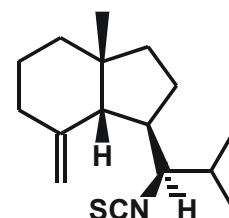
funktionelle Gruppe (R)	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y
	Sesquiterpenoide ($C_{15}H_{25}R$)									Diterpenoide ($C_{20}H_{33}R$)	
-CN oder -NC	•		•	•		•	•				•
-OCN oder -NCO		•			•						
-SCN oder -NCS								•	•		
-OH										•	
Molekülmasse	231	247	231	231	247	231	231	263	263	290	299

Tabelle 3.10 Unterscheidung der Substanzen **O-Y** aus *Axinella rugosa* in Sesqui- und Diterpenoide sowie Zuordnung ihrer funktionellen Gruppen

Durch Vergleiche mit einer MS-Spektrenbibliothek (NIST) zeigt sich für das EI-Massenspektrum von **X** (Abbildung 3.32c) eine starke Übereinstimmung mit dem des weit verbreiteten Naturstoffs Manool (**113**). Weitere Vorschläge zu den Strukturen anderer Terpene dieser Fraktion ergaben sich durch die Recherche in der MS-Spektrenbibliothek nicht. Obwohl insbesondere zahlreiche Sesquiterpene mit den gleichen Funktionalitäten beschrieben wurden, wie sie für die hier vorliegenden Substanzen vermutet werden, stehen ihre Massenspektren nur in wenigen Fällen zur Verfügung. Aus *Phakellia ventilabrum*, einer weiteren Porifere der Familie Axinellidae, die im Rahmen von BOSMAN untersucht wurde, berichtete POSSNER (2005) ebenfalls die Identifikation einiger Sesquiterpene mit Isocyanid-, Isocyanat- und Isothiocyanatgruppe. Vergleiche mit den dort beschriebenen MS-Daten führten zu der Annahme, dass es sich im Falle von Substanz **V** (EIMS siehe Abbildung 3.32b) um das Axisoithiocyanat-1 (**114**) handelt. Vergleiche der Retentionszeiten von **V** mit denen authentischen Referenzmaterials aus *P. ventilabrum* konnten die Identität beider Substanzen bestätigen.



113



114

Eine weitere Trennung der Gesamtextraktfraktion 2 durch präparative Gaschromatographie führte zur Reingewinnung der Substanzen **O** und **X**. An den isolierten Verbindungen wurden anschließend weiterführende Untersuchungen zur Strukturaufklärung vorgenommen.

Zur Bestätigung der mutmaßlichen Isocyanidfunktion von **O** wurde die Substanz einer Infrarotspektroskopie unterzogen. Die infrage kommenden Cyano- und Isocyanogruppen sind durch diese Methode anhand charakteristischer Absorptionen bei $\nu = 2240\text{--}2260\text{ cm}^{-1}$ (-CN) bzw. $\nu = 2110\text{--}2165\text{ cm}^{-1}$ (-NC) eindeutig zu unterscheiden. Das IR-Transmissionsspektrum von **O** (Abbildung 3.33) zeigt im Bereich von etwa $\nu = 2800\text{--}3100\text{ cm}^{-1}$ die verschiedenen $\nu(\text{C-H})$ von Methin-, Methylen- und Methylgruppen sowie $\delta(\text{CH}_2)$ und $\delta(\text{CH}_3)$ bei Wellenzahlen von 1457 cm^{-1} bzw. 1375 cm^{-1} . Interessant ist eine scharfe Absorptionsbande mittlerer Intensität bei $\nu = 3008\text{ cm}^{-1}$, da sie einen Hinweis auf ein weiteres Strukturmerkmal von **O** gibt. Eine schmale Absorptionsbande knapp oberhalb von 3000 cm^{-1} , wie sie im vorliegenden Fall beobachtet wird, rührt von der Valenzschwingung einer C-H-Bindung her, die entweder an einer Doppelbindung lokalisiert ist (Vinyl-CH) oder von einem kleinen (gespannten) Ringgerüst ausgeht (OTTING, 1963). Hinweise auf die funktionelle Gruppe der Substanz sind

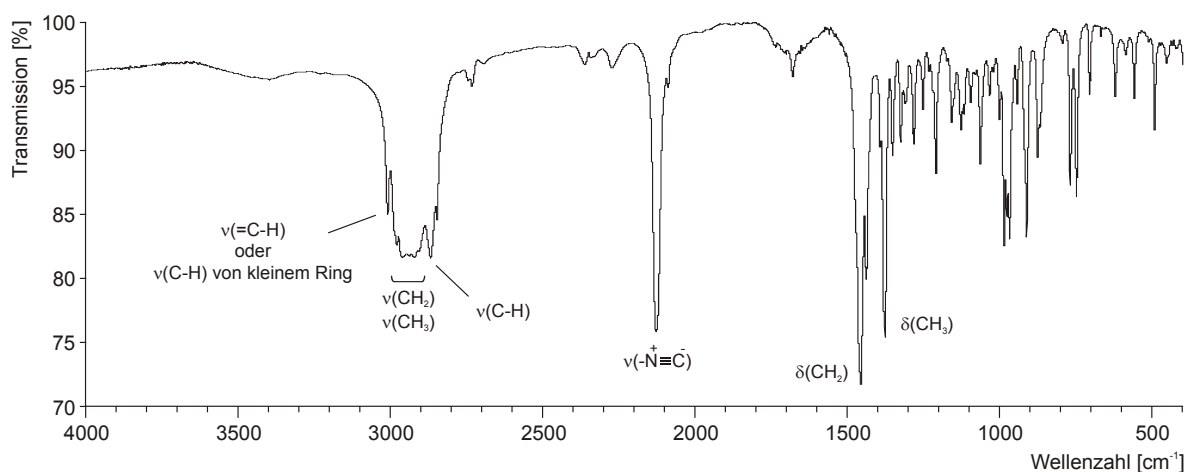


Abbildung 3.33 Infrarot-Transmissionsspektrum der Substanz **O** (KBr-Pressling) aus *Axinella rugosa*

durch das Auftreten eines scharfen und intensiven Signals bei $\nu = 2127 \text{ cm}^{-1}$ gegeben, das der Valenzschwingung einer Isocyanidfunktion zuzuordnen ist.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abbildung 3.34) der Verbindung **O** sind die Signale von 25 Protonen zu erkennen. Sechs Protonen entfallen dabei auf zwei Methylsingulets bei $\delta_{\text{H}} = 0,89 \text{ ppm}$ und $\delta_{\text{H}} = 0,99 \text{ ppm}$. Weitere sechs Protonen sind anhand ihrer beiden Methyl dubletts bei $\delta_{\text{H}} = 0,91 \text{ ppm}$ und $\delta_{\text{H}} = 1,04 \text{ ppm}$ zu identifizieren. Darüber hinaus zeigen sich acht Signale von Methylenprotonen, deren Integrale jeweils einem Proton entsprechen, sowie fünf Signale,

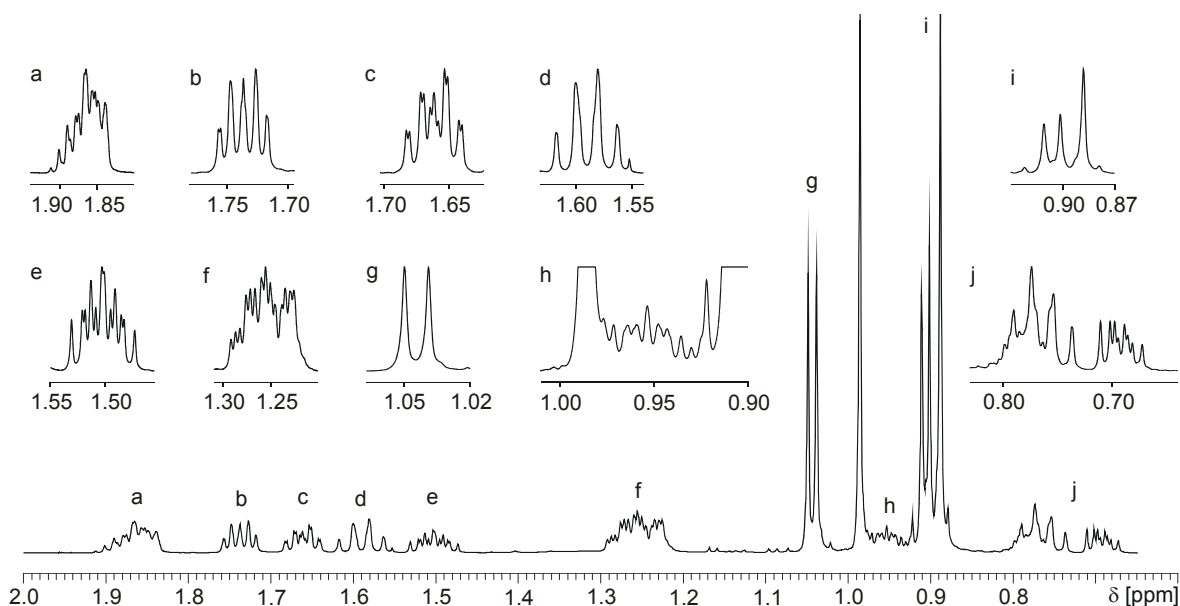


Abbildung 3.34 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Substanz **O** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

die auf Methingruppen zurückzuführen sind. Im ^{13}C -PENDANT (*polarisation enhancement that is nurtured during attached nucleus testing*)-NMR-Spektrum (Anhang, Kapitel 7.4.5, Seite 135) sind neun Methyl- und Methingruppen sowie fünf sekundäre und quartäre Kohlenstoffatome zu erkennen. Ein weiteres quartäres Kohlenstoffatom ist anhand seiner Kopplungen im HMBC-Spektrum (Anhang, Kapitel 7.4.5, Seite 138) bei $\delta_{\text{C}} = 76,1$ ppm zu erkennen. Tabelle 3.11 fasst alle C_1 -Einheiten, die sich aus den NMR-Spektren von **O** ergeben, zusammen. Die dabei festzustellende Differenz eines Stickstoff- und eines Kohlenstoffatoms zu der durch HRMS bestimmten Summenformel von **O** ist auf die funktionelle Gruppe zurückzuführen, deren quartäres Kohlenstoffatom im ^{13}C -PENDANT-NMR-Spektrum nicht beobachtet wurde.

C_1 -Gruppen	C	H
2 x C	2	-
5 x CH	5	5
4 x CH_2	4	8
4 x CH_3	4	12
Σ $\text{C}_{15}\text{H}_{25}$	15	25

Tabelle 3.11 Summierung der nach C_1 -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus den ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- sowie HMBC-Korrelationspektren der Substanz **O** aus *Axinella rugosa*

Das im EIMS von **O** (Abbildung 3.32a) auftretende Molekülion wurde durch die GC/HRMS-Untersuchungen mit einem m/z von 231,1964 (berechnete Masse für $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}^+ = 231,1981$) bestimmt. Die daraus resultierende Summenformel ($\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{N}$) bedingt fünf *DBE*, von denen sich zwei der Isocyanidfunktion zuordnen lassen. Auf das Sesquiterpengerüst der Verbindung entfallen somit noch drei weitere *DBE*. Aus dem Fehlen olefinischer Protonen und Kohlenstoffatome in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren lässt sich einerseits das Vorliegen einer tricyclischen Struktur schließen. Bezug nehmend auf die Beobachtung einer $\nu(\text{C-H})$ -Bande bei $\nu = 3008 \text{ cm}^{-1}$ im IR-Spektrum dieser Substanz ergibt sich andererseits auch ein Hinweis auf eine kleine Ringstruktur im Molekül von **O**. Die zum Hochfeld verschobenen Resonanzen der Methinprotonen bei $\delta_{\text{H}} = 0,69$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 0,89\text{--}0,92$ ppm sowie eines quartären Kohlenstoffatoms bei $\delta_{\text{C}} = 20,2$ ppm unterstützen zusätzlich die Annahme eines gespannten Ringsystems in der Struktur.

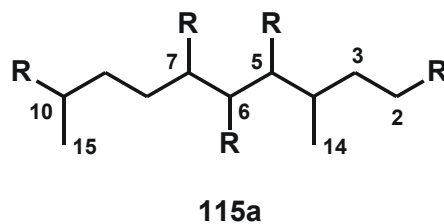
Die chemische Verschiebung des im HMBC identifizierten quartären Kohlenstoffatoms ($\delta_{\text{C}} = 76,1$ ppm) deutet die direkte Nachbarschaft zu der Isocyanogruppe an. Das Fehlen von Signalen im ^1H -NMR-Spektrum, die auf Protonen in geminaler Position zur Isocyanidgruppe hinweisen würden, unterstützt die Bindung der funktionellen Gruppe an ein quartäres Kohlenstoffatom.

C- Pos	O			
	δ_C	δ_H (Multiplizität; $J_{H,H}$)	H,H-COSY ^a	HMBC ^b
1	76,1 ^c	-	-	-
2	39,9	0,92-0,98 (m) 1,83-1,87 (m)	3	1,3,4,5,10
3	32,8	1,47-1,54 (m) 1,63-1,69 (m)	2,4,14	1,2,4,5,14
4	34,8	1,85-1,89 (m)	3,5,14	1,3,5,14
5	47,1	1,25-1,29 (m)	4,6,14	1,3,4,6,10,14
6	24,5	0,89-0,92 (m)	5,7	-
7	27,2	0,69 (ddd; 11,3; 9,1; 6,2)	6,8,12	[6,8] ^d ,12
8	24,6	0,73-0,80 (m) 1,71-1,77 (m)	7,9	6,7,9,10
9	32,6	1,21-1,26 (m) 1,56-1,62 (m)	8,10,15	1,7,8,10,15
10	45,3	0,75-0,81 (m)	9,15	9
11	20,2	-	-	-
12	28,6	0,99 (s)	7,13	6,7,11,13
13	16,0	0,89 (s)	12	6,11
14	18,9	1,04 (d; 7,3)	3,4,5	3,4,5
15	18,3	0,91 (d; 6,7)	9,10	1,9,10
16	-	-	-	-

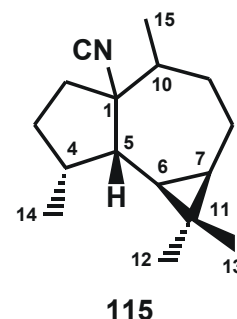
Tabelle 3.12 ¹H-, ¹³C-, H,H-COSY- und HMBC-NMR-Daten des Sesquiterpenisocyanids **O** (in C₆D₆) aus *Axinella rugosa*

- ^a Korrelation von Protonen der linken Spalte zu den angegebenen Protonen
^b Korrelation von Protonen der linken Spalte zu den angegebenen ¹³C-Atomkernen
^c chemische Verschiebung aus HMBC-Spektrum
^d Korrelationen von oder zu einem oder beiden in Klammern genannten Protonen

Das HMQC-Spektrum (siehe Anhang, Kapitel 7.4.5, Seite 136) zeigt die Zuordnung von Protonen zu ihren direkt gebundenen Kohlenstoffatomen an (Tabelle 3.12). Aus den ³J_{H,H}-Kopplungen des H,H-COSY-Spektrums (siehe Tabelle 3.12 und Anhang, Kapitel 7.4.5, Seite 137) folgt die gezeigte Kohlenstoffkette **115a** als Teilstruktur von **O**. Neben der funktionellen Gruppe sind zwei Methylgruppen sowie die zwei quartären Kohlenstoffatome die einzigen verbleibenden Strukturelemente von **O**, die in **115a** nicht enthalten sind. Da die beiden genannten Methylgruppen als Singulets auftreten, müssen sie an ein quartäres Kohlenstoffatom gebunden sein. Aus den heteronuklearen ²J- und ³J-Kopplungen des HMBC-Spektrums (siehe Tabelle 3.12 und Anhang,



Kapitel 7.4.5, Seite 138) geht hervor, dass beide dem Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 20,2$ ppm benachbart sind und dieses mit C-6 und C-7 der Teilstruktur **115a** einen dreigliedrigen Ring bildet. Dieser Befund steht im Einklang mit den zuvor bereits erwähnten Hinweisen auf das Vorliegen eines gespannten Ringsystems unter Beteiligung der Atome C-6, C-7 und C-11. Das zweite quartäre Kohlenstoffatom trägt die funktionelle Gruppe und ist über die drei noch offenen Bindungen mit den Positionen C-2, C-5 und C-10 von **115a** verknüpft. Die daraus resultierende Molekülstruktur wird durch die Kopplungen des HMBC-Spektrums bestätigt. Als Struktur von **O** ergibt sich somit das 1-Isocyanoadromadran (**115**).



Dieses Molekül besitzt insgesamt sechs asymmetrische Kohlenstoffatome, die sich an den Positionen 1, 4–7 und 10 befinden. Die relativen Konfigurationen der Chiralitätszentren an den Positionen C-4, C-5, C-6 und C-7 war dabei auf der Grundlage einiger beobachteten NOE-Kopplungen (Abbildung 3.35) möglich.

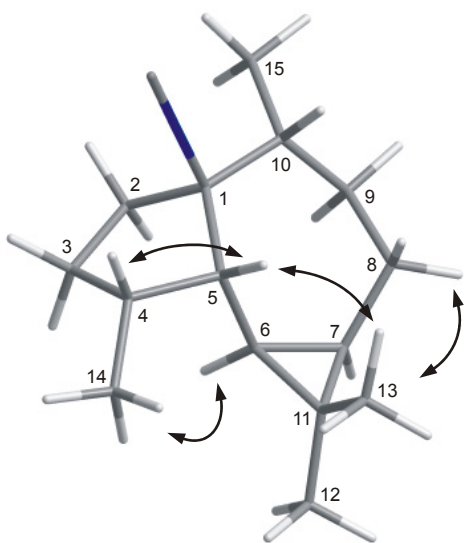


Abbildung 3.35 Stabmodell mit den beobachteten NOE-Kopplungen von **115** aus *Axinella rugosa*

Kopplungen (Abbildung 3.35) möglich. Diese treten zwischen H-4 und H-5 sowie zwischen H-6 und Methylprotonen des C-14 auf, wodurch sich die relativen Konfigurationen an C-4, C-5 und C-6 festlegen lassen. Weiterhin koppeln Methylprotonen des C-13 mit H-5 und H-8. Unter Berücksichtigung der zuvor bestimmten räumlichen Orientierung der Methylgruppe des C-13 ist die Kopplung zwischen den H-13 und H-8 nur durch die in Abbildung 3.35 gezeigte Konfiguration am C-7 zu erklären. Es ergibt sich somit für **115** eine relative Konfiguration $4S^*,5R^*,6S^*,7S^*$. Eine Bestimmung der relativen Konfiguration an den chiralen Zentren C-1 und C-10 war im Rahmen dieser Arbeit nicht ausführbar.

Das ebenfalls als Reinstoff isolierte Diterpenoid **X** zeigt in seinem EIMS (Abbildung 3.32c) bei $m/z = 290$ ein Molekülion von äußerst geringer Intensität. Deutlich hervor tritt dagegen ein Fragmention, das durch eine Wasserabspaltung gebildet wird und durch GC/HRMS mit $m/z = 272,2498$ (berechnete Masse für $C_{20}H_{32}^+ = 272,2498$) bestimmt wurde. Als Summenformel für **X** resultiert daraus $C_{20}H_{34}O$.

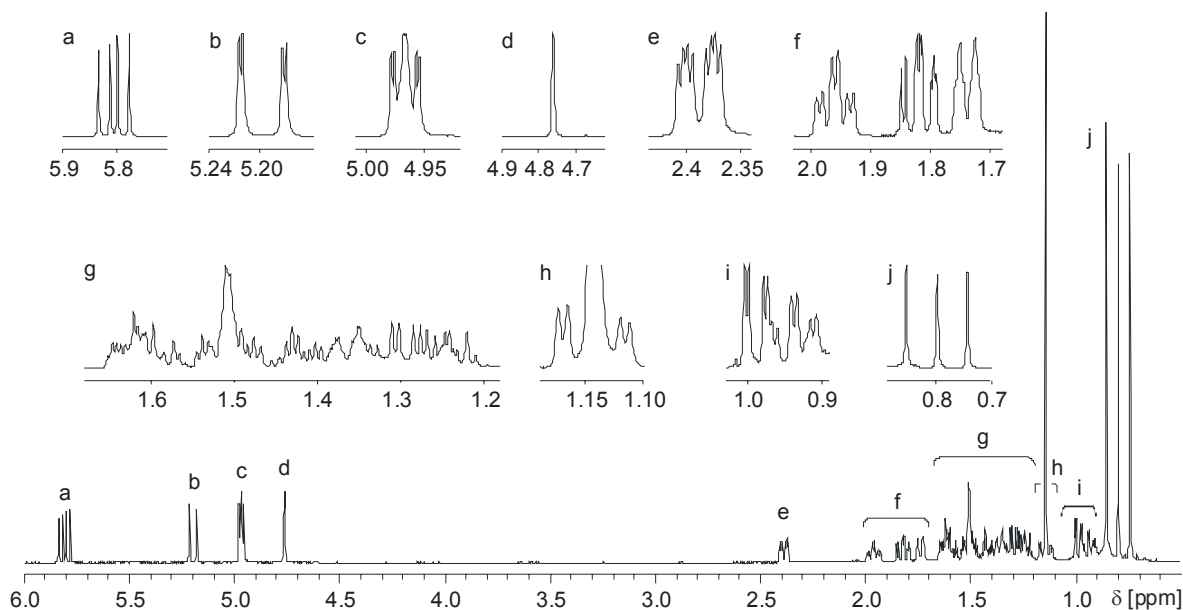


Abbildung 3.36 ^1H -NMR-Spektrum der Substanz **X** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

Das ^1H -NMR-Spektrum (Abbildung 3.36) von **X** zeigt die Signale von 33 Protonen, wobei die von fünf Protonen deutlich zum Tieffeld verschoben sind. Ein Vinylproton tritt bei $\delta_{\text{H}} = 5,81$ ppm auf, während die olefinischen Protonen zweier endständiger Methylengruppen bei $\delta_{\text{H}} = 4,97/5,20$ ppm sowie bei $\delta_{\text{H}} = 4,74\text{--}4,78$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 4,95\text{--}4,99$ ppm erscheinen. Sieben weitere Methylengruppen sind zwischen $\delta_{\text{H}} = 0,90$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 2,42$ ppm zu beobachten. Vier Methylgruppen ($\delta_{\text{H}} = 1,14$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 0,85$ ppm, $\delta_{\text{H}} = 0,80$ ppm und $\delta_{\text{H}} = 0,74$ ppm) sind als Singulets zu sehen, weshalb sie jeweils an quartäre Kohlenstoffatome gebunden sein müssen. Neben dem bereits genannten Methinproton bei $\delta_{\text{H}} = 5,81$ ppm treten zwei weitere bei $\delta_{\text{H}} = 0,96\text{--}1,02$ ppm bzw. $\delta_{\text{H}} = 1,47\text{--}1,58$ ppm auf. Im ^{13}C -PENDANT-NMR-Spektrum (siehe Anhang, Kapitel 7.4.6, Seite 139) zeigen sich die Resonanzen von sieben Methyl- und Methingruppen sowie neun Signale von Methylengruppen. Zwei der sekundären Kohlenstoffatome ($\delta_{\text{C}} = 107,2$ ppm und $\delta_{\text{C}} = 111,3$ ppm) sind an einer Doppelbindung lokalisiert. Signale der quartären Kohlenstoffatome wurden im ^{13}C -PENDANT-NMR-Spektrum nicht beobachtet. Ihre chemischen Verschiebungen wurden daher aus dem HMBC-Spektrum (siehe Anhang, Kapitel 7.4.6, Seite 142) entnommen. Auf diese Weise wurden insgesamt vier quartäre Kohlenstoffatome erfasst. Eines tritt bei $\delta_{\text{C}} = 149,0$ ppm auf, wodurch es einem Kohlenstoffatom an einer Doppelbindung

C_1 -Gruppen	C	H
4 x C	4	–
3 x CH	3	3
9 x CH_2	9	18
4 x CH_3	4	12
Σ $\text{C}_{20}\text{H}_{33}$	20	33

Tabelle 3.13 Summierung der nach C_1 -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus den ^1H -NMR-, ^{13}C -NMR- sowie HMBC-Korrelationspektren der Substanz **X** aus *Axinella rugosa*

C-		X		
Pos	δ_C	δ_H (Multiplizität; $J_{H,H}$)	H,H-COSY ^a	HMBC ^b
1	39,3	0,90-0,98 (m) 1,71-1,77 (m)	2,20	2,3,9,20
2	19,8	1,36-1,45 (m) 1,49-1,54 (m)	1,3	4,10,18
3	42,5	1,10-1,18 (m) 1,33-1,39 (m)	2,19	2,4,18,19
4	40,2 ^c	-	-	-
5	56,0	0,96-1,02 (dd; 12,6; 2,8)	6	4,6,9,19,20
6	24,8	1,23-1,35 (m) 1,60-1,66 (m)	5,7	4,5,7
7	38,8	1,92-2,00 (ddd; 12,9; 12,9; 4,5) 2,36-2,42 (ddd; 12,6; 4,5; 2,4)	6,17	5,6,8,9,17
8	149,0 ^c	-	-	-
9	57,6	1,47-1,58 (m)	11,17	10,11,12,17,20
10	39,8 ^c	-	-	-
11	18,1	1,44-1,49 (m) 1,53-1,60 (m)	9,12	8,9,12,13
12	41,9	1,20-1,26 (m) 1,78-1,86 (m)	11	9,11,13,16
13	73,4 ^c	-	-	-
14	146,0	5,81 (dd; 17,3; 10,7)	15	13,16
15	111,3	4,97 (dd; 10,7; 1,4) 5,20 (dd; 17,3; 1,4)	14	13,14
16	28,3	1,14 (s)	-	11,12,13,14,15
17	107,2	4,74-4,78 (m) 4,95-4,99 (m)	7,9	7,9
18	33,8	0,85 (s)	-	3,5,19
19	21,9	0,80 (s)	3	3,5,18
20	14,7	0,74 (s)	1	5,9,10

Tabelle 3.14 ¹H-, ¹³C-, H,H-COSY- und HMBC-NMR-Daten des Diterpenalkohols X (in C₆D₆) aus *Axinella rugosa*

^a Korrelation von Protonen der linken Spalte zu den angegebenen Protonen

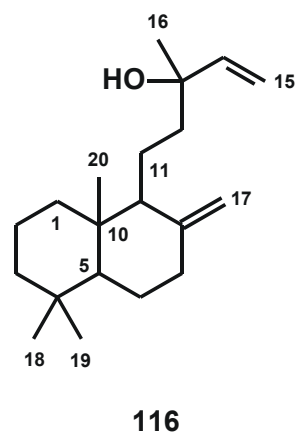
^b Korrelation von Protonen der linken Spalte zu den angegebenen ¹³C-Atomkernen

^c chemische Verschiebung aus HMBC-Spektrum

zugeordnet werden kann. Ein weiteres wurde bei $\delta_C = 73,4$ ppm beobachtet. Seine chemische Verschiebung zeigt an, dass es an das Sauerstoffatom gebunden ist, das aus der Summenformel C₂₀H₃₄O hervorgeht. Die übrigen quartären Kohlenstoffatome sind bei $\delta_C = 39,8$ ppm und $\delta_C = 40,2$ ppm zu finden. Die in den NMR-Spektren identifizierten C₁-Gruppen des Naturstoffes X sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst.

Da neben dem quartären Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 73,4$ ppm keine weiteren Signale auftreten, die auf eine Bindung an Sauerstoff hinweisen, ergibt sich eine Hydroxylgruppe als Strukturelement von **X**. Diese Zuordnung steht im Einklang mit der anhand des EIMS (siehe Abbildung 3.32c, Seite 75) bereits diskutierten Beobachtung einer Wasserabspaltung (vergleiche Seite 76). Das Proton der Alkoholgruppe wurde im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum nicht beobachtet, woraus sich in der Summierung von Tabelle 3.13 im Vergleich zur Summenformel von **X** das Fehlen je eines Sauerstoff- und Wasserstoffatoms ergibt.

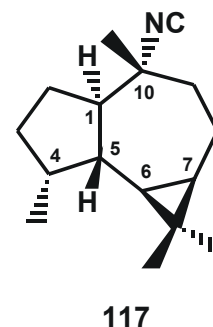
Die Zuordnung der direkten C-H-Konnektivitäten (Tabelle 3.14) wurde auf der Basis des HMQC-Spektrums (siehe Anhang, Kapitel 7.4.6, Seite 140) vorgenommen. Durch die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen des H,H-COSY-Spektrums (siehe Anhang, Kapitel 7.4.6, Seite 141) ließen sich die Konnektivitäten einzelner Molekülregionen bestimmen. Die gesamte Struktur des 8(17),14-Labdadien-13-ols (**116**) ergibt sich unter Berücksichtigung der heteronuklearen Kopplungen des HMBC-Spektrums. Es besitzt, wie schon aufgrund der Vergleiche seines Massenspektrums mit einer Spektrenbibliothek vermutet (vergleiche Seite 77), die Konstitution des Diterpenalkohols Manool (**113**, siehe Seite 77). Angaben zur Stereochemie des isolierten Naturstoffes an den vier chiralen Zentren des Moleküls (C-5, C-9, C-10 und C-13) können anhand der vorliegenden Daten nicht gemacht werden. Es bleibt daher offen, ob **113** und **116** übereinstimmende Konfigurationen besitzen und somit identisch sind.



Diskussion

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 (Seite 15) beschrieben, stellen die Terpene und ihre Derivate eine prominente Naturstoffklasse dar. Wenngleich die meisten dieser Substanzen im terrestrischen Lebensraum auftreten, sind auch marine Vorkommen bekannt. So haben sich beispielsweise unterschiedliche Poriferen der Familie Axinellidae als Quellen diverser Sesquiterpenisocyanide, -isocyanate und -isothiocyanate erwiesen. Auch die in der vorliegenden Studie untersuchte Spezies *Axinella rugosa* gehört diesem Taxon an und hat solche Substanzen in ihrem chemischen Inventar. Die identifizierten Substanzen Axisothiocyanat-1 (**114**) und 1-Isocyanaromadendran (**115**) sind dabei bereits beschriebene Metaboliten von Schwämmen der genannten Familie. Aus *Phakellia ventilabrum*, einer Spezies, die im Zuge des Projektes BOSMAN sowohl am Sula-Rücken als auch im Korsfjord (siehe Kapitel 4.1.1, Seite 88) geborgen werden konnte, isolierte POSSNER (2005) das Axisothiocyanat-1 (**114**). Dieses wurde

bereits 1973 und 1977 jeweils zusammen mit dem analogen Isocyanid als Inhaltsstoff von *Axinella cannabina* beschrieben (CAFIERI *et al.*, 1973; IENGO *et al.*, 1977). In anderen Arbeiten zu dieser Spezies wurde u.a. das Axisonitril-2 (**117**), dem das Kohlenstoffgerüst des Aromadendrans zugrunde liegt, nachgewiesen (FATTORUSSO *et al.*, 1974; CIMINIELLO *et al.*, 1987). Das entsprechende Isocyanid mit inverser Konfiguration an Position 10 wurde als Inhaltsstoff von *Axinella* sp. beschrieben (THOMPSON *et al.*, 1985). Die beiden Substanzen unterscheiden sich von dem im Zuge der vorliegenden Arbeit isolierten Isocyanid **115** nur in der Position der funktionellen Gruppe. Während sich die Isocyanidgruppe von **115** aus *A. rugosa* an Position 1 befindet, sind **117** sowie das genannte Diastereomer am C-10 substituiert. Die relativen Konfigurationen dieser Substanzen an den Positionen 4–7 stimmen jedoch mit denen von **115** überein.

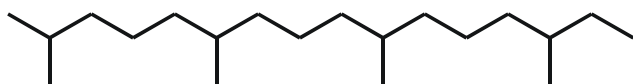


Substanzen mit der zu **115** identischen Konstitution des 1-Isocyanoaromadendrans wurden ebenfalls bereits als Sekundärstoffe von Schwämmen der Familie Axinellidae beschrieben (BRAEKMAN *et al.*, 1987; MAYOL *et al.*, 1987; CAPON und MACLEOD, 1988). Allerdings waren diese jeweils Angehörige der Gattung *Acanthella*, so dass in der vorliegenden Arbeit erstmals von **115** als Metabolit der Gattung *Axinella* berichtet wird. Im Vergleich mit den bisherigen Funden fällt auf, dass auch diese alle dieselbe relative Konfiguration an den Positionen 4–7 aufweisen, wie sie in **115** vorliegt. Bezüglich der Chiralitätszentren C-1 und C-10 werden allerdings in den genannten Publikationen jeweils unterschiedliche Konfigurationen angegeben.

Zur ökologischen Funktion solcher Terpenoide mit Isocyanid-, Isocyanat- und Isothiocyanatfunktionen liegen in der Literatur konkrete Annahmen vor. In einer Studie von 1985 wurden diverse Metaboliten aus Schwämmen u.a. auf ihre Wirkung gegenüber natürlichen Feinden der Produzenten getestet (THOMPSON *et al.*, 1985). Unter den Testsubstanzen befanden sich auch einige Sesquiterpenisocyanide und -isothiocyanate, die aus einer Spezies der Gattung *Axinella* isoliert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen neben antimikrobiellen Eigenschaften auch signifikante Toxizitäten gegenüber einigen Fischarten aufweisen, die im selben Lebensraum beheimatet sind, wie die Produzenten der untersuchten Naturstoffe. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen auf die ökologische Aufgabe dieser Verbindungen. Zum einen decken sich diese Ergebnisse mit der Beobachtung, dass die Produzenten antimikrobieller Naturstoffe nur selten von Überwuchs z.B. durch Rot- oder Grünalgen betroffen sind. Darüber hinaus ist bekannt, dass Schwämme durch vagile Tiere

verletzt werden können, selbst wenn deren Beute nicht der Schwamm, sondern auf dem Schwamm lebende Organismen sind. Substanzen mit schädlichen Wirkungen für Mikroorganismen und Fische nehmen für die Erzeuger dieser Stoffe somit wirkungsvolle Schutz- und Abwehrfunktionen ein. Abseits der Wirkungen, auf der diese Hypothese der ökologischen Bestimmung solcher Substanzen basiert, wurden für einige Terpenoide mit Isocyanid-, Isocyanat- und Isothiocyanatfunktionen weitere interessante Aktivitäten dokumentiert. So wurden beispielsweise für gleichartige Substanzen aus den Schwammespezies *Cymbastela hooperi* und *Acanthella klethra* antiplasmodiale Wirkung berichtet (z.B. ANGERHOFER und PEZZUTO, 1992; KÖNIG *et al.*, 1996; SIMPSON *et al.*, 1997).

Das in *A. rugosa* identifizierte Labdadienol **116** besitzt die Konstitution des in der Natur weit verbreiteten Manools (**113**). Dieses wurde bereits 1935 als Bestandteil eines Kiefernharzes identifiziert (HOSKING und BRANDT, 1935). Später wurde **113** sowie einige seiner Stereoisomere in zahlreichen weiteren Pflanzen gefunden. Darunter befinden sich vorwiegend Blütenpflanzen (z.B. LU *et al.*, 1995; RUSTAIYAN *et al.*, 1995; ULUBELEN *et al.*, 1997; KOBASISY *et al.*, 2002) und Nadelhölzer (z.B. NORIN und WINELL, 1971; SIMPSON und MCQUILKIN, 1976; SU *et al.*, 1994), aber auch andere Gewächse wie etwa Moose (SARITAS *et al.*, 2001). Neben diesen terrestrischen Quellen sind bisher nur äußerst wenige marine Organismen bekannt, in denen **116** als Inhaltsstoff gefunden wurde. Diese sind verschiedene Grünalgen (AWAD, 2002; KAMBOUROVA *et al.*, 2003), eine Korallenart (ROUSSIS *et al.*, 2000) und die Porifere *Aplysilla glacialis* (BOBZIN und FAULKNER, 1992).



118

Strukturell lässt sich **116** vom Phytan (**118**) ableiten (BREITMAIER, 1999). Die enge Verwandtschaft dieser Substanzen ist in Abbildung 3.37 zu erkennen. Durch Ringschlüsse des Phytans zwischen C-6 und C-11 sowie zwischen

C-10 und C-15 wird formal das Labdan (**119**) erhalten. Die Einführung von zwei Doppelbindungen (C-8/C-17 und C-14/C-15) sowie einer Alkoholfunktion an Position 13 führt zur Struktur **116**. Auf der Basis dieser Beziehung werden das Labdan und seine Abkömmlinge als Bicyclophytane aufgefasst. Ein weiteres Phytanderivat konnte im FAME-Extrakt der untersuchten Schwammprobe (Kapitel 3.3.1, Seite 67) identifiziert werden. Als Inhaltsstoff dieses Extraktes tritt neben den FAME auch die Phytansäure (**111**, siehe Seite 71) auf. Der Ursprung von Phytansäure in Schwämmen ist bislang ungeklärt. Einträge von außen

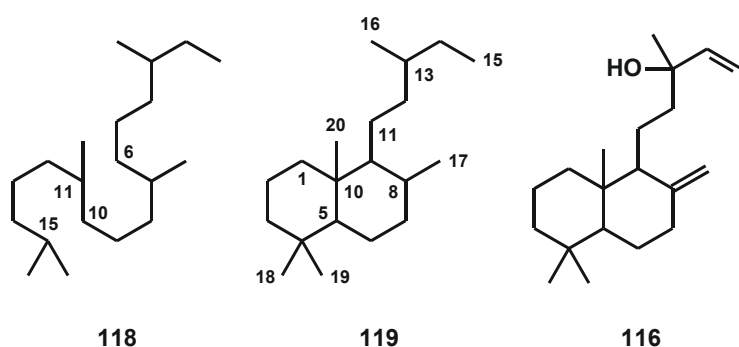


Abbildung 3.37 Vergleichende Ansicht der chemischen Strukturen von Phytan (**118**), Labdan (**119**) sowie von 8(17),14-Labdadien-13-ol (**116**) aus *Axinella rugosa*

kommen dabei ebenso in Betracht wie eine Biosynthese durch assoziierte Archaeen oder den Schwamm selbst. Ebenso ungewiss ist ein möglicher Zusammenhang zwischen der Präsenz der Phytansäure als Lipidbestandteil von *A. rugosa* und dem Auftreten von **116** im selben Schwamm. Über die konkreten

Biosynthesewege einzelner cyclischer Terpene ist bislang verhältnismäßig wenig bekannt (BREITMAIER, 1999). Zumeist wird jedoch die Erzeugung acyclischer Terpene angenommen, die nachfolgend durch Ringschlüsse und Funktionalisierungen in die entsprechenden Endprodukte transformiert werden (BREITMAIER, 1999). Insbesondere vor diesem Hintergrund kann das Auftreten von **116** zumindest als Indiz für die prinzipielle Fähigkeit des Schwammes zur Produktion von Phytansäure gelten.

4 Experimentelles

4.1 Herkunft und Beschreibung der Proben

4.1.1 Herkunft des Probenmaterials

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Probenmaterial wurde während zweier verschiedener Beprobungskampagnen, die im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes BOSMAN durchgeführt wurden, geborgen.

BOSMAN-Fahrt I (Juli 1999)

Die erste Forschungsfahrt des Projektes BOSMAN fand im Juli 1999 mit dem Forschungsschiff POSEIDON (POS 254) zum so genannten Sula-Rücken (siehe Abbildung 4.1) auf dem mittelnorwegischen Tiefschelf statt. Bei 64° N / 8° E, etwa 80 km vor Trondheim (Norwegen) befindet sich in 270 m bis 310 m Tiefe eines der größten bisher bekannten Kaltwasserriffe.

Es erstreckt sich mit einer Breite von 300 m und einer Länge von 13 km in SW-NE-Richtung und ist 10 m bis 35 m hoch (FREIWALD *et al.*, 1999). Das Riff wird in verschiedene Bereiche unterteilt, die aus den Strukturen lebender Korallen, abgestorbener Korallen, sowie aus Bruchstücken abgestorbener Korallen besteht. Maßgeblicher Riffbildner ist dabei die Koralle *Lophelia pertusa*. Aus diesem Ökosystem, das als Lebensraum zahlreicher

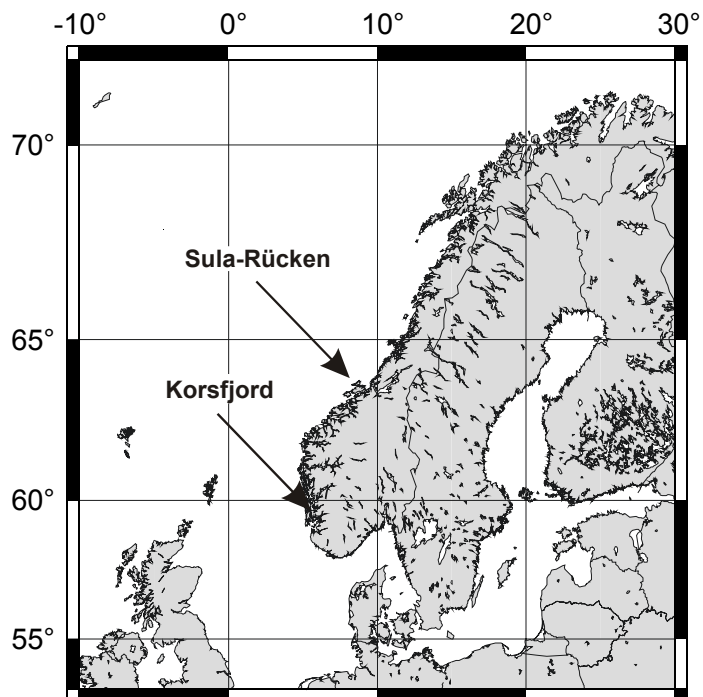


Abbildung 4.1 Entnahmestätten der Probenstücke am Sula-Rücken (*Plakortis simplex*) und im Korsfjord (*Axinella rugosa*) im Rahmen des Projektes BOSMAN

Organismen dient, wurden insgesamt 35 verschiedene Schwammspezies entnommen. Hierzu wurde das mit zwei Personen besetzte und mit einem Greifarm ausgestattete Tauchboot JAGO eingesetzt, welches eine selektive und damit für das Ökosystem äußerst schonende Probennahme ermöglicht.

Marine Biologische Forschungsstation der Universität Bergen (Oktober 2001)

Während eines Aufenthalts an der *Marin-Biologisk Station* der Universität Bergen (Norwegen) im Oktober 2001 konnten mit dem Einsatz des Forschungsschiffs HANS BRATTSTRÖM weitere Organismen geborgen werden. Insgesamt 20 verschiedene Arten von Porifera wurden mit einer Dreedsche an verschiedenen Positionen innerhalb des Korsfjords (siehe Abbildung 4.1) gewonnen.

Die taxonomischen Klassifizierungen aller im Rahmen des Projektes BOSMAN bearbeiteten Poriferen wurden von Prof. Dr. J. Reitner und Dr. F. Hoffmann des Geowissenschaftlichen Zentrums, Abteilung Geobiologie der Universität Göttingen sowie teilweise auch von Dr. H. T. Rapp vom *Institute of Fisheries and Marine Biology, University of Bergen* (Norwegen) sowie von Dr. R. W. M. van Soest vom *Institute for Biodiversity and Ecosystem Dynamics, University of Amsterdam* durchgeführt.

Alle Proben wurden, sofern sie für chemische Arbeiten bestimmt waren, unmittelbar nach ihrer Bergung und Inventarisierung eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von etwa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

4.1.2 Probenbeschreibung

Plakortis simplex

Die Schwammprobe *Plakortis simplex* (POS 31VII99 22J1-10, siehe Abbildung 4.2b) wurde am 31.07.1999 während der Forschungsfahrt des Projekts BOSMAN gewonnen. Der Organismus wurde aus dem Randgebiet des Korallenriffs am Sula-Rücken (64° 04' 50" N / 08° 01' 40" E) in einer Wassertiefe von etwa 280 m bei einer Temperatur von etwa 8 °C geborgen. Das Probenstück bestand aus einem Teil eines abgestorbenen Korallenstocks, das von dem Schwamm überwachsen war. Die Abmessungen dieses Gebildes betragen etwa 10 cm im Durchmesser und 15 cm in der Länge.

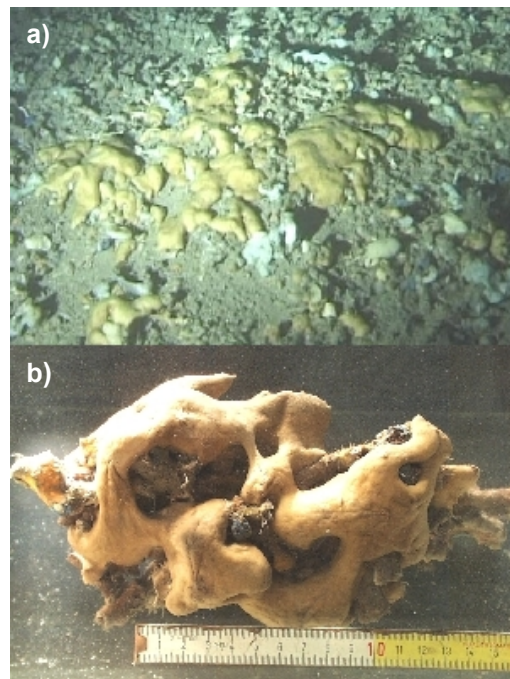


Abbildung 4.2 *Plakortis simplex* a) im Habitat am äußeren Randbereich des Sula-Rückens, b) Probenstück POS 31VII99 22J1-10

Axinella rugosa

Im Rahmen des Aufenthaltes an der *Marin-Biologisk Station* der Universität Bergen (Norwegen) im Oktober 2001 konnten 10 Individuen der Spezies *Axinella rugosa* geborgen und taxonomisch identifiziert werden. Aufgrund der recht geringen Größe und feingliedrigen Wuchsform dieser Spezies war es notwendig, mehrere Organismen, die an verschiedenen Positionen im Korsfjord entnommen wurden, zu einer Gesamtprobe zusammenzufassen. Die untersuchten Individuen dieser Art waren strauchartige Gebilde (siehe Abbildung 4.3) mit einer Größe von wenigen Zentimetern (meist < 10 cm hoch) und einer Masse von jeweils etwa 2–10 g (Nassgewicht).



Abbildung 4.3 Zwei Probenstücke von *Axinella rugosa*

4.2 Analytische Methoden

4.2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

Bei den eingesetzten Chemikalien handelte es sich um kommerziell erworbene Produkte von ALDRICH, FLUKA, MERCK und RIEDEL. Zur Erstellung der Probenextrakte wurden Lösungsmittel des Herstellers MERCK (SupraSolv) verwandt. Als Lösungsmittel sowie als Elutionsmittel bei Trennungen durch LC wurden Produkte der Firmen BAKER, FLUKA, MERCK und ROTH jeweils in den HPLC-Qualitätsstufen „isocratic grade“ oder „gradient grade“ verwandt. Die zur HPLC eingesetzten Elutionsmittel wiesen die Qualitätsstufe „HPLC gradient grade“ auf. Entionisiertes Wasser wurde durch ein Wasserreinigungssystem MILLIPORE Milli-Q aufbereitet.

4.2.2 Manuelle und apparative Techniken

Flüssigkeitschromatographie in Glassäulen (LC)

Für Trennungen von Extrakten durch LC wurde MERCK Kieselgel Si 60 mit Korngrößen von 63 µm bis 200 µm eingesetzt.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Auftrennung von Probengemischen mittels HPLC wurden insgesamt drei verschiedene Systeme eingesetzt.

Ein System bestand aus einer MERCK HITACHI Pumpe L-6200 und einem manuellen Injektionsventil von RHYODYNE. Als UV-Detektor diente ein MILTON-ROY Spectro Monitor 3100.

Ein zweites System bestand aus Elementen der MERCK HITACHI LaChrom-Serie. Im Einzelnen wurden eine Pumpe L-7100, ein automatischer Probengeber L-7200, ein Säulenthermostat L-7350 sowie ein Photodiodenarray-Detektor L-7455 eingesetzt.

Ein weiteres System aus Elementen der Firma SHIMADZU bestand aus einer Pumpe LC-10AT_{vp}, einem Degasser DGU-14A, einer Eluentenmischeinheit FCV-10AL_{vp}, einem automatischen Probengeber SIL-10AF, einem Säulenthermostaten CTO-10AC_{vp},

einem Photodiodenarraydetektor SPD-M10A*vp*, einem Fraktionensammler FRC-10A sowie einem Systemcontroller SCL-10A*vp*.

Als Trennsäulen wurden MERCK LiChroCART Kartuschen mit einer Länge von 250 mm eingesetzt. Für analytische Trennungen und zur Methodenentwicklung wurden Kartuschen mit einem inneren Durchmesser von 4 mm verwendet, während für semipräparative Trennungen Kartuschen mit einem inneren Durchmesser von 10 mm Anwendung fanden. Das verwendete Adsorbens war MERCK LiChrosphere 100 RP-18 mit einer mittleren Korngröße von 10 µm.

Analytische Gaschromatographie

Gaschromatogramme wurden auf verschiedenen Geräten des Herstellers CARLO ERBA (GC 6000 / GC 4100 / HRGC) durchgeführt, die jeweils mit Flammenionisationsdetektoren (FID) ausgestattet waren. Als Trägergas wurde Wasserstoff und als Make-up Gas Stickstoff jeweils in der Reinheit 5.0 eingesetzt. Zur Trennung dienten GC-Kapillarsäulen von J&W des Typs HP-5MS mit einem Innendurchmesser von 320 µm, einer Filmdicke von 0,25 µm und einer Länge von 30 m.

Präparative Gaschromatographie

Zur präparativen Trennung durch Gaschromatographie wurde ein HEWLETT PACKARD 6890 Gaschromatograph kombiniert mit einem GERSTEL Preparative Fraction Collector (PFC) eingesetzt. Parallel zum PFC wurde ein FID als Detektor (Splitverhältnis PFC:FID 50:1) betrieben.

Gaschromatographie mit Infrarotdetektion

Die GC/IR-Messungen wurden mit der Gerätekombination eines HEWLETT PACKARD 6890 Series GC mit einem Infrarotdetektor HEWLETT PACKARD 5965A durchgeführt.

Infrarotspektroskopie

Als Infrarotspektrometer wurde ein THERMO NICOLET Avatar 370 FT-IR Spektrometer eingesetzt.

Massenspektrometrie

GC/MS-Untersuchungen wurden mit einer Kombination eines HEWLETT PACKARD 6890 Gaschromatographen und eines MICROMASS Quattro II Massenspektrometers mit EI/CI-Ionenquelle durchgeführt. Als Trägergas diente Helium der Reinheitsstufe 5.0. Als Trennsäulen wurden GC-Kapillarsäulen des Typs HP-5MS von J&W mit einem Innendurchmesser von 320 μm , einer Filmdicke von 0,25 μm und einer Länge von 30 m eingesetzt. Die Ionisation der Proben wurde durch Elektronenstoß mit 70 eV erreicht.

Zur Messung der Verhältnisse stabiler Kohlenstoffisotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) in organischen Einzelkomponenten wurde eine GC/C/IRMS-Kopplung eines HEWLETT PACKARD 6890 Gaschromatographen mit einem FINNIGAN DeltaPlusXL Massenspektrometer eingesetzt. Die Injektion der Verbindungen erfolgte in ein Kaltaufgabesystem der Firma GERSTEL (KAS4) bei splitloser Betriebsart. Zur Trennung dienten GC-Kapillarsäulen des Typs HP5-Trace von J&W mit einem Innendurchmesser von 250 μm , einer Filmdicke von 0,25 μm und einer Länge von 30 m verwendet. Als Trägergas wurde He in der Reinheitsstufe 5.0 verwendet. Zur Oxidation (zu CO_2 und H_2O) diente ein CuO/Ni/Pt-Ofen bei 940 °C. Eine Nafion-Membran wurde zur Entfernung des Wassers verwendet. Die Ionisation wurde durch Elektronenstoß mit 70 eV erreicht.

Die Isotopendaten werden als Mittelwerte aus jeweils drei Messungen in $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ gegen VPDB (Vienna PeeDee Belemnite Standard) mit einer Standardabweichung von $\pm 0,5 \text{ ‰}$ angegeben.

NMR-Spektroskopie

Zur Aufnahme von NMR-Spektren kamen drei verschiedene Geräte zum Einsatz.

Die Messungen der Substanzen **50** und **51** (cyclische Peroxide aus *Plakortis simplex*) wurden mit einem BRUKER ARX500 bei einer Frequenz von 500 MHz für ^1H -, H,H-COSY-, HSQC- und HMBC- sowie 125 MHz für ^{13}C -NMR-Spektren durchgeführt.

Die ^1H -, H,H-COSY-, HMQC- und HMBC-Messungen der Substanzen **76**, **77** (Tryptophanamide aus *P. simplex*) sowie **116** wurden auf einem BRUKER DRX500 bei 500 MHz aufgenommen. Für die Messung von ^{13}C -PENDANT-NMR-Spektren von

76, 77, 115 und **116** (1-Isocyanoaromadendran und Labdadienol aus *Axinella rugosa*) diente ein BRUKER AMX400 bei 101 MHz.

Die ^1H -, H,H-COSY-, HMQC- und HMBC-Messungen der Substanz **115** (1-Isocyanoaromadendran aus *A. rugosa*) wurden auf einem BRUKER Avance 700 bei 700 MHz aufgenommen.

Alle Messungen wurden bei einer Temperatur von 300 K durchgeführt. Angegeben werden die relativen chemischen Verschiebungen δ in ppm, wobei als interner Standard das jeweilige Lösungsmittel (δ_{H} und δ_{C} nach GOTTLIEB *et al.*, 1997) und teilweise Tetramethylsilan ($\delta_{\text{H}} = 0 / \delta_{\text{C}} = 0$) herangezogen wurde.

4.2.3 Probenbearbeitung

Extraktion und Fraktionierung

Die nass tiefgefrorenen Proben wurden zunächst in möglichst kleine Stücke zerschnitten und dann mit einem Pürrierstab homogenisiert. Anschließend wurde die erhaltene Probenmasse dreimal mit einer Mischung aus MeOH und CH_2Cl_2 (1:1) unter Ultraschall extrahiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugieren abgetrennt und danach die resultierenden Lösungen vereint. Durch Befreien vom Lösungsmittel i.Vak. wurde der organisch lösliche Gesamtextrakt erhalten.

Fraktionierung durch Flüssigkeitschromatographie

Der organisch lösliche Gesamtextrakt wurde je nach erhaltener Menge auf möglichst wenig Kieselgel adsorbiert und auf einer 10 x 1 cm Kieselgelsäule mit Eluenten ansteigender Polarität (Tabelle 4.1) chromatographiert. Auf diese Weise wurden vier Fraktionen gewonnen, die ein unterschiedlich polares Inventar beinhalteten. Dadurch konnte eine weitgehende Trennung der in den Organismen vorliegenden, zum Teil völlig unterschiedlichen Substanzklassen erzielt werden.

Bezeichnung	Eluens	Volumen	Polarität
1	<i>n</i> -Hexan	75 ml	unpolar
2a	Dichlormethan	50 ml	semipolar
2b	Dichlormethan	100 ml	semipolar
3	Essigsäureethylester	75 ml	polar

Tabelle 4.1 Fraktionen von organisch löslichen Gesamtextrakten durch flüssigkeitschromatographische Trennung

Kombinierte Extraktion und Methyltransveresterung estergebundener Lipidbestandteile

1–2 g des nass tiefgefrorenen Probenstückes wurden in möglichst kleine Stücke geschnitten und anschließend mit 2 ml MeOH überschichtet. Nach Zugabe von 200 µl Trimethylchlorsilan wurde 1 h auf 80 °C erhitzt. Die Mischung wurde auf RT abgekühlt, mit jeweils 1 ml H₂O und *n*-Hexan versetzt und 10 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die organische Phase entfernt und noch zweimal mit *n*-Hexan bei Ultraschall extrahiert. Unter einem N₂-Strom wurden die vereinten organischen Phasen vom Lösungsmittel befreit und der trockene Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel mit CH₂Cl₂ gereinigt. Nach Befreien vom Lösungsmittel wurde der resultierende Extrakt der Fettsäuremethylester in wenig *n*-Hexan aufgenommen.

Festphasenextraktion der Fettsäuremethylester aus dem FAME-Extrakt

Der aus der zuvor beschriebenen kombinierten Extraktion und Methyltransveresterung erstellte Extrakt (in *n*-Hexan) wurde unter einem N₂-Strom auf ein möglichst geringes Volumen eingeeengt. Anschließend wurde die Lösung auf eine mit *n*-Hexan konditionierte Aminopropylfestphase (3 ml SUPELCO Supelclean LC-NH₂ SPE-Kartusche mit 500 mg aminopropylmodifiziertem Kieselgel) aufgetragen. Durch aufeinander folgende Elution mit 1 ml *n*-Hexan und 4 ml *n*-Hexan/CH₂Cl₂ (3/1, v/v) entstanden zwei Fraktionen. Fraktion 1 enthielt Kohlenwasserstoffe, während Fraktion 2 die Fettsäuremethylester beinhaltete.

Addition von Dimethyldisulfid an ungesättigte Fettsäuremethylester

200 µl einer Extraktlösung der Fettsäuremethylester (FAME) wurden unter einem N₂-Strom vom Lösungsmittel befreit. Danach wurden 200 µl Dimethyldisulfid und 40 µl einer Lösung von 60 mg Iod in 1 ml Et₂O zugegeben und 48 h auf 50 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurden etwa 300 µl einer wässrigen Natriumthiosulfatlösung (5 %) zugegeben, bis die rötliche Färbung des Iods vollständig beseitigt war. Die Mischung wurde anschließend dreimal mit *n*-Hexan extrahiert und die vereinten organischen Extrakte durch Chromatographie an Kieselgel mit *n*-Hexan gereinigt.

Darstellung von Pyrrolidin-Amiden aus Fettsäuremethylestern

Unter einem N₂-Strom wurden 200 µl einer Extraktlösung der FAME vom Lösungsmittel befreit. Nach Zugabe von 200 µl Pyrrolidin und 20 µl Eisessig wurde die Mischung 1 h auf 100 °C erhitzt. Danach wurde auf RT abgekühlt und durch Zugabe von 1 ml 2 N HCl angesäuert. Die Mischung wurde dreimal mit je 1 ml Et₂O extrahiert und die vereinten organischen Extrakte anschließend dreimal mit je 3 ml H₂O gewaschen. Nach Befreien vom Lösungsmittel unter einem N₂-Strom wurde der trockene Rückstand durch Chromatographie an Kieselgel mit Et₂O/*n*-Hexan (4/1, v/v) gereinigt. Unter einem N₂-Strom wurde vom Lösungsmittel befreit und in wenig *n*-Hexan aufgenommen.

Acetylierung von Lipidalkoholen

200 µl der zu bearbeitenden Extraktlösung wurden unter einem N₂-Strom vom Lösungsmittel befreit und in 1 ml EtOH aufgenommen. Nach Zugabe von 1 ml Pyridin und 800 µl Essigsäureanhydrid wurde die Mischung 12 h bei RT gerührt. Anschließend wurden 2 N HCl zugegeben, bis die Mischung sauer reagierte. Danach wurde dreimal mit jeweils 5 ml *n*-Hexan extrahiert und die vereinten organischen Phasen mit Na₂SO₄ getrocknet.

4.2.4 Bestimmung von Fettsäureverteilungen

Die Aufstellung von Fettsäureverteilungen wurde anhand der Extrakte vorgenommen, die durch die kombinierte Extraktion und Transveresterung mit TMCS (Kapitel 4.2.3, Seite 95) erzeugt wurden. Mit Hilfe von GC/MS-Analysen dieser Extrakte sowie der Lösungen ihrer

durch Derivatisierung erhaltenen Umsetzungsprodukte konnten die einzelnen FAME identifiziert werden.

Interpretation der GC/MS-Messungen von Extrakten underivatisierter FAME

Aus den Signalen der Moleküllionen wurden nach der allgemeinen Summenformel für vollständig gesättigte FAME ($C_{(n+2)}H_{(2n+4)}O_2$) die Anzahl der Kohlenstoffatome berechnet. Ungesättigte FAME weisen eine Molekülmasse auf, die im Vergleich zu ihren gesättigten Homologen um 2 u pro Unsatigung vermindert ist. Ferner erzeugen gesättigte FAME

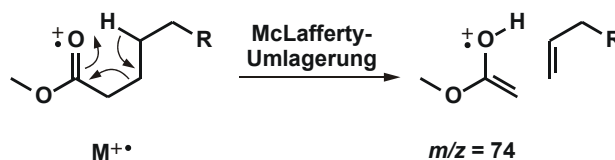


Abbildung 4.4 Bildung des Fragmentions $m/z = 74$ aus den Moleküllionen von Fettsäuremethylester durch McLafferty-Umlagerung (MCLAFFERTY und TUREČEK, 1995).

durch McLafferty-Umlagerung (MCLAFFERTY und TUREČEK, 1995) Fragmentation bei $m/z = 74$ (Abbildung 4.4) als Basispeak sowie ein weiteres intensives Signal bei $m/z = 87$. FAME mit einfacher Unsatigung sind dagegen an den Ionenserien $m/z = 55$ (Basispeak), 69, 83 und 97 zu erkennen. Das Vorliegen von zwei Doppelbindungen äußert sich in den Massenspektren durch das Auftreten der Ionen $m/z = 67$, 81 (Basispeak) und 95. Darüber hinaus treten zweifach ungesättigte FAME bei geringeren Retentionszeiten auf als ihre einfach ungesättigten Homologe. Erst nach den Estern mit einer Doppelbindung eluieren die gesättigten FAME gleicher Kettenlänge. Das relative Retentionsverhalten der Substanzen gibt

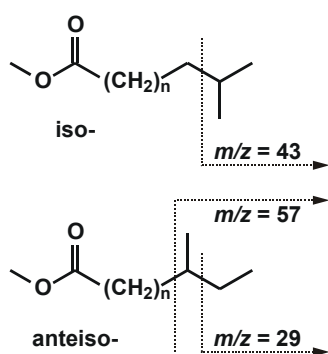


Abbildung 4.5 EIMS Fragmentierungen von *iso*- und *anteiso*-FAME unter Bildung der Ionen $m/z = 43$ bzw. $m/z = 57$ und $m/z = 29$

zudem klare Hinweise auf eine Verzweigung innerhalb der Kohlenstoffketten. So eluieren die Ester von Fettsäuren mit Methylverzweigungen nahe der Carbonylfunktion bei GC-Trennungen vor mittkettig substituierten Analoga. Anschließend treten die endständig verzweigten (*iso*- und *anteiso*-) FAME auf, bevor die linearen Ester eluieren. Als weiteres Indiz für die oft auftretenden *iso*- und *anteiso*-verzweigten FAME wurden wiederum die Massenspektren der Verbindungen hinzugezogen. Methylsubstitutionen in der Kohlenstoffkette haben zur Folge, dass Fragmentionen durch Kettenbrüche direkt neben der Verzweigung (Abbildung 4.5) verstärkt gebildet werden. Dadurch treten in den Massenspektren von *iso*-FAME Fragmente bei $m/z = M-43$ und im Falle von *anteiso*-FAME bei $m/z = M-29$ sowie

$m/z = M-57$ stärker auf, als dies bei FAME mit geraden Kohlenstoffketten beobachtet werden kann.

Für die konkrete Zuordnung einzelner Strukturmerkmale auf der Basis relativer Retentionszeiten wurden die *ECL*-Werte (äquivalente Kettenlängenwerte, *equivalent chain length*) der FAME berechnet (GILLAN, 1983). Als Referenz diente hierbei ein unter identischen Bedingungen analysierter FAME-Standard (SUPELCO 37 Component FAME Mix). Die Kettenlängen der FAME $n-14$, $n-16$, $n-18$, $n-20$ und $n-22$ wurden dabei mit ihren Retentionszeiten korreliert und durch ein Polynom 5. Ordnung mathematisch beschrieben. Die ermittelte Funktion diente nachfolgend zur Ermittlung der *ECL*.

Interpretation der Massenspektren von DMDS-Addukten ungesättigter FAME

Zur Bestimmung der Positionen von Doppelbindungen innerhalb der Kohlenstoffketten von FAME wurde eine Methode nach BUSER *et al.* (1983) und VINCENTI *et al.* (1987) angewandt. Dabei wurden Aliquots der untersuchten Extrakte, wie in Kapitel 4.2.3 (Seite 96) beschrieben, mit DMDS umgesetzt. Dieses Verfahren erwies sich besonders beim Vorliegen einfacher Unsättigungen als äußerst effektiv. Dabei reagierten vorhandene Unsättigungen mit DMDS unter Bildung von Additionsprodukten, deren EIMS-Spektren spezifische Fragmentierungen zwischen den Kohlenstoffatomen der ehemaligen Doppelbindung zeigen (Abbildung 4.6). Die betreffenden Signale der Fragmentionen sind außerordentlich intensiv ($> 50\%$), so dass eine

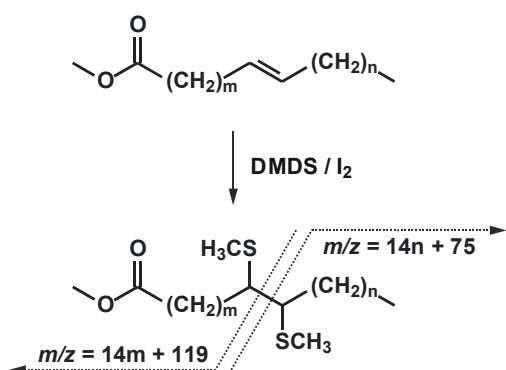


Abbildung 4.6 Addition von Dimethyldisulfid (DMDS) an einen ungesättigten Fettsäuremethylester und schematische Darstellung der MS-Fragmentierung (EIMS) nach BUSER *et al.* (1983)

Identifikation möglich ist. Der Anwendungsbereich dieser Methode wird jedoch durch die deutliche Zunahme der Molekülmassen von 94 u pro Unsättigung sowie der höheren Polarität der gebildeten Produkte gegenüber ungesättigten FAME eingeschränkt. Einfach ungesättigte sowie kurzkettige zweifach ungesättigte FAME können durch diese Methode recht zuverlässig identifiziert werden. Die DMDS-Addukte von langkettigen zweifach ungesättigten Verbindungen werden bei GC/MS-Analysen allerdings oft nicht mehr detektiert, da ihre Flüchtigkeit für die gaschromatographischen Bedingungen nicht mehr ausreicht.

Diesbezüglich eine Ausnahme bilden zweifach ungesättigte FAME, deren Doppelbindungen durch mindestens eine, höchstens aber drei Methylenheiten voneinander getrennt sind. Wie in Abbildung 4.7 gezeigt, reagieren diese mit DMDS unter Bildung cyclischer Thioether. Abhängig vom Abstand der beiden Doppelbindungspositionen zueinander entstehen dabei vier-, fünf- oder sechsgliedrige Heterocyklen. Anstelle einer Addition von je einem Molekül DMDS pro Doppelbindung, wie sie bei mehrfach ungesättigten FAME zu erwarten wäre, kommt es bei dieser Reaktion nur zur Aufnahme eines vollständigen DMDS-Moleküls sowie eines weiteren

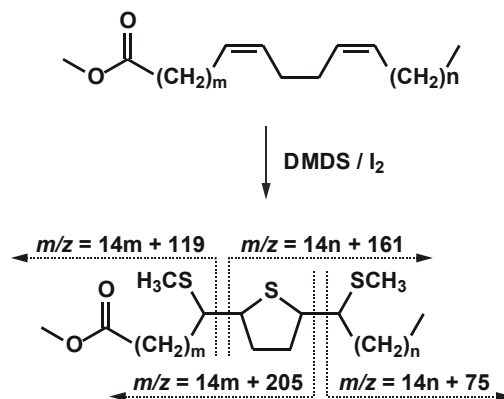


Abbildung 4.7 Reaktion von Dimethyldisulfid (DMDS) mit einem zweifach ungesättigten Fettsäuremethyl-ester unter Bildung eines cyclischen Thioethers und schematische Darstellung seiner MS-Fragmentierung (EIMS) nach VINCENTI *et al.* (1987)

Schwefelatoms. Damit einher geht eine relativ moderate Massenerhöhung von 126 u gegenüber dem jeweiligen Edukt-Ester. Die Detektion durch GC/MS unter den gegebenen Bedingungen ist in diesen Fällen auch für FAME mit längeren Ketten als bei Homologen mit zwei weiter entfernten Doppelbindungen möglich. In den Massenspektren der cyclischen Produkte zeigen sich insgesamt vier aussagekräftige Fragmentationen (Abbildung 4.7), die zur Bestimmung der Doppelbindungspositionen herangezogen werden.

Interpretation der Massenspektren von Pyrrolididen ungesättigter Fettsäuren

Vorwiegend zur Bestimmung von Doppelbindungspositionen innerhalb mehrfach ungesättigter FAME, deren DMDS-Addukte für die durchgeführten GC/MS-Analysen keine ausreichende Flüchtigkeit besitzen, wurde eine

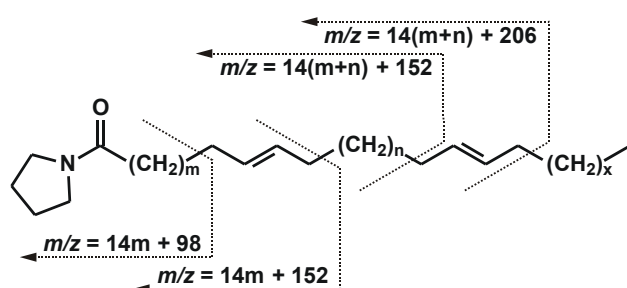


Abbildung 4.8 Hauptfragmentierungen zweifach ungesättigter Fettsäurepyrrolidide

Derivatisierung mit Pyrrolidin nach WALKUP *et al.* (1981) durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.3, Seite 96). Die Molekülmassen der Fettsäurepyrrolidide liegen mit 39 u vergleichsweise geringfügig über denen der analogen FAME. Ihre diagnostischen Hauptfragmentierungen sind in Abbildung 4.8 gezeigt.

4.3 Isolierung von Naturstoffen

4.3.1 Cyclische Peroxide aus *Plakortis simplex*

Aus 10,2 g Schwammgewebe (Nassgewicht) des Probenstückes 22J1-10 wurde ein Gesamtextrakt nach der in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Arbeitsvorschrift (siehe Seite 94) erstellt. Dies ergab 82 mg (0,8 % der Nasseinwaage) organisch löslichen Gesamtextrakt als gelbe ölige Flüssigkeit. Die Fraktion 2b der anschließenden flüssigchromatographischen Trennung wurde i.Vak. vom Lösungsmittel befreit und in etwa 1 ml einer Mischung aus CH₃CN und H₂O (7:3) aufgenommen. Die so erhaltene Probenlösung semipolarer Inhaltsstoffe wurde, auf mehrere Injektionen verteilt, einer weiteren Auftrennung durch Umkehrphasen-HPLC unterzogen. Bei einem Fluss von 4 ml/min diente ein Gemisch von CH₃CN und H₂O (10 min isokratisch bei 70:30 / von 10–30 min auf 100 % CH₃CN) als mobile Phase bei einer C-18 Säule. Es resultierten daraus 1,3 mg der Substanz **50** (0,013 % der Nasseinwaage) sowie 1,1 mg der Substanz **51** (0,011 % der Nasseinwaage).

(3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-ensäuremethylester (50): ¹H- und ¹³C-NMR-Daten siehe Tabelle 3.3, Seite 40 und Tabelle 3.4, Seite 41; EIMS siehe Abbildung 3.9a, Seite 38; HRFABMS, *m/z* 285,2058 [M+H]⁺ (berechnete Masse für C₁₆H₂₉O₄ = 285,2060).

(3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylester (51): ¹H- und ¹³C-NMR-Daten siehe Tabelle 3.3, Seite 40 und Tabelle 3.4, Seite 41; EIMS siehe Abbildung 3.9b, Seite 38; HRFABMS *m/z* 299,2218 [M+H]⁺ (berechnete Masse für C₁₇H₃₁O₄ = 299,2217).

4.3.2 Tryptophanamide aus *Plakortis simplex*

16,85 g des Schwammindividuums (Nassgewicht) vom Probenstück 22J1-10 wurden nach der Arbeitsvorschrift in Kapitel 4.2.3 (Seite 94) extrahiert. Daraus ergaben sich 217 mg (1,3 % der Nasseinwaage) organisch löslicher Gesamtextrakt als gelbe ölige Flüssigkeit. Die aus der flüssigchromatographischen Trennung resultierende Fraktion 3 wurde vom Lösungsmittel befreit, in etwa 3 ml CH₃CN aufgenommen und dreimal mit jeweils 3 ml *n*-Hexan extrahiert. Anschließend wurde die polare Phase i.Vak. vom Lösungsmittel befreit und in etwa 1,5 ml einer Mischung aus MeOH und H₂O (3:1) aufgenommen. Die erhaltene Extraktlösung polarer Inhaltsstoffe wurde durch Umkehrphasen-HPLC mit einer C-18-Säule weiterfraktioniert. Sukzessive Injektionen von Aliquots der Extraktlösung bei einem Fluss von 4 ml/min einer

mobilen Phase aus MeOH und H₂O (75:25, isokratisch) führten zu 1,9 mg der Substanz **76** (0,011 % der Nasseinwaage) sowie 2,7 mg der Substanz **77** (0,016 % der Nasseinwaage).

N-(2,4-Diethyloct-3-enyl)tryptophanmethylester (76): ¹H- und ¹³C-NMR-Daten siehe Tabelle 3.7, Seite 55 und Tabelle 3.8, Seite 56; EIMS siehe Abbildung 3.18a, Seite 52; GC/HRMS, *m/z* 398,2537 M⁺• (berechnete Masse für C₂₄H₃₄N₂O₃⁺• = 398,2564).

N-(2,4-Diethylnon-3-enyl)tryptophanmethylester (77): ¹H- und ¹³C-NMR-Daten siehe Tabelle 3.7, Seite 55 und Tabelle 3.8, Seite 56; EIMS siehe Abbildung 3.18b, Seite 52; GC/HRMS, *m/z* 412,2729 M⁺• (berechnete Masse für C₂₅H₃₆N₂O₃⁺• = 412,2720).

4.3.3 Terpenoide aus *Axinella rugosa*

7 Individuen der Schwammspezies *Axinella rugosa* mit einer Gesamtmasse von 28,8 g (Nassgewicht) wurden nach der Arbeitsvorschrift in Kapitel 4.2.3 (Seite 94) extrahiert. Es resultierten daraus 93,9 mg (0,3 % der Nasseinwaage) organisch löslicher Gesamtextrakt als gelbe ölige Flüssigkeit. Die Fraktionen 2a, 2b und 3 der anschließenden flüssigchromatographischen Trennung wurden vereint und i.Vak. auf ein Volumen von wenigen Millilitern eingengt. Unter einem Stickstoffstrom wurde der Extrakt vom Lösungsmittel befreit und in etwa 4 ml *n*-Hexan aufgenommen. Danach wurde die Lösung durch präparative Gaschromatographie fraktioniert, woraus die Reinsubstanzen **115** und **116** (nicht quantifiziert) hervorgingen.

(4S*,5R*,6S*,7S*)-1-Isocyanoaromadendran (115): ¹H- und ¹³C-NMR-Daten siehe Tabelle 3.12, Seite 80; EIMS siehe Abbildung 3.32a, Seite 75; GC/HRMS, *m/z* 231,1964 M⁺• (berechnete Masse für C₁₆H₂₅N⁺ = 231,1981).

Labda-8(17),13-dien-12-ol (116): ¹H- und ¹³C-NMR-Daten siehe Tabelle 3.14, Seite 83; EIMS siehe Abbildung 3.32c, Seite 75; GC/HRMS, *m/z* 272,2498 [M-H₂O]⁺• (berechnete Masse für C₂₀H₃₂⁺ = 272,2498).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der chemischen Analyse zweier ausgewählter Demospongiae (Kieselschwämme), die im Rahmen des BMBF-Verbundprojektes BOSMAN (Boreale Schwämme als Marine Naturstoffquellen) aus dem Nordatlantik geborgen wurden. Die Spezies *Plakortis simplex* (Ordnung Homosclerophorida, Familie Plakinidae, Schulze, 1880) und *Axinella rugosa* (Ordnung Halichondrida, Familie Axinellidae, Schmidt, 1975) werden dabei im Hinblick auf ihr Inventar an Zellmembranlipiden und Sekundärstoffen untersucht und diskutiert.

Die in den untersuchten Poriferen *P. simplex* und *A. rugosa* nachgewiesenen Primärlipide umfassen verschiedene Fettsäuren mit Kohlenstoffketten ab C₁₄. Neben den unverzweigten und gesättigten Lipiden treten auch methylverzweigte und ungesättigte Komponenten auf. Während die Kettenlängen der in *P. simplex* enthaltenen Fettsäuren dabei bis C₂₁ reichen, weisen die Lipide von *A. rugosa* Molekülgrößen bis C₂₆ auf. Mit Fettsäuren der Kettenlängen C₂₄ bis C₂₆ sowie der Doppelbindungssignatur $\Delta^{5,9}$, enthält der letztgenannte Schwamm typische Lipide der Demospongiae und Hexactinellida. Zudem wurden im selben Kettenlängenbereich bromierte Fettsäuren identifiziert, die ebenfalls an den Positionen 5 und 9 ungesättigt sind. Das Fehlen langkettiger und zweifach ungesättigter Fettsäuren in *P. simplex* weist auf die Sonderstellung der Homosclerophorida innerhalb der Klasse der Demospongiae hin. Anhaltspunkte für eine Verwandtschaft zu den Calcarea, wie sie für diese Ordnung diskutiert wird, ergeben sich aus der gefundenen Fettsäureverteilung nicht. Der Nachweis von zwei mittkettig methylverzweigten und doppelt ungesättigten Fettsäuren (*m*-20 $\Delta^{6,14}$ und *m*-21 $\Delta^{5,9}$) in *P. simplex* ist ein außergewöhnlicher Befund, da ihr natürliches Vorkommen bisher nicht dokumentiert ist.

Weitere Inhaltsstoffe von *P. simplex* sind einige Hopanoide, denen eine Biomarkerfunktion für Bakterien zukommt. Es sind die Verbindungen Neohop-13(18)-en (**43**), Hop-22(29)-en (**44**, Diplopten), Hop-17(21)-en (**45**), 32,35-Anhydrobacteriohopan-32,33,34,35-tetrol (**48**) sowie 17 β (H),21 β (H)-bishomo-Hopansäure (**49**). Die ungewöhnlich hohe Konzentration einiger dieser Hopanoide wurde auf eine hohe Bakteriendichte in *P. simplex* zurückgeführt. Mikrobiologische Untersuchungen dieser Spezies durch Kooperationspartner bestätigen diese Hypothese.

Aus dem organisch löslichen Gesamtextrakt von *A. rugosa* wurde das Axisothiocyanat-1 (**114**) identifiziert, das durch wenige Untersuchungen bereits als Naturstoff anderer Axinellidae bekannt ist. Durch den Einsatz präparativer Gaschromatographie wurden zwei Inhaltstoffe isoliert und anschließend durch ein- und zweidimensionale NMR-Experimente charakterisiert. Ihre Strukturen wurden so als (4*S**,5*R**,6*S**,7*S**)-1-Isocyanoaromadendran (**115**) bzw. Labda-8(17),13-dien-12-ol (**116**) bestimmt. Das natürliche Vorkommen des 1-Isocyanoaromadendrands wurde bisher nur selten und ausschließlich als Metabolit verwandtschaftlich sehr nahe stehender Schwämme dokumentiert. Da die Absolutkonfiguration des Labdadienols **116** nicht bestimmt wurde, bleibt eine Identität mit dem bekannten Naturstoff Manool ungeklärt. Dieses besitzt dieselbe Konstitution wie **116** und wurde ebenso wie einige seiner Stereoisomere bereits in diversen Studien als Metabolit meist terrestrischer Organismen nachgewiesen.

Durch chromatographische Methoden wurden aus dem organisch löslichen Gesamtextrakt von *P. simplex* insgesamt vier Sekundärmetaboliten isoliert. Die Interpretation ein- und zweidimensionaler NMR-Spektren führte zur Identifikation dieser Naturstoffe als (3*R**,6*S**,*Z*)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-ensäuremethylester (**50**), (3*R**,6*S**,*Z*)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylester (**51**), *N*-(2,4-Diethyloct-3-enyl)tryptophanmethylester (**76**) und *N*-(2,4-Diethylnon-3-enyl)tryptophanmethylester (**77**). Wenngleich die cyclischen Peroxide **50** und **51** einer Stoffklasse angehören, die aus zahlreichen Untersuchungen von Schwämmen der Gattung *Plakortis* bekannt ist, wurden die hier identifizierten Substanzen in einer Veröffentlichung zur vorliegenden Studie erstmals als Naturstoffe beschrieben. Bei *In-vitro*-Aktivitätstests mit sechs verschiedenen menschlichen Krebszelllinien erwies sich **51** zudem als antitumoral mit IC_{50} zwischen 7 und 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ein Nachweis des natürlichen Vorkommens der Tryptophanamide **76** und **77** ist bislang in der Literatur nicht zu finden. Vielmehr ist dies der erste Nachweis von Indolalkaloiden in der untersuchten Spezies. Die strukturelle Ähnlichkeit ihrer aliphatischen Säurereste an der Amidfunktion zu den cyclischen Peroxiden **50** und **51** lassen einen biosynthetischen Zusammenhang beider Stoffklassen vermuten. Unterstützt wird diese Annahme durch die Ergebnisse von Analysen der Verhältnisse stabiler Kohlenstoffisotope, die für beide Substanzklassen ähnliche $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ergaben. Ferner wurde gezeigt, dass eine Kettenverlängerung des Säurerestes von **77**, wie sie in der Natur zum Aufbau von Fettsäuren durchgeführt wird, zu einem Zwischenprodukt führen kann, das als plausibler Vorläufer von **50** angesehen wird.

6 Literatur

- Adam K.-P. (1995) Caffeic acid derivatives in fronds of the lady fern (*Athyrium filix-femina*). *Phytochemistry* **40**, 1577-1578.
- Aiello A., Fattorusso E. und Menna M. (1999) Steroids from sponges: Recent reports. *Steroids* **64**, 687-714.
- Althoff K., Schütt C., Steffen R., Batel R. und Müller W.E.G. (1998) Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: Harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar. Biol.* **130**, 529-536.
- Angerhofer C.K. und Pezzuto J.M. (1992) Antimalarial Activity of Sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella klethra*. *J. Nat. Prod.* **55**, 1787-1789.
- Arditti J., Ernst R., Fisch M.H. und Flick B.H. (1972) Ergosterol peroxide from *Rhizoctonia repens*: Composition, conformation, and origin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **22**, 1217-1218.
- Awad N.E. (2002) Volatile constituents, carbohydrate compositions and topical anti-inflammatory of the two green algae *Caulerpa racemosa* (O. Dargent) and *Codium tomentosum* (Stackhouse). *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.* **40**, 233-234, *Chem. Abstr.* **142**:388766.
- Barnathan G., Doumenq P., Njinkoue J.-M., Miralles J., Debitus C., Levi C. und Kornprobst J.-M. (1994) Sponge fatty acids. 3. Occurrence of series of *n*-7 monoenoic and *iso*-5,9 dienoic long-chain fatty acids in the phospholipids of the marine sponge *Cinachyrella* aff. *schulzei* Keller¹. *Lipids* **29**, 297-303.
- Bartik K., Braekmann J.-C., Daloz D., Stoller C., Huyssecom J., Vandevyver G. und Ottinger R. (1987) Topsentins, new toxic bis-indole alkaloids from the marine sponge *Topsentia genitrix*. *Can. J. Chem.* **65**, 2118-2121.
- Bedir E., Calis I., Aquino R., Piacente S. und Pizza C. (1999) Secondary metabolites from the roots of *Astragalus trojanus*. *J. Nat. Prod.* **62**, 563-568.
- Bergmann W. und Burke D.C. (1955) Contributions to the study of marine products. XXXIX. The Nucleosides of Sponges. III Spongothymidine and Spongouridine. *J. Org. Chem.* **20**, 1501-1507.
- Bergmann W. und Burke D.C. (1956) Contributions to the study of marine products. XL. The Nucleosides of sponges. IV. Spongosine. *J. Org. Chem.* **21**, 226-228.
- Bergmann W. und Feeney R.J. (1951) Contributions to the study of marine products. XXXII. The Nucleosides of Sponges. I. *J. Org. Chem.* **16**, 981-987.
- Bergquist P.R., Lawson M.P., Lavis A. und Cambie R.C. (1984) Fatty acid composition and the classification of the porifera. *Biochem. Syst. Ecol.* **12**, 63-84.
- Beyer H. und Walter W. (2004) *Lehrbuch der Organischen Chemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Blumenberg M. (2003) Biomarker aus Kaltwasser- und Tiefseekieselschwämmen. Dissertation, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Universität Hamburg, Hamburg.
- Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. und Prinsep M.R. (2005) Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 15-61.

- Bobzin S.C. und Faulkner D.J. (1992) Chemistry and chemical ecology of the Bahamian sponge *Aplysilla glacialis*. *J. Chem. Ecol.* **18**, 309-332.
- Braekman J.C., Daloz D., De Groote S., Fernandes J.B. und Van Soest R.W.M. (1998) New polyketides from the sponge *Plakortis* sp. *J. Nat. Prod.* **61**, 1038-1042.
- Braekman J.C., Daloz D., Deneubourg F., Huysecom J. und Vandevyver G. (1987) 1-Isocyanoaromadendrane, a new isonitrile sesquiterpene from the sponge *Acanthella acuta*. *Bull. Soc. Chim. Belg.* **96**, 539-543.
- Breitmaier E. (1997) *Alkaloide*. Teubner Verlag, Stuttgart.
- Breitmaier E. (1999) *Terpene*. Teubner Verlag, Stuttgart.
- Burton H.S. und Abraham E.P. (1951) Isolation of antibiotics from a species of *Cephalosporium*. Cephalosporins P₁, P₂, P₃, P₄ and P₅. *Biochem. J.* **50**, 168-174.
- Buser H.R., Arn H., Guerin P. und Rauscher S. (1983) Determination of double bond position in mono-unsaturated acetates by mass spectrometry of dimethyl disulfides adducts. *Anal. Chem.* **55**, 818-822.
- Butler A. und Walker J.V. (1993) Marine Haloperoxidases. *Chem. Rev.* **93**, 1937-1944.
- Cafieri F., Fattorusso E., Magno S., Santacroce C. und Sica D. (1973) Isolation and structure of Axisonitrile-1 and Axisothiocyante-1 two unusual sesquiterpenoids from the marine sponge *Axinella cannabina*. *Tetrahedron* **29**, 4259-4262.
- Cafieri F., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O. und Ianaro A. (1999a) Metabolites from the sponge *Plakortis simplex*. Determination of absolute stereochemistry of plakortin. Isolation and stereostructure of three plakortin related compounds. *Tetrahedron* **55**, 7045-7056.
- Cafieri F., Fattorusso E., Tagliatela-Scafati O., Di Rosa M. und Ianaro A. (1999b) Metabolites from the sponge *Plakortis simplex*. II. Isolation of four bioactive lactone compounds and of a novel related amino acid. *Tetrahedron* **55**, 13831-13840.
- Campagnuolo C., Fattorusso E. und Tagliatela-Scafati O. (2003) Plakohypaphorins A-C, iodine-containing alkaloids from the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. *Eur. J. Org. Chem.*, 284-287.
- Capon R.J. und MacLeod J.K. (1988) New isothiocyante sesquiterpenes from the Australian marine sponge *Acanthella pulcherrima*. *Aust. J. Chem.* **41**, 979-983.
- Carballeira N.M. und Emiliano A. (1993) Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Agelas* sp. *Lipids* **28**, 763-766.
- Carballeira N.M. und Medina J.R. (1994) New fatty acids in the phospholipids of the sea anemone *Stoichactis helianthus*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1688-1695.
- Carballeira N.M. und Negrón V. (1991) Identification and characterization of two new methylcosadienoic acids from *Erylus formosus*. *J. Nat. Prod.* **54**, 305-309.
- Carballeira N.M. und Reyes M. (1995) Identification of a new 6-bromo-5,9-eicosadienoic acid from the anemone *Condylactis gigantea* and the zoanthid *Palythoa caribaeorum*. *J. Nat. Prod.* **58**, 1689-1694.
- Carballeira N.M. und Shalabi F. (1990) Identification of naturally occurring *trans*, *trans* Δ 5,9 fatty acids from the sponge *Plakortis halichondroides*. *Lipids* **25**, 835-840.
- Carballeira N.M. und Shalabi F. (1993) Novel brominated phospholipid fatty acids from the Caribbean sponge *Petrosia* sp. *J. Nat. Prod.* **56**, 739-746.

- Casteel D.A. (1992) Peroxy natural products. *Nat. Prod. Rep.* **9**, 289-312.
- Casteel D.A. (1999) Peroxy natural products. *Nat. Prod. Rep.* **16**, 55-73.
- Chen Y., Killday K.B., McCarthy P.J., Schimoler R., Chilson K., Selitrennikoff C., Pomponi S.A. und Wright A.E. (2001) Three new peroxides from the sponge *Plakinastrella* species. *J. Nat. Prod.* **64**, 262-264.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S. und Mayol L. (1987) New nitrogenous sesquiterpenes based on alloaromadendrane and *epi*-eudesmane skeletons from the marine sponge *Axinella cannabina*. *Can. J. Chem.* **65**, 518-522.
- Compagnone R.S., Piña I.C., Rangel H.R., Dagger F., Suárez A.I., Venkata Rami Reddy M. und Faulkner D.J. (1998) Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospiculatus*. *Tetrahedron* **54**, 3057-3068.
- Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C. und Mangoni A. (2000) The first 12-Methylhopanoid: 12-Methylbacteriohopanetetrol from the marine sponge *Plakortis simplex*. *Tetrahedron* **56**, 3781-3784.
- Costantino V., Fattorusso E., Imperatore C. und Mangoni A. (2001) A biosynthetically significant new bacteriohopanoid present in large amounts in the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. *Tetrahedron* **57**, 4045-4048.
- De Guzman F.S. und Schmitz F.J. (1990) Peroxy aliphatic esters from the sponge *Plakortis lita*. *J. Nat. Prod.* **53**, 926-931.
- Dembitsky V.M., Rezanka T. und Kashin A.G. (1993) Comparative study of the endemic freshwater fauna of Lake Baikal - II. Unusual lipid composition of two sponge species *Baicalospongia bacillifera* and *Baicalospongia intermedia* (Family Lubomirskiidae, Class Demospongiae). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **106B**, 825-831.
- Dengler W.A., Schulte J., Berger D.P., Mertelsmann R. und Fiebig H.H. (1995) Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anti-Cancer Drugs* **6**, 522-532.
- Didyk B.M., Simoneit B.R.T., Brassell S.C. und Eglinton G. (1978) Organic geochemical indicators of palaeoenvironmental conditions of sedimentation. *Nature* **272**, 216-222.
- Djerassi C. und Lam W.-K. (1991) Sponge phospholipids. *Acc. Chem. Res.* **24**, 69-75.
- Djura P. und Faulkner D.J. (1980) Metabolites of the marine sponge *Dercitus* sp. *J. Org. Chem.* **45**, 735-737.
- Erdogan I., Sener B. und Higa T. (2000) Tryptophol, a plant auxin isolated from the marine sponge *Ircinia spinulosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* **28**, 793-794.
- Falbe J. und Regnitz M. (1999) *Römpf Lexikon Chemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Fattorusso E., Magno S., Mayol L., Santacroce C. und Sica D. (1974) Isolation and structure of Axisonitrile-2. *Tetrahedron* **30**, 3911-3913.
- Fattorusso E., Parapini S., Campagnuolo C., Basilico N., Tagliatalata-Scafati O. und Taramelli D. (2002) Activity against *Plasmodium falciparum* of cycloperoxide compounds obtained from the sponge *Plakortis simplex*. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 883-888.
- Faulkner D.J. (2000) Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**, 135-145.
- Fontana A., Ishibashi M., Shigemori H. und Kobayashi J. (1998) New cyclic polyketides from Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. *J. Nat. Prod.* **61**, 1427-1429.

- Francavilla C., Chen W. und Kinder F.R., Jr. (2003) Formal Synthesis of (+)-Discodermolide. *Org. Lett.* **5**, 1233-1236.
- Freiwald A., Wilson J.B. und Henrich R. (1999) Grounding Pleistocene icebergs shape recent deep-water coral reefs. *Sediment. Geol.* **125**, 1-8.
- Garson M.J., Zimmermann M.P., Battershill C.N., Holden J.L. und Murphy P.T. (1994) The distribution of brominated long-chain fatty acids in sponge and symbiont cell types from the tropical marine sponge *Amphimedon terpenensis*. *Lipids* **29**, 509-516.
- Gillan F.T. (1983) Analysis of complex fatty acid methyl ester mixtures on non-polar capillary GC columns. *J. Chromatogr. Sci.* **21**, 293-297.
- Gillan F.T. und Johns R.B. (1980) Input and early diagenesis of chlorophylls in a temperate intertidal sediment. *Mar. Chem.* **9**, 243-253.
- Gochfeld D.J. und Hamann M.T. (2001) Isolation and biological evaluation of Filiformin, Plakortide F, and Plakortone G from the Caribbean sponge *Plakortis* sp. *J. Nat. Prod.* **64**, 1477-1479.
- Golubic S. und Awramik S.M. (1974) Microbial comparison of stromatolite environments: Shark Bay, Persian Gulf and the Bahamas. *Geol. Soc. Am. Ann. Meetings* **6**, 154-155.
- Gottlieb H.E., Kotlyar V. und Nudelman A. (1997) NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **62**, 7512-7515.
- Grell K.G., Gruner H.-E. und Kilian E.F. (1993) Wirbellose Tiere. In: Gruner H.-E. (Hrsg.), *Lehrbuch der speziellen Zoologie 1, Einführung Protozoa, Placozoa, Porifera*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Gunasekera S.P., Gunasekera M., Gunawardana G.P., McCarthy P. und Burres N. (1990a) Two new bioactive cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. *J. Nat. Prod.* **53**, 669-674.
- Gunasekera S.P., Gunasekera M., Longley R.E. und Schulte G.K. (1990b) Discodermolide: A new bioactive polyhydroxylated Lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J. Org. Chem.* **55**, 4912-4915.
- Gunasekera S.P., Gunasekera M., Longley R.E. und Schulte G.K. (1991) Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated Lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta* [Erratum to document cited in Chem. Abstr. 113(9):75187b]. *J. Org. Chem.* **56**, 1346.
- Habermehl G. und Hammann P.E. (2003) *Naturstoffchemie*. Springer-Verlag, Berlin.
- Hahn S., Stoilov I.L., Tam Ha T.B., Raederstorff D., Doss G.A., Li H.-T. und Djerassi C. (1988) Biosynthetic studies of marine lipids. 17. The course of chain elongation and desaturation in long-chain fatty acids of marine sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 8117-8124.
- Harrison B. und Crews P. (1998) Cyclic polyketide peroxides and acyclic diol analogues from the sponge *Plakortis lita*. *J. Nat. Prod.* **61**, 1033-1037.
- Higgs M.D. und Faulkner D.J. (1978) Plakortin, an antibiotic from *Plakortis halichondrioides*. *J. Org. Chem.* **43**, 3454-3457.
- Hirsh S., Carmely S. und Kashman Y. (1987) Brominated unsaturated acids from the marine sponge *Xestospongia* sp. *Tetrahedron* **43**, 3257-3261.
- Hoffmann F., Larsen O., Thiel V., Rapp H.T., Pape T., Michaelis W. und Reitner J. (2005) An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiol. J.* **22**, 1-10.

- Hollenbeak K.H. und Schmitz F.J. (1977) Aplysinsin: antineoplastische Tryptophan-Derivat aus dem Meeres Schwamm *Verongia spengelii*. *Lloydia* **40**, 479-81.
- Holzwarth M., Trendel J.-M., Albrecht P., Maier A. und Michaelis W. (2005) Cyclische Peroxide aus dem Meeres Schwamm *Plakortis simplex*. *J. Nat. Prod.* **68**, 759-761.
- Hooper J.N.A. und van Soest R.W.M. (2002) *Systema Porifera - a guide to the classification of sponges*. Kluwer Academic, New York.
- Hosking J.R. und Brandt C.W. (1935) Über den Diterpenalkohol aus dem Holz von *Dacrydium biforme*. *Ber.* **68B**, 1311-1316.
- Iengo A., Mayol L. und Santacroce C. (1977) Minor Sesquiterpene-Derivate aus dem Schwamm *Axinella cannabina*. *Experientia* **33**, 11-12.
- Inman W.D., O'Neill-Johnson M. und Crews P. (1990) Neue Meeres Schwamm Alkaloide. 1. Plakinidine A und B, anthelmintisch aktive Alkaloide aus einem *Plakortis* Schwamm. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 1-4.
- Kambourova R., Bankova V. und Petkov G. (2003) Volatile Substanzen des grünen Algen *Scenedesmus incrassatulus*. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **58**, 187-190.
- Kasai T., Larsen P.O. und Sorensen H. (1978) Freie Aminosäuren und γ -Glutamylpeptide in Fagaceae. *Phytochemistry* **17**, 1911-1915.
- Kates M., Joo C.N., Palameta B. und Shier T. (1967) Absolute stereochemische Konfiguration von Phytanyl (Dihydrophytyl) Gruppen in Lipiden von *Halobacterium cutirubrum*. *Biochemistry* **6**, 3329-3338.
- Kazlauskas R., Murphy P.T., Quinn R.J. und Wells R.J. (1977) Aplysinsin, ein neues Tryptophan-Derivat aus einem Schwamm. *Tetrahedron Lett.* **18**, 61-64.
- Kerr R.G. und Baker B. (1991) Meeres Sterole. *Nat. Prod. Rep.* **8**, 465-497.
- Kobaisy M., Tellez M.R., Dayan F.E. und Duke S.O. (2002) Phytotoxizität und volatile Bestandteile aus den Blättern von *Callicarpa japonica* Thunb. *Phytochemistry* **61**, 37-40.
- Kondo K., Nishi J., Ishibashi M. und Kobayashi J. (1994) Zwei neue Tryptophan-Derivierte Alkaloide aus dem Okinawan Meeres Schwamm *Aplysina* sp. *J. Nat. Prod.* **57**, 1008-1011.
- König G.M., Wright A.D. und Angerhofer C.K. (1996) Neue potente Antimalaria Diterpene Isocyanate, Isothiocyanate und Isonitrile aus dem tropischen Meeres Schwamm *Cymbastella hooperi*. *J. Org. Chem.* **61**, 3259-3267.
- Lam W.-K., Hahn S., Ayanoglu E. und Djerassi C. (1989) Phospholipidstudien von Meeresorganismen. 22. Struktur und Biosynthese einer neuen bromierten Fettsäure aus einem Hymeniacidonid Schwamm. *J. Org. Chem.* **54**, 3428-3432.
- Langworthy T.A. (1985) Lipide von Archaeobakterien. In: Woese C.R. und Wolfe R.S. (Hrsg.), *The bacteria. A treatise on structure and function VIII*, pp. 459-497. Academic Press, New York.
- Lehmann und Hillmer G. (1997) *Wirbellose Tiere der Vorzeit - Leitfaden der systematischen Paläontologie der Invertebraten*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Li C.-W., Chen J.-Y. und Hua T.-E. (1998) Präkambrische Schwämme mit zellulären Strukturen. *Science* **279**, 879-306.
- Li H., Matsunaga S. und Fusetani N. (1994) Bioaktive Meeres Metaboliten. Teil 52. Einfache antifungale Metaboliten aus einem Meeres Schwamm, *Halichondria* sp. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **107B**, 261-264.

- Li Y., Ishibashi M., Sasaki T. und Kobayashi J. (1995) New bromine-containing unsaturated fatty acid derivatives from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *J. Chem. Res. (S)*, 126-127.
- Lidgren G. und Bohlin L. (1986) Studies of Swedish marine organisms VII. A novel biologically active indole alkaloid from the sponge *Geodia baretii*. *Tetrahedron Lett.* **27**, 3283-3284.
- Lieberknecht A. und Griesser A. (1987) What is the structure of baretin? Novel synthesis of unsaturated diketopiperazines. *Tetrahedron Lett.* **28**, 4275-4278.
- Litchfield C., Greenberg A.J., Noto G. und Morales R.W. (1976) Unusually high levels of C₂₄-C₃₀ fatty acids in sponges of the class demospongiae. *Lipids* **11**, 567-571.
- Lu T., Vargas D., Franzblau S.G. und Fischer N.H. (1995) Diterpenes from *Solidago rugosa*. *Phytochemistry* **38**, 451-456.
- Mackenzie A.S., Patience R.L., Yon D.A. und Maxwell J.R. (1982) The effect of maturation on the configuration of acyclic isoprenoid acids in sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta* **46**, 783-792.
- MacLean I., Eglinton G., Douraghi-Zadeh K., Ackman R.G. und Hooper S.N. (1968) Correlation of stereoisomerism in present day and geologically ancient isoprenoid fatty acids. *Nature* **218**, 1019-1024.
- Maier G. und Fiebig H.H. (2002) Absence of tumor growth stimulation in a panel of 16 human tumor cell lines by mistletoe extracts *in vitro*. *Anti-Cancer Drugs* **13**, 373-379.
- Margot H., Acebal C., Toril E., Amils R. und Fernandez Puentes J.L. (2002) Consistent association of crenarchaeal Archaea with sponges of the genus *Axinella*. *Mar. Biol.* **140**, 739-745.
- Markova T.A. und Gamburg K.Z. (1995) Endogenous *N*-malonyltryptophan in plant cell suspension cultures. *Russ. J. Plant Physiol.* **42**, 106-111; *Chem. Abstr.* **122**:156398.
- Markova T.A. und Gamburg K.Z. (1997) Stereoconfiguration of endogenous *N*-malonyltryptophan in plants. *Plant Science* **122**, 119-124.
- Mayol L., Piccialli V. und Sica D. (1987) Nitrogenous sesquiterpenes from the marine sponge *Acanthella acuta*: Three new isocyanide-isothiocyanate pairs. *Tetrahedron* **43**, 5381-5388.
- McLafferty F.W. und Tureček F. (1995) *Interpretation von Massenspektren*. Spektrum Verlag, Heidelberg.
- Möhn E. (1984) *System und Phylogenie der Lebewesen*. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart.
- Morishita H., Takai Y., Yamada H., Fukuda F., Sawada M., Iwahashi H. und Kido R. (1987) Caffeyltryptophan from green robusta coffee beans. *Phytochemistry* **26**, 1195-1196.
- Morris S.A. und Andersen R.J. (1990) Brominated *bis*(indole) alkaloids from the marine sponge *Hexadella* sp. *Tetrahedron* **46**, 715-720.
- Murata M., Okada H. und Homma S. (1995) Hydroxycinnamic acid derivatives and *p*-coumaroyl-(L)-tryptophan, a novel hydroxycinnamic acid derivative, from coffee beans. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **59**, 1887-1890.
- Murayama T., Ohizumi Y., Nakamura H., Sasaki T. und Kobayashi J. (1989) Plakorin, a potent Ca²⁺-ATPase activator from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. *Experientia* **45**, 898-899.

- Mycke B., Narjes F. und Michaelis W. (1987) Bacteriohopanetetrol from chemical degradation of an oil shale kerogen. *Nature* **326**, 179-181.
- Nakatani S., Yamamoto Y., Hayashi M., Komiyama K. und Ishibashi M. (2004) Cycloanthranilylproline-derived constituents from a myxomycete *Fuligo candida*. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 368-370.
- Newman D.J. und Cragg G.M. (2004) Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.* **67**, 1216-1238.
- Norin T. und Winell B. (1971) Diterpenoids of cones from two *Cedrus* species. *Phytochemistry* **10**, 2818-2821.
- Nuhn P. (1997) *Naturstoffchemie*. S. Hirzel Verlag, Stuttgart.
- Okada H., Murata M., Ohyazu K. und Homma S. (1997) Distinction between arabica and rubusta coffee beans by hydroxycinnamic acid derivatives, especially by p-coumaroyltryptophan. *Food Sci. Technol. Int.* **3**, 205-209.
- Otting W. (1963) *Spektrale Zuordnungstafel der Infrarot-Absorptionsbanden*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ourisson G. und Albrecht P. (1992) Hopanoids. 1. Geohopanoids: the most abundant natural products on earth? *Acc. Chem. Res.* **25**, 398-402.
- Ourisson G., Albrecht P. und Rohmer M. (1979) The hopanoids. Palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products. *Pure Appl. Chem.* **51**, 709-729.
- Ourisson G. und Rohmer M. (1992) Hopanoids. 2. Biohopanoids: a novel class of bacterial lipids. *Acc. Chem. Res.* **25**, 403-408.
- Pape T. (2004) Lipidbiomarker schwammassoziiierter Bakterien und Archaeen. Dissertation, *Institut für Biogeochemie und Meereschemie*, Universität Hamburg, Hamburg.
- Patil A.D., Freyer A.J., Bean M.F., Carte B.K., Westley J.W., Johnson R.K. und Lahouratate P. (1996a) The plakortones, novel bicyclic lactones from the sponge *Plakortis halichondrioides*: Activators of cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase. *Tetrahedron* **52**, 377-394.
- Patil A.D., Freyer A.J., Carte B., Johnson R.K. und Lahouratate P. (1996b) Plakortides, novel cyclic peroxides from the sponge *Plakortis halichondrioides*: Activators of cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase. *J. Nat. Prod.* **59**, 219-223.
- Pettit G.R., Herald C.L., Doubek D.L. und Herald D.L. (1982) Isolation and Structure of Bryostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6846-6848.
- Pettit G.R., Nogawa T., Knight J.C., Doubek D.L. und Hooper J.N.A. (2004) Antineoplastic agents. 535.¹ Isolation and structure of Plakorstatins 1 and 2 from the Indo-Pacific sponge *Plakortis nigra*. *J. Nat. Prod.* **67**, 1611-1613.
- Piel J., Hui D., Wen G., Butzke D., Platzer M., Fusetani N. und Matsunaga S. (2004) Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16222-16227.
- Possner S. (2005) Isolierung und Strukturaufklärung neuer Naturstoffe aus marinen Invertebraten. Dissertation, *Institut für Organische Chemie*, Universität Hamburg, Hamburg.

- Preston C.M., Wu K.Y., Molinski T.F. und DeLong E.F. (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbosium* gen. nov., sp. nov. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6241-6246.
- Quinn R.J. und Tucker D.J. (1985) A brominated bisacetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Tetrahedron Lett.* **26**, 1671-1672.
- Quinn R.J. und Tucker D.J. (1991) Further acetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J. Nat. Prod.* **54**, 290-294.
- Raverty W.D., Thomson R.H. und King T.J. (1977) Metabolites from the sponge *Pachymatisma johnstoni*; L-6-Bromohypaphorine, a new amino-acid (and its crystal structure). *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1204-1211.
- Reitner J. und Mehl D. (1996) Monophyly of the porifera. *Verh. naturwiss. Ver. Hamburg (NF)* **36**, 5-32.
- Roussis V., Vagias C., Tsitsimpikou C. und N. D. (2000) Chemical variability of the volatile metabolites from the Caribbean corals of the genus *Gorgonia*. *Z. Naturforsch., C: J. Biosci.* **55**, 431-441.
- Rustaiyan A., Samadzadeh M., Habibi Z. und Jakupovic J. (1995) Two diterpenes with rearranged abietane skeletons from *Zhumeria majdae*. *Phytochemistry* **39**, 163-165.
- Sakemi S., Higa T., Anthoni U. und Christophersen C. (1987) Antitumor cyclic peroxides from the sponge *Plakortis lita*. *Tetrahedron* **43**, 263-268.
- Sandler J.S., Colin P.L., Hooper J.N.A. und Faulkner D.J. (2002) Cytotoxic β -Carbolines and cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis nigra*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1258-1261.
- Saritas Y., Sonwa M.M., Iznaguen H., König W.A., Muhle H. und Mues R. (2001) Volatile constituents in mosses (Musci). *Phytochemistry* **57**, 443-457.
- Schmitz F.J. und Gopichand Y. (1978) (7E,13 ξ ,15Z)-14,16-Dibromo-7,13,15-hexadecatrien-5-ynoic acid. A novel dibromo acetylenic acid from the marine sponge *Xestospongia muta*. *Tetrahedron Lett.*, 3637-40.
- Simpson J.S., Garson M.J., Hooper J.N.A., Cline E.I. und Angerhofer C.K. (1997) Terpene metabolites from the tropical marine sponge *Axinyssa* sp. nov. *Aust. J. Chem.* **50**, 1123-1127.
- Simpson R.F. und McQuilkin R.M. (1976) Terpenes of the bark oil of *Pinus radiata*. *Phytochemistry* **15**, 328-329.
- Sjögren M., Göransson U., Johnson A.-L., Dahlström M., Andersson R., Bergmann J., Jonsson P.R. und Bohlin L. (2004) Antifouling activity of brominated cyclopeptides from the marine sponge *Geodia barretti*. *J. Nat. Prod.* **67**, 368-372.
- Sölter S., Dieckmann R., Blumenberg M. und Francke W. (2002) Baretin, revisited? *Tetrahedron Lett.* **43**, 3385-3386.
- Staunton J. und Weissman K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millenium review. *Nat. Prod. Rep.* **18**, 380-410.
- Staunton J. und Wilkinson B. (1998) The biosynthesis of aliphatic polyketides, *Top. Curr. Chem.* **195**, pp. 49-90. Springer-Verlag, Berlin.
- Stierle D.B. und Faulkner D.J. (1980) Metabolites of three marine sponges of the genus *Plakortis*. *J. Org. Chem.* **45**, 3396-3401.

- Su W.-C., Fang J.-M. und Cheng Y.-S. (1994) Labdanes from *Cryptomeria japonica*. *Phytochemistry* **37**, 1109-1114.
- Takeuchi S., Ishibashi M. und Kobayashi J. (1994) Plakoridine A, a new tyramine-containing pyrrolidine alkaloid from the Okinawan marine sponge *Plakortis* sp. *J. Org. Chem.* **59**, 3712-3713.
- Thiel V., Blumenberg M., Hefter J., Pape T., Pomponi S.A., Reed J., Reitner J., Wörheide G. und Michaelis W. (2002) A chemical view of the most ancient metazoa - biomarker chemotaxonomy of hexactinellid sponges. *Naturwissenschaften* **89**, 60-66.
- Thompson J.E., Walker R.P. und Faulkner D.J. (1985) Screening and bioassays for biologically-active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA. *Mar. Biol.* **88**, 11-21.
- Ulubelen A., Topcu G. und C.B. J. (1997) Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. *J. Nat. Prod.* **60**, 1275-1280.
- van Soest R.W.M. (1996) Porifera. In: Westheide W. und Rieger R. (Hrsg.), *Spezielle Zoologie 1, Einzeller und Wirbellose Tiere*, pp. 98-119. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Varoglu M., Peters B.M. und Crews P. (1995) The structures and cytotoxic properties of polyketide peroxides from a *Plakortis* sponge. *J. Nat. Prod.* **58**, 27-36.
- Vincenti M., Guglielmetti G., Cassani G. und Tonini C. (1987) Determination of double bond position in diunsaturated compounds by mass spectrometry of dimethyl disulfide derivatives. *Anal. Chem.* **59**, 694-699.
- Walkup R.D., Jamieson G.C., Ratcliff M.R. und Djerassi C. (1981) Phospholipid studies of marine organisms: 2. Phospholipids, phospholipid-bound fatty acids and free sterols of the sponge *Aplysina fistularis* (Pallas) forma *fulva* (Pallas) (= *Verongia thiona*). Isolation and structure elucidation of unprecedented branched fatty acids. *Lipids* **16**, 631-646.
- Wells R.J. (1976) A novel peroxyketal from a sponge. *Tetrahedron Lett.* **17**, 2637-2638.
- West R.R., Mayne C.L., Ireland C.M., Brinen L.S. und Clardy J. (1990) Plakinidines: Cytotoxic alkaloid pigments from the fijian sponge *Plakortis* sp. *Tetrahedron Lett.* **31**, 3271-3274.
- White R.H. und Hager L.P. (1977) Occurrence of fatty acid chlorohydrins in jellyfish lipids. *Biochemistry* **16**, 4944-4948.
- Wijekoon W.M.D., Ayanoglu E. und Djerassi C. (1984) Phospholipid studies of marine organisms 9. New brominated demospongiac acids from the phospholipids of two *Petrosia* species. *Tetrahedron Lett.* **25**, 3285-3288.
- Woese C.R., Kandler O. und Wheelis M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.

7 Anhang

7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1.1 Abbildungen

Abbildung 2.1 Unterteilung des gesamten Lebens in drei Domänen nach WOESE <i>et al.</i> (1990).....	9
Abbildung 2.2 Phylogenetische Zugehörigkeit der Porifera im Stammbaum der Eukarya (vereinfacht)....	9
Abbildung 2.3 Systematik des Stammes der Porifera nach HOOPER und VAN SOEST, (2002)	11
Abbildung 2.4 Biosyntheschema zur Bildung von Geranylpyrophosphat (16) aus (<i>R</i>)-Mevalonsäure- diphosphat (13) über die aktiven Zwischenprodukte Isopent-3-enylpyrophosphat (14) und γ,γ -Dimethylallylpyrophosphat (15)	16
Abbildung 2.5 Biosyntheschema des Initialschrittes einer Polyketidsynthese durch Bildung der Di- ketideinheit Acetessigsäure-Coenzym A (25) aus Acetyl-Coenzym A (10) und Malonyl-Coen- zym A (24)	17
Abbildung 2.6 Biosyntheschema des Shikimisäurewegs zur Bildung der Shikimisäure (11) aus Phosphoenolpyruvat (26) und Erythrose-4-phosphat (27) über das Intermediat 5-Dehydrochina- säure (28).	20
Abbildung 2.7 Stark vereinfachtes Biosyntheschema zur enzymatischen Bildung von Indol (31) und der Aminosäure Tryptophan (32) über Chorisminsäure (29) und Anthranilsäure (30) sowie zur Bildung der Aminosäuren Tyrosin (34) und Phenylalanin (35) über die Prephenensäure (33)	21
Abbildung 3.1 GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes von <i>Plakortis simplex</i> [GC-Tempe- raturprogramm: 80 °C (3min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	26
Abbildung 3.2 Vergrößerter Ausschnitt aus dem GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extrak- tes aus <i>Plakortis simplex</i> [GC-Temperaturprogramm: 80°C (3min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C] ..	27
Abbildung 3.3 Infrarot-Transmissionsspektren der Fettsäuremethylester a) (<i>Z</i>)- <i>n</i> -16 Δ^9 (Standard), b) (<i>E</i>)- <i>n</i> -16 Δ^9 (Standard) und c) <i>m</i> -21 $\Delta^{5,9}$ aus <i>Plakortis simplex</i>	30
Abbildung 3.4 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 1 (Kohlenwasserstoffe) aus <i>Plakortis</i> <i>simplex</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	32
Abbildung 3.5 EI-Massenspektren von a) Neohop-13(18)-en (43), b) Hop-22(29)-en (44 , Diplopten) und c) Hop-17(21)-en (45) aus <i>Plakortis simplex</i>	33
Abbildung 3.6 DAPI-Färbung von Bakterien (blau) im Gewebe einer Porifere der Spezies <i>Plakortis</i> <i>simplex</i> (Bildmaterial: TP2, AG Prof. Dr. J. Reitner, Universität Göttingen).....	34
Abbildung 3.7 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 2a (semipolare Substanzen) aus <i>Plakortis</i> <i>simplex</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	36
Abbildung 3.8 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 2b (semipolare Substanzen) aus <i>Plakortis</i> <i>simplex</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	37
Abbildung 3.9 EI-Massenspektren der isolierten Substanzen a) D und b) E aus <i>Plakortis simplex</i>	38
Abbildung 3.10 ¹ H-NMR-Spektrum der Substanz D (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	38
Abbildung 3.11 Vorgeschlagenes Fragmentierungsschema (EIMS) der Substanzen 50 und 51 aus <i>Plakortis simplex</i>	42

Abbildung 3.12 Resonanzstabilisierung der hypothetischen Struktur des Fragmentions $m/z = 139$ im EIMS der Substanzen 50 und 51 aus <i>Plakortis simplex</i>	43
Abbildung 3.13 Transformation des Peroxids 63 zu dem Furanderivat 64 (COMPAGNONE <i>et al.</i> , 1998)....	47
Abbildung 3.14 Vorgeschlagene biosynthetische Beziehung zwischen dem hypothetischen Vorläufer 66 und dem Plakortin (62) sowie dem Keton 65 aus <i>Plakortis simplex</i>	48
Abbildung 3.15 Biosynthetische Beziehung der hypothetischen Vorläufer 67 und 68 , den theoretischen Metaboliten 69 und 70 sowie den identifizierten Peroxiden 50 und 51 aus <i>Plakortis simplex</i> ..	48
Abbildung 3.16 Isotopenverhältnisse $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$ vs. VPDB [$\% \pm 0,5$]; Mittelwerte aus drei Messungen) einiger Fettsäuren als Methylester sowie der Peroxide 50 und 51 aus <i>Plakortis simplex</i>	49
Abbildung 3.17 GC/MS Chromatogramm (TIC) der Fraktion 3 (polare Substanzen) aus <i>Plakortis simplex</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	51
Abbildung 3.18 EI-Massenspektren der isolierten Substanzen a) K und b) M aus <i>Plakortis simplex</i>	52
Abbildung 3.19 Bildung der Fragmentionen $m/z = 130$ und $m/z = 201$ aus Amiden von Tryptophanmethylestern	52
Abbildung 3.20 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der isolierten Substanz K (in CD_3CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	53
Abbildung 3.21 Vorgeschlagene Bildungsmechanismen des Fragmentions $m/z = 130$ der Substanzen 76 und 77 aus <i>Plakortis simplex</i>	57
Abbildung 3.22 Vorgeschlagener Bildungsmechanismus und Resonanzstabilisierung des Fragmentions $m/z = 201$ der Substanzen 76 und 77 aus <i>Plakortis simplex</i>	58
Abbildung 3.23 Erklärungen für die im EIMS beobachteten Fragmente der Substanzen 76 und 77 aus <i>Plakortis simplex</i>	58
Abbildung 3.24 schematische Darstellung formaler Prozesse und Zwischenprodukte bei der C_2 -Kettenverlängerung bei der Biosynthese von Fettsäuren	64
Abbildung 3.25 Schematische Darstellung eines möglichen Bildungsweges der Carbonsäure 107 durch Kettenverlängerung der Carbonsäure 106	64
Abbildung 3.26 Vermuteter Zusammenhang zwischen den Biosynthesewegen des Tryptophanamids 77 und dem cyclischen Peroxid 50 aus <i>Plakortis simplex</i>	65
Abbildung 3.27 GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes von <i>Axinella rugosa</i> [GC-Temperaturprogramm: 80°C (3°C isotherm), 4°C/min bis 310°C]	67
Abbildung 3.28 EIMS-Fragmentierung von Δ^5 -FAME-Pyrrolididen mit 6-Brom Substitution	68
Abbildung 3.29 Vergrößerter Ausschnitt aus dem GC/MS-Chromatogramm (TIC) des FAME-Extraktes aus <i>Axinella rugosa</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 °C isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	68
Abbildung 3.30 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 1 (Kohlenwasserstoffe) aus <i>Axinella rugosa</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (10 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	73
Abbildung 3.31 GC/MS-Chromatogramm (TIC) der Fraktion 2/3 (semipolare und polare Substanzen) aus <i>Axinella rugosa</i> [GC-Temperaturprogramm: 80 °C (3 min isotherm), 4 °C/min bis 310 °C]	74
Abbildung 3.32 EI-Massenspektren der Substanzen a) O und b) V und c) X aus <i>Axinella rugosa</i>	75
Abbildung 3.33 Infrarot-Transmissionsspektrum der Substanz O (KBr-Pressling) aus <i>Axinella rugosa</i> ...	78
Abbildung 3.34 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Substanz O (in C_6D_6) aus <i>Axinella rugosa</i>	78
Abbildung 3.35 Stabmodell mit den beobachteten NOE-Kopplungen von 115 aus <i>Axinella rugosa</i>	81
Abbildung 3.36 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Substanz X (in C_6D_6) aus <i>Axinella rugosa</i>	82
Abbildung 3.37 Vergleichende Ansicht der chemischen Strukturen von Phytan (118), Labdan (119) sowie von 8(17),14-Labdadien-13-ol (116) aus <i>Axinella rugosa</i>	87

Abbildung 4.1 Entnahmestätten der Probenstücke am Sula-Rücken (<i>Plakortis simplex</i>) und im Korsfjord (<i>Axinella rugosa</i>) im Rahmen des Projektes BOSMAN	88
Abbildung 4.2 <i>Plakortis simplex</i> a) im Habitat am äußeren Randbereich des Sula-Rückens b) Probenstück POS 31VII99 22J1-10.....	90
Abbildung 4.3 Zwei Probenstücke von <i>Axinella rugosa</i>	90
Abbildung 4.4 Bildung des Fragmentions $m/z = 74$ aus den Molekülionen von Fettsäuremethylester durch McLafferty-Umlagerung (MCLAFFERTY und TUREČEK, 1995).....	97
Abbildung 4.5 EIMS Fragmentierungen von <i>iso</i> - und <i>anteiso</i> -FAME unter Bildung der Ionen $m/z = 43$ bzw. $m/z = 57$ und $m/z = 29$	97
Abbildung 4.6 Addition von Dimethyldisulfid (DMDS) an einen ungesättigten Fettsäuremethylester und schematische Darstellung der MS-Fragmentierung (EIMS) nach BUSER <i>et al.</i> (1983).....	98
Abbildung 4.7 Reaktion von Dimethyldisulfid (DMDS) mit einem zweifach ungesättigten Fettsäuremethylester unter Bildung eines cyclischen Thioethers und schematische Darstellung seiner MS-Fragmentierung (EIMS) nach VINCENTI <i>et al.</i> (1987)	99
Abbildung 4.8 Hauptfragmentierungen zweifach ungesättigter Fettsäurepyrrolidide	99
Abbildung 7.1 IR-Transmissionsspektrum des <i>cis</i> -(Z)-16 Δ^9 -FAME-Standards	119
Abbildung 7.2 IR-Transmissionsspektrum des <i>trans</i> -(E)-16 Δ^9 -FAME-Standards	119
Abbildung 7.3 IR-Transmissionsspektrum des <i>cis</i> -(Z)-18 Δ^{11} -FAME-Standards.....	119
Abbildung 7.4 IR-Transmissionsspektrum des <i>trans</i> -(E)-18 Δ^{11} -FAME-Standards.....	119
Abbildung 7.5 IR-Transmissionsspektrum des (6Z,14Z)- <i>m</i> -20 $\Delta^{6,14}$ -FAME aus <i>Plakortis simplex</i>	119
Abbildung 7.6 IR-Transmissionsspektrum des (6Z,14Z)- <i>m</i> -21 $\Delta^{5,9}$ -FAME aus <i>Plakortis simplex</i>	119
Abbildung 7.7 ¹³ C-NMR-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	120
Abbildung 7.8 HSQC-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	121
Abbildung 7.9 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	122
Abbildung 7.10 HMBC-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	123
Abbildung 7.11 ¹ H-NMR-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	124
Abbildung 7.12 ¹³ C-NMR-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	124
Abbildung 7.13 HSQC-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	125
Abbildung 7.14 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	126
Abbildung 7.15 HMBC-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	127
Abbildung 7.16 HMQC-Spektrum der Substanz 76 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	128
Abbildung 7.17 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 76 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	129
Abbildung 7.18 HMBC-Spektrum der Substanz 76 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	130
Abbildung 7.19 ¹ H-NMR-Spektrum der Substanz 77 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	131
Abbildung 7.20 HMQC-Spektrum der Substanz 77 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	132
Abbildung 7.21 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 77 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	133
Abbildung 7.22 HMBC-COSY-Spektrum der Substanz 77 (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	134
Abbildung 7.23 ¹³ C-PENDANT-NMR-Spektrum der Substanz 115 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	135
Abbildung 7.24 HMQC-Spektrum der Substanz 115 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	136
Abbildung 7.25 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 115 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	137

Abbildung 7.26	HMBC-Spektrum der Substanz 115 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	138
Abbildung 7.27	¹³ C-PENDANT-NMR-Spektrum der Substanz 116 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	139
Abbildung 7.28	HMQC-Spektrum der Substanz 116 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	140
Abbildung 7.29	H,H-COSY-C-Spektrum der Substanz 116 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	141
Abbildung 7.30	HMBC-Spektrum der Substanz 116 (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	142

7.1.2 Tabellen

Tabelle 1.1	Einige herausragende Ereignisse in der Geschichte der Naturstoffchemie (NUHN, 1997; HABERMEHL und HAMMANN, 2003)	2
Tabelle 3.1	Übersicht der im FAME-Extrakt von <i>Plakortis simplex</i> nachgewiesenen FAME.....	28
Tabelle 3.2	Summierung der nach C ₁ -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus den ¹ H-NMR-, ¹³ C-NMR- und DEPT-Spektren der Substanz D aus <i>Plakortis simplex</i>	39
Tabelle 3.3	¹ H- und ¹³ C-NMR-Daten der Substanzen D und E (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	40
Tabelle 3.4	H,H-COSY- und HMBC-Kopplungen der Substanzen D und E (in CDCl ₃) aus <i>Plakortis simplex</i>	41
Tabelle 3.5	<i>In-vitro</i> -Aktivitäten von 50 und 51 gegenüber menschlichen Tumorzelllinien in Monolayer-Assays (Oncotest GmbH, Freiburg)	44
Tabelle 3.6	Summierung der nach C ₁ - und N ₁ -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoffatome aus dem ¹ H-NMR-Spektrum sowie den Korrelationsspektren HMQC und HMBC von K aus <i>Plakortis simplex</i>	54
Tabelle 3.7	¹ H- und ¹³ C-NMR-Daten von Tryptophanamid K und M (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i> ..	55
Tabelle 3.8	H,H-COSY- und HMBC-Kopplungen der Substanzen K und M (in CD ₃ CN) aus <i>Plakortis simplex</i>	56
Tabelle 3.9	Übersicht der in <i>Axinella rugosa</i> enthaltenen Fettsäuren.....	69
Tabelle 3.10	Unterscheidung der Substanzen O-Y aus <i>Axinella rugosa</i> in Sesqui- und Diterpenoide sowie Zuordnung ihrer funktionellen Gruppen.....	76
Tabelle 3.11	Summierung der nach C ₁ -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus den ¹ H-NMR-, ¹³ C-NMR- sowie HMBC-Korrelationsspektren der Substanz O aus <i>Axinella rugosa</i>	79
Tabelle 3.12	¹ H-, ¹³ C-, H,H-COSY und HMBC-NMR-Daten des Sesquiterpenisocyanids O (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	80
Tabelle 3.13	Summierung der nach C ₁ -Gruppen unterschiedenen Kohlenstoff- und Wasserstoffatome aus den ¹ H-NMR-, ¹³ C-NMR- sowie HMBC-Korrelationsspektren der Substanz X aus <i>Axinella rugosa</i>	82
Tabelle 3.14	¹ H-, ¹³ C-, H,H-COSY und HMBC-NMR-Daten des Diterpenalkohols X (in C ₆ D ₆) aus <i>Axinella rugosa</i>	83
Tabelle 4.1	Fraktionen von organisch löslichen Gesamtextrakten durch flüssigkeitschromato- graphische Trennung.....	95
Tabelle 7.1	ECL-Werte und relative Mengenanteile der Lipidbestandteile im FAME-Extrakt von <i>Plakortis simplex</i> (Bestimmung und Quantifizierung anhand ihrer Methylester).....	117
Tabelle 7.2	ECL-Werte und relative Mengenanteile der Lipidbestandteile im FAME-Extrakt von <i>Axinella rugosa</i> (Bestimmung und Quantifizierung anhand ihrer Methylester).....	118

7.2 Relative Mengenanteile und ECL-Werte von Lipiden

7.2.1 Membranlipide von *Plakortis simplex*

Fettsäure	ECL	Anteil [%]	Fettsäure	ECL	Anteil [%]
14 <i>n</i> -	14,00	1,3	18 <i>m</i> -	17,41	0,6
15 <i>m</i> -	14,49	1,5	<i>i</i> -	17,63	0,8
<i>i</i> -	14,65	4,5	<i>ai</i> -	17,71	0,6
<i>ai</i> -	14,72	2,8	Δ^5	17,78	2,5
<i>n</i> -	15,01	0,7	<i>n</i> -	18,00	2,7
16 <i>v</i> -	15,10	0,6	19 <i>m</i> - Δ^5	18,09	4,5
<i>i</i> -	15,63	0,6	<i>m</i> -	18,41	15,7
Δ^5	15,79	0,9	<i>i</i> -	18,63	1,0
Δ^9	15,82	5,9	<i>ai</i> -	18,72	2,6
Δ^{11}	15,92	3,3	<i>n</i> -	19,00	Spuren
<i>n</i> -	16,01	3,5	20 <i>m</i> - $\Delta^{6,14}$	19,52	13,5
17 <i>m</i> - Δ^9	16,38	4,1	<i>n</i> -	20,00	0,1
<i>m</i> -	16,43	9,1	21 <i>m</i> - $\Delta^{5,9}$	20,16	12,2
<i>i</i> -	16,63	1,5	<i>m</i> -	20,43	0,7
<i>ai</i> -	16,71	1,9	<i>n</i> -	21,00	Spuren
<i>n</i> -	17,00	0,3			

Tabelle 7.1 ECL-Werte und relative Mengenanteile der Lipidbestandteile im FAME-Extrakt von *Plakortis simplex* (Bestimmung und Quantifizierung anhand ihrer Methyl-ester)

Fettsäuren sind nach den Anzahlen ihrer C-Atome und den nachfolgenden aufgeführten Modifikationen benannt

n- unverzweigte Fettsäure

i- *iso*-verzweigte Fettsäure (ω 2-methylverzweigt)

ai- *anteiso*- verzweigte Fettsäure (ω 3-methylverzweigt)

m-/*v*- mittkettig bzw. nahe der Carbonylfunktion verzweigte Fettsäure

Δ^a Fettsäure mit Unsatigungen an den Positionen a

7.2.2 Membranlipide von *Axinella rugosa*

Fettsäure	ECL	Anteil [%]	Fettsäure	ECL	Anteil [%]
14 <i>n</i> -	14,00	0,40%	20 <i>ai</i> -	19,72	0,62%
15 Δ^4	14,30	0,55%	Δ^{13}	19,79	1,55%
Δ^7	14,35	0,41%	Δ^{15}	19,90	0,74%
Δ^9	14,57	2,32%	<i>n</i> -	20,00	1,07%
<i>i</i> -	14,63	0,50%	21 <i>m</i> -	20,42	1,04%
<i>ai</i> -	14,70	0,09%	<i>i</i> -	20,63	1,08%
<i>n</i> -	15,00	0,38%	<i>ai</i> -	20,73	1,17%
16 <i>i</i> -	15,63	0,65%	<i>n</i> -	21,00	0,12%
<i>ai</i> -	15,71	0,37%	22 Δ^5	21,74	0,55%
<i>n</i> -	16,00	0,60%	Δ^{15}	21,81	3,04%
17 <i>i</i> -	16,63	0,74%	<i>n</i> -	22,00	0,48%
<i>ai</i> -	16,71	0,34%	23 <i>m</i> -	22,38	0,47%
<i>n</i> -	17,00	0,36%	<i>n</i> -	23,00	0,39%
18 <i>i</i> -	17,58	0,23%	24 $\Delta^{5,9}$	23,55	4,95%
P	17,68	4,29%	Δ^{15}	23,74	1,49%
18 <i>ai</i> -	17,71	0,39%	<i>n</i> -	24,00	0,80%
Δ^{11}	17,78	1,76%	25 $\Delta^{5,9}$	24,56	7,61%
<i>n</i> -	18,00	0,73%	<i>n</i> -	25,00	0,16%
19 <i>i</i> -	18,58	0,62%	26 Br- $\Delta^{5,9}$	25,57	1,32%
<i>ai</i> -	18,72	0,27%	24 Br- $\Delta^{5,9}$	26,11	2,43%
<i>n</i> -	19,00	0,30%	25 Br- $\Delta^{5,9}$	27,16	15,83%
20 <i>m</i> -	19,58	0,54%	26 Br- $\Delta^{5,9}$	28,21	35,23%
<i>i</i> -	19,63	1,04%			

Tabelle 7.2 ECL-Werte und relative Mengenanteile der Lipidbestandteile im FAME-Extrakt von *Axinella rugosa* (Bestimmung und Quantifizierung anhand ihrer Methyl-ester)

Fettsäuren sind nach den Anzahlen ihrer C-Atome und den nachfolgenden aufgeführten Modifikationen benannt

- n*- unverzweigter FAME
- i*- *iso*-verzweigter FAME (ω 2-methylverzweigt)
- ai*- *anteiso*- verzweigter FAME (ω 3-methylverzweigt)
- m*- mittkettig verzweigter FAME
- Δ^a FAME mit Unsättigungen an den Positionen a
- Br- bromierte Fettsäure
- P Phytansäure (3,7,11,15-Tetramethylhexadecansäuremethylester)

7.3 IR-Transmissionsspektren

7.3.1 Standards

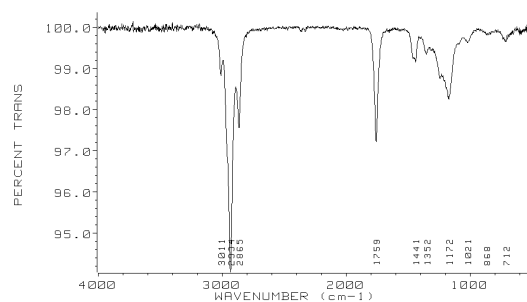


Abbildung 7.1 IR-Transmissionsspektrum des *cis*-(Z)-16 Δ^9 -FAME-Standards

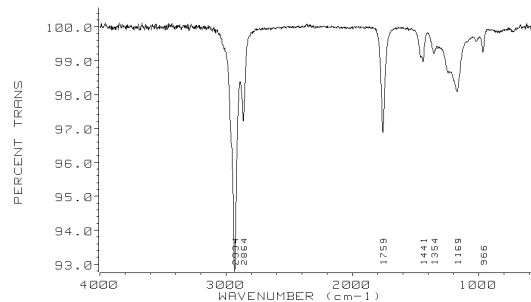


Abbildung 7.2 IR-Transmissionsspektrum des *trans*-(E)-16 Δ^9 -FAME-Standards

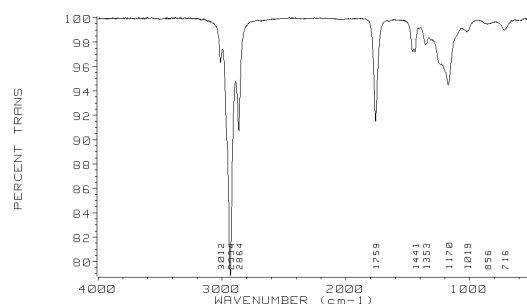


Abbildung 7.3 IR-Transmissionsspektrum des *cis*-(Z)-18 Δ^{11} -FAME-Standards

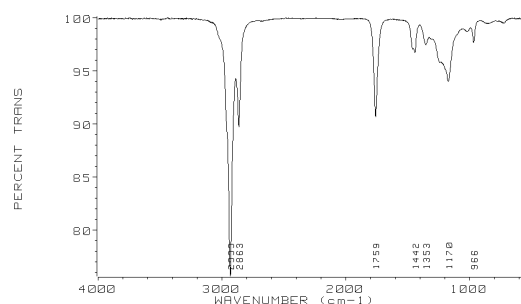


Abbildung 7.4 IR-Transmissionsspektrum des *trans*-(E)-18 Δ^{11} -FAME-Standards

7.3.2 Fettsäuremethylester aus *Plakortis simplex*

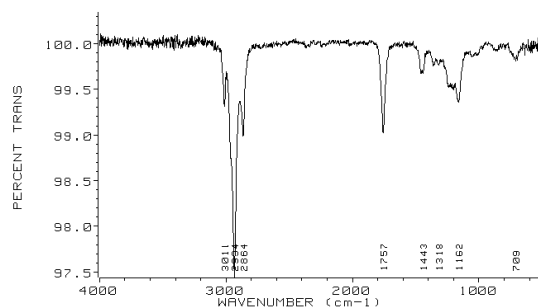


Abbildung 7.5 IR-Transmissionsspektrum des (6Z,14Z)-*m*-20 $\Delta^{6,14}$ -FAME aus *Plakortis simplex*

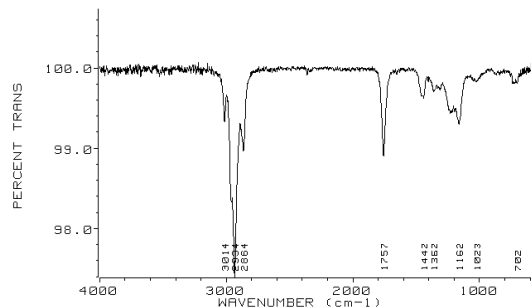


Abbildung 7.6 IR-Transmissionsspektrum des (6Z,14Z)-*m*-21 $\Delta^{5,9}$ -FAME aus *Plakortis simplex*

7.4 NMR-Spektren

7.4.1 (3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-ensäuremethylester (50)

¹H-NMR-Spektrum

siehe Abbildung 3.10, Seite 38

¹³C-NMR-Spektrum

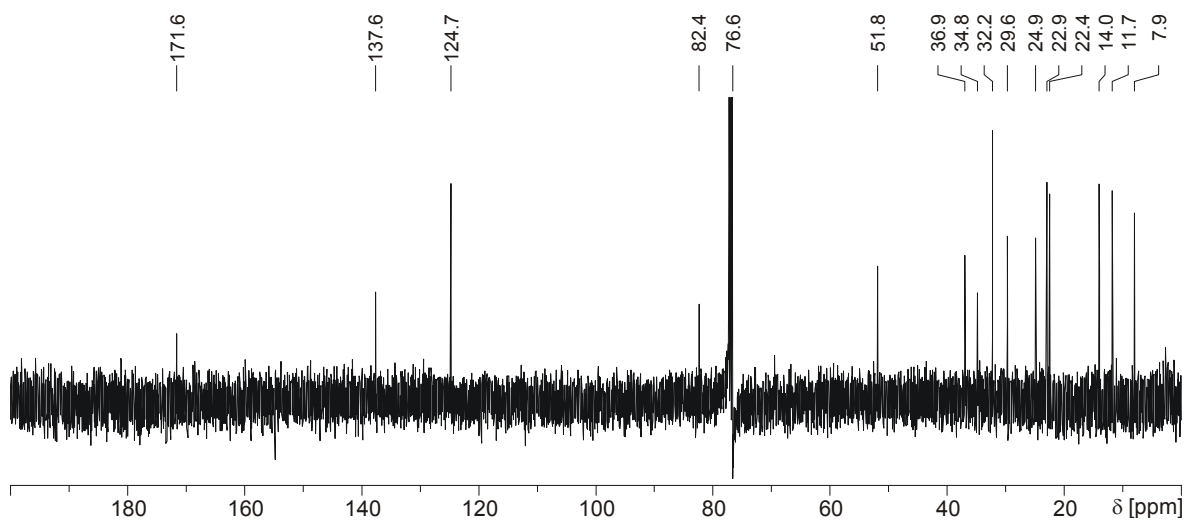
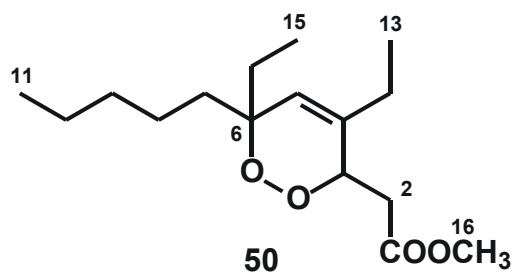
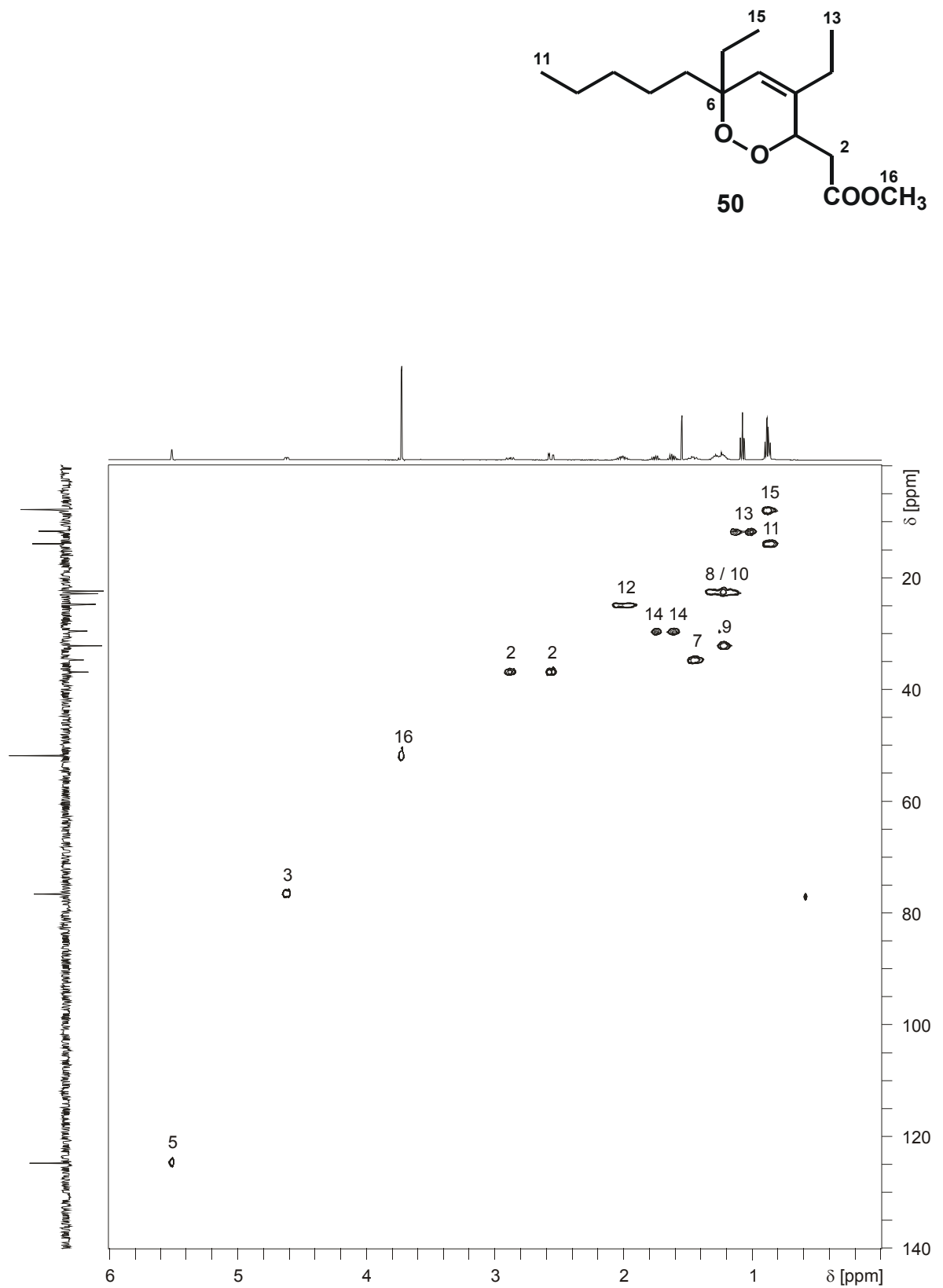


Abbildung 7.7 ¹³C-NMR-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*

HSQC-Spektrum

Abbildung 7.8 HSQC-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl_3) aus *Plakortis simplex*

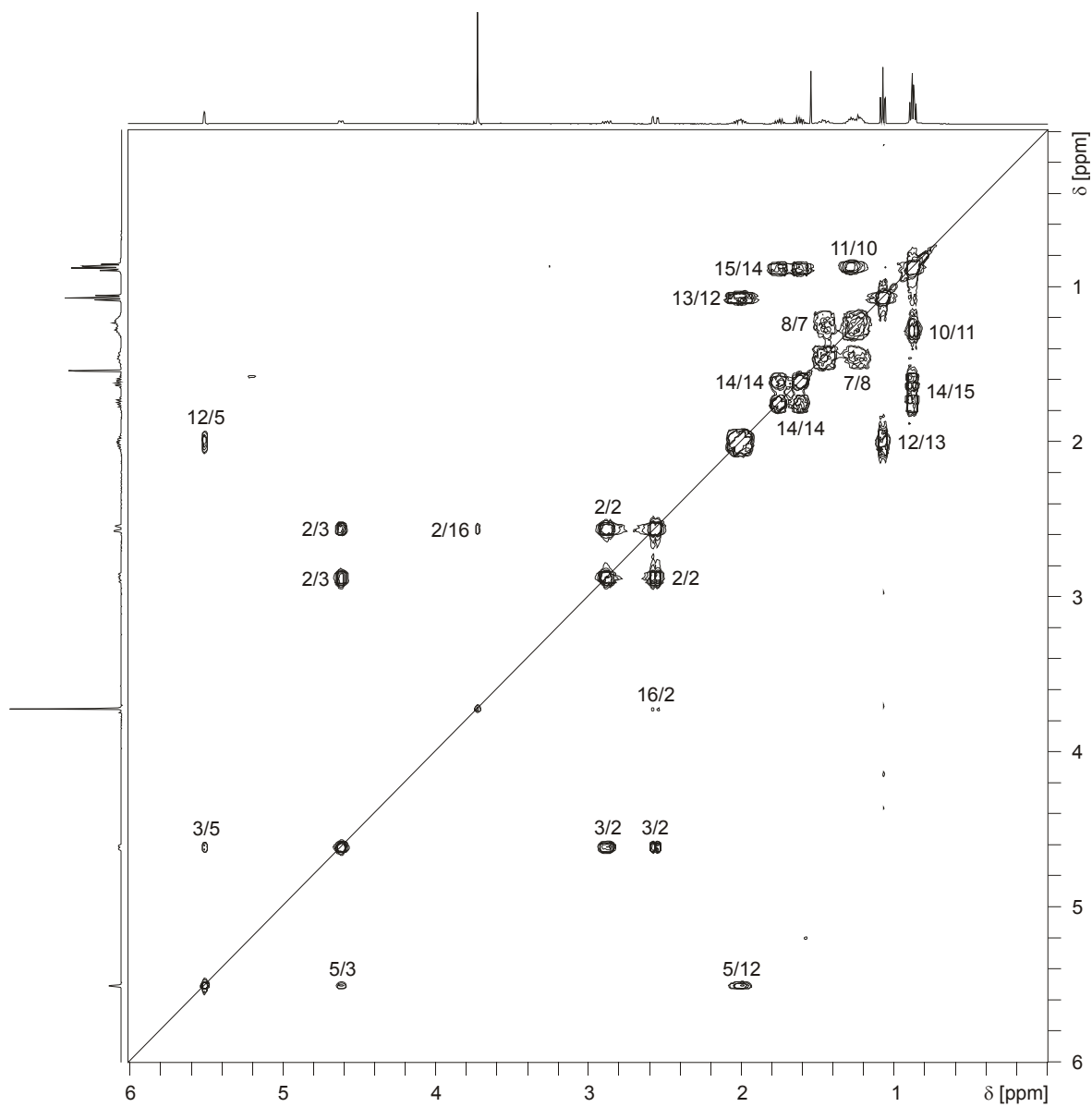
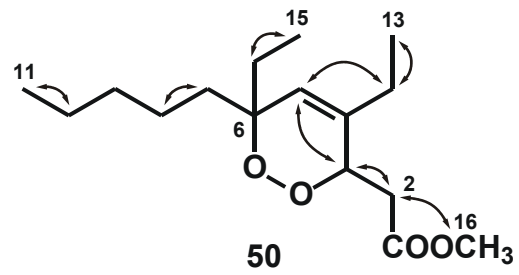
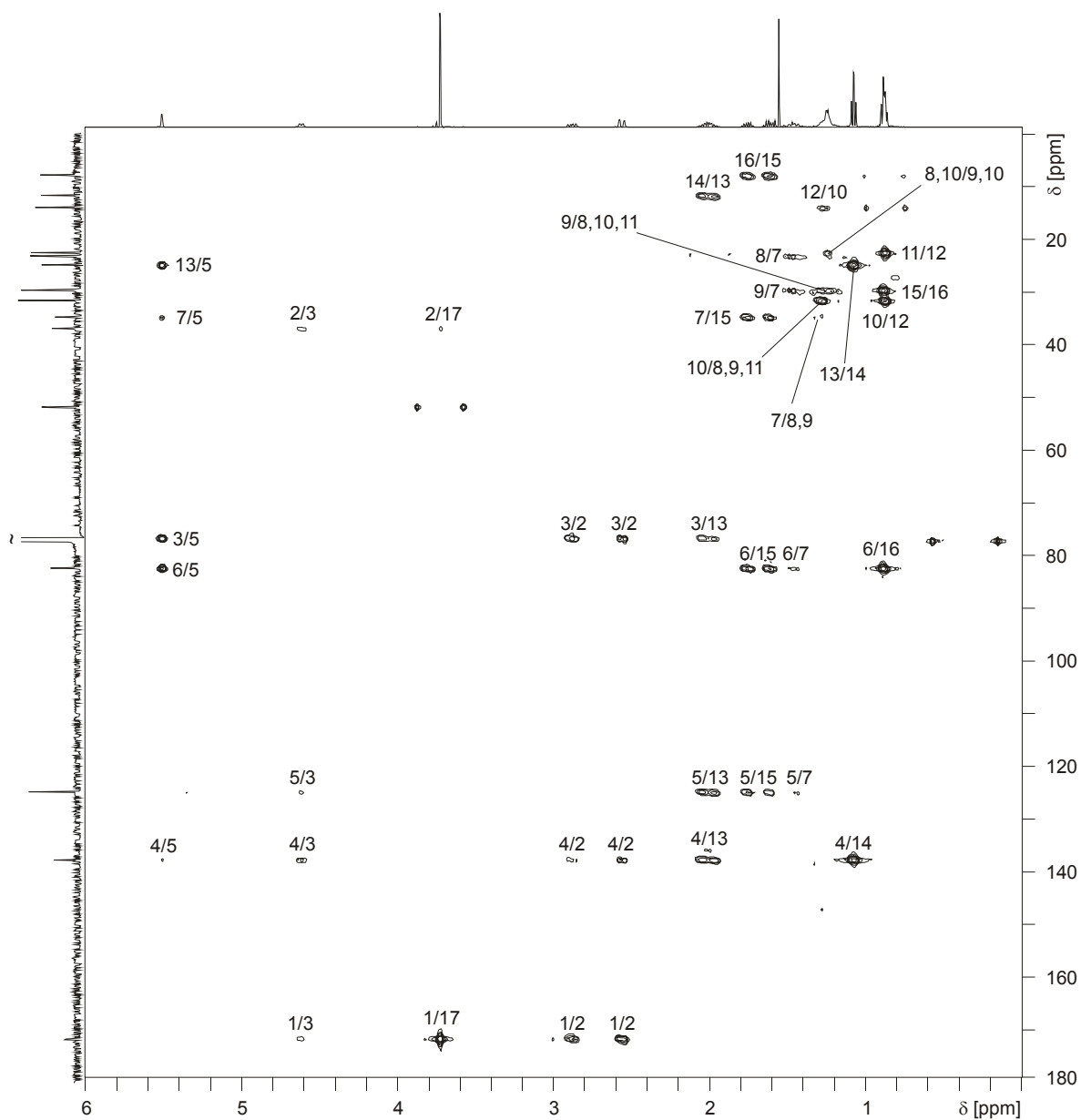
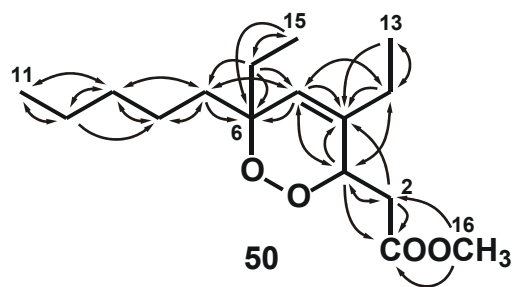
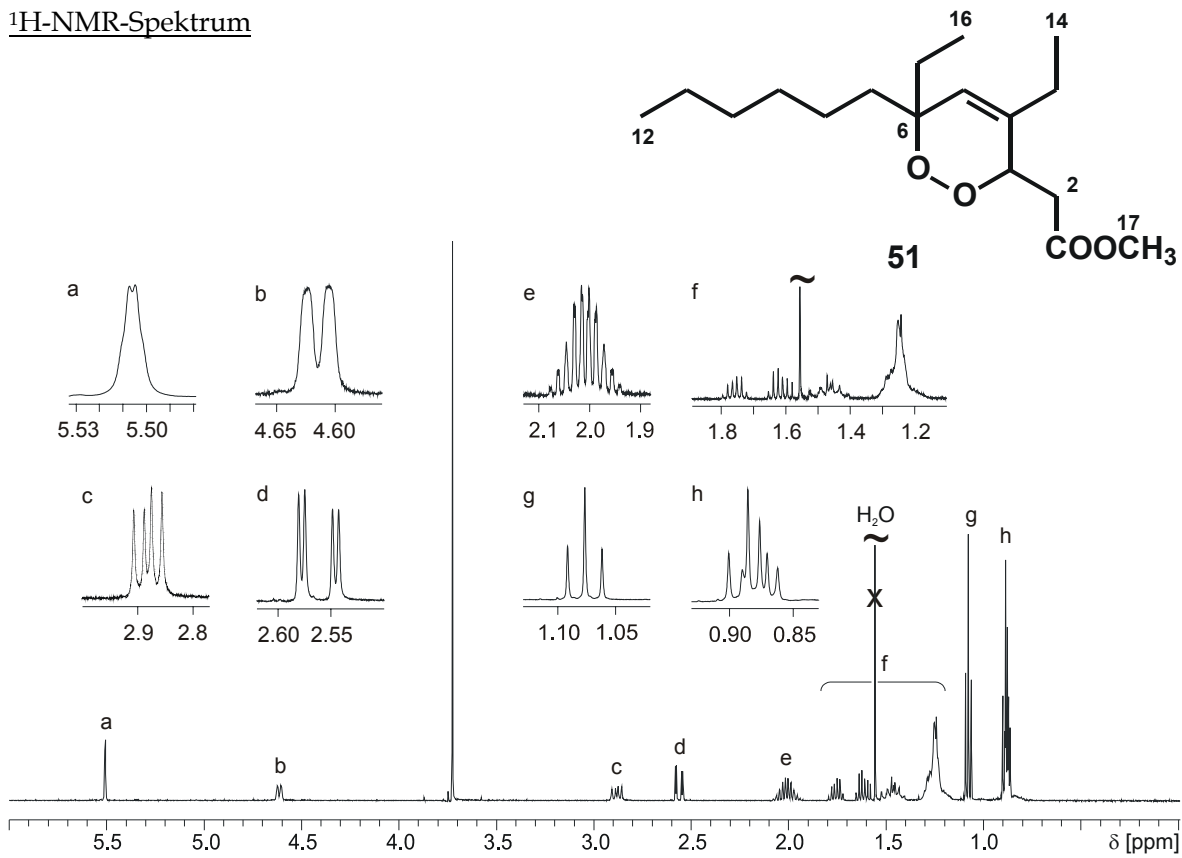
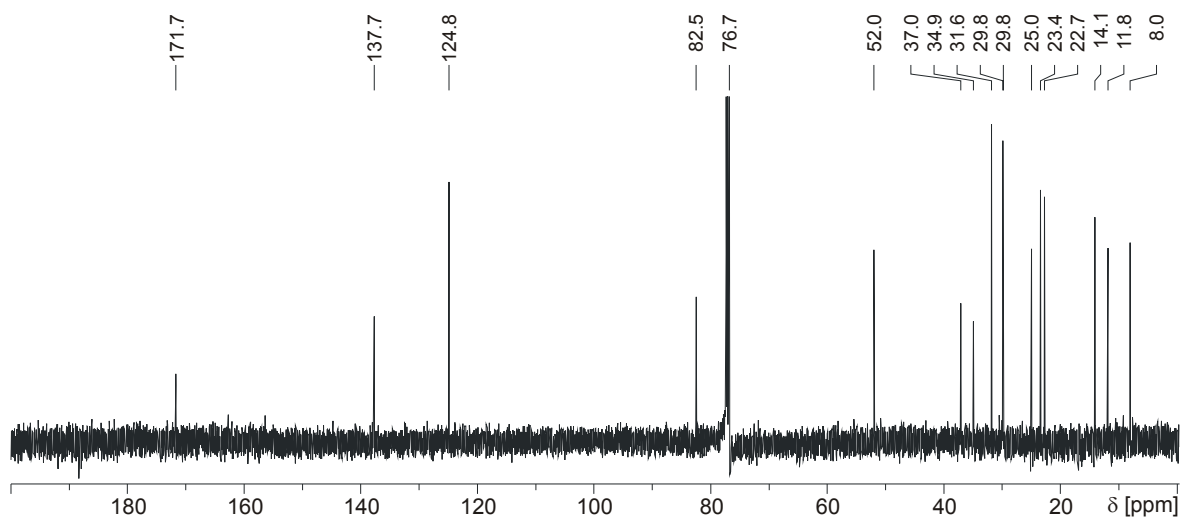
H,H-COSY-Spektrum

Abbildung 7.9 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl_3) aus *Plakortis simplex*

HMBC-Spektrum

Abbildung 7.10 HMBC-Spektrum der Substanz 50 (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*

7.4.2 (3R*,6S*,Z)-4,6-Diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-ensäuremethylester (51)

¹H-NMR-SpektrumAbbildung 7.11 ¹H-NMR-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*¹³C-DEPT-NMR-SpektrumAbbildung 7.12 ¹³C-NMR-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*

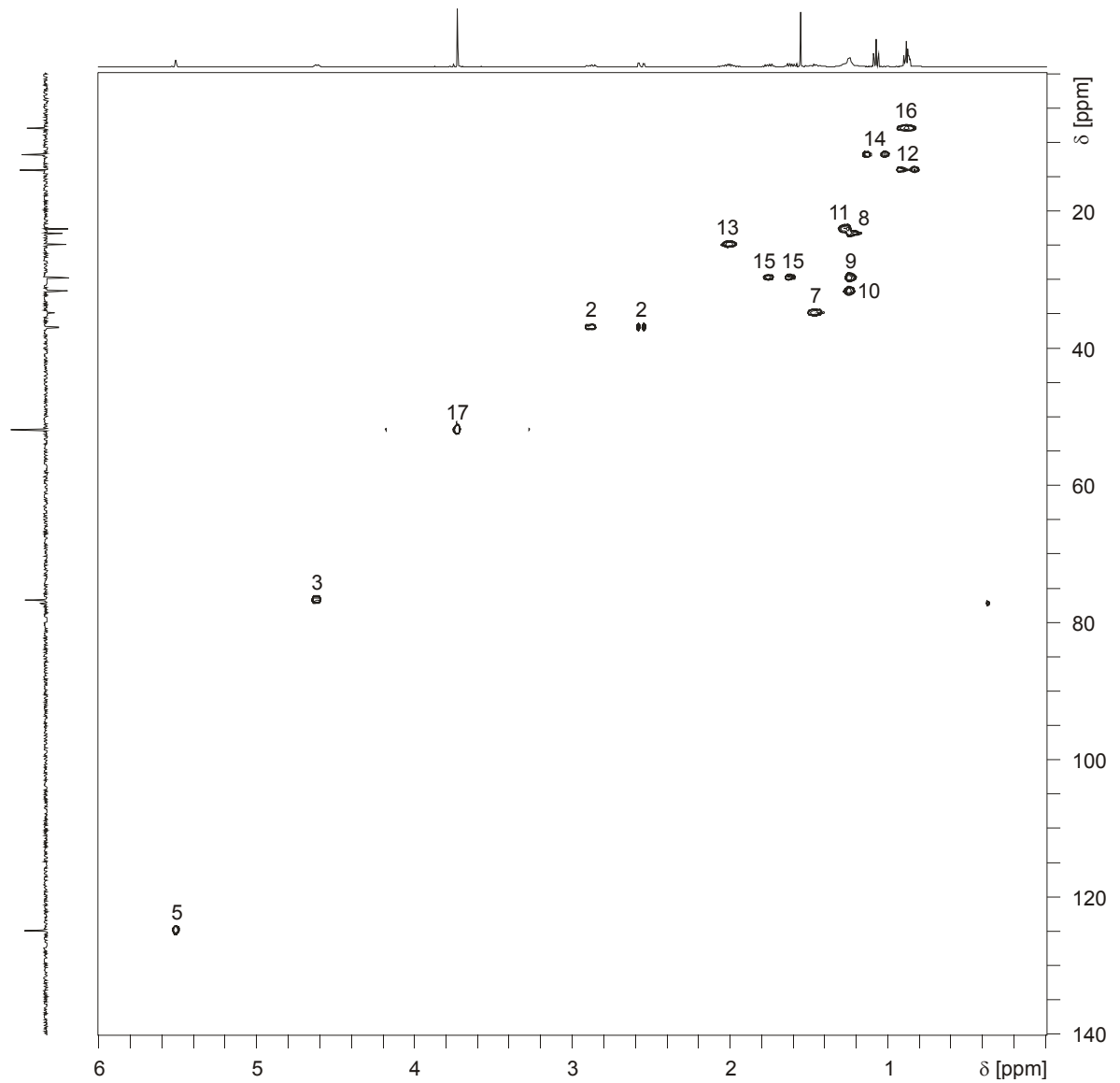
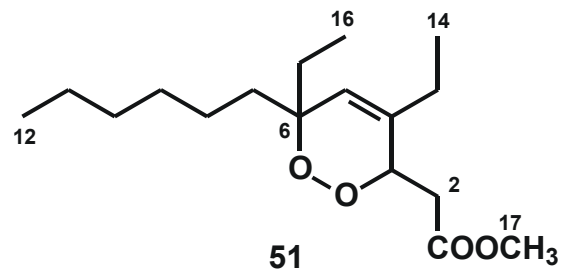
HSQC-Spektrum

Abbildung 7.13 HSQC-Spektrum der Substanz **51** (in CDCl_3) aus *Plakortis simplex*

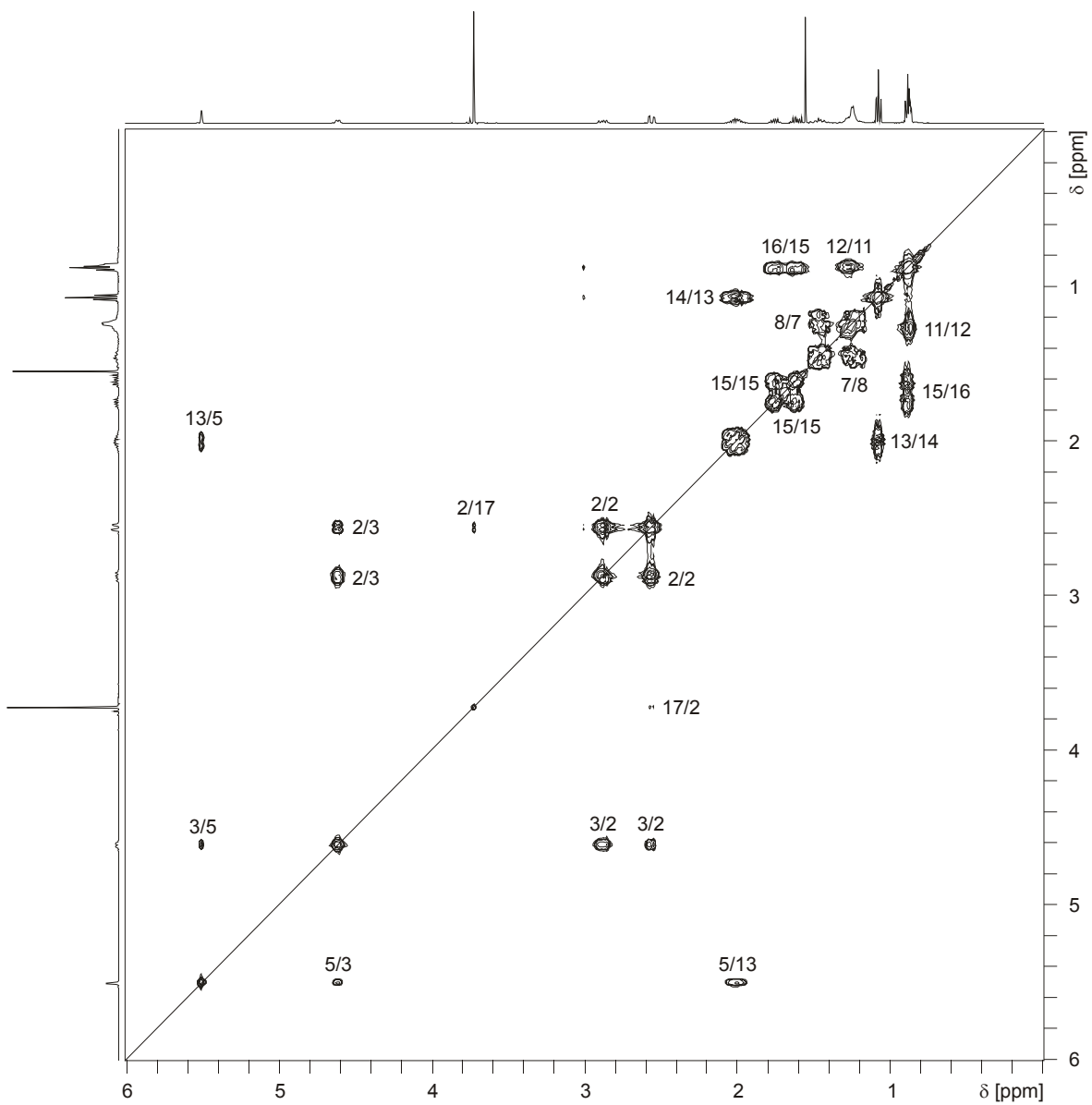
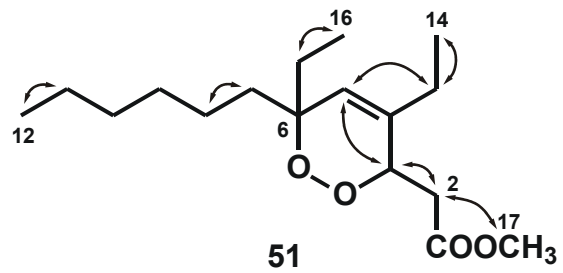
H,H-COSY-Spektrum

Abbildung 7.14 H,H-COSY-Spektrum der Substanz **51** (in CDCl₃) aus *Plakortis simplex*

HMBC-Spektrum

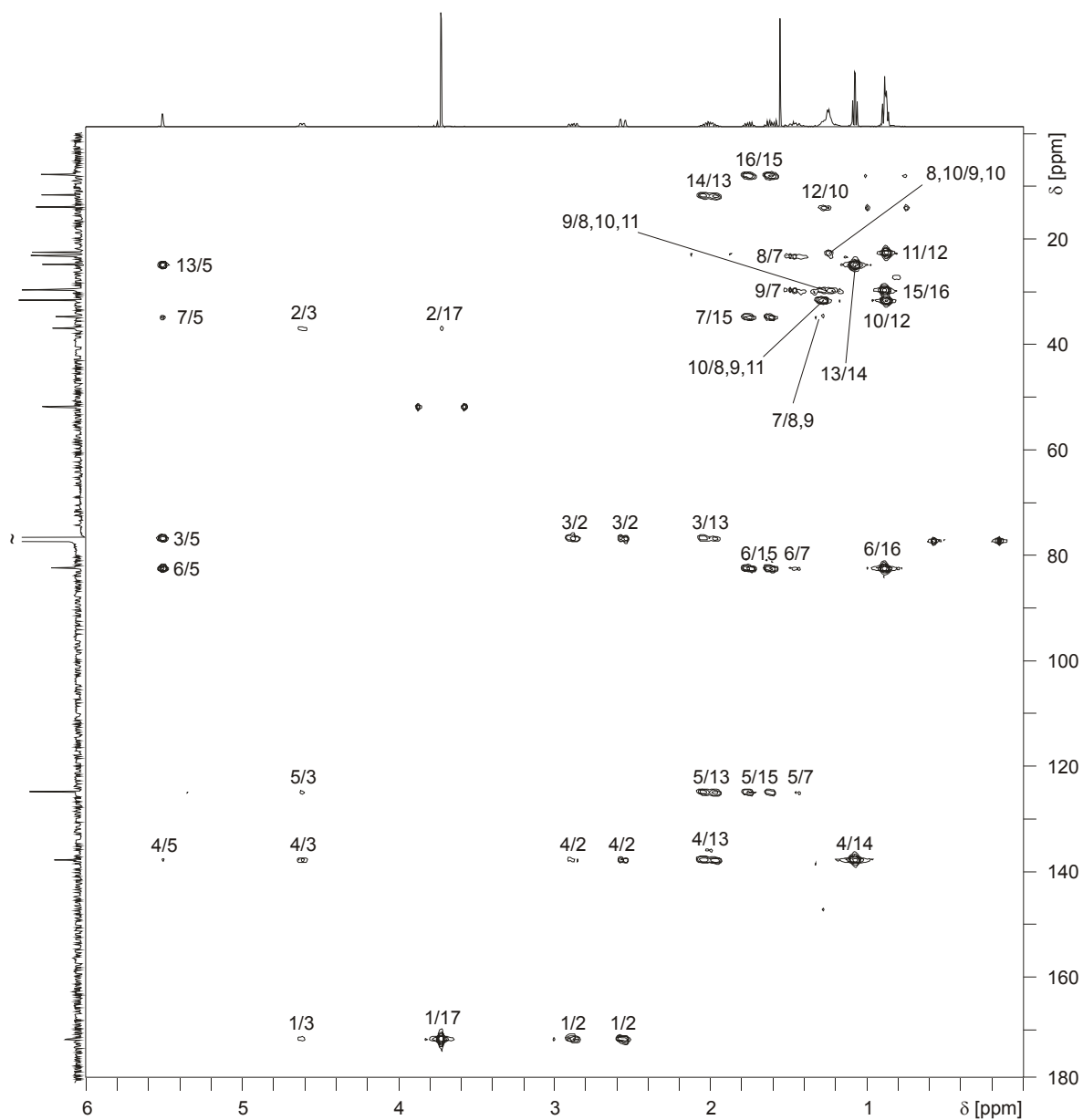
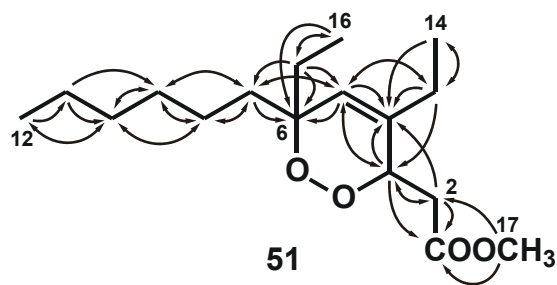
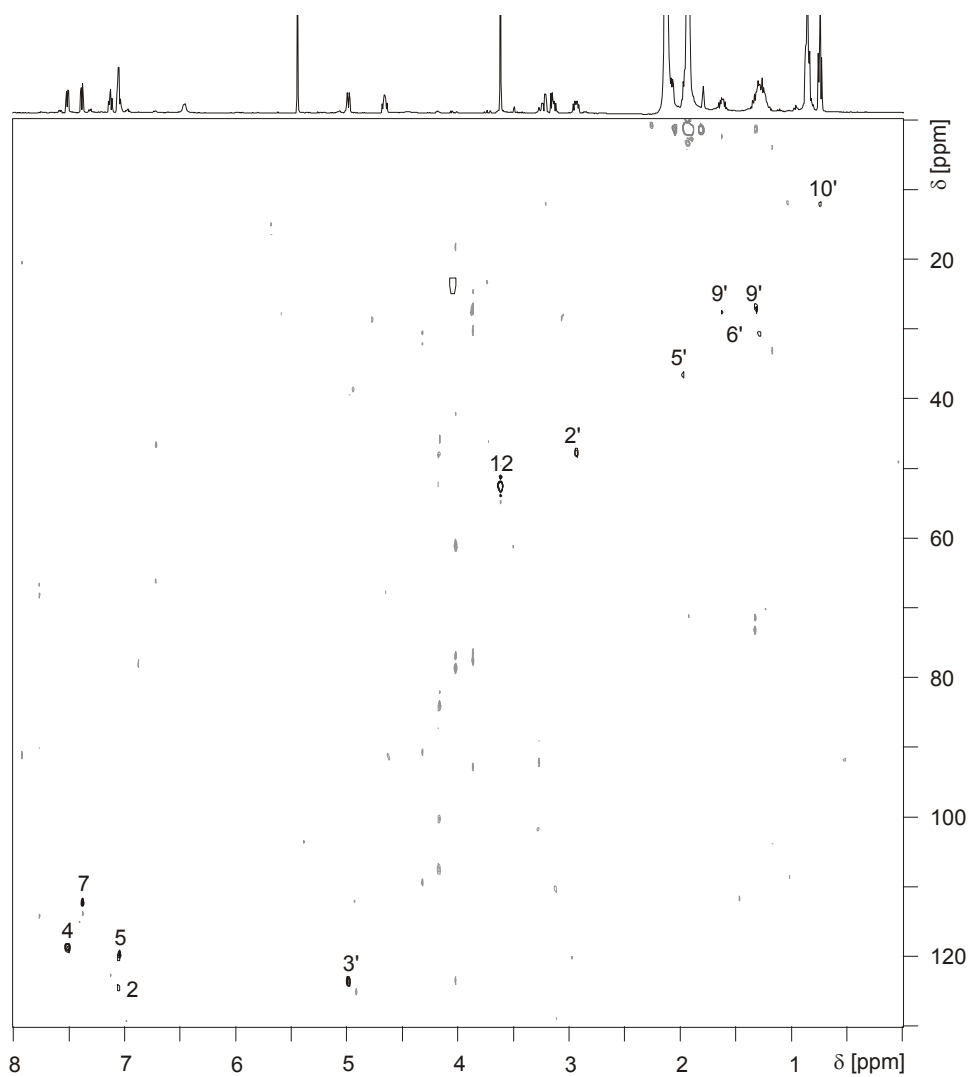
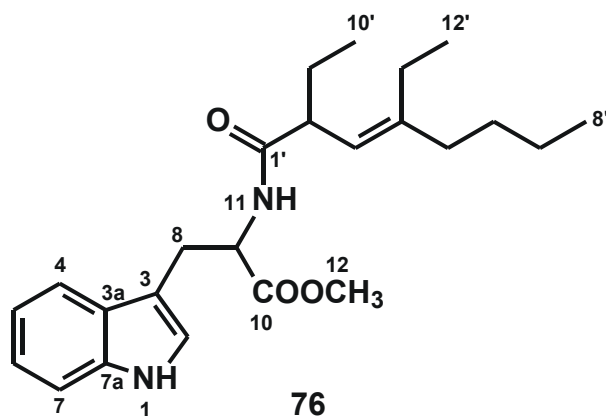


Abbildung 7.15 HMBC-Spektrum der Substanz 51 (in CDCl_3) aus *Plakortis simplex*

7.4.3 N-(2,4-Diethyloct-3-enyl)tryptophanmethylester (76)

 ^1H -NMR-Spektrum

siehe Abbildung 3.20, Seite 53

HMOC-SpektrumAbbildung 7.16 HMOC-Spektrum der Substanz 76 (in CD_3CN) aus *Plakortis simplex*

H,H-COSY-Spektrum

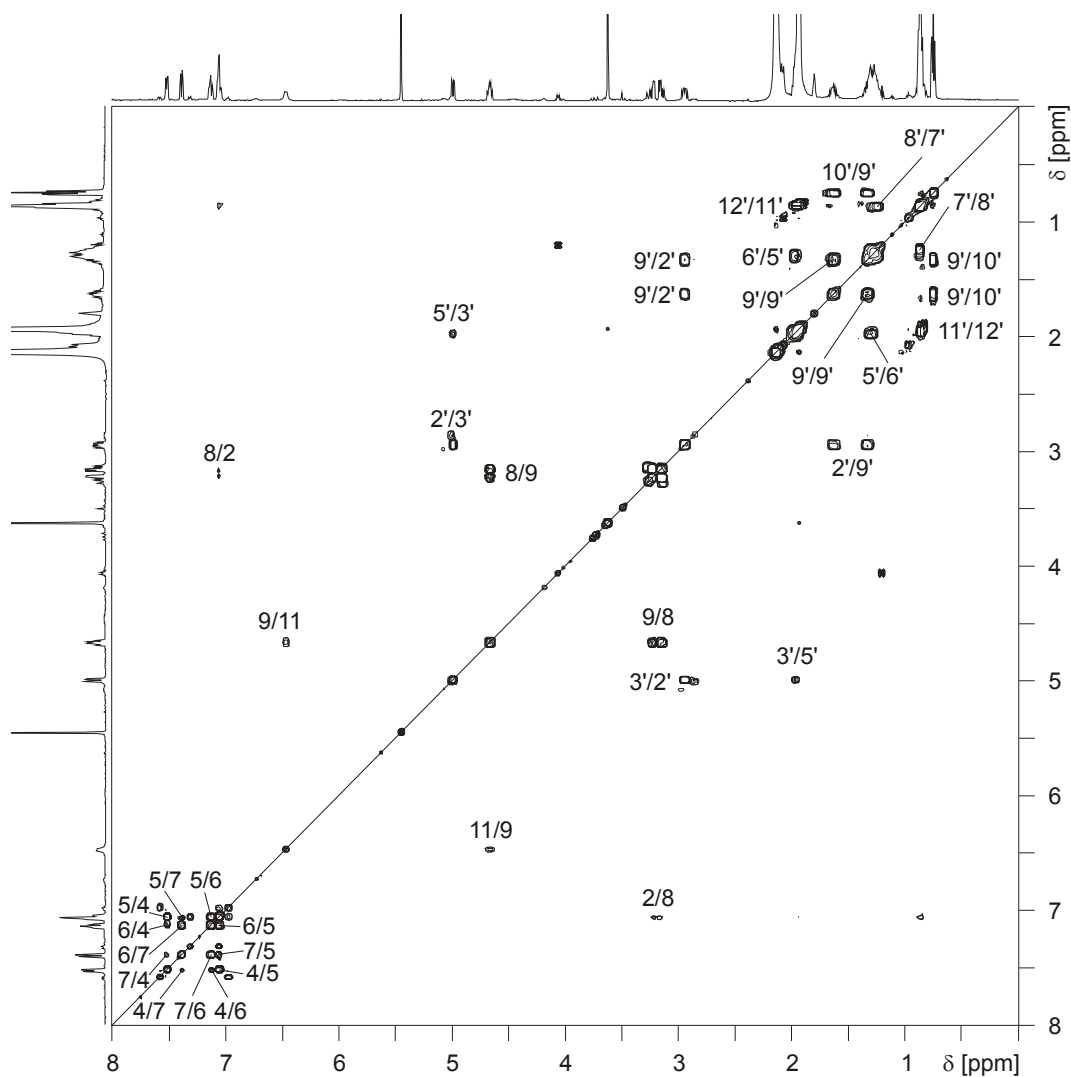
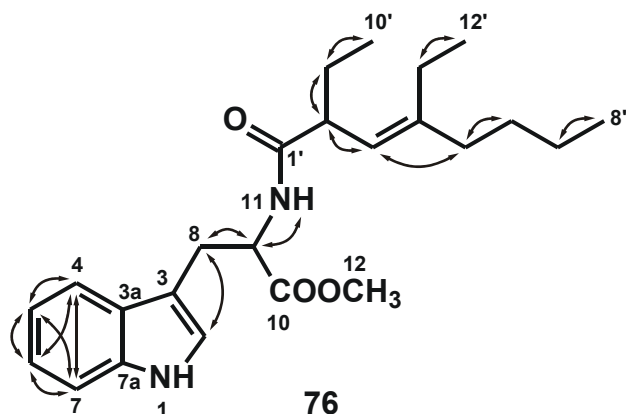
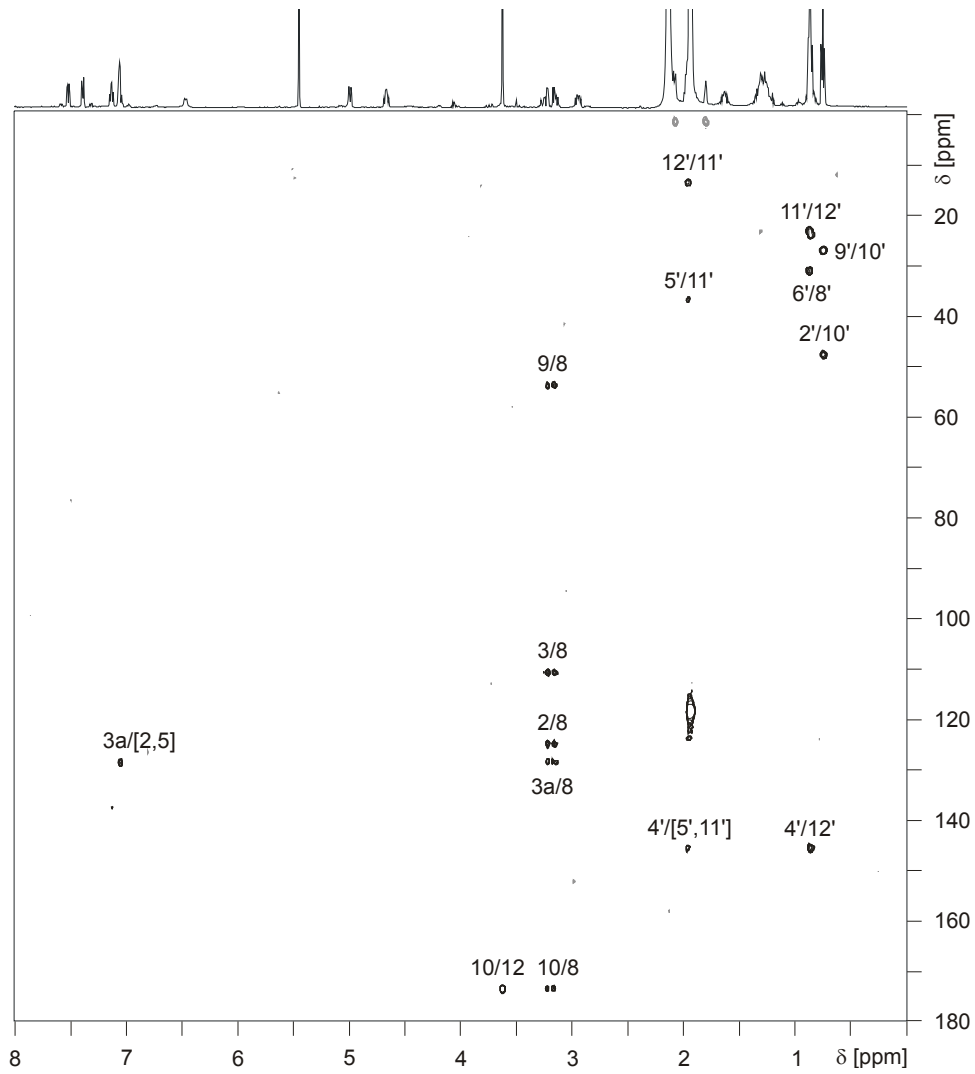
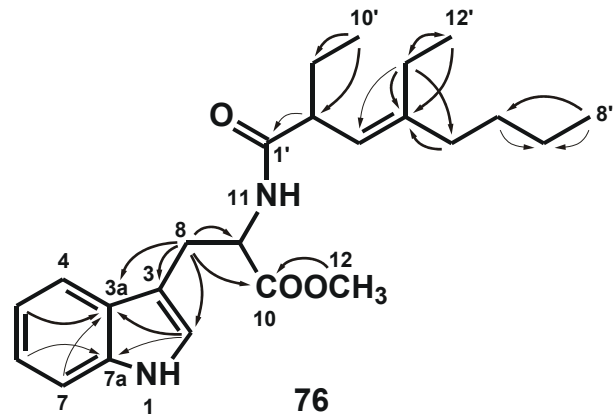
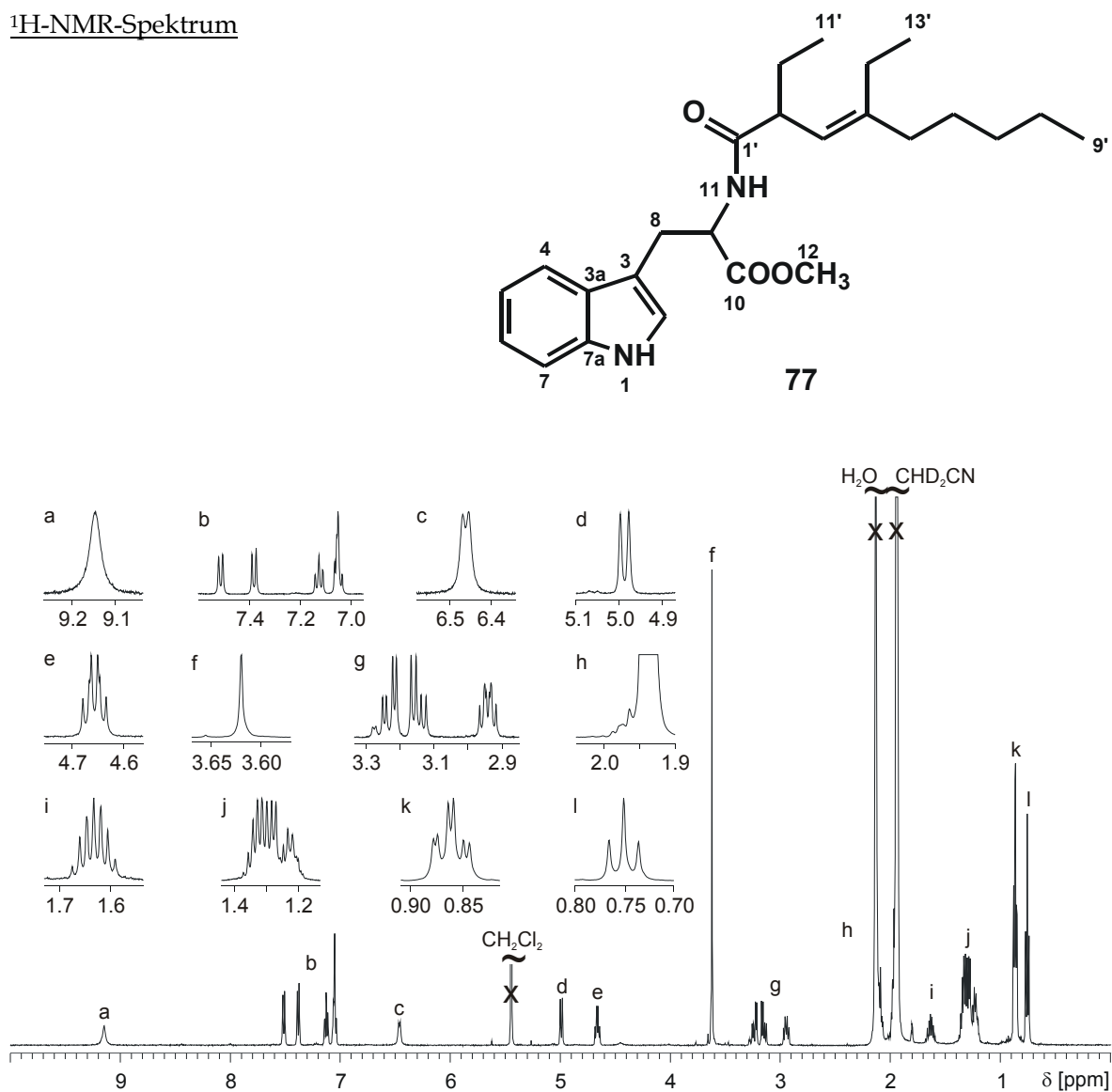


Abbildung 7.17 H,H-COSY-Spektrum der Substanz **76** (in CD_3CN) aus *Plakortis simplex*

HMBC-Spektrum

Abbildung 7.18 HMBC-Spektrum der Substanz 76 (in CD₃CN) aus *Plakortis simplex*

7.4.4 N-(2,4-Diethylnon-3-enyl)tryptophanmethylester (77)

 ^1H -NMR-SpektrumAbbildung 7.19 ^1H -NMR-Spektrum der Substanz 77 (in CD_3CN) aus *Plakortis simplex*

HMQC-Spektrum

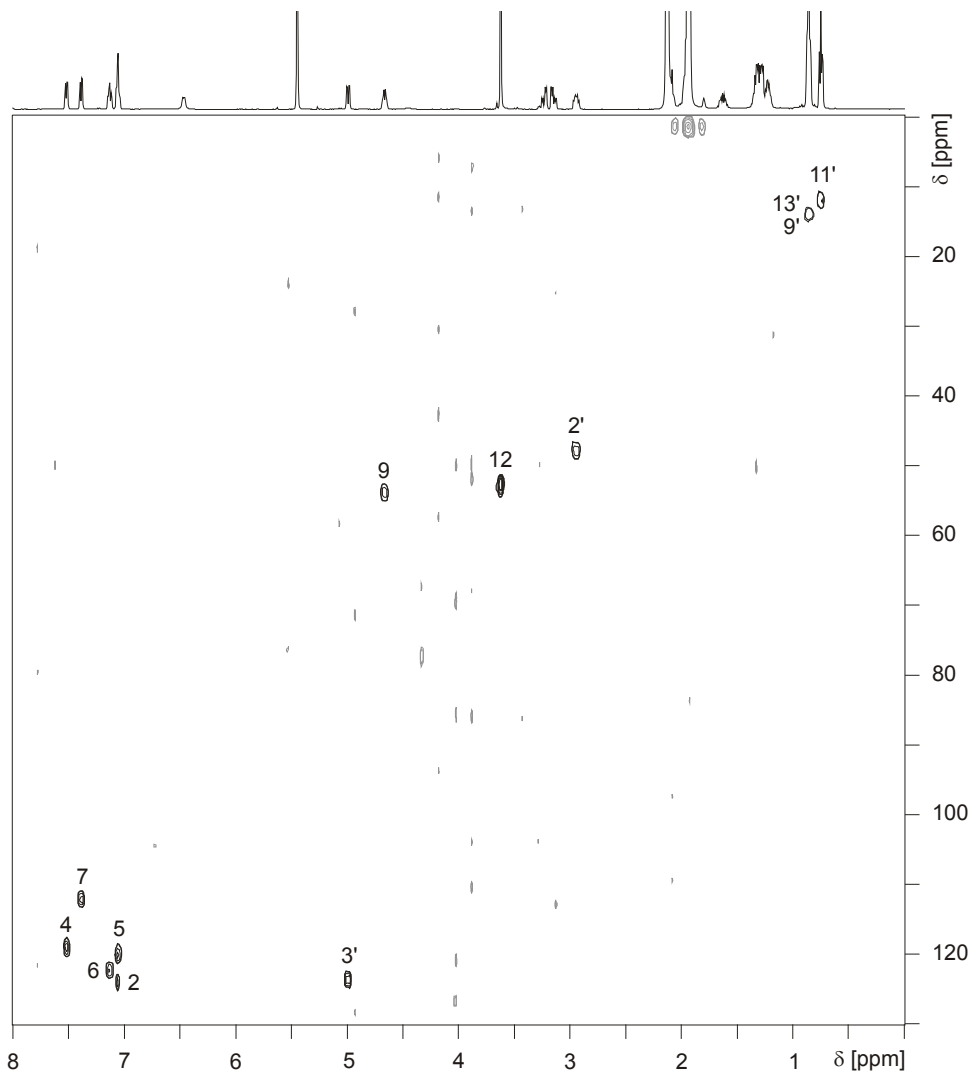
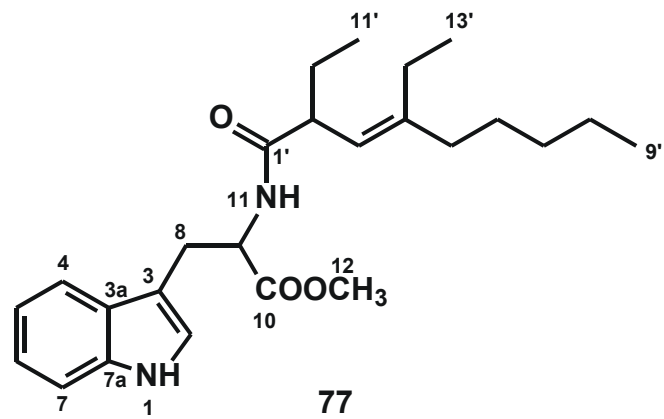


Abbildung 7.20 HMQC-Spektrum der Substanz 77 (in CD₃CN) aus *Plakortis simplex*

H,H-COSY-Spektrum

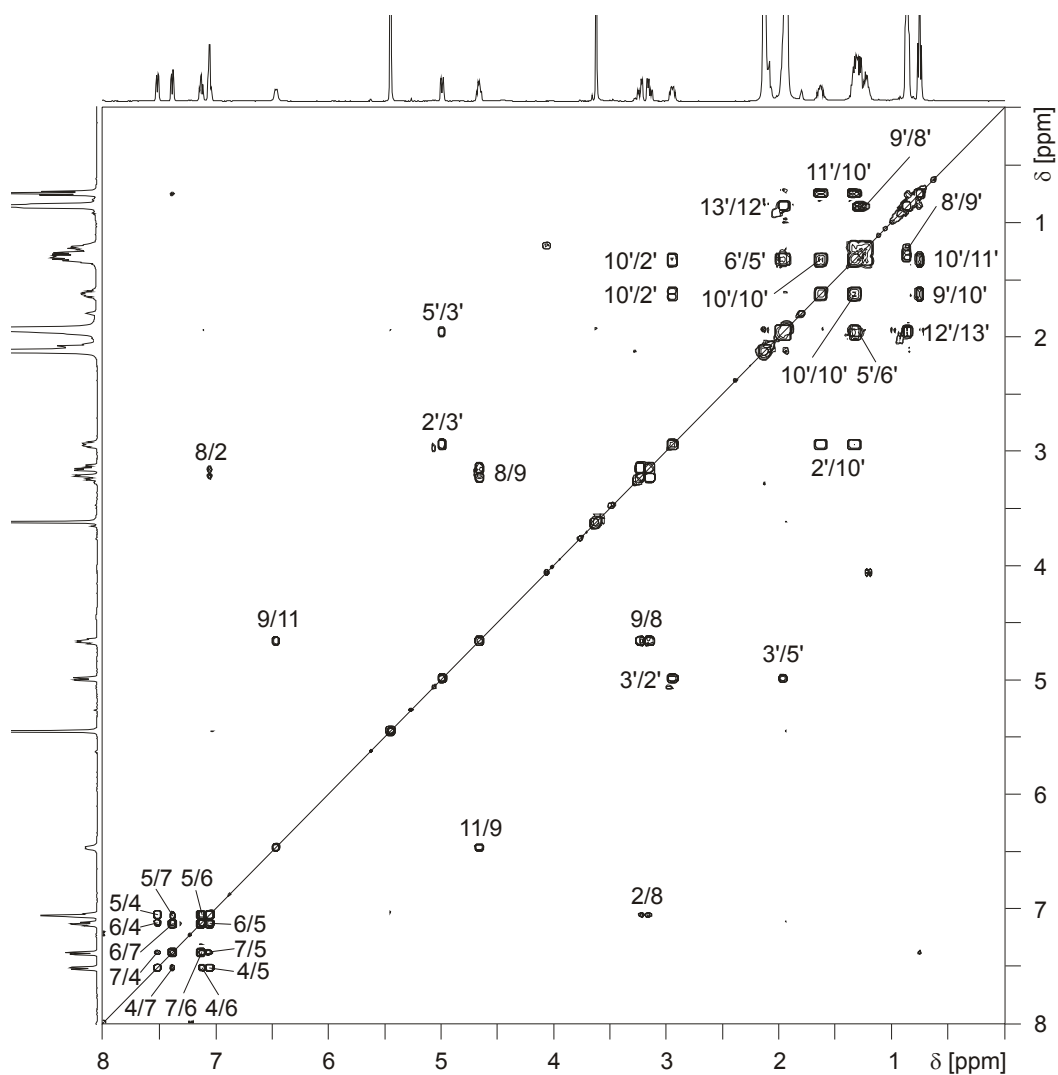
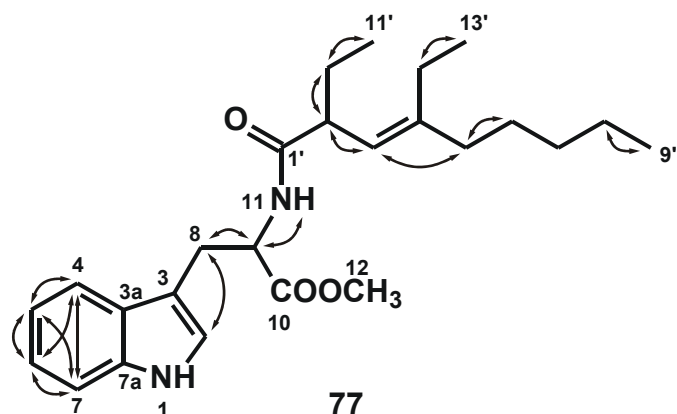


Abbildung 7.21 H,H-COSY-Spektrum der Substanz 77 (in CD_3CN) aus *Plakortis simplex*

HMBC-Spektrum

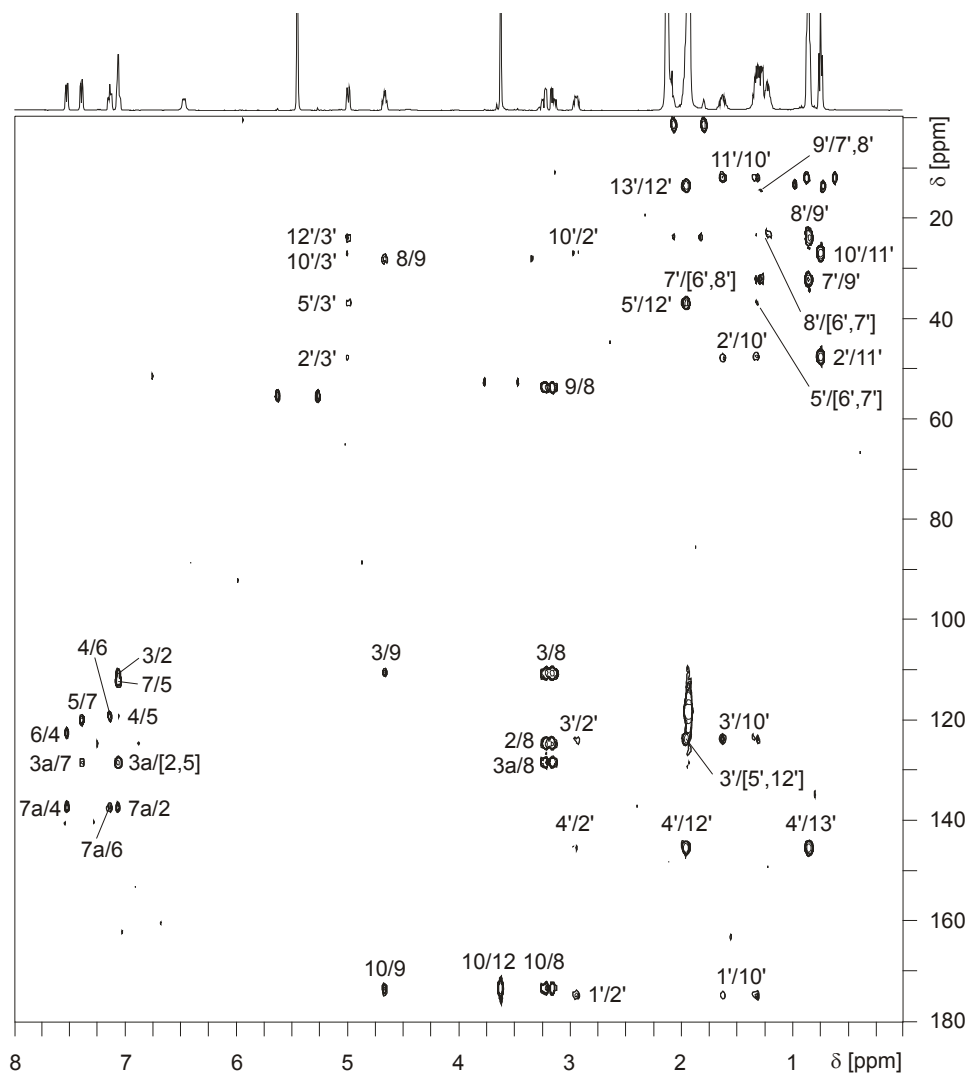
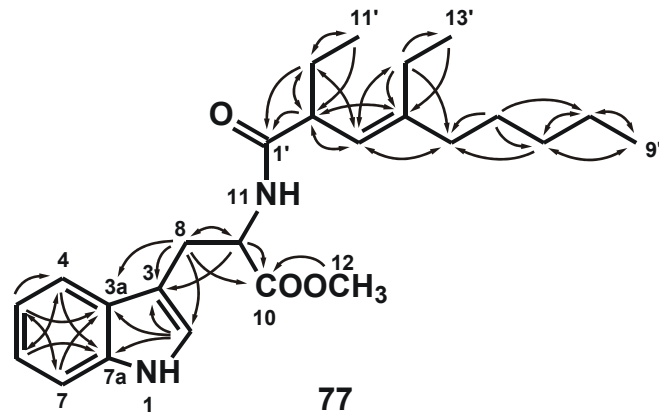
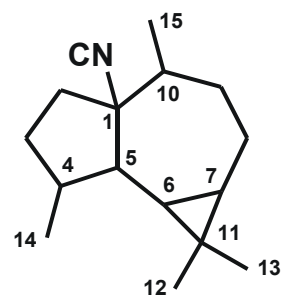
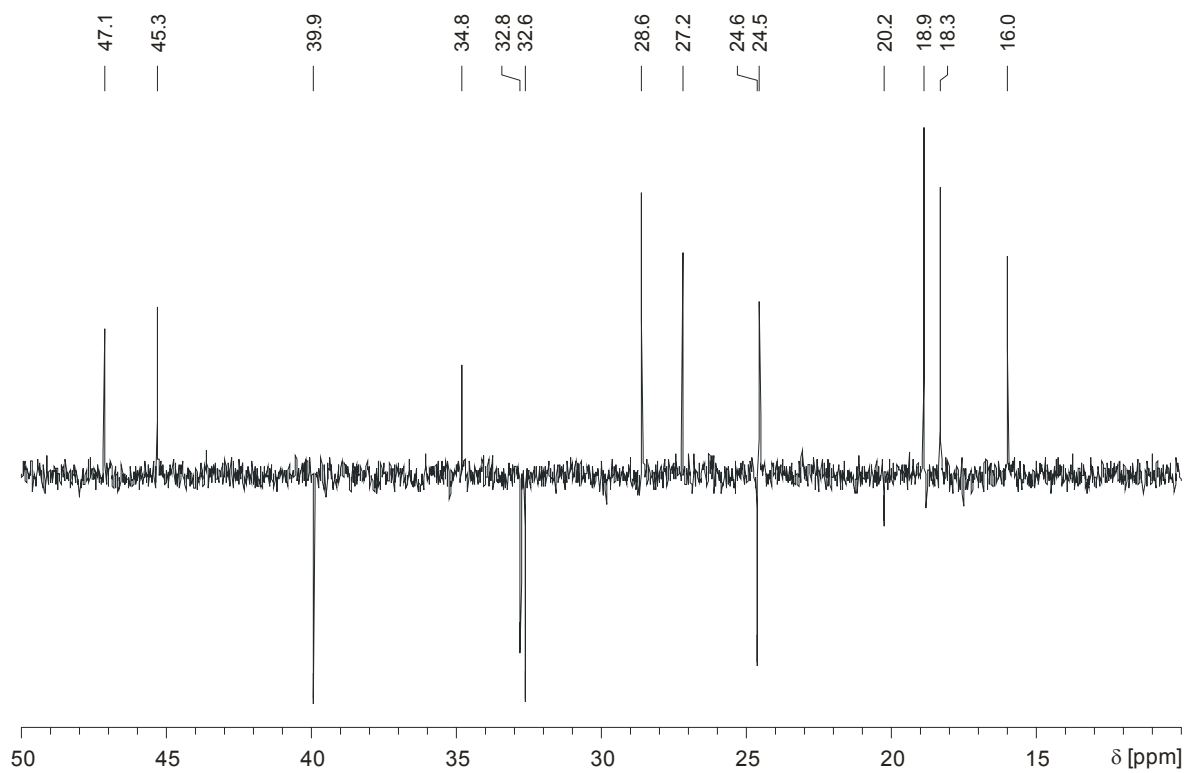


Abbildung 7.22 HMBC-COSY-Spektrum der Substanz **77** (in CD_3CN) aus *Plakortis simplex*

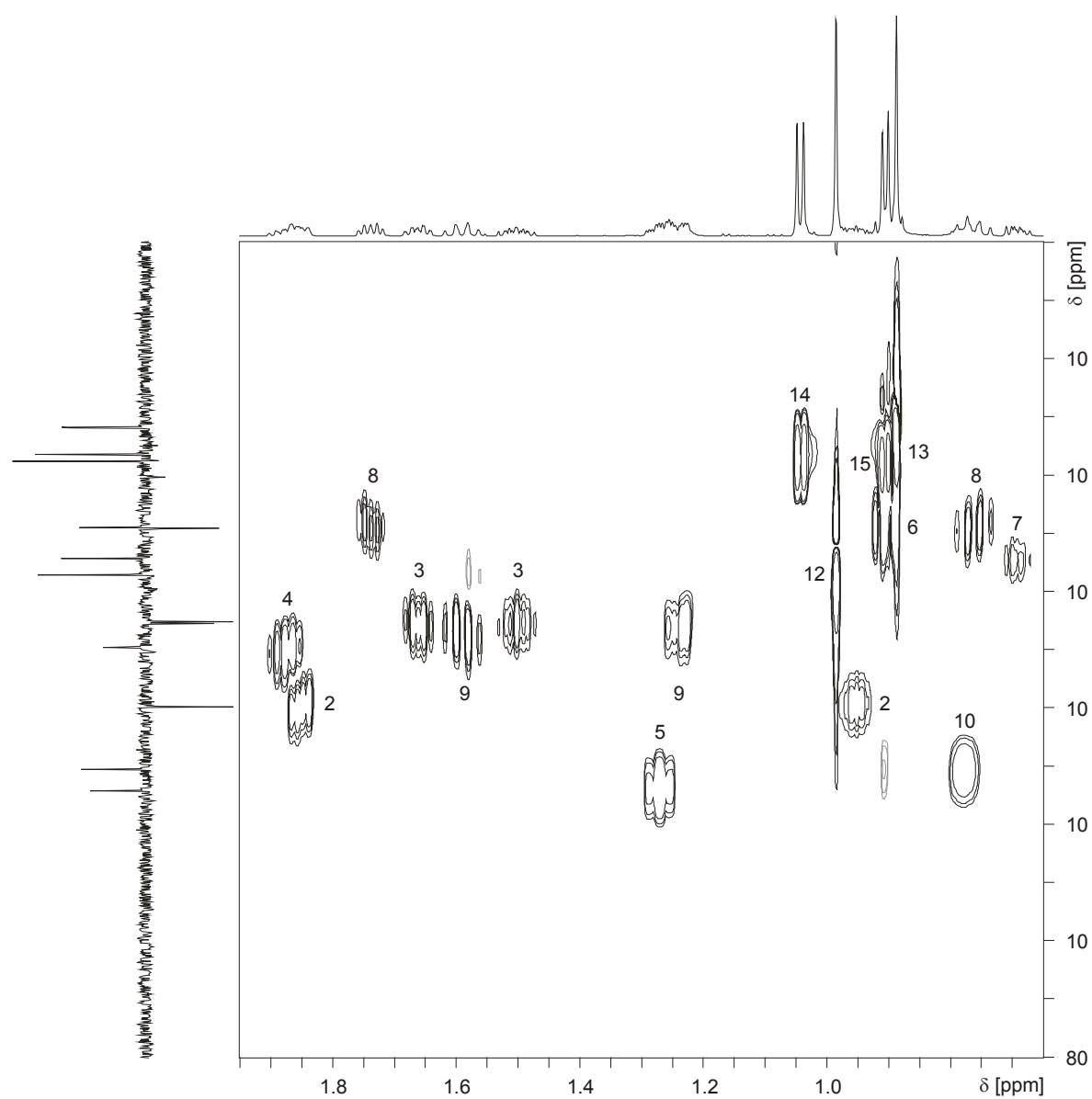
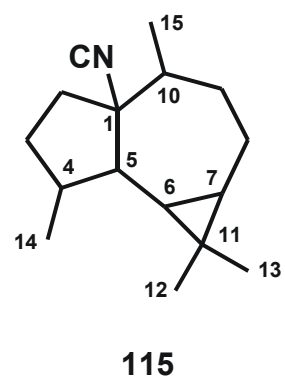
7.4.5 (4S*,5R*,6S*,7S*)-1-Isocyanoaromadendran (115)

¹H-NMR-Spektrum

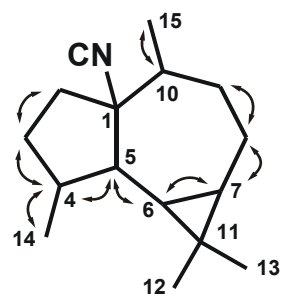
siehe Abbildung 3.34, Seite 78

**115**¹³C-PENDANT-NMR-Spektrum**Abbildung 7.23** ¹³C-PENDANT-NMR-Spektrum der Substanz **115** (in C₆D₆) aus *Axinella rugosa*

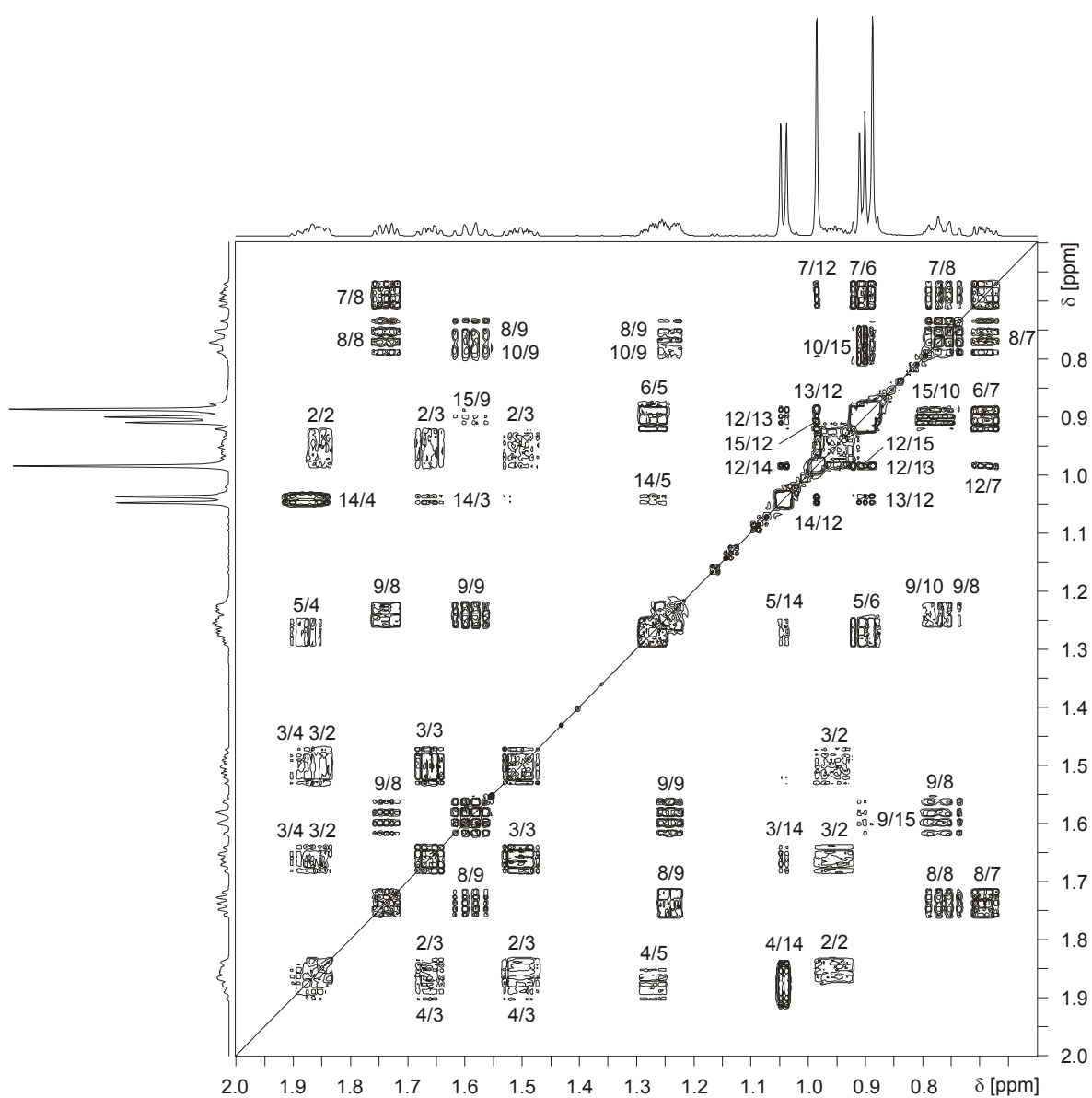
HMQC-Spektrum

Abbildung 7.24 HMQC-Spektrum der Substanz **115** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

H,H-COSY-Spektrum



115

Abbildung 7.25 H,H-COSY-Spektrum der Substanz **115** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

HMBC-Spektrum

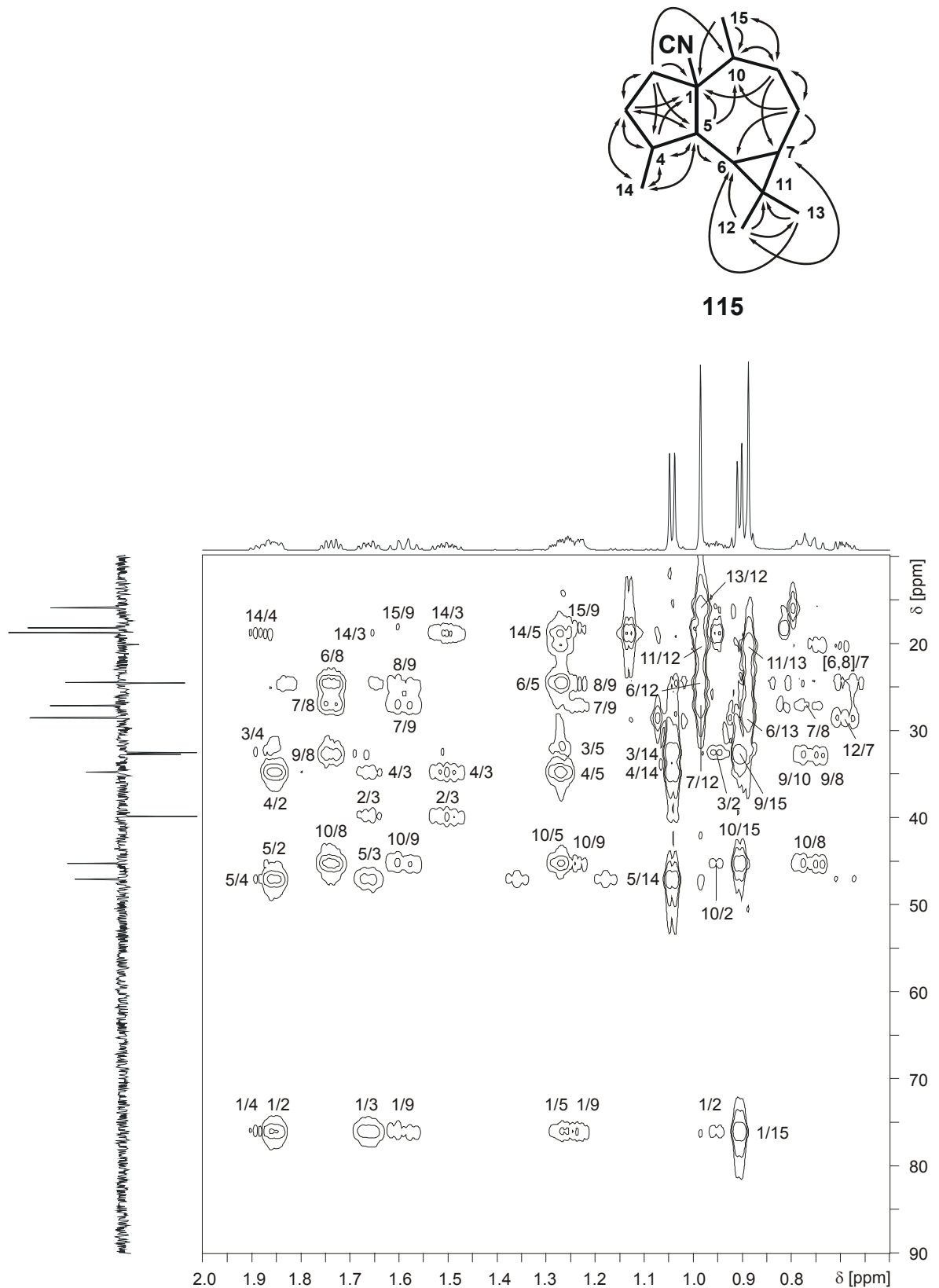
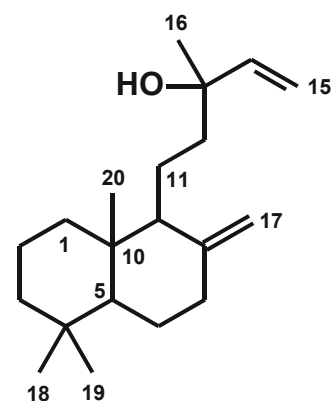
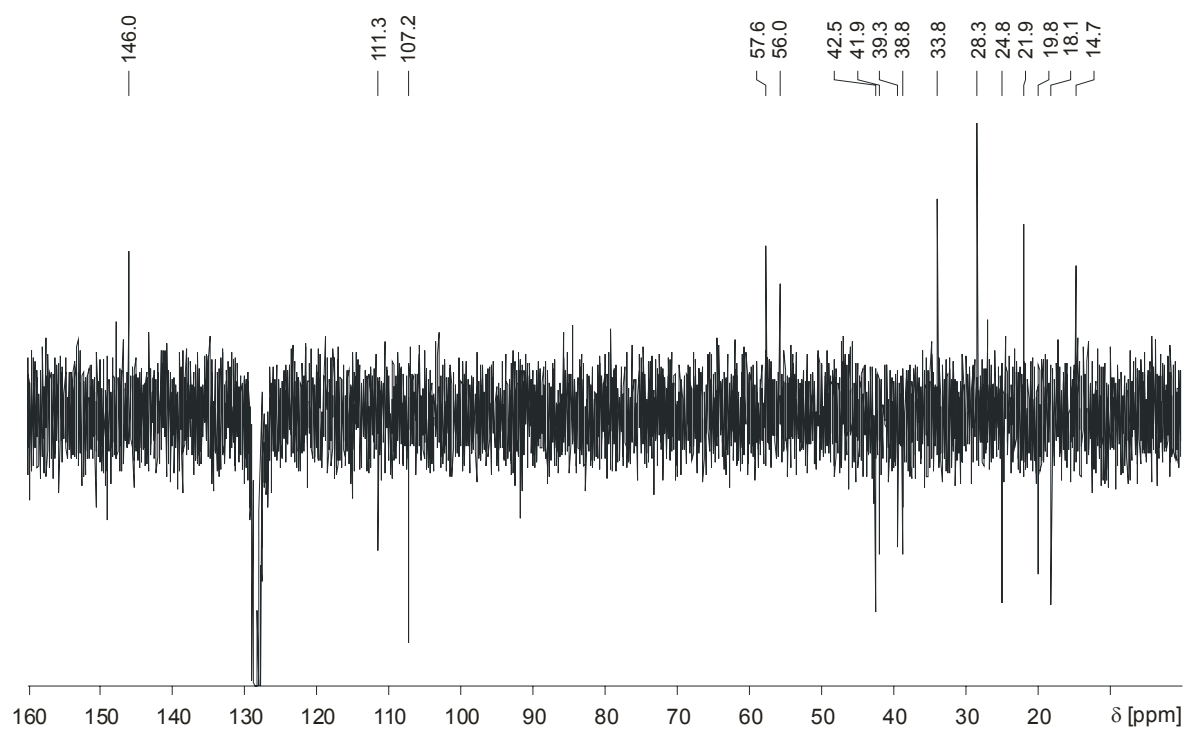


Abbildung 7.26 HMBC-Spektrum der Substanz 115 (in C₆D₆) aus *Axinella rugosa*

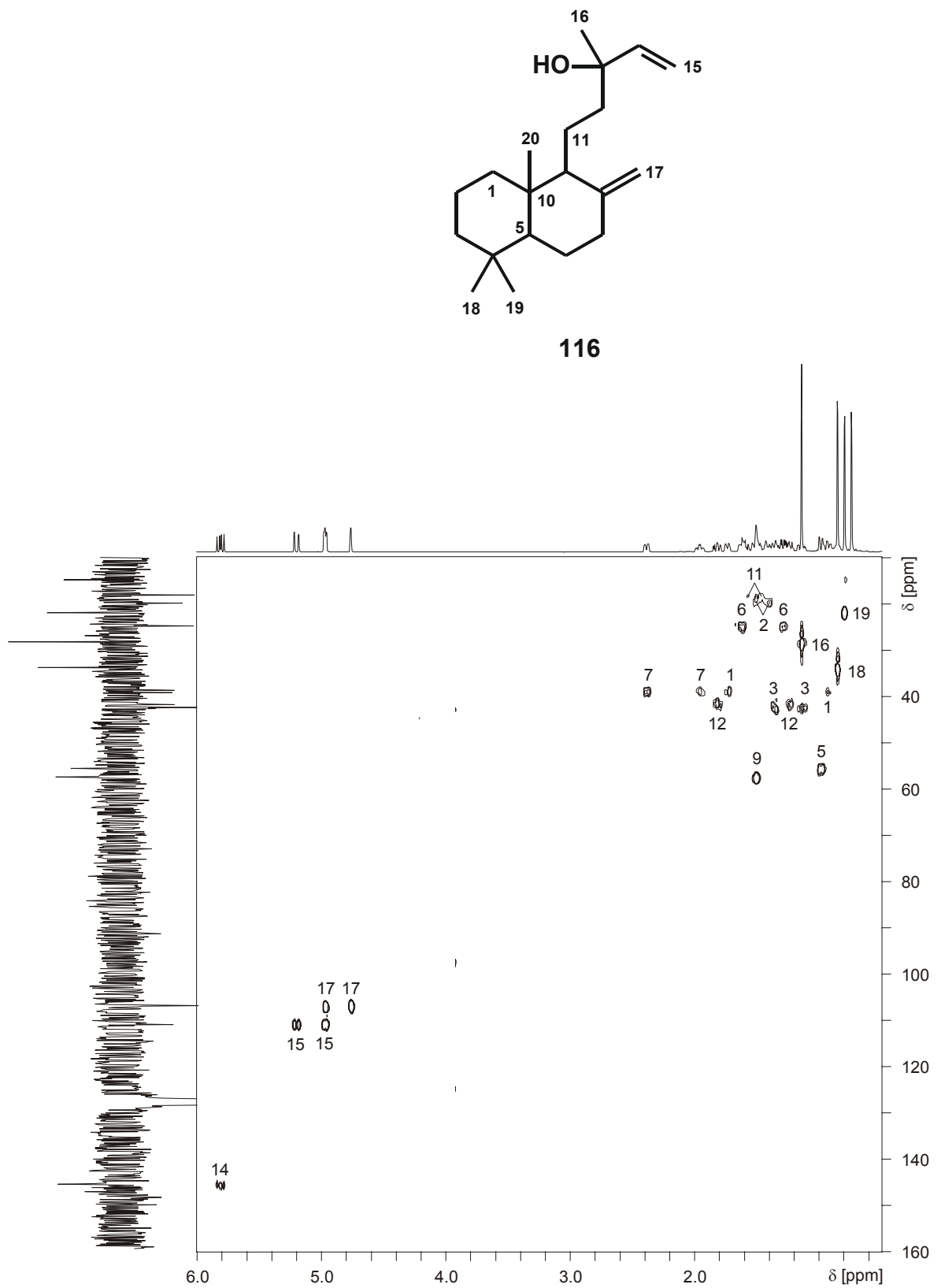
7.4.6 8(17),14-Labdadien-13-ol (116)

 ^1H -NMR-Spektrum

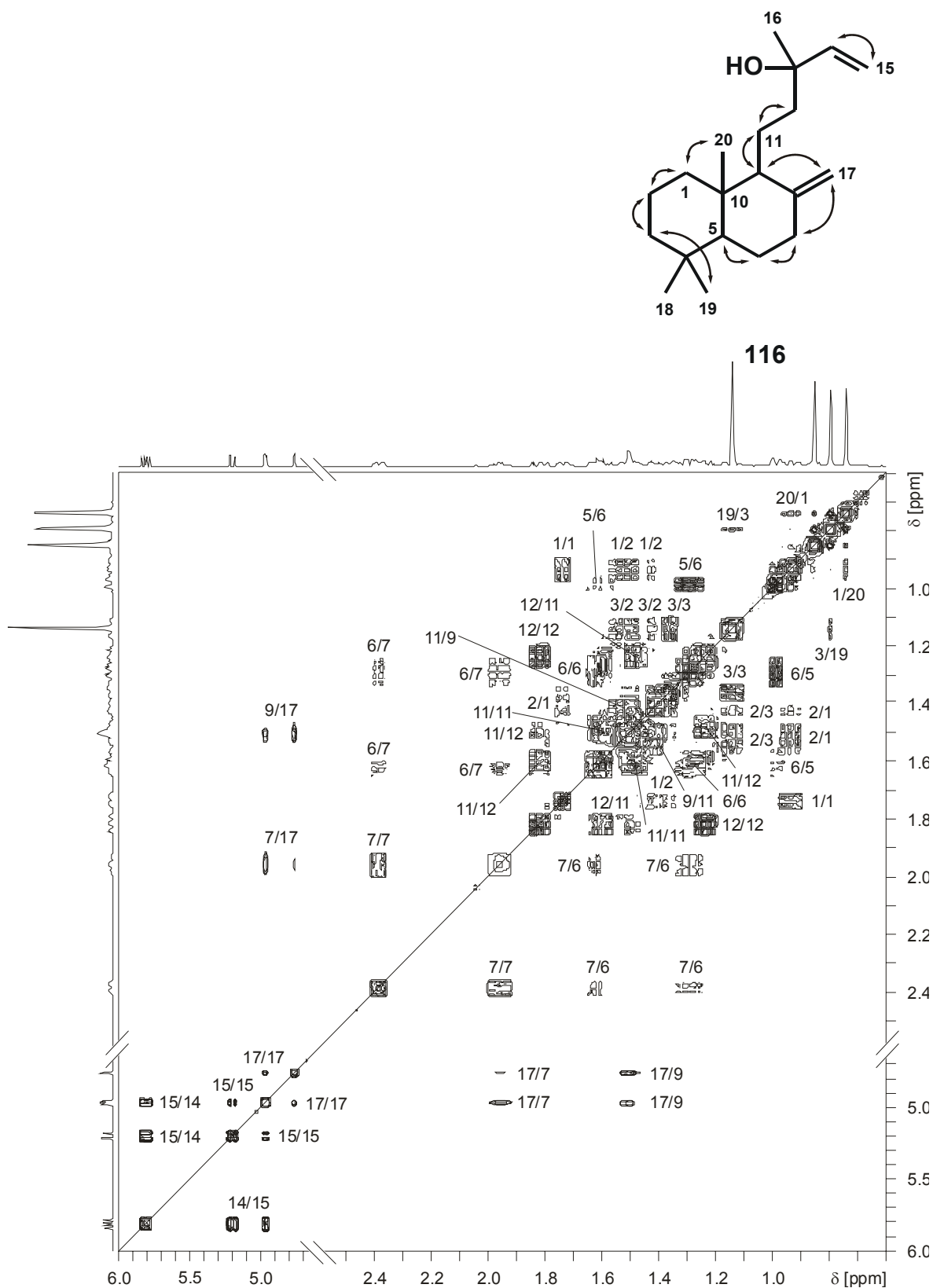
Abbildung 3.36, Seite 82

**116** ^{13}C -PENDANT-NMR-Spektrum**Abbildung 7.27** ^{13}C -PENDANT-NMR-Spektrum der Substanz **116** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

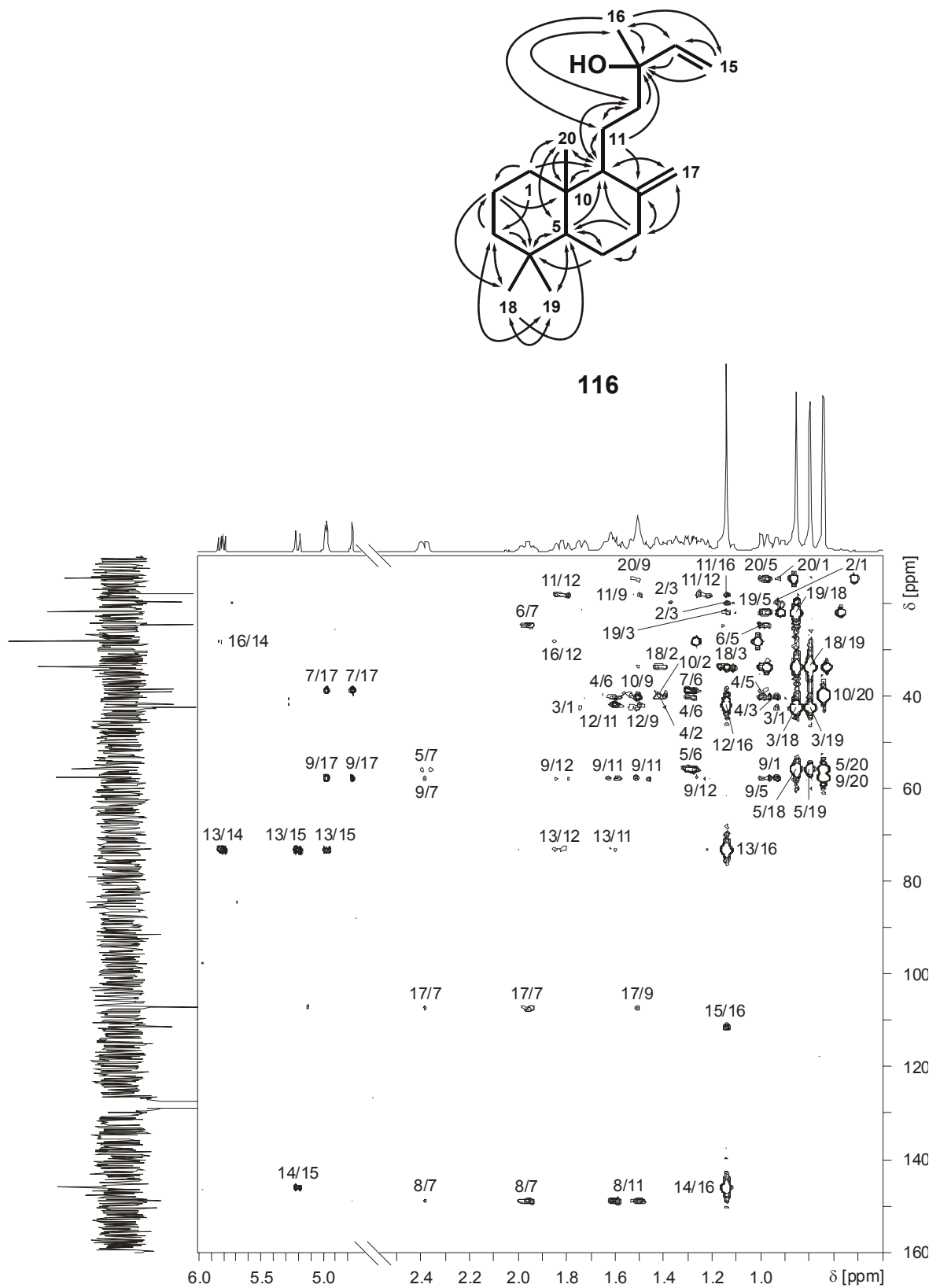
HMOC-Spektrum



H,H-COSY-Spektrum

Abbildung 7.29 H,H-COSYC-Spektrum der Substanz **116** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

HMBC-Spektrum

Abbildung 7.30 HMBC-Spektrum der Substanz **116** (in C_6D_6) aus *Axinella rugosa*

7.5 Veröffentlichung

J. Nat. Prod. 2005, 68, 759–761

759

Notes

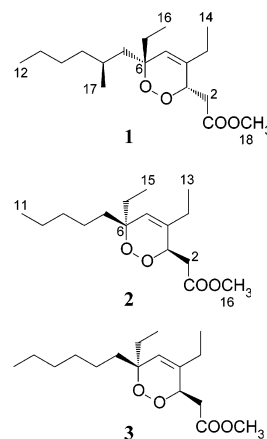
Cyclic Peroxides Derived from the Marine Sponge *Plakortis simplex*Michael Holzwarth,[†] Jean-Michel Trendel,[‡] Pierre Albrecht,[‡] Armin Maier,[§] and Walter Michaelis^{*,†}*Institut für Biogeochemie und Meereschemie, Universität Hamburg, Bundesstrasse 55, D-20146 Hamburg, Germany, Laboratoire de Géochimie Bioorganique, Université Louis Pasteur, ECPM, 25 rue Becquerel, F-67200 Strasbourg, France, and Oncotest GmbH, Am Flughafen 12-14, D-79108 Freiburg, Germany*

Received October 19, 2004

Two new cyclic peroxides, **2** and **3**, were isolated from a sample of the Norwegian sponge *Plakortis simplex*. Their structures including relative stereochemistry were elucidated by interpretation of MS and NMR data. Compound **3** exhibited moderate in vitro activity against six solid human tumor cell lines with IC₅₀ values in the range 7–15 µg/mL.

Sponges of the family Plakinidae are known to be a source of numerous biologically active metabolites.¹ The structures of these natural products include members of different compound classes such as lactones,^{2,3} alkaloids,⁴ glycolipids,⁵ and others. Another prominent family is formed by the cyclic peroxides and structurally related compounds,⁶ many of which possess a six-membered ring structure within a substituted fatty acid backbone.^{7–10} This class of compounds is represented by structure **1**, which has been described previously from *Plakortis* sp.¹¹ and *Plakortis* aff. *angulospiculatus*.¹² Peroxides such as these have proven to be potent agents with various activities such as antifungal,¹³ antibiotic,¹⁴ cytotoxic,^{9,15} antiplasmodial,^{16,17} or cardiac SR-Ca²⁺-pumping ATPase activating effects.¹⁸ In our search for new biologically active metabolites of boreal sponges, we purified two new cyclic peroxides, **2** and **3**, from a sample of *Plakortis simplex* (order Homosclerophorida, family Plakinidae). The current paper presents the isolation, structure elucidation, and cytotoxicity test results of these compounds.

The sponge sample was collected in summer of 1999 at the Norwegian Sula Ridge Reef from a water depth of 280 m. The collection was performed using a manned submersible. A MeOH/CH₂Cl₂ extract was dried and chromatographed over a silica gel column. Further purification of one fraction by HPLC on a RP-18 column using CH₃CN/H₂O as mobile phase led to the isolation of metabolites **2** and **3**. The two compounds showed no molecular ion peak by positive EIMS (70 eV) analysis, but did show [M + NH₄]⁺ ions as base peaks at *m/z* 302 for **2** and *m/z* 316 for **3** by CIMS using ammonia as reactant gas. Pseudomolecular ion peaks [M + H]⁺ were also observed by HRFABMS at *m/z* 285.2058 (285.2060 calculated for C₁₆H₂₉O₄) and *m/z* 299.2218 (299.2217 calculated for C₁₇H₃₁O₄), enabling assignment of the molecular formulas as C₁₆H₂₈O₄ and C₁₇H₃₀O₄ for **2** and **3**, respectively. The EIMS of **2** exhibits ions at *m/z* 266 and 255 corresponding to the loss of water and to the loss of an ethyl group, respectively. Likewise, **3** shows ions at *m/z* 280 and 269. The mass differences of 14



amu in these fragment ions, as well as in their molecular weights, indicate that the structures **2** and **3** vary only by one methylene group. The ¹H NMR spectrum of **2** (Table 1) shows signals for 28 protons, including three methyl triplets, one methyl singlet (δ 3.72, ester methyl), and two downfield signals, one at δ 5.51 ascribable to a vinylic proton and the other (δ 4.62) consistent with a proton located on an oxygen-bearing carbon atom. ¹³C and DEPT NMR spectra reveal the presence of seven methylene as well as six methyl and methine carbons. Moreover, three quaternary carbons can be observed, one single-bonded to an oxygen (δ 82.4), one olefinic (δ 137.6), and one carboxylic (δ 171.6). A strong heteronuclear coupling between the last mentioned carbon (C-1) with the protons of the methyl singlet (H-16), observed in the long-range ¹H–¹³C (^{2,3}J_{CH}) correlation data from an HMBC experiment (Table 2), indicates the presence of a methyl ester group. ¹H–¹H COSY (Table 2) and HSQC (¹J_{CH}) spectra revealed the proton connectivity pattern, which, together with the HMBC data, allowed establishment of the carbon framework. Thus, the backbone consists of an undec-4-enoic acid unit, which bears two ethyl groups at the C-4 and C-6 positions. Two carbon atoms, C-3 (δ 76.6) and C-6 (δ 82.4), are linked to heteroatoms, which must form an epidioxy

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +49-40-42838-5001. Fax: +49-40-42838-6347. E-mail: michaelis@geowiss.uni-hamburg.de.

[†] Universität Hamburg.

[‡] Université Louis Pasteur, Strasbourg.

[§] Oncotest GmbH, Freiburg.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Data of Compounds **1**, **2**, and **3** in CDCl_3

atom	1 ^a		2		3	
	δ_{C}^b	δ_{H}^b	δ_{C}^b	δ_{H}^b (multiplicity; J^c)	δ_{C}^b	δ_{H}^b (multiplicity; J^c)
1	171.6		171.6		171.7	
2	37.2	2.88	36.9	2.88 (dd; 16.0, 9.5)	37.0	2.88 (dd; 16.0, 9.5)
		2.55		2.56 (dd; 16.0, 3.0)		2.56 (dd; 16.0, 3.0)
3	76.6	4.59	76.6	4.62 (m)	76.7	4.61 (m)
4	137.6		137.6		137.7	
5	125.2	5.48	124.7	5.51 (ddd; 1.5, 1.5, 1.5)	124.8	5.51 (ddd; 1.5, 1.5, 1.5)
6	83.5		82.4		82.5	
7	42.4	1.45	34.8	1.46 (m)	34.9	1.46 (m)
		1.36				
8	28.4	1.43	22.9	1.15–1.35	23.4	1.15–1.35
9	38.3	1.22	32.2	1.15–1.35	29.8	1.15–1.35
10	29.3	1.22	22.4	1.15–1.35	31.6	1.15–1.35
11	22.9	1.22	14.0	0.87 (t; 7.0)	22.7	1.15–1.35
12	14.1	0.86	24.9	2.01 (m)	14.1	0.88 (t; 7.0)
13	24.9	1.99	11.7	1.08 (t; 7.5)	25.0	2.01 (m)
14	11.8	1.06	29.6	1.76 (dq; 14.0, 7.5)	11.8	1.08 (t; 7.5)
				1.62 (dq; 14.0, 7.5)		
15	30.9	1.73	7.9	0.89 (t; 7.5)	29.8	1.76 (dq; 14.0, 7.5)
		1.63				1.62 (dq; 14.0, 7.5)
16	8.2	0.87	51.8	3.72 (s)	8.0	0.89 (t; 7.5)
17	22.2	0.88			52.0	3.72 (s)
18	51.9	3.70				

^a See ref 12. ^b δ in ppm relative to TMS. ^c J given to the nearest 0.5 Hz.

Table 2. H,H COSY and HMBC NMR Correlations of **2** in CDCl_3

atom	H,H COSY ^a	HMBC ^b
2	3	1,3,4
3	2,5	1,2,4,5,12
5	3,12	3,4,6,7,12
7	[8,9,10] ^c	5,6,8,9
[8,9,10] ^c	7,11	7,8,9,10,11
11	[8,9,10] ^c	9,10
12	5,13	3,4,5,13
13	12	4,12
14	15	5,6,7,15
15	14	6,14
16		1

^a Correlations are given from the proton designated in the left column to the protons listed. ^b Correlations are given from the proton designated in the left column to the carbons listed. ^c Correlations from or to one of the given protons in brackets showing overlapping ^1H NMR resonances.

bridge and consequently a six-membered ring, due to the elemental composition and the unsaturation equivalents.

Relative chirality (*RS*) at C-3 and C-6 follows from NOESY data, i.e., correlations observed for H-3 with H-15 and one of the C-14 protons as well as between the most deshielded C-2 proton and one or more of the other protons located at C-8, C-9, or C-10. Details of absolute stereochemistry could not be determined, since the limited amounts of **2** and **3** isolated were employed for biological tests.

As suggested by EIMS and supported by ^{13}C NMR spectra (Table 1), compound **3** differs from **2** only in the presence of an additional methylene group. ^1H NMR spectra of both products (Table 1) are nearly superimposable, except for the 1.15–1.35 ppm region. On the basis of 2D NMR correlations, exactly the same structural features were evident in both compounds. Consequently, the backbone of **3** was established as a dodec-4-enoic acid unit. Comparison of ^1H and ^{13}C NMR data from **2** and **3** with those described for **1**¹² (Table 1) shows excellent agreement, except for the signals caused by atoms of, and close to, the side chain branching of **1**. On the basis of these results, the structures of **2** and **3** were assigned as shown. Substance **3** differs from the closest known compound **1** in the lack of the methyl branch at C-8.

Table 3. Antitumor Activity of **2** and **3** in Human Tumor Cell Lines

tumor cell line	IC_{50}^a	
	2	3
GXF 251L	>10.0	8.3
LXF 529L	>10.0	7.7
MAXF 401NL	>10.0	14.9 ^b
MEXF 642NL	>10.0	7.2
RXF 486L	>10.0	14.4 ^b
UXF 1138L	>10.0	14.1 ^b

^a IC_{50} in $\mu\text{g}/\text{mL}$. ^b Value extrapolated.

Peroxide **3** exhibited moderate cytotoxicity toward tumor cells, whereas peroxide **2** did not inhibit proliferation in any of the tumor cell lines tested up to a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Peroxide **3** selectively inhibited proliferation in gastric cancer (GXF 251L, IC_{50} = 8.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), non-small cell lung cancer (LXF 529L, IC_{50} = 7.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and melanoma (MEXF 462NL, IC_{50} = 7.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cell lines (Table 3). Mammary (MAXF 401NL, IC_{50} = 14.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$), renal (RXF 486L, IC_{50} = 14.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and uterin (UXF 1138L, IC_{50} = 14.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) cancer cell lines were slightly less sensitive.

Experimental Section

General Experimental Procedures. 1D (^1H , ^{13}C , DEPT 135) and 2D (^1H – ^1H COSY and NOESY; ^1H – ^{13}C HSQC and HMBC) NMR spectra were taken on a Bruker ARX-500 spectrometer operating at observation frequencies of 500 and 125 MHz for ^1H and ^{13}C nuclei, respectively. Data were recorded at 300 K in CDCl_3 using the standard Bruker software package. Chemical shifts (δ) are reported in ppm downfield from tetramethylsilane using the ^{13}C and the residual ^1H signals of the solvent as secondary references (δ 77.0 and 7.26, respectively). Coupling constants (J values) are given to the nearest 0.5 Hz. All mass spectra were obtained on a Micromass Autospec spectrometer. 3-Nitrobenzyl alcohol was used as matrix and PEG 400 as reference for HRFABMS. Liquid chromatography was performed over silica gel (Merck Kieselgel 60, 63–200 μm).

Sample Collection. During the research cruise POS 254 with the *RV Poseidon* in July 1999, the sponge was collected at the Sula Ridge Reef (64°04'50" N/08°01'40" E), Norwegian Shelf. The sampling was performed at a water depth of 280 m

Notes

and a water temperature of $\sim 8^\circ\text{C}$ by the manned submersible JAGO, which was equipped with a remote-controlled gripper arm. The light brown sponge was encrusting on dead coral material located at the peripheral region of the coral reef. The cylindrical formation of coral rubble and sponge specimen was ~ 10 cm in diameter and ~ 15 cm in length. The thickness of the coral-coating sponge was between 1 and 2 cm. The specimen was immediately frozen and kept at -20°C until analysis. A voucher specimen (POS 31VII99 22J1-20) has been deposited at the Institut für Biogeochemie und Meereschemie, Universität of Hamburg.

Extraction and Isolation. A 10.2 g (wet weight) sample of the sponge was separated from remaining coral rubble, fragmented into small pieces, and homogenized. It was exhaustively extracted with a mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:1, v/v). The solvent was evaporated under reduced pressure to yield 82 mg (0.8% of wet weight) of a pale yellowish oil. This oil was adsorbed on 0.5 g of Si gel and separated on a 10×1 cm Si gel column. A sequence of eluents with increasing polarity from *n*-hexane (1×75 mL) through CH_2Cl_2 (3×50 mL) and EtOAc (1×75 mL) to MeOH (1×100 mL) was used to produce six fractions. The third fraction overall (the second CH_2Cl_2 fraction) was further purified by reversed-phase HPLC using a C-18 column (Merck LiChrosphere RP18, $5 \mu\text{m}$, 250×10 mm). Multiple injections with 30% H_2O in CH_3CN (isocratic, 4 mL/min) yielded 1.3 mg of **2** (0.01% of wet weight) and 1.1 mg of **3** (0.01% of wet weight).

Antitumor Test. Effects of the test compounds on the proliferation of human tumor cells were determined in an assay, where human tumor cell lines growing as monolayers were treated with the test compounds and surviving cells were stained with a fluorescent dye. Details of the test procedure have been described elsewhere.¹⁹ Cell lines tested were derived from patient tumors engrafted as a subcutaneously growing tumor in NMRI nu/nu mice. Doubling times of the cell lines ranged between $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$ (MEXF 462NL) and $35 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ (MAXF 401NL). Antitumor efficacies were described by inhibitory concentrations (i.e., IC_{50}), reflecting concentration-dependent cytotoxicity. Extrapolated IC values are given if the exact value could not be determined within the test range, and if linear regression of existing T/C values would result in IC values within a range of 3-fold the highest test concentration. In the case of resistant cell lines, exhibiting no activities, IC values are expressed to be greater than the highest test concentration.

Methyl (3R*,6S*,Z)-4,6-diethyl-3,6-epidioxyundeca-4-enoate (2): ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; EIMS no molecular ion, fragment ions at m/z 266 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (2), 255 (39), 237 (20), 213 (17), 195 (32), 181 (100), 163 (49), 139 (67), 125 (38), 111 (32), 99 (32); CIMS m/z 302 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (100), 285 (10), 267 (16), 239 (19), 197 (28); HRFABMS m/z 285.2058 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{O}_4$, 285.2060).

Journal of Natural Products, 2005, Vol. 68, No. 5 761

Methyl (3R*,6S*,Z)-4,6-diethyl-3,6-epidioxydodeca-4-enoate (3): ^1H and ^{13}C NMR data, see Table 1; EIMS no molecular ion, fragment ions at m/z 280 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (1), 269 (29), 251 (20), 219 (18), 195 (83), 177 (75), 159 (32), 149 (38), 139 (100), 125 (49), 111 (43); CIMS m/z 316 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (100), 299 (12), 281 (13), 253 (18), 197 (55); HRFABMS m/z 299.2218 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{31}\text{O}_4$, 299.2217).

Acknowledgment. The authors gratefully thank T. Pape for preparation of the sponge during the sampling cruise, F. Hoffmann for taxonomic determination, and R. Graff for assistance in NMR experiments. This paper represents publication no. 31 of the research program BOSMAN (03F0256 A). Financial support was provided by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Supporting Information Available: ^1H and ^{13}C NMR spectra of compounds **2** and **3**. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References and Notes

- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 1–49, and previous reports in this series.
- Cafferi, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 13831–13840.
- Zampella, A.; Giannini, C.; Debitus, C.; D'Auria, M. V. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 257–263.
- Takeuchi, S.; Ishibashi, M.; Kobayashi, J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 3712–3713.
- Costantino, V.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Di Rosa, M.; Ianaro, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 271–276.
- Casteel, D. A. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 55–73.
- Takada, N.; Watanabe, M.; Yamada, A.; Suenaga, K.; Yamada, K.; Katsuhira, U.; Uemura, D. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 356–359.
- Fontana, A.; Ishibashi, M.; Shigemori, H.; Kobayashi, J. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1427–1429.
- Harrison, B.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1033–1037.
- Stierle, D. B.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 3396–3401.
- Braekman, J. C.; Daloz, D.; De Groot, S.; Fernandes, J. B.; Van Soest, R. W. M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1038–1042.
- Compagnone, R. S.; Piña, I. C.; Rangel, H. R.; Daggar, F.; Suárez, A. I.; Reddy, M. V. R.; Faulkner, D. J. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3057–3068.
- Gunasekera, S. P.; Gunasekera, M.; Gunawardana, G. P.; McCarthy, P.; Burren, N. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 669–647.
- Higgs, M. D.; Faulkner, D. J. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 3454–3457.
- Cafferi, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 7045–7056.
- Gochfeld, D. J.; Hamann, M. T. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1477–1479.
- Fattorusso, E.; Parapini, S.; Campagnuolo, C.; Basilio, N.; Tagliatela-Scafati, O.; Taramelli, D. *J. Antimicrob. Chemother.* **2002**, *50*, 883–888.
- Patil, A. D.; Freyer, A. J.; Carte, B.; Johnson, R. K.; Lahouratate, P. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 219–223.
- Dengler, W. A.; Schulte, J.; Berger, D. P.; Mertelmann, R.; Fiebig, H. H. *Anti-Cancer Drugs* **1995**, *6*, 522–532.

NP049665V