

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

Tryptophan-Abkömmlinge in wirbellosen Meerestieren:

Isolierung, Struktur und Funktion

vorgelegt von

Apothekerin Nicola Lysek

aus Freising

- 2002 -

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Apothekerin Nicola Lysek

aus Freising

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2002

Tryptophan-Abkömmlinge in wirbellosen Meerestieren:

Isolierung, Struktur und Funktion

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Lindel

Prof. Dr. Manfred Wießler

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1998 bis Mai 2002 am Pharmazeutisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt. Die Zellversuche wurden am Pharmazeutisch-Chemischen Institut sowie am Institut für Anatomie und Zellbiologie III der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg durchgeführt.

Meinem verehrten Doktorvater

Prof. Dr. Thomas Lindel

möchte ich sehr herzlich für die Überlassung dieses außerordentlich interessanten Themas, für sein herausragendes Engagement, sein Interesse und seine stete Diskussionsbereitschaft bei der Betreuung dieser Arbeit danken.

Herrn Professor Dr. Manfred Wießler danke ich sehr herzlich für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit und die Übernahme des Koreferats.

Für die Übernahme der Nebenfachprüfungen gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. Gert Fricker und Herrn Professor Dr. Jürgen Reichling.

Mein herzlicher Dank gilt ebenso:

Herrn Dr. W. Kramer für die Durchführung von NMR-Spezialmessungen, sowie Frau U. Hertle für NMR-Routinemessungen,

Herrn H. Rudy und Herrn P. Weyrich für die Anfertigung der Massenspektren und Elementaranalysen, sowie Herrn H. Götz und D. Holzmann für so manche nützliche Hilfe,

Herrn Priv.-Doz. Dr. R. Kinscherf und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Anatomie und Zellbiologie III der Universität Heidelberg für die herzliche Aufnahme und geleistete Hilfe,

den Auszubildenden M. Ludwig, D. Kokot, M. Lutz und N. Sauer für ihr Interesse und ihre stete Hilfsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit,

Herrn Dr. Gross und den Angestellten der massenspektrometrischen Abteilung der chemischen Institute der Universität Heidelberg für die Durchführung von massenspektroskopischen Messungen,

Herrn Prof. Dr. Joseph R. Pawlik, Biological Science and Center for Marine Science Research, Universität von North Carolina, Wilmington, für die Möglichkeit, Materialsammlungen in Wilmington/USA durchzuführen und an den marinen Forschungsexpeditionen an Bord der Seward Johnson vom 25.07. – 02.08.99 und vom 03.08. – 11.08.00 teilzunehmen,

Dem Alfred-Wegener- Institut im Bremerhaven für die Beschaffung der Organismen aus der Nordsee, und der BASF für die Unterstützung und Durchführung von Bioassays,

meiner AK- Kollegin Frau Apoth. Tanja Mülhaupt für die Durchführung der Bioassays, den vielen wertvollen Diskussionen und der guten Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Isolierung und Strukturaufklärung,
meinen AK-Kollegen Herrn Dr. M. Hochgürtel und Herrn Dr. H. Hoffmann für die wertvollen Diskussionen und für sorgfältige und zügige Korrektur meiner Arbeit,
meinen AK-Kollegen Frau Dr. D. Leone-Stumpf, DEA. D. Jacquote, Dipl.- Chem. L. Krauss, P. Böhler, Herrn G. Breckle und Dipl.- Chem A. Schmid, für das gute Arbeitsklima und die geleistete Unterstützung,

Herrn Apotheker M. Bläss und Herrn Dr. C. Claus für die Unterstützung bei der Ausführung der Apoptosetests, sowie Herrn T. Noe für die Durchführung der Tests.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Freund Jörg für seine Geduld und seine Hilfsbereitschaft bei der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle meinen besonderen Dank für die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft, durch die der Abschluss eines Hochschulstudiums und die Durchführung der Promotion erst möglich wurden, aussprechen.

Inhaltsverzeichnis

I	THEORETISCHER TEIL	1
1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Indolalkaloide aus Meeresorganismen	7
2.1	Tryptophan-Biosynthese	7
2.2	Indolalkaloide aus marinen Organismen – eine Übersicht	10
2.2.1	Indolalkaloide	10
2.2.2	Tryptophanalkaloide	11
2.2.3	Tryptamin-Abkömmlinge	12
2.2.4	Desaminotryptaminalkaloide	15
2.2.5	Sonstige Indolalkaloide	16
2.2.6	Terpenoide Indolalkaloide	18
2.2.7	Cyclopeptide	18
2.3	Biologische Aktivitäten mariner Indolalkaloiden	20
3	Das Moostierchen <i>Flustra foliacea</i>	26
3.1	Inhaltsstoffe des Moostierchens <i>Flustra foliacea</i>	26
3.1.1	Sauerstofffreie Pyrroloindole	26
3.1.2	Sauerstoffhaltige Pyrroloindole	27
3.1.3	Nicht-cyclisierte Tryptamin-Abkömmlinge	28
3.1.4	Andere Sekundärmetaboliten	29
3.2	Biogenetischer Ursprung der Prenylgruppe	30
3.2.1	Der Mevalonat-Biosyntheseweg	30
3.2.2	1-Deoxy-D-xylulose-Biosyntheseweg	31
3.2.3	Einführung von Prenylgruppen in Sekundärmetaboliten	32
3.3	Biologische Aktivitäten	34
3.3.1	Physostigmin als Cholinesterase-Inhibitor	34
3.3.2	Biologische Aktivitäten von Naturstoffen aus <i>Flustra foliacea</i>	35
3.4	Probengewinnung	36
3.5	Isolierung	37
3.5.1	Gelchromatographie	37

3.5.2	Dereplikation	39
3.6	Strukturaufklärung	44
3.6.1	Fraktion 4 der Gelchromatographie: Flustramin A (133), Flustramin D (135) und Dihydroflustramin C (132)	44
3.6.2	Fraktion 5 der Gelchromatographie: Deformylflustrabromin (172)	47
4	Der Schwamm <i>Hymeniacidon heliophila</i>	56
4.1	Lichtschutz und Antioxidantien in Meeresorganismen	56
4.2	Isolierung und Strukturaufklärung	59
4.2.1	Extraktion, Isolierung und Struktur von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) (186) und Tryptophan (22)	60
4.2.2	Strukturaufklärung	60
4.2.3	Biosynthese und Metabolismus des 5-Hydroxytryptophans (186)	61
4.3	Konzentrationsbestimmung von 5-Hydroxytryptophan (186) durch HPLC und NMR-Spektroskopie	61
4.3.1	Quantifizierung durch HPLC	62
4.3.2	Quantifizierung durch NMR-Spektroskopie	63
4.3.3	Auswertung der Isolierungen	64
4.3.4	Auswertung der Quantifizierungen	65
4.3.5	Biologische Aufgaben von 5-Hydroxytryptophan (186) im Schwamm <i>Hymeniacidon heliophila</i>	65
4.4	5-oxygenierte Indole im Sekundärmetabolismus	66
4.4.1	Einfache 5-Hydroxyindole	67
4.4.2	β -Carboline und Manzamine	67
4.4.3	Gelliusin	71
4.4.4	Cyclopeptide	72
4.5	Biochemische Funktion und biologische Aktivität 5-oxygenierter Indole	73
4.6	Neuer Naturstoff (226) aus dem Schwamm <i>Hymeniacidon heliophila</i>	76
4.6.1	Isolierung	76
4.6.2	Strukturaufklärung	76
5	Schutzwirkung von 5-HTP (186) auf Humanzellen – Apoptose und Antioxidantien	82
5.1	Was ist Apoptose?	82

5.2	Ursachen der Apoptose	82
5.3	Aufbau und Prinzip eines erforderlichen Bioassays	83
5.3.1	Auswertung der Messergebnisse	85
5.4	Messergebnisse	86
5.5	UV-Schutz und 5-HTP (186)	87
6	Application und von [1,2-¹³C₂] Acetat aus Retardtabletten	90
6.1	Einbau von [1,2- ¹³ C ₂] Acetat in Aminosäuren und Oroidin	90
6.1.1	Biosynthesen von L-Lysin (233), L-Prolin (265), L-Ornithin (235) und L-Histidin (236)	92
6.1.2	Einbau von [1,2- ¹³ C ₂] Acetat in die Aminosäuren	97
6.2	Gabe von [1,2- ¹³ C ₂] markiertem Acetat	97
6.2.1	Tablettenherstellung und Messung der Acetat-Freisetzung	98
6.2.2	Applikation von [1,2- ¹³ C ₂] markiertem Acetat an <i>Agelas dispar</i>	99
7	Zusammenfassung	102
II	EXPERIMENTELLER TEIL	108
1	Arbeitstechniken und verwendete Geräte	108
2	Isolierung des Moostierchens <i>Flustra foliacea</i>	109
2.1	HPLC-MS und MS/MS	110
2.2	Flustramin A (133)	110
2.3	Flustramin D (135)	111
2.4	Dihydroflustramin C (132)	112
2.5	Deformylflustrabromin (172)	113
3	Naturstoffe aus dem Schwamm <i>Hymeniacidon heliophila</i>	114
3.1	5-Hydroxytryptophan (186)	114
3.1.1	Identifizierung	115
3.1.2	Quantifizierung	116
3.2	Naturstoff (226) aus dem Schwamm <i>Hymeniacidon heliophila</i>	118
4	Zellversuche	119
4.1	Bereitung des Zellkultur-Mediums	119

4.2	Isolierung der Monozyten	119
4.3	Bestimmung der Zellzahl	120
4.4	Kultivierung	120
4.5	Bestimmung der Apoptoserate	120
5	Biosynthese	120
5.1	Retardtabletten	120
5.2	Freisetzungskinetik	121
5.3	Aquariumsversuche	122
5.4	Freiwasserversuche	122
5.5	Extraktion und Isolierung	122
6	Anhang	124
III	LITERATURVERZEICHNIS	130

Abkürzungsverzeichnis

5-HTP:	5-Hydroxytryptophan
CH ₃ OH:	Methanol
CHCl ₃ :	Chloroform
CI:	Chemical-Ionisation
DMSO:	Dimethylsulfoxid
EI:	Elektronenstoßionisation
ESI:	Elektronensprayionisation
FAB:	fast-atom-bombardement
HMBC:	Heteronuclear Multible Bond Correlation
HOAc:	Essigsäure
HPLC:	High Perfomence Liquid Chromatography
HRFAB:	High Resolution FAB
IC ₅₀ :	Inhibitor Concentration 50%
IR:	Infrarot
MS:	Massenspektrometrie
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance
<i>n</i> -BuOH:	<i>n</i> -Butanol
SR:	Sarcoplasmatisches Retikulum
TFA:	Trifluoressigsäure
TMP:	Trimethylpentan
s	strong (IR)
m	medium (IR)
w	weak (IR)
s	Singulett (NMR)
d	Dublett (NMR)
t	Triplett (NMR)
m	Multiplett (NMR)

I Theoretischer Teil

1 Einleitung und Problemstellung

„Naturstoff“ ist der allgemeine Begriff für Substanzen, die in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen. Sie entstammen überwiegend dem Sekundär- aber auch dem Primärstoffwechsel. Primärverbindungen, d. h. die Metaboliten des den Fetten, Kohlenhydraten und Proteinen zu Grunde liegenden Stoffwechsels, sind überall in lebenden Organismen präsent. Im Gegensatz hierzu stehen die Sekundärstoffe, die sich vom Primärstoffwechsel ableiten und sich meist nur auf bestimmte Organismen oder Organismengruppen beschränken. Sekundärmetaboliten sind meist von erheblicher ökologischer Bedeutung, denn sie bieten den Lebewesen Schutz vor Fressfeinden, Nahrungs- und Raumkonkurrenten oder Infektionen und damit bessere Überlebenschancen. Zudem können sie Aufschluss über verwandtschaftliche Zusammenhänge bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen geben^[1].

Die Naturstoffchemie umfasst die Isolierung und Strukturaufklärung von Naturstoffen, ihre Partial- und Totalsynthese und ihre Biogenese. Dazu gehört auch die Aufklärung ihrer Wirkungsweise^[1].

Über 60 Prozent der Arzneimittel, die in der Zeit von 1989 – 1995 am Markt erhältlich waren oder sich in der klinischen Phase befanden, waren natürlichen Ursprungs^[2] oder dienten als Leitstrukturen. Das zeigt, dass es für die pharmazeutische Industrie von großer Wichtigkeit ist, neue Leitstrukturen für Arzneimittel aus der Natur zu finden. Dabei spielen die Identifizierung neuer Strukturen mit Hilfe spektroskopischer Methoden und das Screening von Substanzbibliotheken auf biologische Wirkung die wichtigste Rolle. Wachsende Bedeutung erlangen molekularbiologische Methoden, die die kombinatorische Biosynthese besonders von Polyketiden erlauben.^[3,4]

Während man Landpflanzen und -tiere schon seit Beginn des 19. Jahrhundert intensiv erforscht hatte, begann man damit bei marinen Organismen erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts. Verstärkt mit der Erfindung der Tauchtechnologie Mitte des 20. Jahrhunderts wurde die Welt der Ozeane für Forscher direkt zugänglich. Viele marine Organismen wie Schwämme, Korallen und auch Tange leben festgewachsen

an Riffen oder ähnlichen Untergründen im Meer. Dort haben sie nur einen geringen Lebensraum zur Verfügung. Da sie sich nicht durch Flucht vor Fressfeinden schützen können, entwickelten sie toxische Substanzen, um ihren Lebensraum und ihr Leben zu verteidigen. Naturstoffe mit bekannter biologischer Funktion sind von steigendem Interesse für neue Leitstrukturen und für pharmakologisch aktive Verbindungen. Welche wichtige Rolle sie hierbei spielen, zeigt eine Studie vom National Cancer Institute: Von 6540 getesteten tierischen Organismen aus dem Meer zeigten fast 2% eine signifikante cytotoxische Aktivität, im Gegensatz dazu zeigten von 18293 terrestrischen Pflanzen weniger als 0.5% eine signifikante Cytotoxizität (**Abb. 1**).

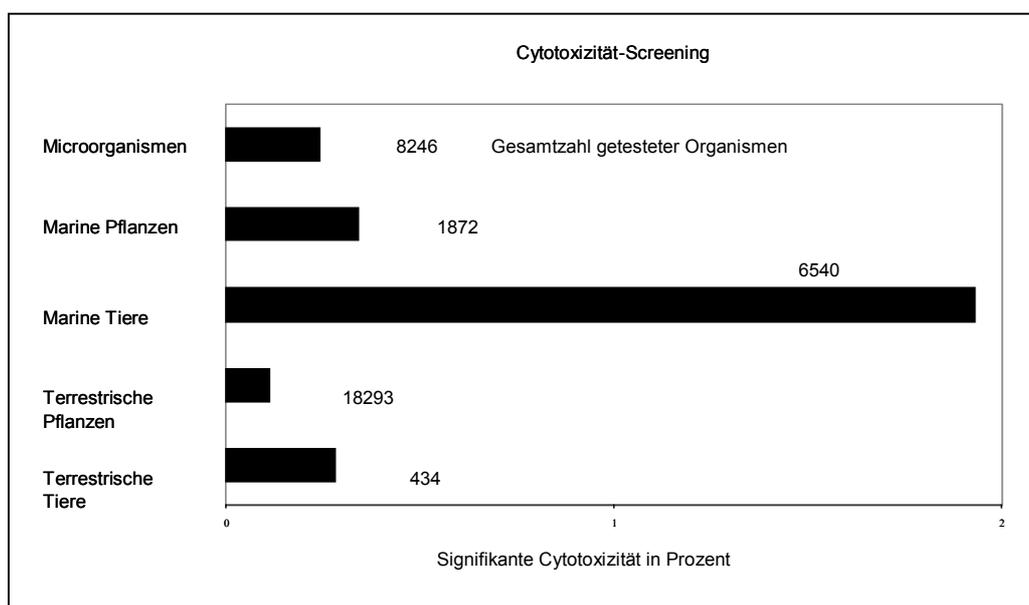
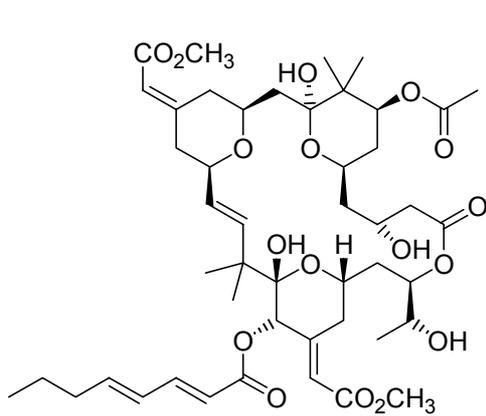
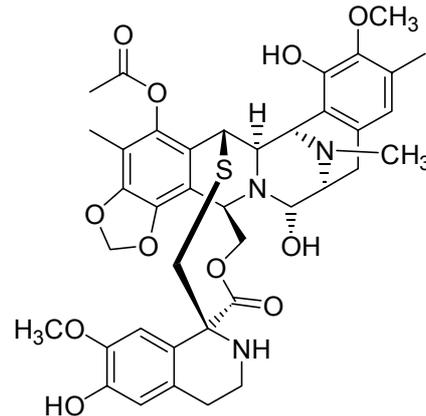


Abb. 1: Cytotoxizität-Screening des National Cancer Institut von Organismen^[5].

Eine der bekanntesten cytotoxischen marinen Verbindungen ist das Bryostatin **1**(**1**). Es wurde schon 1982 von Pettit et al.^[6] aus dem Moostierchen *Bugula neritina* isoliert. Die Verbindung ist ein Agonist der Proteinkinase C und wirkt cytotoxisch gegen P388-Zelllinien mit einem ED₅₀-Wert von 0.89 µg/mL. Im Dezember 2001 wurde **1** in Kombination mit Taxol zur klinischen Phase II für die Behandlung von Speiseröhrenkrebs zugelassen. Der für die klinische Anwendung z. Zt. meistversprechende marine Naturstoff ist das Ecteinascidin 743 (**2**), das 1990 von Rinehart et al.^[7] aus dem Manteltierchen *Ecteinascidia turbinata* isoliert wurde. **2** wirkt gegen Leukämie-Zellen (L1210) mit einem IC₅₀-Wert von 0.5 ng/mL. Die Wirkung beruht auf der Methylierung des Guanins in der kleinen Furche der DNA.

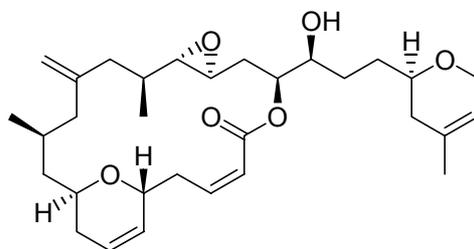


1: Bryostatin 1



2: Ecteinascidin 743

Eine andere interessante Verbindung ist das ω -Conotoxinpeptid, bestehend aus 25 Aminosäuren, isoliert aus der marinen Kegelschnecke *Conus magus*. Es wurde 1982 von McIntosh et al.^[8] isoliert und befindet sich als Analgetikum in der Klinischen Phase III. Im Jahr 2000 wurde es in den USA vorläufig zugelassen, die endgültige Zulassung wird Ende dieses Jahres erwartet^[9]. Das Conotoxinpeptid ist ein Neuronen-spezifischer Calcium-Kanal-Blocker vom N-Typ. Er wirkt bei Patienten schmerzstillend, bei denen Opiate nicht anschlagen^[10]. Das 1988 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander isolierte Laulimalid^[11,12] aus dem Schwamm *Spongia mycofijiensis* und der Nacktschnecke *Chromodoris lochi* zeigt ein cytotoxisches Potential gegen Brustkrebs und Ovariencarcinom ($IC_{50} = 5.7$ nM (MAD-MB-435); $IC_{50} = 11.5$ nM (SK-OV-3)). Die Wirkung von Laulimalid (**3**) ist vergleichbar mit der von Taxol.



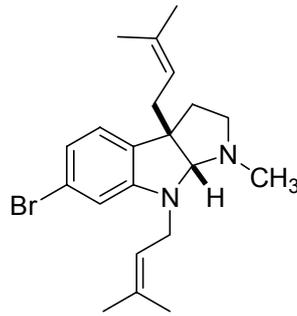
3: (-) Laulimalid

Diese Wirkstoffe lenken den Blick auf marine wirbellose Tiere wie Seegurken, Seehasen, Schnecken, Manteltierchen, Würmer und natürlich Moostierchen und Schwämme. Besonders die Schwämme (Porifera) und Moostierchen (Bryozoa) aus mediterranen, tropischen, subtropischen und selbst borealen Meeren enthalten eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten.

Im Verlauf dieser Arbeit sollten die drei im Folgenden genannten Organismen auf ihre Inhaltsstoffe und deren pharmazeutische, biologische und ökologische Rolle untersucht werden.

1. Ein bekanntes Moostierchen aus der Nordsee ist *Flustra foliacea*, das auch auf Grund seines Aussehens als „Blättermoostierchen“ bekannt ist. Seine Sekundärstoffe, z. B. die Flustramine, sind Tricyclen, die sich vom Grundbaustein Tryptophan bzw. Tryptamin ableiten. Von diesen sind verschiedene Derivate bekannt, z. B. die Flustraminole oder Flustrarine. Es sind zudem Sekundärmetaboliten mit bicyclischer Grundstruktur bekannt.

Die bisher isolierten Verbindungen zeigen nur moderate biologische Aktivitäten, etwa die muskelrelaxierende Wirkung von Flustramin B bei Rattenzwerchfellen mit einem IC_{50} -Wert von 63 $\mu\text{g/mL}$. Antibakterielle und fungizide Aktivitäten waren jedoch nicht signifikant. Trotz der Vielzahl der bekannten Sekundärmetaboliten aus *Flustra foliacea* liegen nur wenige Erkenntnisse über die Biogenese der einzelnen Verbindungen vor. Auch sind offensichtlich nur wenige biologische Aktivitäten dieser Verbindungen bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, weitere Sekundärmetaboliten aus dem Moostierchen zu isolieren. Zum einen sollten sie Aufschluss über die Biosynthese einiger schon bekannter Metaboliten geben und zum anderen sollten neue biologische - und möglichst pharmakologisch interessante - Verbindungen gefunden werden.



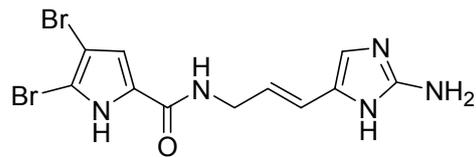
4. Flustramin B

2. Von besonderem Interesse sind die Organismen im Gezeitenbereich. Dort sind sie bei Ebbe extremen Umwelteinflüssen ausgesetzt: Direkte Sonneneinstrahlung einschließlich dem damit verbundenen UV-Licht, hohe Salzkonzentrationen beim Austrocknen und leichtere Auffindbarkeit durch Fressfeinde. Gerade über den Licht- bzw. UV-Schutz in marinen Organismen ist nur wenig bekannt. Bisher bekannte Verbindungen sind u. a. Mycosporin-ähnliche Substanzen. Sie schützen den Organismus vor UV- Licht durch Absorption und moderate antioxidative Aktivitäten. Potterat¹³ stellte in einem Übersichtsartikel marine Antioxidantien vor.

Ein Beispiel für das Überleben unter starker UV-Einstrahlung ist der subtropische Schwamm *Hymeniacidon heliophila*, der im Gezeitenbereich lebt und sich bei Ebbe oberhalb der Wasseroberfläche befindet. Er wurde deshalb in die Untersuchungen einbezogen.

Der Schwamm *Hymeniacidon heliophila* ist wie oben erwähnt durch die starke UV- Belastung einem extremen oxidativen Stress ausgeliefert. In ihm waren deshalb antioxidative bzw. vor Strahlenschäden schützende Substanzen zu erwarten. Dies regte die Entwicklung eines Bioassays an, der auf der Apoptose, dem programmierten Zelltod, beruht.

3. Weitere bekannte Schwammfamilien sind die *Agelasidae*, *Axinellidae* und die *Halichondridae*. Der bekannteste Vertreter der Sekundämetaboliten in diesen Familien ist das Pyrrol-Imidazol-Alkaloid Oroidin, das den Grundbaustein für viele weitere Sekundärmetaboliten bildet.



5: Oroidin

In den letzten Jahren erfolgten Untersuchungen zur biologischen Funktion und zur Biosynthese. Die Biosynthese des Oroidins konnte allerdings noch nicht geklärt werden. Eine Schwierigkeit bestand darin, dass marine Schwämme in Aquarien nur schwer zu züchten und zu halten sind. Für Untersuchungen mit markierten Substanzen sind sie nur äußerst schwer zugänglich.

Im Verlauf dieser Arbeit sollte zum einen ein Verabreichungssystem entwickelt werden, mit dem man die Möglichkeit besitzt, Organismen markierte Substanzen unter Wasser zu applizieren. Zum anderen sollte die Biosynthese des Oroidins aufgeklärt werden.

Diese Arbeit galt deshalb den folgenden Zielen:

- Isolierung von weiteren Verbindungen aus dem Moostierchen *Flustra foliacea*, die biologische Aktivitäten zeigen und Aufschluss über die Biosynthese der schon bekannten Sekundärmetaboliten geben,
- Isolierung von Sekundärmetaboliten aus dem Schwamm *Hymeniacidon heliophila* und Aufschluss über seinen antioxidativen Schutzmechanismus,
- Entwicklung eines neuen Apoptose-Bioassays mit UV- Licht als oxidativem Stressor,
- Entwicklung eines Systems zur Applikation markierter Substanzen für Biosyntheseversuche unter Wasser,
- weitere Aufklärung der Biosynthese des Oroidins.

2 Indolalkaloide aus Meeresorganismen

Indolalkaloide sind auf Grund ihrer Struktur und biologischen Wirkungen von hohem wissenschaftlichen Interesse. Sie sind als Sekundärmetaboliten von zahlreichen Landlebewesen bekannt, aber auch in marinen Organismen werden sie zunehmend gefunden. Diese Verbindungen helfen den Organismen im Kampf vor Fressfeinden, Infektionen und Konkurrenten um Nahrung oder Lebensraum. Die meisten Indolalkaloide leiten sich von der Aminosäure Tryptophan ab, die deswegen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel dieser Verbindungen einnimmt. Ausnahmen sind die Betalaine, die über den Tyrosinstoffwechsel gebildet werden.

Ein bekanntes Beispiel für Indolalkaloide von Landpflanzen ist Physostigmin (**129**), das aus der Calabar-Bohne (*Physostigma venenosum*) isoliert wurde.

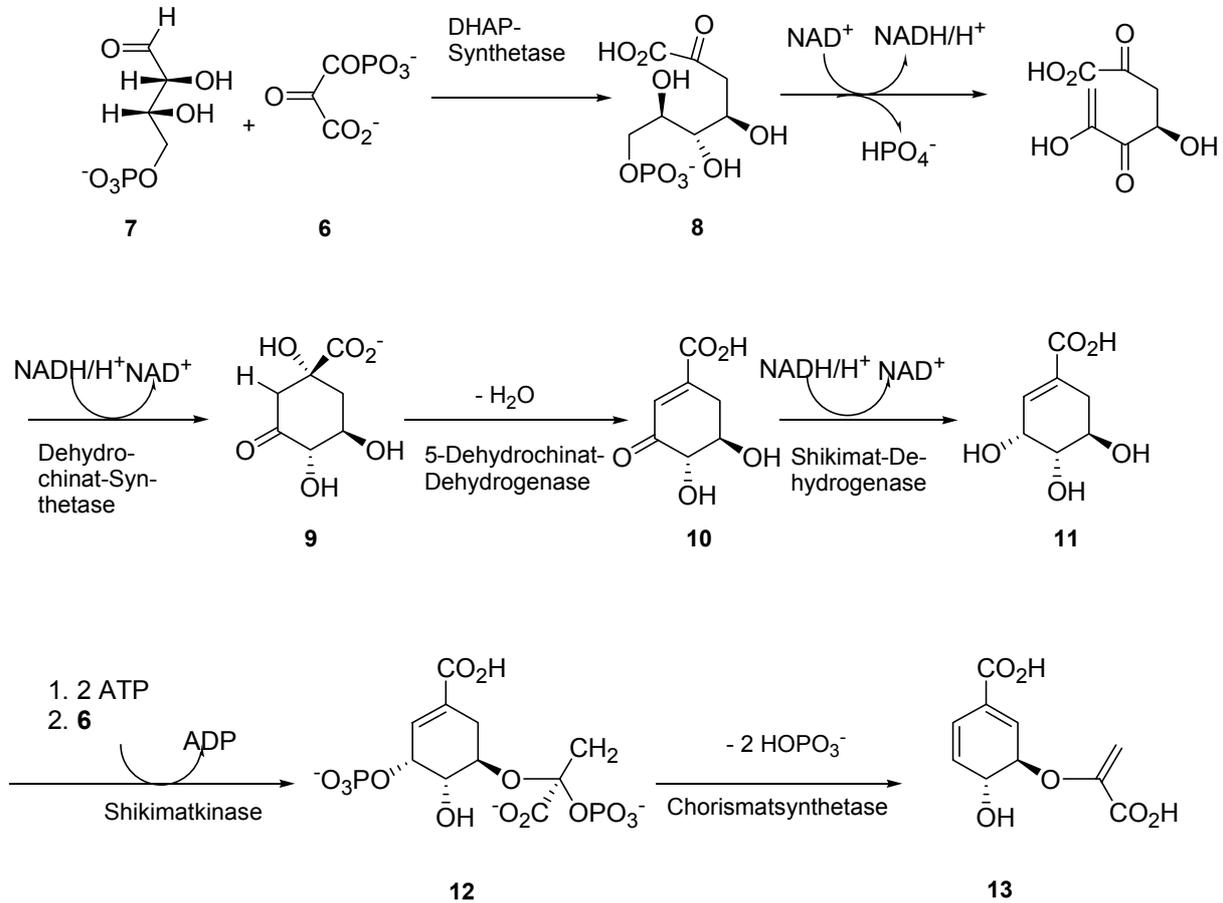
Die folgende Übersicht soll zeigen, wie variabel diese Grundstruktur allein bei marinen Organismen ist - und welches chemisch-pharmazeutische und biologische Potential diese Verbindungen besitzen.

2.1 Tryptophan-Biosynthese

Tryptophan ist eine für den Menschen essentielle Aminosäure, die von Pflanzen und Mikroorganismen synthetisiert und mit der Nahrung aufgenommen werden muss. Aus Sicht der Biosynthese stammen Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin vom Shikimisäureweg ab.

Phosphoenolpyruvat (**6**), ein Zwischenprodukt der Glykolyse, kondensiert mit Erythrose-4-phosphat (**7**) aus dem Pentosephosphatweg über die DHAP-Synthetase zu Desoxyarabinoheptulosonat-7-Phosphat (**8**). Am Kohlenstoff C-4 erfolgt eine Oxidation durch NAD^+ mit anschließender Phosphatabspaltung. Unter der Katalyse der Dehydrochinat-Dehydrosynthetase und NADH/H^+ entsteht 3-Dehydrochinat (**9**). Wasserabspaltung unter Katalyse durch die 5-Dehydrochinat-Dehydrogenase führt zu 3-Dehydroshikimisäure (**10**), die durch NADH/H^+ zur Shikimisäure (**11**) reduziert und durch die Shikimatkinase und ATP phosphoryliert wird. Es folgt eine Kondensation des entstandenen Shikimisäure-3-phosphats mit einem weiteren Phosphoenolpyruvat (**6**) zu dem Zwischenprodukt 5-Enolpyruvoylshikimat-3-

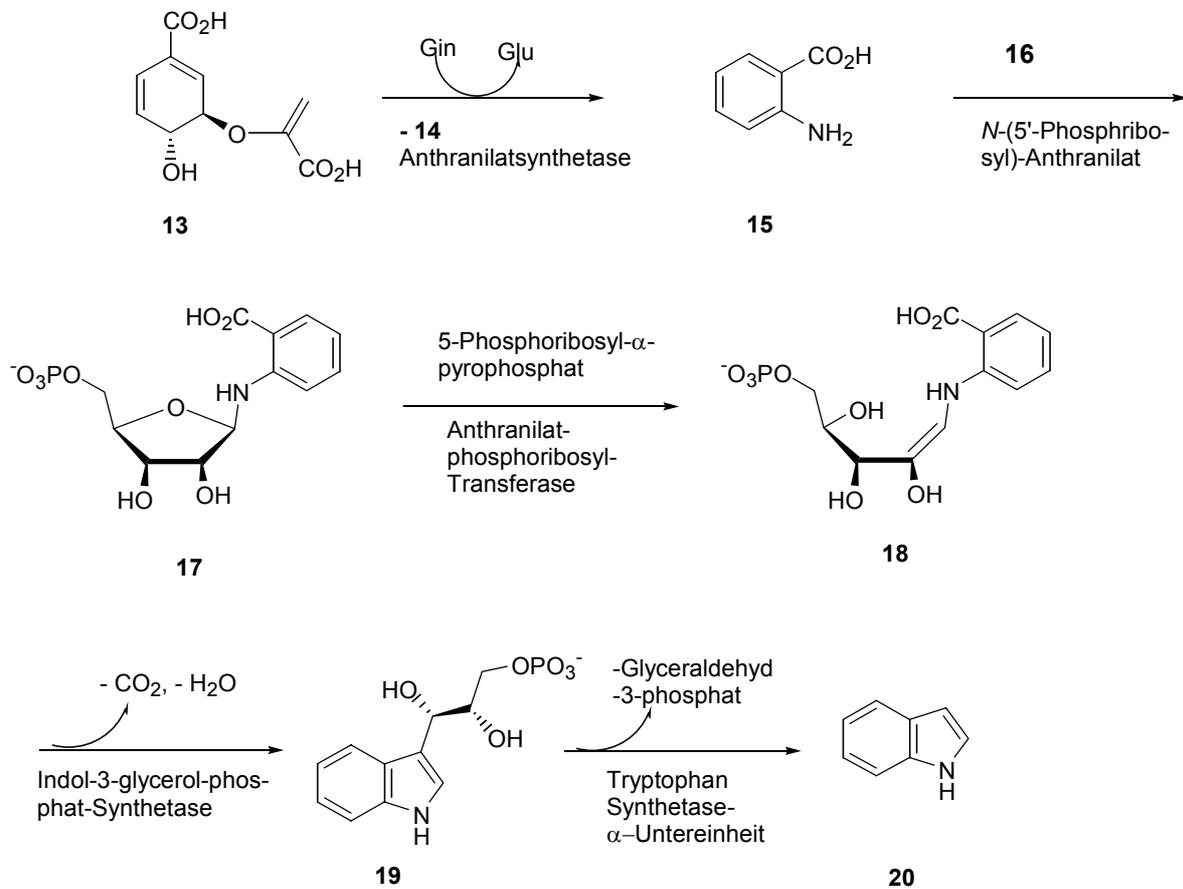
phosphat (**12**). Durch die Abspaltung von 2 Phosphaten und durch die Chorismatsynthetase bildet sich Chorismat (**13**) (**Schema 1**).



Schema 1: Tryptophan-Biosynthese: Biosynthese des Chorismat.

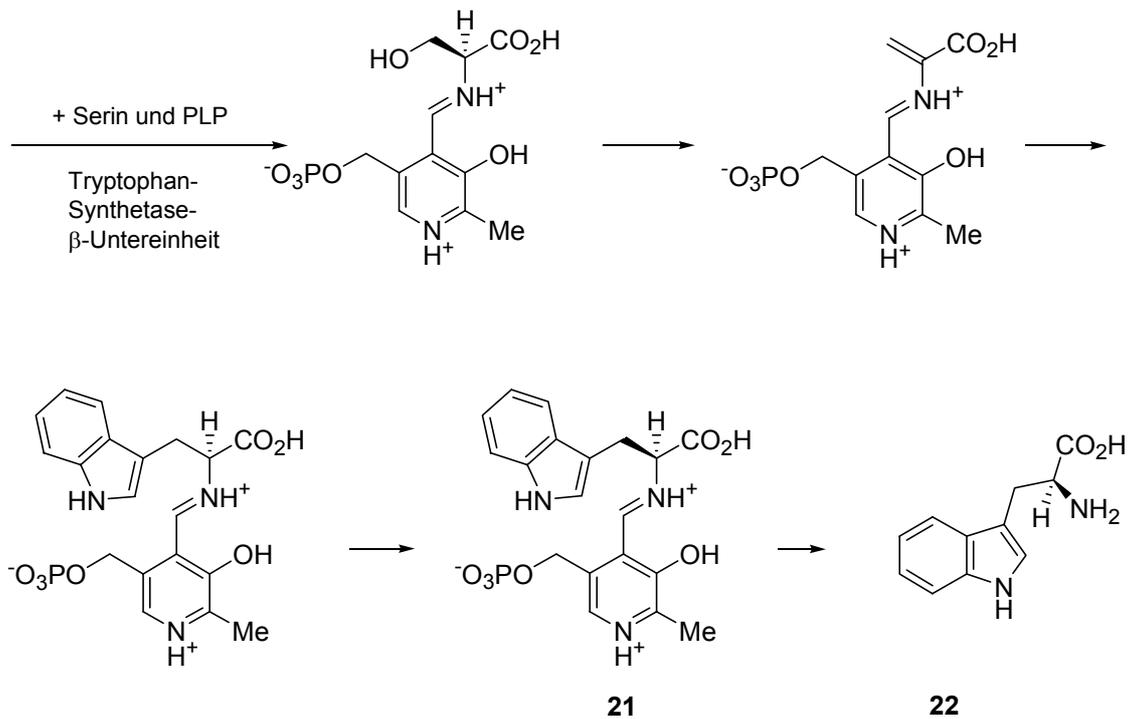
Ausgehend von Chorismat (**13**) verlaufen die Biosynthesewege der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin vom Weg des Tryptophans ab. Nach der Abspaltung von Pyruvat (**14**) und der Einführung einer Aminogruppe durch Glutamin, das in vielen Biosynthesereaktionen als Aminogruppendonor fungiert, entsteht Anthranilsäure (**15**). Diese kondensiert mit 5-Phosphoribosyl- α -pyrophosphat (**16**), der aktivierten Form von Ribosephosphat, zu *N*-5'-Phosphoribosylantranilat (**17**). Diese Reaktion wird energetisch durch die Hydrolyse des Pyrophosphates ermöglicht. *N*-5'-Phosphoribosylantranilat-Isomerase lagert den Riboseanteil der Verbindung zu Enol-1-*o*-carboxyphenylamino-1-deoxyribulosephosphat (**18**) um, das durch Decarboxylierung und Wasserabspaltung zu Indol-3-glycerolphosphat (**19**) wird. Die

Abspaltung von Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch die α -Untereinheit der Tryptophansynthetase katalysiert, es entsteht ein Indol (**20**) (**Schema 2**).



Schema 2: Tryptophan-Biosynthese: Biosynthese des Indols.

Die β -Untereinheit katalysiert die Übertragung des Serins auf das Indol zur Bildung von L-Tryptophan (**22**). Im aktiven Zentrum der β -Untereinheit befindet sich ein Pyridoxalphosphat (PLP) als prosthetische Gruppe, an die das Serin bindet. Serin wird dehydroxyliert und kondensiert mit dem Indol. Durch Umlagerung und Abspaltung des PLP-Komplexes (**21**) wird L-Tryptophan (**22**) frei. α - und β -Untereinheiten der Tryptophansynthetase können die einzelnen Reaktionen auch isoliert voneinander katalysieren, allerdings verlaufen diese Reaktionen langsamer als im Komplex, denn die α -Untereinheit gibt das gebildete Indol aus dem Enzym nicht mehr frei, sondern leitet es direkt zur β -Untereinheit weiter (**Schema 3**).^[14]



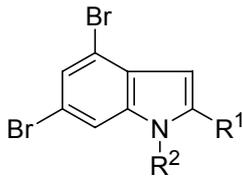
Schema 3: Tryptophan-Biosynthese.

2.2 Indolalkaloide aus marinen Organismen – eine Übersicht

Das Indol bildet die Grundeinheit und die Vorstufe der Aminosäure Tryptophan (**22**). Im Verlauf der Biosynthese kommt es zu Veränderungen des Tryptophan-Grundgerüsts, wie 2,3-Dihydroindol oder Verbindungen bei denen die Teilstrukturen z. B. Tricyclen sind. Im Folgenden soll eine Übersicht über Indolalkaloide aus Meeresorganismen gegeben werden.

2.2.1 Indolalkaloide

Bei diesen Alkaloiden ist die Grundstruktur das Indol, das mit verschiedenen Resten substituiert ist, wie es bei den Verbindungen **23**, **24**, **25** und **26**^[15] aus *Glossobalanus sp.* der Fall ist. Die Verbindungen **27**, **28**, **29**, **30**, **31** und **32**^[16] aus *Darcatas orbita* sind an der Position 2 mit einer Schwefelgruppe substituiert. Eine Auffällige Struktur zeigt Trisindolin^[17] (**34**) aus dem Schwamm *Hyrtios altum*, an dem drei Indole miteinander verknüpft sind (**Abb. 2**).

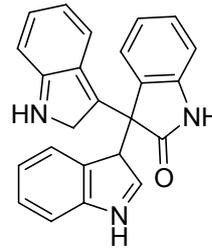


23: $R^1 = R^2 = H$: 4,6-Dibromindol

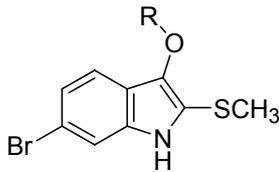
24: $R^1 = H, R^2 = Ac$: *N*-Acetyl-4,6-dibromindol

25: $R^1 = CH_3, R^2 = H$: 4,6-Dibrom-2-methylindol

26: $R^1 = CH_3, R^2 = Ac$: *N*-Acetyl-4,6-dibrom-2-methylindol

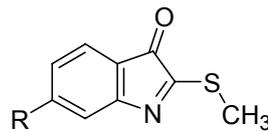


32: Trisindolin



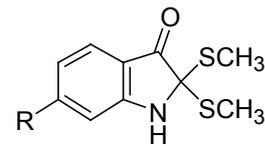
28: $R = SO_3^- Na^+$: Tyrindoxyl

27: $R = H$: Natrium Tyrindoxylsulfat



29: $R = Br$:
6-Brom-2-methylthio
indolenin-3-on

30: $R = H$:
2-Methylthioindolenin-3-on



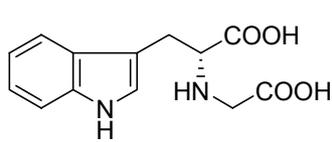
31: $R = Br$:
6-Brom-2,2-dimethyl-
thioindolin-3-on

32: $R = H$: 2,2-Dimethylthio-
indolin-3-on

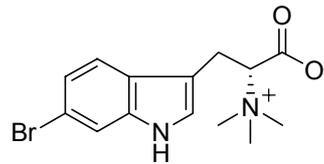
Abb. 2: Indolalkaloide.

2.2.2 Tryptophanalkaloide

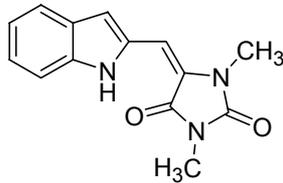
Bei den Tryptophanalkaloiden kondensiert ein Indol mit einem Serinrest unter Katalyse der β -Untereinheit der Tryptophansynthetase. Bei Konbamidin^[18] (**33**) und D-6-Bromhypaphorin^[19] (**34**) ist noch eine freie Säure vorhanden. In Isoplysin A (**35**), **36**^[20] und **37**^[21] ist die Aminosäurefunktion in ein cyclisches System eingebaut (**Abb. 3**).



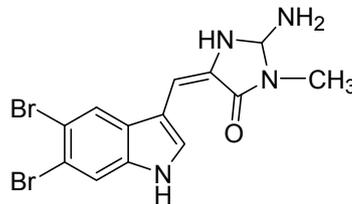
33: Konbamidin



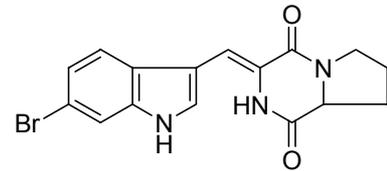
34: D-6-Bromhypaphorin



35: Isoplysin A



36: 5,6-Dibromem-2'-dimethyl-aplysinopsin (E)

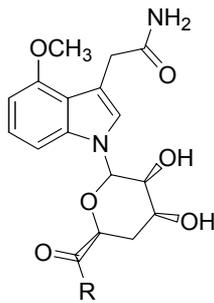


37: Baretin

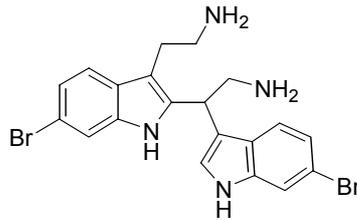
Abb. 3: Tryptophanalkaloide.

2.2.3 Tryptamin-Abkömmlinge

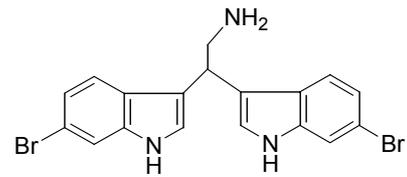
Wird Tryptophan decarboxyliert entsteht Tryptamin, das wiederum an der Struktur von Alkaloiden beteiligt sein kann. Bei den Verbindungen **38** und **39**^[22] aus dem Bakterium *Nocardiopsis dassonvillei*, sowie **40** aus dem Schwamm *cf. Orinia sp.* und **41**^[23], das aus dem Manteltierchen *Didemnum candidum* isoliert wurde, ist die Aminogruppe frei, im Gegensatz zu den Coscamiden A – C^[24] (**42**, **43**, **44**), bei denen die Aminogruppe an einer β -Ketoenamingruppe beteiligt ist. Bei **45**^[25] aus dem Schwamm *Disoderma polydiscus*, **46** und **47**^[26] ist die Aminogruppe an der Cyclisierung beteiligt, ebenso bei **48**, **49**, und **50**. In Arborescinin (**51**)^[27] aus dem Manteltierchen *Pseudodistoma arborescens* ist die Aminogruppe Bestandteil des Chinolingerüsts (**Abb. 4**).



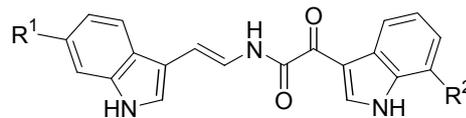
38: R = OCH₃: Kahakamid A
39: R = NH₂: Kahakamid B



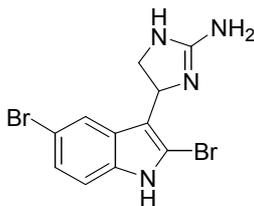
40: Gelliusin F



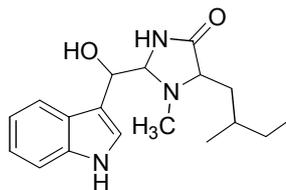
41: 2,2-Bis-(6'-brom-3'-indolyl)-ethylamin



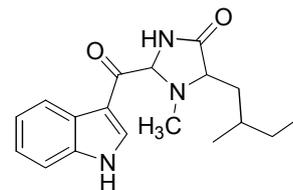
42: R¹ = Br, R² = H: Coscinamid A
43: R¹ = H, R² = H: Coscinamid B
44: R¹ = Br, R² = H: Coscinamid C



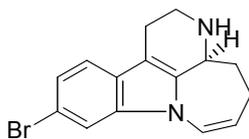
45: Discodermindol



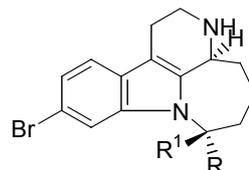
46: Martensin A



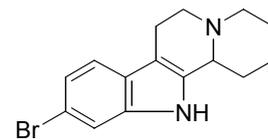
47: Martensin B



48: Arborescidin B



49: R = OH, R¹ = H: Arborescidin C
50: R = H, R¹ = OH: Arborescidin D

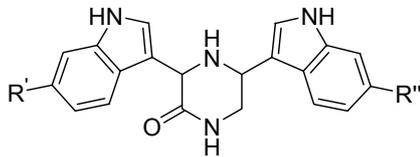
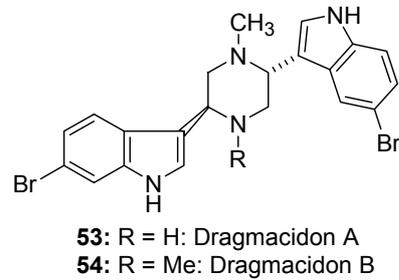
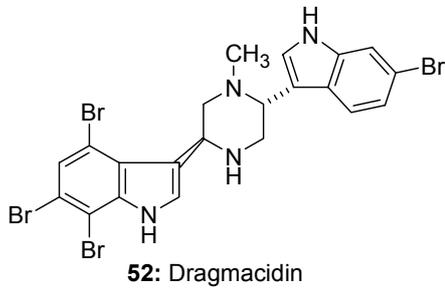


51: Arborescidin A

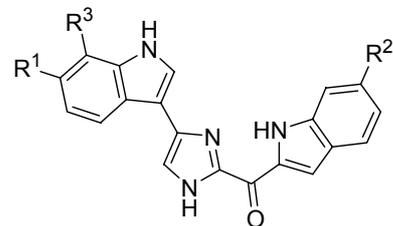
Abb.4: Tryptaminalkaloide 1.

Dragmacidin (**52**)^[28], Dragmacidon A (**53**), Dragmacidon B (**54**)^[29] aus dem Schwamm *Hexadella sp.*, Dragmacidin F^[30] aus *Halicortex sp.*, sowie **55**, **56**, **57**^[31] aus *Raphisia lacacei* sind durch Kondensation von zwei Tryptaminen entstanden. Auch an der Struktur von **58**, **59**, **60**, **61**^[32] und **62**^[33] aus dem Schwamm *Spongisorites sp.*, **63**, **64**^[29] aus *Hexadella sp.* und **65**^[32] aus dem Schwamm *Topsentia genitrix* sind zwei Tryptamine beteiligt, durch die Kondensation entsteht

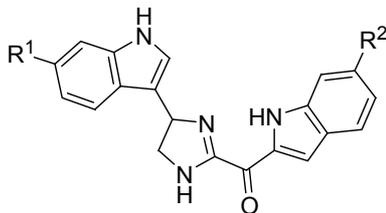
ein Imidazolring. Weitere Vertreter der Tryptaminalkaloide sind Grossularin (**66**)^[34] aus *Dendrodora grossularia* und die Chartelline A (**67**) und C (**68**)^[35], sowie die Chartellamide A (**69**) und B^[36] (**70**), die aus dem Moostierchen *Chartella papyracea* isoliert wurden (**Abb. 5**).



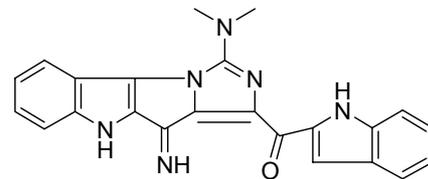
- 55:** R¹, R², = Br: *cis*-3,4-Dihydroamcanthin B
56: R¹ = Br, R² = H:
6'-Debrom-*cis*-3,4-dihydroamcanthin B
57: R¹ = H, R² = Br:
6''-Debrom-*cis*-3,4-dihydroamcanthin B



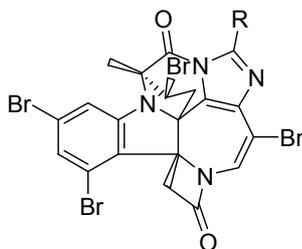
- 58:** R¹; R² = H, R³ = H: Topsisentin A
59: R¹ = H, R² = OH, R³ = H: Topsisentin B1
60: R¹ = Br, R² = OH, R³ = H: Topsisentin B2
61: R¹ = Br, R² = H, R³ = H: 6''-Deoxy-bromtopsentin
62: R¹; R² = H, R³ = OH: Isobromtopsentin



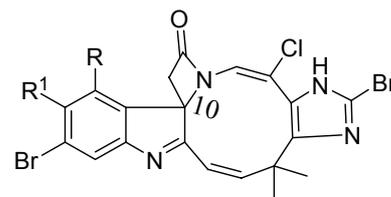
- 63:** R¹ = Br, R² = H:
4,5-Dihydro-deoxy-bromtopsentin
64: R¹, R² = H: Topsisentin D
65: R¹ = Br, R² = Br: Topsisentin C



66: Grossularin



- 69:** R = H: Chartellamid A
70: R = Br: Chartellamid B



- 67:** R = Br, R1 = H Chartellin B
68: R = H, R1 = H Chartellin C

Abb. 5: Tryptaminalkaloide 2.

Eudistomine sind β -Carboline, von denen 16 verschiedene Derivate bekannt sind. Hier sollen nur einige erwähnt werden - die 5-hydroxylierten werden in **Kap. 4.4.2** beschrieben. Baker^[37] diskutierte sie in seinem Übersichtsartikel von 1996 ausgiebig.

Bei **70**^[38] ist Prolin, bei **71**, **72**^[39], **73** und **74** und Cystein als weitere Aminosäure beteiligt (**Abb. 6**). Auch **75** gehört zu den Eudistominen.

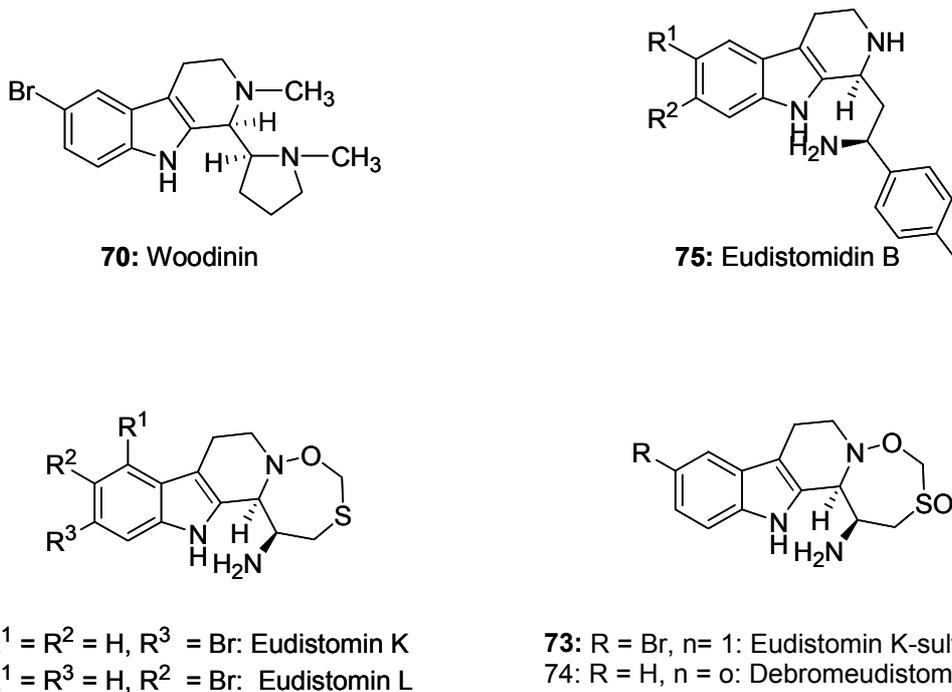


Abb. 6: β -Carboline.

2.2.4 Desaminotryptaminalkaloide

Bei den Verbindungen **76**^[40] aus dem Moostierchen *Amathia convoluta*, **77**^[41] und **78**^[42] aus *Aplysina sp.* hat eine Desaminierung stattgefunden (**Abb. 7**).

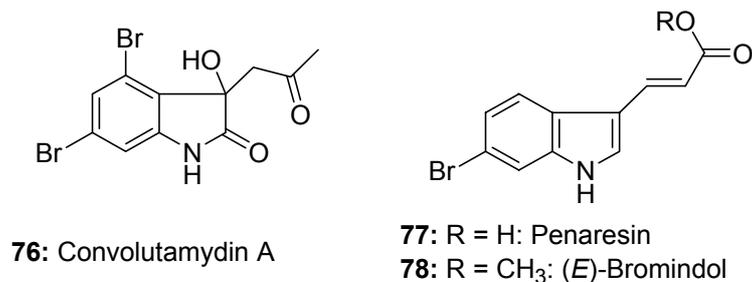
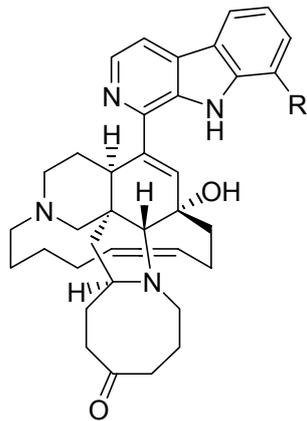
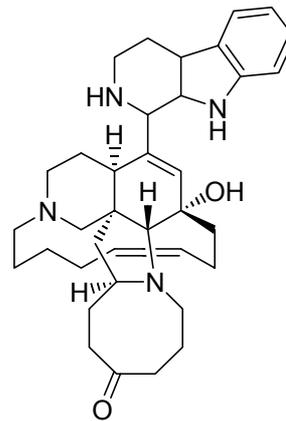


Abb. 7: Desaminotryptaminalkaloide.

Manzamine enthalten ebenfalls das Indolgerüst, zudem sind sie mit einer Einheit substituiert, die biomimetisch aus Ammoniak, Acroleineinheit und einem (Z)-5-Decendialdehyd entstanden ist. Auch sie stellen eine große Gruppe von Alkaloiden dar, **79**^[43], **80** und **81**^[44] sind nur wenige Beispiele.



79: R = H: Manzamin E
80: R = OH: Manzamin F

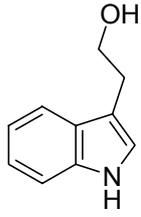
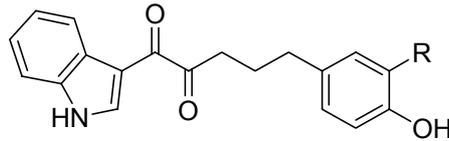


81: R = H: Manzamin D

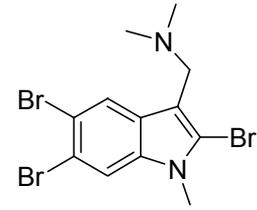
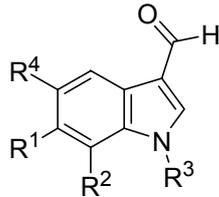
Abb 8: Manzamine.

2.2.5 Sonstige Indolalkaloide

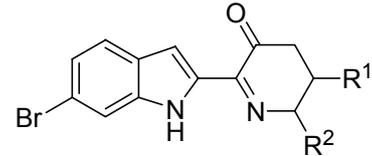
Es gibt noch weitere Gruppen von Indolalkaloiden: **82**^[18], **83**, **84**^[45], **85**^[46] und **86**^[47] aus dem Schwamm *Halichondria sp.* sowie **87**^[48] aus dem Moostierchen *Zoobotryon pellucidum*. Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Substitutionen am Indol. Die Poylandrocarbamide A – C^[49] (**88**, **89**, **90**) aus *Polyandrocarpa sp.* weisen zusätzlich noch einen substituierten Phenolring auf. Hamacanthin A und B^[50] (**91**, **92**) aus dem Pilz *Cryptococcus neoformans* besitzen zwei Indole und an Fragilamid^[26] (**93**) aus *Martensia fragilis* ist ein Tyrosinrest beteiligt. Auch in Vibrindol A^[51] (**94**) aus dem Fisch *Ostracion cubicus* und den Rhopaladinen A – D (**95**, **96**, **97**, **98**)^[52] sind zwei Indolreste vorhanden. Pallidin^[53] (**99**) aus dem Schwamm *Rhaphisia pallida* ist ebenso ein Indol-Alkaloid (**Abb. 9**).

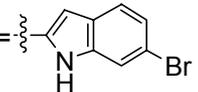
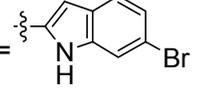
**82:** Tryptophol

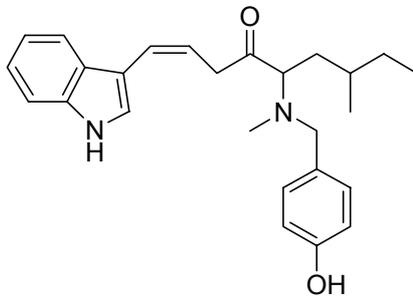
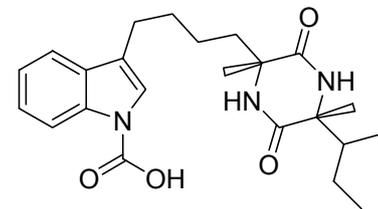
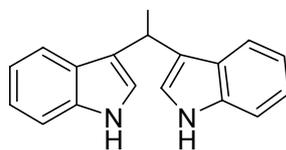
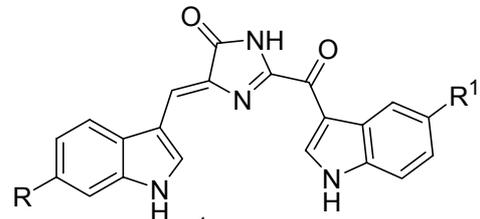
88: R = Br: Polyandrocarpamid A
89: R = I: Polyandrocarpamid B
90: R = H: Polyandrocarpamid C

**87:** 2,5,6-Tribrom-1-methylgramin

83: R¹ = H, R² = H, R³ = H, R⁴ = H, R⁵ = H:
 Indol-3-carbaldehyd
84: R¹ = Br, R² = H, R³ = H, R⁴ = H, R⁵ = H:
 6-Bromindol-3-carbaldehyd
85: R¹ = H, R² = CH₃, R³ = CH₃, R⁴ = H, R⁵ = H:
 N-7-Dimethylindol-3-carboxyaldehyd
86: R¹ = Br, R² = H, R³ = CH₃, R⁴ = Br, R⁵ = Br:
 2,5,6-Tribrom-N-methylindol-3-carbaldehyd



91: R² = H, R¹ = 
 Hamacanthin A
92: R¹ = H, R² = 
 Hamacanthin B

**93:** Fragilamid**99:** Pallidin**94:** Vibrindol A

95: R = OH, R¹ = Br: Rhopaladin A
96: R = OH, R¹ = H: Rhopaladin B
97: R = H, R¹ = Br: Rhopaladin C
98: R = H, R¹ = H: Rhopaladin D

Abb. 9: Marine Indolalkaloide.

2.2.6 Terpenoide Indolalkaloide

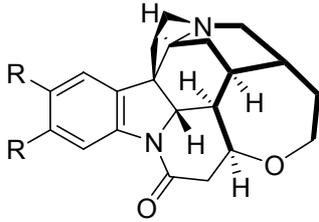
Bei den terpenoiden Indolalkaloiden sind an das Indol noch Terpeneinheiten geknüpft. Ruzicka^[1] stellte 1953 die Isopren-Regel auf. Danach leiten sich alle Terpenoide von einer acyclischen Grundstruktur ab: u. a. entstehen Monoterpene aus Geranylpyrophosphat, Sesquiterpene aus Farnesylpyrophosphat, Diterpene aus Geranylgeranylphosphat und Sesterterpene aus Geranylarnesylpyrophosphat.

Diese Verbindungen spielen auch in terrestrischen Organismen eine große Rolle. Bekannt ist das starke Gift Strychnin (**100**), das 1818 aus der Brechnuss *Strychnos nux vomica* isoliert wurde (das ebenso bekannte Brucin (**101**) ist das Methoxyderivat). Bei einer Vergiftung von Strychnin kommt es durch die synaptische Hemmung der Übertragungssubstanz Glycin im Rückenmark zu einer verstärkten Reizleitung und zum Tod durch Atemnot bei vollem Bewusstsein. Für Erwachsene ist die letale Dosis von Strychnin 1 mg/kg Körpergewicht.

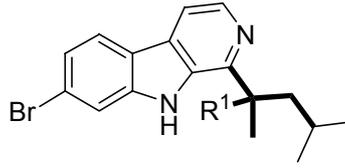
Aber auch aus Meeresorganismen wurden terpenoide Indolalkaloide isoliert, wie Securamin A (**102**) und B^[54] (**103**) aus dem Moostierchen *Securiflustra securifrons* oder die Verbindungen **104**, **105**, **106** und **107**^[55] aus dem Schwamm *Trikentrion flabelliforme*. Das Pibocin B^[56] (**108**) aus dem Manteltierchen *Eudistoma sp.* besitzt eine ähnlich Struktur wie Lysergsäurediethylamid. 109 und 110 gehören zu den β -Carbolinen (**Abb. 10**).

2.2.7 Cyclopeptide

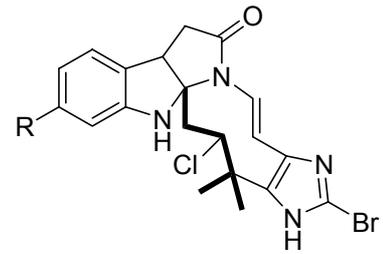
Tryptophan, die Ausgangssubstanz der meisten Indolalkaloide, ist als Aminosäure auch in Cyclopeptiden vertreten. Als Beispiele sollen hier einmal Phakellistatin aus *Phakellia carteri*^[57] (**111**) genannt werden, das durch die extrem hohe Cytotoxizität gegen lympholeukämische Zellen (ED₅₀ 0.33 $\mu\text{g/mL}$ ^[57]) auffiel, sowie die Diazonamide A und B^[58] (**112**, **113**) aus *Diazona chinensis* (**Abb. 11**).



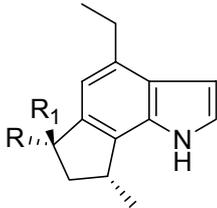
100: R = H: Strychnin
101: R = OCH₃: Brucin



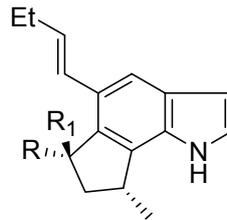
109: R¹ = H, R² = NH₂: Eudistalbin A
110: R¹ = R² = H: Eudistalbin B



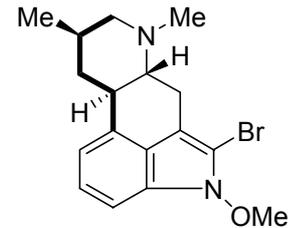
102: R = H: Securamin A
103: R = Br: Securamin B



104: R = CH₃, R¹ = H:
 (-)-*cis*-Trikentrin A
105: R = H, R¹ = CH₃:
 (-)-*trans*-Trikentrin A

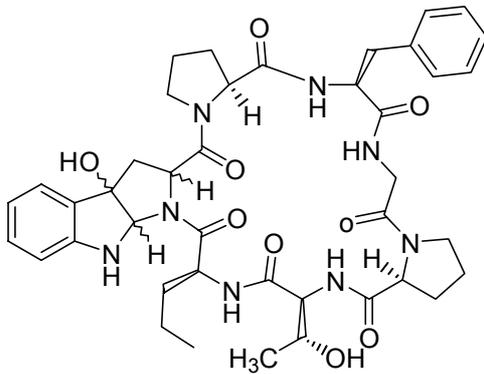


106: R = CH₃, R¹ = H: (-)-*cis*
 Trikentrin B
107: R = H, R¹ = CH₃: (-)-*trans*
 Trikentrin B

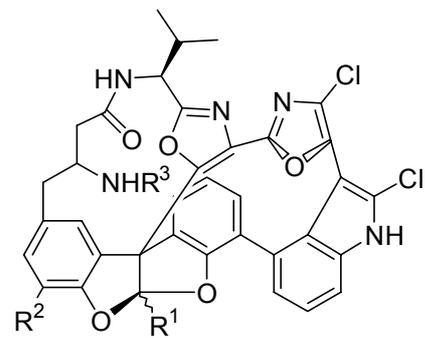


108: Pibocin B

Abb. 10: Terpenoide Indolalkaloide.



111: Phakellistatin 3



112: R¹ = OH, R² = H, R³ = COCH(NH₂)CHMe₂:
 Diazonamid A
113: R¹ = OH, R² = Br, R³ = H: Diazonamid B

Abb. 11: Cyclopeptide.

2.3 Biologische Aktivitäten mariner Indolalkaloiden

Das Interesse an diesen Indolalkaloiden ergibt sich, wie oben erwähnt, aus ihrer ökologischen Bedeutung. Diese macht gleichzeitig ihr chemisch-pharmazeutisches Potential aus - vgl. hierzu die folgende Aufstellung (**Tab. 1**).

Tab. 1: Biologische Aktivitäten mariner Indolalkaloide.

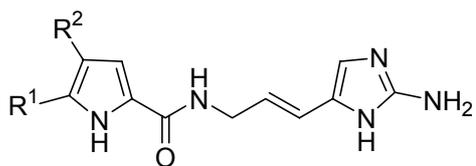
Metabolit	Spezies	Aktivität
Tryptophol (82)	<i>Halichondria sp.</i>	Fungizid gegen <i>Mortierella ramannianus</i> ^[46] .
6-Bromindol-3-carbaldehyd (84)	<i>Halichondria sp.</i>	Fungizid gegen <i>Mortierella ramannianus</i> ^[45] .
Indol-3-carbaldehyd (83)	<i>Halichondria sp.</i>	Fungizid gegen <i>Mortierella ramannianus</i> ^[45] .
2,5,6-Tribrom-1-methylgramin (87)	<i>Zoobotryon pellucidum</i>	Fäulnishemmende Eigenschaften gegen im Labor gezogene Seepockenlarven <i>Balanus amphitrite</i> , sowie gegen die Miesmuschel <i>Mytilus edulis</i> ^[48] .
2,5,6-Tribrom-N-methylindol-3-carbaldehyd (86)	<i>Zoobotryon pellucidum</i>	Fäulnishemmende Eigenschaften gegen im Labor gezogene Seepockenlarven <i>Balanus amphitrite</i> , sowie gegen die Miesmuschel <i>Mytilus edulis</i> ^[48] .
Discodermindol (45)	<i>Discodermia polydiscus</i>	Cytotoxische Aktivität gegen P388 mausartige Leukämiezellen, A-549 menschliche Lungenzellen und HT-29 menschliche Darmzellen ^[25] .
5,6-dibrom-2'-demethylaplisinopsin E/Z (36)	<i>Hyrtios erecta</i>	Antagonist der neuronalen NO-Synthetase ^[20] .

Kahakamid A und B (38, 39)	<i>Nocardiopsis dassonville</i>	Antibakterielle Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> . ^[22]
Coscinamid A-C (42, 43, 44)	<i>Coscinoderma sp.</i>	Antiviral ^[24]
Trisindolin (32)	<i>Vibrio sp.</i>	Antibakteriell ^[17] .
Topsentin B2 (60)	<i>Spongosorites sp</i>	α 1a relative und α 1b selektive adrenerger Rezeptorliganden ^[59] . K _i von α 1b liegt zwischen 0.08-0 15 μ M; Cytotoxizität gegen MKI Zellen IC ₅₀ = 6.3 μ g/mL ^[32] .
Topsentin B1 (59)	<i>Spongosorites sp</i>	Cytotoxizität gegen MKI Zellen IC ₅₀ = 12 μ g/mL ^[32] .
Diagmacidin (52)	<i>Dragmacidon sp.</i>	Cytotoxizität gegen Mäuseleukämiezellen (P388) ID ₅₀ = 15 μ M/mL, menschl. Lungencarcinomzellen (HCT-8) ID ₅₀ = 1-10 μ M/mL, menschl. Mammacarcinomzellen ID ₅₀ = 1-10 μ M/mL ^[28,30]
Dragmacidon A (53)	<i>Hexadella sp.</i>	Significante Cytotoxizität gegen L1210 Zellen ^[29]
Hamacanthin A/B (91, 92)	<i>Hamacantha sp.</i>	Fungizid gegen <i>Candida albicans</i> und gegen <i>Cryptococcus neoformans</i> . ^[50]
Arborescidin D (50)	<i>Pseudodistoma arborescens</i>	Cytotoxizität gegen menschliche Buccalkarzinomzellen IC ₅₀ 3 μ g/mL. ^[27]
Phakellistatin 3 (111)	<i>Phakellia carteri</i>	Cytotoxizität gegen P 388 Maus lympholeukämische Zellen. ED ₅₀ 0.33 μ g/mL ^[57] .
Diazonamid A (112)	<i>Diazona chinensis</i>	Cytotoxizität <i>in vitro</i> gegen HCT-116 Zellen und Mäusemelanomzellen: IC ₅₀ < 15ng/mL ^[58] .

Eudistomidin B (75)	<i>Eudistoma glaucus</i>	Cytotoxizität gegen L-1210 IC ₅₀ = 3.4 µg/mL und L517y Zelllinien: IC ₅₀ = 3.1 µg/mL ^[37] .
Eudistomin K (71)	<i>Eudistoma olivaceum</i>	Cytotoxizität gegen P-388 IC ₅₀ = 0.01 µg/mL antibakterielle Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> 20/100, <i>Escherichia coli</i> 15/100, fungizide Aktivität <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 24/100 Zone der Inhibition/µg ^[37] .
Eudistomin L (72)	<i>Eudistoma olivaceum</i>	Antibakterielle Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> 27/100, <i>Escherichia coli</i> 20/100; fungizid gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 28/100 Zone der Inhibition/µg ^[37] .
Eudistalbin A (109)	<i>Eudistoma album</i>	Cytotoxizität gegen KB Zellen: IC ₅₀ = 3.2 µg/mL ^[37] .
Woodinin (70)	<i>Eudistoma fragum</i>	antibakterielle Aktivität gegen <i>Staphylococcus aureus</i> 16/100 und <i>Escherichia coli</i> 8/100 Zone der Inhibition/µg ^[37] .
Manzamin F (80)		Cytotoxizität gegen P-388 IC ₅₀ = 5.0 µg/mL; antibakterielle Aktivität gegen <i>Staphylococcus aureus</i> MIC = 25 µg/mL ^[37] .

2.4. Pyrrol-Imidazol-Alkaloide

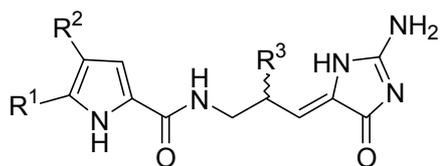
In Naturstoffen leitet der Pyrrolring sich meist von der Aminosäure Prolin (**265**) ab. Das Pyrrol ist Bestandteil der Pyrrol-Imidazol-Alkaloide, eine Stoffklasse, die nur in marinen Schwämmen zu finden ist. Eine Reihe von Derivaten wurde aus Familien wie *Agelasidae*, *Axinellidae* und *Halichondridae* isoliert. Das Oroidin^[60] (**114**) ist der Ausgangspunkt vieler cyclisierter und dimerisierter Derivate und weist u. a. cytotoxische Wirkung gegen NSCLC-N6 Zellen mit einem IC₅₀-Wert von 11.2 µg/mL auf^[61]. **115**^[60] und **116**^[62] unterscheiden sich von Oroidin durch den Grad der Bromierung. Keramadin^[63] (**117**) verfügt im Gegensatz zu allen anderen über eine methylierte Aminoimidazol-Einheit und u. a. über eine Eigenschaft als Serotonin- und Cholin-Rezeptor-Antagonist ($1.5 \cdot 10^{-5}$ M)^[64]. Bei Dispacamid A – D^[65] (**118**, **119**, **120**, **121**) ist der Imidazolring oxidiert worden. **118** wirkt als Antagonist des Histamin-Rezeptors mit einem pD₂-Wert von 5.52 ± 0.11 ^[65]. Bei dem Cyclisierungsprodukt Dibromphakellstatin^[66] (**122**), das wie **123**^[67] zu einem Tetracyclus cyclisiert ist, sind sowohl das Stickstoffatom des Pyrrols als auch der Amidstickstoff an der Cyclisierung beteiligt. **122** zeigt eine hohe Cytotoxizität gegen KM2059-Zellen mit einem ED₅₀-Wert von 0.11 µg/mL, gegen SK-MEL-5-Zellen mit einem ED₅₀-Wert von 0.11 µg/mL und gegen A498 Zellen mit einem ED₅₀-Wert von 0.21 µg/mL^[66]. Durch eine Cyclisierung erhält man Stevensin^[68] (**124**). Pomponi und Kerr haben hierzu Biosynthesestudien durchgeführt (**Kap. 6**). Agelastatin A ist ein weiteres Cyclisierungsprodukt des Oroidins, das zudem eine Cytotoxizität gegenüber Leukämiezellen L1210 mit einem IC₅₀-Wert von 33 µg/mL aufweist^[69]. Oroidin ist darüber hinaus der Grundbaustein für die Dimere Sceptrin^[70] (**127**), das eine Affinität für Somastatin mit einem IC₅₀-Wert von 0.27 µM aufweist und für das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) mit einem IC₅₀-Wert von 19.8 µM^[71], und Ageliferin^[72] (**128**), das u. a. die Actomyosin-ATPase in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-5}$ M aktiviert.



114: $R^1 = \text{Br}$, $R^2 = \text{Br}$: Oroidin

115: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Br}$: Hymenidin

116: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$: Clathrocin

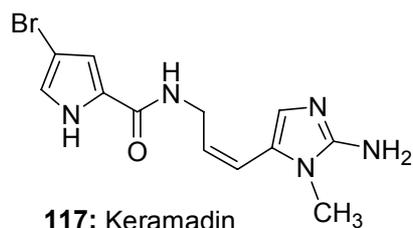


118: $R^1 = \text{Br}$, $R^2 = \text{Br}$, $R^3 = \text{H}$: Dispacamid A

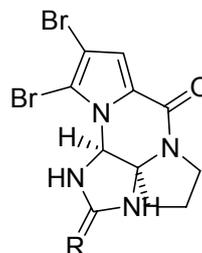
119: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Br}$, $R^3 = \text{H}$: Dispacamid B

120: $R^1 = \text{Br}$, $R^2 = \text{Br}$, $R^3 = \text{OH}$: Dispacamid C

121: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{Br}$, $R^3 = \text{OH}$: Dispacamid D

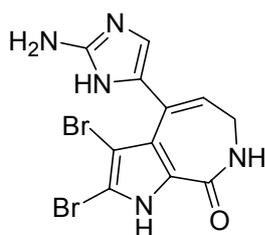


117: Keramadin

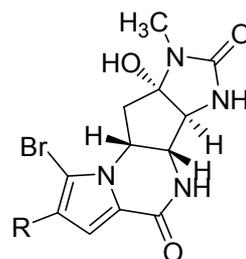


122: $R = \text{O}$: Dibromphakellstatin

123: $R = \text{NH}$: Dibromphakellin

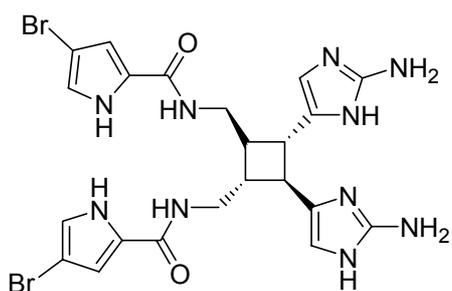


124: Stevensin

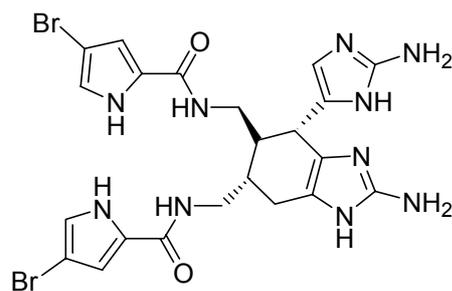


125: $R = \text{H}$: Agelastatin A

126: $R = \text{Br}$: Agelastatin B



127: Scepterin



128: Ageliferin

Abb. 12: Pyrrol-Imidazol-Alkaloide.



Abb. 13: *Flustra foliacea*

3 Das Moostierchen *Flustra foliacea*

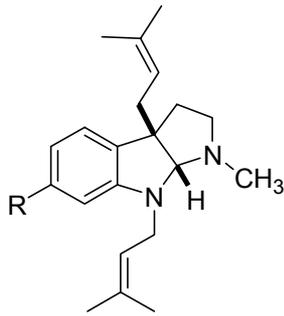
Flustra foliacea (**Abb. 13**)⁷³ gehört zur Ordnung der Moostierchen (Bryozoa), innerhalb der Klasse der Tentaculata. Das einzelne Moostierchen ist sehr klein und hat nur eine Größe von etwa 1 mm. Es ist an einem Substrat (Steine, Molluskenschalen, Seegras) fest gewachsen und bildet Kolonien bis zu einem Durchmesser von 1 m^[74]. Die Tierchen ernähren sich von einzelligen Organismen, die sie durch Strudeln einsaugen. *Flustra foliacea* ist in kühlen Meeren, wie der Nordsee, verbreitet und kommt in Tiefen bis zu 45 m vor.

Wichtige Inhaltsstoffe aus *Flustra foliacea* sind bromierte Indolderivate. Insgesamt sind schon mehr als 15 derartige Sekundärmetaboliten isoliert worden, von denen die meisten die Pyrrolo[2,3-b]indol-Grundstruktur des Physostigmins (**129**) aufweisen. **129** stammt aus der Calabar-Bohne (*Physostigma venenosum*) und ist ein reversibler Acetylcholin-Inhibitor, dessen letale Dosis bei 6 -10 mg^[75] liegt und dessen Einsatz in der Alzheimer-Therapie diskutiert wird^[76]. Aus *Flustra foliacea* sind Sekundärmetaboliten sowohl mit antibakterieller^[77], als auch muskelrelaxierender^[78] Wirkung bekannt.

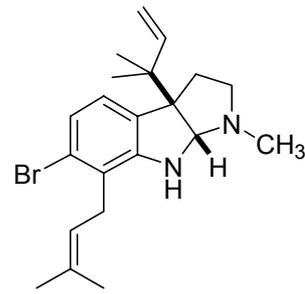
3.1 Inhaltsstoffe des Moostierchens *Flustra foliacea*

3.1.1 Sauerstofffreie Pyrroloindole

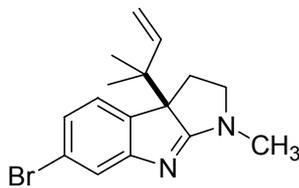
Flustramine besitzen ein Pyrrolo[2,3-b]indol-Grundgerüst, das einfach (**130**, **131**, **132**)^[79,80] oder zweifach (**133**, **4**, **134**, **135**)^[101,104] prenyliert sein kann. Die Prenylgruppe kann direkt als 3',3'-Dimethylallyl- oder invers als 1',1'-Dimethylallylsubstituent eingeführt sein. Alle tricyclischen Flustramine sind am Stickstoffatom N1 methyliert und außer bei Verbindung **136** (Debromoflustramin B)^[80] am Kohlenstoff C-6 bromiert. An Position 3a befindet sich, außer bei Flustramin B (**4**), Debromoflustramin (**136**) und Flustramin E (**131**), eine inverse Prenylgruppe. Flustramin D (**135**) und Isoflustramin D sind in den Positionen C7 bzw. C5 prenyliert.



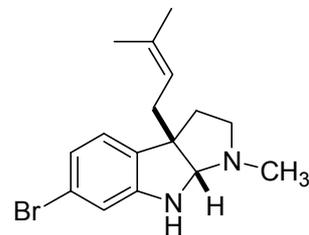
4: R = Br: Flustramin B
136: R = H: Debromoflustramin B



134: Isoflustramin D



130: Flustramin C



131: Flustramin E

Abb. 14: Tricyclische, sauerstoffhaltige Indolalkaloide (Flustramine) aus dem Moostierchen *Flustra foliacea*.

3.1.2 Sauerstoffhaltige Pyrroloindole

Von einigen Flustraminen sind auch oxygenierte Derivate bekannt. Flustraminol (**137**) A und B (**138**)^[79] besitzen anstelle der Prenylgruppe in Position 3a eine OH-Gruppe. Zudem befindet sich die Prenylgruppe von Flustraminol A (**137**) an Position 8a. Dihydroflustramin C *N*-oxide (**139**) und Flustramin D *N*-oxide (**140**)^[104] sind in Position N1 *N*-oxidiert. Bei Flustramin B (**143**)⁸¹ ist das Ringsystem zu einem 1,2-Oxazinan vergrößert. Die Flustramid A (**141**)⁸² und B (**142**)^[81] weisen eine Lactamstruktur auf.

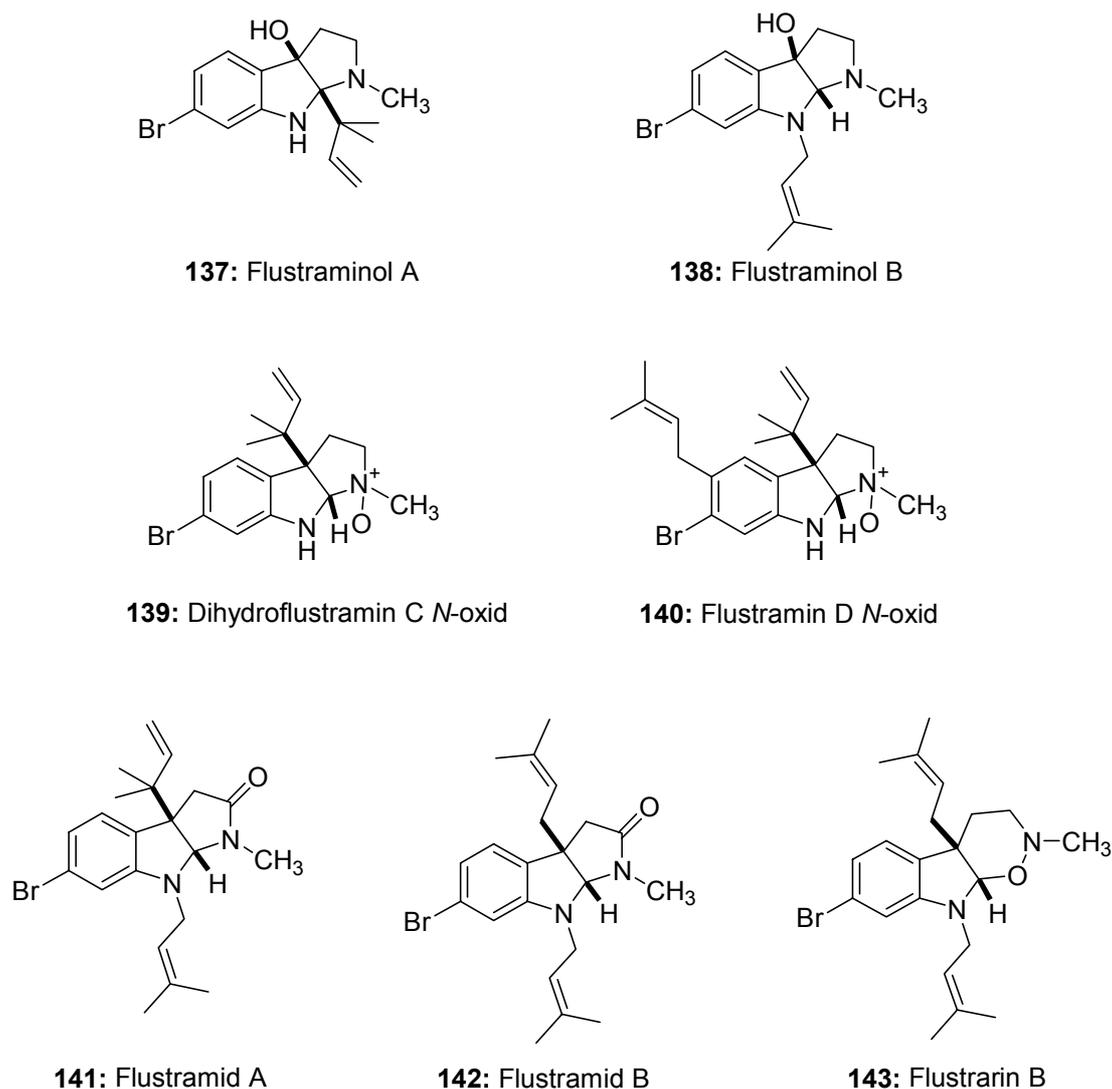


Abb. 15: Oxygenierte, tricyclische Sekundärmetaboliten aus dem Moostierchen *Flustra foliacea*.

3.1.3 Nicht-cyclisierte Tryptamin-Abkömmlinge

Tryptamin wird in biogenetischen Reaktionen durch Decarboxylierung aus Tryptophan gebildet und dann mit Hilfe von *N*-freien Komponenten zu Alkaloiden aufgebaut. 6-Brom-*N*_b-methyl-*N*_b-formyl-tryptamin (**144**)^[82] ist ein bromiertes Tryptaminderivat, bei dem der Stickstoff sowohl methyliert als auch formyliert ist. Die gleiche Grundstruktur liegt bei Formylflustrabromin vor, welches zusätzlich an Position C2 mit einer inversen Prenylgruppe substituiert ist. Im Gegensatz zu **144** wurde Flustrabromin als Gemisch der *E* (**145**)- und *Z* (**146**)- Isomere isoliert, die sich nicht trennen ließen.

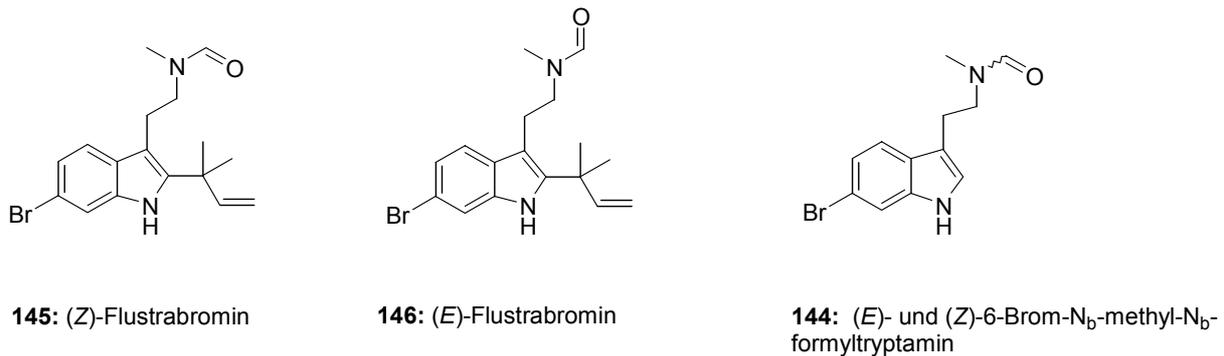
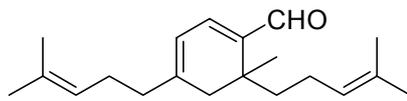


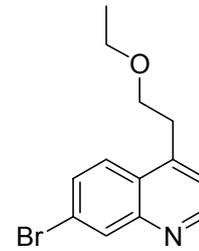
Abb. 16: Nicht-cyclisierte Tryptamin-Abkömmlinge aus *Flustra foliacea*.

3.1.4 Andere Sekundärmetaboliten

Aus dem Moostierchen *Flustra foliacea* wurden sieben weitere Naturstoffe isoliert, die nicht zur Klasse der Indolalkaloide gehören. Sechs stammen aus dem Terpenstoffwechsel, von denen fünf Verbindungen darstellen, die schon früher aus verschiedenen Organismen, wie z. B. der subtropischen Pflanze *Backhousia citriodora* (Cital (147, 147a)), dem Java-Citronenöl aus dem Drüsen-Sekret der Alligatoren ((R)- und (S)-Citronellol (148)), dem Palmarosaöl (Geraniol (149)) und aus der Strohblume *Helichrysum italicum* (Nerol (150))^[1] isoliert wurden (Abb.16)^[83]. 4,6-Bis-(4-methylpent-3-en-1yl)-6-methylcyclohexa-1,3-dien-1-carbaldehyd (151)^[84], ist eine aus dem Terpenstoffwechsel stammende Verbindung, die von Bachmann et al. 1994 aus *Flustra foliacea* isoliert wurde. Der Naturstoff 152^[85] weist ein Chinolingerüst auf, dessen Biosynthese ebenfalls von der Aminosäure Tryptophan ausgehen dürfte. Bei den China-Alkaloiden aus Cinchona-Arten stammt auch das Chinolingerüst von der Aminosäure Tryptophan (22) ab. Aus 22 und Secologanin entsteht Vincosid das in Cinchonaminal überführt wird. Es erfolgt eine oxidative Ringöffnung zu N-Formylkynurein, welches nach Transaminierung zum Cholingerüst cyclisiert. Die Ethoxygruppe der Seitenkette könnte während der Isolierung entstanden sein und somit ein Artefakt darstellen, da die Verbindung während der Extraktion längere Zeit in Ethanol gelöst war.

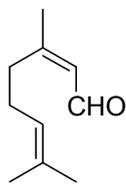


151: 4,6-Bis(4-methylpent-3-en-1-yl)-6-methylcyclohexa-1,3-dien-1-carbaldehyd

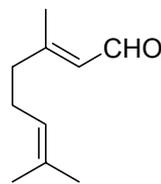


152: 7-Brom-4-(2-ethoxyethyl)-chinolin

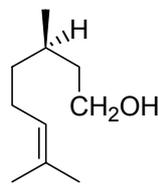
Abb. 17: Chinolin- und Terpendervate aus *Flustra foliacea*.



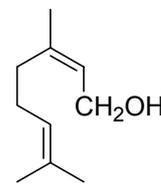
147: (Z)-Citral



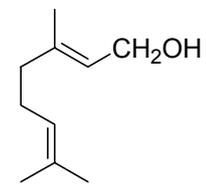
147a: (E)-Citral



148: Citronellol



150: Nerol



151: Geraniol

Abb. 18: Ubiquitäre Monoterpene aus *Flustra foliacea*.

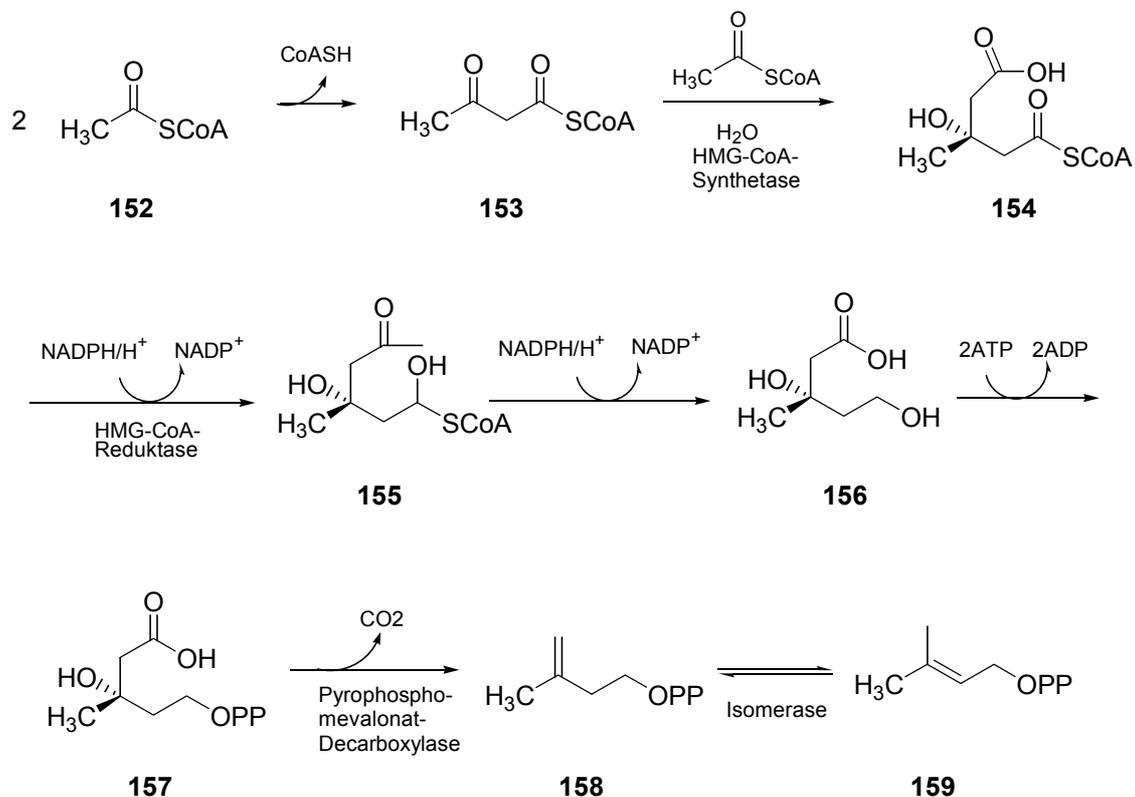
3.2 Biogenetischer Ursprung der Prenylgruppe

Bis vor kurzem ist man davon ausgegangen, dass isoprenoide Teilstrukturen in Sekundärmetaboliten wie den Flustraminen ausschließlich auf dem Mevalonat-Biosyntheseweg entstehen (**Schema 4**). Es konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass isoprenoide Metaboliten sowohl über den Mevalonatweg als auch über den 1-Desoxy-D-xyluloseweg (**Schema 5**) gebildet werden. Dies wurde in Bakterien^[86], Grünalgen^[87] und höheren Pflanzen, wie *Gingko biloba*^[88], *Taxus chinensis*^[89], *Daucus carota*^[90] und *Hordeum vulgare* beobachtet.

3.2.1 Der Mevalonat-Biosyntheseweg

Durch eine intermolekulare Claisenkondensation von zwei Acetyl-CoA (**152**) wird Acetoacetyl-CoA (**153**) gebildet. An die Ketogruppe der Verbindung lagert sich durch Aldolkondensation eine weitere Acetyl-CoA-Einheit an. Es folgt eine Hydrolyse des

zuletzt eingeführten Thioesters zu Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) (**154**). Durch die irreversible Reduktion des HMG-CoA durch die HMG-CoA-Reduktase entsteht als Zwischenprodukt das Hemithioacetal der Mevaldinsäure (**155**), das sogleich zur Mevalonsäure (**156**) weiter reduziert wird. Mevalonsäure wird anschließend durch 2 ATP zu Mevalonsäure-5-pyrophosphat ((*R*)-MVA-5PP) (**157**) phosphoryliert. Die darauf folgende Decarboxylierung durch die Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase findet ebenfalls unter Verbrauch von Phosphat statt, es entsteht das C₅-Gerüst des aktivierten Isopentenylpyrophosphats (IPP) (**158**). **158** wird zu Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (**159**) isomerisiert^[91].

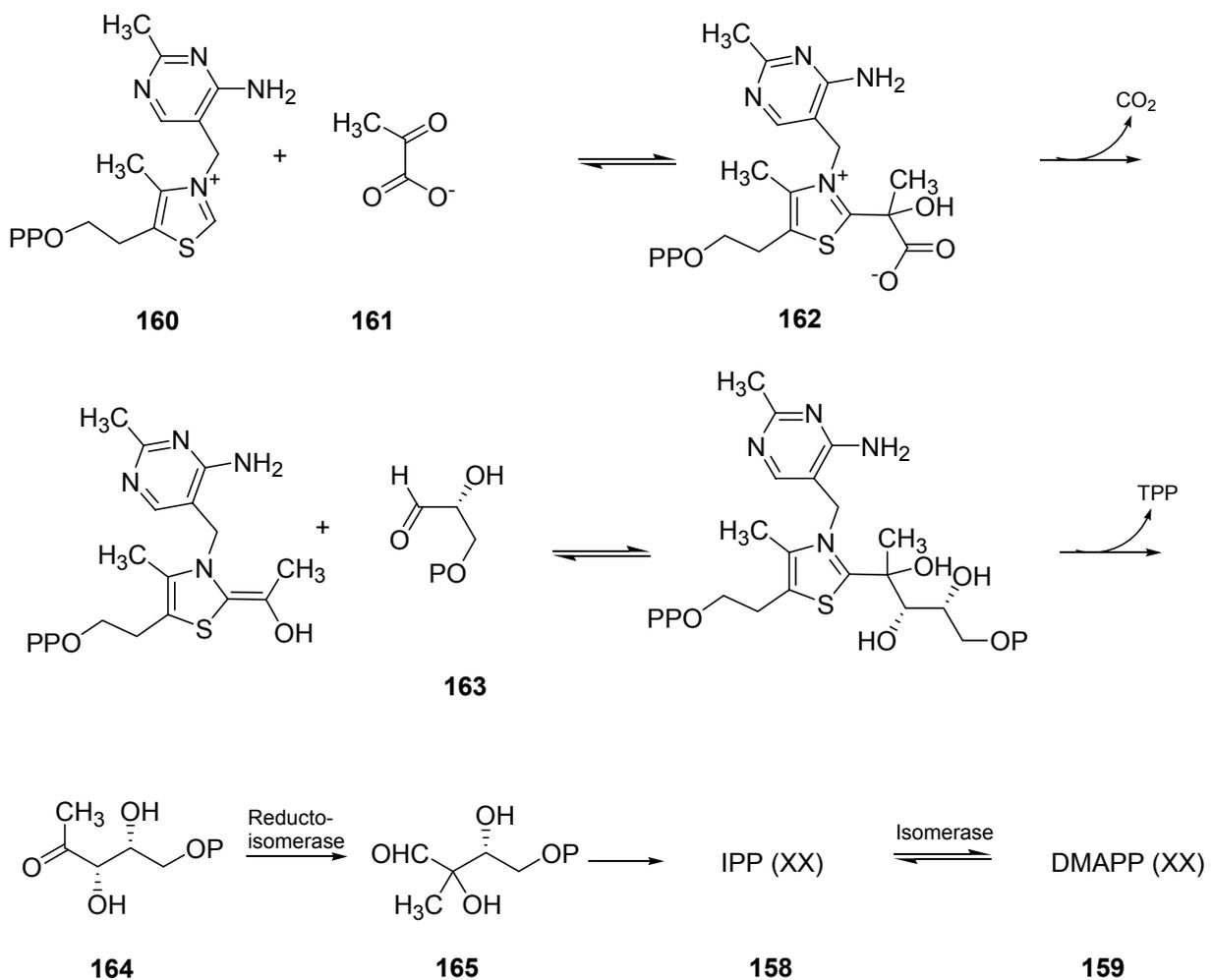


Schema 4: Mevalonat-Biosyntheseweg.

3.2.2 1-Deoxy-D-xylulose-Biosyntheseweg

In den letzten Jahren erhielt man bei Biosyntheseversuchen mit markierten Substanzen widersprüchliche Ergebnisse. Zunächst ging man davon aus, dass isoprenoide Teilstrukturen auf dem Mevalonat-Biosyntheseweg entstehen^[92]. In *E.*

coli konnte jedoch der 1-Deoxy- D-xylulose-Weg als Alternative nachgewiesen werden (**Schema 5**). Der erste Schritt ist die Reaktion von Pyruvat (**161**) mit Thiaminpyrophosphat (TPP, Vitamin B₁) (**160**). Das entstandene Produkt (**162**) wird Decarboxyliert, um in einer Kopf-Kopf-Kondensation mit Glyceraldehyd-3-phosphat (**163**) zu reagieren. Thiamin wird abgespalten, und es entsteht D-1-Deoxy-xylulose-5P (**164**)^[93]. **164** geht unter Katalyse einer Reduktoisomerase in den instabilen Zustand **165** über. Es folgen zwei weitere Reduktionen zur Bildung von IPP (**158**), das mit Hilfe der Isomerase zu DMAPP (**159**) umgelagert wird^[94].



Schema 5: 1-Deoxy-D-xylulose-Biosyntheseweg.

3.2.3 Einführung von Prenylgruppen in Sekundärmetaboliten

In den Sekundärmetaboliten von *Flustra foliacea* gibt es sowohl „normale“ Dimethylallyl-pyrophosphat (DMAPP), als auch inverse Prenylgruppen als

Seitenketten. In den letzten Jahren war nicht nur der biogenetische Ursprung der Prenylgruppen Bestand intensiver Untersuchungen (**Kap. 3.2.1** und **3.2.2**), sondern auch die Einführung der inversen und „normalen“ Prenylgruppen durch eine reverse und normale Prenyltransferase in Sekundärmetaboliten.

Bis heute gibt es keine Biosyntheseuntersuchungen zu den Sekundärmetaboliten von *Flustra foliacea*. Stocking et al.^[95] führten Studien zur Einführung von Prenylgruppen mit Metaboliten der Paraherquamidfamilie aus dem Pilz *Penicillium fellutanum* durch, die als Teilstruktur sowohl prenylierte als auch invers prenylierte Indole besitzen. Die Untersuchungen ergaben, dass an Position 2 des Indols eine inverse Prenylierung stattfindet. Die Ergebnisse ließen darauf schließen, dass bei der Einführung der Prenylgruppe das Substrat so mit dem Isoprenylrest im aktiven Zentrum verankert ist, dass der nucleophile Angriff des Indols am pyrophosphattragenden Kohlenstoff unter Inversion der Konfiguration stattfindet. Bei der reversen Prenyltransferase ist der Pyrophosphatrest im aktiven Zentrum verankert und der Isoprenylrest so angeordnet, dass in Position C2 des Indols das olefinische π -Elektronensystem in einer nucleophilen Reaktion von beiden Seiten angreifen kann (**Abb. 19**).

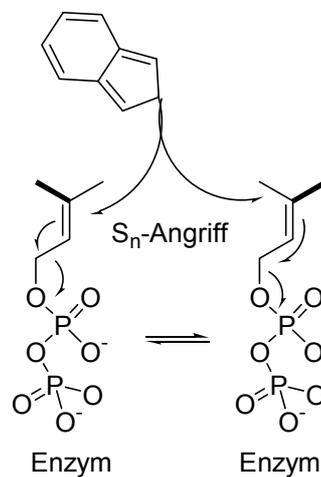
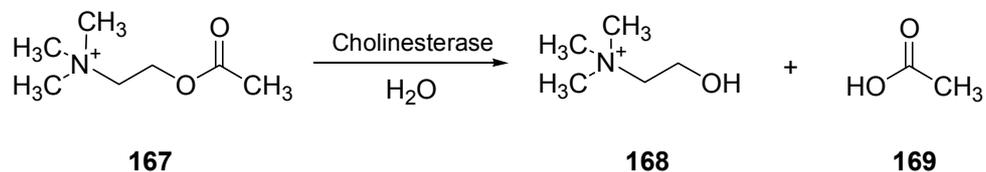


Abb. 19: Einbau der inversen Prenylgruppen.

3.3 Biologische Aktivitäten

3.3.1 Physostigmin als Cholinesterase-Inhibitor

Ausgehend von Physostigmin (**129**) als Leitstruktur konnten durch systematische Abwandlung eine Reihe Carbaminsäureester wie z. B. Neostigminbromid (**166**) erhalten werden. Sie hemmen reversibel die Acetylcholinesterase, die Acetylcholin (**167**) in Cholin (**168**) und Essigsäure (**169**) spaltet (**Schema 6**). Die Verbindungen zeigen somit eine indirekte cholinerge Wirkung und gelten als indirekte Parasympathomimetika.



Schema 6: Spaltung von Acetylcholin durch die Cholinesterase.

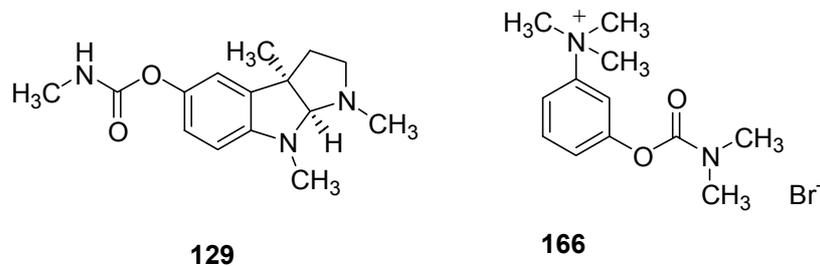
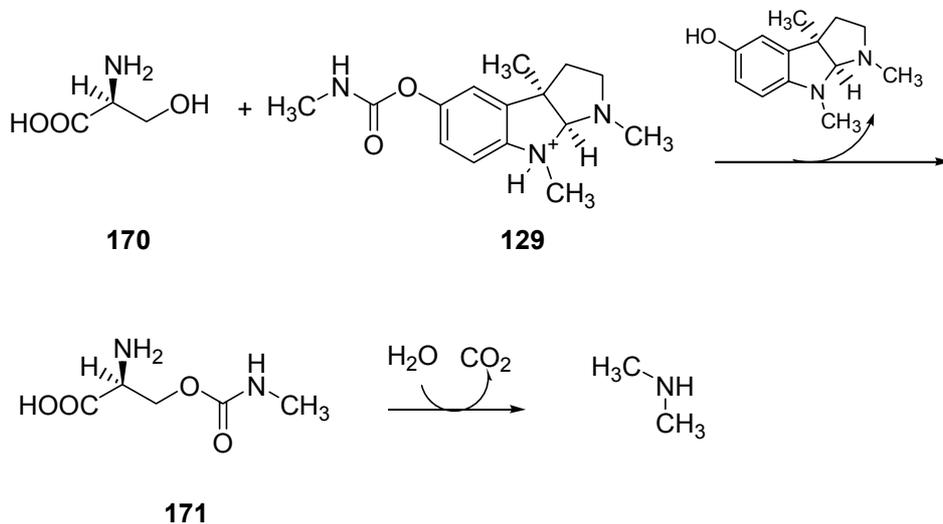


Abb. 20: Reversible Cholinesterase-Hemmer.

Die Hemmung des Enzyms findet durch die Bindung des durch Protonierung quartären Stickstoffatoms N-1 (**129**) an das anionische Zentrum des Enzyms statt, das eine nucleophile Bindungsstelle darstellt. Die Bindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms ist die Aminosäure Tryptophan (**22**), so dass die Wechselwirkung unter Bildung eines Charge-Transfer-Komplexes möglich ist. Danach erfolgt eine Umesterung der Carbamoylgruppe des Physostigmins auf die OH-Gruppe des Serinrestes (**170**) im aktiven Zentrum, gefolgt von einer Dissoziation des

Carbaminsäureesters von dem Rest der Substanz und einer Hydrolyse des Serin-Carbaminsäureesters (**171**) (**Schema 7**). Diese Hydrolyse von Carbaminsäureestern verläuft langsamer als die Hydrolyse des Acetylcholins^[96].



Schema 7: Physostigmin als Acetylcholinesterase-Hemmer.

Physostigmin wird als Antidot bei Atropinvergiftungen und bei Vergiftungen mit tricyclischen Antidepressiva eingesetzt. Auch finden Untersuchungen zur Anwendung bei Alzheimer-Demenz statt. Auf Grund ihrer giftigen Wirkung wurde die Calabar-Bohne, in der Physostigmin enthalten ist, in Westafrika als Ordalgift gegeben. Ordalgifte sind Gifte, die zur Herbeiführung von Gottesurteilen verwendet wurden^[1].

3.3.2 Biologische Aktivitäten von Naturstoffen aus *Flustra foliacea*

Schon 1977 konnten Al-oily^[97] et al. eine fäulnishemmende (Verhinderung der Bewachung durch andere Organismen) Wirkung bei *Flustra foliacea*, die durch antibiotische Wirkung zustande kommt, beobachten. Wenn ein Teil des Organismus in einem Röhrchen unter Verschluss gehalten wurde, konnte der Geruch von Citronellal nachgewiesen werden, das als Insektizid in mit einem ED₅₀-Wert von 0.25 mg/cm² auf einer künstlichen Membran wirkt^[98], der Effekt ist im Vergleich zu Autan ED₅₀-Wert von 0.15 mg/cm² etwas geringer.

In **Tab. 2** sind alle bisher gefundenen biologischen Aktivitäten der Sekundärmetaboliten von *Flustra foliacea* aufgelistet. Flustramin A (**133**) und B (**4**) zeigten muskelrelaxierende Wirkung, die durch Neostigminbromid nicht aufgehoben werden konnte. Die Verbindungen zeigen im allgemeinen nur moderate antibiotische Wirkungen.

Tab. 2: Aktivitäten der Sekundärmetaboliten aus *Flustra foliacea*.

Metabolit	Gehalt in% der Trockenmasse	Biologische Aktivität
Flustramin A (133)	0.04	Muskelrelaxierende Wirkung. Rattenzwerchfell: IC ₅₀ 59 µg·mL ⁻¹ ; Meerschweinchendarm: IC ₅₀ 69 µg·mL ⁻¹ . Screen-grip in Mäusen: 200 mg·kg ⁻¹ Dosis war aktiv.
Flustramin B (4)	0.04%	Muskelrelaxierende Wirkung. Rattenzwerchfell: IC ₅₀ 63 µg·mL ⁻¹ ; Meerschweinchendarm: IC ₅₀ 71 µg·mL ⁻¹ . Screen-grip in Mäusen: 200 mg·kg ⁻¹ Dosis war aktiv.
Flustramin E (131)	0.006	Fungizide Aktivität: <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Rhizotonia solani</i> ¹⁵ .
Dihydroflustramin C (132)	0.032	Antibakterielle Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> ³ .

3.4 Probengewinnung

Um weitere Kenntnisse über das Moostierchen und seine Inhaltsstoffe zu erhalten, um Zwischenmetaboliten zu isolieren, die Aufschluss über die Biosynthese der Flustramine geben könnten, und um eventuell weitere biologische Aktivitäten dieser Sekundärmetaboliten zu finden, wurde das Moostierchen nochmals gesammelt und bearbeitet.

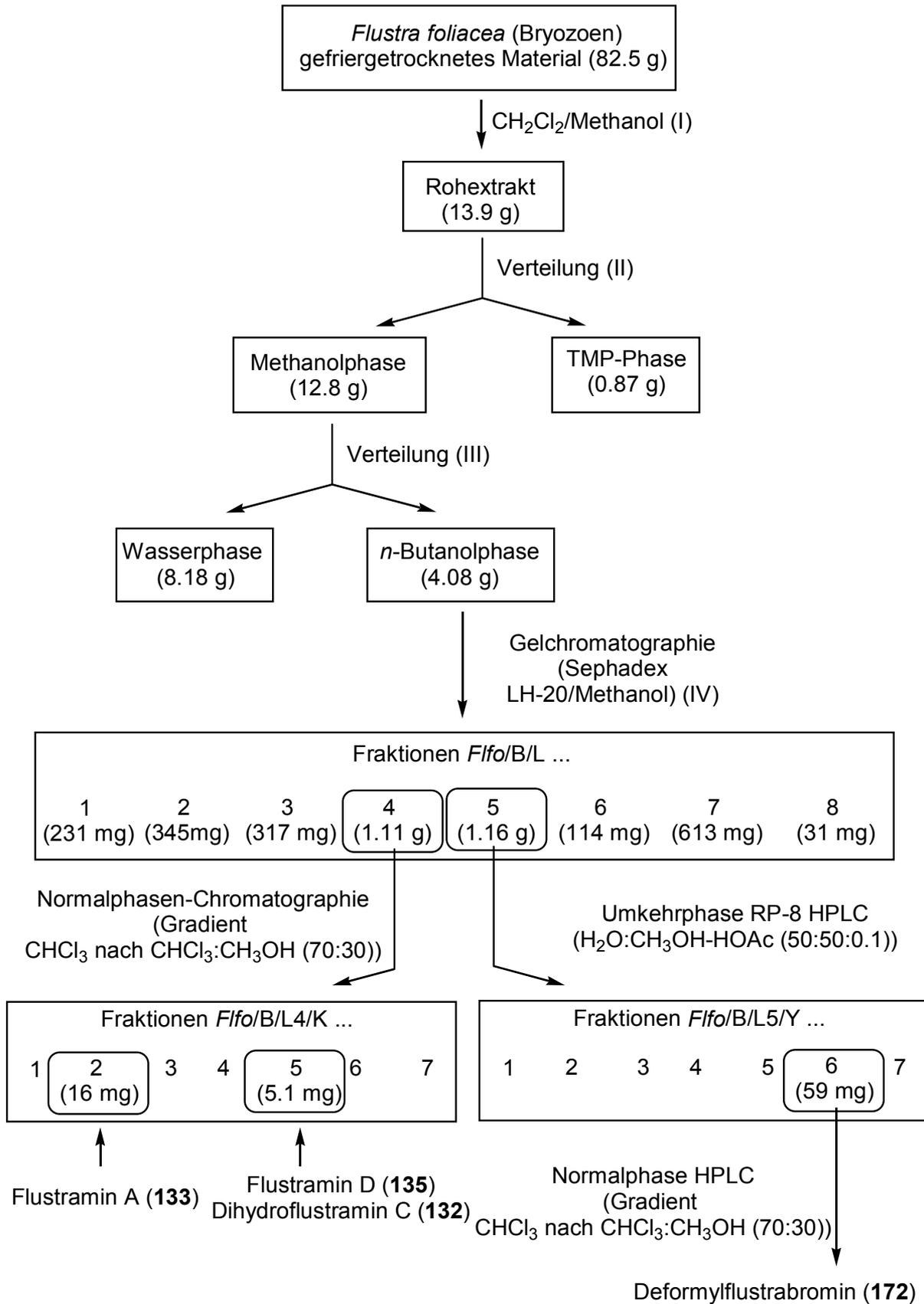
In der Tiefen Rinne von Helgoland im Südosten der Nordsee wurde bei 54°12' N und 7°47' E während der Expedition 116 der RV "Heincke" am 12. Februar 1999 der Organismus mit einem Grundschleppnetz auf 33 – 45 m Tiefe gewonnen. Das gesammelte und gereinigte Material wurde sofort in Plastiktüten eingefroren.

3.5 Isolierung

Flustra foliacea wurde gefriergetrocknet und vollständig extrahiert. Zu diesem Zweck wurden Lösungsmittel verwendet, die umfassend alle Verbindungen herauslösen und durch anschließende Filtration vom Exoskelett abtrennen. Versuche ergaben, dass das Lösungsmittelgemisch Dichlormethan/Methanol ($\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:1)) die meisten Substanzen löst und vom Exoskelett abtrennt.^[99] Das gefriergetrocknete Material wurde mehrmals mit Dichlormethan/Methanol (1:1) extrahiert (I) (**Schema 8**). Die einzelnen Extrakte wurden vereinigt und konzentriert. Durch Ausschütteln (Phasenverteilung) des getrockneten Rohextraktes mit Methanol und *iso*-Octan (TMP (II)), können unpolare Komponenten (z. B. Fette, Lipide oder β -Carotine) von den polaren Verbindungen getrennt werden. Die Methanolphase wurde mit *iso*-Octan gewaschen, damit sich in der polaren Methanolphase keine unpolaren Verbindungen mehr befanden. Die getrocknete Methanolphase wurde mit Wasser aufgenommen und gegen *n*-Butanol ausgeschüttelt (III). In der Wasserphase sammeln sich Salze und sehr polare organische Verbindungen. Alkaloide lösen sich dagegen besser in *n*-Butanol. Diese *n*-Butanolphase wurde dann mit Wasser gewaschen, um anorganische Salze und stark polare Verbindungen zu entfernen.

3.5.1 Gelchromatographie

Die *n*-Butanolphase wurde mittels Größenausschluss- und Affinitätschromatographie^[100] aufgereinigt. Als stationäre Phase wurde Sephadex LH-20 verwendet, das aus Hydroxy-propylierten-Cyclodextranen, die mit Polysacchariden vernetzt sind, besteht. Diese bilden durch Quellung in einem Lösungsmittel Poren. Die Quellung und die Porengröße sind abhängig vom verwendeten Lösungsmittel. Sephadex LH-20 ist hervorragend für die Trennung von Naturstoffen wie Alkaloiden, Steroiden, Terpenoiden, Lipiden und kleinere Peptiden geeignet. Als Fließmittel wurde Methanol verwendet, dadurch lag die Quellung der stationären Phase bei 3.9 – 4.3 mL/g. Die eluierten Verbindungen wurden in 8 Fraktionen aufgesammelt.



Schema 8: Isolierungsverlauf der Sekundärmetaboliten von *Flustra foliacea*.

3.5.2 Dereplikation

Sinn der Dereplikation ist die Identifizierung von bekannten Verbindungen auf einer möglichst frühen Stufe der Isolierung. Nicht alle Inhaltsstoffe sind dabei von großem Interesse, somit versucht man schon beim Screening während der Isolierung von Naturstoffen durch Dereplikation frühzeitig wichtige und interessante Fraktionen zu erkennen. Für diesen Zweck wurden die Proben mit Hilfe von HPLC-MS- und MS/MS-Kopplungstechniken untersucht. Parallel wurde die biologische Aktivität der Fraktionen verfolgt.

3.5.2.1 HPLC-MS und MS/MS

Um mehr Informationen über die Verbindungen der einzelnen Fraktionen zu erhalten wurden sie mittels analytischer HPLC-MS (ESI^+) untersucht. Als stationäre Phase wurde RP-18 und als Eluent $\text{H}_2\text{O}/\text{Acetonitril}$ mit einem Gradientensystem von H_2O 100% zu Acetonitril 100% (TFA 0.1%) verwendet. Die einzelnen Fraktionen wurden zunächst aufgetrennt und anschließend mittels Massenspektrometrie detektiert. Durch HPLC-MS Kopplung sollten auf dieser Stufe schon Informationen über die Molmasse von bekannten und unbekanntem Verbindungen in den einzelnen Fraktionen erhalten werden. Um zusätzliche Informationen über Substituenten der Verbindungen zu erhalten, wurden auch Fragmentierungsversuche (MS/MS Versuche) durchgeführt. Außer in Fraktion 2 konnten durch HPLC-MS-Kopplung sowohl bekannte als auch unbekanntem Indolderivate detektiert werden (**Tab. 3**).

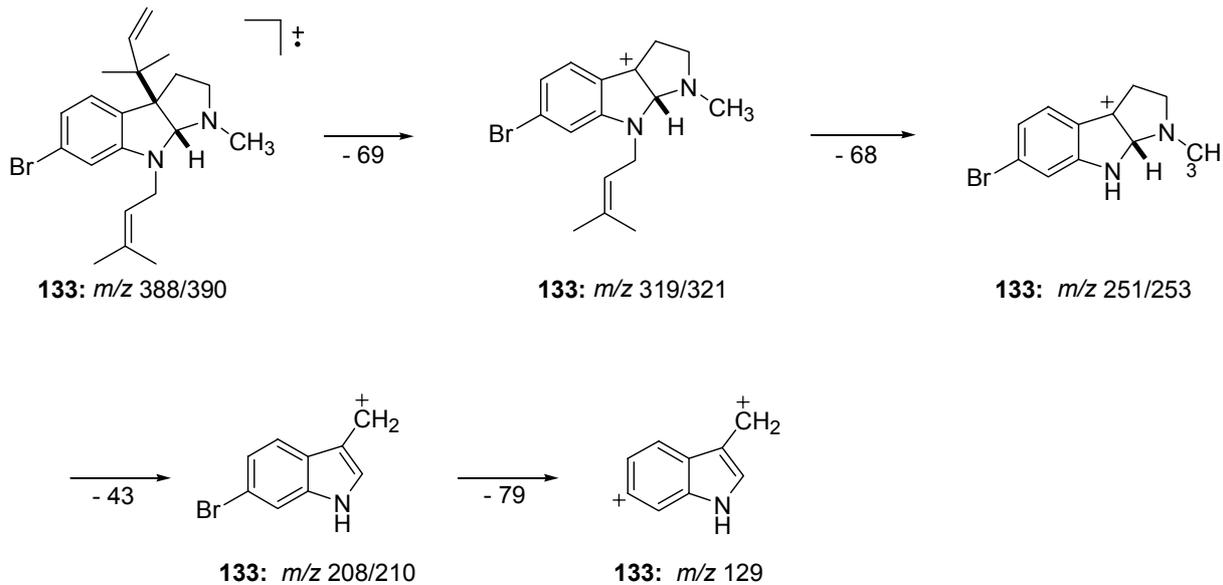
Von der Fraktion 4 konnte der Zerfall des Molpeaks von $m/z = 388/390$ durch eine doppelte massenspektrometrische Messung analysiert werden. Das Signal von $388/390$ fragmentiert zu $m/z = 321/319$ und weiter zu $m/z = 253/251$. Die Verbindung verliert zweimal die Masse einer Prenylgruppe. Somit war zu vermuten, dass es sich in diesem Fall um eines der Flustramine A (**133**), B (**4**), D (**135**) oder Isoflustramin D (**134**) handelt.

Tab. 3: Hauptsignale der HPLC-MS-Kopplungstechnik und der Tandem MS/MS der Dereplikation von *Flustra foliacea*. Bekannte Molmassen wurden potentiellen Verbindungen zugeordnet. Die gekennzeichneten Fraktionen wurden aufgereinigt und die gekennzeichneten Molmassen und Verbindungen isoliert. Durch das charakteristische Isotopensignal können im Massenspektrum die Monobromierungen erkannt werden.

Fraktion (Gelchromatographie)	Retentionszeit HPLC-ESIMS (min)	Molmasse HPLC- ESIMS	Strukturvorschlag	EI- MS/MS
1	3.09	426		~
	3.18	484		~
	3.33	338/336Br	Dihydroflustramin C N-oxid (139), Flustraminol A (137) und B (138);	~
	4.00	320/322Br	Flustramin E (131), Dihydroflustramin C (132);	~
	4.24	436/434 Br		~
	5.06	511		~
	5.12	495		~
	5.15	390/388 Br	Flustramin A (133), B (4), D (135), Isoflustramin D (134);	~
3	4.00	322/320 Br	Flustramin E (131), Dihydroflustramin C (132);	~
	5.09	495		~
	5.12	505		~
	6.42	281		~
4	3.36	338/336 Br	Dihydroflustramin C N-oxid (139), Flustraminol A (137) und B (138);	~
	3.54	422/420 Br		~
	4.09	322/320 Br	Flustramin E (131), Dihydroflustramin C (132) ;	210/208 Br
	4.27	436		253/251 Br
	5.12	406/404 Br	Flustrarin B (143), Flustramin D N-	321/319 Br

			oxid (140);	
	5.45	390/388 Br	Flustramin A (133) , B (4), D (135) , Isoflustramin D (134);	390/388 Br
5	3.36	338/336 Br	Dihydroflustramin C N-oxid (139), Flustraminol A (137) und B (138);	379/377 Br
	4.00	322/320 Br	Flustramin E (131), Dihydroflustramin C (132);;	277/279 Br
	4.24	406/404 Br	Flustrarin B (143), Flustramin D N-oxid (140);;	322/320 Br
	4.39	390/388 Br	Flustramin A (133), B (4), D (135), Isoflustramin D (134);	398
6	4.03	322/320 Br	Flustramin E (131), Dihydroflustramin C (132);;	~
	5.15	313		~
	6.09	332; 376		~
	6.39	281		~
7	4.03	322/320 Br	Flustramin E (131), Dihydroflustramin C (132);	276/278 Br
	4.48	338/336 Br; 749/747 Br	Dihydroflustramin C N-oxid (139), Flustraminol A (137) und B (138);	~
	4.45	350/348 Br		~
8	3.39	338/336 Br	Dihydroflustramin C N-oxid (139), Flustraminol A (137) und B (138);	~
	4.00	550		~
	4.57	336		~
	6.33	653		~
	6.39	281		~

Durch die EI-MS/MS Messungen konnten die Fragmentierungen der Molmasse $m/z = 388/390$ den Flustraminen zugeordnet werden (**Schema 9**). Das Fragmentierungsschema von $m/z = 320/322$ konnte keinen der bisher bekannten Verbindungen zugeordnet werden. Deswegen erschien Fraktion 5 interessant für eine weitere Aufarbeitung,



Schema 9: Fragmentierungsschema von $m/z = 388/390$ am Beispiel von Flustramin A (**133**).

Abb 21 zeigt die Ergebnisse der HPLC-MS-Analyse der Fraktion 5, in der die Fragmentierung des Molpeaks von $m/z = 320/322$ zu $m/z = 277/279$ beobachtet wird. Das Signal bei $m/z = 320/322$ entspricht der Molmasse von Dihydroflustramin C (**132**) und von Flustramin E (**131**).

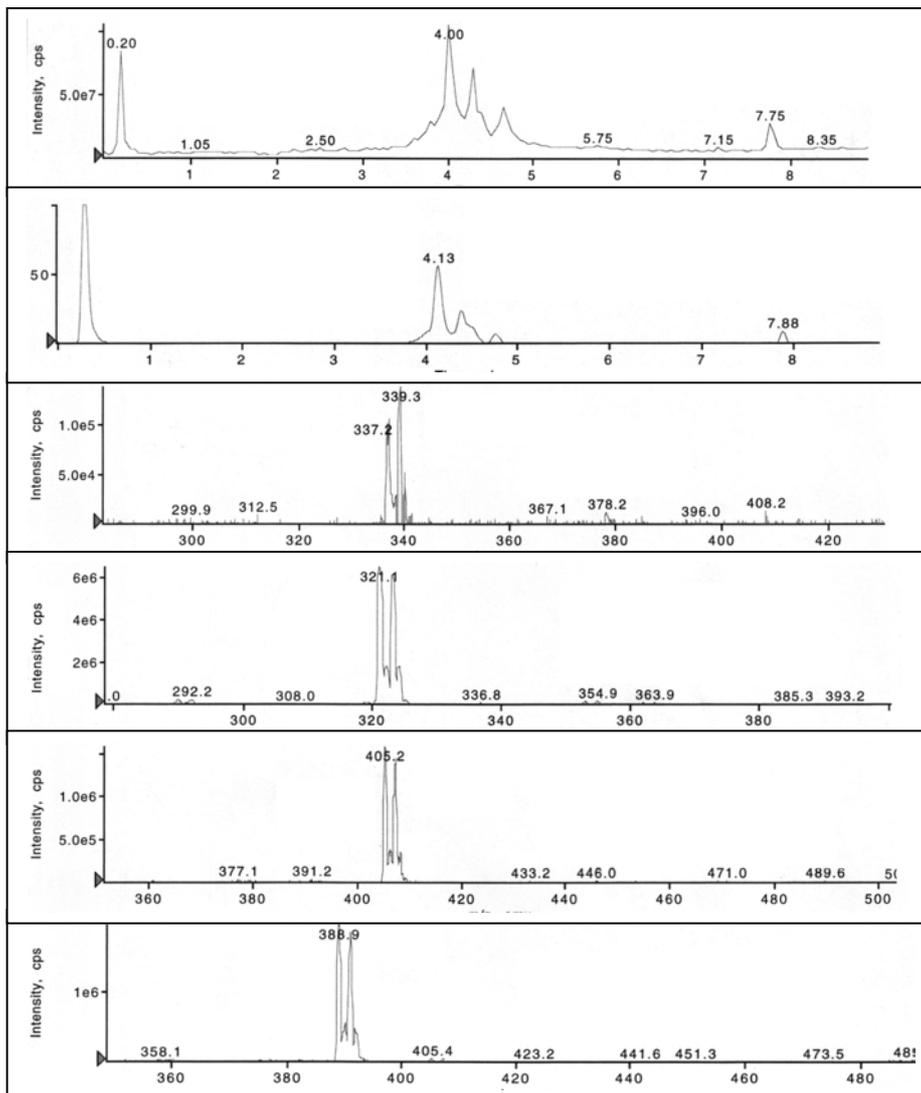


Abb. 21: HPLC-MS (ESI⁺) von Fraktion 5: Bild 1: MS-Elutionsprofil; Bild 2: UV-Elutionsprofil; Bild 3: MS-Signal bei 3.60 min (336/338 Br; **137, 138, 139**); Bild 4: MS-Signal bei 4.00 min (322/320 Br, **131, 132**); Bild 5: MS-Signal bei 4.40 min (404/406 Br, **104, 143**); Bild 6: MS-Signal bei 4.65 min (388/390 Br, **133, 134, 135**).

3.5.2.2 Bioassay

Marine Organismen, die fest am Riff oder Meeresboden verankert sind, haben nur einen eng begrenzten Lebensraum und keine Fluchtmöglichkeiten. Sie müssen sich deswegen mit anderen Methoden gegen Feinde verteidigen. Dies geschieht u. a. durch toxische Sekundärmetaboliten. Dieses biologische Potential versucht man zu

nutzen, indem man gezielt nach Verbindungen sucht, die auch für den Menschen pharmakologische Wirkungen haben. In Bioassays werden solche Aktivitäten detektiert. Meist wird der Rohextrakt in einem Bioassay getestet. Ist dieser aktiv, wird weiter nach den Einzelverbindungen gesucht, wobei alle Chromatographieschritte von dem Bioassay begleitet werden und es dann stets mit der aktiven Fraktion weiter gearbeitet wird. Am Ende sollte dann die aktive, aufgereinigte Einzelverbindung erhalten werden. Oft passiert es jedoch, dass die Aktivität während der Reinigung komplett verloren geht, da Verbindungen z. B. nur in Gemischen eine ausreichende Aktivität zeigen.

Bei der Extraktion von *Flustra foliacea* wurden nicht nur der Rohextrakt sondern alle Extrakte auf Cytotoxizität gegen HCT-116 Zellen (menschliche Darmkrebszellen) getestet, da von *Flustra foliacea* noch keine cytotoxische Wirkung beschrieben wurde. Bisher sind nur Sekundärmetaboliten mit muskelrelaxierender und antibiotischer Wirkung aus diesem Organismus isoliert worden.

Von Beginn der Isolierung an wurden alle Fraktionen getestet. Der Rohextrakt, die konzentrierte Wasser- und die *iso*-Octanphase zeigten keinerlei Aktivität. Nur die konzentrierte *n*-Butanolphase besaß mit einem IC₅₀-Wert von 71.2 µg/mL schwache cytotoxische Aktivität. Danach wurden alle Sephadex LH-20 Fraktionen der *n*-Butanolphase auf Cytotoxizität getestet. In Fraktion 4 wurde wiederum eine Aktivität mit einem IC₅₀-Wert von 74.1 µg·mL⁻¹ gefunden.

3.6 Strukturaufklärung

Auf Grund der gefundenen Molmassen von $m/z = 320/322$ und $m/z = 388/390$ in Fraktion 4 und 5 und der interessanten cytotoxischen Aktivität der Fraktion 4 wurden diese beiden Fraktionen weiter aufgereinigt.

3.6.1 Fraktion 4 der Gelchromatographie: Flustramin A (133), Flustramin D (135) und Dihydroflustramin C (132)

3.6.1.1 Flustramin A (133)

Aus Fraktion 4 der Größenausschluss-Chromatographie konnten die Verbindungen an Kieselgel und einem Eluenten CHCl₃/CH₃OH (Gradient CHCl₃ zu CHCl₃/CH₃OH

(7:3)) chromatographiert werden. In Fraktion 2 dieser Trennung wurden 16 mg (**133**) isoliert, das entspricht 0.02% des Trockengewichtes. $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, massenspektrometrische-, IR-, UV/VIS- und polarimetrische-Daten stimmten mit den Daten von J. S. Carle^[101] überein.

Flustramin A (**133**) enthält ein Bromatom und besitzt die Molmasse m/z 388/390. Im MS/MS-Spektrum ist die Abspaltung einer Prenylgruppe (69, C_5H_9) zu sehen, und das Molekölion fragmentiert zu m/z 319/321. Im zweiten Schritt von m/z 319/321 zu 251/253 findet eine weitere Fragmentierung unter Abspaltung der Prenylgruppe statt, und die Molmasse verringert sich um 68 (C_5H_8)^[102]. Bei der folgenden Fragmentierung zur Molmasse m/z 210/208 wird das Physostigmingerüst zerstört, wahrscheinlich handelt es sich um das Bromo-3-methylindolin^[103]. Durch die MS/MS Analyse konnte die weitere Fragmentierung unter Bromabspaltung zu 129 beobachtet werden. Das bestätigt die Struktur von Flustramin A(**133**) (**Schema 9**).

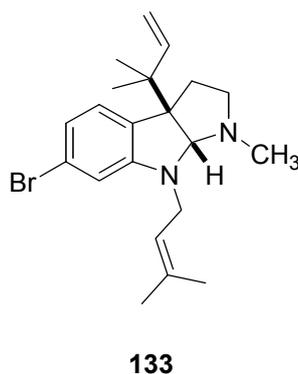


Abb. 22: Flustramin A.

3.6.1.2 Flustramin D (**135**)

Ein weiteres Derivat der Flustramingruppe, Flustramin D (**135**), wurde ebenfalls aus Fraktion 4 isoliert: Die Aufreinigung erfolgte wie bei **133**. Flustramin D (**135**) wurde zusammen mit Dihydroflustramin C (**132**) in einem Verhältnis von 1:3 eluiert. Das Verhältnis der beiden Verbindungen wurde durch die Integration der H-Signale an Position 4 im $^1\text{H-NMR}$ Spektrum der beiden Verbindungen ermittelt. Es folgte eine Reinigung durch präparative HPLC. Als stationäre Phase wurde Kieselgel verwendet

mit einem Fließmittelgradienten CHCl_3 (9.5:0.5) zu $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2). Nach einer Retentionszeit von 22.20 min wurde wiederum im Gemisch Flustramin D (**135**) mit Dihydroflustramin C (**132**) erhalten. Die strukturelle und polare Ähnlichkeit der beiden Verbindungen verhinderte die Trennung durch eine Normalphase, eine Trennung an RP-18 Phase wurde nicht mehr durchgeführt, da die 5.1 mg für die Bioassays benötigt wurden.

Die erhaltenen 5.1 mg des Gemisches enthielten aber keine weiteren im NMR-Spektrum erkennbaren Verunreinigungen. $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und MS-Daten wurden mit den Daten der Literatur^[104] verglichen, Flustramin D (**135**) konnte eindeutig identifiziert werden.

Flustramin D (**135**) unterscheidet sich von Flustramin A (**133**) durch die Position der Prenylgruppe. **133** ist am Stickstoffatom *N*-8 mit einer Prenylgruppe substituiert, während Flustramin D (**135**) die Prenylgruppe am Kohlenstoffatom C-5 trägt. Da **135** die gleiche Molmasse wie **133** besitzt, können auch hier die unter **133** beschriebenen Fragmentierungen der Massenspektrometrie zutreffen, da beide Verbindungen aus Fraktion 4 isoliert wurden.

3.6.1.3 Dihydroflustramin C (**132**)

Dihydroflustramin C (**132**) wurde als Gemisch mit Flustramin D (**135**) isoliert (siehe **Kap. 3.6.1.3.**). Anhand der $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ - und massenspektroskopischen Daten des schon früher isolierten Dihydroflustramin C (**132**), konnte die Verbindung eindeutig identifiziert werden.

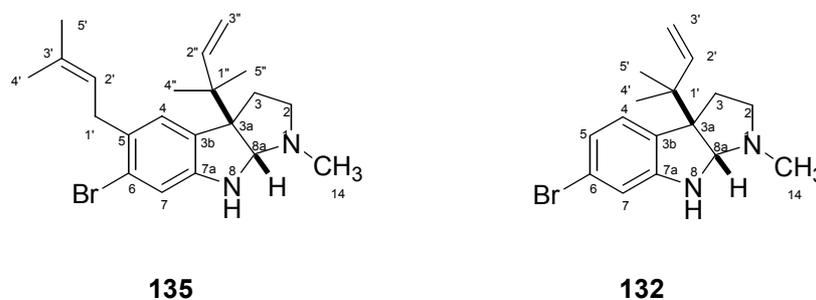


Abb. 23: Flustramin D (**135**) und Dihydroflustramin C (**132**).

3.6.2 Fraktion 5 der Gelchromatographie: Deformylflustrabromin (172)

3.6.2.1 Deformylflustrabromin (172)

Die Isolierung von Deformylflustrabromin (**172**) erfolgte zuerst an einer RP-8 Phase, gefolgt von einer Reinigung an Kieselgel. Durch $^1\text{H-NMR}$ -, $^{13}\text{C-NMR}$ -, HSQC-, HMBC- und COSY-Daten und der Molmasse, die durch eine HRFABMS (M^+H) Messung für $\text{C}_{16}\text{H}_{22}^{79}\text{BrN}_2$ auf 321.0974 ermittelt wurde, ließ sich die Struktur von **172** festlegen. In **Tab. 4** und der **Abb. 24 und 26** sind die erhaltenen NMR-Daten und Korrelationen zu sehen.

Tab. 4: Eindimensionale und zweidimensionale NMR-Daten von Deformylflustrabromin (**172**).

Position	$^1\text{H-NMR}^{\text{a}}$	$^{13}\text{C-NMR}^{\text{b}}$	HMBC Korrelationen ^c
2	-	141.8	
3	-	104.9	
3a	-	127.6	
4	7.45 (1H, d, 8.3 Hz)	119.4	3, 3a, 6, 7a
5	7.15 (1H, d, 8.3 Hz)	121.2	7
6	-	113.5	
7	7.53 (1H, s)	113.4	3a, 5, 6
7a	-	135.5	
1'	3.23 (2H, m)	21.6	2, 3, 3a
2'	3.08 (2H, m)	48.5	
1''	-	38.7	
2''	6.15; dd; 17.3, 10.4	145.5	2, 1'', 4''(5'')
3''	5.17 (1H, d, 17.3 Hz; E); 5.16 (1H, d, 10.4 Hz; Z)	111.6	1'', 2''
4''	1.53 (3H, s)	27.6	2, 1'', 2'', 5''
5''	1.53 (3H, s)	27.6	2, 1'', 2'', 4''
NCH_3	2.71 (3H, s)	45.4	

^a 360 MHz (Chloroform- d_1 /Methanol- d_4 (7:3)); ^b 75.4 MHz (DMSO- d_6); ^c Position der C-Atome.

Dann wurde versucht, mit Hilfe des Computerprogramms COCON^[105] die exakte Struktur zu sichern, da die Aminogruppe keine ^1H - ^{13}C -HMBC-Korrelationen zu den benachbarten C- oder H-Atomen zeigt. Das Programm COCON berechnet auf Basis von HSQC-, HMBC- und COSY-NMR Daten alle mit den Konnektivitätsinformationen und der Summenformel vereinbaren Konstitutionen. (**Tab. 5**)

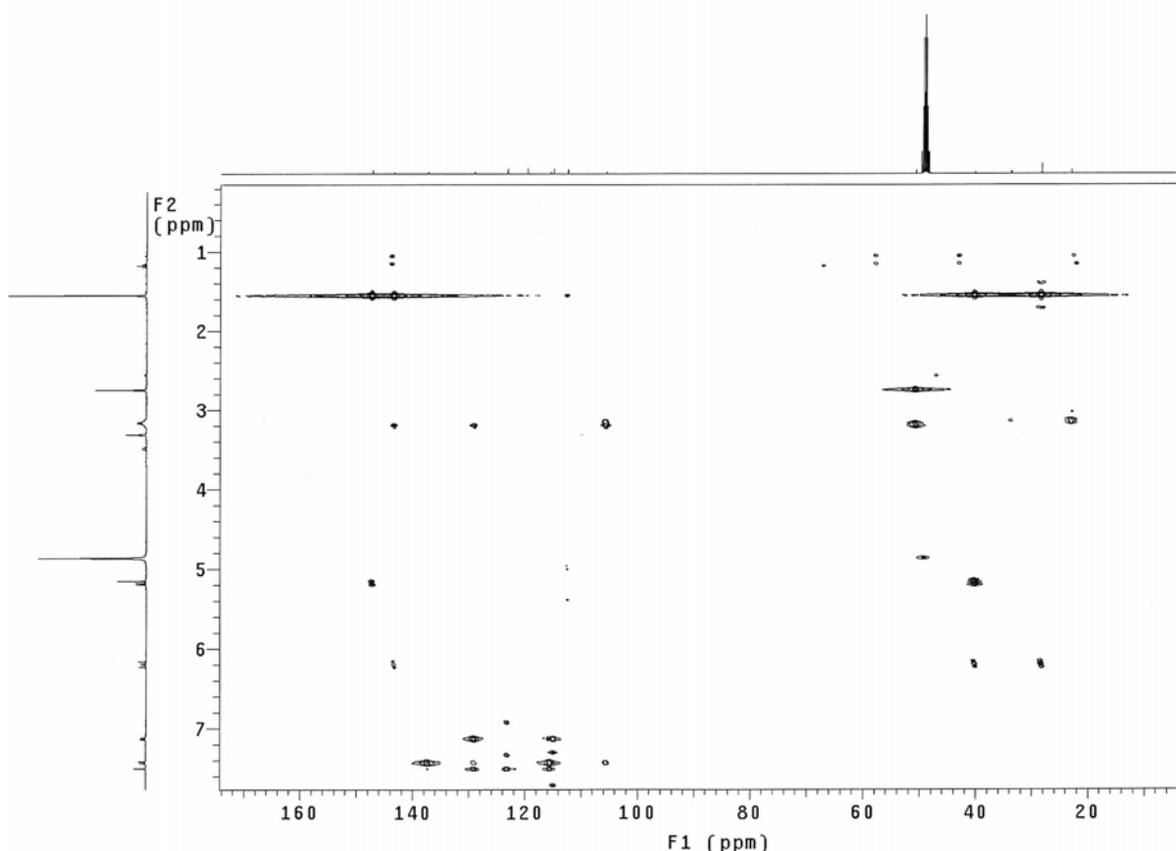


Abb. 24: HMBC-Spektrum von Deformylflustrabromin (**172**) 100.5 MHz in Methanol- d_4 : Die Struktur wurde nochmals bestätigt, indem die Verbindung in Methanol- d_4 vermessen wurde. Hierbei konnten eine Korrelation von der NCH_3 -Gruppe auf das Kohlenstoffatom C-2' gesehen werden.

Als Ergebnis der COCON Berechnung wurden nur die Konstitutionen (**172**) und (**173**) als Möglichkeiten erhalten. Das Ergebnis zeigt, dass die Positionen der Methylaminogruppe und des Broms nicht gesichert sind. In den beiden erhaltenen Strukturvorschlägen sind die Positionen der beiden Substituenten vertauscht. Betrachtet man die chemische Taxonomie der Flustramine und die Einordnung von Deformylflustrabromin (**172**) in die Biosynthese, so muss Struktur **172** bevorzugt werden.

Tab. 5: COCON Input-File.

# No.	ON	Hx	13C	code	(Atomtyp)	3JHH	13C HMBC
1	6	2	22	130	(>CH ₂)	6	7, 13, 15
2	6	3	27	193	(-CH ₃)	-	3, 4, 15, 16
3	6	3	28	193	(-CH ₃)	-	2, 4, 15, 16
4	6	-	39	4	(>C<)	-	-
5	6	3	45	193	(-CH ₃)	19	-
6	6	2	49	130	(>CH ₂)	1	-
7	6	-	105	11	(=C<)	-	-
8	6	2	112	137	(=CH ₂)	-	4, 16
9	6	1	113	74	(=CH-)	-	10, 12, 13
10	6	-	115	11	(=C<)	-	-
11	6	1	119	74	(=CH-)	12	7, 10, 13, 14
12	6	1	123	74	(=CH-)	11	9, 13
13	6	-	128	11	(=C<)	-	-
14	6	-	135	11	(=C<)	-	-
15	6	-	141	11	(=C<)	-	-
16	6	1	145	74	(=CH-)	-	2, 3, 4
17	35	-	500	1	(-Br)	-	-
18	7	1	500	66	(>NH)	-	7, 13, 14, 15
19	7	1	500	66	(>NH)	5	-

Zahlendiagramm: 1. Spalte: Nummer der Atome; 2. Spalte: Ordnungszahlen; 3. Spalte: Anzahl der H-Atome an dem jeweiligen C-Atom; 4. Spalte: ¹³C-NMR-Shift; 5. Spalte: Codezahlen für die Hybridisierung; 6. Spalte: Erklärung des Codes für die Hybridisierung; 7. Spalte: COSY-Korrelationen; 8. Spalte: HMBC-Korrelationen.

Weitere Eingaben, die die Verbindung näher charakterisieren:

Bei dem zu berechnenden Molekül handelt es sich um eine neutrale Verbindung mit Doppelbindungen, die weder ein Cyclopropan noch ein Cyclobutadien als Teilstruktur besitzt. In der Verbindung befinden sich weder Peroxide, noch enthält das Ringsystem 2 Heteroatome.

Es werden sowohl die ¹³C-NMR Shifts, als auch die Hybridisierung der einzelnen C-Atome berücksichtigt. Die Hybridisierung wird durch einen Code deklariert. Auch die COSY- und HMBC-Daten wurden mit in die Berechnung eingebracht. Da nicht alle möglichen COSY-Daten bei der Messung zu sehen waren, ist man davon ausgegangen, dass auch die H-Atome benachbart sein können, bei denen diese Korrelation nicht zu sehen ist.

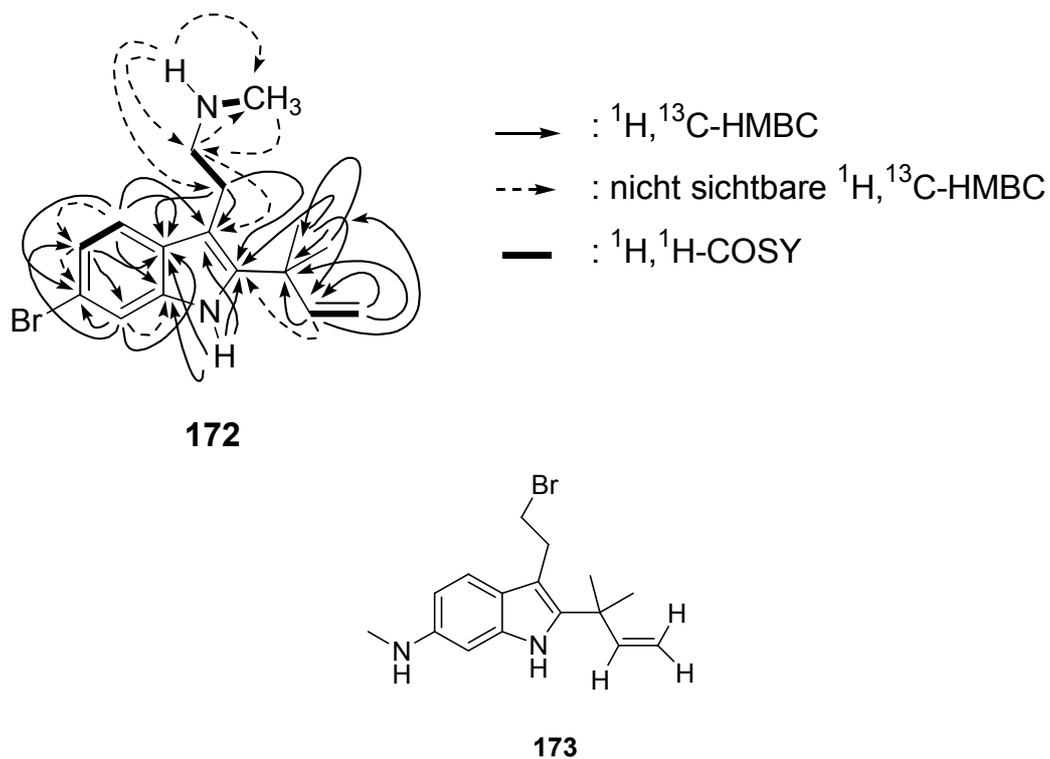


Abb. 25: Strukturvorschläge durch die COCON-Berechnung: Oben Deformylflustrabromin (**172**) mit den eingezeichneten 2D-NMR-Daten; unten: zweiter COCON-Vorschlag (**173**), der aber unwahrscheinlich ist.

In Anlehnung an Flustrabromin (**145**)^[106], das im Vergleich zur neu isolierten Verbindung zusätzlich in der Seitenkette *N*-formyliert substituiert ist, wurde die Verbindung **172** Deformylflustrabromin genannt.

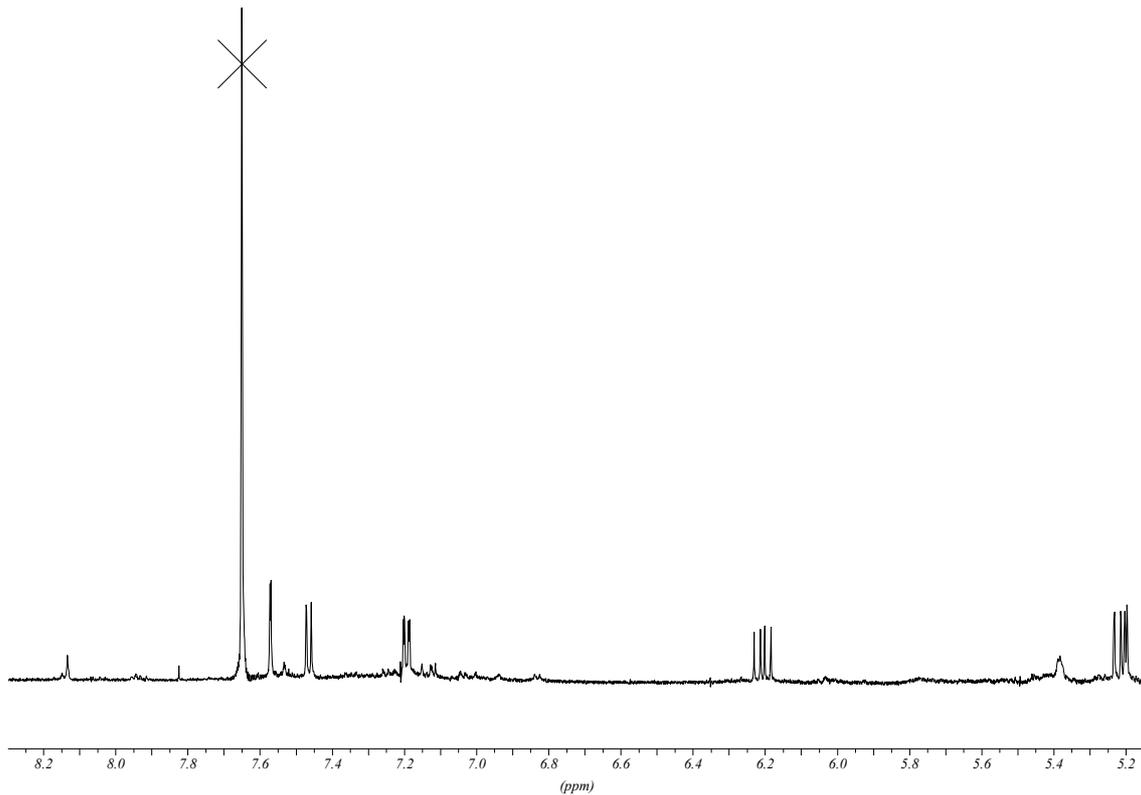


Abb. 26: *n*-Butanolphase aus *Flustra foliacea* ^1H NMR (600MHz, Chloroform- d_1 /Methanol- d_4 (1:1)).

Die Ähnlichkeit der beiden Verbindungen **172** und **145** ließ darauf schließen, dass es sich bei **172** um ein Artefakt von **145** handeln könnte, das durch chromatographische Bedingungen aus Flustrabromin entstanden ist. Dies konnte mit Hilfe des ^1H -NMR-Spektrum der *n*-Butanolphase (**Abb.26**) ausgeschlossen werden. Im aromatischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums ließen sich die dominanten Signale der Verbindung **172** zuordnen. Ein *N*-Formyl-Proton-Signal, das bei $\delta = 8.0$ ppm zu erwarten wäre, fehlte jedoch.

Der Gehalt der Verbindung **172** wurde auf 0.072% der Trockenmasse bestimmt, sie ist damit vergleichbar dem Gehalt von schon bekannten Sekundärmetaboliten (speziell des Flustrabromins)^[82] des Moostierchens *Flustra foliacea*.

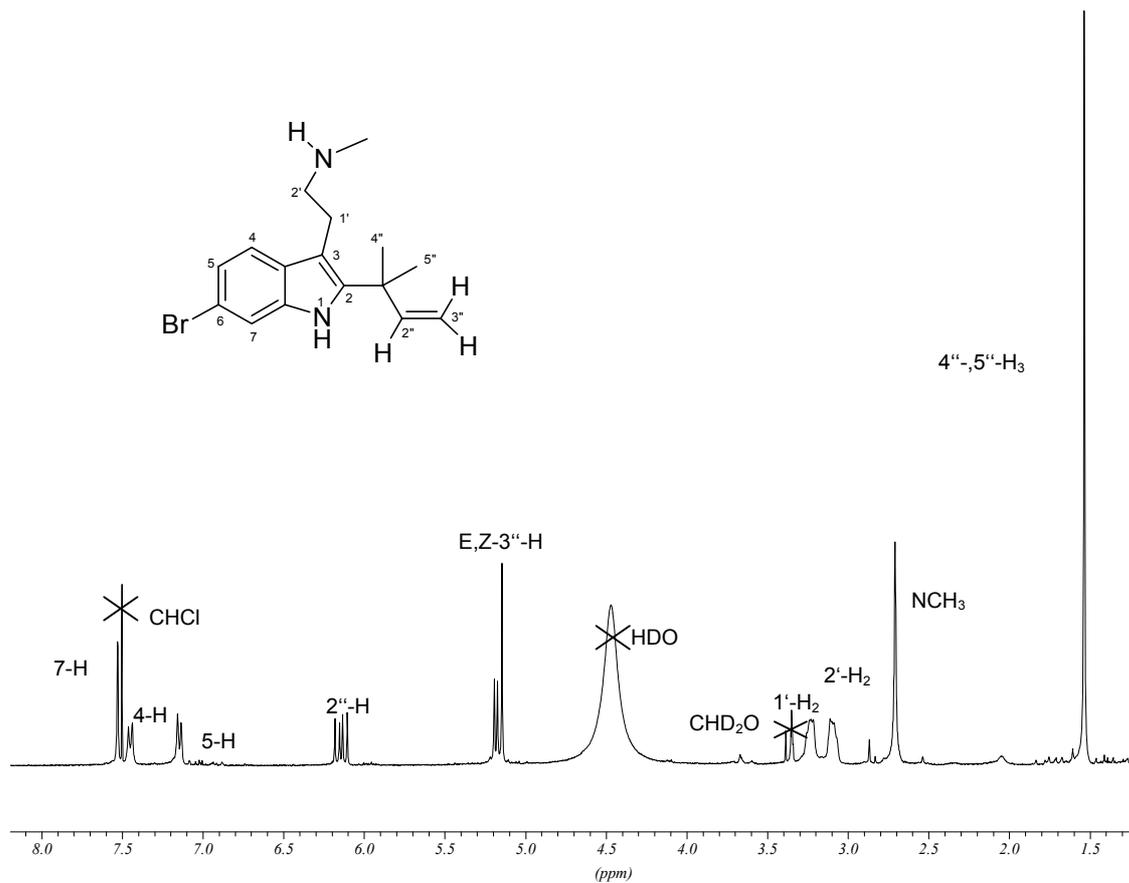


Abb. 27: Deformylflustrabromin (**172**) ^1H NMR (360 MHz, Chloroform- d_1 /Methanol- d_4 (7:3)).

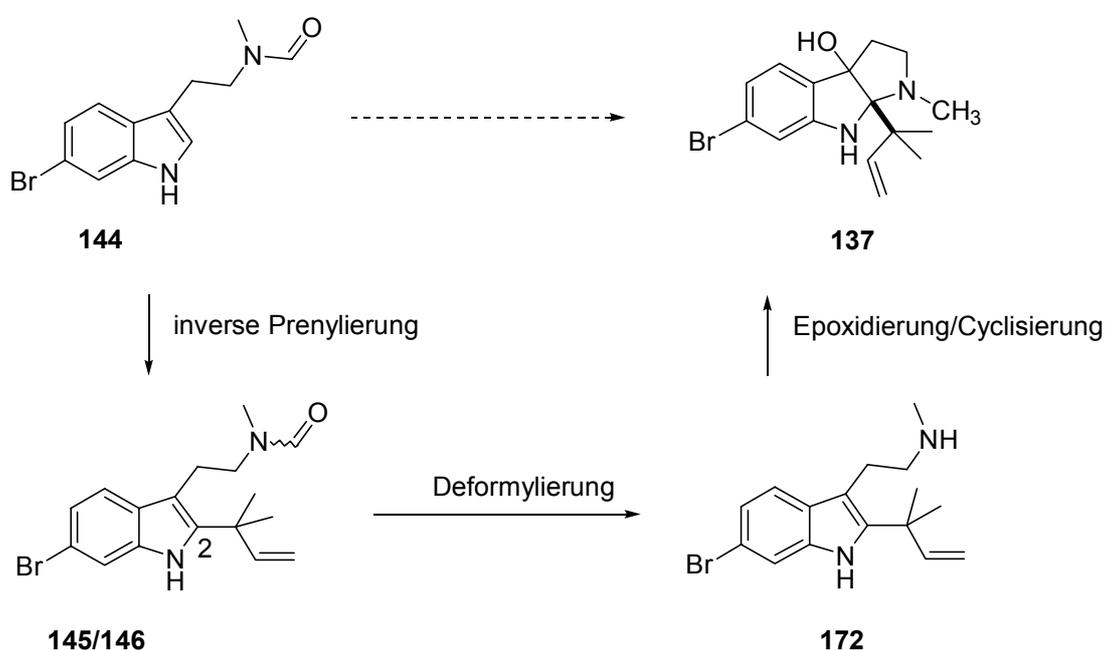
3.6.2.2 Einordnung von Deformylflustrabromin (**172**)

Aus diesem Organismus sind bis heute 25 verschiedene Sekundärmetaboliten isoliert worden, **172** eingeschlossen. Bei sechs Verbindungen stammt das ganze Grundgerüst aus dem Terpenstoffwechsel. 18 Verbindungen sind Indolalkaloide. Bei 14 dieser Verbindungen ist dieses zu einem Physostigmin Grundgerüst cyclisiert. **172** könnte als Schlüsselbaustein Aufschluss über die Biosynthese der indolartigen Sekundärmetaboliten geben.

3.6.2.2.1 Mögliche Biosynthesewege

Die tricyclischen Sekundärmetaboliten sind immer am Stickstoffatom N-1 methyliert. Durch die Cyclisierung von Verbindung **144** könnten die tricyclischen Derivate von der Natur gebildet werden. Flustraminol A ist als einzige Verbindung an Position 8a mit einer inversen Prenylgruppe substituiert. Geht man davon aus, dass die oben

beschriebenen Tricyclen durch eine Cyclisierung von Tryptaminderivaten gebildet werden, so könnte auch Deformylflustrabromin (**172**) die Vorstufe von Flustraminol A (**137**) sein (**Schema 10**). **172** könnte entweder direkt durch eine Prenylierung am Kohlenstoff C-2 aus Tryptamin entstehen oder die Deformylierung von Flustrabromin könnte **172** liefern. Die anschließende Epoxidierung der Doppelbindung von **172**, gefolgt von einer Cyclisierung könnte direkt Flustraminol A (**137**) ergeben. In Anbetracht dessen stellt Deformylflustrabromin (**172**) vielleicht eine Biosynthesestufe von **137** dar.



Schema 10: Biosyntheseweg von Flustraminol A (**137**) über Flustrabromin (**145/146**) und Deformylflustrabromin (**172**).

3.6.2.3 Biologische Aktivitäten

Für alle hier isolierten Derivate wurden die im folgenden genannten biologischen Aktivitäten gefunden, die bisher noch nicht bekannt waren.

3.6.2.3.1 Fungizide und antibakterielle Wirkungen

Für Deformylflustrabromin (**172**) wurde eine antibiotische Aktivität gegen das Bakterium *Staphylococcus aureus* mit einem IC_{50} -Wert von 3.9 $\mu\text{g/mL}$ und eine

fungizide Aktivität gegen *Candida albicans* gefunden. Die Werte lagen zwischen einem IC_{50} -Wert von 3.1 und 3.9 $\mu\text{g/mL}$. Beide Aktivitäten sind moderat. Clotrimazol als eine der bekanntesten Wirkstoffe gegen *Candida albicans* hat eine Aktivität von IC_{50} 1.0 $\mu\text{g/mL}$.

3.6.2.3.2 Cytotoxische Wirkungen von *Flustra foliacea*

Im Zuge unserer Bioassay-geleiteten Isolierung wurde für alle isolierten Verbindungen eine moderate cytotoxische Aktivität gegen menschliche Darmkrebszellen (HCT-116 Zellen) gefunden.

Auffallend war, dass **172** zwar die stärkste cytotoxische Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 1.89 $\mu\text{g/mL}$ zeigte, diese aber erst im isolierten Zustand gemessen werden konnte. Die anderen drei Verbindungen befanden sich alle in Fraktion 4 der Gelchromatographie, die schon während der Isolierung als aktiv getestet wurde. Das Gemisch von Flustramin D (**135**) und Dihydroflustramin C (**132**) zeigte mit einem IC_{50} -Wert von 8.7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ eine stärkere Aktivität als Flustramin A (**133**) selbst (IC_{50} -Wert von 25.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Die Hypothese, dass die Flustramine im Gemisch stärker cytotoxisch sind als die Einzelverbindungen, erscheint jedoch fraglich, da der Wirkungsmechanismus der Flustramine noch nicht geklärt ist.



Abb. 28: *Hymeniacidon heliophila*

4 Der Schwamm *Hymeniacidon heliophila*

Hymeniacidon heliophila (**Abb. 28**) ist ein mariner Schwamm (Stamm: Porifera), aus der Klasse der Demospongiae (Kieselschwämme). Funde sind bisher nur aus subtropischen Meeren bekannt. Der Schwamm bildet Kolonien, die auf einem harten Untergrund wie Stein, Felsen oder Molluskenschalen angeheftet wachsen. Die Tiere ernähren sich von kleinen Organismen, die sie mit Hilfe von Geißeln einstrudeln.

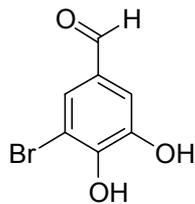
Der Schwamm *Hymeniacidon heliophila* wächst in der Gezeitenzone subtropischer Meere. Er befindet sich deshalb bei Ebbe zum Teil über der Wasseroberfläche. Dadurch ist er der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Dieser „sonnen-liebende Schwamm“ („*heliophila*“ bzw. „sun-loving-sponge“) muss einen Schutzmechanismus entwickelt haben, um dem extremen photo-oxidativen Stress standzuhalten. Da dieser Organismus keine morphologischen Schutzeinrichtungen besitzt wurde auf einen chemischen Lichtschutz geschlossen. Darüber hinaus steht dieser Schwamm – als Organismus in der Gezeitenzone – beim Austrocknen unter einem hohen osmotischen Stress. Dies legt ebenfalls hohe Konzentrationen niedermolekularer Substanzen nahe.

4.1 Lichtschutz und Antioxidantien in Meeresorganismen

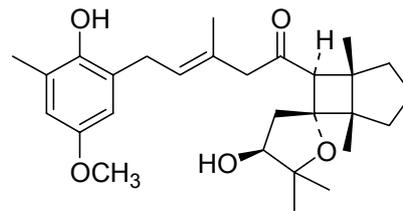
Lichtstrahlung auf der Erde besteht aus Infrarot (>800 nm), sichtbarer und photosynthetisch aktiver (400-750 nm), ultravioletter-A (UV-A 320-400 nm) und ultravioletter-B (UV-B 280-320 nm) Strahlung. Organismen, die im Gezeitenbereich oder dicht unter der Wasseroberfläche leben, sind der gesamten Strahlung ausgesetzt. Dies kann zu Schädigungen an Organismen führen, die in Tiefen bis etwa 20 m leben^[107]. Vor allem durch die UV-Strahlung kann es zu DNA-Schädigungen, Lipidperoxidation, Schädigung von Enzymen, Zerstörung der Zellmembranen und bei Algen sogar zur Inhibition von Photosynthese und Wachstum kommen^[108]. Zum Teil handelt es sich um Schäden durch die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanion (O_2^-), die protonierte Form des Hydroperoxidradikals ($\cdot HO_2$) oder das Hydroxylradikal ($\cdot OH$). Größere Tiere und Pflanzen verfügen über einen morphologischen Schutz vor hoher Sonneneinstrahlung, z. B. Haare. Zusätzlich verfügen sie über antioxidative Enzyme wie die Superoxiddismutasen, Katalasen und

Ascorbatperoxidase, deren Aktivität in positiver Korrelation mit der Sonneneinstrahlung steht. Dies trifft auch für marine Organismen zu^[109].

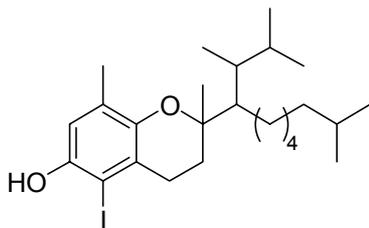
Bekannte Antioxidantien, die auch in marinen Organismen vorkommen, sind wasserlöslich, z. B. Ascorbinsäure, Glutathion, Harnsäure oder lipidlösliche wie α -Tocopherol und β -Carotin^[110]. Potterat^[13] berichtet über weitere antioxidativ wirksame Verbindungen aus marinen Organismen: 5-Brom-3,4-dihydroxy-benzaldehyd (**174**) wurde aus der Rotalge *Polysiphonia urceolata* isoliert. Das Antioxidans Balearon (**175**) aus der Gattung *Cystoseira* besitzt in etwa die gleiche Kapazität wie α -Tocopherol, um Sauerstoffradikale abzufangen. In der Braunalge *Ascophyllum nodosum* konnte ein Chromanolderivat (**176**) als antioxidativ wirksame Substanz identifiziert werden. Auch das Manteltierchen *Amaroucium multiplicatum* verfügt über Antioxidantien (**177** und **178**), die durch Hemmung der Lipidperoxidation wirken (**Abb. 29**).



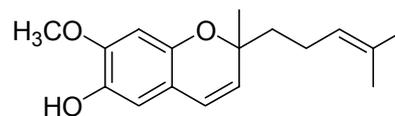
174: 5-Brom-3,4-dihydroxy-benzaldehyd



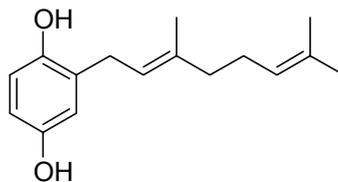
175: Balearon



176: Chromanolderivat



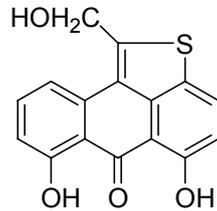
177: 2H-Chromen



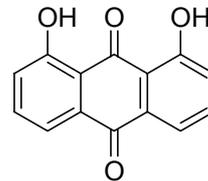
178: Hydrochinon Terpen

Abb. 29: Marine Antioxidantien.

Als antilipoperoxidative Substanzen wirken 6H-Anthra-[1,9-b,c]thiophen (**179**) und 1,8-Dihydroxyanthrachinon (**180**) aus dem Moostierchen *Dakaira sp.*.



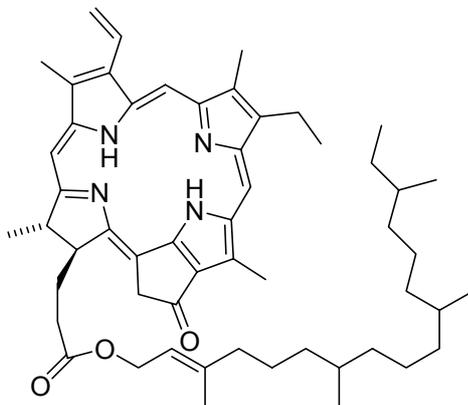
179: 6H-Anthra [1,9-b,c]thiophen



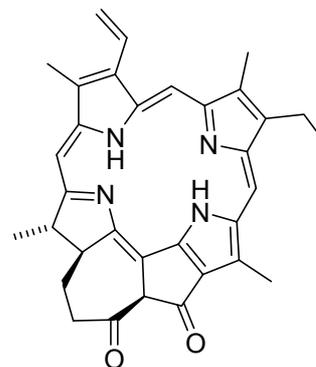
180: 1,8-Dihydroxyanthrachinon

Abb. 30: Tricyclische marine Antioxidantien.

Die Alge *Eisenia bicyllis* besitzt u. a. Pyropheophytin (**181**) als antioxidative Verbindung. Die Muschel *Ruditapes philippinarum* enthält das Chlorophyll-ähnliche Derivat (**182**).



181: Pyropheophytin

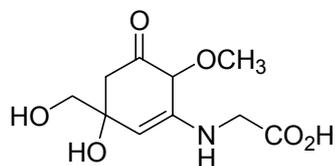


182: Chlorophyllon A

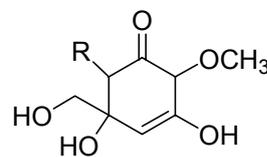
Abb. 31: Cyclische marine Antioxidantien

Über die biochemische Wirkungsweise von Antioxidantien ist nur wenig bekannt. Die besten Kenntnisse hat man über die Gruppe der Mycosporin-ähnlichen-Aminosäuren

(MAAs) (**183**, **184**, **185**). Sie sind kleine Moleküle, deren Konzentration im Organismus von der Meerestiefe abhängig ist. Ihnen konnte nur eine moderate antioxidative Wirkung nachgewiesen werden. Andererseits dafür sind sie aber in der Lage, das energiereiche UV-Licht (310 nm-360 nm) zu absorbieren ^[111]. MAAs werden von Mikroalgen produziert, die im Korallenriff als Symbionten u. a. in Schwämmen, Seeanemonen oder Korallen leben. Der größere Anteil der MAAs ist interessanterweise im Wirt zu finden^[112]. Ebenso wurden sie in nicht symbiontischen Organismen wie Seescheiden, Seehasen, Muscheln und Krabben gefunden.



183: Mycosporin-Glycin ($\lambda = 310$ nm)



184: R = OH: Gadusol ($\lambda = 268$ nm)
185: R = H: Deoxygadusol ($\lambda = 268$ nm)

Abb. 32: Mycosporine aus marinen Organismen.

Mit *Hymeniacidon heliophila* war ein Schwamm gefunden worden, der extreme Sonneneinstrahlung überlebt. Es sollte deshalb herausgefunden werden, ob diese Art einen chemischen Schutzmechanismus besitzt. Dazu sollten aktive Antioxidantien isoliert und identifiziert werden. Bei den ersten Versuchen wurde ein auffällig hoher Gehalt an 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) (**186**) gefunden, das *in vitro* antioxidativ wirkt^[113]. Ein Zusammenhang zwischen diesem hohen 5-HTP (**186**) Gehalt und dem offensichtlich notwendigen Sonnenschutz wurde deshalb vermutet. Durch die folgenden Versuche sollte diese Hypothese bestätigt werden.

4.2 Isolierung und Strukturaufklärung

Der Schwamm *Hymeniacidon heliophila* wurde vor Wilmington (North Carolina, USA, 34° N und 77°W, 1997 und 1999) in mehreren Chargen gesammelt und gefriergetrocknet. Insgesamt standen ca. 400 g des gefriergetrockneten Schwammes zur Verfügung. Die einzelnen Chargen wurden getrennt aufgearbeitet.

4.2.1 Extraktion, Isolierung und Struktur von 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) (**186**) und Tryptophan (**22**)

Das gefriergetrocknete Material wurde wie in **Kap. 3.5** beschrieben erschöpfend mit Dichlormethan/Methanol (1:1) extrahiert. Der getrocknete Rohextrakt wurde in Methanol aufgenommen und mit *iso*-Octan ausgeschüttelt, um lipophile Substanzen von den polaren Verbindungen der Methanolphase zu trennen. Die aufkonzentrierte Methanolphase wurde in Wasser aufgenommen und gegen *n*-Butanol ausgeschüttelt, um Salze und stark polare Verbindungen von Alkaloiden und weniger hydrophilen Verbindungen abzutrennen. Die aufkonzentrierte alkaloidhaltige *n*-Butanolphase wurde mittels Größenausschluss- und Affinitätschromatographie (Sephadex LH-20) mit Methanol als Fließmittel aufgetrennt. In Fraktion 6, der acht erhaltenen Fraktionen wurde 5-L-Hydroxytryptophan (5-HTP) (**186**) als saubere Verbindung eluiert.

4.2.2 Strukturaufklärung

Durch NMR-Spektroskopie, Massenspektrometrie, IR- und UV-Analyse wurde 5-HTP (**186**) eindeutig identifiziert. Das Vorliegen des 6-Hydroxytryptophan-Isomers konnte NMR spektroskopisch mit einem HMBC Experiment durch die 3J -Kopplung des Wasserstoffatoms an Position 6 mit dem Kohlenstoff an C-7a ausgeschlossen werden. Die Stereochemie wurde durch Vergleich des experimentell bestimmten Drehwertes ($[\alpha]_D^{20} = -27.4$) mit den Literaturwerten des L-Hydroxytryptophans (**186**) bestätigt. In Fraktion 4 der Größenausschluss-Chromatographie wurde im Gemisch mit **186** auch Tryptophan (**22**) isoliert, das in der Biosynthese die Vorstufe von **186** ist. Durch Vergleichsmessungen konnte auch diese Verbindung eindeutig identifiziert werden.

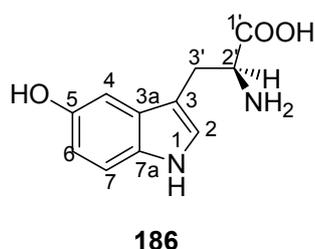
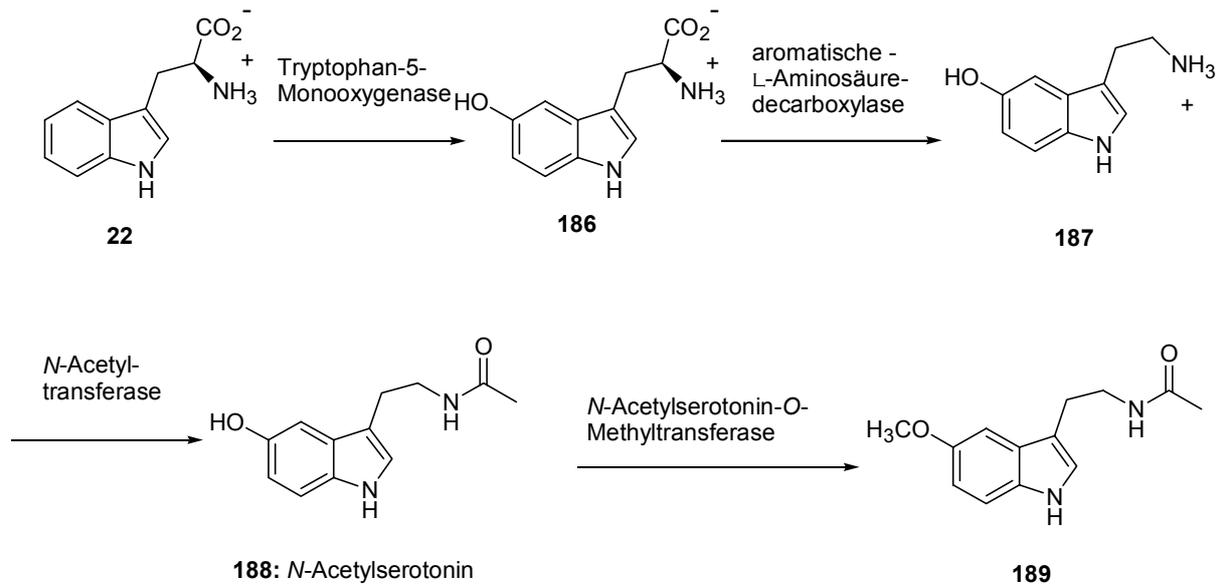


Abb. 33: Hauptmetabolit des Schwammes *Hymeniacidon heliophila*.

4.2.3 Biosynthese und Metabolismus des 5-Hydroxytryptophans (186)

5-HTP ist ein Metabolit der Aminosäure Tryptophan (**22**) und entsteht durch eine Hydroxylierung am Kohlenstoffatom C-5 des Indolrings. Durch die Decarboxylierung entsteht Serotonin (**187**), das durch eine *N*-Acetyltransferase am Stickstoff acetyliert wird. Durch Acetylierung der Aminogruppe und Methylierung durch die *N*-Acetylmethyltransferase entsteht Melatonin¹¹⁴ (**189**).



Schema 11: Metabolisierung von Tryptophan.

Sowohl Serotonin als auch Melatonin wurden bisher nicht in *H. heliophila* gefunden. Serotonin wirkt als Neurotransmitter im zentralen und peripheren Nervensystem^[1]. Melatonin ist bei Fischen der Antagonist von Melanotropin und bewirkt über eine Kontraktion der Pigmentzellen eine Aufhellung der Haut.

4.3 Konzentrationsbestimmung von 5-Hydroxytryptophan (186) durch HPLC und NMR-Spektroskopie

Die überraschend hohen Konzentrationen an 5-HTP (**186**) (ca. 0.5% der Trockenmasse) legen eine besondere Rolle dieser Substanz nahe und erforderten somit eine weitere Quantifizierung. Dies um so mehr, als von Jovanovic^[113] **186** bereits als Antioxidans diskutiert worden war. Da bei der ersten Untersuchung der Inhaltsstoffe ein hoher Anteil an 5-HTP (**186**) isoliert wurde (ca. 0.5%), wurden nochmals mehrere Aufsammlungen an verschiedenen Orten bei Wilmington (North

Carolina/USA) gesammelt und danach mit einer hierfür speziell entwickelten Methode extrahiert und isoliert. Zur Quantifizierung von 5-HTP wurden die einzelnen Aufsammlungen getrennt mit Wasser/Ethanol (1:1) extrahiert. Die erschöpfende Extraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Diese Extraktionsmethode hatte auch den Vorteil, dass unpolare Substanzen, wie Lipide oder β -Carotine nicht extrahiert wurden. Die erhaltenen Extrakte wurden sowohl durch HPLC-, als auch durch NMR-Messungen quantifiziert.

4.3.1 Quantifizierung durch HPLC

Für die HPLC-Quantifizierung wurden 100 mg Extrakt in 100 ml Wasser/Methanol-Gemisch (1:1) gelöst und 20 μ l injiziert. Als Fließmittel wurde ebenfalls Wasser/Methanol (1:1) verwendet (**Abb. 34**). Alle Extrakte wurde dreimal vermessen und gegen eine Kalibriergerade, die mit **186** erstellt wurde, ausgewertet (**Tab. 6**).

Tab. 6: Mittels HPLC bestimmte Konzentrationen an 5-HTP (**186**) in den verschiedenen Schwammaufsammlungen von *Hymeniacidon heliophila* mit einem durchschnittlichen Gehalt von $(0.44 \pm 0.23)\%$.

Proben	% (TG)5-HTP	Lichtverhältnisse am Standort
1	0.32 ± 0.08	Sonne
2	0.53 ± 0.07	Sonne
3	0.15 ± 0.09	Sonne
4	0.59 ± 0.16	Sonne
5	0.73 ± 0.21	Schatten
6	0.59 ± 0.11	Sonne
7	0.18 ± 0.03	Schatten



Abb. 34: HPLC Chromatogramm der Quantifizierung: Stationäre Phase: Rp-8; mobile Phase: Wasser/Methanol (1:1); Flussrate: 3.5 mL/min; Signal 1: **186** $R_t = 3.30$ min; Signal 2: Unbekannt $R_t = 4.44$; Signal 3: **22** $R_t = 5.60$ min.

4.3.2 Quantifizierung durch NMR-Spektroskopie

Die Quantifizierung weiterer Aufsammlungen mittels NMR erfolgte durch Integration. Jede Aufsammlung wurde zweimal vermessen. Zu jedem Extrakt wurden 10 mL ($c = 1 \text{ mg/mL}$) Maleinsäure (**190**) als interner Standard zugegeben. Die beiden H-Atome an der Doppelbindung des Standards ($\delta = 6.35$) wurden mittels Integration mit einem Signal der vier aromatischen H-Atome ($\delta 6.79$, $\delta 7.05$, $\delta 7.27$, oder $\delta 7.33$) des 5-HTPs (**186**) verglichen (**Tab. 7**).

Tab. 7: Durch die NMR-Methode erhaltene Konzentrationen an **186** in den einzelnen Schwammaufsammlungen des *Hymeniacidon heliophila*, mit einem durchschnittlichen Gehalt von $(0.45 \pm 0.23)\%$.

Proben	% (TG) 5-HTP	Lichtverhältnisse am Standort
1	0.49 ± 0.06	Sonne
2	0.36 ± 0.01	Sonne
3	0.57 ± 0.06	Schatten
4	0.48 ± 0.025	Sonne
5	0.32 ± 0.01	Schatten

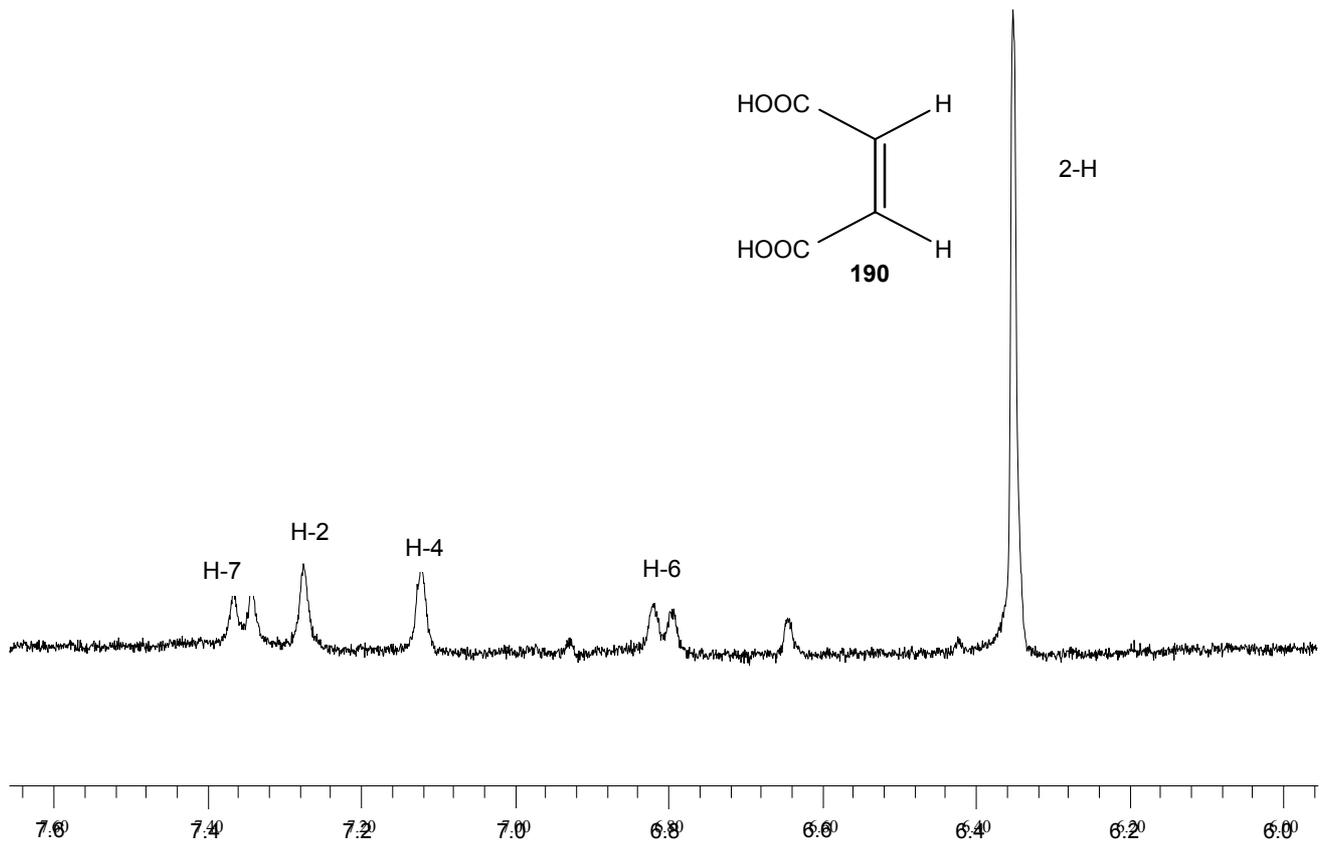


Abb. 35: ¹H-NMR-Spektrum: Quantifizierung von 5-Hydroxytryptophan (**186**) Methanol-*d*₄/Wasser-*d*₂ (1:1).

4.3.3 Auswertung der Isolierungen

Durch die erschöpfende Extraktion mit Dichlormethan/Methanol (1:1) werden fast alle Verbindungen aus dem Exoskelett durch das Lösungsmittel herausgelöst. Nach der Konzentrierung des Extraktes wurde ein ¹H-NMR-Spektrum in Methanol-*d*₄/Wasser-*d*₂ (1:1) aufgenommen. Die Signale des Indols von **186** sind im aromatischen Bereich ($\delta = 5.5$ bis $\delta = 8.5$ ppm) des ¹H-NMR-Spektrums die Dominierenden. Dadurch konnten andere aromatische Substanzen - z.B. Flavonoide, die als Antioxidantien in Pflanzen fungieren - als dominierende antioxidative Verbindungen ausgeschlossen werden. 5-HTP wird im menschlichen Körper zu Serotonin (**187**) und Melatonin (**189**) umgewandelt. Diese beiden Metaboliten wurden jedoch in dem Meeresschwamm nicht gefunden.

Durch die entwickelte Extraktion für die Quantifizierung sollte sichergestellt werden, dass 5-HTP vollständig extrahiert wurde. Die unpolaren Substanzen, die in einer Konzentration von ca. 5.4% der Trockenmasse vorhanden sind und bei beiden

Methoden der Quantifizierung stören würden, sollten nicht in dem zu vermessenden Extrakt enthalten sein.

4.3.4 Auswertung der Quantifizierungen

Da bei der NMR-Quantifizierung der hohe Gehalt an Meersalz die Messung beeinträchtigen könnte, wurde ebenfalls eine Kalibriergerade erstellt, in dem **186** in unterschiedlichen Konzentrationen mit NaCl vermischt und vermessen wurde. Die NMR-Proben wurden sowohl bei der Kalibrierung als auch bei der Quantifizierung in CD₃OD/D₂O komplett gelöst. Durch den Korrelationskoeffizienten ist erkennbar, dass der hohe Salzanteil die Messung nicht stört und die Ergebnisse der einzelnen Extrakte als richtig angenommen werden können.

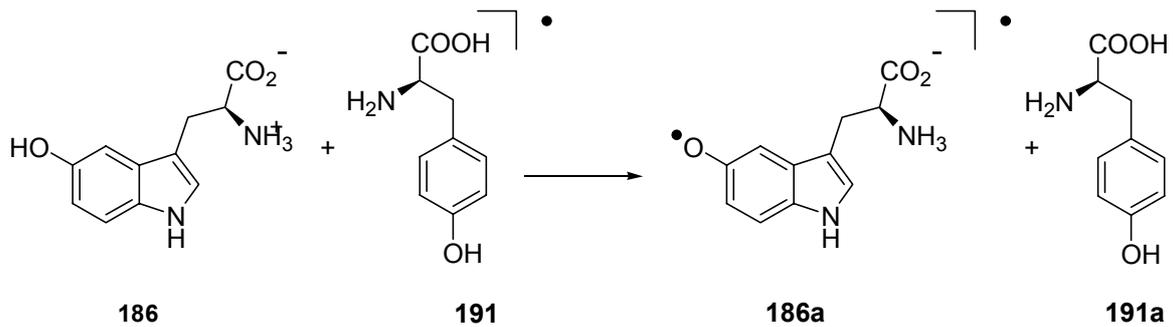
Die Ergebnisse in den Tabellen 6 und 7 zeigen, dass sowohl die Quantifizierung mittels HPLC als auch mittels NMR eine gemittelte 5-HTP-Konzentration von 0.45% ergaben und somit übereinstimmten. Die Resultate zeigen allerdings keinen Unterschied in der Konzentration von **186** in Schwämmen an sonnigen und schattigen Plätzen.

4.3.5 Biologische Aufgaben von 5-Hydroxytryptophan (**186**) im Schwamm *Hymeniacidon heliophila*

Die hohen gefundenen Konzentrationen im Zusammenhang mit den Lichtverhältnissen am Standort legen eine Schutzfunktion des 5-HTP (**186**) nahe.

4.3.5.1 Redoxpotential

Schon 1990 wurde von Jovanovic^[113] beschrieben, dass 5-Hydroxytryptophan (**186**) ein ausreichendes Redoxpotential hat, um eine antioxidative Funktion in einem biologischen System zu übernehmen. Das Oxidationspotential des 5-HTP-Radikals (**186a**) ist pH- abhängig, bei pH 3 besitzt es ein Potential von $E = 0.86$ V, bei pH 9.1 von $E = 0.55$ V und bei pH 13 $E = 0.29$ V. Da der pH-Wert des Meerwassers bei pH 7-8 liegt, ist das Potential des 5-HTP (**186**) von $E = 0.64$ V bei pH = 7 entscheidend. Durch dieses Oxidationspotential kann es kleine radikalische Moleküle wie Tyrosin (**191**) und das in der DNA enthaltene Guanin mit einem Redoxpotential von $E = 0.85$ V bzw. $E = 1.04$ V, wieder in ihren ursprünglichen Zustand zurückführen.



Schema 12: Redoxreaktion mit Beteiligung von 5-HTP (**186**).

Betrachtet man Flavonoide, die in Pflanzen als Antioxidantien tätig sind, so besitzen sie mit $E = 0.72 \text{ V}$ (Hesperidin) und $E = 0.57 \text{ V}$ (Catechin) etwa gleichwertige Redoxpotentiale^[115]. Man kann also annehmen, dass **186** wie auch diese Substanzen in erster Linie die Organismen vor Strahlenschäden schützen.

4.3.5.2 Konzentration

Auch die Konzentrationen liegen im vergleichbaren Bereich. *Hymeniacidon heliophila* enthält mit einer von 0.45% 5-HTP (**186**) – entsprechend einer geschätzten Konzentration von 2 mM im Zellwasser - eine ähnliche Konzentration wie Flavonoide in Pflanzen vorliegen (0.5.-1.5%^[116]). Sie dienen ebenfalls als Antioxidantien.

Die gesammelten Proben des Schwammes wurden auch auf eine Veränderung der Konzentration von **186** durch unterschiedliche Sonneneinstrahlung untersucht. Im Gegensatz zu den Flavonoiden bei denen ein Anstieg des Gehalts von 70% durch UV-B Strahlung zu sehen ist^[117], konnte dies bei diesem Organismus nicht beobachtet werden. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Sonneneinstrahlung und Konzentration nachgewiesen werden, aber die signifikant hohen Konzentrationen von **186** reichen aus, um dieser Substanz eine zentrale Rolle als Antioxidans zuzuschreiben.

4.4 5-oxygenierte Indole im Sekundärmetabolismus

5-Hydroxytryptophan (**186**) ist der wichtigste Metabolit in dem Schwamm *Hymeniacidon heliophila*. Es ist ein 5-oxygenierter Metabolit des Tryptophans (**22**).

Dieses Indol ist die biosynthetische Vorstufe der meisten indolhaltigen Sekundärmetaboliten in Lebewesen.

Bei terrestrischen Pflanzen ist das Physostigmin (**129**) aus dem Samen der Kalabarbohne (*Physostigma venenosum*) eines der bekanntesten Vertreter mit 5-oxygeniertem Indol. Aber auch im Meer sind bis heute schon zahlreiche Vertreter der Tryptophan-Abkömmlinge gefunden worden. Dem gegenüber stehen die Betalaine, die sich nicht vom Tryptophan ableiten lassen.

4.4.1 Einfache 5-Hydroxyindole

Ein einfaches 5-Hydroxyindol ist das Hyrtiosin A (**192**) mit einer 1-Carbonyl-2-hydroxy-Seitenkette am Kohlenstoff C-3 des Indols. Das Hyrtiosin B (**193**) ist das Dimer von Hyrtiosin A. Beide wurde aus dem Schwamm *Hyrtiosia erecta* isoliert^[118].

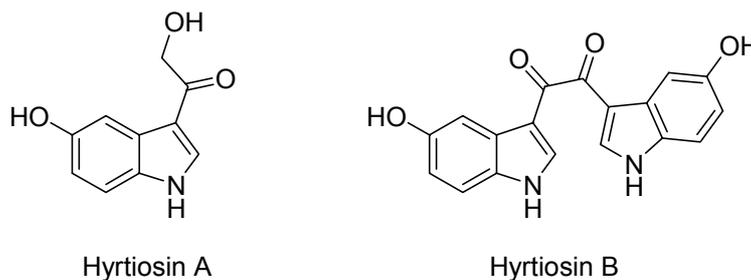
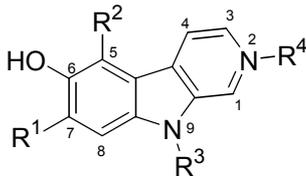


Abb. 36: Einfache Hydroxyindole.

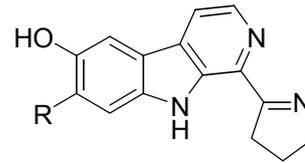
4.4.2 β -Carboline und Manzamine

Die Eudistomine sind wohl die am besten untersuchten Indole bzw. 5-oxygenierten Indolderivate in marinen Organismen. Weitere Derivate wurden kürzlich von Boyd^[121] aus dem Manteltierchen *Eudistoma gilboverse* isoliert. Sie bekamen nach der Methylierung des Stickstoffs ihren Namen *N*-2-Methyleudistomin D und *N*-14-Methyleudistomidin C (**194** und **195**). Die weite geographische und taxonomische Verbreitung und die unterschiedlichen Substituenten dieser Metaboliten lassen darauf schließen, dass diese Sekundärmetaboliten von einem symbiotischen Mikroorganismus gebildet werden^[119].

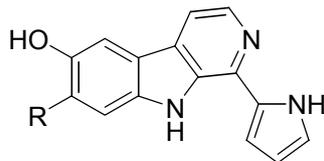
Der Kohlenstoff der Position C5 des Indols wird in einem β -Carbolin-Ring durch den Pyridinring, der zusätzlich am Indol hängt, zur Position C6. Die einfachen an Position C6 hydroxylierten Eudistomine können durch die unterschiedlich bromierte Position getennt werden. Bei Eudistomin D (**196**)^[120] befindet sich die Bromierung an Position C5 und bei Eudistomin J (**197**)^[120] am Kohlenstoff C-7. Deren methylierte Derivate *N*-2-Methyleudistomin D (**198**)^[121] und *N*-2-Methyleudistomin J (**199**)¹¹⁹, sind am Kohlenstoff C-2 und *N*-9- Methyleudistomin D (**200**) am Kohlenstoff C-9 substituiert. 7-bromeudistomin (**201**) hat am Kohlenstoff C-7 im Vergleich zu Eudistomin D ein weiteres Brom. Sowohl bei Eudistomin P (**202**)^[122], als auch bei Eudistomin Q (**203**)^[122], die sich durch eine Bromierung an Position C7 unterscheiden, ist der Kohlenstoff an C-1 mit 3,4 Dihydro-pyrrol substituiert. Eudistomin A (**204**)^[120] trägt das Bromatom ebenfalls an Position C7 und an Position C2 ein Pyrrolring, so auch bei Eudistomin M (**205**)^[120]. Eudistomin C (**206**)^[123], ein 7-Brom-, und Eudistomin E (**207**), ein 5-Bromo-Derivate, enthalten je einen Oxathiazepin-Ring. Bei Eudistomidin C (**208**)^[124] ist am Kohlenstoff C-1 ein Cysteinrest angefügt, ebenso bei Eudistomidin E (**198**)^[125] und Eudistomidin F (**199**)^[126]. Beide unterscheiden sich nur durch einen Sauerstoff am Schwefel.



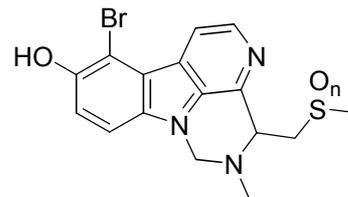
- 196:** R¹ = H, R² = Br, R³ = H, R⁴ = H:
Eudistomin D
197: R¹ = Br, R² = H, R³ = H, R⁴ = H:
Eudistomin J
200: R¹ = H, R² = Br, R³ = CH₃, R⁴ = H:
N-(9)-Methyleudistomin D (Eudistomidin D)
201: R¹ = Br, R² = Br, R³ = H, R⁴ = H:
7-Bromeudistomin D
194 R¹ = H, R² = Br, R³ = H, R⁴ = CH₃:
2-Methyleudistomin D
199: R¹ = Br, R² = H, R³ = H, R⁴ = CH₃:
2-Methyleudistomin J



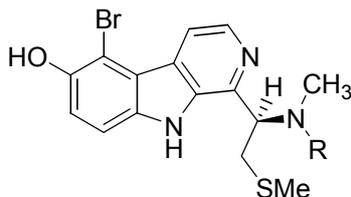
- 202:** R = Br: Eudistomin P
203: R = H: Eudistomin Q



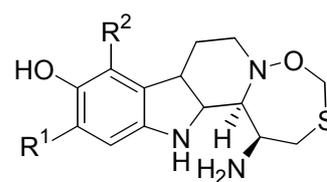
- 204:** R = Br: Eudistomin A
205: R = H: Eudistomin M



- 198:** n = 1: Eudistomidin E
199: n = 0: Eudistomidin F



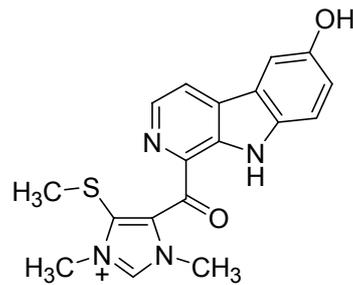
- 208:** R = H: Eudistomidin C
195: R = CH₃: *N*-Methyleudistomidin C



- 206:** R¹ = Br, R² = H: Eudistomin C
207: R¹ = H, R² = Br: Eudistomin E

Abb. 37: β -Carboline.

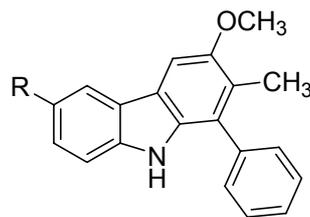
Hyrtiomanzamin (**210**)^[127] ist eine weitere indolhaltige Substanz, die aus dem Schwamm *Hyrtios erecta* isoliert wurde. Sie enthält einen Pyridinring und ist so strukturell mit den β -Carbolinen verwandt. Dazu ist sie am Kohlenstoff C-2 mit 3S(Methyl)-*N,N*-imidazol substituiert ist.



210: Hyrtiomanzamin

Abb. 38: Hyrtiomanzamin.

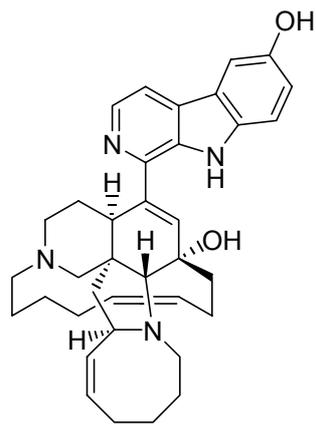
Die stickstoffhaltigen Tricyclen Hyellazol (**211**) und Chlorhyellazol (**211**)^[128] wurden aus *Hyella caespitosa* (Cyanophyceae/Blaualge) isoliert. Sie besitzen am Kohlenstoff C-2 einen Phenylring.



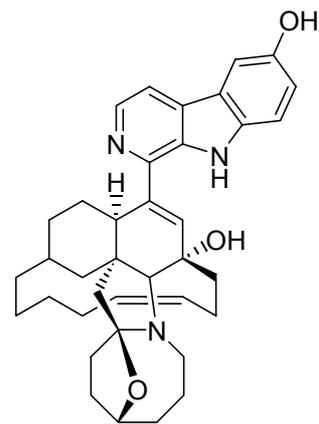
211: R = H: Hyellazol
212: R = Cl: Chlorhyellazol

Abb. 39: Weitere hydroxylierte Indole.

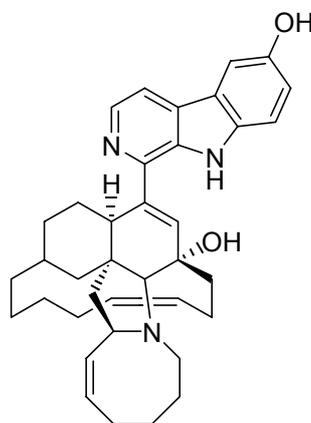
Eine weitere Klasse der β -Carboline sind die Manzamine, die zusätzlich einen Isochinolin und einen makro-heterocyclischen Ring besitzen. Bei 6-Hydroxymanzamin A (**213**)¹²⁹ aus dem Schwamm *Amphimedon sp.* ist im Isochinolinring der Stickstoff noch enthalten, bei Manzamin X (**214**) und Manzamin Y (**215**)^[130] aus dem Schwamm *Xestospongia sp.* ist dies nicht mehr der Fall **214** bildet durch ein Oxim einen Tricyclus, der in **215** jedoch nicht vorhanden ist.



213: 6-Hydroxymanzamin A



214: Manzamin

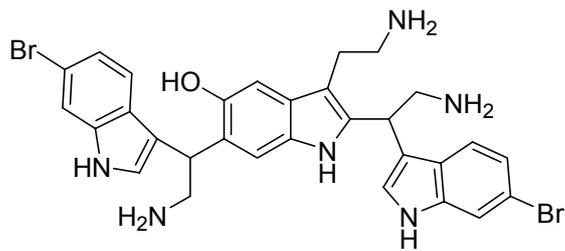
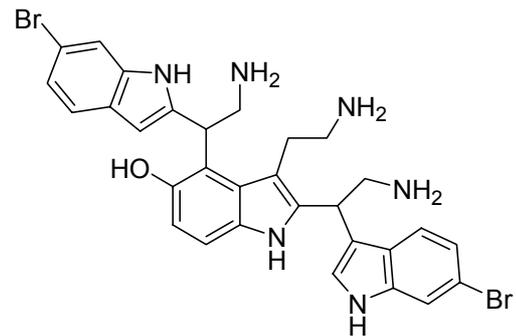
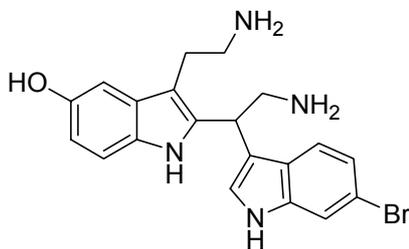
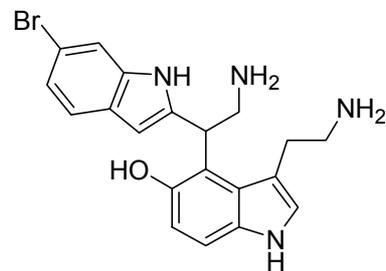


215: Manzamin Y

Abb. 40: Manzamine.

4.4.3 Gelliusin

Gelliusine sind bis- oder tris-Indole, die jeweils durch eine Alkyl-Brücke miteinander verbunden sind und als Enantiomerenpaar aus dem Schwamm *Orina sp.* oder *Gellius sp.* isoliert wurden. Das Enantiomerenpaar (\pm)-Gelliusin A (**216**) und B (**217**)^[125] und (\pm) Gelliusin C (**218**) sind Tris-indole. **216** und **217** sind an Position 6 des 5-oxygenierten Indols substituiert und (C) am Kohlenstoff C-4 mit einem weiteren Indol verknüpft. (\pm) Gelliusin E (**219**) und D (**220**)^[126] sind Bis-indole, wobei E eine 2-3 und D eine 4-2 Verknüpfung der Indole aufweist.

**216/217:** (±)-Gelliusin A und B**218:** (±)-Gelliusin C**219:** (±)-Gelliusin E**220:** (±)-Gelliusin D**Abb. 41:** Gelliusin.

4.4.4 Cyclopeptide

Auch einige cyclische Peptide beinhalten 5-Hydroxytryptophan (**186**). Konbamid (**221**)^[131], Keramamid A (**222**)^[132] sind aus dem Schwamm *Theonella sp.* isoliert worden. **221** beinhaltet nur eine aromatische Aminosäure, das 5-Hydroxytryptophan (**186**). **222** hat zu dem 5-Hydroxytryptophan (**186**) noch zwei Phenylalanin als Aminosäuren. Als weitere Vertreter sind noch Discobahamin A (**223**) und B (**224**)^[133] aus dem Tiefseeschwamm *Discodermia* von den Bahamas oder Orbiculamid A (**225**)^[134] aus dem Schwamm *Theonella sp.* zu nennen.

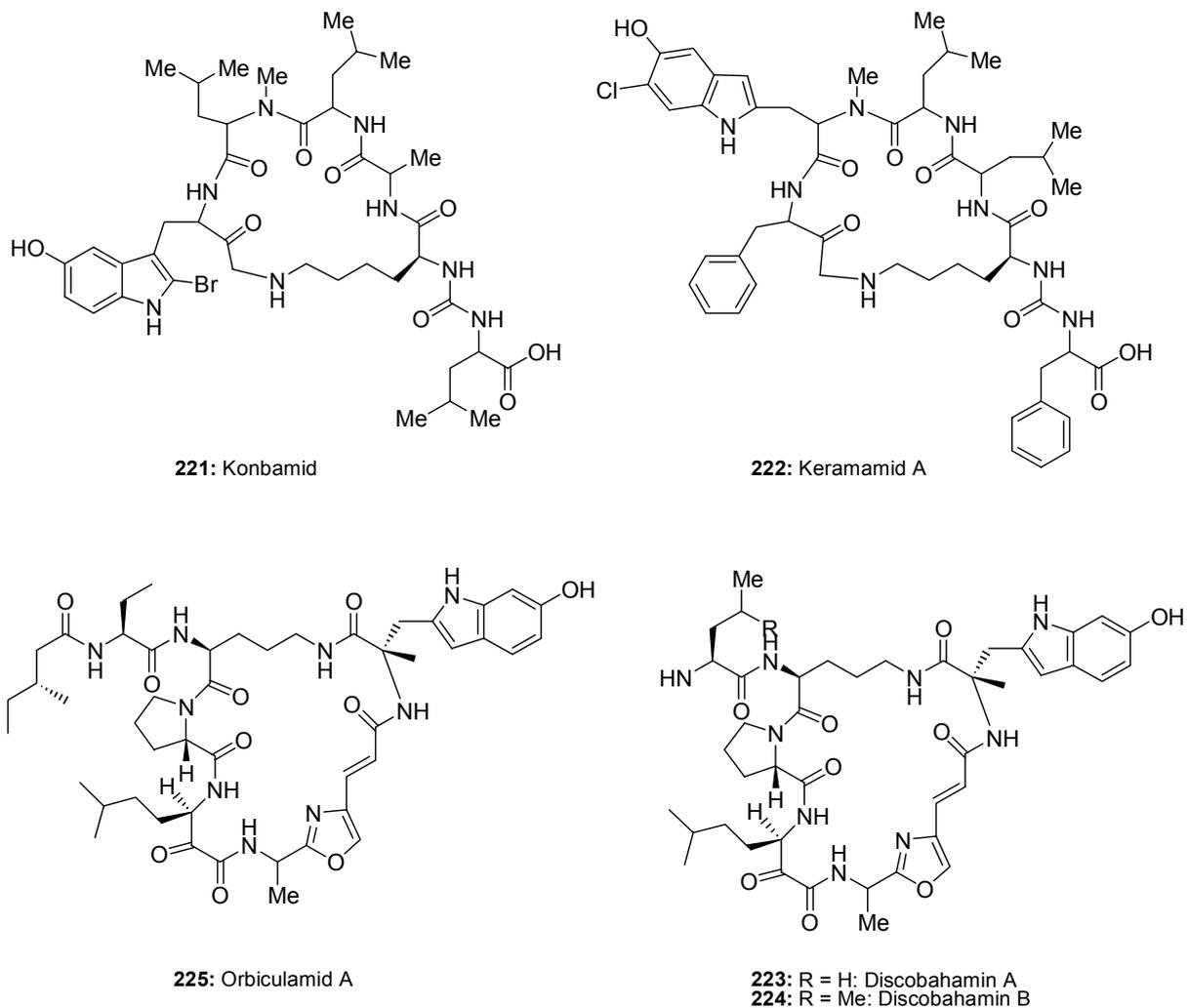


Abb. 42: Cyclopeptide.

4.5 Biochemische Funktion und biologische Aktivität 5-oxygenerter Indole

Physostigmin als prominenter Naturstoffvertreter der Indol- bzw. 5-Hydroxyindolderivate ist ein reversibler Acetylcholinesterase-Hemmer und somit ein indirektes Parasympatomimetikum. Es wird auch als solches in der Medizin (z.B. als Antidot für Atropin) eingesetzt. Auch bei marinen 5-oxygenierten Indolen sind schon einige biochemische und biologische Wirkungen bekannt (Tab. 8).

Viele Derivate der Eudistomine zeigen antibiotische, antivirale und cytotoxische Aktivität. Die 6-Hydroxylierten Eudistomine beeinflussen zudem die Kontraktion der gestreiften und der glatten Muskulatur. Das sarcoplasmatische Retikulum (SR) ist der

intrazelluläre Ca^{2+} -Ionen-Speicher der glatten und gestreiften Muskulatur. Aus ihm werden Ca^{2+} -Ionen freigesetzt, damit es zur Muskelkontraktion kommt. In der gestreiften Muskulatur wird die Freisetzung aus SR durch das entstehende Aktionspotential ausgelöst. Bei der Herzmuskulatur wird dies durch einströmende Ca^{2+} -Ionen durch den L-Typ- Ca^{2+} -Ionen-Kanal ausgelöst. Die freigesetzten Ca^{2+} -Ionen in der glatten Muskulatur binden sich an Calmodulin und aktivieren eine spezifische Kinase. Diese phosphoryliert das Myosin, was zur Kontraktion führt. Durch die Phosphorylierung der Myosinkinase nimmt die Affinität des Ca^{2+} -Calmodulins zur Myosinkinase ab, was zur Entspannung des Muskels führt¹³⁵. Auch in der gestreiften Muskulatur besteht eine Untereinheit der Kinase aus Calmodulin. Eudistomin A, D, J und Eudistomidin D setzen aus dem sarcoplasmatischem Retikulum (SR) Ca^{2+} -Ionen frei. 7-Bromoeudistomin D ist darin 400-fach potenter als Coffein, dass in einer Konzentration von 3 mM 50% der Ca^{2+} -Ionen freisetzt. Eudistomin A und Eudistomidin C sind Calmodulin-Antagonisten.

Tab. 8: Bioaktivitäten mariner Hydroxyindole.

Metabolit	Spezies	Bioassay und Aktivitäten
Eudistomin D (196)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ^[120]	Bakterienhemmende Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> , 14/100 Zone der Inhibition/ μg ; Ca^{2+} Freisetzung aus SR ^[136] ; antivirale Aktivität ^[120] .
Eudistomin J (197)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ^[120]	Ca^{2+} - Freisetzung aus SR ^[136] .
N (2)-Methyleudistomin D (194)	<i>Eudistoma gilboverse</i> ^[121]	Cytotoxizität gegen 4 verschiedene Tumorzellen ^[137] .
N (2)-Methyleudistomin J (195)	<i>Eudistoma gilboverse</i> ^[119]	Cytotoxizität gegen 4 verschiedene Tumorzellen ¹³⁷ .
Eudistomin P (202)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ^[122]	Bakterienhemmende Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> , 15/100 Zone der Inhibition/ μg und gegen <i>Saccharomyces aureus</i> , 20/100 Zone der Inhibition/ μg ^[136] .

Eudistomin Q (203)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ¹²²	Bakterienhemmende Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> , 14/100 Zone der Inhibition/ μg . ^[136]
Eudistomin A (204)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ^[120]	Calmodulin Antagonist IC_{50} $3 \cdot 10^{-5}$ M; Ca^{2+} Freisetzung von aus SR.
Eudistomin M (205)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ¹²⁰	Potenzierung der Myosin B aktivierenden ATPase in der Skelettmuskulatur von Ratten (Konc. $>10^{-5}$ M) ^[138] .
Eudistomin C (206)	<i>Eudistoma olivaceum</i> ^[123]	Bakterienhemmende Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> , 14/100 Zone der Inhibition/ μg und gegen <i>Escherichia coli</i> , 22/100 Zone der Inhibition/ μg ^[136] ; antivirale Aktivität. ^[123]
Eudistomin E (207)	<i>Ritterella sigillinoidis</i> <i>Eudistoma olivaceum</i>	Cytotoxizität gegen menschlichen KB buccal Karzinom-Zellen ED_{50} 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[139] ; bakterienhemmende Aktivität gegen <i>Bacillus subtilis</i> 17/100 Zone der Inhibition/ μg ^[136] ; antivirale Aktivität.
Eudistomidin C (208)	<i>Eudistoma glaucus</i> ^[124]	Calmodulin-Antagonist ^[140] ; Cytotoxizität gegen leukämische Zellen L1210: 0.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und L5178Y: 0.42 $\mu\text{g}/\text{mL}$. ^[138]
14-Methyleudistomidin C (209)	<i>Eudistoma gilboverse</i> ¹²¹	Cytotoxizität gegen Tumorzellen IC_{50} $< 1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$. ^[137]
Eudistomidin D (200)	<i>Eudistoma glaucus</i> ^[125]	Ca^{2+} Freisetzung aus SR ^[143] ; Cytotoxizität gegen leukämische Zellen L1210: 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ und L5178Y: 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[37] .
Hyrtiomanzamin(210)	<i>Hyrtios erecta</i> ^[127]	Immunsuppressive Aktivität gegen B Lymphozyten. ^[127]
Gellusin A und B (216, 217)	<i>Orina</i> sp. oder <i>Gellius</i> sp. ^[125]	Cytotoxizität schwach gegen KB Zellen; Serotoninrezeptor-Agonist 10-100 μM . ^[141]

Konbamid (221)	<i>Theonella sp.</i> ^[131]	Calmoduline-Antagonist IC ₅₀ 4-10 M. ^[131]
Keramamid A (222)	<i>Theonella sp.</i> ^[132]	Cytotoxizität ^[142] ; Hemmung des SR und der Ca ²⁺ ATPase IC ₅₀ 3·10 ⁻⁴ M. ^[143]
Discobahamin A (223)	<i>Discodermia sp.</i> ^[133]	Fungizide Aktivität gegen <i>Candida albicans</i> . ^[131]
Orbicularamid A (225)	<i>Theonella sp.</i> ^[134]	Cytotoxizität

4.6 Neuer Naturstoff (226) aus dem Schwamm *Hymeniacidon heliophila*

Aus dem Schwamm *Hymeniacidon heliophila* wurde eine weitere noch unbekannt Substanz mit einer Ausbeute von 0.002% (1 mg) erhalten.

4.6.1 Isolierung

Auf Grund von auffälligen Signalen in der Wasserphase im ¹H-NMR-Spektrum des Extraktes aus *Hymeniacidon heliophila* wurde auch diese weiter bearbeitet. Zunächst erfolgte eine weitere Trennung mittels Größenausschluss-Chromatographie mit Sephadex LH-20. Im Gegensatz zur Aufreinigung der Verbindungen aus *Flustra foliacea* und des 5-Hydroxytryptophans (**186**) wurde nicht Methanol, sondern Wasser als mobile Phase gewählt. Sephadex LH-20 besteht aus Cyclodextranen, die durch Wasser oder organische Lösungsmittel quellen. Das Volumen der Quellung ist abhängig vom Lösungsmittel. Bei Wasser kommt es zu einer Quellung von 4.0-4.4 mL/g. Die Quellung bestimmt die Porengröße des Materials. Durch chromatographische Aufarbeitung wurden acht Fraktionen erhalten. Als weiterer Schritt wurde, auf Grund von NMR-Daten, Fraktion 8 mit HPLC unter Verwendung von RP-18 als stationäre Phase und H₂O/CH₃OH (Gradient H₂O/CH₃OH 95:5 zu H₂O/CH₃OH 5:95) als Fließmittel aufgetrennt. Nach 23.40 min wurde 1 mg einer gelben und zähen Verbindung eluiert

4.6.2 Strukturaufklärung

Es wurde versucht, die Struktur des neuen Naturstoffes mit Hilfe der NMR-

Spektroskopie aufzuklären. Neben eindimensionalen ^1H - und ^{13}C -NMR-Experimenten wurden auch zweidimensionale HMBC-, HMQC- und COSY-Experimente durchgeführt. In **Tab. 9** sind die gefundenen Verschiebungen bzw. Korrelationen zusammengefasst. Die Struktur der Verbindung wurde in drei einzelne Teilstrukturen unterteilt (**Abb. 43**).

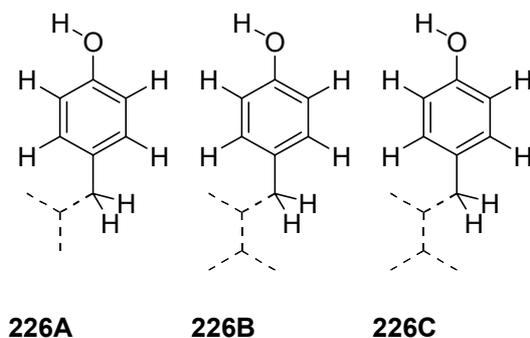


Abb. 43: Teilstrukturen der Verbindung **226**: **226A**, **226B**, **226C**

Tab. 9: Eindimensionale und zweidimensionale NMR-Daten der Teilstrukturen.

Teilstruktur	Atom	^{13}C -NMR ^a	^1H -NMR ^b	Anzahl H-Atom	HMBC-Korrelationen ^c	COSY
A	1'	21.4	3.85	2	119.5; 120.9; 129.05;	7.13;
A	2	115.5	6.76	1	115.5; 120.6; 156.6;	7.13;
A	6	115.5	6.76	1	115.5; 120.6; 156.6;	7.13;
A	2'	119.55		0		
A	4	120.9		0		
A	3	129.1	7.13	1	21.4; 129.1; 156.6;	6.76; 3.85;
A	5	129.1	7.13	1	21.4; 129.1; 156.6	6.76; 3.85;
A	1	156.6		0		
A	XH		9.53	1	115.5	
B	1'	28.6	3.67	1	126.5; 129.45; 150.8; 165.2;	6.97
B	2	114.9	6.63	1.	114.9; 126.6; 155.4;	6.97

B	6	114.9	6.63	1	114.9; 126.6; 155.4;	6.97
B	4	126.6		0		
B	3	129.5	6.97	1	36.3; 129.5; 155,4; [155];	6.63; 3.67
B	5	129.5	6.97	1	36.3; 129.5; 155,4; [155];	6.63; 3.67
B	2' od. 3'	150.8		0		
B	1	155.4		0		
B	2' od. 3'	165.2		0		
B		XH	9.22	1		
C	1'	36.3	3.38	1	129.5; 152.4; (165.3)	6.97
C	2	114.5	6.6	1	114.5; 129.5; 155;	6.97
C	6	114.5	6.6	1	114.5; 129.5; 155;	6.97
C	3	129.5	6.97	1	36.3; 129.47; 155; [155.6]	6.6, 3.38,
C	5	129.5	6.97	1	36.3; 129.47; 155; [155.6]	6.6, 3.38,
C	4	129.6		0		
C	2' od. 3'	152.4		0		
C	1	155.0		0		
C	2' od. 3'	165.3				
		XH	9.08	1	114.45; 155.0;	

^a 360 MHz DMSO-*d*₆; ^b 90.6 MHz DMSO-*d*₆; ^c Position der C-Atome.

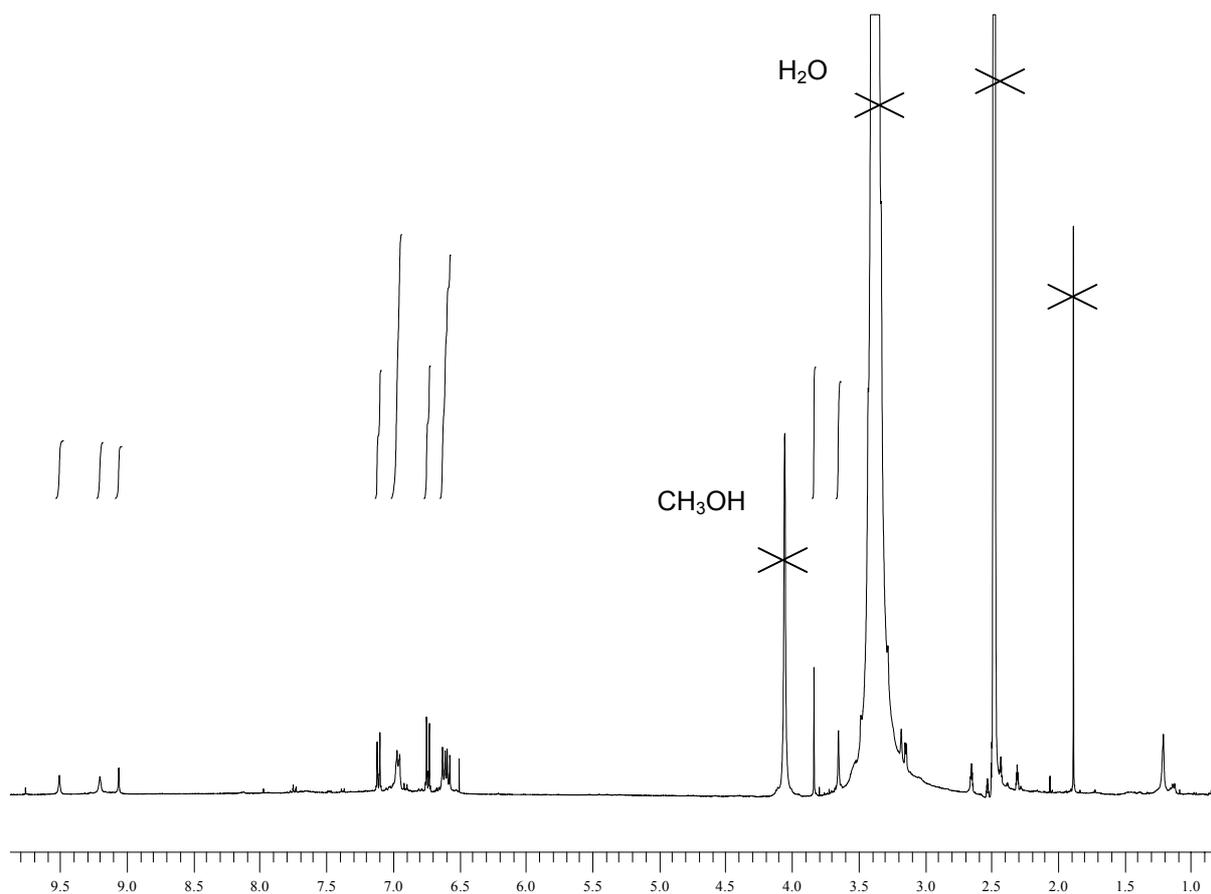


Abb. 44: ^1H -NMR Spektrum 90.6 MHz, $\text{DMSO-}d_6$ der isolierten Verbindung (**226**).

Im Alkylbereich ist zu sehen, dass unter den Singulettis bei $\delta = 3.85$ ppm und $\delta = 3.67$ ppm zwei Wasserstoffatome liegen, die zu den Teilstrukturen **226A** und **226B** gehören. Durch das HSQC-Experiment konnten sie den ^{13}C -Signalen bei $\delta = 21.4$ ppm und $\delta = 28.6$ ppm zugeordnet werden. Das äquivalente ^1H -Signal der Verbindung **226C** liegt unter dem Wassersignal und konnte mit Hilfe der HSQC- und HMBC-Spektren zugeordnet werden. Durch Integration des ^1H -NMR-Spektrums wurden auch die Verhältnisse der ^1H -Atome im Aromatenbereich zueinander bestimmt. Bei den drei Singulettis im Tieffeld bei $\delta = 9.08 - 9.53$ ppm handelt es sich um einzelne H-Atome, die an ein Heteroatom gebunden sind, da sie keine HSQC-Signale auf ein Kohlenstoffatom zeigen. Durch die Breite der Signale (z. B. $\delta = 9.22$ ppm) von 8 Hz könnte es sich um Hydroxyprotonen handeln. Signale von OH-Gruppen sind durch den stattfindenden chemischen Austausch verbreitert. Dieser chemische Austausch findet zwar nur in Lösungsmitteln wie Wasser und Methanol

statt, aber durch die verwendeten Lösungsmittel während der Isolierung ist sowohl Wasser, als auch Methanol in der Probe vorhanden.

Das Wasserstoffatom bei $\delta = 9.53$ ppm zeigt im HMBC-Spektrum auf die Kohlenstoffatome bei $\delta = 115.5$ ppm (**226A**: C-2 und C-6) und das Wasserstoffatom $\delta = 9.08$ ppm zeigt auf die Kohlenstoffatome $\delta = 114.5$ ppm (**226C**: C-2 und C-6) und $\delta = 155$ ppm (**226C**: C-1). Daher kann angenommen werden, dass an diesem Heteroatom keine weiteren Wasserstoffatome oder Alkylketten substituiert sind.

Bei Teilstruktur **226A** zeigt die Integration des Dubletts bei $\delta = 6.76$ ppm und $\delta = 7.13$ ppm, dass es sich um jeweils zwei H-Atome handelt. Durch die HMBC-Korrelationen konnte gezeigt werden, dass die vier Wasserstoffe an vier verschiedene Kohlenstoffatome gebunden sind, wobei jeweils zwei Wasserstoffatome und zwei Kohlenstoffatome chemisch äquivalent sind. Dies ist der Fall in einem Benzolring, der an den Kohlenstoffatomen der Positionen C-1 und C-4 nicht mit H-Atomen und an den Kohlenstoffatomen der Positionen C-2, C-3, C-4 und C-6 mit je einem Wasserstoffatom substituiert ist. Am Kohlenstoff C-1 ist der Benzolring mit einem Heteroatom substituiert. An Position C-4 befindet sich wahrscheinlich ein Alkanyl-Rest mit einer CH_2 -Gruppe. Die Wasserstoffatome der CH_2 -Gruppe zeigen HMBC-Korrelationen zu den Kohlenstoffatomen bei $\delta = 120.9$ ppm und $\delta = 129.5$ ppm des Benzolrings. Zudem ist eine Korrelation zu dem Kohlenstoffatom C-2' bei $\delta = 119.6$ ppm zu sehen. Diese Korrelation ist die Verbindung zu der CH_2 -Gruppe, an der ein nicht genau bestimmbarer Rest hängt.

Die aromatischen Signale im ^1H -NMR-Spektrum von $\delta = 6.96$ ppm und 6.98 ppm sind nicht genügend aufgelöst, gehören aber zu den Teilstrukturen **226B** und **226C**. Die Integration zeigt, dass es sich hierbei um vier Wasserstoffatome handelt. Auch bei den ^1H -Signalen $\delta = 6.60$ ppm und 6.63 ppm handelt es sich um vier Wasserstoffatome. Durch das HSQC- und das HMBC-Spektrum konnte auch hier festgestellt werden, dass die Teilstrukturen **226B** und **226C** der Verbindung **226A** ähnlich sind. Der Unterschied dieser beiden Teilstrukturen zu Verbindung **226A** besteht in den vermuteten Alkanseitenkette. Die CH_2 -Gruppen bei $\delta = 3.37$ ppm und $\delta = 3.38$ ppm zeigen HMBC-Korrelationen zu zwei weiteren Kohlenstoffatomen, die sich wahrscheinlich in der substituierten Seitenkette befinden. Die Wasserstoffatome

von $\delta = 6.97$ ppm der Teilstruktur **226B** zeigen eine HMBC-Korrelation auf das Kohlenstoffatom C-1' der Teilstruktur **226C**. Somit müssten die einzelnen Teilstrukturen miteinander zusammenhängen. Wie diese 3 Teilstrukturen der Verbindung miteinander gekoppelt sind, konnte an Hand der NMR-Spektren jedoch nicht geklärt werden.

Auf Grund der bisher erhaltenen Daten liegt es nahe, dass es sich um ein Polyphenol handelt. Die massenspektrometrische Bestimmung ist bei Polyphenolen nur sehr schwer möglich. Auch hier gelang es nicht, trotz Verwendung unterschiedlicher Ionisierungs-Methoden wie chemischer Ionisation (CI), Elektronen-Ionisation (EI), Fast-Atom-Bombardment (+oder -; FAB) oder Elektronenionisationspray (ESI) von der neu isolierten Verbindung eine Molmasse zu bestimmen.

5 Schutzwirkung von 5-HTP (186) auf Humanzellen – Apoptose und Antioxidantien

5.1 Was ist Apoptose?

Apoptose ist der kontrollierte oder auch programmierte Zelltod, d.h. die Zelle zerstört sich selbst, ohne dass es zu einer inflammatorischen Reaktion in der Umgebung der Zellen kommt. Durch Apoptose kommt es in einem unumkehrbaren, sequentiellen Prozess zum Absterben irreversibel geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen.

Zu Beginn der Apoptose verringert sich das Zellvolumen, der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich (morphologische Veränderung). Die Organellen der Zelle bleiben zunächst intakt und funktionsfähig. Auch die Cytoplasmamembran ist funktionell noch intakt. Biochemisch tritt eine Veränderung ein (metabolische Veränderung). Phosphatidylserin, das normalerweise auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist, rückt auf die extrazelluläre Seite. Mit der Zeit kommt es bei der Apoptose zum sogenannten *membrane blebbing*, d. h. dass an der Membran Ausstülpungen und Bläschen gebildet werden. Sie sondern sich als membranumschlossene Vesikel (*apoptotic bodies*) ab und werden *in vivo* von phagozytierenden Zellen aufgenommen, so dass sich kein entzündliches Gewebe bildet. Im Zellkern werden spezifische calcium- und magnesiumabhängige DNasen aktiviert. Da diese die genomische DNA nur an bestimmten Stellen schneidet, kommt es zu charakteristischen Bruchstücken der DNA (Fragmentierung, DNA-Laddering).

Bei der Nekrose kommt es im Gegensatz zur Apoptose zu Cytoplasmamembran-Schädigung, so dass die cytoplasmatischen Organelle anschwellen und durch Lyse ihre Inhalte freisetzen. Durch diesen Prozess kommt es zu einer intensiven lokalen Entzündungsreaktion, bei der die umliegenden Zellen ebenfalls betroffen sind. Die DNA wird in unterschiedlich lange Fragmente gespalten, in dem das Chromatingerüst nur zum Teil aufgedreht ist^[144].

5.2 Ursachen der Apoptose

Lebewesen sind permanent Stress-Situationen ausgesetzt, die über das Überleben des einzelnen Individuums wie der gesamten Art entscheiden. Dies gilt auch auf der

molekularen Ebene. Zu den wichtigsten Faktoren gehört oxidativer Stress, durch den reaktive Intermediate wie das Superoxidanion, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale, Peroxidradikale und Singulett-Sauerstoff entstehen. Durch sie kann die Zelle zerstört werden, indem Proteine, Nucleinsäuren oder auch Lipide oxidativ angegriffen werden.

Setzt man die Organismen oder Zellen einem erhöhten oxidativen Stress aus, wird das Gleichgewicht von Oxidation und Antioxidation negativ aus dem Gleichgewicht geworfen, was zu Zellschädigung führt^[145], die wiederum an Krankheiten wie z. B. Tumore, AIDS oder Parkinson beteiligt ist^[146]. Längere Zeit ist man davon ausgegangen, dass oxidativer Stress primär Nekrose auslöst, allerdings haben neuere Studien gezeigt, dass dadurch Apoptose ausgelöst wird^[147]. U.a. konnte beobachtet werden, dass während der Apoptose die Glutathionkonzentration abnahm und die Konzentration der Sauerstoffradikale zunahm^[148]. Ferner konnten Antioxidantien wie *N*-Acetylcystein experimentell die Apoptoserate verringern^[149].

5.3 Aufbau und Prinzip eines erforderlichen Bioassays

Wie in **Kap. 4** beschrieben kann auch UV-Licht oxidativen Stress auslösen, der zur Apoptose in den Zellen führt. Dies wurde für den Aufbau eines neuen Bioassays ausgenutzt. Dabei wurde speziell der oxidative Stress mit Hilfe einer UV-Lampe bei 254 nm ausgenutzt, die mit einer Energie von 1 mW/cm² für 2 h auf Humanzellen einstrahlte. Als Zellen wurden Monozyten verwendet, da diese als humane Modellsysteme leicht aus Primärkulturen (Humanblut) zu isolieren sind. Monozyten vermehren sich nicht, wodurch die Zellzahl gleich bleibt. Ein weiterer Grund, Monozyten zu verwenden war, dass sie mittels des Scavenger-Rezeptors - eines Protein der Zellmembran - an der Plastikoberfläche des Kulturgefäßes adhären. Ferner sind Monozyten dafür bekannt, dass sie für Apoptosetests geeignet sind. Zur Gewährleistung einer ausreichenden Adhärenz und zur Äquilibration der Zellen im Medium nach der Isolierung wurden die Versuche erst nach 2 Tagen durchgeführt. Sowohl als Lösung für die Testsubstanzen, als auch als Nährmedium für den Versuch wurde RPMI ohne Phenolrot verwendet, da der bei Kulturen routinemäßig zugesetzte Indikator zum einen UV-Strahlung absorbiert und zum anderen nicht vernachlässigbare antioxidative Eigenschaften aufweist. Als antioxidativer Standard wurde *N*-Acetylcystein verwendet, da durch die Literatur bekannt ist, dass durch

diese Substanz die Apoptoserate bei UV-Licht (254 nm) gesenkt werden kann^[150]. Der Aufbau der Apparatur ist schematisch **Abb. 45** und als Fotografie **Abb. 46** dargestellt.

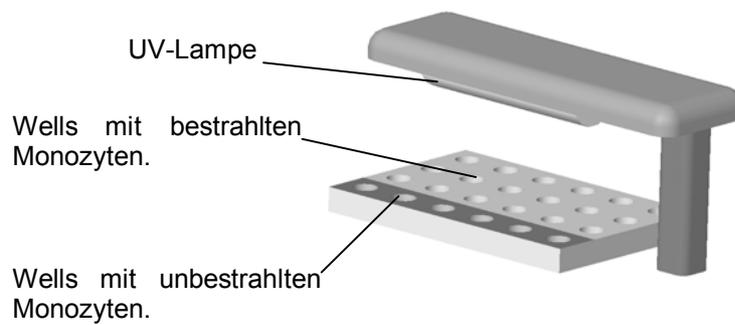


Abb. 45: Bestrahlungsapparatur: Die Bestrahlung erfolgte für 2 h mit einer 254 nm UV-Lampe in einem Brutschrank. Helle Reihen: Monozyten die bestrahlt wurden; dunkle Reihe: Monozyten die durch eine Abdeckung vor der Bestrahlung geschützt wurden.

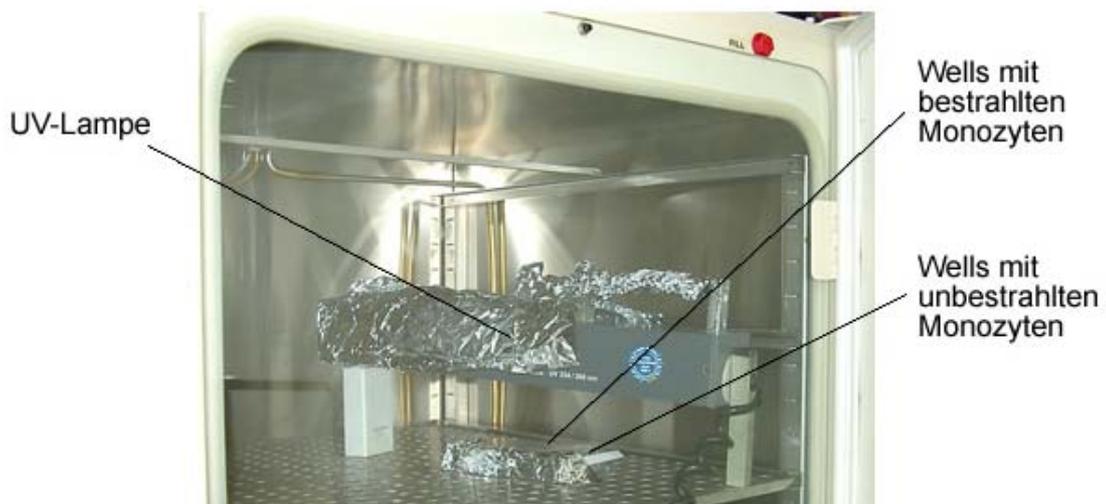


Abb. 46: Original Bestrahlungsanlage.

Für den Versuch wurden 4 verschiedene Konzentrationen (10 mM, 5 mM, 1 mM, 0.5 mM) des Schwamminhaltsstoffs 5-Hydroxytryptophan (**186**) eingesetzt. Der Standard (*N*-Acetylcystein) hatte eine Konzentration von 5 mM. Im Blindversuch wurden Zellen, parallel in reinem Nährmedium bestrahlt. Zur Überprüfung nicht auszuschließender unspezifisch toxischer Effekte von 5-HTP (**186**) wurden unbestrahlte Zellen nur mit 10 mM Lösung 5-HTP (**186**) im Nährmedium verwendet. Als Kontrolle wurden unbestrahlte Zellen, im Nährmedium liegend verwendet.

Die Konzentration des 5-HTP (**186**) entsprach der Konzentration von 5-HTP (**186**) im Schwamm *Hymeniacidon heliophila*. ($0.45\% \pm 0.23$ des Trockenmasse). Geht man davon aus, dass das Trockengewicht 10% des Nassgewichts ausmacht, entspricht dies in etwa einer Konzentration von 2 mM des Nassgewichts.

5.3.1 Auswertung der Messergebnisse

Nach der Bestrahlung wurden die Zellen mit Hoechst 33342 (**227**) behandelt, einem blau fluoreszierenden Farbstoff, der für Zell- und Kernmembran permeabel ist und somit alle Zellen anfärbt. Anschließend wurden die Zellen mit YO-PRO 1 (**228**) inkubiert, einem Farbstoff, der spezifisch nur die apoptotischen Zellen detektiert, die im Mikroskop bei Verwendung eines Filters (450-490 nm) grün fluoreszieren.

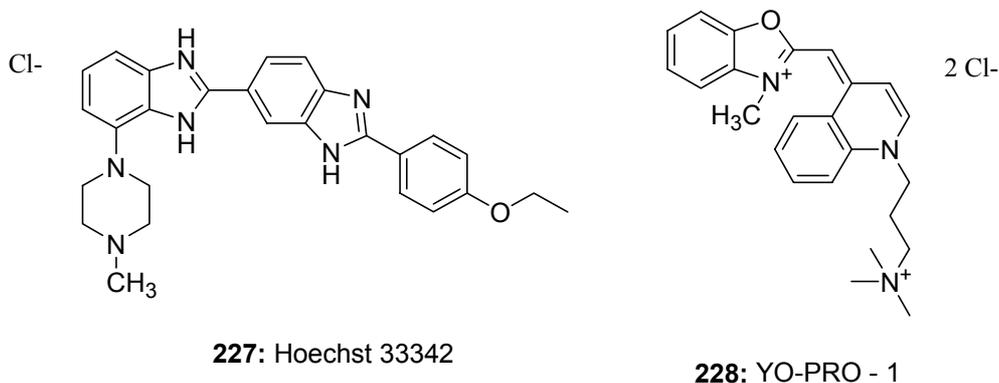


Abb. 47: Fluoreszenzfarbstoffe: **227:** dringt in alle Zellkerne ein und lässt diese blau fluoreszieren; **228:** dringt nur in apoptotische Zellen ein, verursacht dort eine grüne Fluoreszenz.

Durch diesen Farbstoff kann somit Nekrose von Apoptose unterschieden werden^[151]. Unter einem Lichtmikroskop mit grüner und blauer Fluoreszenz wurden die Zellen ausgezählt. (**Abb. 48**)

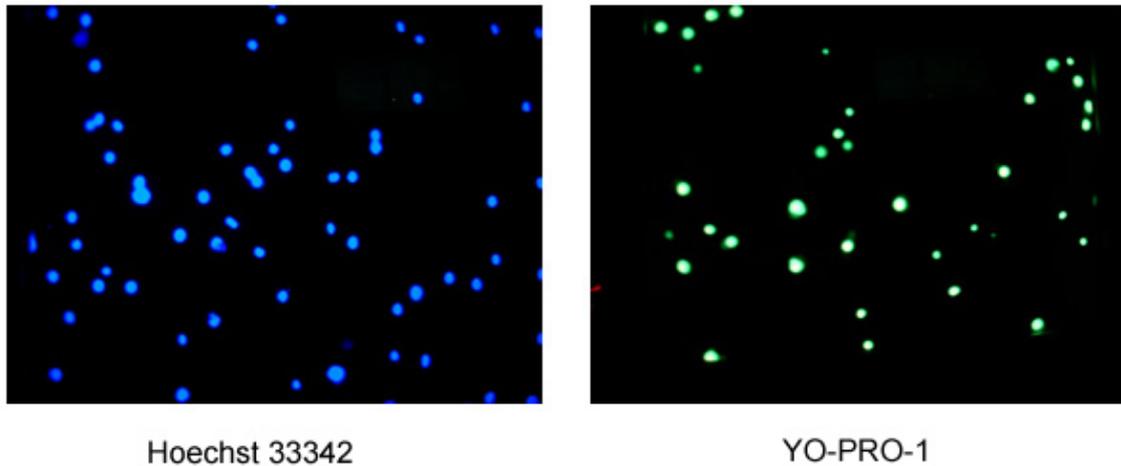


Abb. 48: linkes Bild: zeigt alle Zellen, die unter dem Mikroskop zu sehen sind; rechtes Bild: der grün fluoreszierende Farbstoff dringt nur in die apoptotischen Zellen ein. Durch Auszählung wird der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt.

5.4 Messergebnisse

Die Ergebnisse sind in **Abb. 49** dargestellt. Die Standardabweichungen von 8 - 22% kommen durch die Verwendung von Blut unterschiedlicher Probanden zustande. Da sich bei jedem Probanden die natürliche Apoptoserate und die Wirkung von 5-HTP (**186**) genetisch bedingt unterscheiden, kommt es in Testreihen mit menschlichen Proben zu Standardabweichungen von bis zu 25%.

10 mM und 5 mM Lösungen liegen mit ihrer Apoptoserate von 20% unter der natürlichen Rate von 21% und zeigen damit einen deutlichen Schutz vor UV-Licht. Bei der Konzentration 1 mM 5-HTP (**186**) steigt die Apoptoserate auf 44%, liegt aber dennoch deutlich unter der des Blindwertes mit 62% und des Standardwertes mit 48%. Auch bei 0.5 mM 5-HTP (**186**) ist die Apoptoserate noch geringer als die des Blindversuchs.

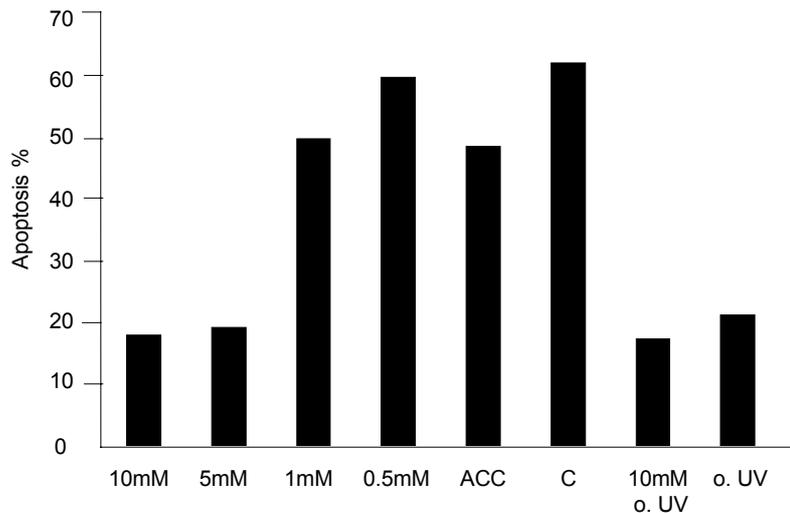


Abb. 49: UV-Bestrahlung (254 nm, 2 h). Monozyten: 5-HTP (**186**) in verschiedenen Konzentrationen; mit Acetylcystein (ACC) als Standard, C = Zellbestrahlung ohne UV-Schutz, o. UV. = ohne UV-Bestrahlung.

5.5 UV-Schutz und 5-HTP (**186**)

Bei den Konzentrationen 10 mM und 5 mM ist ein deutlicher Schutz der menschlichen Monozyten vor Apoptose zu sehen. Auch bei einer Konzentration von 1 mM zeigt sich noch eine antiapoptotische Wirkung. Die Versuche haben gezeigt, dass bei dieser Konzentration und unter diesen Bedingungen 5-HTP (**186**) bei menschlichen Monozyten die Apoptose signifikant hemmt. Der Mechanismus dieser Hemmung ist nicht vollständig geklärt. 5-HTP (**186**) besitzt, wie in **Kap. 4.3.5.1** beschrieben, bei pH = 7 ein Redoxpotential von $E = 0.64$ V und könnte deswegen durch antioxidative Wirkung vor Apoptose schützen. Außerdem zeigt 5-HTP (**186**) bei 254 nm zwar kein Absorptionsmaximum (302 nm und 276 nm), weist aber dennoch eine geringe Absorption mit einem molekularen Absorptionskoeffizient von $\epsilon = 1852$ auf. Dieser ist allerdings zu gering, um eine Schutzfunktion auszuüben. Somit schützt 5-HTP (**186**) die Monozyten auf Basis seines günstigen Redoxpotential.

Betten et al.^[152] beschrieben 2001, dass Serotonin (**187**), ein Metabolit von 5-HTP (**186**) und **186** selbst mit gleicher Effektivität die Radikale der H_2O_2 -Peroxidase in einer Konzentration von 5 μ M abfangen können. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass 5-HTP (**186**) als Antioxidans wirkt.

Bei der Verwendung von UV-Licht als oxidativem Stressor wurden Konzentrationen von 0.5 μM bis 10 μM eingesetzt. Diese hohen Konzentrationen entsprechen zwar nicht denen im menschlichen Blut, aber denen im Schwammes *Hymeniacidon heliophila*, der im Durchschnitt eine Konzentration von 2.4 mM an 5-HTP (**186**) aufweist, geht man davon aus, dass die Trockenmasse eines Schwammes 10% seines Nassgewichtes beträgt.

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass sich der neu entwickelte Bioassay gut eignet, um Substanzen auf ihre antioxidative Wirkung bei photo-oxidativem Stress zu testen. Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass 5- Hydroxytryptophan (**186**) auch humane Monozyten vor UV-Licht schützen kann.

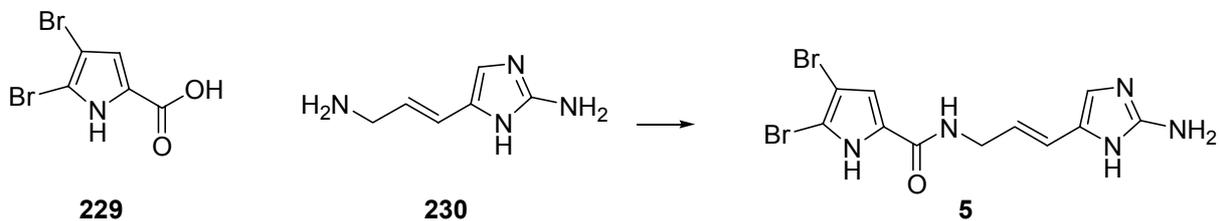


Abb. 50: *Agelas dispar*

6 Application und von [1,2-¹³C₂] Acetat aus Retardtabletten

Das Pyrrol-Imidazol-Gerüst des Schwamm-Metaboliten Oroidin – speziell in der Gattung *Agelas sp.* (**Abb. 50**)¹⁵³ - bildet das Grundgerüst vieler Sekundärmetaboliten. Bis heute ist jedoch die Biosynthese dieses Schlüsselmetaboliten nicht geklärt.

Die Gabe von [1,2-¹³C₂] Acetat an *Agelas dispar* und die Detektion mittels ¹³C-NMR-Spektroskopie sollte Aufschluss darüber geben. Die ¹³C-NMR-Spektroskopie beruht auf der Messung von ¹³C-Kohlenstoffatomen. Diese kommen in geringeren Mengen in der Natur vor und werden deswegen weniger in chemische Moleküle eingebaut, als ¹²C-Kohlenstoffatome. Bei einem Einbau in Sekundärmetaboliten von [1,2-¹³C₂] Acetat kommt es in der ¹³C-NMR-Spektroskopie zu verstärkten Signalen, durch die Anhäufung der ¹³C-Kohlenstoffatome. Liegen zwei oder mehrere ¹³C-Atome nebeneinander, kommt es durch die Möglichkeit der Kopplung zu einer Aufspaltung der Signale. Falls nur eines der markierten C-Atome erhalten bleibt, sieht man ein verstärktes Signal im ¹³C-Spektrum.



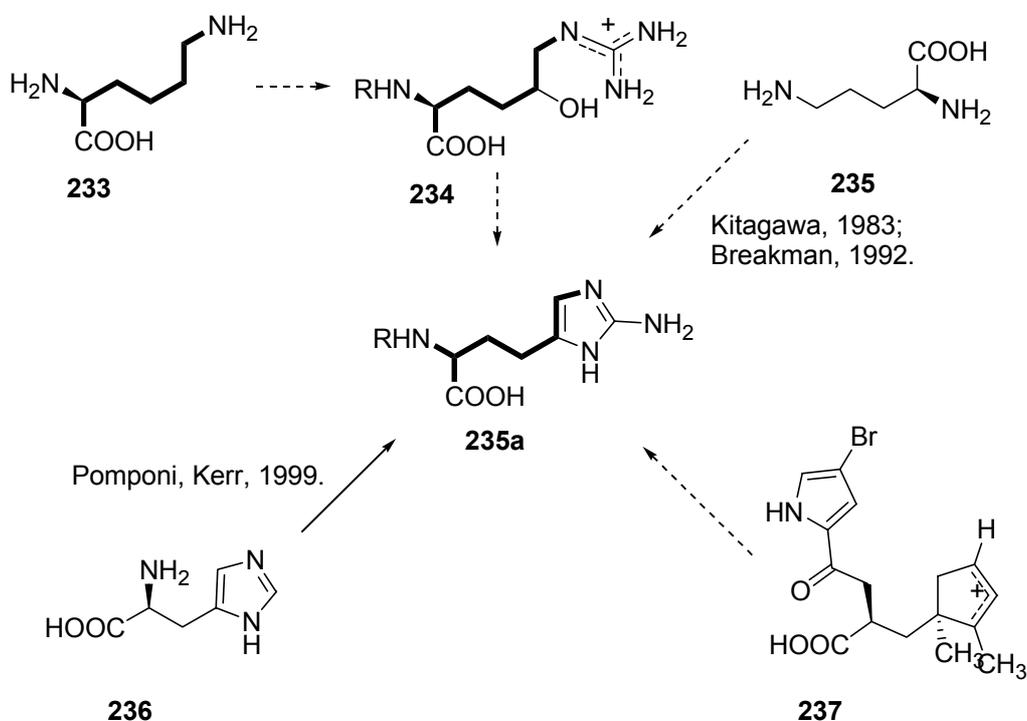
Schema 13: Biosynthese des Oroidins aus den Naturstoffen Brompyrrolcarbonsäure und 2-Amino-5-(3-amino)prop-1-enylimidazol^[154].

6.1 Einbau von [1,2-¹³C₂] Acetat in Aminosäuren und Oroidin

Die Pyrrol-2-carbonsäure ist als Naturstoff aus *Agelas sp.* bekannt und stammt wahrscheinlich aus dem Prolin-/Ornithin- Biosyntheseweg. Für den Ursprung des 2-Aminoimidazols werden mehrere Möglichkeiten diskutiert: Pomponi und Kerr^[155] züchteten zum ersten Mal Zellkulturen des Schwammes *Teichaxinella morchella*, die einen Hauptmetabolit, das Pyrrol-Imidazol-Alkaloid Stevensin (**124**), bildeten. Diese Zellkulturen wurden mit radioaktiv markierten Aminosäuren inkubiert. Der Einbau von Histidin (**236**) in **124** wurde zwar beobachtet, der genaue Einbau aber nicht

beschrieben. Histidin (**236**) könnte über Clathramid A (**240**), das aus *Agelas clathrodes* 1996 von Cafieri^[156] isoliert wurde, eingebaut werden. Das fehlende Kohlenstoffatom würde zusätzlich eingebaut werden. Kitagawa^[157] und Breakman^[158] hatten den Vorschlag, dass es die Aminosäure Ornithin (**235**) sei, die an der Bildung von 2-Aminoimidazol beteiligt ist. Die Carboxylgruppe und α -Aminogruppe wird in die 2-Aminoimidazol-Einheit eingebaut, die Amidbildung in der Verbindung zum Pyrrolcarbonylrest entsteht durch die δ -Aminogruppe.

1999 wurde von Assmann, Köck et al.^[159] $N\alpha$ -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)- L-Homoarginin (**232**) aus dem Schwamm *Agelas wiedenmayeri* isoliert. Diese neue Verbindung bestärkt den Biosynthesevorschlag, dass auch Lysin (**233**) und nicht nur Histidin (**236**) oder Ornithin (**235**) der Ursprung des 2-Aminoimidazols sein könnte. Lysin (**233**) würde erst zu Homo-Arginin, das mit der Brompyrrolcarbonsäure zu **232** kondensieren würde. Durch eine weitere Hydroxylierung an der δ Position und eine darauf folgende Cyclisierung würde Oroidin (**5**) entstehen (**Schema 14 und Abb. 51**).



Schema 14: Biosynthesevorschlag der Pyrrol-Imidazol-Alkaloide.

Verbindung **232** und Oroidin könnten, wie die Verbindung **231**^[160] aus dem Schwamm *Aplysina* auf eine Biosynthese hindeuten, die von der Aminosäure Lysin (**233**) ausgeht (**Abb. 51**).

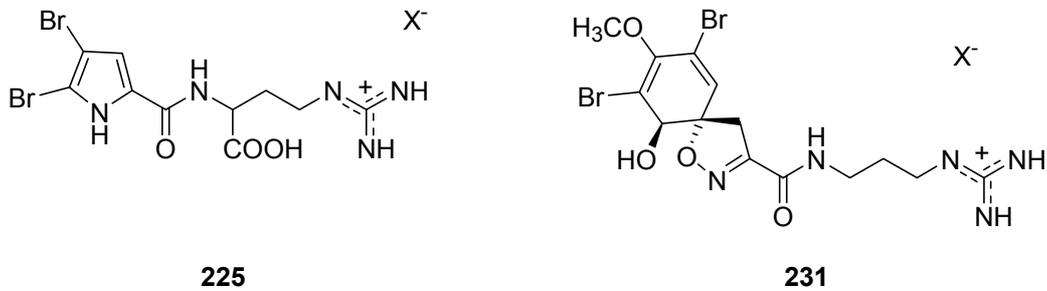


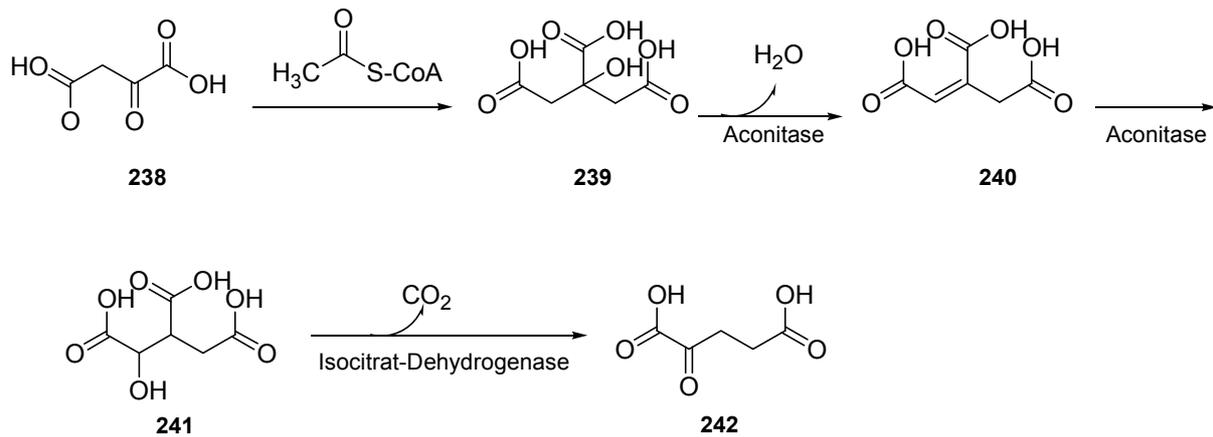
Abb. 51: Das Homoargenin Derivat (**232**) aus *Agelas wiedenmayeri* und Aplysinamisin II (**231**) aus *Aplysina* sp.

Die Gabe und der Einbau von [1,2-¹³C₂] markierten Acetat in *Agelas dispar* sollte zur Aufklärung der Biosynthese von Pyrrol-Imidazol-Alkaloiden beitragen^[161].

6.1.1 Biosynthesen von L-Lysin (**233**), L-Prolin (**265**), L-Ornithin (**235**) und L-Histidin (**236**)

Die Biosynthesen von Lysin (**233**), Ornithin (**235**), und Prolin (**265**), die alle vom Citronensäurecyclus ausgehen, weisen bis zum α -Ketoglutarat (**242**) die gleiche Reaktionsfolge auf. Erst die Folgereaktionen verlaufen unterschiedlich.

[1,2-¹³C₂] markiertes Acetat würde als Acetyl-CoA in den Citronensäurecyclus eingeführt und bildet unter Kondensation mit Oxalacetat (**238**) Citrat (**239**). Katalysiert durch der Aconitase wird unter Bildung des Zwischenmetaboliten Aconitat (**240**) das Isocitrat (**241**) gebildet. α -Ketoglutarat (**242**) entsteht durch Decarboxylierung.



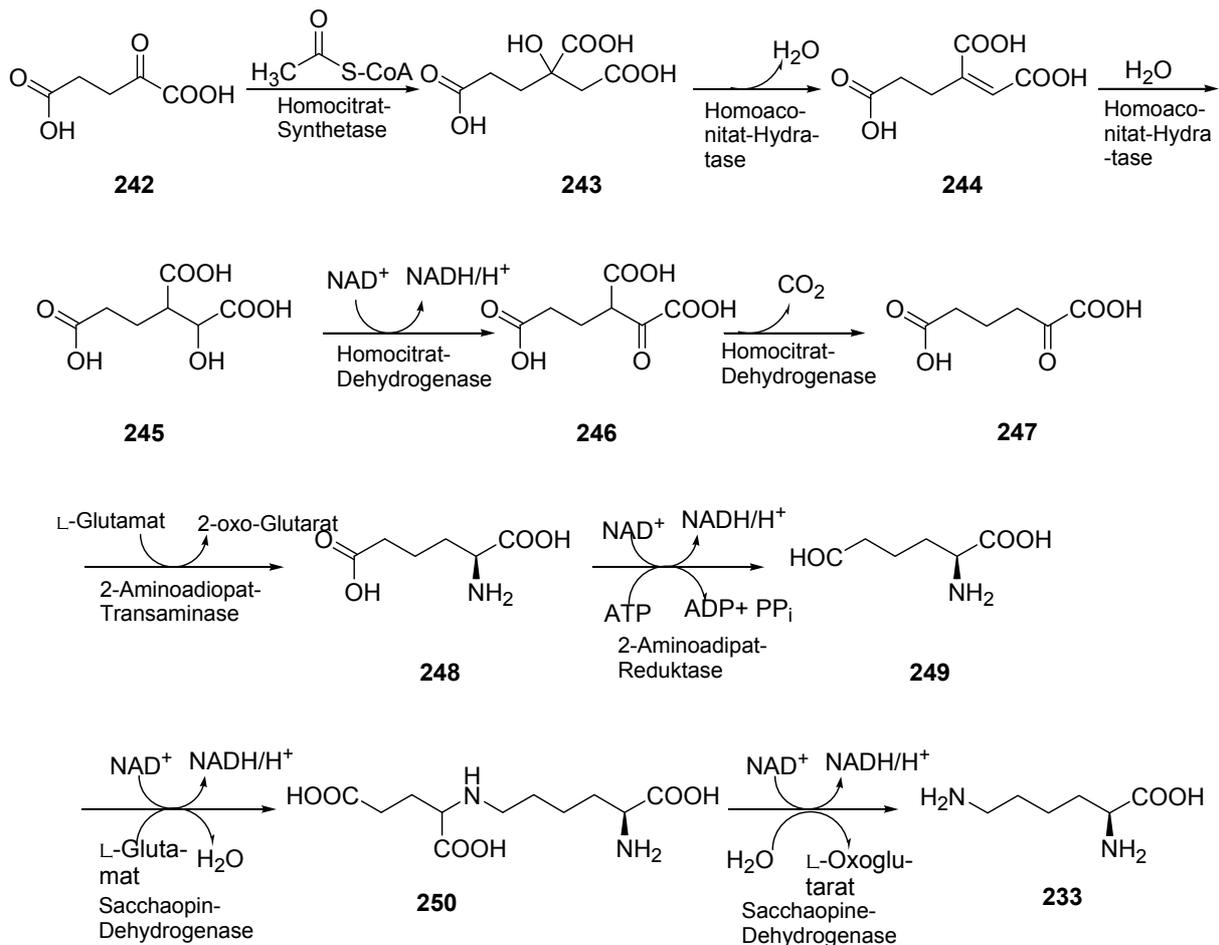
Schema 15: Biosynthese α -Ketoglutarat (**242**) ausgehend von Oxalacetat (**238**).

6.1.1.1 Lysin-Biosynthese

Die Biosynthese von Lysin (**233**) in Pilzen unterscheidet sich von der Biosynthese in Pflanzen und Bakterien. Da Schwämme meist in Symbiose mit Bakterien, Pilzen oder auch Algen leben, müssen beide Wege berücksichtigt werden, solange nicht geklärt ist, von welchem Organismus die Pyrrol-Imidazol-Alkaloide und die dazu verwendeten Aminosäuren stammen.

6.1.1.1.1 Biosynthese in Pilzen

Ein weiteres [1,2- $^{13}\text{C}_2$] markiertes Acetat würde mit α -Ketoglutarat (**242**) kondensieren und wird zum Homocitrat (**243**). Katalysiert durch die Homaconit-Synthetase entsteht das Homoisocitrat (**245**), bei dem nicht mehr der Kohlenstoff C-3, sondern der Kohlenstoff C-2 mit einer OH-Gruppe substituiert ist. Durch Reduktion entsteht Oxaloglutarat (**246**), das durch Decarboxylierung zu 2-Oxo adipat (**247**) wird. Mit Hilfe von L-Glutamat, katalysiert durch die 2-Amino adipat-Transaminase entsteht das aminierte L-2-Amino adipat (**248**), das durch Oxidation zu L-Amino adipat-semialdehyd (**249**) wird, das unter Katalyse von Saccharopin-Dehydrogenase mit L-Glutamat kondensiert und zu Saccharopin (**250**) wird. Durch Abspaltung von L-Oxoglutarat entsteht L-Lysin (**233**).

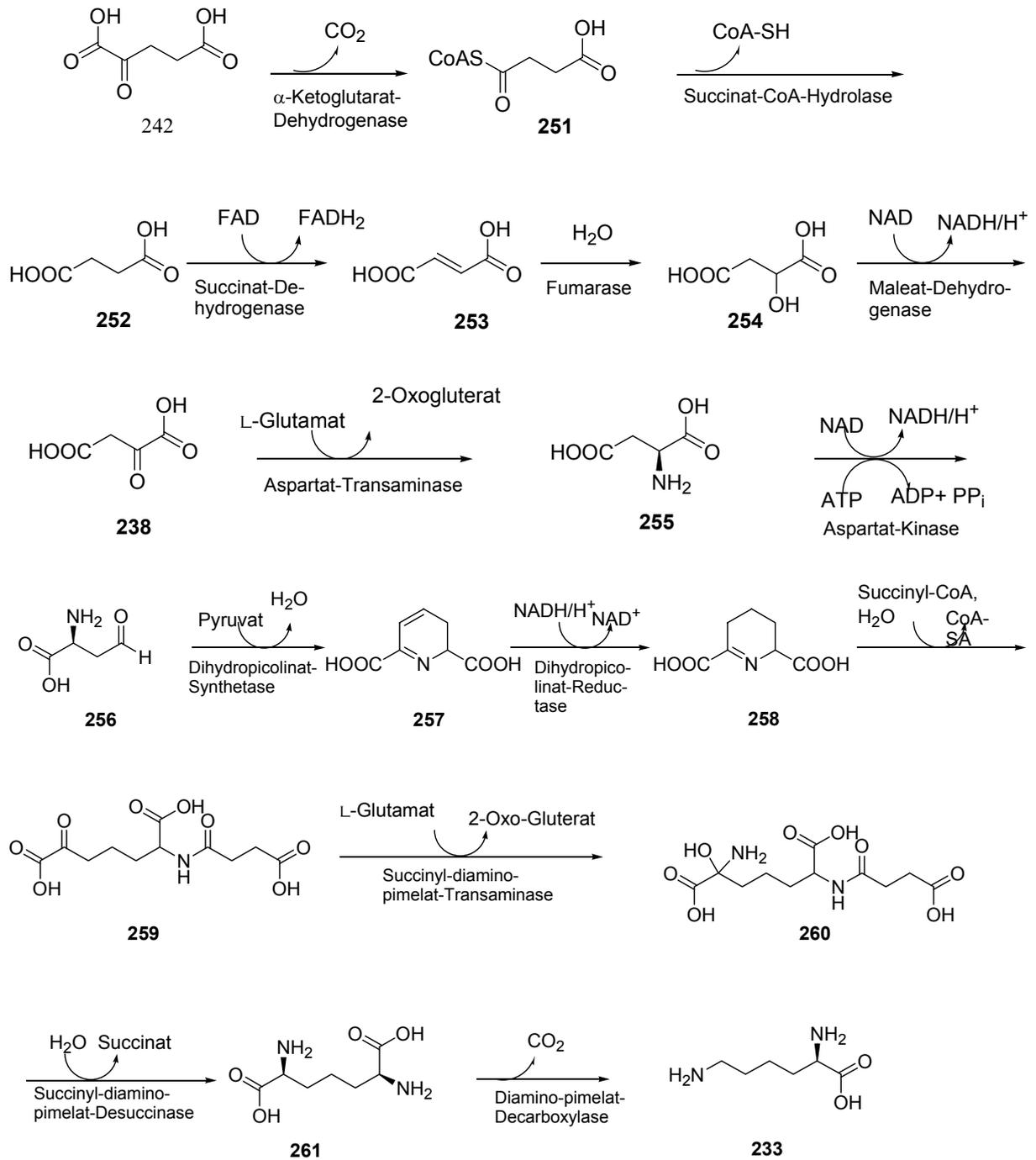


Schema 16: L-Lysinbiosynthese der Pilze.

6.1.1.1.2 Biosynthese in Bakterien und Pflanzen

Ausgehend von α -Ketoglutarat (**242**) würde man noch im Citronensäurecyclus verbleiben und durch Decarboxylierung entsteht Succinyl-CoA (**251**), das durch Abspaltung von Coenzym A zu Succinat (**252**) wird. Durch Reduktion entsteht Fumarat (**253**) und unter Wasseranlagerung Malat (**254**). Das durch eine weitere Reduktion zu Oxalacetat (**238**) und unter Katalyse der Aspartat-Transaminase entsteht. Aspartat (**255**) wird unter ATP-Verbrauch zu L-Aspartat-4-semialdehyd (**256**) reduziert und unter Einführung von Pyruvat (**161**) bildet sich das cyclische 2,3-Dihydro-dipicolinat (**257**). Durch eine weitere Reduktion entsteht Piperidin-2,6-dicarboxylat (**258**), das mit Succinyl-CoA (**251**), katalysiert durch die Succinyl-diamino-pimelat-Transaminase, zu *N*-Succinyl-2,6-diamino-pimelat (**260**) wird.

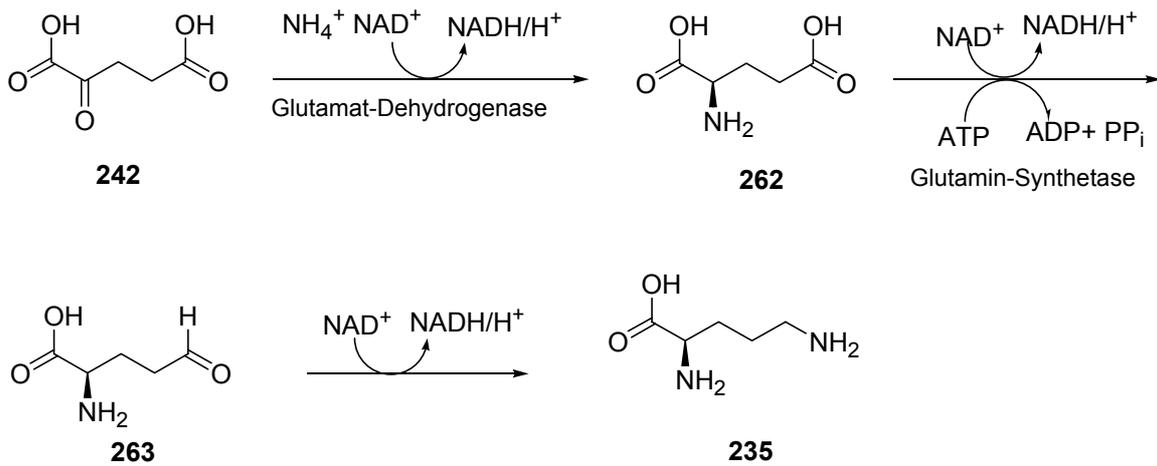
Succinat (**251**) wird abgespalten, und es entsteht LD-2,6-Diamino-pimelat (**261**).
Durch die Katalyse von Diamino-pimelat-Decarboxylase entsteht L-Lysin (**233**).



Schema 17: L-Lysinbiosynthese der Pflanzen und Bakterien.

6.1.1.2 Ornithinbiosynthese

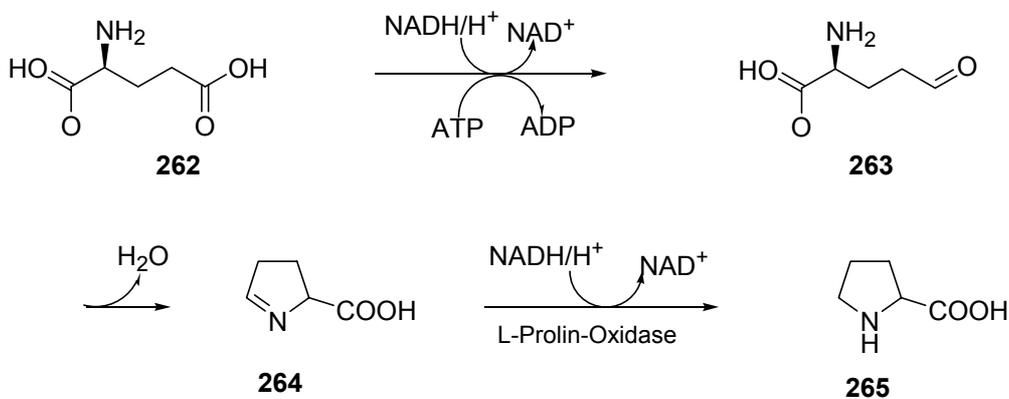
α -Ketoglutarat (**242**) aus dem Citronensäurecyclus wird unter Katalyse der Glutamat-Dehydrogenase und NH_4 zu L-Glutamat (**262**), das unter ATP-Verbrauch zum Glutamat- γ -semialdehyd (**263**) wird. Durch eine weitere Transaminierung entsteht L-Ornithin (**235**).



Schema 18: L-Ornithinbiosynthese.

6.1.1.3 Prolinbiosynthese

Die Biosynthese des Prolins (**265**) verläuft bis zum L-Glutamat- γ -semialdehyd (**263**) wie bei Ornithin (**235**). Darauf folgt eine spontane Cyclisierung zum Pyrrolin-5-carboxylat (**264**), das dann zu Prolin (**265**) reduziert wird.



Schema 19: L-Prolinbiosynthese.

6.1.2 Einbau von [1,2-¹³C₂] Acetat in die Aminosäuren

Bacher et al. berichteten 2001^[162] über den Einbau von [1,2-¹³C₂] Acetat in verschiedene Aminosäuren in Mais. Die Ergebnisse zeigten unterschiedliche Einbauquoten des ¹³C Kohlenstoffatoms für die einzelnen Kohlenstoffpositionen bei den Aminosäuren. **Abb. 52** zeigt die Einbauquoten in die Aminosäuren L-Prolin (**265**), L-Ornithin (**235**) und von Bakterien gebildeten L-Lysins (**233**).

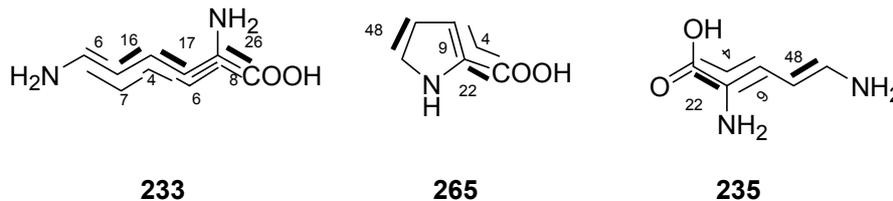


Abb. 52: Einbau von [1,2-¹³C₂] Acetat in L-Lysin (**233**), L-Prolin (**265**) und L-Ornithin (**235**): die Einbauquoten wurden durch eine ¹³C-NMR-Quantifizierung berechnet und geben die Einbauten in Prozent an.

Da bei L-Histidin (**236**) die Biosynthese über den Riboseweg verläuft waren keine signifikanten Einbauquoten zu erwarten.

6.2 Gabe von [1,2-¹³C₂] markiertem Acetat

Damit Organismen markierte Substanzen aufnehmen und metabolisieren können, müssen sie eine Zeit lang in einem abgeschlossenen System leben. Bei Poriferen ist es schwierig, sie in Aquarien zu züchten und zu halten. Die Organismen sind temperaturempfindlich^[163], ferner können Algen- und Bakterienwachstum^[164] zum Absterben des Organismus führen. Da Schwämme eine geringe Aufnahme von Primärmetaboliten haben^[165], müssen diese über längere Zeit mit markierten Substanzen „gefüttert“ werden.

Auf Grund der Probleme, Schwämme in Aquarien zu halten, sollte die Fütterung von markierten Substanzen am Riff erfolgen. Das Problem war die Inkubation der markierten Substanzen, da diese im offenen Meer, d. h. während der Inkubation, einem zu hohen Wasservolumen ausgesetzt sind. Um dies zu umgehen, wurden retardierende Tabletten hergestellt, die eine langsame Freisetzung gewährleisten und dem Schwamm somit über einen ausgedehnten Zeitraum markiertes Acetat als Nahrung anzubieten.

6.2.1 Tablettenherstellung und Messung der Acetat-Freisetzung

Für die retardierenden Matrixtabletten wurden Ethylcellulose als Quellmittel, Avicel zur Verbesserung der Fließeigenschaft des Pulvergemisches und Magnesiumstearat als Schmiermittel verwendet. Ethylcellulose und Eudragit RL verursachen die Retardierung.

Die Löslichkeit von Eudragit L, einem Copolymerisat aus 50% Methacrylsäure und 50% Methacrylsäureestern, ist pH-abhängig. Unter pH 5.7 erfolgt keine Salzbildung. Bei einem pH über 6 ist Eudragit L in Wasser durch Alkalisalzbildung löslich und hat dadurch einen magensaftresistenten Effekt.

Eudragit RL - ein Copolymerisat aus Acryl- und Methacrylsäureestern, die zu 10% aus Trimethyl-ammonium-methacrylsäure-estern bestehen – ist unlöslich in Wasser, aber gleichzeitig findet eine Quellung statt. Der Anteil Eudragit RL beeinflusst, durch die Quellung die Retardierung.

Der pH der Meere und Ozeane liegt zwischen pH 7.2 und 7.8 und damit in dem Bereich, in dem Eudragit L löslich ist. Durch diese Eigenschaft werden Poren in der Matrixtablette gebildet, und der Wirkstoff diffundiert in die Umgebung. Durch die Quellung von Eudragit RL kommt es zur Retardierung in den Tabletten. Das Mischungsverhältnis von Eudragit L und Eudragit RL ist somit ausschlaggebend für den Zeitrahmen der Retardierung. Je mehr Poren durch die Löslichkeit von Eudragit L entstehen, desto schneller kann Eudragit RL quellen und die Diffusion des Wirkstoffes stattfinden. Die Zusammensetzung der Tabletten ist in **Kap.5.1** beschrieben.

Für die Freisetzungskinetik wurden jeweils zehn Tabletten in sechs verschiedene Gefäße mit 100 mL künstlichem Meerwasser (Zusammensetzung siehe **Kap. 5.2**) gegeben. Aus je einem Gefäß wurde nach 30 min, 1 h, 1.5 h, 2 h, 2.5 h und 3 h eine Probe von 1 mL entnommen und 10 mL Maleinsäurelösung ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) als interner Standard dazugegeben. Die Proben wurden konzentriert und in D_2O wieder aufgenommen. Die $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetatkonzentration wurde durch $^1\text{H-NMR}$ Integration der CH_3 Signale von Acetat bei $\delta = 1.85 \text{ ppm}$ und des Maleinsäuresignals der beiden äquivalenten H Atome bei $\delta = 6.02 \text{ ppm}$ bestimmt.

In **Abb. 53** ist die Freisetzungskinetik dargestellt. Durch den Anteil von 23% Eudragit L und 17% Eudragit RL konnten nach 3 h 47% des Wirkstoffes freigesetzt werden.

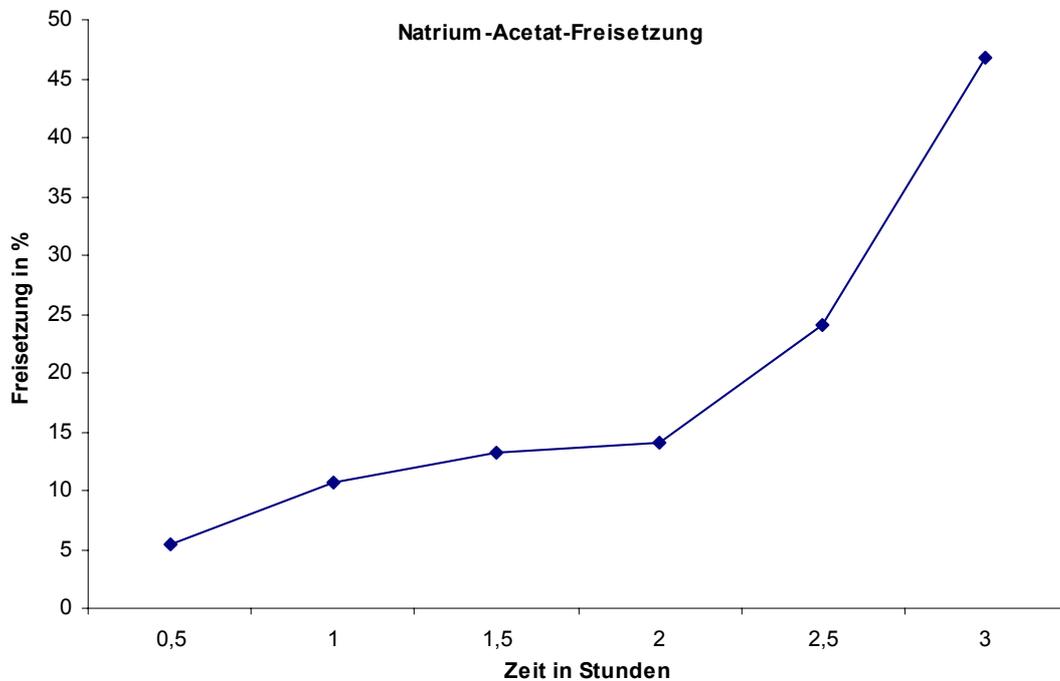


Abb. 53: Freisetzungskinetik von Natriumacetat in künstlichem Meerwasser.

6.2.2 Applikation von [1,2-¹³C₂] markiertem Acetat an *Agelas dispar*

Für die folgenden Versuche wurde der Schwamm *Agelas dispar* verwendet. In einem 1.5 L-Korpus wurden auf 16 m Tiefe 28 Tabletten mit je 10 mg [1,2-¹³C₂] Acetat verteilt und nach 17 h Inkubation durch 20 neue Tabletten ersetzt. Mit dem Ziel der Vermeidung zu rascher Verdünnung wurde der Schwamm mit einer Plastiktüte umgeben. Bei einem weiteren Feldversuch wurden 250 mL Korpus mit zehn Tabletten gefüllt und ebenfalls mit einer Plastiktüte vom Umfeld separiert. Beim dritten Feldversuch wurde 1 L *Agelas dispar* mit einer Plastiktüte umgeben, 600 mg in Meerwasser gelöstes [1,2-¹³C₂] Acetat mit einer Spritze injiziert und die Einstichstelle verschlossen. Alle Plastiktüten wurden nach 6 h entfernt und die Schwämme verblieben für weitere 40 min am Riff, bis sie ohne Luftkontakt in Aquarien überführt wurden. Dort verblieben die Organismen weitere vier Tage bei fließendem Meerwasser und Sauerstoffzufuhr, um dann direkt eingefroren zu

werden. Die Abtrennung der Schwämme von ihrer Umwelt durch Plastiktüten sollte den Inkubationsraum und somit das Inkubationsvolumen der Organismen verringern.

In einem weiteren Aquariumsversuch wurde 1 L-Korpus *Agelas dispar* für 1 h mit 600 mg [1,2-¹³C₂] Acetat in einem 18 L Aquarium inkubiert. Danach folgten 45 min fließendes Meerwasser und es erfolgte eine weitere Inkubation mit 500 mg [1,2-¹³C₂] Acetat für 3 h. Der Organismus verblieb für weitere sechs Tage im Aquarium bei fließendem Meerwasser und Sauerstoffzufuhr, um danach direkt eingefroren zu werden.

Die Isolierung erfolgte wie im **Kapitel 5.5** beschrieben. Alle Gelchromatographie-Fractionen wurden ¹³C-NMR-spektroskopisch untersucht. Bei Einbau des doppelt markierten [1,2-¹³C₂]Acetats wären zwei Dubletts im Spektrum erschienen. Bis zu dieser Auftrennung konnten keine Dubletts gemessen werden.

In karibischen Schwämmen befindet sich eine große Anzahl von Verbindungen. Es könnte also sein, dass in den Sephadex LH-20-Fractionen der Anteil von markiertem Acetat noch zu gering war. Wahrscheinlich ist aber, dass die Versuchsdauer – auf Grund mangelnder Zeit im Rahmen der Expedition – zu kurz war. Ein anderes Problem bestand darin, dass die Organismen durch die Plastiktüten nicht vollständig von ihrer Umgebung abgetrennt wurden. Sato et. al.^[166] führten Versuche mit [1,2-¹³C₂] markiertem Acetat durch und gaben *Amphidinium sp.* über 11 Tage 37 mg Acetat. Sie konnten den Einbau in die cytotoxischen Makrolide Amphodinolid G und H beobachten. Da die Aufnahme von Primärmetaboliten bei Schwämmen nur gering ist^[165], waren die Inkubationszeiten, die für die Organismen angesetzt wurden, zu kurz.

Da unbekannt ist, von welchen der an der Symbiose beteiligten Organismen Oroidin (**5**) gebildet wird und woher die dafür verwendeten Aminosäuren stammen, wurde auf die Verwendung von Antibiotika in den Aquarien verzichtet. Dies könnte zu einem erhöhten Bakterienanteil geführt haben. Ferner zeigten die Organismen in den Aquarien Farbveränderungen an den Schnittstellen. Zwar konnte man noch beobachten, dass aus den Organismen in den Aquarien Bläschen (CO₂) aufstiegen, die ein Zeichen dafür sind, dass der Schwamm noch am Leben ist. Die Stresssituation war für die Organismen dennoch zu groß.

Bei einer Wiederholung der Versuche sollte man markierte Primärmetaboliten über eine längere Zeit applizieren und den Organismus erst zur Extraktion aus dem Meer bergen. Eine weitere Möglichkeit wäre die Veränderung der Tabletten. Aus ihnen wurde in den ersten 2 Stunden nur ca. 15% des Acetats freigesetzt und in der darauf folgenden Stunde weitere 23%. Bei nochmaligen Versuchen sollte darauf geachtet werden, dass zu Beginn der Acetatgabe eine größere Menge freigesetzt wird und somit eine Initialdosis entsteht. Durch diese würde der Schwamm von Beginn an einer höheren Konzentration markierter Substanzen ausgesetzt sein, die dann durch die weitere Retardierung der Tablette aufrechterhalten werden könnte. Auf Grund des engen Zeitrahmens der Expedition konnten die Versuche nicht ausgedehnt werden.

7 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Isolierung, Strukturaufklärung, biologischen Aktivität und Biosynthese stickstoffhaltiger Naturstoffe aus wirbellosen Meerestieren. Zuerst wurde das Blättermoostierchen *Flustra foliacea* untersucht, das in der Nordsee und anderen borealen Gewässern zu finden ist. Der subtropische Schwamm *Hymeniacidon heliophila* lebt im Gezeitenbereich auf festem Untergrund. Er zeigt eine bemerkenswerte Resistenz gegen intensive Sonneneinstrahlung. Als drittes wurde mit dem Schwamm *Agelas dispar* gearbeitet, der ebenfalls in subtropischen und mediterranen Gewässern zu finden ist. Charakteristische Inhaltsstoffe von *Agelas sp.* sind die Pyrrol-Imidazol-Alkaloide, die nur in Schwämmen gefunden worden sind und deren Biosynthese noch kaum bearbeitet wurde.

Besonderes Augenmerk wurde auf stickstoffhaltige Naturstoffe gelegt, die besonders interessante pharmakologische und biologische Aktivitäten aufweisen^[167]. Oft sind an deren Biosynthesen Aminosäuren beteiligt: L-Prolin (**265**) etwa bildet das Grundgerüst des Pyrrols bei den Pyrrol-Imidazol-Alkaloiden und L-Tryptophan ist an der Biogenese der Flustramine beteiligt, die aus *Flustra foliacea* bekannt sind.

1. Das Moostierchen *Flustra foliacea* wurde in Kooperation durch das Alfred-Wegener-Institut mit einem Grundschleppnetz in der Tiefen Rinne vor Helgoland gesammelt und gefriergetrocknet. Danach erfolgte die Extraktion des Materials wie in **Schema 8** gezeigt.

Aus *Flustra foliacea* sind bereits Inhaltsstoffe, z. B. die Flustramine, bekannt. Deshalb wurde die Isolierung von einer Dereplikation mit Hilfe von HPLC-MS- und Tandem-MS/MS-Techniken begleitet, um schon bekannte Inhaltsstoffe frühzeitig an der Molmasse zu erkennen, und um neue Inhaltsstoffe zu detektieren. Es erschien vielversprechend, die Cytotoxizität von Fraktionen aus *Flustra* gegen die humane Krebszelllinie HCT-116 zu verfolgen, da hierüber vorher nichts bekannt war. Als Inhaltsstoffe der untersuchten Proben wurden z.B. Flustramin A (**133**), Dihydroflustramin C (**132**) und Flustramin D (**135**) identifiziert, die in Gehalten von bis zu 0.02% der Trockenmasse vorkommen. Als neuer Naturstoff wurde Deformylflustrabromin (**172**) durch präparative HPLC aufgereinigt. Die Strukturaufklärung gelang mit Hilfe von

zweidimensionalen NMR-Experimenten und Massenspektrometrie. Die Struktur **172** wurde mit Hilfe des Computerprogramms COCON zweifelsfrei belegt. Mit Hilfe von Bioassays konnte cytotoxische (IC_{50} 1.89 $\mu\text{g/mL}$), antibakterielle (IC_{50} 3.9 $\mu\text{g/mL}$) und fungizide (IC_{50} 3.1 und 3.9 $\mu\text{g/mL}$) Aktivitäten gefunden werden, die sich auf Ebene der Vorfraktionen noch nicht zeigten.

Deformylflustrabromin (**172**) ist ein Tryptamin-Abkömmling, der in der 2-Position des Indolrings invers prenyliert ist. Deformylflustrabromin (**172**) könnte eine Vorstufe in der Biosynthese des Naturstoffs Flustraminol A (**137**) sein. Epoxidierung der 2,3-Doppelbindung in **172**, gefolgt von intramolekularer Ringöffnung, ergäbe **137**.

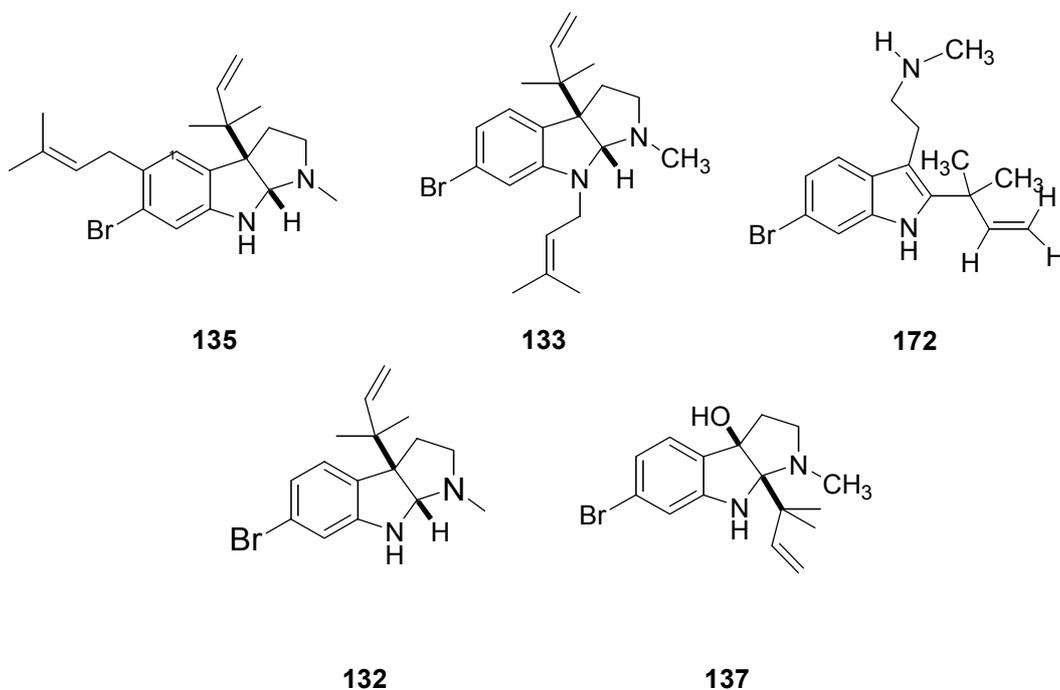


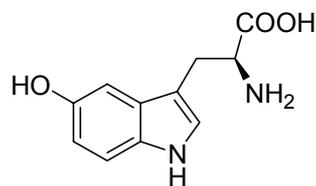
Abb. 54: Deformylflustrabromin (**172**) ist ein neuer Naturstoff aus *Flustra foliacea*, der eine Vorstufe in der Biosynthese von Flustraminol A darstellen könnte. Die Verbindung hat cytotoxische (IC_{50} 1.89 $\mu\text{g/mL}$), antibakterielle (IC_{50} 3.9 $\mu\text{g/mL}$) und fungizide (IC_{50} 3.1 und 3.9 $\mu\text{g/mL}$) Eigenschaften. Bei Flustramin A (**133**) konnte eine cytotoxische Aktivität mit einem IC_{50} -Wert von 25.1 $\mu\text{g/mL}$ gefunden werden, ebenso waren Flustramin D (**135**) und Dihydroflustramin C (**132**) im Gemisch cytotoxisch (IC_{50} 8.7 $\mu\text{g/mL}$).

2. Der erstmals chemisch untersuchte subtropische Schwamm *Hymeniacidon heliophila* erweckte Aufmerksamkeit, da er in der Gezeitenzone lebt. Dort ist er sehr hoher Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Es stellte sich die Frage nach einer chemischen Ursache seines Überlebens. Das Material wurde an der Küste vor

Wilmington / North Carolina (USA) bei zwei Expeditionen in mehreren Chargen an unterschiedlichen Standorten gesammelt und getrennt aufgearbeitet. In den Gelchromatographie-Fractionen konnte als Hauptkomponente L-5-Hydroxytryptophan (**186**) isoliert werden. Ebenso konnte dessen Biosynthesevorstufe Tryptophan detektiert werden, nicht aber dessen mögliche Folgeprodukte Serotonin und Melatonin. Auf Grund des hohen Gehaltes an **186** und der Untersuchung von Jovanovic et al.^[168], der 5-HTP (**186**) *in vitro* als Antioxidans getestet und als biologisches Antioxidans vorgeschlagen hatte, wurden weitere Untersuchungen zur biologischen Funktion von **186** durchgeführt.

Für die selektive und vollständige Extraktion erwies sich die Verwendung eines Wasser/Ethanol (1:1)-Gemisches als besonders geeignet. Unpolare Verbindungen wie β -Carotine und Lipide verblieben im Rückstand. Danach erfolgte die Quantifizierung unabhängig durch HPLC und durch NMR-Spektroskopie, wobei Maleinsäure als geeigneter interner Standard identifiziert wurde.

Der Gehalt an 5-HTP (**186**) war in den einzelnen Proben sehr unterschiedlich und betrug $(0.45 \pm 0.23)\%$ der Trockenmasse. Das entspricht in etwa dem Gehalt der als Antioxidantien geltenden Flavonoide in Pflanzen. Durch diesen hohen Gehalt an 5-HTP (**186**) im Schwamm *Hymeniacidon heliophila* konnte die Hypothese von Jovanovic bestätigt werden, der die Möglichkeit einer Rolle von **186** als Antioxidans in biologischen Systemen postulierte.



186

Abb. 55: 5-Hydroxytryptophan (**186**) ist als Inhaltsstoff in *Hymeniacidon heliophila* mit $(0.45 \pm 0.23)\%$ der Trockenmasse zu finden und wirkt *in vitro* als Antioxidans. In einer Konzentration von 1 mM hemmt es auf Grund seiner antioxidativen Eigenschaft die Apoptose bei humanen Monozyten.

3. Zur Untermauerung und weitergehenden Bewertung dieser Hypothese wurde 5-HTP (**186**) auf seine antioxidative Wirkung in Zellsystemen getestet. Hierfür wurde ein neuer Bioassay entwickelt. Dieser basiert auf der Beobachtung, dass Antioxidantien Apoptose bei Monozyten verhindern können, während diese oxidativem Stress ausgesetzt sind. Es wurde eine UV-Bestrahlung bei 254 nm mit 1 mW/cm^2 als oxidativer Stressor verwendet. Monozyten, die bei Apoptosetests routinemäßig verwendet werden, wurden damit für 2 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ bestrahlt.

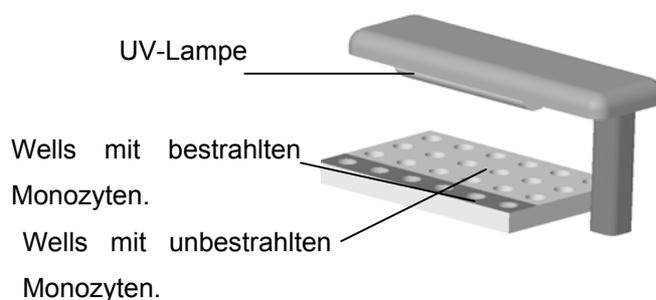


Abb. 56: Aufbau der Bestrahlungsanlage für den entwickelten Bioassay, bei dem Monozyten durch UV-Licht-Bestrahlung oxidativem Stress ausgesetzt werden.

Es ließ sich zeigen, dass 5-HTP (**186**) die Apoptose bei Monozyten konzentrationsabhängig deutlich verringert und somit als Antioxidans auch in Schwamm fremden Zellsystemen wirken kann.

4. Pyrrol-Imidazol-Alkaloide sind Verbindungen, die bis jetzt nur in Schwämmen der Familie *Agelasidae*, *Axinellidae* und *Halichondridae* gefunden wurden. Der bekannteste Vertreter ist das Oroidin (**5**), dessen Biosynthese noch nicht geklärt ist. Der Pyrrol-2-carbonsäure-Teil stammt wahrscheinlich von der Aminosäure L-Prolin (**265**) ab. Für die Biogenese der 2-Aminoimidazol-Einheit gibt es drei plausible Möglichkeiten, ausgehend von den Aminosäuren L-Histidin (**236**)^[169], L-Ornithin (**235**)^[170,171] oder L-Lysin (**233**)^[159].

Durch die Applikation von doppelt markiertem $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat an *Agelas dispar* sollten orientierende Erkenntnisse über die Biosynthese von Oroidin gewonnen werden. Zu diesem Zweck wurde ein neues Verabreichungssystem entwickelt, dass sich direkt am Riff bei *Agelas dispar* einsetzen ließ. Hierfür wurden nach pharmazeutischem Vorbild Retardtabletten (Matrixtabletten) formuliert, die ca. 50% des Wirkstoffes innerhalb von 3 h freisetzen. Die Freisetzungskinetik wurde durch NMR-Spektroskopie bestimmt.

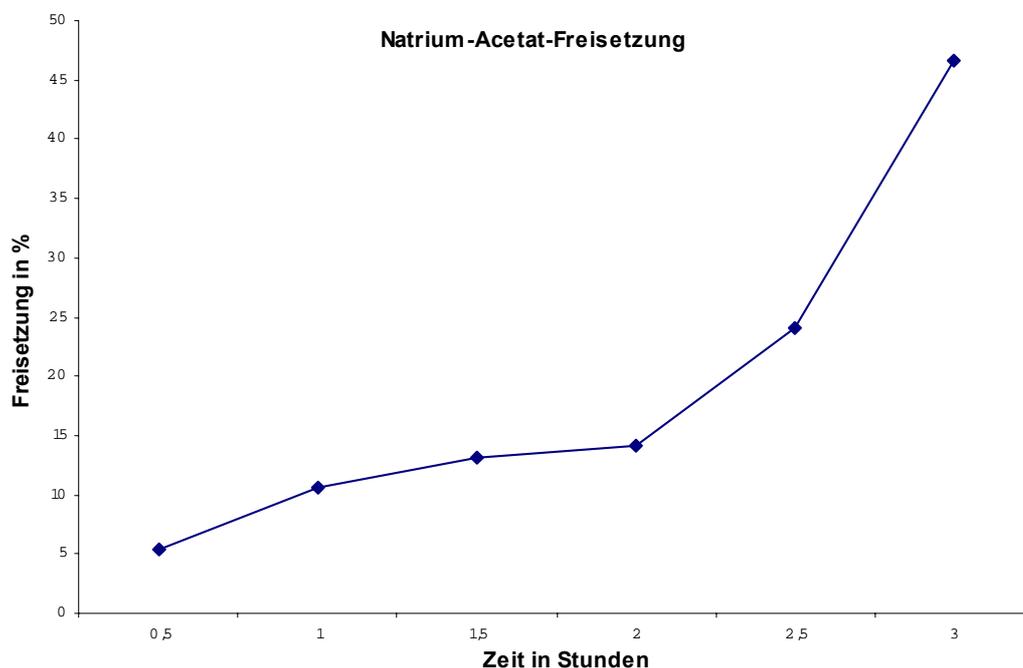


Abb. 57: Durch NMR-Spektroskopie bestimmte Kinetik der Freisetzung von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat aus speziell entwickelten Retardtabletten.

Dadurch sollten dem Schwamm für längere Zeit in der gewohnten Umgebung die markierten Substanzen zur Verfügung stehen, ohne dass diese von den umliegenden Wassermengen am Riff weggespült würden.

Bei der Aufarbeitung der Organismen und der Isolierung speziell von Oroidin konnte jedoch kein Einbau von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Acetat beobachtet werden. Im kurzen Zeitrahmen der Expedition konnten weder die Inkubationszeit verlängert, noch die Versuche mit einem optimierten System wiederholt werden.

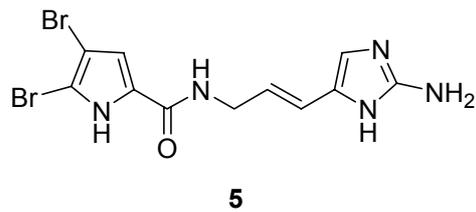


Abb. 58: Oroidin ist ein Schlüsselbaustein in der Biosynthese der Pyrrol-Imidazol-Alkaloide, in deren Biosynthese wahrscheinlich L-Prolin (**265**) den Pyrrolring bildet und der 2-Aminoimidazolring entweder durch L-Ornithin (**235**), L-Histidin (**236**) oder L-Lysin (**233**) gebildet wird.

II Experimenteller Teil

1 Arbeitstechniken und verwendete Geräte

Die verwendeten Lösungsmittel wurden nach den üblichen Verfahren gereinigt^[172]. Für die Säulenchromatographie wurde Silicagel (230-400 mesh) der Fa. E. Merck Darmstadt verwendet und für die Größenausschlusschromatographie Sephadex LH-20 der Fa. Amersham Pharmacia. Die verwendeten Laufmittel sind an entsprechender Stelle angegeben. Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde auf Kieselgel-Fertigplatten F₂₅₄ sowie Rp18 F₂₅₄ und Rp8 F₂₅₄ Fertigplatten der Fa. Merck (Darmstadt) durchgeführt. Der Nachweis der Zonen erfolgte mittels Detektion einer UV-Lampe mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm oder mittels Ansprühreagenz verdünnter Schwefelsäure (33%) und Erwärmung durch einen Heißluftfön.

HPLC

Trennung und Reinigung wurden entweder mit einem HPLC-Gerätesystem der Fa. Merck-Hitachi (L6200 A und UV-Detektor L4000) oder mit einem HPLC-Gerätesystem der Fa. Varian (Varian Module, Varian PDA Detektor 330.71 und dem Computerprogramm Varian Chromatography Station 5.5) durchgeführt. Es wurden präperative Säulen (Hibar Pre-Packed Column RT 250x25mm, Lichroprep RP-18, 25-40 μ m, Lichroprep RP-8, 25-40 μ m, LiChroprep Si-60, 25-40 μ m) sowie semipräperative Säulen (250x10mm, LiChrospher 100 RP-8, 10 μ m) der Fa. E. Merck verwendet.

UV/VIS

UV/VIS-Spektren wurden mit einem UV-Spektrometer HP 8452 Diode Array der FA. Hewlett Packard (Waldborn) aufgenommen.

NMR

Die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren erfolgte mit den NMR-Spektrometern AM 360 (360.12 MHz), WM 250 (250.13 MHz) der Fa. Bruker (Karlsruhe) und Varian INOVA-400 MHz. δ in ppm ist entweder relativ zum internen Standard Tetramethylsilan (Si(CH₃)) oder zu den verwendeten deuterierten Lösungsmitteln J ist in Hz angegeben. ¹³C-NMR-Spektren wurden bei 90.56 MHz, 75.4 MHz und 62.89 MHz mit

denselben Spektrometern erhalten. Die Substitutionsordnung wurde mittels *J*-modulierten *Spin-Echo*-Experimenten bzw. CH-COSY, HMBC und HMQC bestimmt.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit den Massenspektrometern MAT-311 A der Fa. Varian (Bremen) bzw. JEOL MS 70 der Fa. JEOL (München) bei 70 eV. *M/z* (rel%) aufgenommen.

Polarimetrie

Die optischen Drehwerte wurden mit einem Polarimeter A Perkin-Elmer 241 und einer 10 cm Küvette gemessen.

IR-Spektren

IR-Spektren wurden als Film auf einem NaCl-Fenster mit einem PE 1600 FT-IR Spektralphotometer der Fa. Perkin Elmer (Überlingen) erhalten.

2 Isolierung des Moostierchens *Flustra foliacea*

Flustra foliacea wurde mit einem Fischerschleppnetz vom Seegrund der tiefen Helgolandrinne im Südosten der Nordsee (etwa 54°12' N und 7°47' E) in 33 m – 45 m Tiefe, während der Expedition 116 der RV „Heincke“ am 12. Februar 1999 gesammelt. Nachdem der Fang an Bord war, wurde er gedräscht und in PE-Tüten eingefroren.

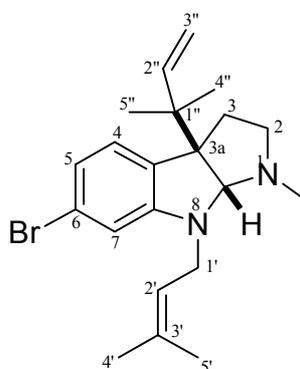
Der Organismus wurde gefriergetrocknet, und 82.5 g wurden mit CH₃OH/CH₂Cl₂ (1:1, 750 mL, dreimal) extrahiert. Die Phasen wurden vereinigt und konzentriert. 13.9 g Rohextrakt wurde mit CH₃OH und iso-Octan (je 200 mL) ausgeschüttelt und die Methanol-Phase (12.8 g) dreimal mit iso-Octan (Trimethylpentan) gewaschen. Die konzentrierte Methanolphase wurde mit Wasser und *n*-Butanol (je 200 mL) ausgeschüttelt und die *n*-Butanolphase mit Wasser dreimal gewaschen. Die konzentrierte *n*-Butanolphase (4.08 g) wurde chromatographiert (Sephadex LH-20, MeOH, Säulenlänge 1 m, Säulendurchmesser 6 cm).

2.1 HPLC-MS und MS/MS

HPLC MS: RP-18 (100x10 mm 5-7 μm); Fließmittel: Gradient H_2O mit TFA 0.1% zu Acetonitril mit TFA 0.1% in 10 min; Flussrate 1 mL/min. **Detektion:** Elektronenspray-Massenspektrometrie (EI-MS), UV-Diodenarray.

Doppelte Massenspektrometrie (EI-MS/MS) (70 eV): Elektronenspray –Methode $[\text{M}^+]$.

2.2 Flustramin A (133)



Fraktion 4 der Sephadexsäule wurde mittels Kieselgel (Gradient CHCl_3 nach $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (7:3)) aufgetrennt. In Fraktion 2 wurde Flustramin A (**133**) eluiert.

Ausbeute: 16 mg (= 0.02% des Trockenmasse)

DC: (Kieselgel, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9.5:0.5)): $R_f = 0.5$

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, Chloroform- d_1): $\delta = 6.90$ (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, 4-H), 6.69 (dd, $J = 1.5, 8.5$ Hz, 1H, 5-H), 6.48 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 7-H), 5.94 (dd, $J = 10.5, 17.0$ Hz, 1H, 2''-H), 5.22 (t, $J = 6.3$ Hz, 1H, 2'-H), 5.06 (dd, $J = 1.5, 10.5$ Hz, 1H, 3''-H_Z), 4.98 (dd, $J = 1.5, 17$ Hz, 1H, 3''-H_E), 4.35 (s, 1H, 8a-H), 3.84 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H, 1'-H), 2.67 (m, 2H, 2-H), 2.42 (s, 3H, NCH_3), 2.22 (m, 2H, 3-H), 1.73 (s, 6H, 4'-H, 5'-H), 1.01 (s, 3H, 4''-H), 0.94 (s, 3H, 5''-H).

HPLC (Kieselgel Gradient $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9.5:0.5) \rightarrow $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) in 30 min; Flussrate 11.5ml/min) R_f : 22.20 min.

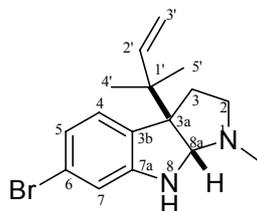
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d_1) δ = 6.93 (s, 1H, 4-H), 6.75 (s, 1H, 7-H), 5.95 (dd, J = 10.8, 17.2 Hz, 1H, 2''-H), 5.22 (t, J = 7.2 Hz, 1H, 2'-H), 5.07 (dd, J = 1.6, 10.8 Hz, 1H, 3''-H_Z), 5.00 (dd, J = 1.6, 17.2 Hz, 1H, 3''-H_E), 4.40 (s, 1H, 8a-H), 3.31 (d, J = 6.8 Hz, 2H, 1'-H), 2.57 (m, 2H, 2-H), 2.39 (s, 3H, NCH_3), 2.28 (m, 1H, 3-H), 1.78 (m, 1H, 3-H), 1.73 (s, 3H, 4'-H), 1.70 (s, 3H, 5'-H), 1.02 (s, 3H, 4''-H), 0.98 (s, 3H, 5''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90.6 MHz Chloroform- d_1) δ = 149.9 (C-7a), 144.7 (C-2''), 133.5 (C-3b), 132.5 (C-3'), 130.1 (C-5), 126.4 (C-4), 123.0 (C-6), 122.7 (C-2'), 113.1 (C-3''), 112.7 (C-7), 84.9 (C-8a), 64.2 (C-3a), 53.1 (C-2), 41.3 (C-1''), 36.9 (NCH_3), 34.6 (C-3), 34.3 (C-1'), 25.7 (C-18), 23.3 (C-4''), 22.4 (C-5''), 17.4 (C-5').

MS (70 eV) (FAB^+ , NBA): m/z (%) = 389/391 (62/52) [M^+H], 319/321 (82/100) [M^+H].

HRFABMS ber: $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{N}_2^{81}\text{Br}$ 389.1592 [M^+], gef.: 389.1564 [M^+].

2.4 Dihydroflustramin C (132)



Isolierung: Fraktion 4 der Sephadexsäule wurde mittels Kieselgel (Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow$ bis $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (7:3) aufgetrennt. In Fraktion 5 wurde Dihydroflustramin C (**132**) und Flustramin D (**135**) eluiert. Gereinigt wurden diese beiden Verbindungen mittels HPLC (Kieselgel Gradient $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (9.5:0.5) \rightarrow bis $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (8:2) in 30 min; Flussrate 11.5mL/min) R_f : 22.20 min.

Die angegebenen analytischen Daten gelten jeweils für das Stoffgemisch Dihydroflustramin C (**132**) und Flustramin D (**135**).

Ausbeute: 5.1mg (Gemisch) Dihydroflustramin C (**132**) Flustramin D (**135**) (3:2).

DC: (Kieselgel CHCl_3 - CH_3OH (9:1)): $R_f = 0.61$

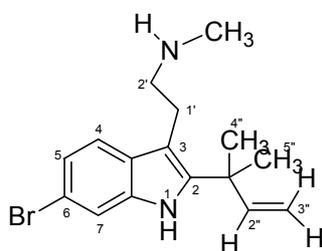
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, Chloroform- d_1) $\delta = 6.96$ (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 4-H), 6.78 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H, 5-H), 6.68 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 7-H), 5.96 (dd, $J = 10.8, 17.2$ Hz, 1H, 2'-H), 5.07 (dd, $J = 1.3, 10.8$ Hz, 1H, 3'-H_Z), 5.01 (dd, $J = 1.3, 17.2$ Hz, 1H, 3'-H_E), 4.42 (s, 1H, 8a-H), 2.57 (m, 2H, 2-H), 2.39 (s, 3H, NCH₃), 2.28 (m, 1H, 3-H), 1.78 (m, 1H, 3-H), 1.04 (s, 3H, 4'-H), 0.98 (s, 3H, 5'-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90.6 MHz, Chloroform- d_1) $\delta = 152.1$ (C-7a), 144.6 (C-2'), 132.6 (C-3b), 126.4 (C-4), 121.4 (C-6), 120.9 (C-5), 113.3 (C-3'), 111.7 (C-7), 84.5 (C-8a), 64.0 (C-3a), 53.1 (C-2), 41.3 (C-1'), 36.9 (NCH₃), 34.7 (C-3), 23.2 (C-4'), 22.4 (C-5').

MS (70 eV) (FAB⁺, NBA): m/z (%) 319/321 (82/100) [M^+H].

HRFABMS ber.: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2^{81}\text{Br}$: 323.0946 [M^+], gef.: 323.0948 [M^+].

2.5 Deformylflustrabromin (172)



Isolierung: Fraktion 5 der Sephadexsäule wurde mittels HPLC (RP8-Phase $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}/\text{HAc}$ (50:50:0.1), Flussrate: 11.5 mL/min, R_t : 10:06 min) aufgetrennt und mit HPLC (Kieselgel Gradient $\text{CHCl}_3 \rightarrow$ bis $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (7:3), Flussrate: 11 mL/min) über 30 min, R_t : 25.00 min).

Ausbeute: 59 mg (0.072% des Trockenmasse)

DC (Kieselgel $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 8:2): $R_f = 0.5$

$^1\text{H-NMR}$ (360 MHz, Chloroform- d_1 /Methanol- d_4 (7:3)): δ = 7.53 (s, 1H, 7-H), 7.45 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 4-H), 7.15 (d, J = 8.3 Hz, 1H, 5-H), 6.15 (dd, J = 17.3, 10.4 Hz, 1H, 2''-H), 5.17 (d, J = 17.3 Hz, 1H, 3''-H_E), 5.16 (d, J = 10.4 Hz, 1H, 3''-H_Z), 3.23 (m, 2H, 1'-H), 3.08 (m, 2H, 2'-H), 2.71 (s, 3H, NCH₃), 1.53 (s, 6H, 4'',5''-H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (90.6 MHz, DMSO- d_6): δ = 145.5 (C-2''), 141.8 (C-2), 135.5 (C-7a), 127.6 (C-3a), 121.2 (C-5), 119.4 (C-4), 113.5 (C-6), 113.4 (C-7), 111.6 (C-3''), 104.9 (C-3), 48.5 (C-2'), 45.4 (NCH₃), 38.7 (C-1''), 27.6 (C-4'', C-5''), 21.6 (C-1').

HMBC 7.53→3a, 5, 6; 7.45→3, 3a, 6, 7a; 7.15→7; 6.15→2, 1'', 4''(5''); 5.17→1'', 2''; 5.16→1'', 2''; 3.23→2, 3, 3a; 1.53→2, 1'', 2'', 5''; 1.53→2, 1'', 2'', 4'':

IR (NaCl): $\tilde{\nu}$ = 3279 cm⁻¹, 2978 cm⁻¹, 2760 cm⁻¹, 2433 cm⁻¹, 1710 cm⁻¹, 1591 cm⁻¹, 1466 cm⁻¹.

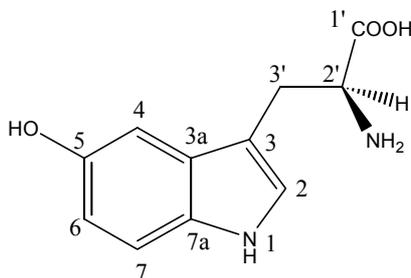
UV/VIS (CH₃OH): λ_{max} (ϵ) = 204nm (30190), 230nm (22731), 282nm (4768 mol⁻¹*cm⁻¹*L).

MS (70 e V) (FAB⁺, NBA): m/z (%): 321/323 (100/96) [M⁺H], (277/279 (22/22) [M⁺H].

HRFABMS ber.: C₁₆H₂₂⁷⁹BrN₂ 321.0966, gef.: 321.0974 [M⁺]

3 Naturstoffe aus dem Schwamm *Hymeniacidon heliophila*

3.1 5-Hydroxytryptophan (186)



3.1.1 Identifizierung

Isolierung: Der gefriergetrocknete Schwamm *Hymeniacidon heliophila* (231 g) wurde mit MeOH/CH₂Cl₂ (1:1, 1500 mL, dreimal) extrahiert und danach eingeeengt. Der Rohextrakt (34.5 g) wurde zwischen MeOH und *iso*-Octan verteilt (je 300 mL). Die MeOH-Phase wurde dreimal mit *iso*-Octan gewaschen (*iso*-Octanphase: 12.5 g). Die konzentrierte MeOH-Phase (20.5 g) wurde verteilt zwischen *n*-BuOH und Wasser (je 300 mL), die *n*-BuOH-Phase wurde dreimal mit Wasser gewaschen. 2.6 g der *n*-BuOH-Phase (4.7 g) wurden chromatographiert (Sephadex LH-20, MeOH, Säulenlänge 1 m, Säulendurchmesser 6 cm oder 3 cm). In Fraktion 6 wurde 5-Hydroxytryptophan (**186**) eluiert.

DC: $R_f = 0.76$ (RP-18, MeOH/H₂O (1:1));

Drehwert: $[\alpha]_D^{20} = -27.4$, ($c = 1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$);

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*₁/Methanol-*d*₄ (4:6)): $\delta = 7.22$ (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, 7-H), 7.13 (s, 1H, 2-H), 7.06 (d, $J = 2.4$ Hz, 4-H), 6.73 (dd, $J = 2.4, 8.8$ Hz, 1H, 6-H), 3.83 (dd, $J = 9.6, 4.0$ Hz, 2'-H), 3.46 (dd, $J = 15.2, 3.8$ Hz, 1H, 3'-H), 3.09 (dd, $J = 15.2, 9.6$ Hz, 3'-H).

¹³C NMR (125 MHz, Methanol-*d*₄): $\delta = 174.7$ (C-1'), 151.5 (C-5), 133.2 (C-7a), 129.1 (C-3a), 125.9 (C-2), 112.9 (C-6), 112.8 (C-7), 108.7 (C-3), 103.5 (C-4), 56.5 (C-2'), 28.5 (C-3').

MS (70 eV) (EI⁺): m/z (%) = 220 [M⁺]; HREIMS: ber. für C₁₁H₁₂N₂O₃ 220.0845, gef. 220.0863.

UV (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 302 (3380), 276 nm (4836 mol⁻¹·cm⁻¹·L).

IR (NaCl): $\tilde{\nu} = 3945.2 \text{ cm}^{-1}$ (s), 2833.5 cm⁻¹ (s), 2594.8 cm⁻¹ (w), 2521.4 cm⁻¹ (w), 2041.8 cm⁻¹ (w), 1623.1 cm⁻¹ (m), 1448.4 cm⁻¹ (m), 1419.0 cm⁻¹ (m), 1107.4 cm⁻¹ (m), 1025.2 cm⁻¹ (s).

3.1.2 Quantifizierung

Isolierung: 5-Hydroxytryptophan (**186**) wurde mit Wasser/EtOH (1:1) vollständig (Kontrolle mittels Dünnschichtchromatographie) aus den gesammelten Proben (2.53 bis 5.92g) des Meeresschwamms *Hymeniacidon heliophila* extrahiert und dann konzentriert. Der Gehalt der Probe wurde ohne weitere Aufreinigung analysiert.

3.1.2.1 Quantifizierung (HPLC):

(RP8, H₂O/CH₃OH (50:50); 250x10mm): R_t = 5.30 min; Flussrate: 3.5 mL/min

Kalibriergerade: (RP8, H₂O/CH₃OH (50:50)): R_t = 3.30 min, Konzentrationen: 0.00125 mg/L, 0.0205 mg/L, 0.041 mg/L 5-HTP).

Tab. 10: Daten HPLC-Kalibrierungsgerade.

Konzentration	0.041 mg/mL	0.0205 mg/mL	0.00125 mg/mL
Signalfläche in MAUS	193135	87933	35175
Signalfläche in MAUS	167852	78534	34040
Signalfläche in MAUS	170422	78438	40909
Signalfläche in MAUS	163406	75216	38185
Signalfläche in MAUS	153185	78572	
Signalfläche in MAUS	176608	81558	
Signalfläche in MAUS		81963	
Signalfläche in MAUS		78373	

Kalibriergerade: $y = 337.5x + 2.5207$; Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0.9646$.

3.1.2.2 Quantifizierung (NMR):

Erstellung der Kalibriergeraden: Es wurden Lösungen mit 4 unterschiedlichen Konzentrationen 5-HTP (**186**) hergestellt und mit NaCl (5 mg) versetzt. Als interner Standard wurde Maleinsäure (10 mL, 1 mg/mL) zugegeben. Die einzelnen Proben

wurden konzentriert und in Chloroform- d_1 /Methanol- d_4 (1:1) mittels ^1H -NMR-Spektroskopie vermessen.

Tab. 11: Daten der NMR-Kalibriergerade.

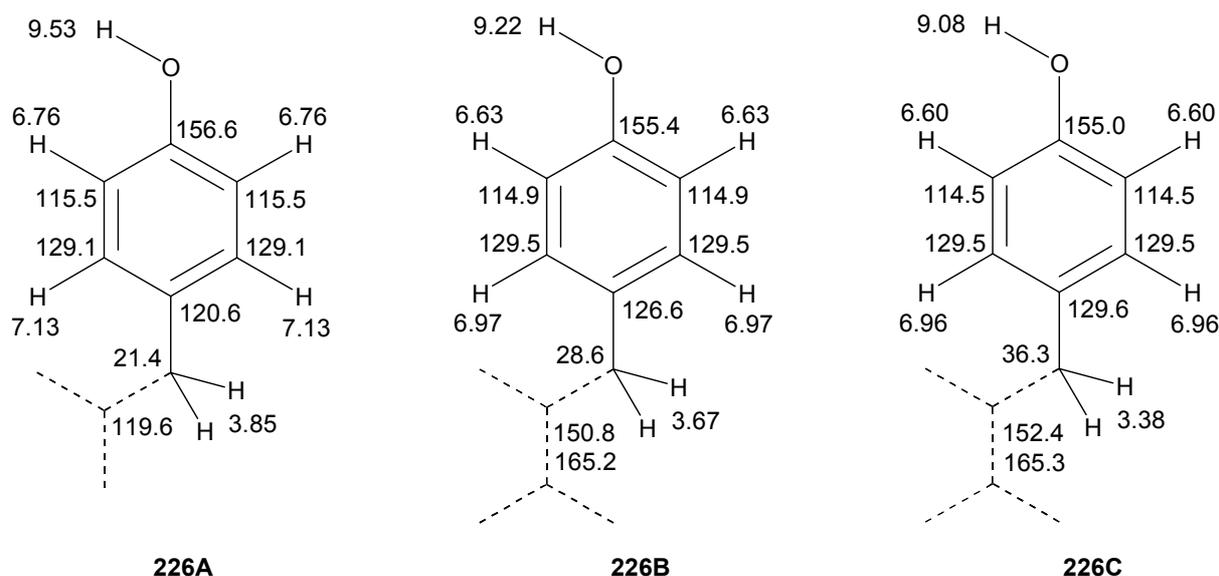
Sollwert (mg)	Istwert (mg)
16.22	17.76
	15.53
	16.75
	17.76
	19.43
6.46	6.53
	6.23
	6.49
3.2	3.16
	3.29
	3.2
0.65	0.60
	0.60
	0.63

Kalibriergerade: $y = 0.00283x - 0.0055$; Korrelationskoeffizient: $R^2 = 0.9877$.

Quantifizierung der Proben:

Jeder Extrakt (0.75-1.56 g) wurde mit wässriger Maleinsäure-Lösung (10 mL, 1 mg/mL) versetzt und konzentriert. Danach wurden die Gemische vollständig in $\text{D}_2\text{O}/\text{CD}_3\text{OD}$ (1:1) gelöst. Von je 1 mL eines Extraktes wurde ein ^1H -NMR Spektrum aufgenommen und integriert.

3.2 Naturstoff (226) aus dem Schwamm *Hymeniacidon heliophila*



Isolierung: Gefriergetrockneter Meeresschwamm *Hymeniacidon heliophila* (51.9 g) wurde mit CH₂Cl₂-CH₃OH (1:1; 450 mL, dreimal) extrahiert. Der Rohextrakt (8.0 g) wurde zwischen MeOH und *iso*-Octan (200 mL) ausgeschüttelt. Die MeOH-Phase wurde dreimal mit *iso*-Octan gewaschen. Die konzentrierte MeOH-Phase (7.2 g) wurde zwischen *n*-BuOH und Wasser verteilt (200 mL), die resultierende *n*-BuOH-Phase (1.5 g) wurde dreimal mit Wasser gewaschen. 3.8 g der Wasser-Phase wurden chromatographiert (Sephadex LH-20, MeOH, Säulenlänge 1 m, Säulendurchmesser 3 cm) und in 8 Fraktionen aufgesammelt. Fraktion 8 wurde über eine HPLC aufgetrennt. Dabei wurde der Naturstoff (1 mg) isoliert.

HPLC (RP18, Gradient H₂O/CH₃OH 9.5:0.5 → H₂O/CH₃OH 0.5:9.5 (30 min)): R_t = 23.40 min, Flussrate: 11.5 mL/min.

DC: H₂O/CH₃OH 0.5 : 9.5: R_f = 0.46.

¹H-NMR (360 MHz, DMSO-*d*₆): **226A**: δ = 9.53 (s, 1H, OH); 7.13 (d, *J* = 8, 2H, 3-H und 5-H); 6.76 (d, *J* = 8, 2H, 2-H und 6-H); 3.86 (s, 2H, 1'-H). **226B**: δ = 9.22 (s, 1H, OH); 6.98 (d, *J* = 8, 2H, 3-H und 5-H); 6.64 (d, *J* = 8, 2H, 2-H und 6-H); 3.76 (s, 2H, 1'-H). **226C**: δ = 9.08 (s, 1H, OH); 6.97 (d, *J* = 8, 2H, 3-H und 5-H); 6.60 (d, *J* = 8, 2H, 2-H und 6-H); 3.38 (s, 2H, 1'-H).

¹³C-NMR (90.6 MHz, DMSO-*d*₆): **226A**: δ = 156.6 (C-1), 129.1 (2C, C-3 und C-5), 120.6 (C-4), 119.6 (C-2'), 115.5 (2C, C-2 und C-6), 21.4 (C-1'). **226B**: δ = 165.2 (C-2' oder C-3'), 155.4 (C-1), 150.8 (C-2' oder C-3'), 129.5 (2C, C-3 und C-5), 126.6 (C-4), 114.9 (2C, C-2 und C-4), 28.6 (C-1'). **226C**: δ = 165.3 (C-2' oder C-3'), 155.0 (C-1), 152.4 (C-2' oder C-3'), 129.6 (C-4), 129.5 (2C, C-3 und C-5), 114.5 (2C, C-2 und C-6), 36.3 (C-1').

4 Zellversuche

Vollblutspenden und Buffy coats zur Isolierung von Monozyten wurden von unterschiedlichen Spendern aus der Blutbank des Universitätsklinikums Heidelberg bezogen.

4.1 Bereitung des Zellkultur-Mediums

Monozyten wurden in RPMI-1640-Medium mit Indikator (Phenolrot, BRL Life Technologies, Eggenstein; PAA, Linz, Österreich) kultiviert. Das Medium wurde mit 2 mM L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin (Sigma, Deisenhofen) und 10% fetalem Kälberserum (fetal calf serum = FCS) (Roche Diagnostics, Mannheim), welches zuvor 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert wurde, unter Sterilfiltration (0.22 µm) supplementiert. Es wurden jeweils 550 ml Medium angesetzt, welches bei 4 °C gelagert und innerhalb von 7 Tagen aufgebraucht wurde.

4.2 Isolierung der Monozyten

Das Lymphozyten-Separationsmedium der Fa. PAA Linz wurde mit den Blutproben (ohne Plasma) in einem sterilen Falconröhrchen überschichtet und anschließend 30 min mit 1000 g zentrifugiert (Labofug 1). Die Monozyten wurden aus der Interphase sorgfältig abgenommen und mit 50 ml isotonischem Phosphatpuffer (PBS, pH 7.4) gewaschen (I). Danach wurde zentrifugiert, der Phosphatpuffer abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig in PBS resuspendiert und nochmals gewaschen. Insgesamt wurde dieser Vorgang dreimal wiederholt (II). Abschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium (s.o.) resuspendiert, in einer Neubauerzählkammer gezählt (III) und durch weiteres Verdünnen auf eine Konzentration von 7.5×10^6 /ml eingestellt (IV) (Anhang 1) (Anhang **Abb. 59**)

4.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurde ein Aliquot mit Tryptan-Blau Lösung (Boehringer Mannheim, Mannheim) 1:1 verdünnt und die Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das Volumen des Kleinquaders beträgt 2.5×10^{-4} μl .

4.4 Kultivierung

Die Monozyten ($7.5 \times 10^6/\text{ml}$) wurden in 1 ml Medium mit Indikator in 24 Wells (Durchmesser 1 cm) ausgesät und 2 Tage unter den angegebenen Standardbedingungen in einem Inkubator kultiviert (gesättigte Wasserdampfatosphäre, 37°C , 5% CO_2)

4.5 Bestimmung der Apoptoserate

Nach 2 Tagen wurde das Medium mit nonadhärenten Lymphozyten abgesaugt und die Monozyten mit jeweils 1 ml/Well Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 0.5 ml der gewünschten Konzentration 5-L-Hydroxytryptophan (**186**) und Acetylcystein (beide in RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot, Fluka) für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine zweistündige Bestrahlung mit einer UV-Lampe (Osram) bei einer Wellenlänge von 254 nm ($1 \text{ mW}/\text{cm}^2$) für 2 h bei 37°C . Danach wurden die Zellen mit 14 μl YO-PRO-1 Iodid (0.1 mM Lösung in DMSO/PBS Puffer) und 10 μl Hoechst 33342 (0.1 mM Lösung in DMSO/PBS Puffer) versetzt. Die fluoreszierenden Nuclei wurden nach 20 Minuten unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse FS 100) mit Hilfe eines Filters für die blaue (EPI-FL Filterblock 340-380 nm) und eines für die grüne Fluoreszenz (EPI-Fluoreszenz Filterblock B-2A 450-490 nm) ausgezählt.

5 Biosynthese

5.1 Retardtabletten

Tablette: ^{13}C doppelt markiertes Natrium Acetat 10 mg

Zusammensetzung: Ethylcellulose (45.4%), Avicel (9.2%), Eudragit L (23%), Eudragit RL (17%), Magnesiumstearat (0.9%), Na-Acetat (4.7%).

Einwaagen: Ethylcellulose: 9.7 g; Avicel: 2.0 g; Eudragit L: 4.9; Eudragit RL: 3.6 g
Magnesiumstearat: 0.2 g; Natrium-Acetat (1.0 g).

Das Gemisch wurde eingewogen, 30 min im Turbolamischer homogenisiert und danach direkt tablettiert.

Durchschnittsgewicht einer Tablette: 212 mg

5.2 Freisetzungskinetik

In sechs Gefäßen wurden je zehn Tabletten in 100 mL künstliches Meerwasser unter leichtem Rühren gegeben und alle 30 min Proben von je 1 mL entnommen.

Die Freisetzung des Natriumacetats wurde durch NMR Messungen bestimmt. Zu jeder Probe wurden 10 mL Maleinsäure ($c = 1 \text{ mg mL}^{-1}$) als internen Standard gegeben. Durch Integration des Signals bei $\delta = 1.85 \text{ ppm}$ (CH_3 des Natriumacetats) und des Signals der beiden äquivalenten H – Atome der Maleinsäure bei $\delta = 6.02 \text{ ppm}$ wurde der Gehalt berechnet.

Herstellung des künstlichen Meerwassers:

28 g NaCl, 7 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2.4 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ und 0.2 g NaHCO_3 wurden in 985 mL dest. Wasser gelöst.

Freisetzungskinetik von Acetat

Tab. 12: Freisetzung.

Zeit (h)	1. Messung	2. Messung	3. Messung	Mittelwert	Standardabweichung
0.5	0.0055	0.0063	0.0045	0.0054	0.00074
1	0.012	0.0108	0.0089	0.0106	0.00128
1.5	0.0128	0.0151	0.0118	0.0132	0.00138
2	0.0136	0.0158	0.0128	0.0141	0.00127
2.5	0.043	0.0251	0.0225	0.0240	0.00109
3	0.0469	0.0485	0.0445	0.0467	0.00161

Aquarium: Es wurden entweder 10 L oder 18 L Aquarien verwendet, die permanent mit fließendem Meerwasser und Sauerstoff versorgt wurden.

5.3 Aquariumsversuche

Agelas dispar (ca. 1L Volumen) (a) wurde in ein Aquarium mit 18 L Meerwasser gelegt, 500 mg [1,2-¹³C₂] Acetat zugegeben und unter Sauerstoffzufuhr ohne fließendes Meerwasser für 1 h inkubiert. Es folgte ein Durchfluss von 45 min Meerwasser um dann anschließend für 3 h mit 500 mg [1,2-¹³C₂] Acetat unter Sauerstoffzufuhr inkubiert zu werden. Der Schwamm wurde für fünf Tage im Aquarium gehalten und dann tiefgefroren.

5.4 Freiwasserversuche

In den Korpus eines *Agelas dispar* (1.5 L Volumen) (b) wurden in 16 m Tiefe 28 10 mg [1,2-¹³C₂] Acetat Retardtabletten gegeben. 17 h später wurden die Tabletten entfernt, durch 20 neue ersetzt und für 6 h mit einer Plastiktüte abgedeckt. Nach Entfernung dieser verblieb der Schwamm für weitere 40 min im freien Wasser, bevor er geborgen wurde, für weitere vier Tage in einem 18 L Aquarium lag und dann direkt eingefroren wurde.

1 L Korpusvolumen *Agelas dispar* (c) wurde in 16 m Tiefe mit einer Plastiktüte abgedeckt, 600 mg [1,2-¹³C₂] Acetat in den Innenraum injiziert und die Einstichstelle verschlossen. Die Plastiktüte wurde nach 6 h entfernt und nach weiteren 40 min wurde der Schwamm geborgen. Nach vier Tagen in einem 10 l Aquarium wurde der Organismus eingefroren.

In den Korpus eines *Agelas dispar* (250 mL Korpusvolumen) (d) wurden 10 [1,2-¹³C₂] Acetat Retardtabletten gegeben nach 6 h und 40min wurde der Schwamm geborgen und noch vier Tage in einem 10 L Aquarium gehalten und dann eingefroren.

5.5 Extraktion und Isolierung

Die tiefgefrorenen Schwämme wurden separat je zweimal mit 1 L CH₃OH und dann mit 1 L des Lösungsmittelgemisches CH₂Cl₂/CH₃OH dreimal extrahiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und konzentriert, zwischen CH₃OH und iso-

Octan (je 200 mL) verteilt und die Methanolphase mit *iso*-Octan zweimal gewaschen. Die konzentrierte Methanolphase wurde zwischen Wasser und *n*-Butanol (je 200 mL) verteilt und die getrocknete *n*-Butanolphase auf einer Sephadex LH-20 Säule mit Methanol chromatographiert. Alle Verteilungsfractionen und alle Fractionen der Sephadexchromatographie wurden mit ^{13}C -NMR-Spektroskopie vermessen.

Ausbeuten der Extraktionen: (a) Rohextrakt: 4.2 g; Methanolphase: 3.7 g; *n*-Butanolphase: 1.2 g; Wasserphase: 2.4 g; *iso*-Octanphase: 0.4 g. (b) Rohextrakt: 5.7 g; Methanolphase: 4.8 g; *n*-Butanolphase: 1.7 g; Wasserphase: 3.9 g; *iso*-Octanphase: 0.6 g. (c) Rohextrakt: 4.5 g; Methanolphase: 3.6 g; *n*-Butanolphase: 1.1 g; Wasserphase: 2.0 g; *iso*-Octanphase: 0.5 g. (d) Rohextrakt: 2.2 g; Methanolphase: 1.9 g; *n*-Butanolphase: 0.5 g; Wasserphase: 1.3 g; *iso*-Octanphase: 0.1 g.

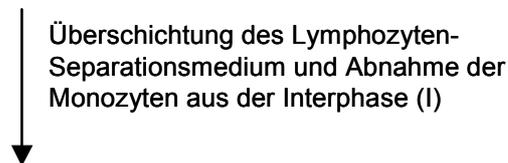
6 Anhang

Isolation von Monozyten

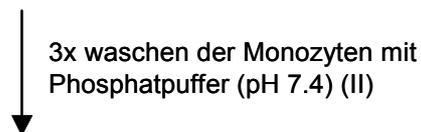
Gewinnung des menschlichen Blutes



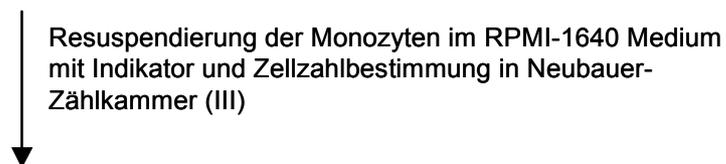
Blutbuffy



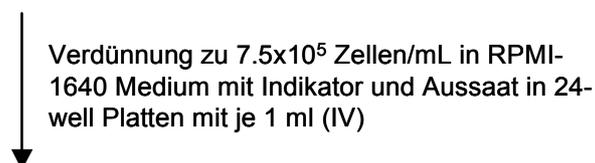
Monozyten



Gereinigte Monozyten



Monozytenanzahl



Ausgesäte Monozyten

Abb. 59: Isolation von Monozyten aus Humanblut

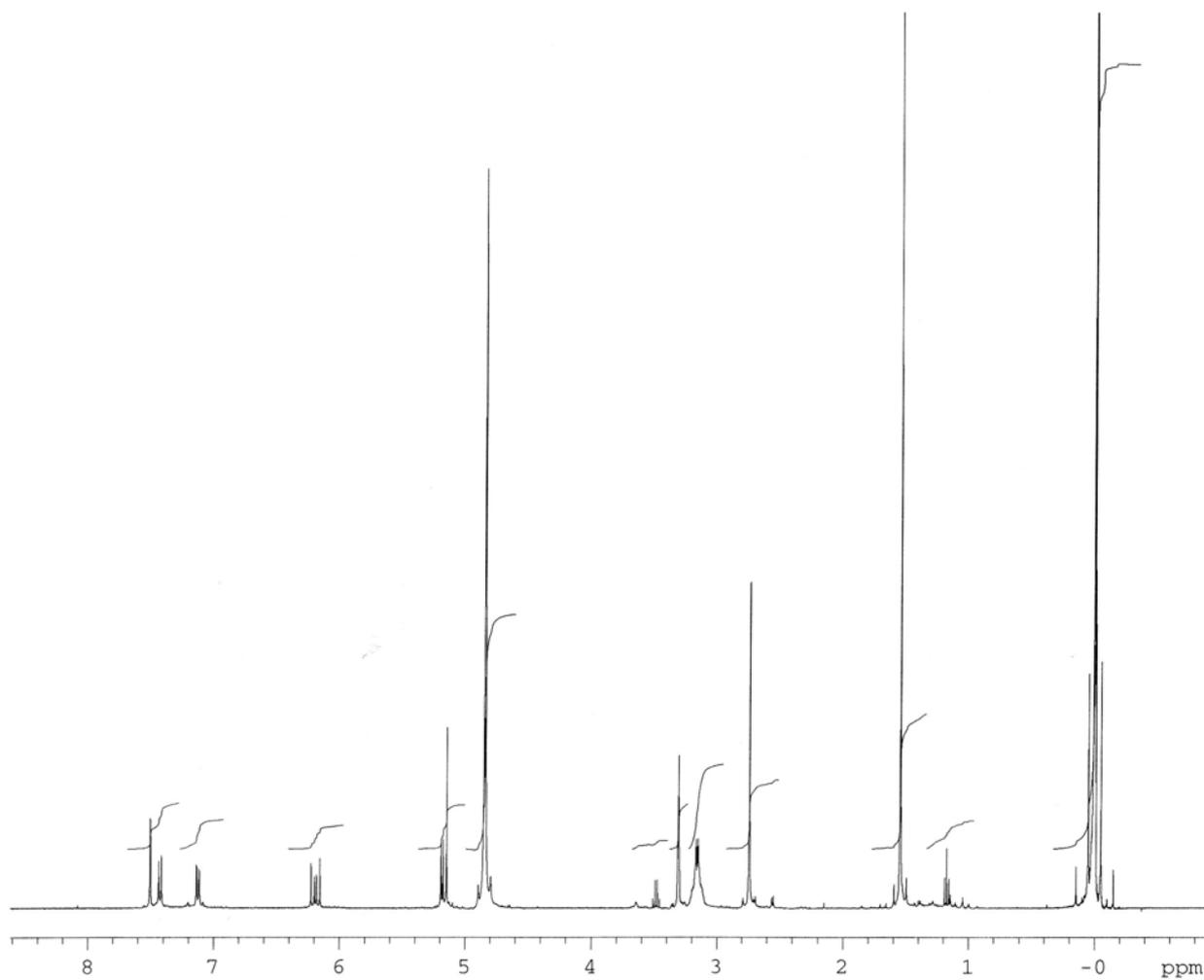


Abb. 60: $^1\text{H-NMR}$ 400 MHz $\text{Methanol } d_4$: Deformylflustrabromin (172).

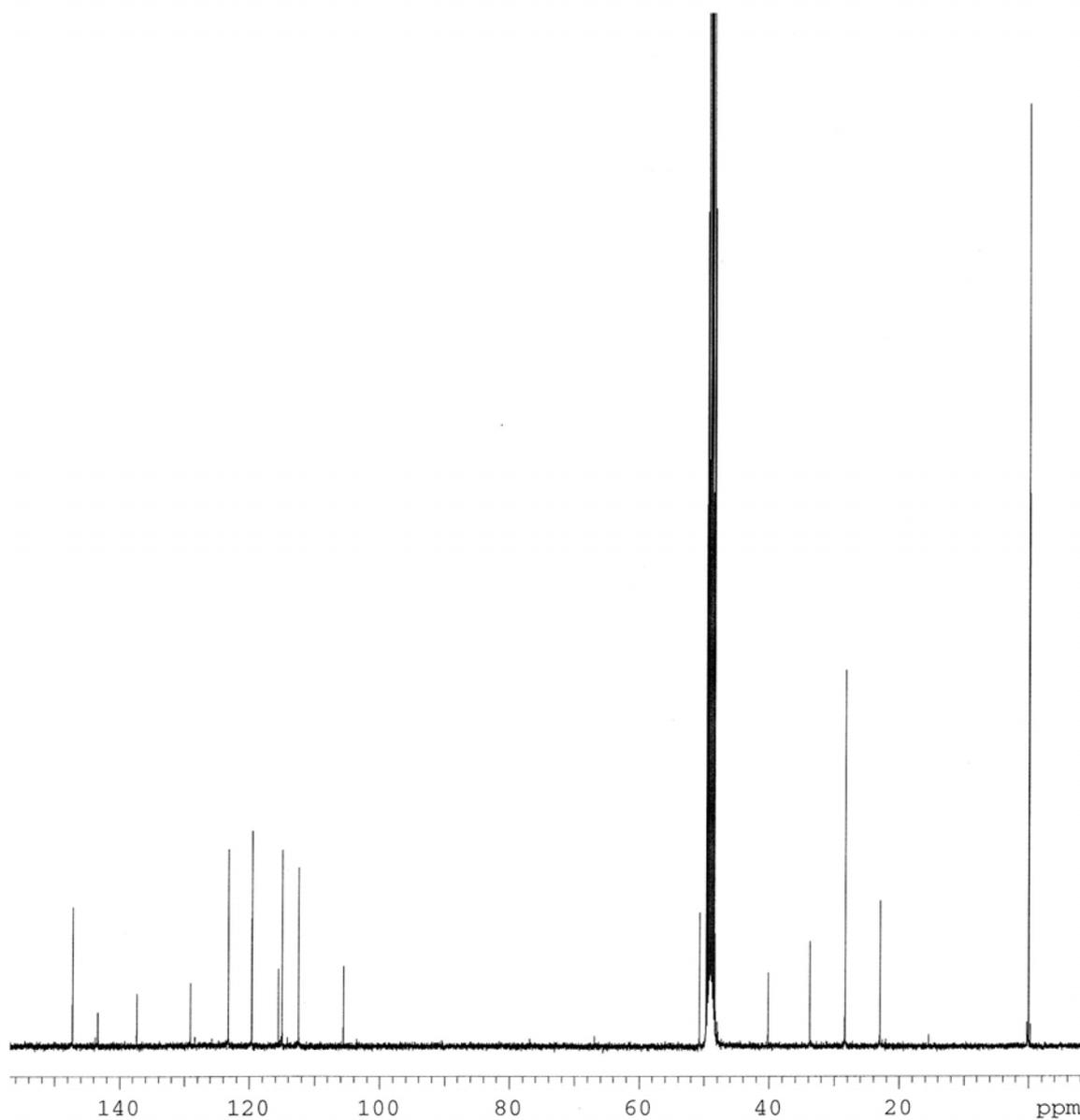


Abb. 61: ^{13}C -NMR-Spektrum 100.5 MHz Methanol d_4 : Deformylflustrabromin (172).

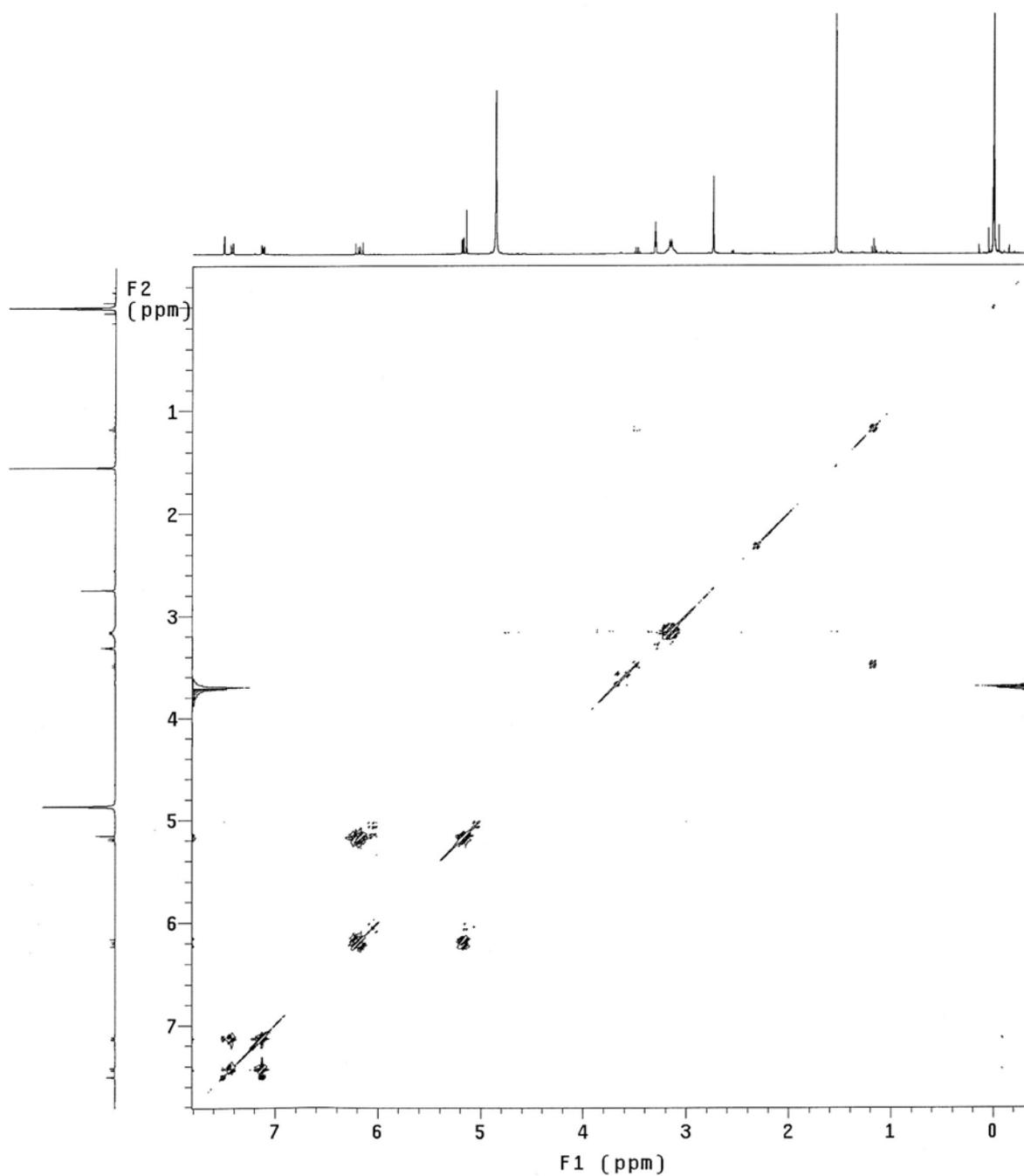


Abb. 62: COSY-NMR-Spektrum 400 MHz Methanol d_4 : Deformylflustrabromin (172).

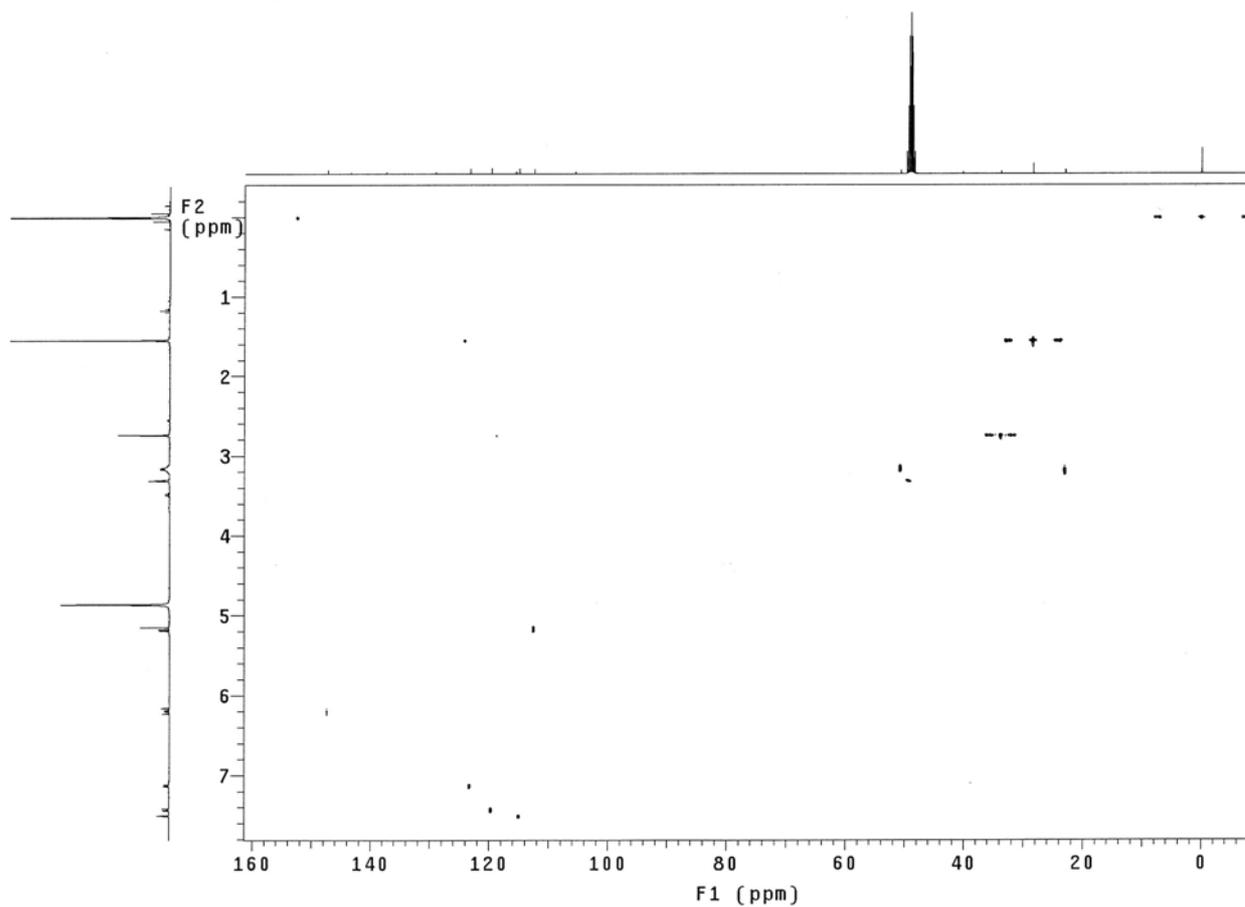


Abb. 63: HSQC-Spektrum 100.5 MHz Methanol d_4 : Deformylflustrabromin (172).

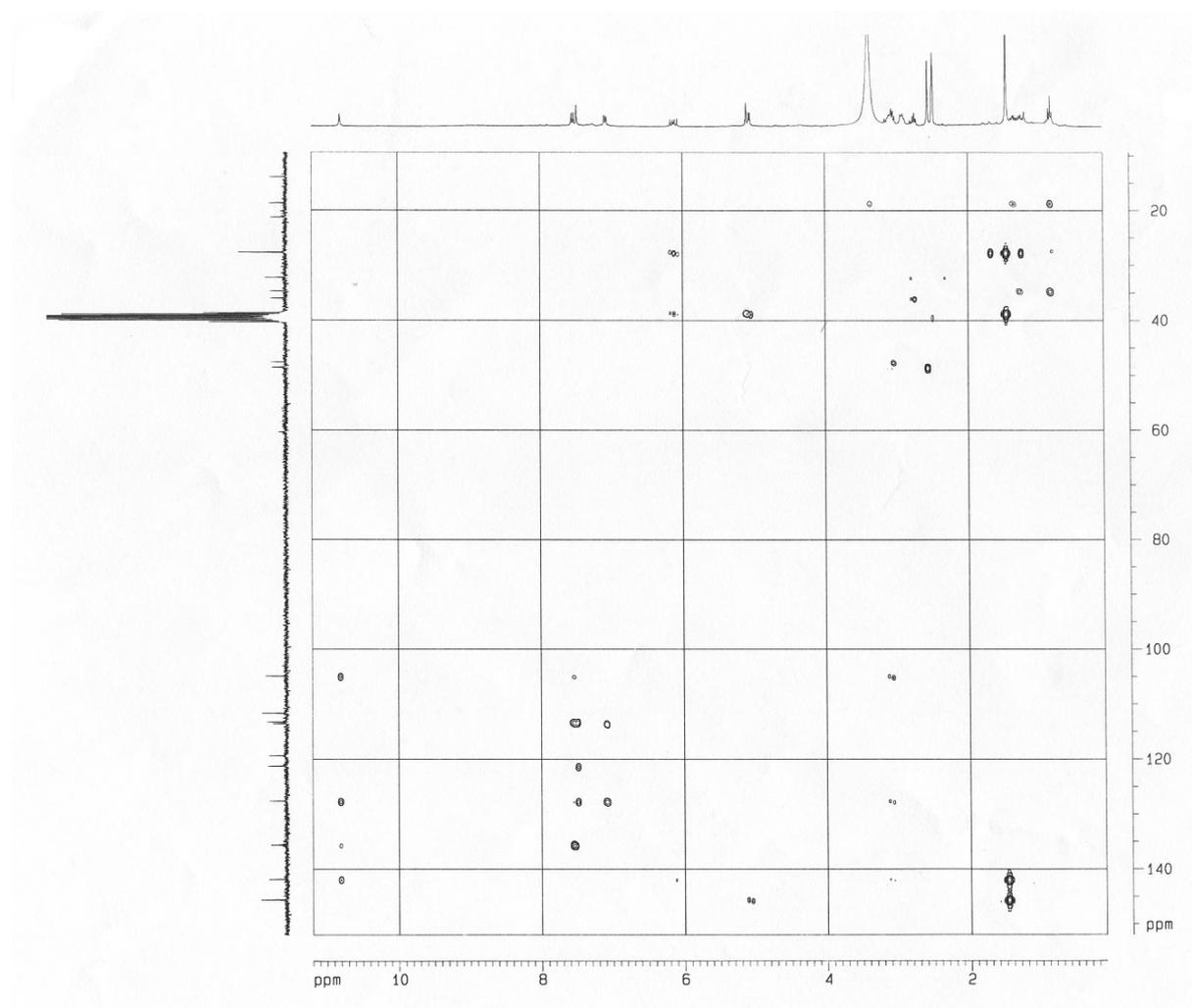


Abb. 64: HMBC-Spektrum 70.4 MHz DMSO-*d*₆: Deformylflustrabromin (**172**).

III Literaturverzeichnis

- [1] W. Steglich, B. Fugmann, S. Lang-Fugmann, *Römpf Lexikon Naturstoffe*, Georg Thieme Verlag Stuttgart **1997**.
- [2] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52-60.
- [3] Y. Z. Shi, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1053-1071.
- [4] [a] H. Kessler, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 857-859; [b] A. Ganesan, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 2989-2992.
- [5] M. H. G. Munro et al., *J. Biotechnol.* **1999**, *70*, 15-25
- [6] G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, D. L. Herald, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 6846-6848.
- [7] K. L. Rinehart, T. G. Holt, N. L. Fregeau, J. G. Stroh, P. A. Keifer, F. Sun, L. H. Li, D. G. Martin, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4512-4515.
- [8] M. McIntosh, L. J. Cruz, M. W. Hunkapiller, W. R. Gray, B. M. Olivera, *Arch. Biochem. and Biophys.* **1982**, *218*, 329-334.
- [9] <http://www.theage.com.au/news/state/2002/01/28/FFXY7QQPXWC.html>
- [10] B. Heppelmann, *Pharm. iuZ* **2002**, *31*, 96-100.
- [11] D. G. Corley, R. Herb, R. E. Moore, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3644-1646.
- [12] E. Quinoa, Y. Kakou, P. Crews, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3642-1364.
- [13] O. Potterat, *Curr. Org. Chem.* **1997**, 415-440.
- [14] K. M. Herrmann, R. Somerville "In: *Amino acids biosynthesis and genetic regulation Addison-Wesley, London*", **1983**, Chaps 18-20.
- [15] T. Higa, T. Ichiba, R. K. Okuda, *Experientia* **1985**, *41*, 1487-1488.
- [16] B. Baker, C. C. Duke, *J. Aus. Chem.* **1973**, *26*, 2153-2157.
- [17] M. Kobayashi, S. Aoki, K. Gato, K. Matsunami, M. Kurosu, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2449-2451.
- [18] H. Shingonga, H. Shigemori, J. Kobayashi, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1603-1605.
- [19] K. Kondo, J. Nishi, M. Ishibahi, J. Kobayashi, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1008-1011.
- [20] S. Aoki, Y. Ye, K. Higuchi, A. Takashima, Y. Tanaka, I. Kitagawa, M. Kobayashi, *Chemical & Pharm. Bull.* **2001**, *49*, 1372-1374.
- [21] G. R. Pettit, R. Tan, D. L. Herald, M. D. Williams, R. L. Cerny, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1593-1595.

- [22] R. W. Schumacher, B. L. Harrigan, B. S. Davidson, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 5133-5135.
- [23] G. Bifulco, I. Bruno, R. Riccio, J. Lavayre, G. Bourdy, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1254-1260.
- [24] H. R. Bokesch, L. K. Pannell, T. C. McKee, M. R. Boyd, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 6305-6308.
- [25] H. H. Sun, S. Sakemi, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4307-4308.
- [26] M. P. Kirkup, R. E. Moore, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 2087-2090.
- [27] M. Chbani, M. Pais, J. M. Delauneux, C. Debitus, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 99-104.
- [28] N. Lindquist, W. Fenical, G. D. van Duyne, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2303-2304.
- [29] S. A. Morris, R. J. Andersen, *Tetrahedron* **1990**, *46*, 715-720.
- [30] A. Cutignano, G. Bifulco, I. Bruno, A. Casapullo, L. Gomez-Paloma, R. Riccio, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 3743-3748.
- [31] A. Casapullo, G. Bifulco, I. Bruno, R. Riccio, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 447-451.
- [32] M. Chbani, M. Pais, J. M. Delauneux, C. Debitus, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 99-104.
- [33] J. B. Baker, C. C. Duke, *J. Aus. Chem.* **1973**, *26*, 2153-2157.
- [34] T. Higa, T. Ichiba, R. K. Okuda, *Experientia* **1985**, *41*, 1487-1488.
- [35] U. Anthoni, K. Bock, L. Chevolot, C. Larsen, P. H. Nielsen, C. Christophersen, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 4709-4712.
- [36] U. Anthoni, K. Bock, L. Chevolot, C. Larsen, P. H. Nielsen, C. Christophersen, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 5638-5639.
- [37] B. J. Baker, *Chem. Biol. Perspect.* **1996**, *10*, 357-407.
- [38] C. Debitus, D. Laurent, M. Pais, *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 799-801.
- [39] K. L. Rinehart, J. H. Kobayashi, G. C. Harbour, R. G. Jr. Hughes, S. A. Mizesak, T. A. Scahill, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1524-1526.
- [40] Y. Kamano, H. Zhang, Y. Ichihara, H. Kizu, K. Komiyama, G. R. Pettit, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2783-2784.
- [41] M. Chbani, M. Pais, J. M. Delauneux, C. Debitus, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 99-104.
- [42] G. Dellar, P. Djura, M. V. Sargent, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, *6*, 1679-80.
- [43] T. Higa, R. Sakai, S. Kohmoto, M. Lui, *Eur. Pat. Appl.* **1988**, 14-16.
- [44] T. Chiba, R. Sakai, S. Kohmoto, G. Saucy, T. Higa, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 3083-3086.
- [45] H. Li, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Comp. Biochem. Physiol., B. Comp. Biochem.* **1994**, *107B*, 261-264.

- [46] J. S. Todd, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 586-589.
- [47] M. J. Ortega, E. Zubia, J. Salv, *J. Nat. Prod.* **1993**, *6*, 633-636.
- [48] K. Kon-ya, N. Shimidzu, K. Adachi, W. Miki, *Fish. Sci.* **1994**, *60*, 773-775.
- [49] N. Lindquist, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2521-2524.
- [50] S. P. Gunasekera, P-J. McCarthy, M. Kelly-Borges, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1437-1441.
- [51] R. Bell, S. Carmeli, N. Sar, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1587-1590.
- [52] H. Sato, M. Tsuda, K. Watanabe, J. Kobayashi, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 8687-8690.
- [53] N. Lindquist, W. Fenical, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 2521-1254.
- [54] L. Rahbaek, U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, B. O. Petersen, *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 887-889.
- [55] R. J. Capon, J. K. Macleod, P. J. Scammells, *Tetrahedron* **1986**, *42*, 6545-6550.
- [56] T. N. Makarieva, A. S. Dmitrenok, P. S. Dmitrenok, B. B. Grebnev, V. A. Stonik, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1559-1561.
- [57] G. R. Pettit, R. Tan, D. L. Herald, M. D. Williams, R. L. Cerny, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 1593-1595.
- [58] N. Lindquist, W. Fenical, G. D. van Duyne, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2303-2304.
- [59] D. W. Phife, R. A. Ramos, M. Feng, I. King, S. P. Gunasekera, A. Wright, M. Patel, J. A. Pachter, S. J. Coval, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 2103-2106.
- [60] J. Kobayashi, Y. Ohizumi, H. Nakamura, Y. Hirata, *Experientia* **1986**, *42*, 1176-1177.
- [61] I. Mancini, G. Guella, P. Amade, C. Roussaki, F. Pietra, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6271-6274.
- [62] J. J. Morale, A. D. Rodriguez, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 122-125.
- [63] H. Nakamura, Y. Ohizumi, J. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *61*, 1225-125.
- [64] R. Rosa, W. Silva, G. Escalona de Motta, A. D. Rodriguez, J. J. Morales, M. Ortiz, *Experientia* **1992**, *48*, 885-887.
- [65] F. Cafieri, E. Fattorusso, A. Mangoni, O. Tagliatalata-Scafati, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3587-3590.
- [66] G. R. Pettit, J. McNulty, D. L. Herald, D. L. Doubek, J. C. Dhapuis, J. M. Schimdt, L. P. Tackett, M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 180-183.
- [67] G. M. Sharma, P. R. Burkholder, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1971**, 151-152.
- [68] K. F. Albizati, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 4163-4164.

- [69] [a] M. D'Ambrosio, A. Guerriero, C. Debitus, O. Ribes, J. Pusset, S. Leroy, F. Pietra, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 1305-1306; [b] M. D'Ambrosio, A. Guerriero, G. Chiasera, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta* **1994**, *77*, 1895-1902; [c] M. D'Ambrosio, A. Guerriero, M. Ripamonti, C. Debitus, J. Waikedre, F. Pietra *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 727-735; [d] T. W. Hong, D. R. Jimenez, T. F. Molinski, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 158-161.
- [70] R. P. Walker, D. J. Faulkner, D. van Engen, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6772-6773.
- [71] A. Vassas, G. Bourdy, J. J. Paillard, J. Lavayre, M. Pais, J. C. Quirion, C. Debitus, *Planta Medica* **1996**, *62*, 28-30.
- [72] J. Kobayashi, M. Tsuda, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *46*, 5579-5586.
- [73] www.kystnett.no/~emil/flustra/index.htm.
- [74] W. Westheide, R. Rieger, *Spezielle Zoologie, Teil 1 : Einzeller und wirbellose Tiere*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, **1996**, S. 743.
- [75] Hunnius, *Pharmazeutisches Wörterbuch*, 7. Aufl., de Gruyter Verlag **1993**.
- [76] B. Witkop, *Heterocycles* **1998**, *49*, 9-27.
- [77] L. C. Wright, *J. Nat. Prod.* **1984**, *47*, 893-895.
- [78] T. Sjöblom, L. Bohlin, C. Christophersen, *Acta Pharm. Suec.* **1983**, *20*, 415-419.
- [79] J. S. Carlé, C. Christophersen, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 3440-3443.
- [80] P. B. Holst, U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 997-1000.
- [81] P. Keil, E. G. Nielsen, U. Anthoni, C. Christophersen, *Acta Pharm. Scand.* **1986**, 555-558.
- [82] P. Wulff, J. S. Carlé, C. Christophersen, *Comp. Biochem. Physiol.* **1982**, *71B*, 523-524.
- [83] C. Christophersen, J. S. Carle, *Naturwissenschaften* **1978**, 440-441.
- [84] P. Bachmann Holst, U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, K. Bock, *Acta Pharm. Scand.* **1994**, *48*, 765-768.
- [85] P. Wulff, J. S. Carlé, C. Christophersen, *Biochem. Physiol.* **1982**, *71B*, 525-526.
- [86] [a] M. Rohmer, M. Knani, P. Simonin, B. Sutter, H. Sahm, *Biochem. J.* **1993**, *295*, 517-524; [b] M. Rohmer, M. Seemann, S. Horbach, S. Bringer-Meyer, H. Sahm, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 2564-2566.
- [87] J. Schwender, M. Seemann, H. K. Lichtenthaler, M. Rohmer, *Biochem. J.* **1996**, *316*, 73-80.
- [88] A. Cartayrade, M. Schwarz, B. Jaun, D. Arigoni, *Abstr. Paper 2nd Symposium of the European Network on Plant Terpenoids*, (Strasbourg/Bischoffen) **1994**, S. 1.

- [89] W. Eisenreich, B. Menhard, P. J. Hylands, M. H. Zenk, A. Bacher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6431-6436.
- [90] H. K. Lichtenthaler, J. Schwender, A. Disch, M. Rohmer, *FEBS Lett.* **1997**, 400, 271-274.
- [91] Verwendete Reviews: [a] K. Bloch, *Steroids* **1992**, 57, 378-383; [b] D. V. Banthorpe, B. V. Charlwood, M. J. O. Francis, *Chem. Rev.* **1972**, 72, 115-155; [c] T. J. Bach, *Lipids* **1995**, 30, 191-202.
- [92] [a] G. Flesch, M. Rohmer, *Eur. J. Biochem.* **1988**, 175, 405-411; [b] M. Rohmer, B. Sutter, H. Sahm, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1989**, 1471-1472; [c] T. Duvold, J. M. Bravo, C. Pale-Grosdemange, M. Rohmer, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 4769-4772; [d] S. R. Putra, L. Charon, K. Danielsen, C. Pale-Grosdemange, L-M. Lois, N. Campos, A. Boronat, M. Rohmer, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 6185-6188.
- [93] [a] S. Sagner, C. Latzel, W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1998**, 221-222; [b] W. Eisenreich, A. Bacher, M. H. Zenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 10600-10605. [c] W. Eisenreich, M. Schwarz, A. Cartayrade, D. Arigoni, M. H. Zenk, A. Bacher, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 221-233.
- [94] T. Kuzuyama, S. Takahashi, S. Watanabe, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 3, 4509-4512.
- [95] E. M. Stocking, J. F. Sanz-Cervera, R. M. Williams, *Angew. Chem.* **1999**, 111, 880-883.
- [96] H. J. Roth, H. Fenner, *Pharmazeutische Chemie III Arzneistoffe*. 2. Aufl. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, **1994**, S.302.
- [97] S. M. Al-Ogily, E. W. Knight-Jones, *Nature* **1977**, 265, 728-729.
- [98] A. Cockcroft A, J. B. Cosgrove, R. J. Wood, *Medical and Veterinary Entomology* **1998**, 12, 289-294.
- [99] G. R. Pettit, Y. Kamano, R. Aoyagi, C. L. Herald, D. L. Doubek, J. M. Schmidt, J. J. Rudloe, *Tetrahedron*, **1985**, 41, 985-994.
- [100] R. R. P. Canell, *Methods in Biotechnology: „Natural Products“*, Humana Press, Totowa New Jersey, **1998**.
- [101] J. S. Carlé, C. Christophersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4012-4013.
- [102] J. S. Carlé, C. Christophersen, *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1586-1589.
- [103] H. Budziewicz, C. Djerassi, D. H. Williams, *Holden-Day Inc. San Francisco Vol 1*, **1964**.
- [104] M. V. Laycock, J. L. C. Wright, J. A. Findlay, A. D. Patil, *Can. J. Chem.* **1986**, 64, 1312-1316.
- [105] T. Lindel, J. Junker, M. Köck, *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 573-577.
- [106] P. Wulff, J. S. Carlé, C. Christophersen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1981**, 2895-2898.

- [107] C. R. Booth, J. H. Morrow, *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 254-257.
- [108] [a] W. Harm, *Biological Effects of Ultraviolet Radiation*, Cambridge University Press, **1980**.
[a] R. C. Worrest, *Review of the literature concerning the impact of UV-B radiation upon marine organisms. In the Role of Solar Ultraviolet Radiation in Marine Ecosystems*, (Edit by J. Calkins), Plenum Press, New York, **1982**, S. 429-457; [b] G. Renger, M. Voss, P. Grabe, S. Shulze, *Effect of UV irradiance on different partial reactions of the primary process of Photosynthesis. In Stratospheric Ozone Reduction, Solar Ultraviolet Radiation and Plant Life*, Edited by R.C. Worrest and M. M. Caldwell, Springer Berlin **1986**, S. 171-184; [c] D. J. Kyle, *The biochemical basis for photoinhibition of photosystem II. In Photoinhibition*, Elsevier, Amsterdam, **1987**, S. 197-226.
- [109] J. M. Shick, M. P. Lesser, W. C. Dunlap, W. R. Stochaj, B. E. Chalker, J. Wu Won, *Mar Biol* **1995**, *122*, 41-51.
- [110] J. M. Shick, M. P. Lesser, P. L. Jokiel. *Global Change Biol* **1996**, *2*, 527-545.
- [111] W. C. Dunlap, J. M. Shick, Y. Yamamoto, *Redox Report* **1999**, *4*, 301-306.
- [112] W. C. Dunlap, J. M. Shick, *J. Phycol* **1998**, *34*, 418-430.
- [113] S. V. Jovanovic, S. Steenken, M. G. Simic, *J. Phys. Chem.* **1990**, *94*, 3583-3588.
- [114] G. Michal, *Biochemical Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, **1998**.
- [115] S. V. Jovanovic, S. Steenken, S. Tosic, M. B. Marjanovic, M. G. Simic, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4846-4851.
- [116] R. S. Thompson, D. Jacques, E. Haslam, R. J. N. Tanner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1* **1972**, 1387-1399.
- [117] L. C. Olsson, M. Veit, G. Weissenböck, J. F. Bormann, *Phytochemistry*, **1998**, 1021-1028.
- [118] J. Kobayashi, T. Murayama, M. Ishibashi, S. Kosuge, M. Takamatsu, Y. Ohizum, H. Kobayashi, T. Ohta, S. Nozoe, T. Sasaki, *Tetrahedron*, **1990**, *46*, 7699-7702.
- [119] A. Badre, A. Boulanger, E. Abou-Mansour, B. Banagis, G. Combaut, C. J. Francisco, *J. Nat. Prod.* **1994**, *29*, 528-533.
- [120] J. Kobayashi, G. C. Harbour, J. Gilmore, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1526-1528.
- [121] M. A. Raschid, K. R. Gustafson, M. R. Boyd, *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1454-1456.
- [122] K. L. Reinhart Jr., J. Kobayashi, G. C. Harbour, J. Gilmore, M. Mascal, T. G. Holt, L. S. Shield, F. Lafargue, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3378.
- [123] K. L. Reinhart, J. Kobayashi, G. C. Harbour, G. Hughes Jr., S. A. Mizsak, T. A. Scahill, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1524-1526.

- [124] J. Kobayashi, J. Cheng, T. Ohta, S. Nozoe, Y. Ohizumi, T. Sasaki, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 3666-3670.
- [125] G. Bifulco, I. Bruno, R. Riccio, J. Lavayre, G. Bourdy, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 1254-1260.
- [126] G. Bifulco, I. Bruno, L. Minale, R. Riccio, A. Calignano, C. Debitus, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1294-1299.
- [127] M. L. Bourguet-Kondracki, M. T. Martin, M. Guyot, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3457-3460.
- [128] J. H. Cardellina, M. P. Kirkup, R. E. Moore, J. S. Mynderse, K. Seff, C. J. Simmons, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 4915-4916.
- [129] J. Kobayashi, M. Tsuda, N. Kawasaki, T. Sasaki, Y. Mikami, *J. Nat. Prod.* **1994**, 1737-1740.
- [130] M. Kobayashi, Y. Chen, S. Aoki, Y. In, T. Ishid, I. Kitagawa, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 3727-3736.
- [131] M. Kobayashi, M. Sato, T. Murayama, M. Ishibashi, M. R. Walchi, M. Kanai, J. Shoji, Y. Ohizumi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 1050-1052.
- [132] J. Kobayashi, F. Itagaki, H. Shigemori, M. Ishibashi, K. Takahashi, M. Ogura, S. Nagasawa, T. Nakamura, H. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7812-7813.
- [133] S. P. Gunasekera, S. A. Pomponi, P. J. McCarthy, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 79-83.
- [134] N. Fusetani, T. Sugawara, S. Matsunaga, H. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7811-7812.
- [135] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, K. Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1997**.
- [136] J. Kobayashi, Y. Ohizumi, H. Nakamura, J. Gilmore, G. C. Harbour, K. L., Jr. Rinehart, Y. Hirata, *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1986**, 28th, 121-128.
- [137] M. A. Raschid, K. R. Gustafson, M. R. Boyd, *J. of Natural Products* **2001**, *64*, 1454-1456.
- [138] O. Murata, H. Shigemori, M. Ishibashi, K. Sugama, K. Hayashi, J. Kobayashi, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3539-3542.
- [139] S. A. Adesanya, M. Chabani, M. C. Pais, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 525-527.
- [140] J. Kobayashi, J. F. Cheng, M. Ishibashi, H. Nakamura, Y. Ohizumi, Y. Hirata, T. Ohta, S. Nozoe, T. Sasaki. *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1989**, 31st, 348-355.
- [141] G. Bifulco, I. Bruno, L. Minale, R. Riccio, A. Calignano, C. Debitus, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1294-1299.
- [142] S. Matsunaga, *Kagaku to Seibutsu* **1994**, *32*, 517-525.
- [143] M. Sato, F. Itagaki, H. Shigemori, M. Ishibashi, J. Kobayashi, T. Murayama, J. Shoji, Y. Ohizumi, *Tennen Yuki Kagobutsu Toronkai Koen Yoshishu* **1991**, 33rd, 651-658.

- [144] www.spektrum-verlag.com/katalog/ISBN/82/40500beinett.htm, **1998**.
- [145] H. Sies, „*Oxidative stress: oxidative stress: introductory remarks*“, H. Sies, ed., London Academic Press, **1985**, Chapter 1.
- [146] J. Chandra, A. Samali, S. Orrenius, *Free rad. Biol. and med.* **2000**, *29*, 323-333.
- [147] M. B. Hampton, S. Orrenius, *FEBS Lett.* **1997**, *414*, 552-556.
- [148] A. Macho, T. Hirsch, J. Marzo, P. Marchetti, B. Dallporta, S. A. Susin, N. Zamzami, G. Kroemer, *J. Immunol.* **1997**, *158*, 4612-4619.
- [149] T. M. Buttke, P. A. Sandstrom, *Immunol. Today* **1994**, *15*, 7-10.
- [150] V. S. Slyshenkov, K. Piwocka, E. Sikora, L. Wojtczak, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1303-1310.
- [151] T. Idziorek, J. Estaquier, F. De Bels, J.-C. Ameisen, *J. Immunol. Methods* **1995**, *185*, 249-58.
- [152] A. Betten, C. Dahlgren, S. Hermodsson, K. Hellstrand *J. of Leukocyte Biol.* **2001**, *70*, 65-72.
- [153] Photo: Sven Zea/ Bahamas
- [154] A. E. Wright, S. A. Chiles, S. S. Cross, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 1684-1686.
- [155] P. Adrade, R. Willoughby, S. A. Pomponi, R. G. Kerr, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4775-4778.
- [156] F. Cafieri, E. Fattorusso, A. Mangoni, O. Taglialatela-Scafati, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13713-13720.
- [157] I. Kitagawa, M. Kobayashi, I. Kitanaka, M. Kido, Y. Kyogoku, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321-2328.
- [158] J. C. Braekman, D. Daloze, C. Stoller, R. W. M. van Soest, *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 417-431.
- [159] M. Assmann, E. Lichte, R. W. M. van Soest, M. Koeck, *Org. Lett.* **1999**, *1*, 455-457.
- [160] A. D. Rodriguez, I. C. Pina, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 907-914.
- [161] G. Michal: *Biosynthetic Pathways*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, **1999**.
- [162] E. Glawischnig, A. Gierl, A. Tomas, A. Bacher, W. Eisenreich, *Olant Physiol.* **2001**, *125*, 1178-1186.
- [163] A. Adreinne, T. Rinehart, K. L. Rinehart, Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6763-6765.
- [164] H. M. McMammon, *In Cluture of Marine Inverterbrate Animals*, W. L. Smith, M H. Chanley, Eds.; Plenum Press: New York, **1975**, S. 15.
- [165] M. J. Garson, *J. Nat. Prod. Rep.* **1989**, 143-170.

- [166] M. Sato, K. Shimbo, M. Tsuda, J. Kobayahi, *Tetrah. Lett.* **2000**, *41*, 503-506
- [167] S. Urban, S. J. H. Hickford, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, *Curr Org. Chem.* **2000**, *4*, 765-807.
- [168] V. S. Jovanovic, M. G. Simic, *J. Free Rad. Biol. Med.* **1985**, *1*, 125-129.
- [169] P. Adrade, R. Willoughby, S. A. Pomponi, R. G. Kerr, *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4775-4778.
- [170] I. Kitagawa, M. Kobayashi, I. Kitanaka, M. Kido, Y. Kyogoku, *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321-2328.
- [171] J. C. Braekman, D. Daloze, C. Stoller, R. W. M. van Soest, *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 417-431.
- [172] D. D Perrin, W. L .F. Armargo, *Purification of Laboratory Chemicals*, 3. Aufl., Pergamon Oxford, **1988**.