

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus marinen
Mikroorganismen nach biologischen und chemischen
Gesichtspunkten**

Tanja Mülhaupt
aus
Waldshut

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Th. Lindel betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 21.11.2003

Dissertation eingereicht am 21. November 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Th. Lindel
2. Gutachter: Prof. Dr. F. Bracher

Mündliche Prüfung am 18. Dezember 2003

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2000 bis September 2003 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Lindel am Pharmazeutisch-Chemischen Institut der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg und am Department Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Dank

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 Prof. Dr. F. Bracher danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. William Fenical für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Unterstützung in vielen Fragen der Naturstoffchemie sowie die Möglichkeit zur Durchführung zahlreicher Bioassays. Weiterhin danke ich ihm für die Überlassung des Extraktes CNH 741. Für das im Rahmen dieses Aufenthalts in den USA gewährte Kurzzeitstipendium für Doktoranden möchte ich mich herzlich beim DAAD bedanken.

Dem Alfred-Wegener-Institut in Bremerhaven danke ich für die Beschaffung der Organismen von Schelf und Küsten der Polarmeere sowie der Nordsee, und der BASF für die Unterstützung und Durchführung von Pflanzenschutzassays.

Dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines BMBF-Projektes (03F0254A).

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises, Delphine Jacquot, Alexander Schmid, Laura Bräuchle, Gregor Breckle, Petra Böhler und Manuel Friedel für die sehr freundschaftliche und hilfsbereite Atmosphäre. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner ehemaligen Kollegin Nicola Lysek für ihre zahlreichen Telefonate nach San Diego und viele wertvolle Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt der analytischen Abteilung für die Aufnahme zahlreicher Spektren: Frau Claudia Dubler für die NMR-Spektren, Herrn Dr. Werner Spahl und Herrn Dr. Gerd Fischer für die Aufnahme von Massenspektren sowie Herrn Ivo Brück für die Aufnahme von UV- und IR-Spektren.

Mein besonderer Dank gilt Laura Bräuchle für die kritische und vor allem sehr zügige Durchsicht des Manuskripts. Dieser Dank gilt auch meinem AK-Kollegen Gregor Breckle und meiner Schwester Angela Karasaç.

Meinen Eltern möchte ich besonders für die jederzeit gewährte Unterstützung und Hilfsbereitschaft danken, durch die der Abschluß eines Hochschulstudiums und die Durchführung der Promotion erst möglich wurden.

Meinen Eltern

I	ZUSAMMENFASSUNG	5
II	EINLEITUNG	9
III	ALLGEMEINER TEIL	12
1	NATURSTOFFE AUS MARINEN WIRBELLOSEN	12
1.1	Bryostatine	12
1.2	Ecteinascidin 743	14
1.3	Aplidin	15
1.4	Variolin B	16
2	NATURSTOFFE AUS MARINEN MIKROORGANISMEN	17
2.1	Maitotoxin	17
2.2	Salinosporamid A	18
3	BIOSYNTHESEWEGE	20
3.1	Polyketid-Biosynthese	20
3.2	Biosynthese von Isoprenoiden	22
3.2.1	Acetat-Mevalonat-Weg	23
3.2.2	Desoxyxylulose-Phosphat-Weg	23
3.3	Biosynthese aromatischer Aminosäuren	25
4	ZIELSETZUNG	28
IV	SPEZIELLER TEIL	30
5	AUSWAHL EINES MARINEN SEDIMENTBAKTERIUMS	30
5.1	Isolierung.....	31
6	ISOLIERUNG BIOLOGISCH AKTIVER SEKUNDÄRMETABOLITEN	32
6.1	Reinigung	32
6.2	Strukturaufklärung.....	32
6.3	Bestimmung der Konfiguration	43

6.4	Strukturaufklärung	46
6.5	Zusammenfassung	54
6.6	Struktur und biologische Aktivität von Polyether-Antibiotika	55
6.6.1	Biosynthese der Polyether-Antibiotika am Beispiel von Monensin	56
6.6.2	Wirkprinzip der Polyether-Antibiotika	58
7	ISOLIERUNG VON ISOPRENOIDEN SEKUNDÄRMETABOLITEN	59
7.1	Reinigung	59
7.2	DC- und HPLC-Analytik	59
7.2.1	Strukturaufklärung von Curcutetraol	59
7.2.2	Konfiguration von Curcutetraol und Problemstellung	66
7.2.2.1	Ableitung der absoluten Konfiguration durch Drehwertvergleich.....	68
7.2.2.2	Ableitung der absoluten Konfiguration durch CD-Berechnung	69
7.2.2.3	Bestimmung der Enantiomerenreinheit.....	72
7.2.2.3.1	Ermittlung der Enantiomerenreinheit von Curcutetraol durch NMR- spektroskopische Untersuchung mit Hilfe des Shift-Reagenzes Pr(hfc) ₃ (54)	72
7.2.2.3.2	Analyse durch HPLC an chiralen Phasen	75
7.3	Reinigung von Curcutetraol über Kieselgel	77
7.3.1	Strukturaufklärung der unbekanntten Verbindung.....	77
7.4	Strukturaufklärung von Curcutriolamid	81
7.4.1	Konfiguration von Curcutriolamid und Problemstellung.....	86
7.4.2	Modellreaktion zur Bestimmung der absoluten Konfiguration stereogener CH- Gruppen in α -Position zu einer Carbonsäure.....	87
7.4.2.1	Auswertung der Modellreaktion.....	91
7.4.2.2	Reaktion in kleinem Maßstab.....	92
7.4.2.3	Konfiguration von Curcutriolamid.....	92
7.4.3	Bisabolan-Sesquiterpene aus marinen Organismen	92
7.4.4	Strukturverwandte Bisabolane aus weiteren Quellen.....	94
7.4.5	Stickstoffhaltige Sesquiterpene mit Bisabolan-Grundgerüst	95
7.4.6	Einordnung der Ergebnisse	96
8	SEKUNDÄRMETABOLITEN AUS DEM AMINOSÄURESTOFFWECHSEL	98
8.1	Isolierung	98
8.2	Strukturaufklärung	98
8.2.1	Bestimmung der absoluten Konfiguration von 37 nach Marfey	103
8.2.2	Einkristallstrukturanalyse.....	106
8.3	β-Aminosäuren	106
8.4	Reinigung	109
8.4.1	Strukturaufklärung	109
8.4.2	Zusammensetzung der Teilfragmente	113
8.4.3	Weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen	116

9	STUDIE ZUM VORKOMMEN VON BIOLOGISCH AKTIVEN SEKUNDÄRSTOFFEN IN MEERESORGANISMEN AUS GEMÄßIGTEN GEWÄSSERN	121
9.1	Einleitung und Aufgabenstellung	122
9.2	Beschreibung der Organismen.....	123
9.3	Herkunft der Organismen	123
9.4	Bearbeitung der Organismen.....	123
9.5	Screeningprogramme.....	124
9.5.1	Pflanzenschutz-Screening Tests der BASF.....	125
9.5.2	Fraßabschreckung.....	125
9.5.3	Elektrophysiologischer Assay	125
9.5.4	Antimikrobieller Assay	126
9.5.4.1	Prinzip des antimikrobiellen Assays	126
9.6	Das Mengenproblem	127
9.7	Chemisches Screening.....	128
9.8	Ergebnisse	128
9.9	Schlußfolgerung.....	130
V	EXPERIMENTELLER TEIL	131
10	GERÄTE, MATERIALIEN UND ALLGEMEINE ARBEITSMETHODEN	131
10.1	Analytik.....	131
10.2	Antimikrobieller Assay	134
10.2.1	<i>Staphylokokkus aureus</i>	134
10.2.2	<i>Candida albicans</i>	135
10.3	Das marine Sedimentbakterium CNH 741	137
10.3.1	Isolierung.....	137
11	BIOLOGISCH AKTIVE SEKUNDÄRMETABOLITEN	138
11.1	Septamycin (42)	138
11.2	3- <i>O</i> -Methylseptamycin (43)	139
12	ISOPRENOIDE SEKUNDÄRMETABOLITEN	141
12.1	Curcutetraol (40)	141
12.2	Curcutriolamid (41)	142
12.2.1	Acetylierung von 41	142

12.3	7-<i>O</i>-Methylcurcutetraol (55)	143
12.4	Modellreaktion	144
12.4.1	(<i>S/R</i>)-Diastereomer (59)	144
12.4.2	(<i>R/R</i>)-Diastereomer (60).....	145
12.4.3	Einkristallstruktur-Analyse von 60	146
13	SEKUNDÄRMETABOLITEN AUS DEM AMINOSÄURESTOFFWECHSEL	149
13.1	Phenamid (37)	149
13.1.1	Derivatisierung nach Marfey	150
13.1.2	Einkristallstruktur-Analyse von 37	150
13.2	cyclo-(Pro-Val) (38)	153
13.3	cyclo-(Pro-Tyr) (39)	153
VI	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	155
VII	LITERATURVERZEICHNIS	157

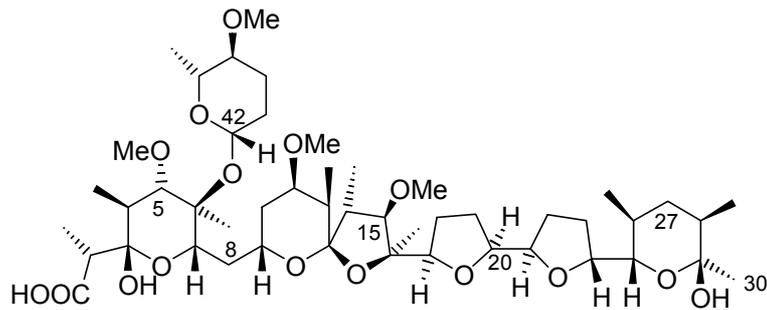
I Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich an der Basis der Naturstoffchemie mit der Isolierung und Strukturaufklärung verschiedener Sekundärmetaboliten aus Meeresorganismen nach wirkungs- und strukturorientierten Gesichtspunkten. Der Schwerpunkt liegt auf der Erforschung des im Rahmen dieser Dissertation identifizierten Sedimentbakteriums CNH 741, welches sich durch ausgeprägte biologische Aktivität und chemische Reichhaltigkeit seines Extrakts auszeichnet. Weiterhin wurde erforscht, inwieweit sich das Potential mariner Naturstoffe aus bisher kaum untersuchten sesshaften oder sich nur langsam fortbewegenden Makroorganismen der Nordsee, Spitzbergens und des europäischen Nordmeeres im Hinblick auf ihre Einsetzbarkeit im Pflanzenschutz oder in der Pharmaforschung nutzen lässt.

Im einzelnen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

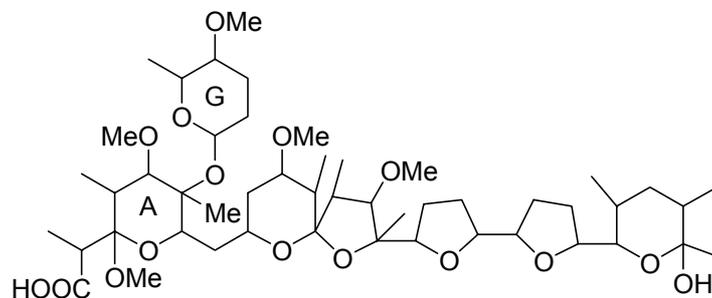
Die Verfolgung der biologischen Aktivität erfolgte anhand eines Vollzellassay-Screeningprogramms gegen die Erreger *Staphylokokkus aureus*, *Candida albicans* und die Krebszelllinie HCT-116. Die Isolierung erfolgte säulenchromatographisch sowie mittels mehrfacher Umkehrphasen-HPLC. Die Strukturaufklärung nutzte das volle Repertoire zweidimensionaler NMR-Experimente und massenspektrometrischer Methoden.

- Die Aufreinigung des Ethylacetat-Extrakts einer 20 L-Fermentation von CNH 741 durch mehrfache RP-HPLC führte zur Konzentration der antibiotischen Aktivität in einer Fraktion, deren chemische Analyse das Vorliegen des ursprünglich aus *Streptomyces hygroscopicus* isolierten Ionophor-Antibiotikums Septamycin (**42**) ergab.



42: Septamycin

Als weitere, eng verwandte Verbindung konnte ein neues Derivat von Septamycin (**42**) isoliert werden, dessen hochaufgelöstes Massenspektrum eine zusätzliche Methylengruppe nachwies, deren Position sich aus den HMBC-Experimenten ergab. Die größten Unterschiede zu Septamycin im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum werden für die Protonen der Tetrahydrofuranringe beobachtet. Die Stereochemie des gegenwärtigen Strukturvorschlags **43** konnte aufgrund der geringen isolierten Mengen nicht aufgeklärt werden, sollte aber zumindest für die Ringe A und G mit der von Septamycin übereinstimmen.



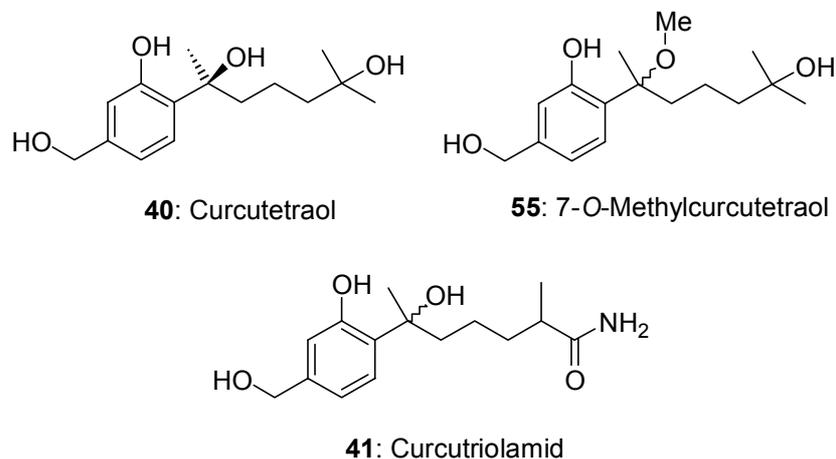
43: 3-O-Methylseptamycin

Eine besondere Schwierigkeit bei der Isolierung beider Ionophor-Antibiotika bestand in der Kombination hoher antibiotischer Aktivität und sehr geringer isolierter Mengen (0.2 mg Septamycin, 0.1 mg 3-O-Methylseptamycin). Abwesenheit von Signalen aromatischer oder olefinischer Protonen im NMR-Spektrum schloß die Identifizierung der Naturstoffe auf Ebene von Extrakten oder Vorfraktionen aus.

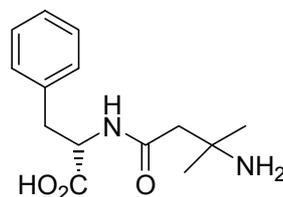
- Analyse der Kultur des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 nach rein chemischen Gesichtspunkten zeigte dieses als Produzent sesquiterpenoide Naturstoffe vom Bisabolan-Typ. Der isolierte, neue marine Naturstoff Curcutetraol (**40**)

ist das erste Tetraol und damit der polarste Vertreter aus dieser Gruppe. Die absolute Stereochemie des quartären, benzylicen C-Atoms C-7 konnte auf Basis quantenchemischer CD-Berechnungen als 7*S* identifiziert werden. Es gelang, durch Vermeidung von Chromatographie an Normalphasen die Racemisierung des Naturstoffs zu verhindern, deren Leichtigkeit durch die Bildung von racemischem 7-*O*-Methylcurcutetraol bei Kontakt mit Methanol an Kieselgel deutlich wird.

Die ebenso unbekannt Verbindung Curcutriolamid (**41**) ist eines der wenigen stickstoffhaltigen Bisabolan-Sesquiterpenoide aus marinen Quellen. Die Entdeckung beider Naturstoffe ist interessant, da in geringerem Maße hydroxylierte Analoga aus marinen Quellen vorher nur aus Meeresschwämmen und Hornkorallen isoliert worden waren.



- Neben verschiedenen Diketopiperazinen wurde aus dem Bakterium CNH 741 auch der fungizide Naturstoff Phenamid (**37**) isoliert, dessen absolute Stereochemie erstmalig nach Marfey's Methode zweifelsfrei als *S* festgelegt werden konnte.



37: Phenamid

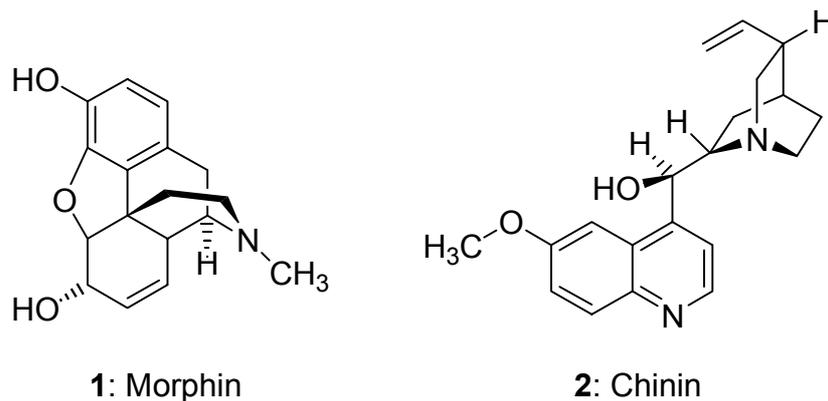
- Eine wichtige Plattform bei der Suche nach neuen Wirkstoffen bildet die Auswahl origineller Naturstoffquellen. Infolgedessen konzentrierte sich eine Untersuchung auf

ca. 60 verschiedene Makroorganismen der Nordsee, Spitzbergens und des europäischen Nordmeeres. Eine Überprüfung der Extrakte und Verteilungsfractionen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität zeigte auffällige Verteilungsfractionen. Z.B. fielen *Artica islandica* (B), *Cardium edule* (T, B) und *Buccinum undatum* (W) durch ihre Aktivität im Pflanzenschutz gegen *Plasmopara viticola* auf. Die *n*-Butanol-Fraktion von *Liocarcinus holsatus* (Crustacea) zeigte Aktivität gegen *Botrytis cinerea*, dem Erreger des Grauschimmels an Paprika. Von den getesteten Organismen zeigte sich *Hormathia nodosa* (Cnidaria) als fraßhemmend im Amphipodentest. In einem elektrophysiologischen Assay erwies sich die butanolische Fraktion der Seescheide *Ciona intestinalis* als auffällig. In den antimikrobiellen Vollzell-Assays zeigte sich jedoch keiner der untersuchten Organismen als aktiv.

II Einleitung

Naturstoffe zeichnen sich durch ihre große strukturelle Vielfalt und eine breitgefächerte biologische Wirkung aus. In Europa begann die systematische Nutzung von Naturstoffen vor etwa 2500 Jahren. Um das Jahr 800 n. Chr. wendeten Benediktinermönche Schlafmohn (*Papaver somniferum*) nicht nur zur Behandlung von Schmerzen, sondern auch als Anästhetikum an. Mit der Nutzung der Chinarinde (*Cortex chinae*) wurde ein wirksames Mittel zur Behandlung von Malaria entdeckt. Seit Beginn des 19. Jahrhunderts gelang es, aus den medizinisch verwendeten Drogen die pharmakologisch aktiven Inhaltsstoffe zu isolieren. Bereits 1806 isolierte Sertürner Morphin (**1**) aus dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns (benannt nach Morpheus; griech. Gott des Schlafes). Es ist das erste Alkaloid, das isoliert werden konnte. Morphin (**1**) wurde ab 1826 von Merck in Darmstadt als Analgetikum eingesetzt, allerdings erfolgte die Strukturaufklärung durch Robinson und Schöpf erst 120 Jahre nach der Isolierung der Substanz.

Als pharmakologisch wirksamer Bestandteil der Chinarinde konnte das Alkaloid Chinin (**2**) isoliert und identifiziert werden. Chinin (**2**) blieb lange Zeit der einzige Wirkstoff, der zur Behandlung von Malaria eingesetzt werden konnte. Heute spielt **2** auch eine wichtige Rolle zur Herstellung von Katalysatoren für die enantioselektive Katalyse.



Bis zum Beginn des letzten Jahrhunderts erfolgte die Entdeckung neuer biologisch aktiver Naturstoffe eher zufällig, und die Strukturaufklärung komplizierter Naturstoffe stellte oft eine Lebensaufgabe dar. Die Weiterentwicklung auf dem Gebiet der Naturstoffchemie in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts ist gekennzeichnet durch

den zunehmenden Einsatz leistungsfähiger physikalischer Methoden zur Trennung und Strukturaufklärung sowie durch enge Zusammenarbeit mit biologisch orientierten Fachgebieten. In Anbetracht des enormen Fortschritts im Bereich der Chemie schien es möglich, auf die ursprünglichen Quellen der Naturstoffe zu verzichten und die Wirkstoffe synthetisch zu erzeugen. Die z.B. mit der kombinatorischen Chemie als Methode der pharmazeutischen Forschung verbundenen Hoffnungen wurden jedoch bisher kaum erfüllt.¹ Erste durchschlagende Erfolge der kombinatorischen Biosynthese bleiben abzuwarten. Trotz einiger Anstrengungen, Arzneistoffe unabhängig von einem natürlichen Vorbild zu entwerfen, übernehmen Naturstoffe bis heute eine dominierende Rolle in der Entdeckung und Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Behandlung verschiedenster Krankheiten. Über 60 % der Medikamente, die in der Zeit von 1981-2002 am Markt erhältlich waren oder sich in der klinischen Phase befanden, waren natürlichen Ursprungs oder sind von Naturstoffen abgeleitet worden (Abb. 1).²

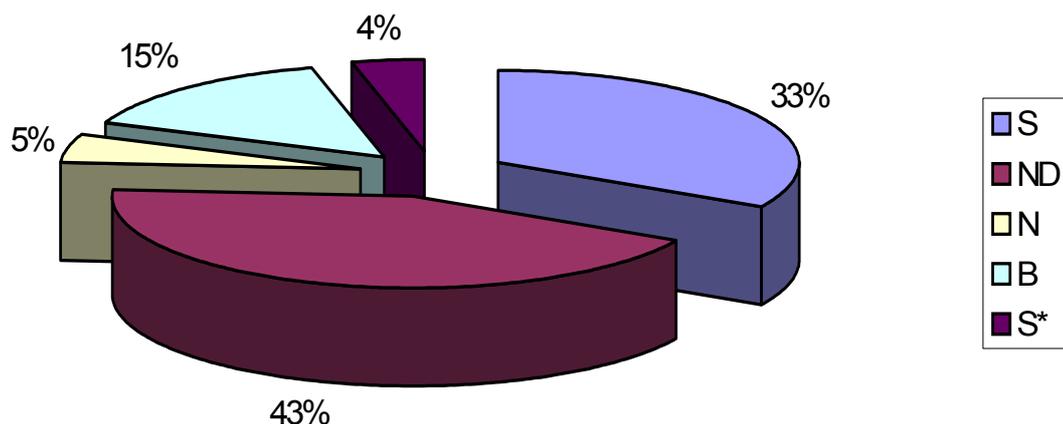
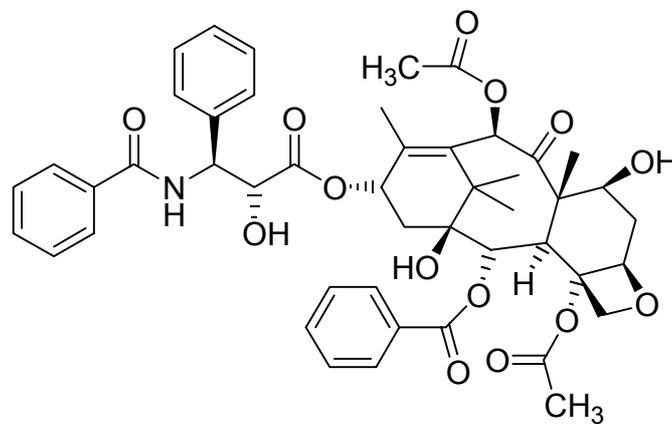


Abbildung 1: Einteilung der Wirkstoffe 1981-2002 nach Ursprung

Obwohl lediglich 5 % der Wirkstoffe als reine Naturstoffe zur Behandlung verschiedener Krankheiten eingesetzt werden (N), wie z.B. das Antibiotikum Bleomycin, dienen Naturstoffe in zahlreichen Fällen als Leitstruktur. So entsprechen 43% der entwickelten Arzneimittel einem Naturstoffderivat (ND). Besonders im Bereich der Antibiotika wurden Wirkstoffe auf der Basis eines Naturstoffs entwickelt, wie die antibakteriellen Wirkstoffe Azithromycin und Roxithromycin, deren Entwicklung ausgehend von Erythromycin erfolgte. Nur etwa 4% der Arzneistoffe entstanden durch Synthese eines Arzneistoffs, nachdem die Aufklärung biologischer Vorgänge gelang (S*). Hier seien virustatische Nukleosidanaloga wie Zidovudin und Aciclovir erwähnt.

Bei den Bioligomeren (B) handelt es sich meist um Proteine, wie die bei Viruserkrankungen eingesetzten Interferone. Die reinen synthetischen Produkte, deren Aktivität zufällig in einem biologischen Test entdeckt wurde (S), nehmen schließlich 33 % der zur Zeit verwendeten Arzneistoffe ein.

Besonders die Fülle an neuen Strukturprinzipien, die immer wieder in der belebten Welt gefunden werden, rechtfertigt eine verstärkte Suche nach neuen Wirkstoffen in allen Bereichen der Natur. Als Beispiel für eine erfolgreiche Suche sei Taxol (**3**) genannt. Taxol (**3**) besitzt eine außergewöhnliche Struktur, und es kann bezweifelt werden, daß diese Verbindung jemals zufällig in einem Labor für kombinatorische Chemie oder Biosynthese entdeckt worden wäre.



3: Taxol

Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen richtet sich das Augenmerk immer stärker auf die Ozeane und ihre Organismen. Die Erforschung des marinen Lebensraums als Quelle interessanter Naturstoffe erreichte ihren ersten Höhepunkt in den 70er Jahren.³ Obwohl bisher über 10.000 Substanzen aus marinen Organismen isoliert werden konnten, läßt die weitgehend unerforschte Vielfalt an niederen Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen hoffen, neuartige biologisch aktive Substanzen zu finden, die als Leitstrukturen zur Herstellung neuer Medikamente dienen können.⁴

Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über marine Naturstoffe gegeben werden, mit besonderer Beachtung ihrer pharmakologischen Eigenschaften.

III Allgemeiner Teil

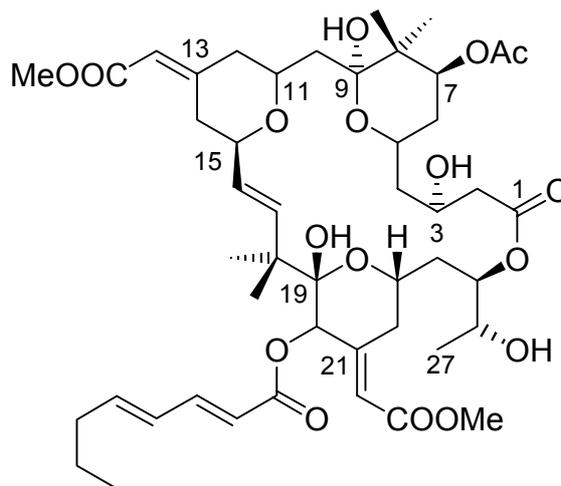
1 Naturstoffe aus marinen Wirbellosen

Die am intensivsten untersuchten Gruppen mariner Organismen sind Schwämme, gefolgt von Manteltierchen und Korallen.

1.1 Bryostatine

Im Jahre 1968 entdeckten Pettit et al. die antineoplastische Wirkung der Extrakte des marinen Moostierchens *Bugula neritina*.⁵ Jedoch erst 14 Jahre später gelang es dieser Arbeitsgruppe, das Polyketid Bryostatin 1 (**4**) als erstes Mitglied einer sehr aktiven Klasse von Antitumorsubstanzen zu isolieren und in seiner Struktur aufzuklären.⁶ Bis heute sind 20 Bryostatine aus den marinen Wirbellosen *B. neritina* und *Amathia convulata* bekannt. Die Bryostatine sind Proteinkinase C-Inhibitoren, immunstimulierend, blutbildend und hemmen das Wachstum von Tumorzellen bei Leukämie, Eierstock- und Brustkrebs. Aufgrund dieses bemerkenswerten Potentials befindet sich **4** in den Phasen I und II der klinischen Studien. Da Bryostatin I (**4**) in Kombination mit Vincristin Aktivität gegen einige Krebszelllinien zeigt, wird in einigen Studien die Wirkung von **4** auch in Kombination mit anderen Krebs-Therapeutika untersucht.⁷

Bei allen Bryostatinen handelt es sich um 20-gliedrige Macrolactone mit drei Pyranringen. An C-8 und C-18 befinden sich jeweils geminale Dimethylgruppen. Die Hauptunterschiede werden an den Substituenten an C-7 und C-20 beobachtet. Die Hydroxygruppe an C-7 von **4** ist bei Bryostatin 3 acetyliert und die Seitenkette an C - 20 fehlt bei den Bryostatinen 10, 11, 13, 16, 17 und 18.



4: Bryostatin 1

Erste Untersuchungen zur Biosynthese der Bryostatine begannen 1996. Acetat, S-Adenosylmethionin (SAM) und Glycerin konnten als Hauptbausteine von **4** bestimmt werden.⁸ Die geminalen Dimethylgruppen stammen aus SAM-Methylierungen von eingebauten Acetateinheiten. Da die Polyketid-Biosynthese typisch ist für Mikroorganismen, wurde lange vermutet, daß die isolierten Bryostatine von Symbionten des Moostierchens gebildet werden. Derzeit werden von der Arbeitsgruppe Haygood vor allem die Larven von *Bugula neritina* auf vorhandene Symbionten untersucht. Es stellte sich heraus, daß als Bryostatin-Produzent das unkultivierbare γ -Proteobakterium „*Candidatus Endobugula sertula*“ in Frage kommt.⁹ Das Problem der Mengenbeschaffung für eine breite therapeutische Anwendung von Bryostatin 1 (**4**) ist schon lange bekannt. Taucher des National Cancer Instituts benötigten 2 Jahre, um 13 Tonnen *B. neritina* vor der südkalifornischen Küste zu sammeln. Die Ausbeute an **4** betrug nach Extraktion und Isolierung 18 Gramm.¹⁰ Da allein zur Behandlung von verschiedenen Leukämieformen eine jährliche Menge von 50-100 Gramm nötig wäre, untersuchte Mendola die Kultivierbarkeit von *B. neritina*. Es gelang die Kultivierung der Larven von *B. neritina* in 5000 L Seewassertanks, jedoch war die Ausbeute an **4** wesentlich geringer als bei natürlich gewachsenen Moostierchen. Die Umstellung auf eine Kultivierung im Meer brachte den gewünschten Erfolg, und die so gezüchteten Wirbellosen produzierten annähernd soviel **4** wie die unter natürlichen Bedingungen gewachsenen. Dies wäre eine Möglichkeit, ausreichende Mengen an **4** zu liefern, um Bryostatin 1 (**4**) als Krebsmedikament in

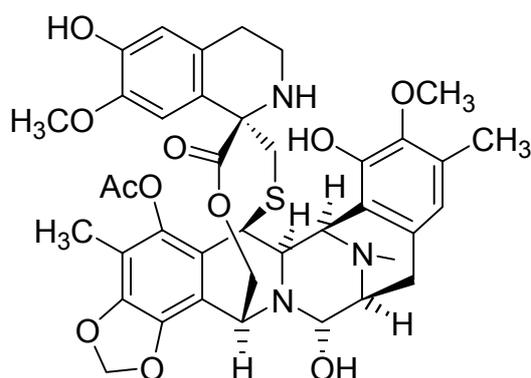
den Handel zu bringen.¹¹ Für Bryostatin 2 und 3 konnten bereits Totalsynthesen formuliert werden,^{12,13,14} während für Bryostatin 1 (**4**) dieser Erfolg noch aussteht.

1.2 Ecteinascidin 743

DNA-interaktive Substanzen spielen eine große Rolle unter den Krebstherapeutika. Zu dieser Gruppe gehört auch der marine Naturstoff Ecteinascidin 743 (YondelisTM, **5**), isoliert aus dem Manteltierchen *Ecteinascidia turbinata*. Obwohl schon seit 1969 der zytotoxische Effekt des Extraktes von *E. turbinata* bekannt war, war es aufgrund der geringen Menge an aktiver Komponente erst 11 Jahre später möglich, die für die Aktivität verantwortliche Komponente zu isolieren und aufzuklären.¹⁵

ET 743 (**5**) hat Phase I der klinischen Studien abgeschlossen und befindet sich nun in Phase II. Die guten *in vitro* Ergebnisse von **5** wie die Aktivität gegen Brust-, Melanom-, Lungen-, und Eierstockkrebszelllinien zeigten sich auch bei den *in vivo* Studien. Bis jetzt sind versprechende Ergebnisse aus Phase II der klinischen Studien gegen Eierstock- und Brustkrebs bekannt, und über 1600 Patienten wurden bereits mit ET 743 (**5**) behandelt.¹⁶

ET 743 (**5**) hemmt die Zellteilung in Phase G₂/M und verhindert die Transkription einiger Gene.¹⁷ Außerdem verbessert **5** die Aktivität anderer Zytostatika.¹⁸ Die Interaktion mit dem DNA-Reparaturprotein TC-NER ist das Kernstück des Wirkmechanismus von **5**.



5: Ecteinascidin 743

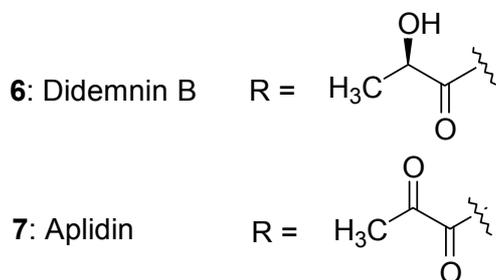
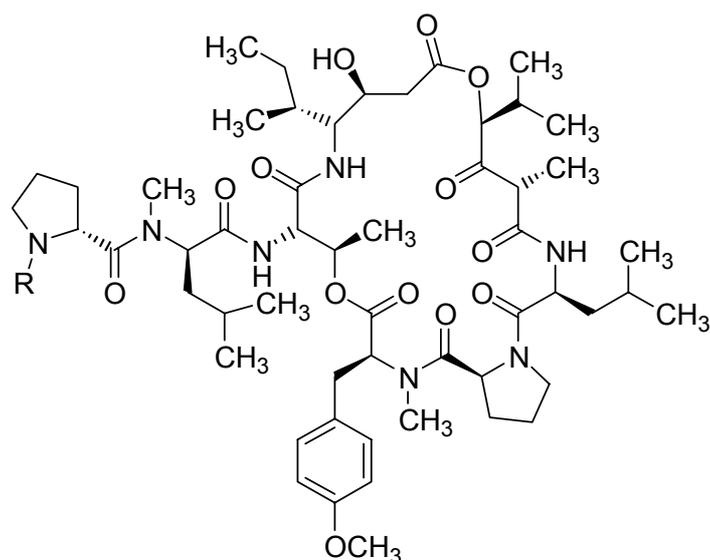
Ecteinascidin 743 (**5**) ist ein Tris-tetrahydroisochinolin-Alkaloid. Die erste erfolgreiche Totalsynthese gelang 1996 Corey et al.¹⁹ Da aufgrund des langen Syntheseweges

dieser Zugang nicht erlaubt, genug Substanz von **5** zu produzieren, entwickelten Mitarbeiter der Firma PharmaMar einen halbsynthetischen Prozeß, ausgehend vom Antibiotikum Safracin B. Safracin B kann aus der Fermentationskultur von *Pseudomonas fluorescens* isoliert werden.²⁰ Um 1 g ET 743 (**5**) durch Extraktion aus *E. turbinata* zu erhalten, müßte eine halbe Tonne Organismus gezüchtet werden. Biosynthesestudien werden gerade von der Arbeitsgruppe Rinehart, die den Naturstoff **5** auch isoliert und aufgeklärt hat, durchgeführt.²¹

1.3 Aplidin

Die Didemnine, isoliert aus dem karibischen Manteltierchen *Trididemnum solidum*, zeigen signifikante immunsuppressive, antivirale und Antitumor-Eigenschaften. Als besonders aktiv erwies sich Didemnin B (**6**). Es hemmt die DNA-Viren *Herpes simplex* Typ I und II *in vitro* in einer Konzentration von 0.05 µM. Außerdem zeigt es Aktivität gegen Erreger des Rift-Valley-Fiebers, Gelbfiebers und Sandfliegenfiebers.²² Aufgrund dieser Ergebnisse gelangte Didemnin B (**6**) in Phase I und II der klinischen Prüfung. Ernsthafte neurotoxische und kardiotoxische Effekte bewirkten allerdings einen Abbruch der klinischen Prüfungen.^{23,24}

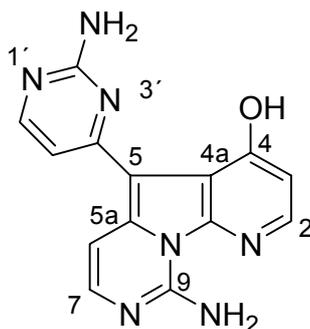
Bei Aplidin (Dihydrodidemnin B, **7**), isoliert von Rinehart et al. aus dem mediterranen Tunikaten *Aplidium albicans*, handelt es sich um einen Abkömmling der Didemnine. Aplidin (**7**) besitzt bessere Antitumoreigenschaften als **6** sowie eine verringerte Toxizität bei fehlender Kardiotoxizität. 1998 wurde Aplidin (**7**) von PharmaMar in Phase I klinischer Studien eingeführt. Über 200 Patienten wurden seither mit **7** behandelt. Mittlerweile befindet es sich in Phase II der klinischen Studien. Die biologische Aktivität der Didemnine beruht auf der Hemmung der Protein-Biosynthese und dem damit verbundenen Stillstand des Zellwachstums. Ursache dafür ist die Blockade des GTP-bindenden Rezeptors EF-1 α .^{3,25,26}



Bei Didemnin B (**6**) und Aplidin (**7**) handelt es sich jeweils um cyclische Depsipeptide. **6** und **7** unterscheiden sich lediglich um 2 Wasserstoffatome in einer Seitenkette. Während **6** einen D-Lactylrest enthält, befindet sich bei **7** in dieser Position ein Pyruvylrest. Es überrascht, wie schon durch eine kleine Modifikation der Seitenkette die Zytotoxizität beträchtlich gesteigert und die Nebenwirkungen gesenkt werden.

1.4 Variolin B

Über die Sekundärmetaboliten aus wirbellosen Tieren der Antarktis und kalter Gewässer ist verhältnismäßig wenig bekannt. Im Jahre 1992 beobachteten McClintock et al. die Aktivität des Extraktes des antarktischen Schwammes *Kirkpatrickia variolosa* gegen verschiedene gramnegative Bakterien. Zwei Jahre später gelang die Isolierung und Aufklärung mehrerer Verbindungen, die Varioline genannt wurden. Die aktivste Substanz dieser Gruppe, Variolin B (**8**), besitzt einen IC₅₀ von 210 ng/ml gegen die P388 Zelllinie, sowie Aktivität gegen andere Krebszelllinien und auch den *Herpes simplex* Typ I Virus.²⁷



8: Variolin B

Variolin B (**8**) ist ein Pyrido-Pyrrolopyrimidin Alkaloid. Die komplette Strukturaufklärung konnte infolge der Vielzahl an quartären Kohlenstoffen und in Konsequenz daraus wenigen NMR-Korrelationen nicht allein durch NMR-spektroskopische Experimente gelöst werden. Glücklicherweise gelang die Kristallisation von **8**, und anschließende röntgenspektroskopische Untersuchung führte zu einer erfolgreichen Strukturaufklärung.

Verschiedene Derivate von **8** zeigen verbesserte Aktivität und wurden 2002 patentiert. Die Beschreibung zweier Totalsynthesen wird die Versorgung mit Variolin B für klinische Studien sichern.^{28,29}

2 Naturstoffe aus marinen Mikroorganismen

Durch die Isolierung einiger therapeutisch interessanter Naturstoffe aus marinen Makroorganismen wie Ecteinsascidin 743 (**5**) oder Bryostatin 1 (**4**) wurde das Problem der Beschaffung ausreichender Mengen sehr deutlich. Außerdem kommt seit einigen Jahren immer wieder die Frage auf, ob eine isolierte Substanz wirklich vom Makroorganismus oder von assoziierten bzw. symbiontischen Mikroorganismen produziert wird. Aus diesen Gründen hat sich die Aufmerksamkeit der Naturstoffforscher vermehrt auf Mikroorganismen konzentriert. Es soll auf einige Beispiele von Naturstoffen aus marinen Mikroorganismen eingegangen werden.

2.1 Maitotoxin

Maitotoxin ist das stärkste bisher bekannte nicht proteinogene Gift. Die LD₅₀ bei einer intraperitonealen Injektion beträgt 50 ng pro Kilogramm Maus.³⁰ Maitotoxin (**9**) gehört

zu den Ciguatera-Toxinen. Der Begriff Ciguatera beschreibt Vergiftungen nach dem Verzehr von normalerweise ungiftigen tropischen und subtropischen Fischen. Yasumoto et. al identifizierten den Dinoflagellaten *Gambierdiscus toxicus*, einzellige Mikroalgen, als Auslöser der Fischvergiftung.³¹ Die Dinoflagellaten werden von den Fischen aufgenommen und lösen so eine Vergiftung hervor. Der **9** produzierende Dinoflagellat *G. toxicus* wurde aus dem Doktorfisch *Ctenochaetus striatus* isoliert, und so erhielt Maitotoxin (**9**) seinen Namen nach dem Tahitianischen Wort „Maito“ für diesen Fisch.

Die Vergiftungserscheinungen werden durch die Aktivierung der Phospholipasen A2 und C durch **9** ausgelöst. Der dadurch stimulierte Ionenkanal läßt selektiv im Verhältnis 50:1 mehr Ca^{2+} -als Na^{+} -Ionen passieren.³² **9** weist außerdem eine sehr hohe Cytotoxizität, Ichthyotoxizität und hämolytische Aktivität auf.

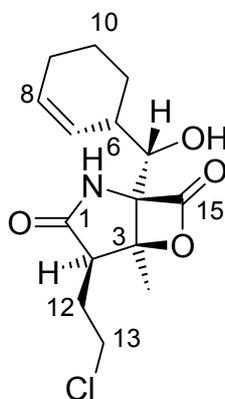
Maitotoxin (**9**) besitzt ein Molekulargewicht von 3422 Da mit der Summenformel $\text{C}_{164}\text{H}_{256}\text{O}_{68}\text{S}_2\text{Na}_2$. Es tritt als Dinatriumsalz auf. Bei **9** handelt es sich um einen Polyether, der mit 32 Etherringen, 28 Hydroxylgruppen und zwei Sulfateestern der größte bekannte Sekundärmetabolit ist. Um für die Strukturaufklärung ausreichende Mengen an **9** zu erhalten, wurden aus insgesamt 4000 L Fermentationslösung des Dinoflagellaten *G. toxicus* 25 mg **9** isoliert. Aufgrund der Komplexität des Moleküls, beziehungsweise der vielfachen Überlappung der ^1H - und ^{13}C -NMR-Singale, besonders in den 2D-NMR-Spektren, machte eine Aufklärung des Gesamtmoleküls nicht von Beginn an möglich. Erst mit Hilfe neuerer Methoden der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie konnten nach Behandlung von **9** mit NaIO und NaBH_4 drei Fragmente erhalten werden, deren Konformation und schließlich relative Konstitution anhand erschöpfender NMR und MS/MS-Analysen aufgeklärt werden konnte.³³

2.2 Salinosporamid A

Die Arbeitsgruppe von Fenical kultivierte und charakterisierte mit Hilfe der Sequenzierung von 16S rRNA eine neue Gruppe von obligat marinen Actinomyceten.³⁴ Insgesamt konnten 2500 Bakterienproben an fünf verschiedenen tropischen und subtropischen Lokalitäten bis zu Tiefen von 1100 m gesammelt werden, und es gelang, die Stämme auf marinem Nährmedium zu kultivieren. Diese

wurden einer neuen Gruppe, genannt „Salinospora“, zugeordnet. Der Salinospora -Stamm besitzt eine zuvor nicht beschriebene 16S rRNA Sequenz. Ein Screeningprogramm zeigte zahlreiche antibiotische und cytotoxische Aktivitäten der organischen Extrakte, die vermuten ließen, daß die neue „Salinospora“ Gruppe eine Quelle für biologisch aktive Substanzen sein könnte.

Bioassay-geleitete Isolierung des Stammes CNB-392 aus der „Salinospora“-Gruppe führte zur Isolierung und Identifizierung von Salinosporamid A (**10**). **10** zeigt eine starke *in vitro* Zytotoxizität gegen HCT-116 (human colon carcinoma) mit einem IC_{50} von 11 ng/ml. Außerdem hemmt es Lungenkrebs-, Brustkrebs- und Melanom-Zelllinien.



10: Salinosporamid A

10 besitzt ebenso eine bicyclische γ -Lactam- β -lacton-Struktur, wie das zuvor aus einem terrestrischen Streptomycceten isolierte Omuralid.³⁵ Allerdings ist die Funktionalisierung durch die Chlorethyl- und die Cyclohexenylcarbinol-Gruppe einzigartig.

Während die Konstitution von **10** zügig mit Hilfe der 2D-NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie bestimmt werden konnte, stellte die Aufklärung der Konfiguration des stereogenen Zentrums, substituiert durch einen sekundären Alkohol, eine besondere Herausforderung dar. Aufgrund der sterischen Hinderung des sekundären Alkohols konnte die Konfiguration von Salinosporamid A (**10**) nicht durch chemische Derivatisierung ermittelt werden. Die Bestimmung der absoluten Konfiguration gelang erst durch Einkristallstrukturanalysen von **10**.³⁶

3 Biosynthesewege

Im folgenden soll auf einige ausgewählte Biosynthesewege näher eingegangen werden.

3.1 Polyketid-Biosynthese

Polyketide sind Naturstoffe, die eine große strukturelle Vielfalt aufweisen. Eine Vielzahl von Organismen wie Pflanzen, Pilze oder Bakterien sind in der Lage, Polyketide zu bilden, wobei diese als aliphatische, cyclische, acyclische und aromatische Verbindungen vorliegen können und die unterschiedlichsten biologischen Funktionen erfüllen. Die Polyketide weisen eine therapeutische Vielseitigkeit auf, wobei das Spektrum von Antibiotika (z.B. Erythromycin), Lipidsenkern (Lovastatin), Immunsuppressiva (Rapamycin) bis zu Fungiziden (Amphotericin B) reicht. Aufgrund ihrer biologischen Aktivität wurden die meisten Polyketide in Screeningprogrammen entdeckt. Ihre wahre Funktion in den produzierenden Organismen ist meist unbekannt. Trotz der vielfältigen Strukturunterschiede der Polyketide besitzen sie einen gemeinsamen biosynthetischen Ursprung. Der Begriff „Polyketide“ wurde 1907 von Collie aus der Hypothese abgeleitet, daß in der Natur Substanzen durch Vervielfachung des Ketens ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$) entstehen können.³⁷ Diese Theorie wurde von Robinson weiterentwickelt, aber erst der von Birch und Donovan formulierte Biosyntheseweg führte zu einer breiten Akzeptanz.³⁸ Demnach verläuft der Biosyntheseweg der Polyketide und der Fettsäuren nach einem ähnlichen Schema ab. Als Startermoleküle fungieren in der Regel Acetyl-CoA und Malonyl-CoA. Es können aber auch Propionat (C_3 -Einheit) oder Butyrat (C_4 -Einheit) bzw. Methyl- oder Ethylmalonat zur Kettenverlängerung bzw. Kettenverzweigung eingesetzt werden.³⁹ Im Unterschied zur Fettsäurebiosynthese bleiben bei der Polyketidbiosynthese in β -Stellung meist Sauerstofffunktionen erhalten, während bei der Fettsäurebiosynthese die β -ständige Carbonylfunktion in drei Schritten zur CH_2 -Gruppe reduziert wird. Dies ist verantwortlich für die Ausbildung von Keto- oder Hydroxygruppen, Doppelbindungen oder Methylengruppen und die variable Gestaltung der Stereochemie entstehender Chiralitätszentren.^{40,41} Die Biosynthese der Polyketidketten erfolgt an Multienzymkomplexen. Man unterteilt diese sogenannten Polyketidsynthasen (PKS) in zwei Typen: Typ-1-PKS katalysieren die Biosynthese von

Polyethern und Makroliden, während Typ-2-PKS die Synthese von polyzyklischen aromatischen Verbindungen wie z.B. Anthracycline oder Tetracycline katalysieren. Der Typ-1-PKS besteht aus großen, modular aufgebauten Multienzymkomplexen (Abb. 2).

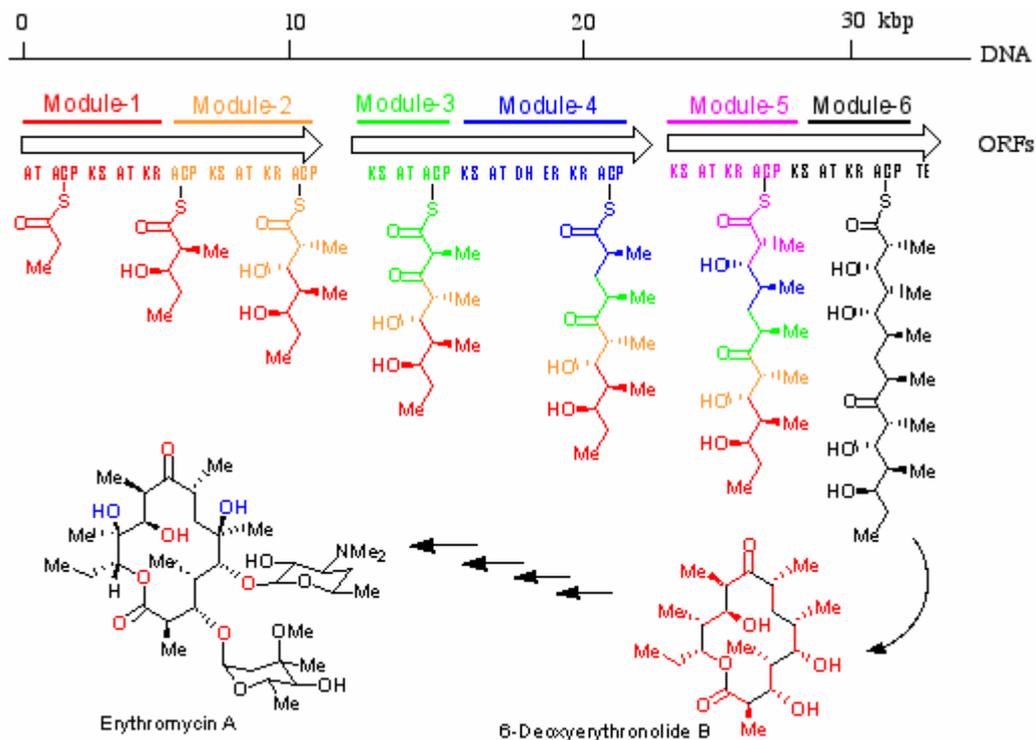


Abbildung 2: Typ-1-PKS zur Biosynthese von Erythromycin A.

Die für den Aufbau des Grundgerüsts zuständigen Gene sind heute größtenteils charakterisiert. Man bezeichnet diesen Teil der Gene als „minimale PKS“. Sie enthält eine β -Keto-Synthase (KS), eine damit gekoppelte Acyltransferase (AT), die die Startereinheit zur Ketosynthese transportiert, einen Kettenlängenfaktor, der die Kettenlänge bestimmt und ein Acylcarrierprotein (ACP), an das die Polyketidkette gebunden ist. Unter die post-PKS-Gene fallen Ketoreduktasen (KR), die eine Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe reduzieren. Die Aromatasen (ARO) und Cyclasen (CYC) sind verantwortlich für spezifische Ringbildungen, die größtenteils dem Reaktionstyp einer intramolekularen Aldolkondensation gleichen.⁴²

Typ-2-PKS hingegen bestehen lediglich aus einem einzelnen Satz monofunktionaler oder sogar bifunktionaler Enzyme. Zunächst wird die gesamte Polyketidkette durch aufeinanderfolgende Claisen Kondensation aufgebaut, bis die gewünschte Kettenlänge erreicht ist. Durch die starke CH-Acidität der entstandenen Methylengruppen wird so

nach geeigneter Faltung des Vorläufers eine intramolekulare Aldolkondensation ermöglicht, die schließlich zu den stabilen aromatischen Sechsringen führt. Daneben gibt es aber auch Ringschlüsse, bei denen man vermutet, daß sie unkatalysiert zum thermodynamisch stabilen Produkt führen. Nachdem das Grundgerüst aufgebaut worden ist, folgen die post PKS Modifikationen, wie z.B. Oxidationen, Reduktionen, Alkylierungen und Glykosylierungen.

3.2 Biosynthese von Isoprenoiden

Seit dem Altertum werden aus Pflanzen, wie z.B. Pfefferminz, Thymian oder Eukalyptus mehr oder weniger flüchtige, sehr intensiv riechende Öle gewonnen. Ursprünglich wurden die zerkleinerten Pflanzenteile direkt destilliert, später trennte man die „ätherischen Öle“ durch Wasserdampfdestillation ab. Diese ätherischen Öle werden schon seit langem als Zusatz zu Kosmetika, sowie in der Lebensmittelindustrie oder der Pharmazie eingesetzt. Der überwiegende Anteil der ätherischen Öle gehört zu den Terpenen, und bis heute sind über 22.000 Terpene, überwiegend pflanzlicher Herkunft, bekannt.

Bereits im Jahre 1922 erkannte Ruzicka, daß man sich die meisten Terpene aus zwei oder mehr Isoprenmolekülen aufgebaut vorstellen kann, wobei die Isoprenreste meistens in Kopf-an-Schwanz-Stellung miteinander verknüpft sind (Abb. 3).

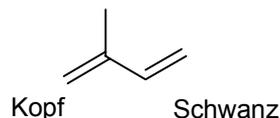


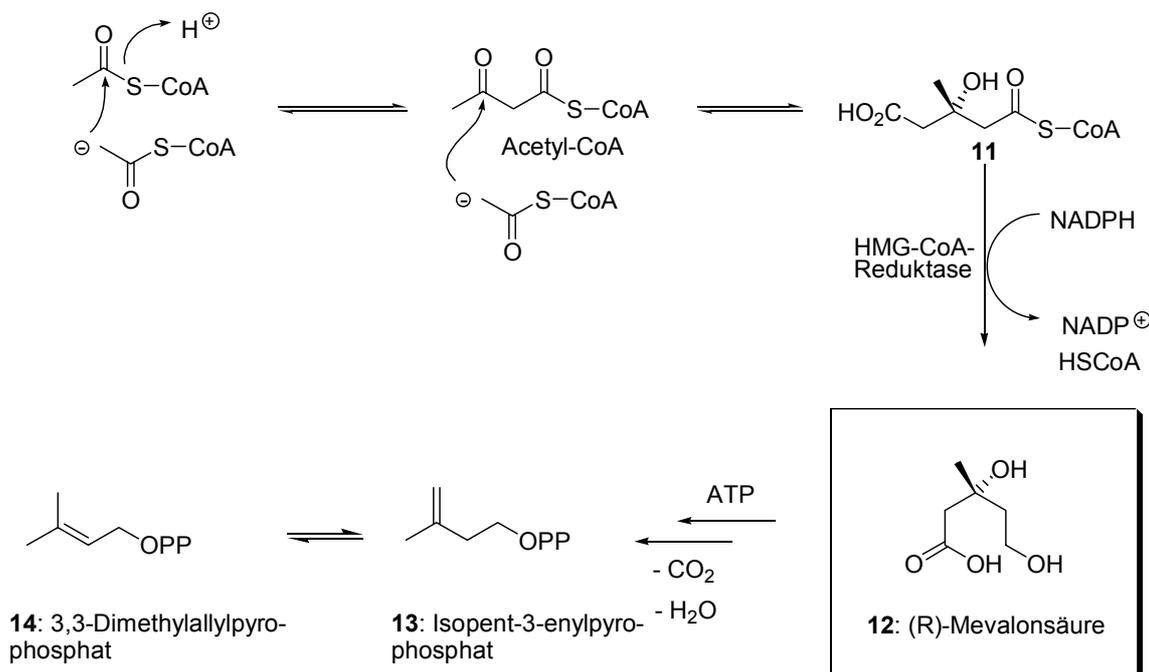
Abbildung 3: Isopren

1953 konnte er dann seine biogenetische Isopren-Regel formulieren, nach der sich die natürlichen isoprenoiden Verbindungen von acyclischen Vorstufen wie Geraniol (C_{10}), Farnesol (C_{15}), Geraniolgeraniol (C_{20}) und Squalen (C_{30}) ableiten lassen.⁴³

Je nach Anzahl der Isoprenreste (C_5 -Einheiten) lassen sich die Terpene in Mono-, Sesqui-, Di-, Sester-, Tri-, Tetra- und Polyterpene unterteilen.⁴⁴

3.2.1 Acetat-Mevalonat-Weg

Ausgangspunkt der Biosynthese sind zwei Moleküle Acetyl-CoA, die in einer Claisen-Reaktion zu Acetoacetyl-CoA reagieren. Durch eine stereospezifische Aldol-Reaktion wird ein dritter Baustein Acetyl-CoA übertragen. Es entsteht β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA, **11**), dessen Reduktion zur Mevalonsäure (**12**) durch die HMG-CoA-Reduktase der geschwindigkeitsbestimmende Schritt darstellt. Durch Decarboxylierung und Eliminierung von Wasser entsteht aus der Mevalonsäure Isopent-3-enylpyrophosphat („aktives Isopren“, **13**), das durch eine Isomerase in das stabilere 3,3-Dimethylallylpyrophosphat (**14**) umgelagert wird (Schema 1).^{45,46}

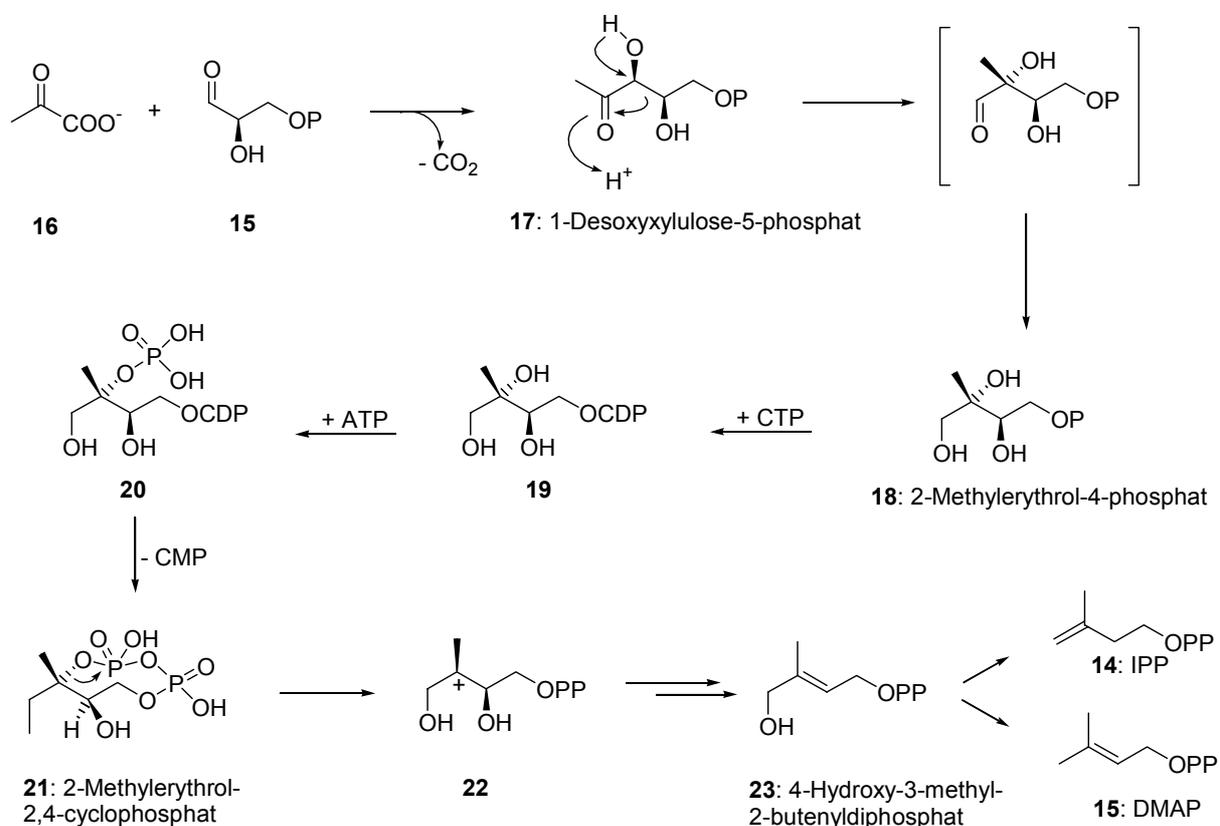


Schema 1: Acetat-Mevalonat-Biosyntheseweg.

3.2.2 Desoxyxylulose-Phosphat-Weg

In jüngster Zeit gibt es immer mehr Beweise, daß der Mevalonat-abhängige Weg in der Terpenbiosynthese seltener durchlaufen wird als der kürzlich entdeckte Mevalonat-unabhängige Weg. Erste Hinweise lieferten Verfütterungsexperimente an dem Bakterium *Zymomonas mobilis*, das ausschließlich Hexosen als Kohlenstoffquelle benutzt.⁴⁷ Neuere Untersuchungen postulieren die Kondensation von Glycerinaldehyd-3-phosphat (**15**) und Brenztraubensäure (**16**) zu 1-Desoxyxylulose-5-phosphat (**17**). Umlagerung führt zu 2-Methylerythrol-4-phosphat (**18**), dessen Reaktion mit Cytidintriphosphat (CTP) und erneute Phosphorylierung

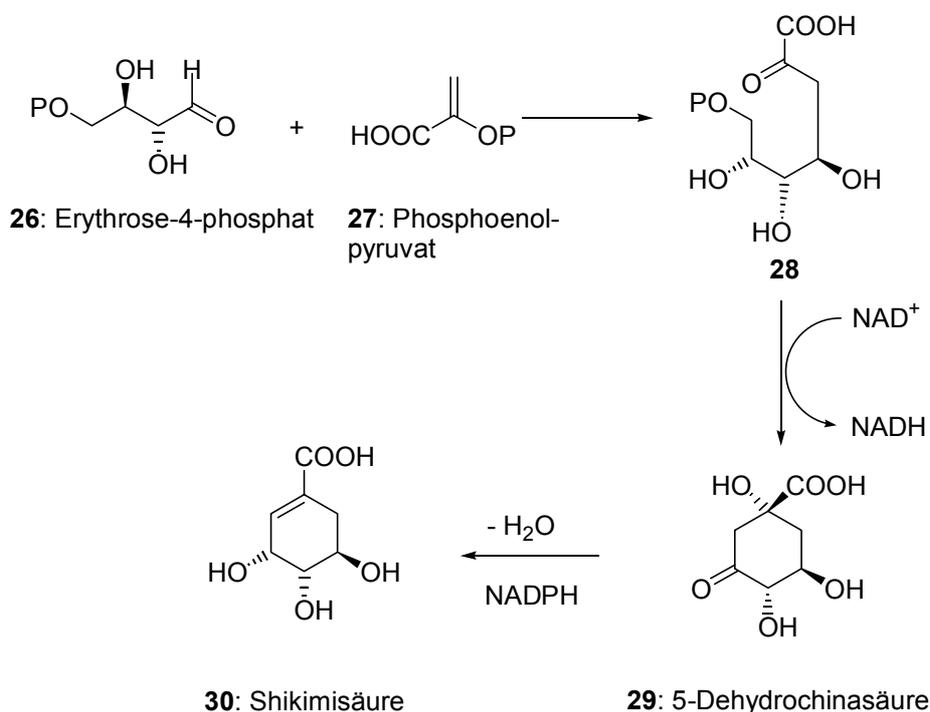
schließlich zu einem cyclischen Phosphat, dem 2-Methylethyl-2,4-cyclophosphat (**21**) führt.^{48,49} Vor kurzer Zeit konnten von der Arbeitsgruppe Rohmer Anhaltspunkte zum Verlauf der Reaktion von **21** zu **23** gewonnen werden.⁵⁰ Dabei öffnet sich das Cyclophosphat **21** zunächst zum Kation **22**, um dann durch ein Enzym in mehreren Schritten zu **23** reduziert zu werden (Schema 2). Gao et al. konnten durch Verfütterung von Deuterium- bzw. Tritium-markiertem 4-Hydroxy-3-methyl-2-butenyldiphosphat (**23**) an *Narcissus pseudonarcissus* und *Capsicum annuum* dessen Rolle als Zwischenstufe auf dem Weg zu Isopentenylpyrophosphat (**14**) und Dimethylallylpyrophosphat (**15**) zeigen.⁵¹ Dabei wird **15** wahrscheinlich nicht durch Isomerisierung von **14** gebildet, sondern unabhängig davon.



Schema 2: Desoxyxylulose-Phosphat-Weg.

3.3 Biosynthese aromatischer Aminosäuren

Eine Verbindung von unerwarteter Wichtigkeit wurde 1885 aus der Frucht *Illicium refigosum* isoliert. Dieser wurde der Name Shikimisäure gegeben, abgeleitet von dem japanischen Namen „Shikimi-no-ki“ für diese Pflanze. Spätere Untersuchungen ergaben, daß die Shikimisäure unter anderem ein Schlüsselintermediat in der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin (**24**), L-Tyrosin (**25**) und L-Tryptophan in Pflanzen und Mikroorganismen darstellt.^{52,53}

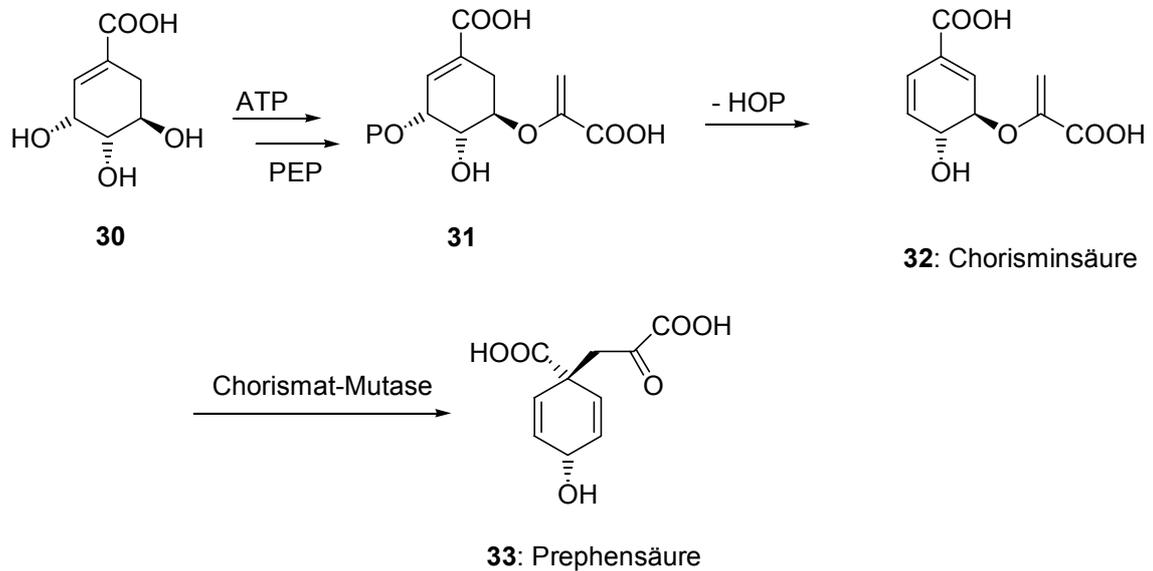


Schema 3: Biosynthese der Shikimisäure.

Der Biosyntheseweg beginnt mit der aldolartigen Verknüpfung von D-Erythrose-4-phosphat (**26**) mit Phosphoenolpyruvat (**27**). Die Cyclisierung des entstandenen 3-Desoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphats (**28**) führt zu 5-Dehydrochinasäure (**29**). Nach Abspaltung von Wasser und anschließender NADPH-abhängiger Reduktion wird die Shikimisäure (**30**) gebildet (Schema 3).^{52,53}

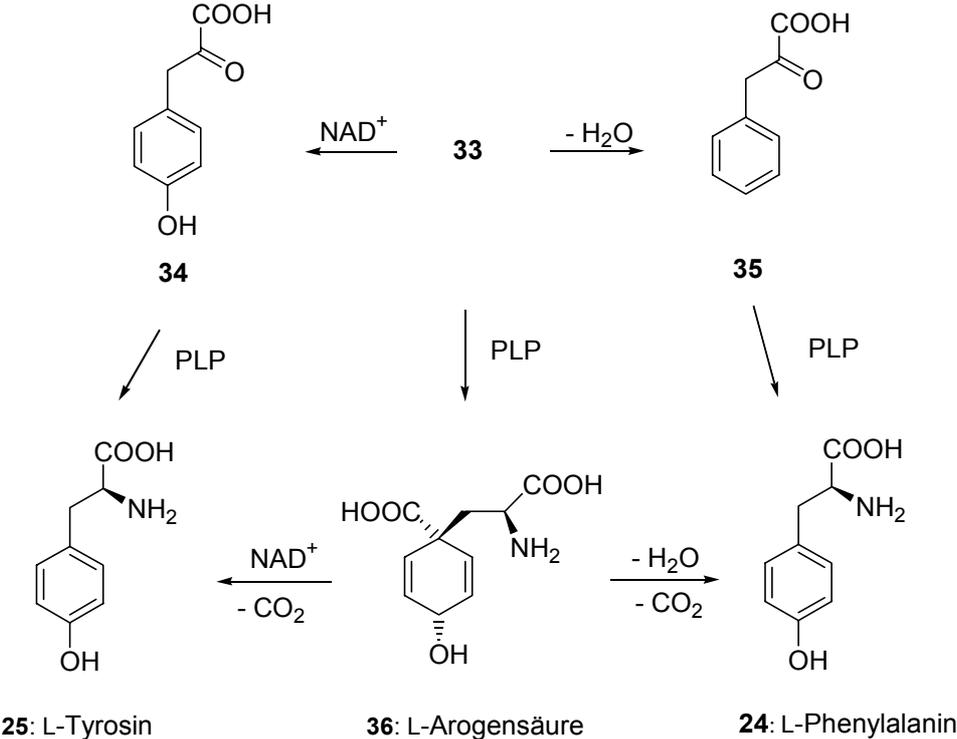
Durch ATP-katalysierte Phosphorylierung der Hydroxyfunktion in Position 3 und Reaktion der 5-Hydroxygruppe mit Phosphoenolpyruvat gelangt man unter Eliminierung von Phosphorsäure zu 5-Enolpyruvyl-shikimisäure-3-phosphat (**31**).⁵⁴ Unter Eliminierung des Phosphatrestes an der 3-Hydroxyfunktion entsteht

Chorisminsäure (**32**). Die Chorismat-Mutase katalysiert die Claisen-Umlagerung zu Prephensäure (**33**), der Ausgangsverbindung für die Tyrosin- und Phenylalanin-Biosynthese (Schema 4).



Schema 4: Prephenat-Biosyntheseweg.

Für die weitere Biosynthese der beiden Aminosäuren Phenylalanin (**24**) und Tyrosin (**25**) existieren zwei separate Biosynthesewege. Die Reaktion kann entweder über eine Phenylbrenztraubensäure (**34**, **35**) oder über L-Arogensäure (**36**) erfolgen. Im zweiten Fall findet die Transaminierung vor der Decarboxylierung statt (Schema 5).⁵⁵



Schema 5: Biosynthese von L-Tyrosin (25) und L-Phenylalanin (24).

4 Zielsetzung

Für das Auffinden von Sekundärmetaboliten in allen Bereichen der Natur können prinzipiell zwei Ansätze beschrieben werden.

- Wirkungsorientierter Ansatz: Verfolgung der biologischen Aktivität der Extrakte.
- Strukturorientierter Ansatz: Suche nach neuen Sekundärmetaboliten mit physikalischen und chemischen Methoden.

Der Vorteil des wirkungsorientierten Ansatzes liegt in der gezielten Suche nach Wirkstoffen für eine bestimmte Problemstellung. Allerdings besteht bei dem wirkungsorientierten, biologischen Ansatz auch der Nachteil, daß Metaboliten mit einer anderen Wirkung als der getesteten nicht gefunden werden können. Auch können die Metaboliten in einer zu geringen Konzentration in den Fraktionen vorkommen, um eine Aktivität zu zeigen, oder es kommt zu falsch positiven Ergebnissen aufgrund synergistischer Effekte im Extrakt.

Demgegenüber ist es häufig interessant, sich nach rein chemischen Gesichtspunkten zu richten und einen Naturstoff aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften zu isolieren. Liegt der Naturstoff in reiner Form vor, kann die biologische Aktivität gezielt überprüft werden. Es kann einerseits nicht zu synergistischen Effekten kommen und andererseits kann biologische Aktivität detektiert werden, die in einem Rohextrakt nicht zu beobachten wäre.

Ein Nachteil beider Ansätze ist, daß auch schon bekannte Verbindungen erfaßt werden.

Als besonders ergiebig erwies sich die Kultur des marinen Sediment-Bakteriums CNH 741, die nach biologischer Prüfung im Rahmen der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation unter mehr als 30 Extrakten ausgewählt wurde. CNH 741 fiel durch antibiotische Aktivität gegen *Staphylokokkus aureus* auf. Es stellte sich allgemeiner auch die Frage, ob die alleinige Orientierung an biologischer Aktivität der geeignetste Weg zur Identifizierung neuer Naturstoffe, auch aus den bisher wenig erforschten gemäßigten Gewässern, ist.

Bei der Analyse der bisher charakterisierten Naturstoffe ist der relativ niedrige Anteil polarer Verbindungen auffällig. Wahrscheinliche Ursache ist die weit verbreitete

Bevorzugung von Normalphasen, z. B. Kieselgel, bei der chromatographischen Fraktionierung. Polare Verbindungen stellen außerdem aufgrund häufig gleichzeitiger Anwesenheit mehrerer, auch quartärer Alkohol-Funktionen besondere Anforderungen an die Zuordnung ihrer absoluten Stereochemie.

Bei vielen marinen Naturstoffen, die aus Makroorganismen isoliert wurden, stellt sich die Frage, ob der betreffende Makroorganismus selbst oder assoziierte Mikroorganismen für die Bildung der isolierten Verbindungen verantwortlich sind. Z. B. konnten die Pyridoacridin-Alkaloide zweifelsfrei in Schwammzellen nachgewiesen werden.⁵⁶ Beispiele für von assoziierten Bakterien gebildete Naturstoffe liefern andererseits die peptidischen Verbindungen aus dem Schwamm *Theonella swinhoei*.⁵⁷ Es wäre also sehr interessant, im Mikroorganismus CNH 741 Inhaltsstoffe eines Strukturtyps zu finden, der im marinen Bereich vorher nur in Makroorganismen identifiziert wurde.

Infolgedessen stellten sich im einzelnen folgende Fragen:

- Welche Inhaltsstoffe sind für die ausgeprägte antibakterielle Aktivität des Extrakts verantwortlich?
- Könnte es sich bei CNH 741 um einen der seltenen, aus dem Meer isolierten Mikroorganismen handeln, die Substanzen produzieren, welche vorher nur in Makroorganismen gefunden wurden?
- Kann die absolute Stereochemie polarer Inhaltsstoffe von CNH 741 aufgeklärt werden?
- Wie sind seßhafte marine Organismen der Nordsee und des Nordmeeres als Quelle biologisch aktiver Naturstoffe zu beurteilen?

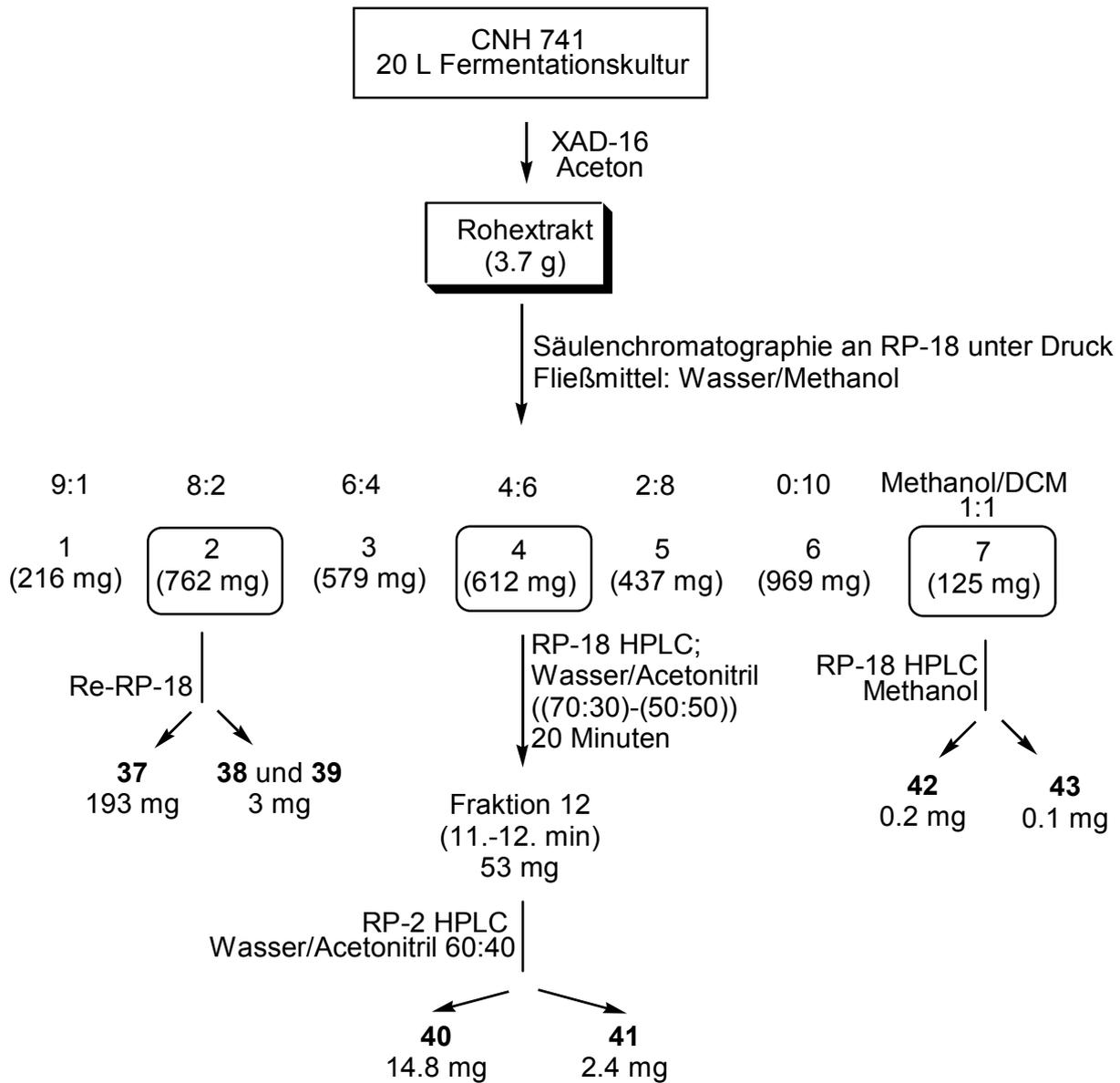
IV Spezieller Teil

5 Auswahl eines marinen Sedimentbakteriums

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Testung von 27 marinen Mikroorganismen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität im Vollzellassay-Screeningprogramm gegen die Krankheitserreger *Staphylokokkus aureus*, *Candida albicans* und der Krebszelllinie HCT-116. Die Mikroorganismen wurden hierfür jeweils im 1-L-Maßstab fermentiert und die erhaltenen Rohextrakte mittels RP-18 oder HP-20 Säulenchromatographie in 5-7 Fraktionen aufgereinigt. Die Rohextrakte und ihre Fraktionen wurden auf ihre biologische Aktivität überprüft (Schema 6).

Der Rohextrakt des marinen Sedimentbakteriums mit der Kultivierungsnummer CNH 741 zeigte moderate Aktivität gegen *S. aureus*, woraufhin CNH 741 für eine weitere Analyse ausgewählt wurde. Um ausreichende Mengen an Rohextrakt zu erhalten, wurde das Bakterium im 20-L-Maßstab fermentiert, wodurch eine Ausbeute von 3.7 g an Rohextrakt erhalten werden konnte.

5.1 Isolierung



Schema 6: Isolierungsschema des marinen Sedimentbakteriums CNH 741.

6 Isolierung biologisch aktiver Sekundärmetaboliten

6.1 Reinigung

Da der Rohextrakt des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 im Vollzellassay-Screeningprogramm Aktivität gegen das Bakterium *Staphylokokkus aureus* zeigte, wurden die nach RP-18 Chromatographie erhaltenen sieben Fraktionen des Rohextrakts erneut auf biologische Aktivität gegen *Staphylococcus aureus* überprüft. Es stellte sich heraus, daß sich die Aktivität auf Fraktion sieben konzentrierte. Die geringste Konzentration der Fraktion, bei der das Wachstum für *S. aureus* noch gehemmt werden konnte, betrug 7.8 µg/ml (MIC). Fortgesetzte RP-18 HPL-chromatographische Trennung dieser Fraktion mit Methanol lieferte das biologisch aktive Prinzip (**42**) in einer Ausbeute von 0.2 mg und einen weiteren Naturstoff (**43**) in einer Ausbeute von 0.1 mg.

6.2 Strukturaufklärung

Im niederaufgelösten ESI-Massenspektrum konnte eine Masse von $m/z = 932.6$ detektiert werden. Ein weiterer beobachteter Peak bei $m/z = 937.9$ läßt darauf schließen, daß es sich bei $m/z = 932.6$ um $[M + NH_4]^+$ und bei $m/z = 937.9$ um $[M + Na]^+$ handelt. Somit würde das Molekülion, welches nicht detektiert werden konnte, einer Masse von $m/z = 914$ entsprechen.

Das IR-Spektrum von **42** zeigt eine starke breite Bande bei 3306 cm^{-1} , die auf mindestens eine NH- oder OH-Valenzschwingung hinweist, sowie zwei weitere Banden bei 2926 und 2852 cm^{-1} , die charakteristisch für die CH-Valenzschwingungen von Alkylgruppen sind. Bei 1460 und 1374 cm^{-1} liegen Banden für CH_3 -Deformationsschwingungen vor. Weitere Banden liegen bei 1164 und 1100 cm^{-1} .

Da das UV-Spektrum von **42** keinerlei Absorption zeigt, kann das Vorliegen eines Chromophors ausgeschlossen werden.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 4) von **42** zeigt vier Singulets bei $\delta_{\text{H}} = 3.35, 3.41, 3.47$ und 3.54 , deren Integration jeweils drei Protonen entsprechen. Die Tieffeldverschiebung deutet auf Methylgruppen, die jeweils an Heteroatome gebunden sind. Drei Methylgruppen, die als Dubletts auftreten, werden bei $\delta_{\text{H}} = 0.82, 0.90$ und

1.06 beobachtet. Vier weitere Methylgruppen liegen in den Bereichen $\delta_{\text{H}} = 0.83\text{-}0.87$ und $0.97\text{-}1.00$. Die Integration der Signale bei $\delta_{\text{H}} = 3.92, 3.99, 4.30, 4.56$ und 4.86 ergibt jeweils ein Proton. Ebenso die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 2.47$ und 2.81 . Der Bereich zwischen $\delta_{\text{H}} = 1.20$ und 2.00 kann aufgrund seiner Komplexität ohne die Auswertung der 2D-NMR-Daten nicht näher charakterisiert werden.

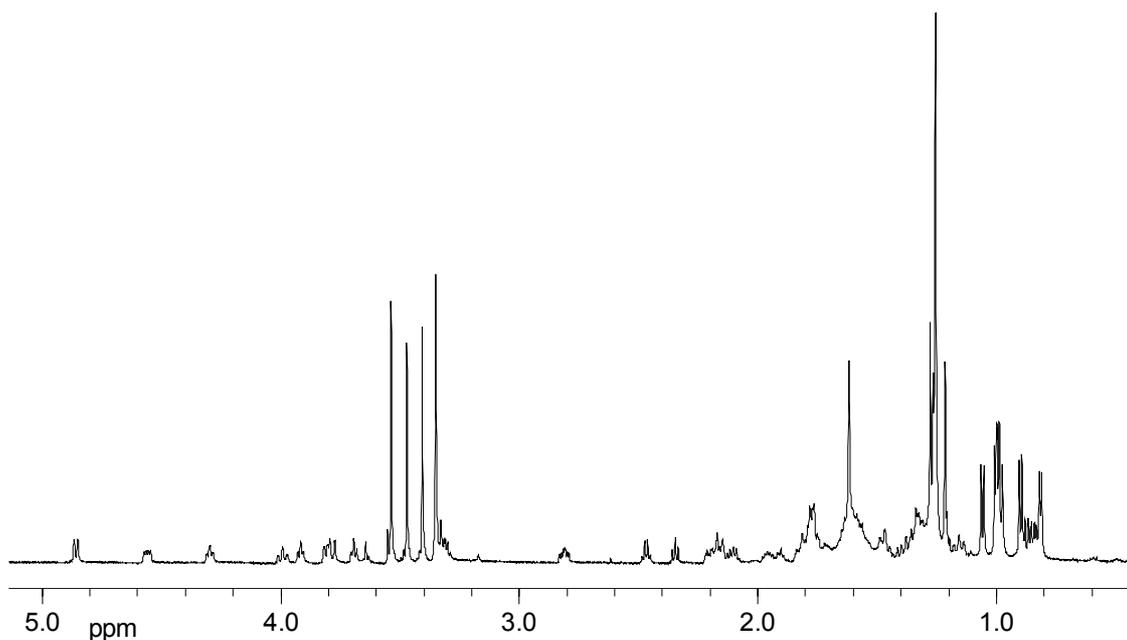


Abbildung 4: ^1H -NMR-Spektrum des antibiotischen Naturstoffs **42**, $[\text{D}_1]$ Chloroform, 600 MHz.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 5) können 47 Kohlenstoffatome identifiziert werden. Diese entsprechen nach Abgleich mit dem DEPT-NMR-Spektrum fünf quartären Kohlenstoffatomen, neun CH_2 -Gruppen, 19 aliphatischen CH sowie 14 Methylgruppen. Nach Auswertung des HMBC-Spektrums (Abb. 6) konnte ein weiterer quartärer Kohlenstoff identifiziert werden ($\delta_{\text{C}} = 180.7$), der im ^{13}C -NMR-Spektrum nicht zu detektieren war.

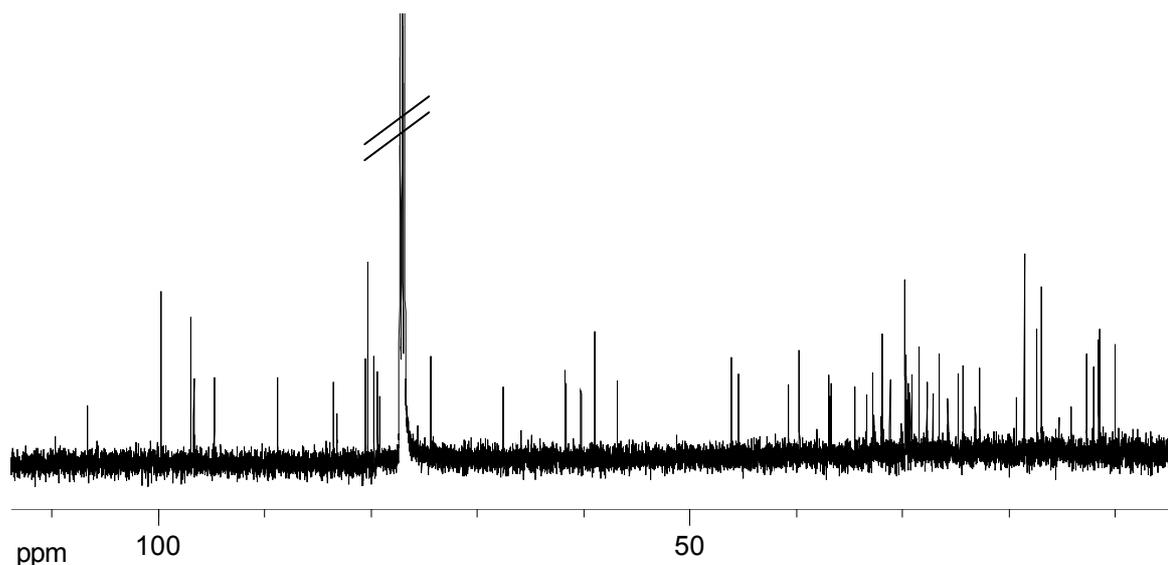


Abbildung 5: ^{13}C -NMR-Spektrum von **42**, $[\text{D}_1]$ Chloroform, 600 MHz.

Der quartäre Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 180.7$ liegt relativ isoliert vor, weshalb er sich als Einstieg zur Auswertung des HMBC-Spektrums eignet (Abb. 6). Aufgrund seiner Tieffeldverschiebung könnte er einer Säuregruppe entsprechen. Eine gemeinsame Kopplung zu diesem Signal zeigen die Protonensignale bei $\delta_{\text{H}} = 2.47$ und 1.06 . Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 2.47$ entspricht einer CH-Gruppe, das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 1.06$ einer CH_3 -Gruppe und im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (Abb. 9) ist eine wechselseitige Kopplung der Signale zu beobachten ($^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz). Weiterhin zeigen die Protonensignale eine gemeinsame Kopplung zu einem quartären Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 99.6$. Üblicherweise lässt eine Verschiebung eines Kohlenstoffsignals um 100 ppm eine sp^3 -Hybridisierung des C-Atoms mit einer doppelten Substitution durch einen Heteroaromaten vermuten. Unter Berücksichtigung einer Kopplung der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.76$ und der Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.01$ zu dem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff lässt sich folgendes Bruchstück formulieren (Abb. 7).

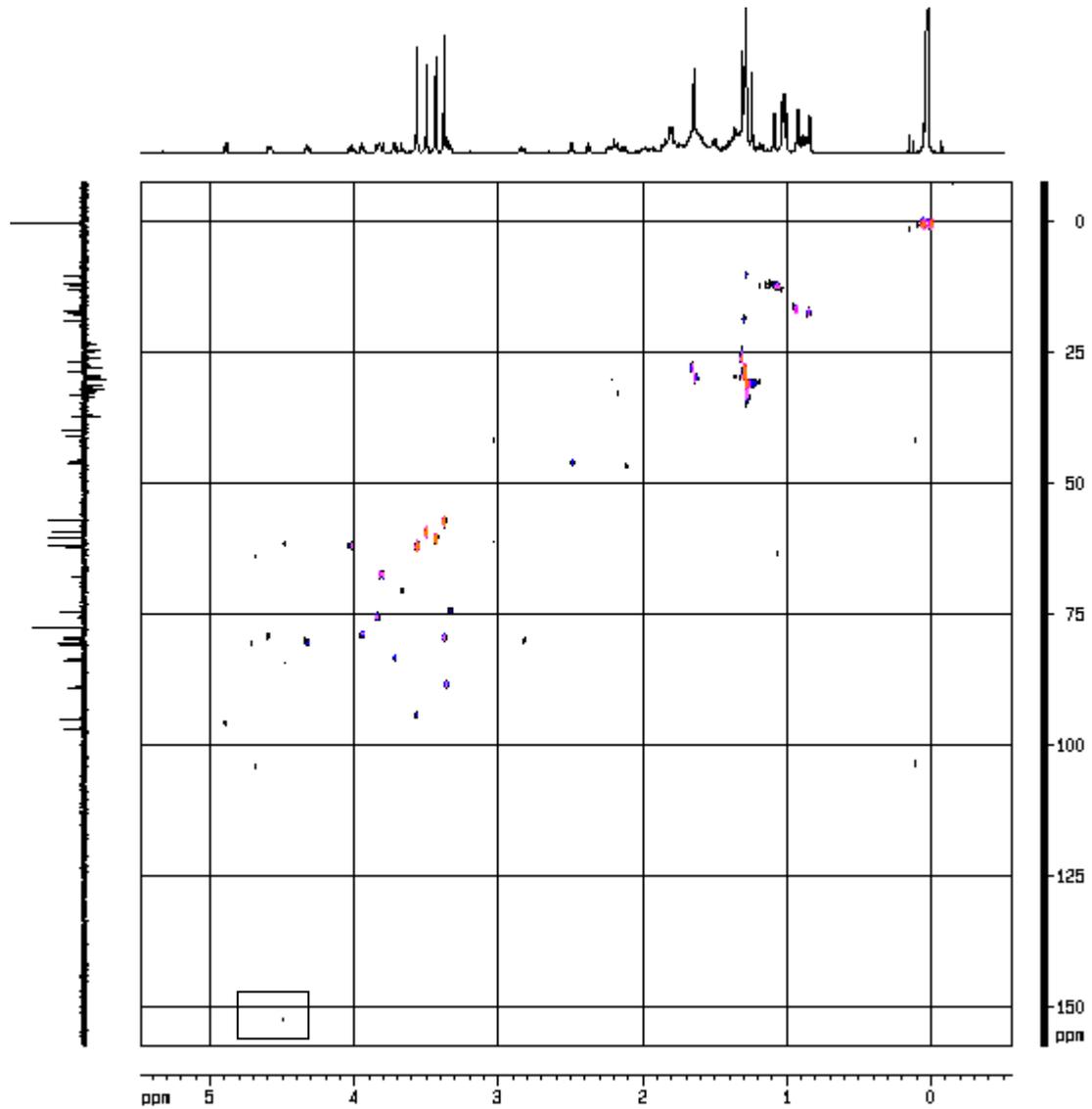


Abbildung 6: HMBC-Spektrum von **42**, [D₁]Chloroform, 600 MHz.

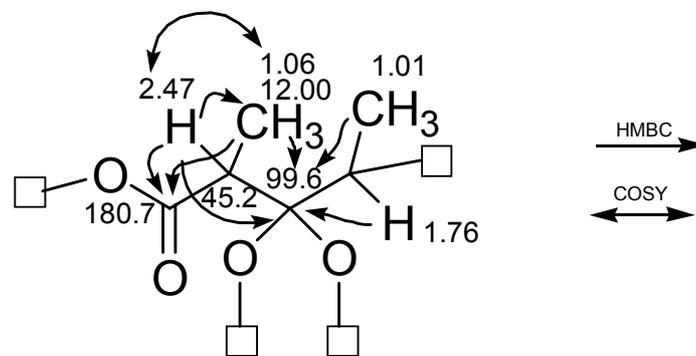


Abbildung 7: Strukturfragment I für **42**.

Obwohl dieses Fragment relativ klein ist, wird bei einer Teilstruktursuche in verschiedenen Datenbanken sehr schnell ersichtlich, daß es sich hierbei um ein typisches Strukturelement der Polyether-Antibiotika handelt. Dies würde auch die ausgeprägte Aktivität der Fraktion sieben gegen *Staphylokokkus aureus* erklären. Als wesentliche Strukturelemente enthalten die Polyether-Antibiotika eine Carboxylgruppe und eine verschiedene Anzahl an, zumeist in Spiroketal- oder Hemiketalstrukturen integrierte, Tetrahydrofuran- oder Tetrahydropyranringe. Ein weiteres Merkmal ist die Anwesenheit von Hydroxylgruppen und die größere Anzahl an Methylgruppen.⁵⁸

Die weitere Auswertung des HMBC-Spektrums zeigt Kopplungen der Protonensignale bei $\delta_{\text{H}} = 1.76$ und 1.01 zu dem Kohlenstoffsignal bei $\delta_{\text{C}} = 88.8$. Die beobachtete Tieffeldverschiebung sowie die deutliche Kopplung der Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.54$ und dessen Verschiebung deuten auf eine Substitution des C-Atoms durch eine Methoxygruppe hin. Die Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.22$ zeigt eine Kopplung zum selben Kohlenstoffsignal wie auch zu den Signalen $\delta_{\text{C}} = 80.3$ und 67.5 . Auf Basis der Annahme, daß es sich bei dem isolierten Naturstoff um einen Polyether handelt, und da das Protonensignal bei $\delta_{\text{H}} = 3.79$ Kopplungen zu den Kohlenstoffsignalen bei $\delta_{\text{C}} = 88.8$ und 80.3 zeigt, kann Strukturfragment I zu einem Tetrahydropyranring vervollständigt werden (Strukturfragment II, Abb. 8).

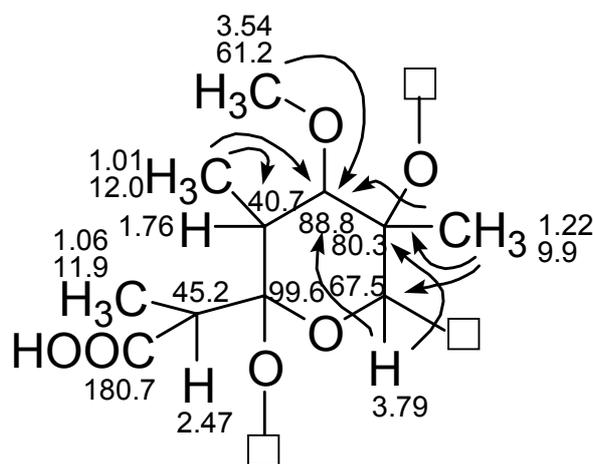


Abbildung 8: Strukturfragment II für **42** mit HMBC-Korrelationen.

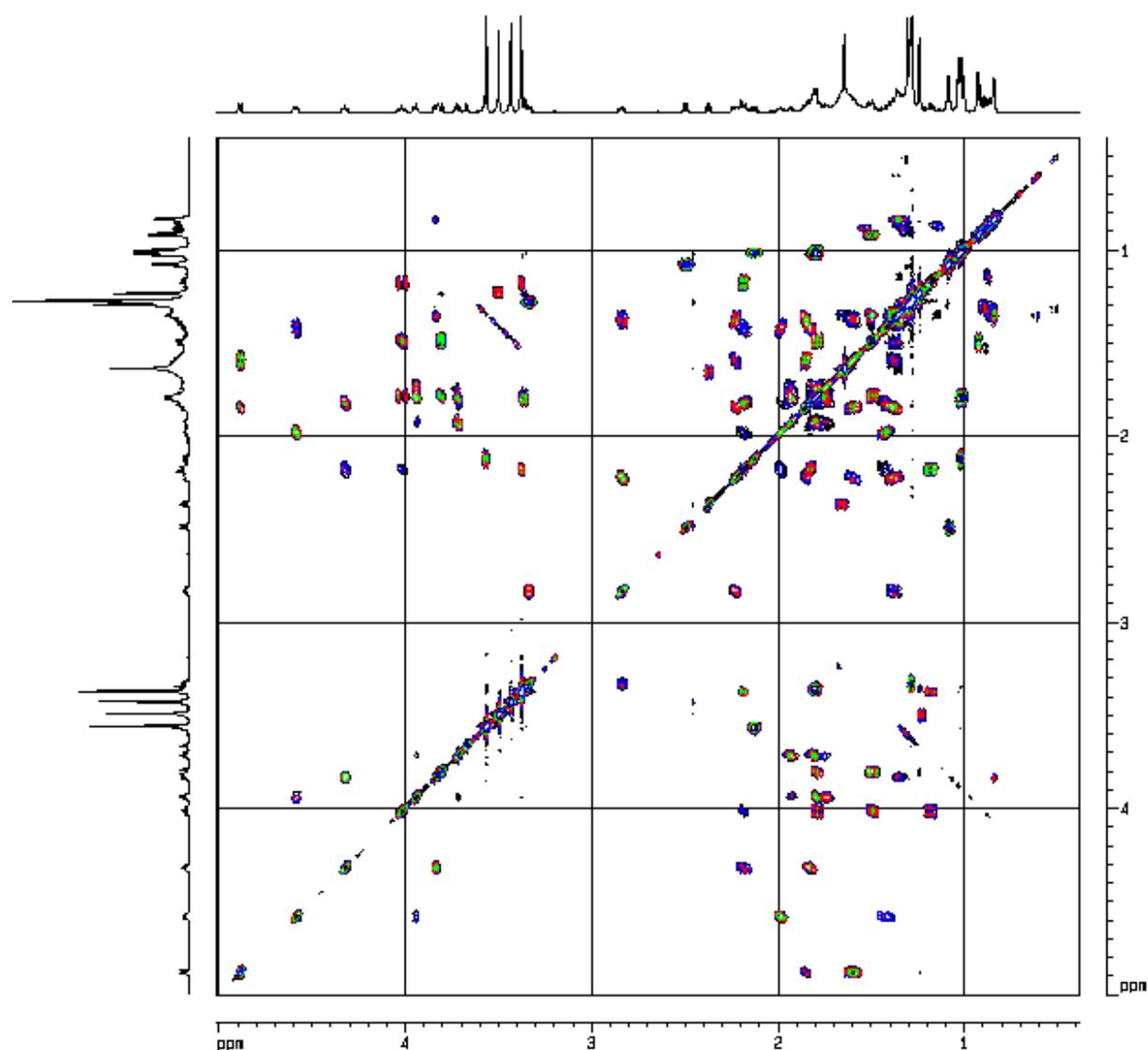


Abbildung 9: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von **42**, $[\text{D}_1]\text{Chloroform}$, 600 MHz.

Eine weitere Kopplung zum Kohlenstoffsignal bei $\delta_{\text{C}} = 80.3$ zeigt die CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.86$ und $\delta_{\text{C}} = 96.5$. Aufgrund der Verschiebungen der C-Atome sind diese vermutlich über eine Etherbindung verbrückt. Die CH-Gruppe zeigt im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (Abb. 9) Kopplungen zu einer Methylengruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.55$ und 1.84), die sich mit einer weiteren CH_2 -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.22$ / 1.32) und einer CH-Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.81$ und $\delta_{\text{C}} = 80.2$) zu einer Kette zusammenfügen lassen. Diese Signale koppeln nur im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum, während sie im HMBC-Spektrum keinerlei Korrelationen untereinander zeigen.

Die Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.26$ koppelt mit dem Kohlenstoffsignal bei $\delta_{\text{C}} = 74.3$. Gemeinsam mit dem Protonensignal bei $\delta_{\text{H}} = 3.33$ zeigt es eine Kopplung zu der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 80.2$, welche durch eine Methoxygruppe ($\delta_{\text{H}} = 3.35$ und $\delta_{\text{C}} = 56.8$) substituiert ist. Auch wenn das Protonensignal bei $\delta_{\text{H}} = 3.33$ keine direkte Kopplung zu dem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 96.5$ zeigt, deuten die NMR-Verschiebungen auf einen weiteren Tetrahydropyranring (Abb. 10) hin.

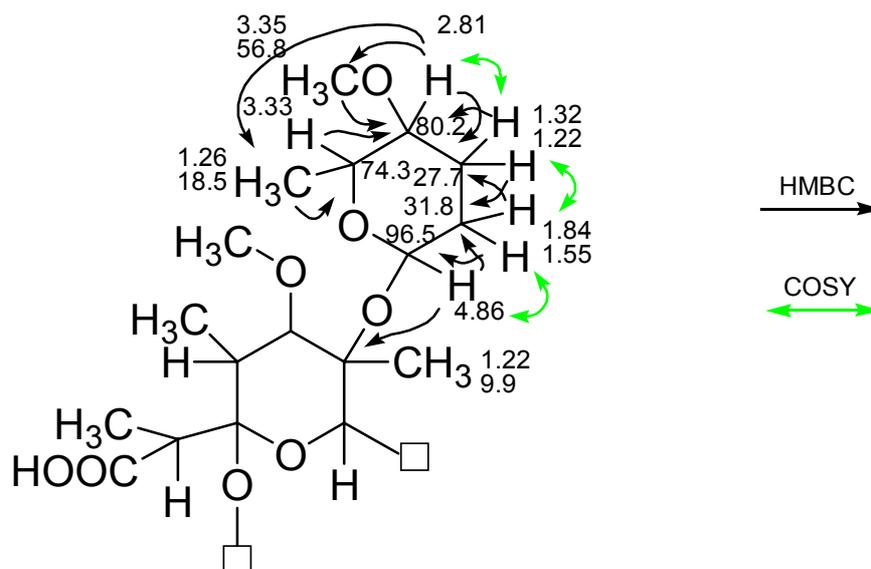


Abbildung 10: Strukturfragment III für **42**.

Durch die Erweiterung des Strukturfragments (Abb. 10) konnte die Teilstruktursuche gezielter durchgeführt werden. Unter Berücksichtigung der NMR-Verschiebungen und der für **42** detektierten Masse konnte die Anzahl an Verbindungen auf 2 Polyether-Antibiotika eingegrenzt werden. Diese beiden Naturstoffe, Etheromycin (**44**) und Septamycin (**42**),^{59,60} besitzen das gleiche Grundgerüst, bestehend aus vier Tetrahydropyranringen, drei Tetrahydrofuranringen, und einer Carboxylgruppe. Sie unterscheiden sich lediglich in den Positionen C-5, C-8, C-14, C-15, C-20 und C-27 (Abb. 11 und Tab. 1).

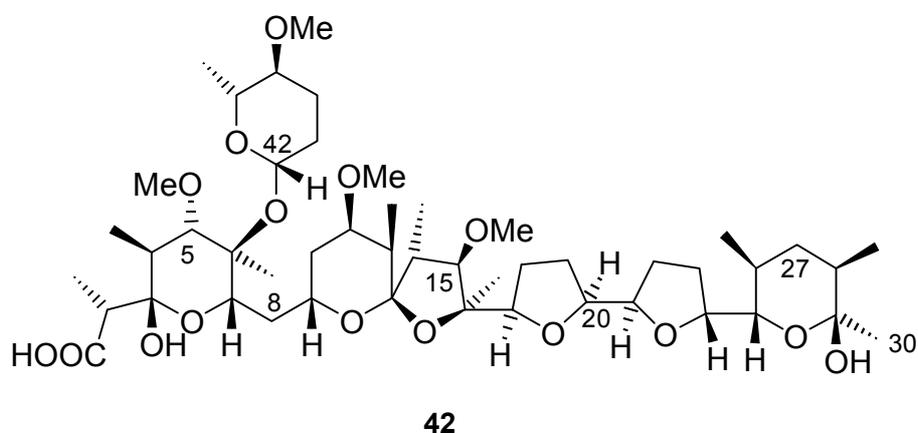
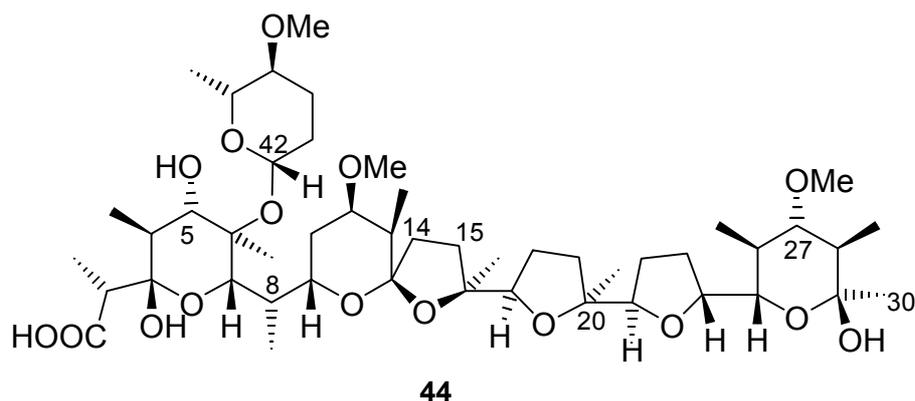
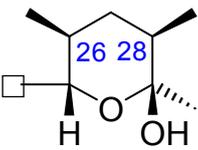
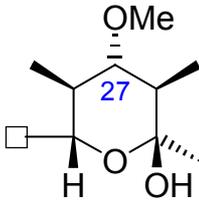


Abbildung 11: Etheromycin (**44**) und Septamycin (**42**).

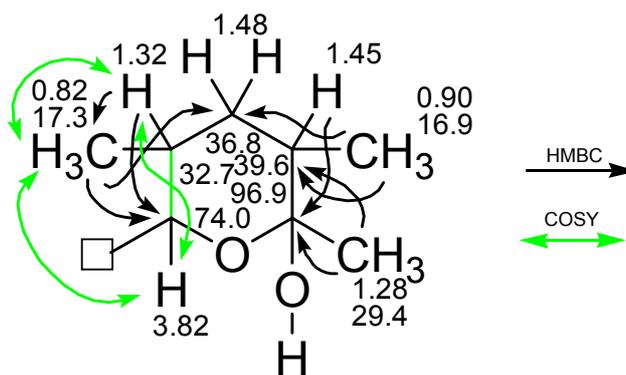
Bei dem bisher identifizierten Strukturfragment des isolierten Naturstoffs findet sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die beiden Verbindungen **42** und **44**. Nur in Position C-5 kann eine Unterscheidung getroffen werden. Während Etheromycin, (**44**) durch eine Hydroxylgruppe substituiert ist, befindet sich bei Septamycin (**42**) eine Methoxygruppe in Position C-5. Da dieser Unterschied nicht eindeutig ist, mußten durch weitere Auswertung der 2D-NMR Spektren zusätzliche Teilstrukturen identifiziert werden.

Ein charakteristischer Unterschied zwischen beiden Naturstoffen **44** und **42** besteht in den NMR-spektroskopischen Daten des Tetrahydropyranringes C-25 bis C-29. Durch den Einfluß der Methoxygruppe in Position C-27 bei Etheromycin (**44**) erfahren die Methylgruppen an C-26 und C-28 einen Tieffeldshift im Vergleich zu Septamycin (**42**). Auch die ^{13}C -NMR-Verschiebung des halbacetalischen Kohlenstoffs C-29 eignet sich zur Unterscheidung.

Tabelle 1: Überblick über ausgewählte ^{13}C -NMR-Verschiebungen von **42** und **44**.

	Septamycin (42); δ_{C} [ppm]		Etheromycin (44); δ_{C} [ppm]
	75.2	C-25	73.6
	32.7	C-26	39.3
	36.8	C-27	84.6
	40.6	C-28	46.3
	96.6	C-29	98.4
	17.3	26-CH ₃	13.6
	16.9	28-CH ₃	12.4
	26.4	29-CH ₃	26.6
			

Die weitere Auswertung der 2D-NMR-Spektren des isolierten Naturstoffs konzentrierte sich auf den quartären, vermutlich hemiketalischen Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 96.9$. Möglicherweise charakterisiert dieses Signal den Kohlenstoff in C-29. Als Ausgangspunkt dienen die im HMBC-Spektrum beobachteten Kopplungen der Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.28$ und $\delta_{\text{C}} = 29.4$) und der CH-Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.45$ und $\delta_{\text{C}} = 39.6$) zu diesem Kohlenstoffsignal. Außerdem zeigt die Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.28$ und $\delta_{\text{C}} = 29.4$) mit einer weiteren Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 0.9$ und $\delta_{\text{C}} = 16.9$) eine gemeinsame Kopplung zu der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.45$ und $\delta_{\text{C}} = 39.6$. Die beiden Methylgruppen ($\delta_{\text{H}} = 0.90 / \delta_{\text{C}} = 16.9$ und $\delta_{\text{H}} = 0.82 / \delta_{\text{C}} = 17.3$) zeigen gemeinsame Kopplungen zu einer CH₂-Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.48$ und $\delta_{\text{C}} = 36.8$). Durch die wechselseitige Kopplung der Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 0.82$ und $\delta_{\text{C}} = 17.3$) und der CH-Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.32$ und $\delta_{\text{C}} = 32.7$) sowie deren gemeinsame Kopplung zu der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 74.0$ kann schließlich folgendes Strukturfragment formuliert werden (Abb. 12).

Abbildung 12: Strukturfragment IV für **42**.

Man kann schließen, daß es sich bei der isolierten Verbindung um das Polyether-Antibiotikum Septamycin (**42**) handelt.

Tabelle 2: Ausgewählte ^{13}C -NMR-spektroskopische Daten von **42** und **44** (Literaturwerte) und gemessene Werte.

Position	δ_{C} [ppm] Literatur für Septamycin (42)	δ_{C} [ppm] Literatur für Etheromycin (44)	δ_{C} [ppm] gemessener Wert
C5	88.5	76.6	88.8
C8	32.4	39.7	32.5
C14	46.0	36.9	46.1
C15	94.5	32.9	94.7
C20	78.9	86.1	79.3
C27	36.8	84.6	36.8

Mit Hilfe der Literaturdaten konnten auch die restlichen, zum Teil überlagerten NMR-Signale zugeordnet werden. Es wird bestätigt, daß es sich bei dem aus dem marinen Mikroorganismus CNH 741 in einer Menge von 0.2 mg isolierten Naturstoff um das Polyether-Antibiotikum Septamycin (**42**) handelt.⁶¹ Das hochaufgelöste ESI-Massenspektrum bestätigt das Ergebnis und die Summenformel $\text{C}_{48}\text{H}_{82}\text{O}_{16}$.

Tabelle 3: NMR-spektroskopische Daten des isolierten Septamycins (**42**), HMBC-und COSY-Korrelationen beziehen sich auf die Positionsnummern.

Position	δ_C [ppm]	δ_H [ppm] (mult., J_{Hz} , Integr)	HMBC	COSY
1	180.7			
2	45.2	2.47 (q, 7.2, 1H)	1, 3, 38	38
3	99.6			
4	40.7	1.76 (br, 1H)	3, 5, 37	
5	88.8	3.34 (br, 1H)	4, 36, 37	
6	80.3			
7	67.5	3.79 (dd, 11.4, 2.4, 1H)	5(w), 6, 9(w), 36	8, 36(w)
8	32.5	1.48 (1H)	7(w), 9, 10	7, 9,
		1.78 (br, 1H)		
9	61.6	3.99 (m, 11.4, 1.9, 1H)		8, 10
10	31.1	1.16 (1H)	11	9
		2.15 (br, 1H)		
11	79.8	3.35 (br, 1H)		
12	36.9	1.76 (br, 1H)	10, 11, 13	35
13	106.7			
14	46.1	2.10 (dt, 9.5, 6.7, 1H)	13, 15, 34	15
15	94.7	3.55 (br, 1H)	14, 16, 33, 34, 39	14
16	83.3			
17	83.5	3.70 (dd, 7.6, 7.1, 1H)		18
18	25.6	1.77 (1H)		17
		1.93 (br, 1H)		
19	23.0	1.72 (br, 1H)		20
20	79.1	3.92 (dd, 6.1, 1.4, 1H)		19, 21
21	79.3	4.56 (m, 5.7, 1.4, 1H)		19, 22
22	29.2	1.38 (1H)	20	21
		1.93 (br, 1H)		
23	24.2	1.80 (1H)	24, 25	24
		2.16 (br, 1H)		
24	80.4	4.30 (dt, 7.6, 2.4, 1H)	25	23, 25
25	74.0	3.82 (dd, 9.5, 2.4, 1H)		26
26	32.7	1.32 (br, 1H)	25, 28	25, 32
27	36.8	1.48 (br, 2H)	29	
28	39.6	1.45 (br, 1H)	29	
29	96.9			
30	29.4	1.28 (s, 3H)	28, 29	
31	16.9	0.90 (d, 7.2, 3H)	27, 28	
32	17.3	0.82 (d, 5.7, 3H)	25, 26, 27	25, 26
33	28.4	1.62 (s, 3H)	15, 16, 17	
34	11.5	1.00 (d, 7.2, 3H)	13, 14, 15	
35	12.6	0.98 (d, 8.6, 3H)	11, 12, 13	8
36	9.9	1.22 (s, 3H)	5, 6, 7	7(w)
37	12.0	1.01 (d, 6.1, 3H)	3, 4, 5	
38	11.5	1.06 (d, 7.2, 3H)	1, 2, 3	2
39	60.2	3.41 (s, 3H)	15	

40	58.9	3.47 (s, 3H)	11	
41	61.2	3.54 (s, 3H)	5	
42	96.5	4.86 (dd, 9.0, 1.9, 1H)	6	43
43	31.8	1.55 (1H)	42, 44	42, 44
		1.84 (br, 1H)		
44	27.7	1.32 (1H)	43	43, 45
		2.22 (br, 1H)		
45	80.2	2.81 (dt, 9.0, 4.3, 1H)	46, 47, 48	44
46	74.3	3.33 (br, 1H)	45	
47	18.5	1.26 (d, 6.1, 3H)	45, 46	
48	56.8	3.35 (s, 3H)	45	

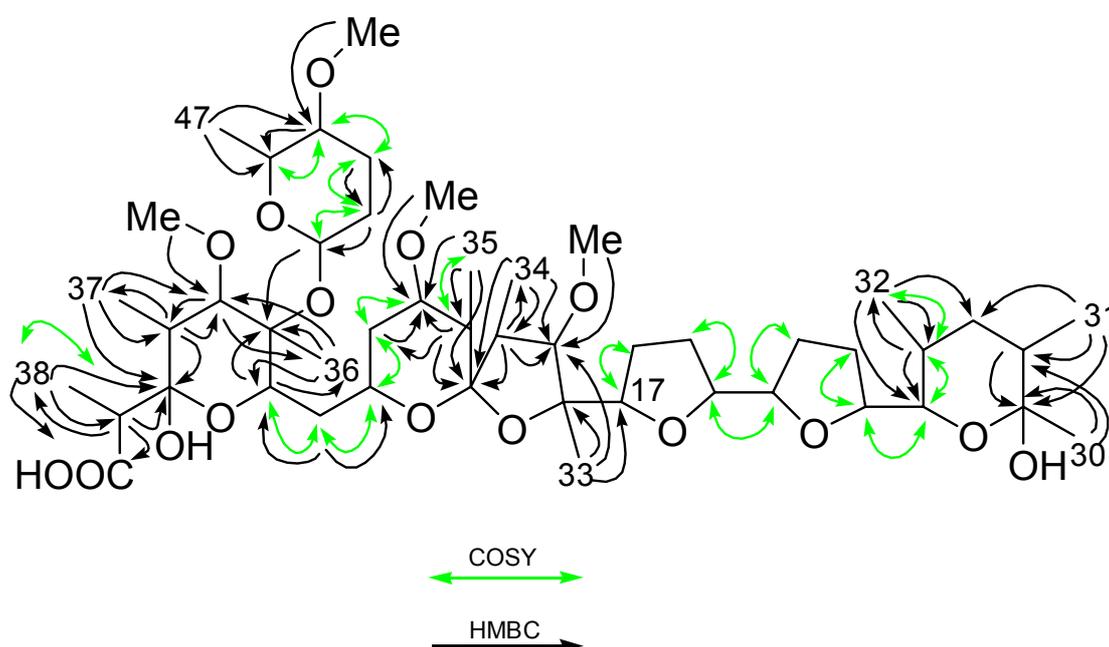


Abbildung 13: Struktur von Septamycin (**42**) mit HMBC- und COSY-Korrelationen.

6.3 Bestimmung der Konfiguration

Die Überprüfung der relativen Konfiguration gelang durch die Ermittlung einiger Kopplungskonstanten. Die vicinale Kopplungskonstante $^3J_{H,H}$ für die Protonen 20-H und 21-H beträgt 1.4 Hz, für die Protonen 24-H und 25-H entspricht sie 2.4 Hz (Abb. 14).

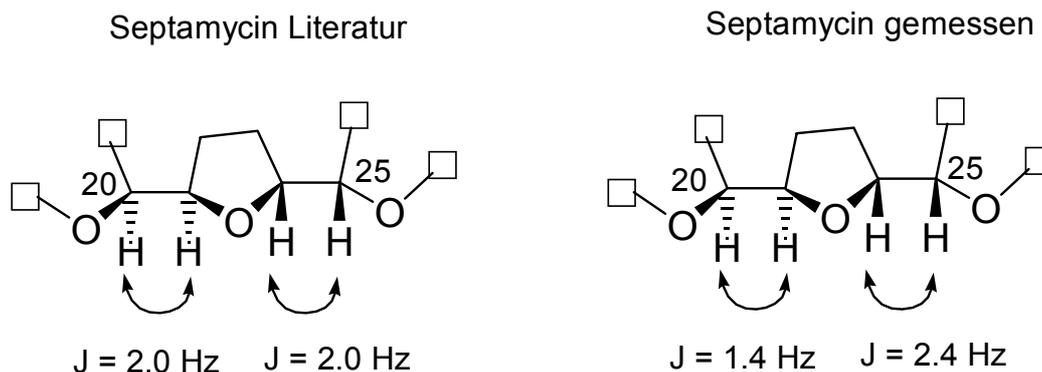


Abbildung 14: Ausschnitt von Septamycin (**42**) mit Kopplungskonstanten. Links: Der Literatur entnommen, rechts: Gemessene Kopplungskonstanten.

Bei $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen an „frei“ drehbaren (C-C)-Bindungen ändert sich die Größe der Kopplungskonstante mit dem Torsionswinkel. Zur quantitativen Abschätzung dient die Karplus-Kurve.⁶² Die gemessenen Kopplungskonstanten von 2-3 Hz sprechen für einen Diederwinkel von $\sim 60^\circ$ wie er bei einer *syn*-Anordnung der Protonen zu beobachten ist. Stünden die Protonen in einer *anti*-Anordnung, wären sie folglich auf unterschiedlichen Seiten einer durch die Tetrahydrofuranringe festgelegten Ebene, so hätte die Kopplungskonstante $^3J_{\text{H,H}}$ einen Wert von 7-12 Hz. Die für Septamycin berichteten $^3J_{\text{H,H}}$ Kopplungskonstanten stimmen mit den gemessenen Konstanten überein.⁶³ Folglich kann für das isolierte Septamycin (**42**) die gleiche relative Konfiguration angenommen werden wie für den schon berichteten Naturstoff. Weiterhin kann die gleiche absolute Konfiguration, wie sie von Petcher et al. röntgenspektroskopisch bestimmt wurde, angenommen werden.⁶⁴

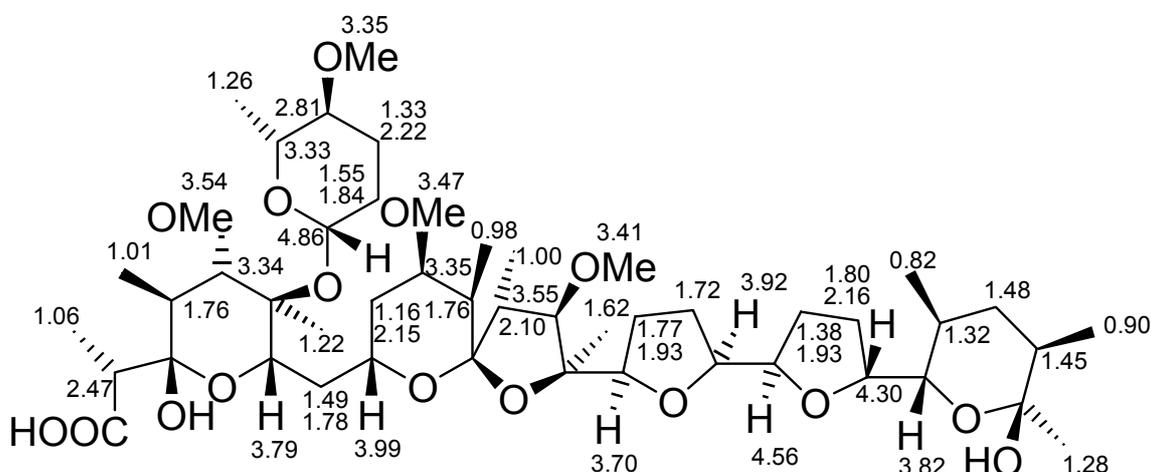


Abbildung 15: Struktur von Septamycin (**42**) mit ^1H -NMR-Verschiebungen.

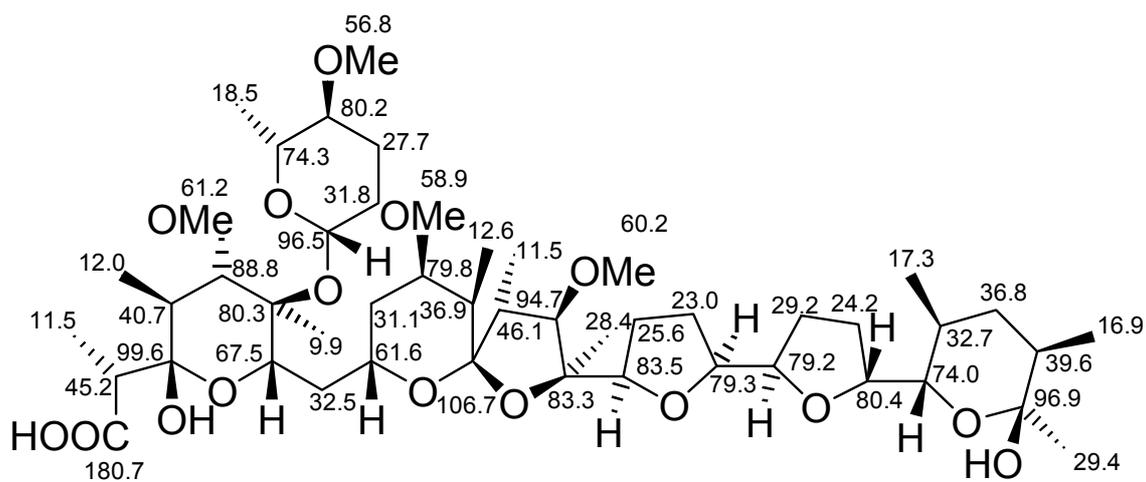


Abbildung 16: Struktur von Septamycin (**42**) mit ^{13}C -NMR-Verschiebungen.

6.4 Strukturaufklärung

Nach RP-18 HPL-chromatographischer Reinigung der Fraktion sieben konnte ein weiterer Naturstoff (**43**) in einer Ausbeute von 0.1 mg erhalten werden. Im niederaufgelösten ESI-Massenspektrum zeigte **43** eine Masse von $m/z = 951.7$. Ein weiteres beobachtetes Signal bei $m/z = 967.6$ lässt darauf schließen, daß es sich bei $m/z = 951.7$ um $[M + Na]^+$ und bei $m/z = 967.6$ um $[M + K]^+$ handelt, da sich beide Signale um 16 Masseneinheiten unterscheiden. Somit würde das nicht detektierte Molekülion $[M]^+$ einer Masse von $m/z = 928$ entsprechen. Die detektierte Masse von **43** unterscheidet sich von der des Septamycins (**42**) um 14 Einheiten.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 17) des isolierten Naturstoffs **43** ähnelt dem des Septamycins (**42**). Bei $\delta_{\text{H}} = 3.20$ ist neben $\delta_{\text{H}} = 3.54, 3.41, 3.35$ und 3.32 ein zusätzliches Singulett zu detektieren, dessen Integration drei Protonen entspricht und bei dem es sich um eine weitere Methoxygruppe handeln könnte. Die Verschiebung bei $\delta_{\text{H}} = 4.82$ entspricht einem Proton, wie auch $\delta_{\text{H}} = 4.12, 4.05, 3.96, 3.77, 2.81, 2.62, 2.36$ und 2.21 . Das Dublett bei $\delta_{\text{H}} = 1.10$ entspricht einer Methylgruppe. Weitere Methylgruppen liegen in den Bereichen $\delta_{\text{H}} = 0.96-1.00$ und $\delta_{\text{H}} = 0.84-0.90$.

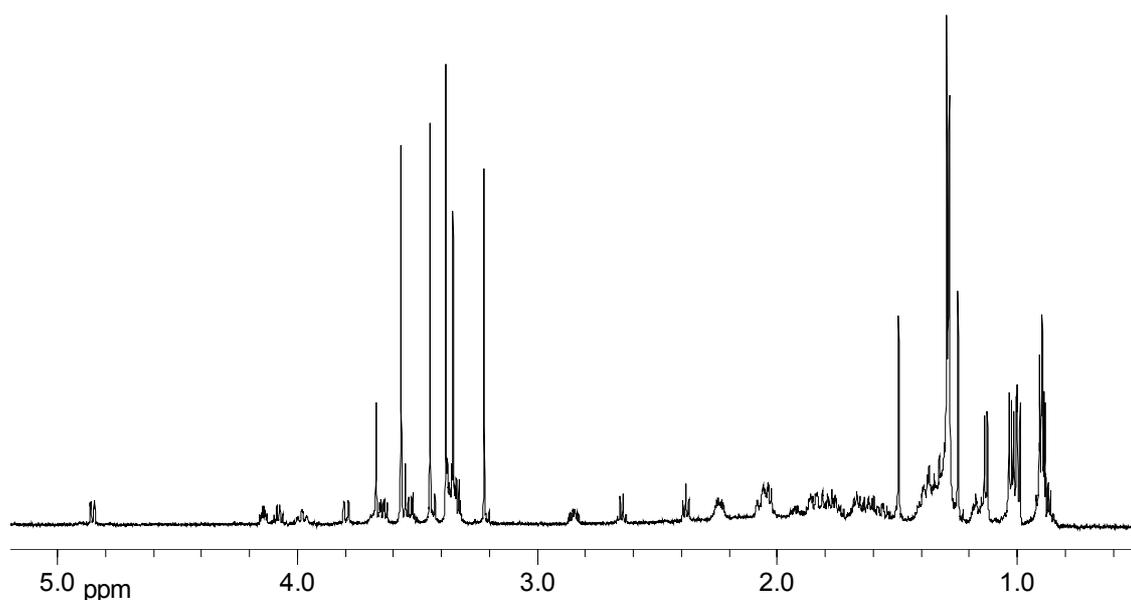


Abbildung 17: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des isolierten Naturstoffs **43**, $[\text{D}_1]\text{Chloroform}$, 600 MHz.

Die Interpretation des ^{13}C -NMR-Spektrums gestaltete sich aufgrund der geringen Menge an isoliertem Naturstoff als sehr schwierig. Trotz einer Meßzeit von ca. 72 h wurde kein akzeptables Signal-Rausch Verhältnis erzielt. Die Identifizierung der ^{13}C -Signale erfolgte durch die Auswertung des HSQC- und HMBC-Spektrums.

Die Ähnlichkeit des ^1H -NMR-Spektrums des zweiten isolierten Naturstoffs (**43**) mit dem des Septamycins (**42**) läßt vermuten, daß es sich bei **43** um ein Septamycin-Derivat handelt. Die Integration des Signals bei $\delta_{\text{H}} = 4.82$ entspricht einem Proton. Durch Auswertung des HSQC-Spektrums läßt sich diesem Proton das ^{13}C -NMR-Signal $\delta_{\text{C}} = 96.8$ zuordnen. Für $\delta_{\text{H}} = 4.82$ konnte im HMBC-Spektrum keine Korrelation zu einem Kohlenstoffsignal beobachtet werden. Allerdings zeigte $\delta_{\text{H}} = 4.82$ im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum Kopplungen zu den diastereotopen Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 1.58$ und 1.80 . Diese zeigen wechselseitige Kopplungen zu einer weiteren Methylengruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.37$ und 2.21 . An diese Kette läßt sich eine CH-Gruppe mit $\delta_{\text{H}} = 2.81$ anschließen, die ihrerseits mit einer CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.31$ koppelt. Im HMBC-Spektrum sind Kopplungen der Methoxygruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.35$ zur CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 2.81$ und $\delta_{\text{C}} = 80.4$ zu beobachten. Weiterhin koppelt eine Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.26$ und $\delta_{\text{C}} = 18.6$) mit der CH-Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.31$ und $\delta_{\text{C}} = 74.6$. Somit läßt sich folgende, dem Septamycin (**42**) ähnliche Teilstruktur (I) formulieren (Abb. 18).

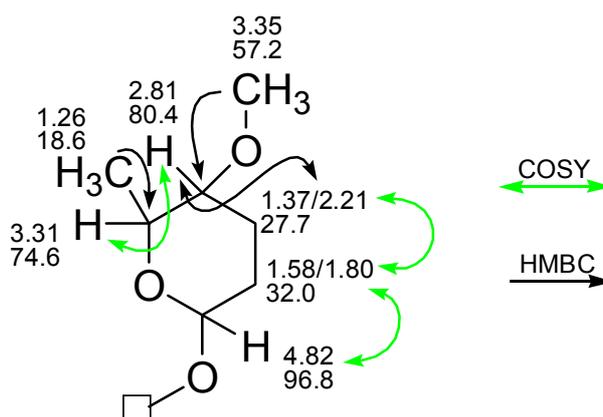


Abbildung 18: Teilstruktur I des isolierten Naturstoffs **43**.

Das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 2.62$ entspricht einem Proton und koppelt mit dem Carbonylkohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 177.6$, mit einer Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.10$ und $\delta_{\text{C}} = 10.9$) sowie mit einem sp^3 -hybridisierten Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 99.6$. Eine weitere

Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.00$ und $\delta_{\text{C}} = 12.1$) koppelt mit dem Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 99.6$, wie auch mit $\delta_{\text{C}} = 40.5$ und 88.2 . Eine dritte Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.22$ und $\delta_{\text{C}} = 10.3$) zeigt Kopplungen mit $\delta_{\text{C}} = 88.2$ und 69.3 .

Das zusätzliche Signal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei $\delta_{\text{H}} = 3.20$ zeigt lediglich eine HMBC-Korrelation zum quartären Kohlenstoff C-3 ($\delta_{\text{C}} = 99.6$). Diese Beobachtung führt im Vergleich zu Septamycin (**42**) zu dem Unterschied, daß die Hydroxygruppe in C-3 methyliert ist. Folglich läßt sich die Teilstruktur (II) formulieren (Abb. 19).

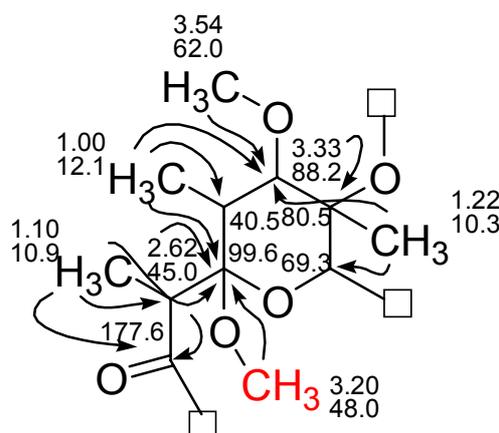
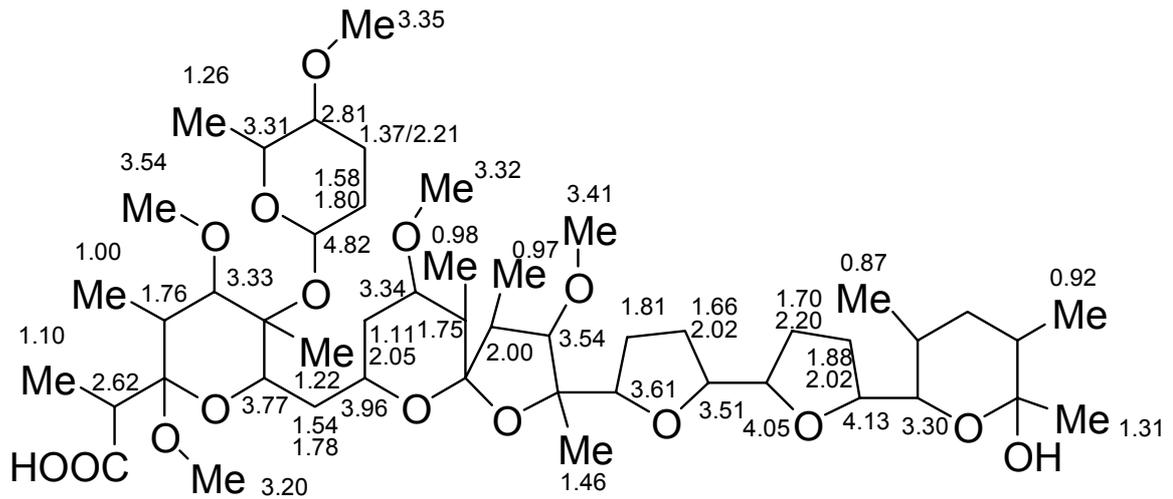
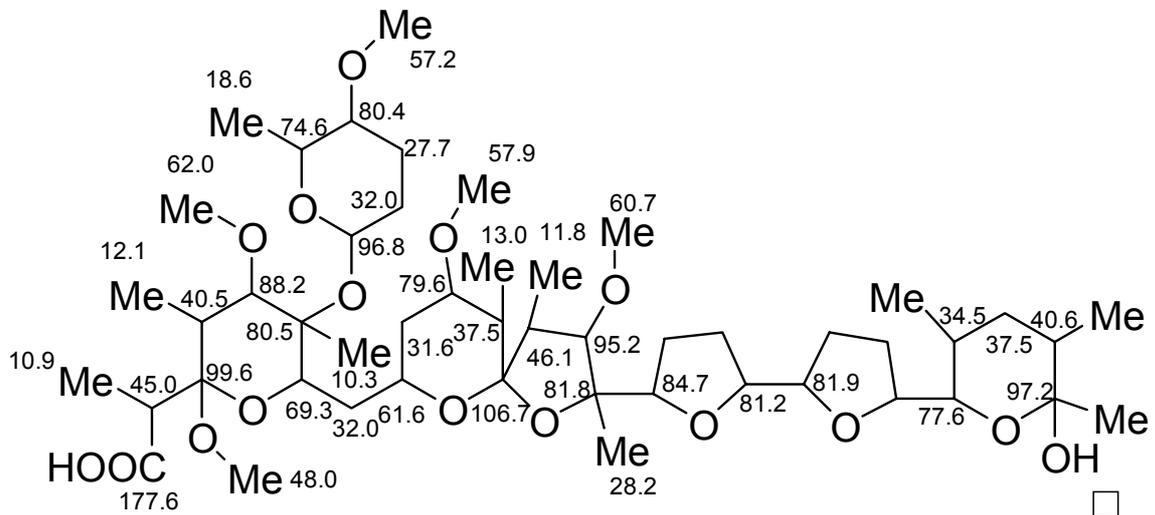


Abbildung 19: Teilstruktur II des isolierten Naturstoffs **43** mit HMBC Korrelationen.

In Anlehnung an die bereits zugeordneten NMR-Verschiebungen für Septamycin (**42**) lassen sich die 2D-NMR-Spektren des isolierten Naturstoffs **43** weiter auswerten. Weitere Rückschlüsse auf die Konstitution des Polyether-Antibiotikums können aus dem niederaufgelösten ESI-Massenspektrum gezogen werden. Die ermittelte Masse von **43** ($m/z = 928$) unterscheidet sich um 14 Masseneinheiten von Septamycin (**42**). Dies entspricht einer CH_2 -Einheit. Das im hochaufgelösten Massenspektrum detektierte Signal bei $m/z = 951.5459$ charakterisiert das Molekülion $[\text{M} + \text{Na}]^+$ und entspricht einer Summenformel von $\text{C}_{49}\text{H}_{84}\text{NaO}_{16}$. Das zusätzliche Singulett im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum bei $\delta_{\text{H}} = 3.20$ und dessen Tieffeldverschiebung deutet auf das Vorliegen einer weiteren Methoxygruppe. Berücksichtigt man nun diese Beobachtungen, so gelangt man zu der Schlußfolgerung, daß bei **43** im Vergleich zu Septamycin (**42**) eine schon vorliegende Hydroxygruppe gegen eine Methoxygruppe ausgetauscht wurde. Für den neuen isolierten Naturstoff soll demnach 3-O-Methylseptamycin (**43**) als Strukturvorschlag postuliert werden (Abb. 20).



43 (a)



43 (b)

Abbildung 20: ^1H -NMR- (a) und ^{13}C -NMR-Verschiebungen (b) für 3-O-Methylseptamycin (43).

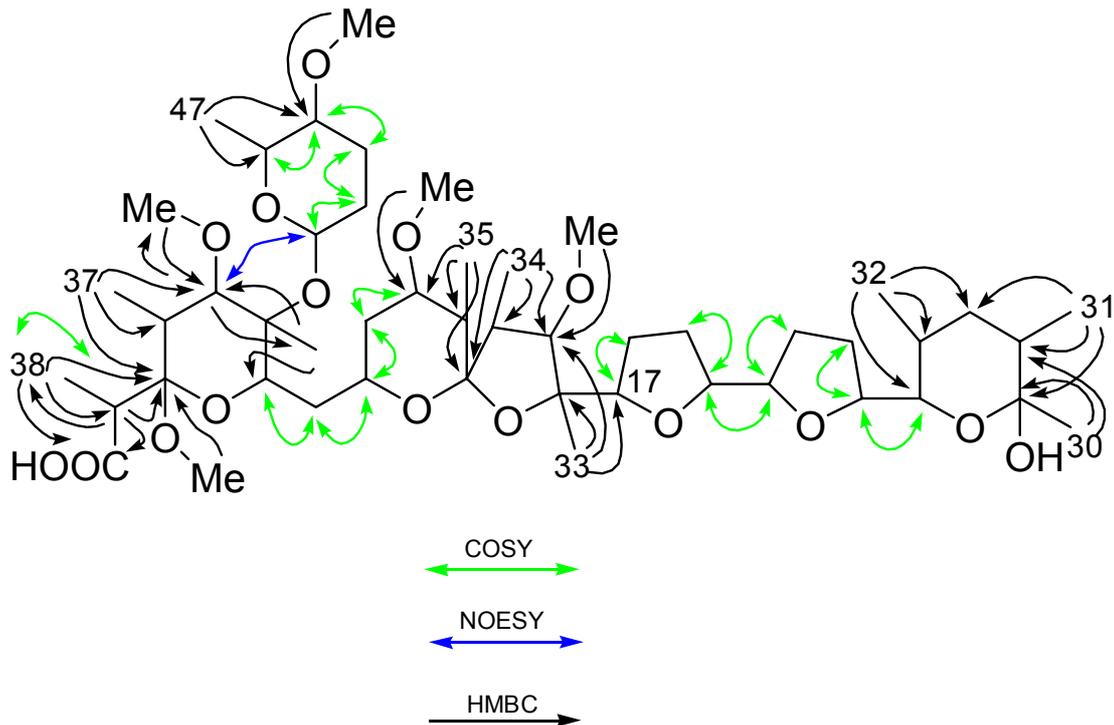


Abbildung 21: HMBC-, COSY- und NOESY-Kopplungen von 3-O-Methylseptamycin (**43**).

Aufgrund der geringen Menge an isoliertem Naturstoff **43** konnte für den äußeren Tetrahydropyranring (C-25-C29) keine eindeutigen Zuordnungen getroffen werden. Während die Kopplungen der Methylgruppen (C-30, C-31, C-32) zu den jeweiligen Kohlenstoffatomen im HMBC gut zu identifizieren waren, konnte den Signalen bei $\delta_C = 37.5$ (CH₂), 34.5 (CH) und 40.6 (CH) im HSQC-Spektrum kein eindeutiges Protonensignal zugewiesen werden.

Die Identifizierung der Tetrahydrofuranringe C17-C24 war, wie schon beim isolierten Septamycin (**42**), ausschließlich durch die Auswertung des COSY-Spektrums zu erreichen.

Tabelle 4: Identifizierte NMR-spektroskopische Daten des isolierten Naturstoffs **43**, HMBC- und COSY-Korrelationen beziehen sich auf die Positionsnummern.

Position	δ_C [ppm]	δ_H [ppm] (mult., J_{HH} [Hz])	HMBC	COSY
1	177.6			
2	45.0	2.62 (q, 7.2)	1, 3, 38	38
3	99.6			
4	40.5	1:76		
5	88.2	3.33	36; 41	42 (NOE)
6	80.5			
7	69.3	3.77 (dd, 12.0, 1.7)		8
8	32.0	1.54/1.78		7, 9
9	61.6	3.96 (m, 11.2, 1.8)		8, 10
10	31.6	1.11/2.05		9, 11
11	79.6	3.34		
12	37.5	1.75		
13	106.7			
14	46.1	2.00		
15	95.2	3.54		
16	81.8			
17	84.7	3.61		
18		1.81		
19		1.66/2.02		
20	81.2	3.51		
21	81.9	4.05		
22		1.70/2.20		
23		1.88/2.02		
24		4.13		
25	77.6	3.30		
26	34.5			
27	37.5			
28	40.6			
29	97.2			
30		1.31	28, 29	
31		0.92	27, 29	
32		0.87	25, 26, 27	
33	28.2	1.46	15, 16, 17	
34	11.8	0.97	13, 14, 15	
35	13.0	0.98	11, 12, 13	
36	10.3	1.22	5, 6, 7	
37	12.1	1.00	3, 4, 5	
38	10.9	1.10	1, 2, 3	
39	60.7	3.41	15	
40	57.9	3.32	11	
41	62.0	3.54	5	
42	96.7	4.82		43, 5 (NOE)
43	32.0	1.58/1.80		42, 44
44	27.7	1.37/2.22		43, 45
45	80.4	2.81 (m, 5.1, 4.7, 2.0)		44, 46

46	74.6	3.31		45
47	18.6	1.26	45, 46	
48	57.2	3.35	45	
49	48.0	3.20	3	

Vergleicht man die beobachteten NMR-Verschiebungen des neuen isolierten Naturstoffs **43** mit denen des Septamycins (**42**), werden einige Veränderungen der ^1H -NMR-Verschiebungen ersichtlich (Abb. 22, 23). Auch Protonen in einiger Entfernung von der substituierten Hydroxylgruppe weisen erstaunliche Unterschiede hinsichtlich ihrer ^1H -NMR-Verschiebungen im Vergleich mit den entsprechenden Protonen des Septamycins (**42**) auf.

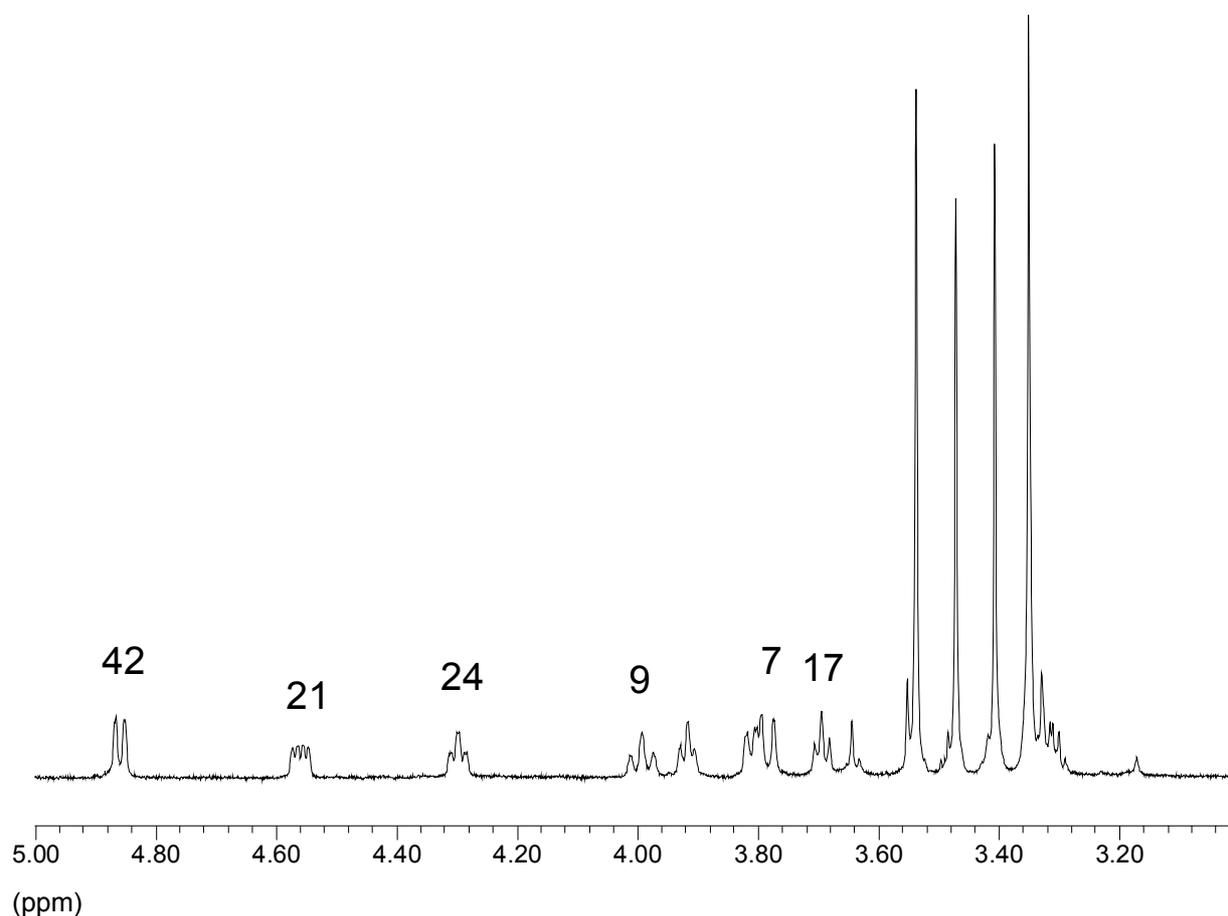


Abbildung 22: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von Septamycin (**42**).

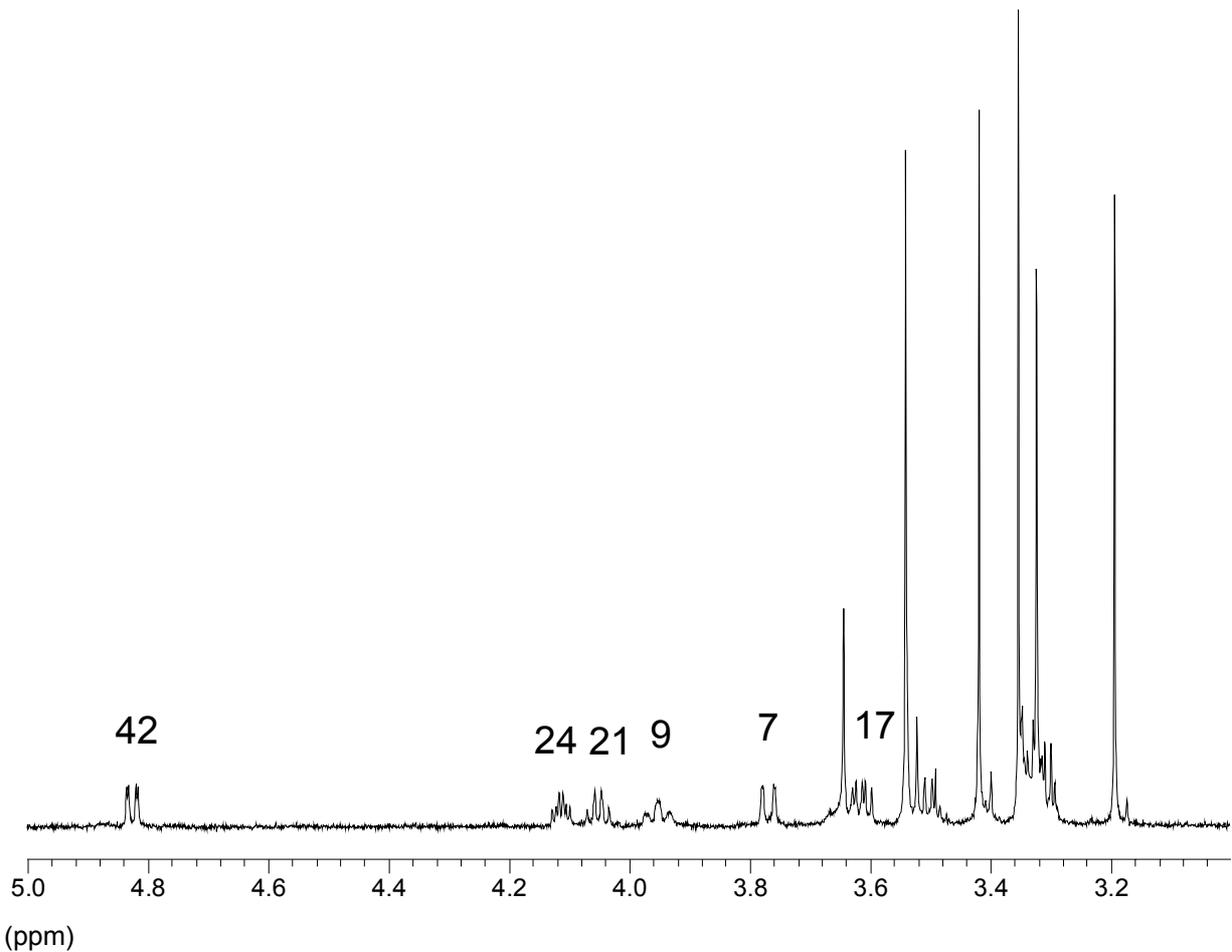


Abbildung 23: Ausschnitt aus dem $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 3-O-Methylseptamycin (**43**).

Betrachtet man die strukturell unveränderten Tetrahydrofuranringe C-17 bis C-24 von **43**, können Abweichungen zu Septamycin, vorliegend als freie Säure, zwischen 0.1 und 0.5 ppm beobachtet werden (Abb. 24).

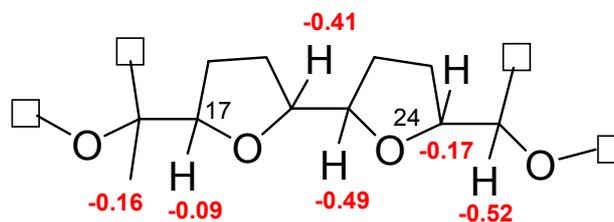


Abbildung 24: Molekülausschnitt mit den Abweichungen von **43** zu Septamycin (frei Säure) im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum [ppm].

Vergleicht man die $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungen von Septamycin (**42**) in Form der freien Säure und als Natriumsalz, so kann man schon hier für die untersuchten Tetrahydrofuranringe gewisse Unterschiede beobachten (Abb. 25).

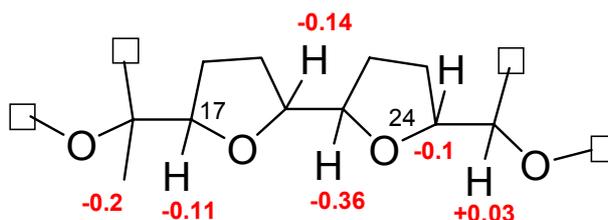


Abbildung 25: Molekülausschnitt, $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Differenzen Septamycin (**42**) freie Säure – Natriumsalz [ppm],

Während der überwiegende Anteil der Protonensignale von 3-O-Methylseptamycin (**43**) sich nicht wesentlich von Septamycin (**42**) unterscheidet, sind die deutlichsten Abweichungen im Bereich der Tetrahydrofuranringe zu beobachten. Bereits die Gegenüberstellung der freien Säure und des Natriumsalzes führt zu einer Abweichung der $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebung von -0.36 ppm bei 21-H. Die Unterschiede einiger Protonensignale des 3-O-Methylseptamycins (**43**) zu denen des Septamycins (**42**) könnten durch auftretende Unterschiede der Konformationen hervorgerufen werden. Es wird für die Polyether-Antibiotika eine „Hufeisenform“ beschrieben, die durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonsäure und der Hydroxygruppe in C-29 stabilisiert wird. Durch die Einführung einer Methoxygruppe in Position C-3 wird die Wasserstoffbrückenbindung möglicherweise gestört, wodurch eine Veränderung der Konformation hervorgerufen werden könnte. Folglich sollten sich die Signale einiger Protonen durch Änderung ihrer räumlichen Umgebung verschieben.

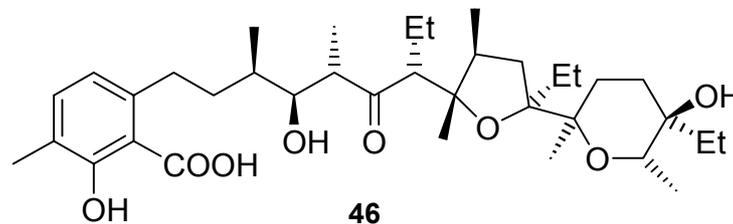
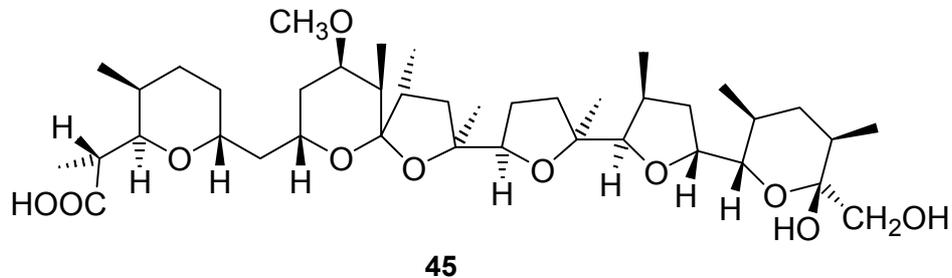
6.5 Zusammenfassung

Septamycin (**42**) und 3-O-Methylseptamycin (**43**) gehören zur Gruppe der Polyether-Antibiotika. Zum ersten Mal wurde Septamycin (**42**) 1975 von Keller-Juslén et al. aus dem Bakterium *Streptomyces hygrosopicus* isoliert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals die Isolierung von Septamycin (**42**) aus einer marinen Quelle berichtet werden. Weiterhin gelang die Isolierung eines neuen Naturstoffs, der als 3-O-Methylseptamycin (**43**) beschrieben werden konnte.

Eine Aktivität 3-O-Methylseptamycin (**43**) gegen das Bakterium *S. aureus* bleibt abzuwarten.

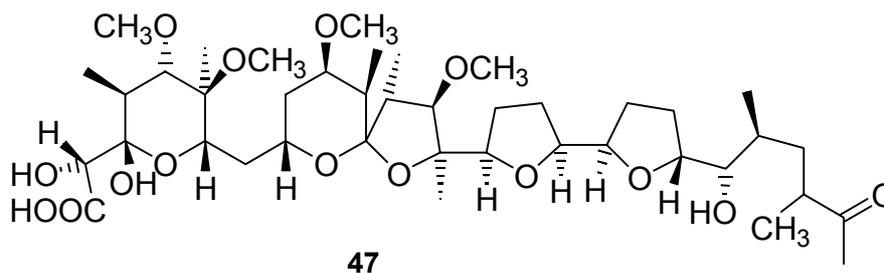
6.6 Struktur und biologische Aktivität von Polyether-Antibiotika

Die Entwicklung auf dem Gebiet dieser interessanten Verbindungsklasse begann bereits 1951 mit der Entdeckung der Antibiotika Nigericin (**45**) und Lasalocid (**46**).^{58,65}



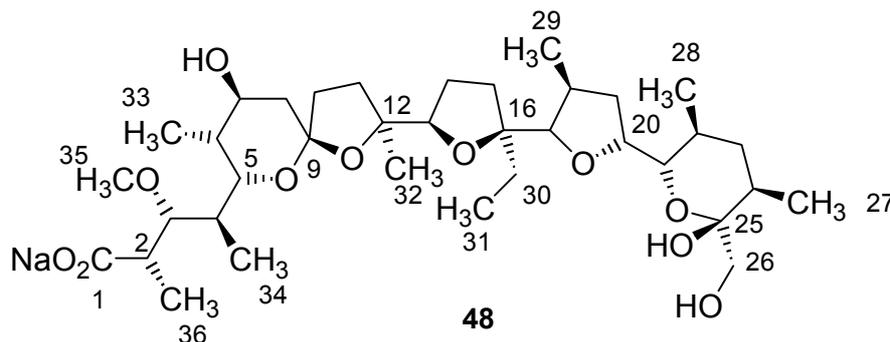
Bisher sind über 120 Polyether-Antibiotika identifiziert worden, überwiegend aus Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces*. Daneben gibt es aber auch eine geringe Anzahl von Antibiotika, die von Meeresorganismen wie Schwämmen oder Dinoflagellaten synthetisiert werden. Hierzu gehören unter anderem die Brevetoxine (*Ptychodiscus brevis*, Feueralge), die Bryostatine, das Palytoxin (*Palythoa toxica*, Krustenanemone) und das erst vor kurzem entdeckte Maitotoxin (**9**).

Ein Vertreter der Polyether-Antibiotika, der aus einem marinen Mikroorganismus isoliert wurde ist die pentacyclische Arenarsäure ("arenaric acid", **47**). Sie konnte 1999 von Cheng et al. aus dem marinen Sedimentbakterium *Streptomyces* sp. isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt werden.⁶⁶



6.6.1 Biosynthese der Polyether-Antibiotika am Beispiel von Monensin

Besonders intensiv wurde der biosynthetische Ursprung von Monensin A (**48**) untersucht, da die Verbindung breite Anwendung in der Veterinärmedizin findet. Die Polyether-Antibiotika charakterisieren sich durch die Anwesenheit von Tetrahydrofuran- und/oder -pyranringen und sind Abkömmlinge der Polyketidbiosynthese. Die Bruttozusammensetzung der Mehrzahl der bisher bekannten Polyether-Antibiotika kann mit der allgemeinen Formel $(C_{3-4}H_{5-7}O)_n$ mit $n = 9-15$ beschrieben werden.⁶⁷ Wie durch Inkorporationsexperimente mit markierten Vorstufen der Polyether-Antibiotika (Acetat, Propionat, Butyrat), sowie durch nachfolgenden Abbau und NMR-Untersuchungen ermittelt wurde, erfolgt die Biogenese der Antibiotika ohne Ausnahme durch Kopf-Schwanz-Verknüpfung von Acetyl- oder Propionyl-CoA-Einheiten als Starter mit den entsprechenden aktivierten Bausteinen Malonyl-, Methylmalonyl- und Ethylmalonyl-CoA über den Polyketidweg.



Erste Biosynthesestudien durch ¹³C-markierte Vorläufer und anschließenden Abbau des gebildeten Monensins A (**48**) zeigte, daß das Kohlenstoffgerüst aus fünf Acetat, sieben Propionat und einem Butyrat Molekül aufgebaut wird (Abb. 26).

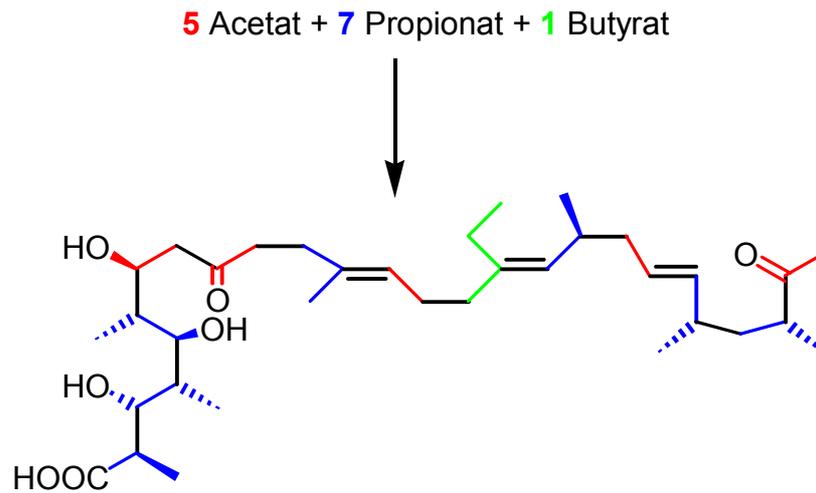


Abbildung 26: 1. Biosyntheseschritt von Monensin A (**48**)

Cane et al. untersuchten die Quelle der vorliegenden Sauerstoffatome durch Inkorporation von $[1-^{18}\text{O}_2, 1-^{13}\text{C}]$ Propionat oder $[1-^{18}\text{O}_2, 1-^{13}\text{C}]$ Acetat zum Fermentationsmedium.⁶⁸ Sie konnten nachweisen, daß sich sechs Sauerstoffatome direkt von den Carboxylat-Sauerstoffatomen der Bausteine Acetat und Propionat ableiten. Nach Bildung des Grundgerüsts erfolgt eine dreifache Epoxidierung mit molekularem Sauerstoff. Eine kaskadenähnliche Reaktion, ausgehend von der Hydroxylgruppe in C-5 an das C-9, führt schließlich zu den Ringschlüssen, die in fünf Etherringen resultiert (Abb. 27).

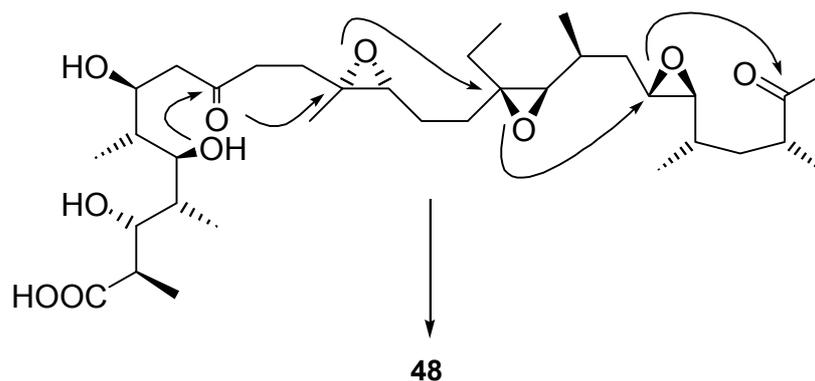


Abbildung 27: Epoxid-Kaskade zu Monensin (**48**).

6.6.2 Wirkprinzip der Polyether-Antibiotika

Polyether-Antibiotika werden aufgrund ihrer Fähigkeit, mit ein- oder zweiwertigen Kationen lipidlösliche Komplexe bilden zu können, auch Ionophor-Antibiotika genannt. Die Komplexbildung erfolgt in der Regel durch Chelatisierung von Kationen über die freien Elektronenpaare. Monensin A (**48**) und Septamycin (**42**) bevorzugen Na⁺-Ionen, Monensin A (**48**) jedoch mit einer höheren Affinität als **42**. Die zentral gerichtete Orientierung der polaren Bindungsstellen der Polyether-Antibiotika bedingt, daß unpolare Molekülteile die äußere Sphäre des Komplexes bilden und ihm lipophile Eigenschaften verleihen. Diese „Tennisball“-ähnliche Konformation erleichtert die Bindung der Kationen im Innern der Moleküle.

Aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften dringen Polyether-Antibiotika in Biomembrane ein und wirken als Ionencarrier. Dies führt zum unkontrollierten Einstrom ein- und zweiwertiger Kationen aus dem Medium in die Zelle, aber auch zum Ausfluß von Protonen und essentiellen Kationen. Die ausgelösten Veränderungen des elektrochemischen Protonengradienten und die Minimierung der Konzentration bestimmter Kationen werden zelluläre Funktionen von Energiestoffwechsel bis hin zur Hormonwirkung erheblich beeinträchtigt, wodurch schließlich der Zelltod ausgelöst wird.

Polyether-Antibiotika weisen antimikrobielle Wirksamkeit gegen grampositive Bakterien (*Bacillus*, *Staphylokokkus* usw.) auf. Durch ihren Wirkmechanismus sind sie aber auch stark toxisch, und für den therapeutischen Einsatz ungeeignet. Allerdings fanden sie ein breites Anwendungsfeld in der Veterinärmedizin, da sie eine ausgeprägte Aktivität gegen *Eimeria tenella*, dem Auslöser der Kokzidiose, besitzen. Polyether-Antibiotika steigern auch die Effektivität der Futtermittelverwertung der Wiederkäuer durch die Veränderung der Gesamtpopulation der Bakterien im Magen-Darm-Trakt, weshalb z.B. Monensin A (**48**, Rumensin®) oder Lasalocid (Avatec®), dem Mischfutter zugegeben werden.

7 Isolierung von isoprenoiden Sekundärmetaboliten

7.1 Reinigung

Die vierte Fraktion des mittels Säulenchromatographie aufgereinigten Rohextraktes der Kultur des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 lieferte zwei neue Naturstoffe, die die Namen Curcutetraol (**40**) und Curcutriolamid (**41**) erhalten sollen. Die Reinigung erfolgte durch HPL-chromatographische Trennung an RP-18 mit dem Fließmittelgemisch Wasser/Acetonitril. Die abschließende Reinigung der Fraktion 12 wurde HPL-chromatographisch an RP-2 vorgenommen. Es handelt sich bei **40** und **41** um bräunliche Öle, die in unterschiedlichen Konzentrationen im Mikroorganismus vorkommen. Hauptverbindung ist Curcutetraol (**40**) mit einer Ausbeute von 14.8 mg. Curcutriolamid (**41**) konnte in einer Menge von 2.4 mg isoliert werden.

7.2 DC- und HPLC-Analytik

Im Dünnschichtchromatogramm zeigen beide Verbindungen eine Absorption bei 254 nm, aber keine Fluoreszenz bei 366 nm. Nach Tauchen der DC-Platte in eine Anisaldehyd/Schwefelsäure-Lösung und anschließendem Erhitzen lassen sich beide Naturstoffe anfärben. Curcutetraol (**40**) und Curcutriolamid (**41**) färben sich erst grün und danach braun. Das Färbereagenz wird unter anderem zum Nachweis von Zuckern und Terpenen verwendet.⁶⁹

7.2.1 Strukturaufklärung von Curcutetraol

Das niederaufgelöste EI-Massenspektrum von **40** zeigt einen Peak bei $m/z = 268.2$, bei dem es sich um das Molekülion $[M]^+$ handelt. Da die Spaltprodukte eine wesentlich größere Intensität zeigen als der Molekülpeak, konnte dieser erst nach der Strukturaufklärung durch 2D NMR identifiziert werden.

Das UV-Vis-Spektrum von **40** weist Absorptionsmaxima bei 219 und 277 nm auf. Das IR-Spektrum von **40** zeigt eine stark verbreiterte Bande bei 3306 cm^{-1} , welche auf eine OH-Valenzschwingung schließen lässt. Weitere charakteristische Banden bei 2921 und 2851 deuten auf Alkylgruppen (CH-Valenzschwingung). Weiterhin liegen

Banden bei 1429 (C=C-Valenzschwingung von Aromaten), 1296, 1156 und 1032 cm^{-1} vor.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 28) von Curcutetraol (**40**) zeigt Signale eines 1,2,5-trisubstituierten Benzolringes ($\delta_{\text{H}} = 6.74, 6.77$ und 7.10). Das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 6.77$ erscheint als Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten von 1.6 und 7.7 Hz. Das korrespondierende Signal mit der Kopplungskonstanten von $^3J_{\text{HH}} = 7.7$ Hz tritt bei $\delta_{\text{H}} = 7.10$ auf. Der Betrag der Kopplungskonstanten identifiziert eine *ortho*-Kopplung. Charakteristisch für eine *meta*-Kopplung ist eine Kopplungskonstante von $^4J_{\text{HH}} = 1.6$ Hz, wie sie die Signale bei $\delta_{\text{H}} = 6.77$ und 6.74 zeigen.

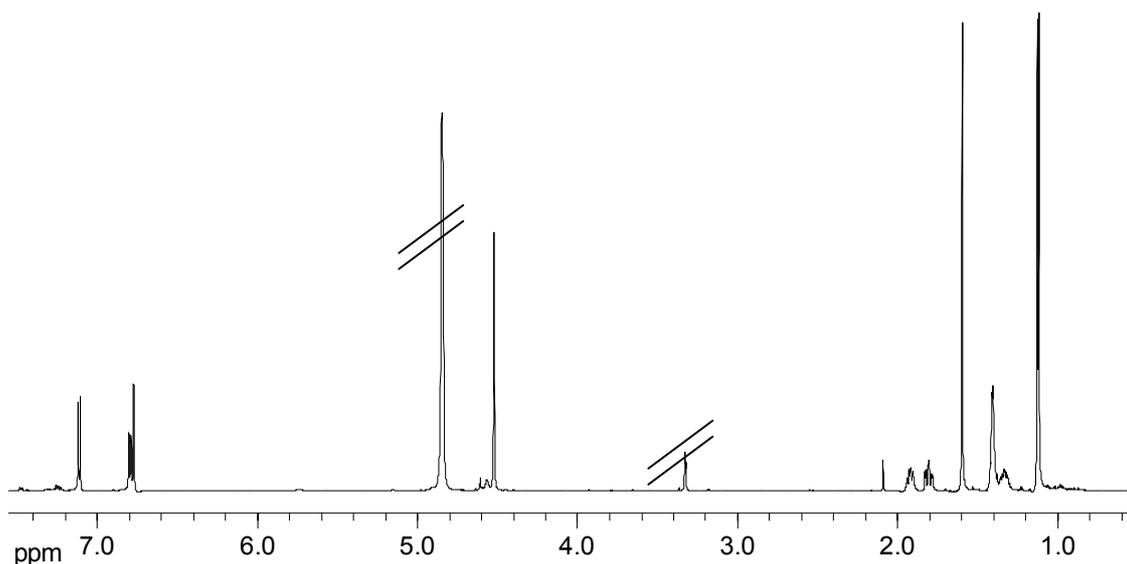


Abbildung 28: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **40** in $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz.

Das Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 4.50$ entspricht einer CH_2 -Gruppe, die aufgrund der starken Tieffeldverschiebung vermutlich durch ein Heteroatom substituiert ist. Weitere drei Singuletts sind bei $\delta_{\text{H}} = 1.09, 1.10$ und 1.58 zu beobachten, die für drei Methylgruppen stehen. Daneben finden sich die diastereotopen Protonen einer CH_2 -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.79$ und 7.91). Die Integration der breiten Signale bei $\delta_{\text{H}} = 1.32$ und 1.39 ergeben insgesamt vier Protonen und entsprechen zwei weiteren CH_2 -Gruppen.

Im $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum (Abb. 29) sind 15 Kohlenstoffsignale detektierbar, die über das DEPT-NMR-Spektrum als fünf quartäre Kohlenstoffatome, drei aromatische CH -, vier CH_2 - und drei CH_3 -Gruppen identifiziert werden können.

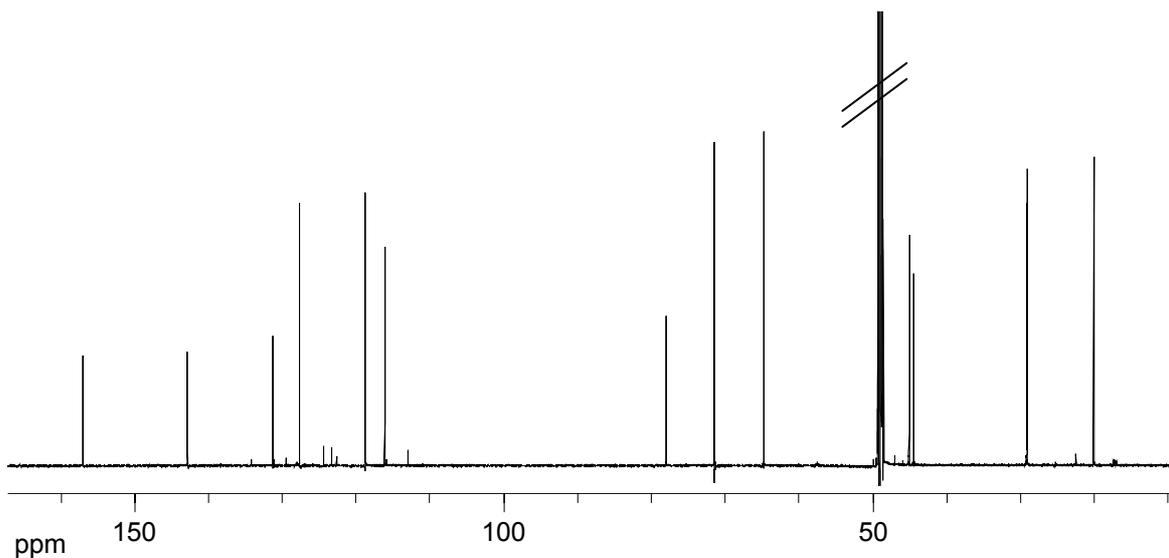


Abbildung 29: ^{13}C -NMR-Spektrum von Curcutetraol (**40**), $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz.

Im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (Abb. 30) ist neben der Kopplung der beiden aromatischen Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 6.77$ und 7.10 eine Kopplung der tieffeldverschobenen Methylengruppe ($\delta_{\text{H}} = 4.50$) mit den beiden aromatischen Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 6.74$ und 6.77 zu beobachten.

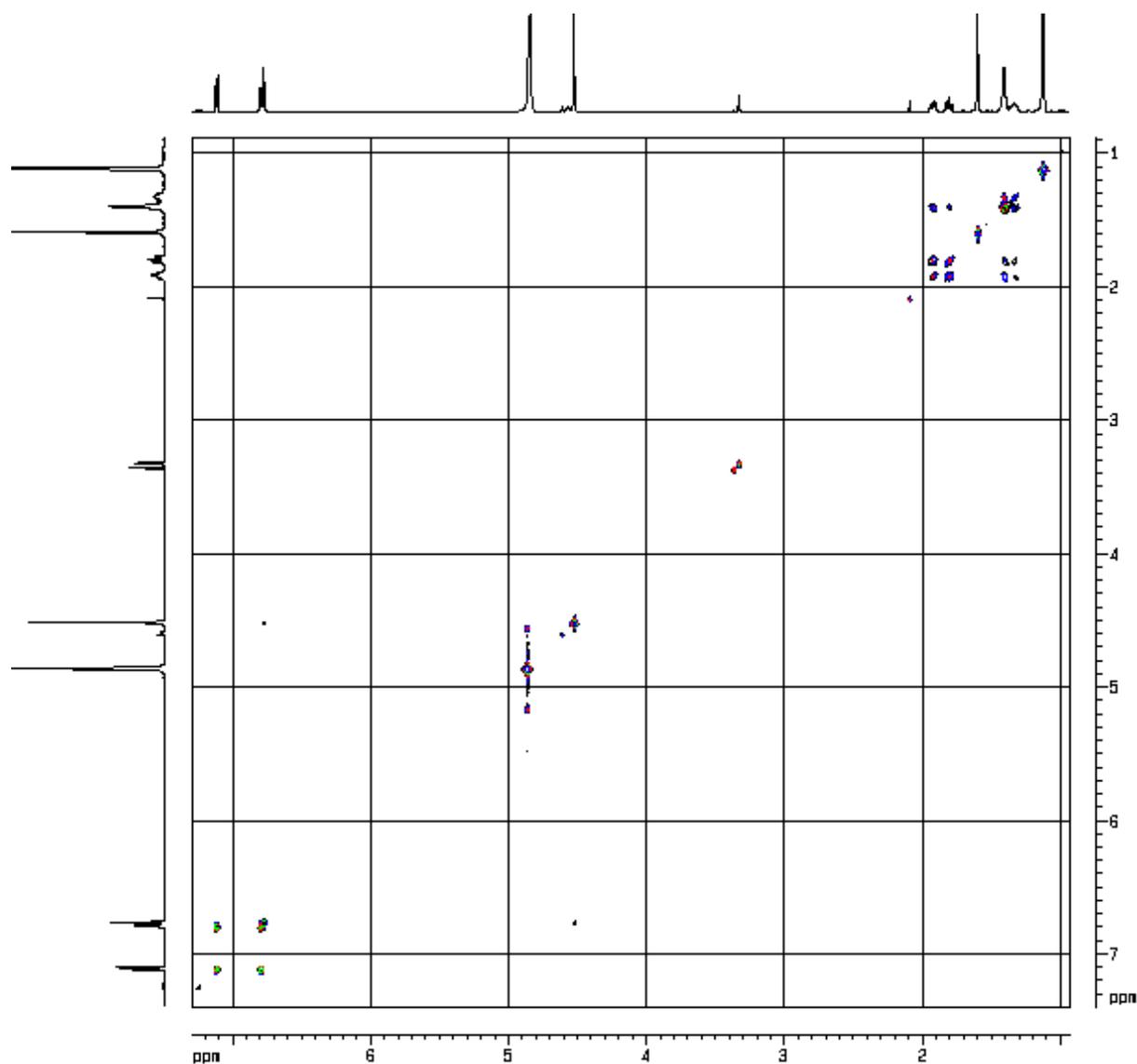


Abbildung 30: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von Curcutetraol (**40**) in $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz.

Die CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.50$ und die CH -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.74$ zeigen im HMBSC-Spektrum (Abb. 31) eine wechselseitige Fernkopplung, sowie eine gemeinsame Kopplung zu der aromatischen CH -Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 118.8$. Weiterhin zeigt die CH -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 6.74$ Kopplungen zu den beiden quartären Kohlenstoffatomen $\delta_{\text{C}} = 157.0$ und 131.3 . Die Protonen der Methylengruppe ($\delta_{\text{H}} = 4.50$) koppeln unter anderem mit dem quartären Kohlenstoff $\delta_{\text{C}} = 142.8$. Das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 6.77$, welches im HSQC-Spektrum dem Kohlenstoffsignal bei $\delta_{\text{C}} = 118.8$ zugeordnet werden konnte, koppelt mit $\delta_{\text{C}} = 116.1$ ($\delta_{\text{H}} = 6.74$) und $\delta_{\text{C}} = 131.3$.

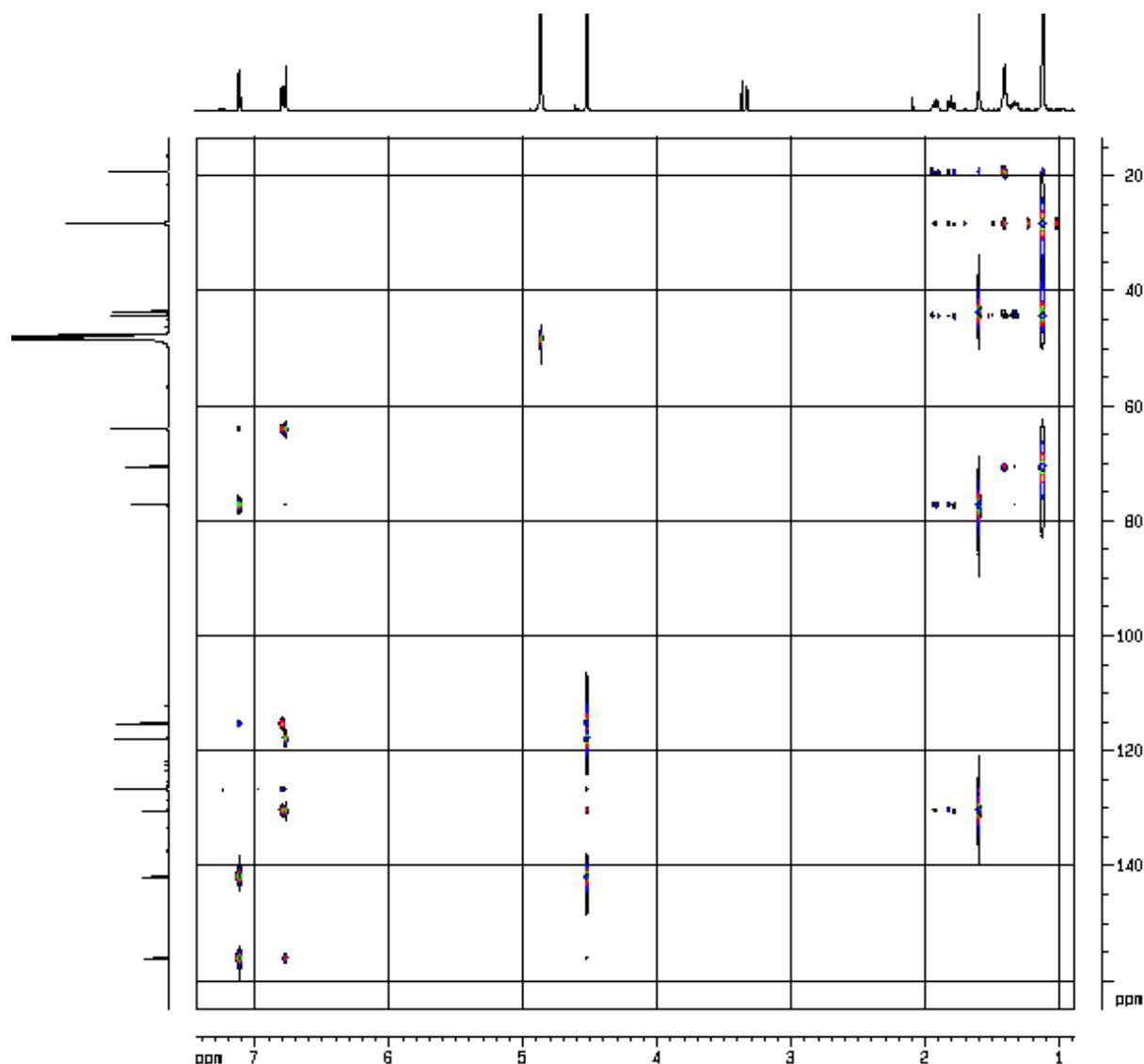


Abbildung 31: HMBC-Spektrum von Curcutetraol (**40**) in $[D_4]$ Methanol, 600 MHz.

Die dritte aromatische CH-Gruppe bei $\delta_H = 7.10$ wurde dem Kohlenstoffsignal bei $\delta_C = 127.6$ zugeordnet und koppelt mit den quartären Kohlenstoffatomen bei $\delta_C = 157.0$ und 78.0 . Die Tieffeldverschiebung des quartären Kohlenstoffs bei $\delta_C = 157.0$ läßt auf ein Heteroatom, wahrscheinlich Sauerstoff, als Substituenten schließen. Auch die NMR-Verschiebungen der Methylengruppe ($\delta_H = 4.50$ und $\delta_C = 64.8$) deuten auf ein Sauerstoffatom als weiteren Substituenten. Somit läßt sich das erste Strukturfragment formulieren (Abb. 32).

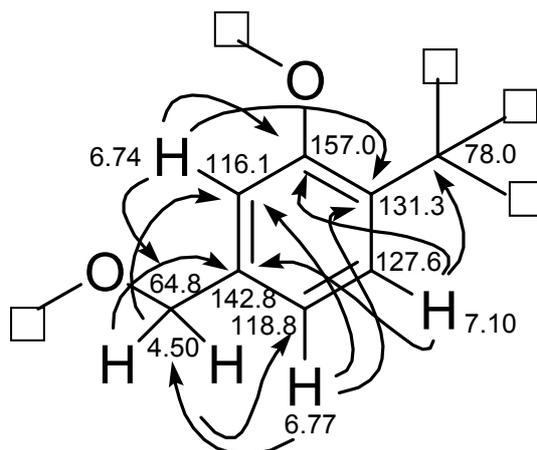


Abbildung 32: Strukturfragment I von **40** mit HMBC-Kopplungen.

Durch die weitere Auswertung des ^1H - ^1H -COSY-Spektrums lassen sich die drei restlichen CH_2 -Gruppen ($\delta_{\text{H}} = 1.32, 1.39$ und $1.79/1.91$) in eine Kette reihen. An einem Ende befindet sich die Methylengruppe mit den diastereotopen Protonen $\delta_{\text{H}} = 1.79$ und 1.91 . Die beiden CH_3 -Gruppen bei $\delta_{\text{H}} = 1.09$ und 1.10 zeigen Fernkopplungen zu einer Methylengruppe bei $\delta_{\text{C}} = 45.1$ ($\delta_{\text{H}} = 1.39$), die das andere Ende der CH_2 -Kette darstellt. Außerdem koppeln die Methylgruppen mit dem quartären Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 71.4$, dessen Tieffeldverschiebung vermutlich durch die Substitution eines weiteren Heteroatoms hervorgerufen wird.

Die dritte Methylgruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.58$) koppelt mit $\delta_{\text{C}} = 131.3$ und 78.0 sowie der diastereotopen Methylengruppe ($\delta_{\text{H}} = 1.79/1.91$ und $\delta_{\text{C}} = 44.6$). Anhand dieser Informationen läßt sich das zweite Strukturfragment (Abb. 33) formulieren.

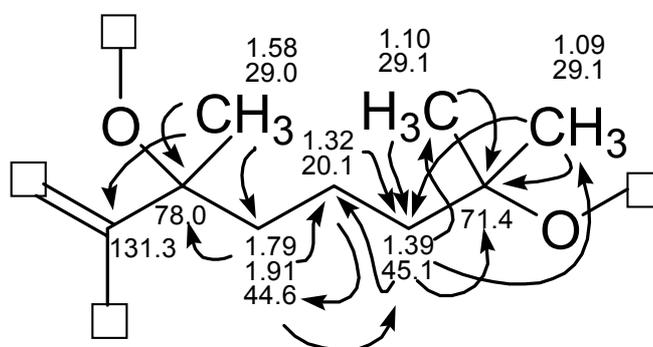
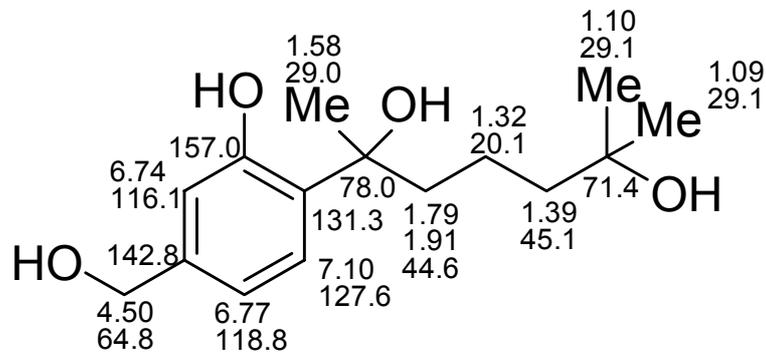
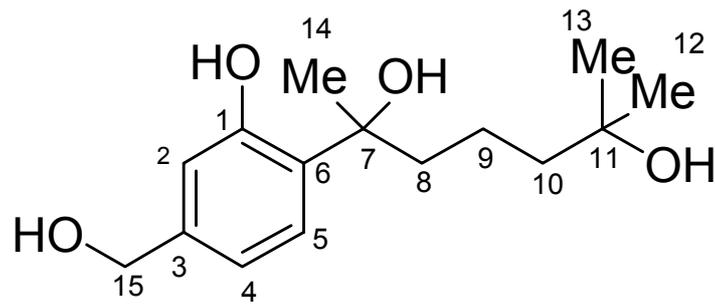


Abbildung 33: Strukturfragment II von **40** mit HMBC-Kopplungen.

Fügt man beide Teilfragmente zusammen, so ergibt sich für Curcutetraol (**40**) folgender Strukturvorschlag (Abb. 34). Durch das hochaufgelöste Massenspektrum läßt sich die Schlußfolgerung, daß es sich bei den Heteroatomen jeweils um Sauerstoff handelt, verifizieren und die Summenformel von $C_{15}H_{24}O_4$ bestätigen.



40 (a)



40 (b)

Abbildung 43: Struktur von Curcutetraol (**40**) mit NMR-Verschiebungen (**a**) und Numerierung (**b**).

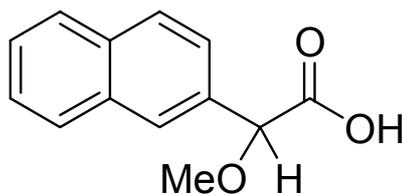
Bei der isolierten neuen Verbindung Curcutetraol (**40**) handelt es sich um ein vierfach hydroxyliertes aromatisches Sesquiterpen mit einem Bisabolan-Grundgerüst.

Tabelle 5: NMR-spektroskopische Daten von Curcutetraol (**40**), HMBC- und COSY-Korrelationen beziehen sich auf die Positionsnummern.

Position	δ_C [ppm]	δ_H [ppm] (mult., J_{HH} [Hz], Integr)	HMBC	COSY
1	157.0			
2	116.1	6.74 (d, 1.6, 1H)	1, 4, 6, 15	15
3	142.8			
4	118.8	6.77 (dd, 7.7, 1.6, 1H)	2, 15, 6	5, 15
5	127.6	7.10 (d, 7.7, 1H)	1, 2, 3, 7	4
6	131.3			
7	78.0			
8	44.6	1.79, 1.91 (m, 11.3, 4.5, 1.2, 2H)	6, 7, 9, 10, 14	8, 9, 10
9	20.1	1.32 (br, 2H)	8, 10	8, 10
10	45.1	1.39 (br, 2H)	8, 9, 11, 12, 13	8, 9
11	71.4			
12	29.1	1.09 (s, 3H)	10, 11	
13	29.1	1.10 (s, 3H)	10, 11	
14	28.3	1.58 (s, 3H)	6, 7, 8	
15	64.8	4.50 (s, 2H)	2, 3, 4	2, 4

7.2.2 Konfiguration von Curcutetraol und Problemstellung

Der tertiäre Alkohol in Position C-7 bildet das stereogene Zentrum des Naturstoffs Curcutetraol (**40**). Im Gegensatz zu sekundären Hydroxylgruppen, deren Konfigurationsbestimmung mit Hilfe der Mosher-Methode durch Veresterung des Alkohols mit (*R*)- und (*S*)-MTPA (2-Methoxy-2-phenyl-2-(trifluormethyl)essigsäure) und anschließender ^1H -NMR-spektroskopischer Untersuchung schon zu den Standardmethoden gehört,^{70,71} stellt die Aufklärung der absoluten Konfiguration tertiärer Hydroxylgruppen immer noch ein Problem dar. Takahashi et al. beschrieben eine Möglichkeit der Konfigurationsaufklärung von tertiären Alkoholen unter Verwendung von 2-NMA [**49**, Methoxy-(2-naphthyl)essigsäure], einem Derivat der Moshersäure.⁷²

**49**

Die Anwendbarkeit dieser Methode ist jedoch auf wenige Verbindungen beschränkt. Es muß sich um einen aliphatischen tertiären Alkohol handeln. Weiterhin muß das α -Carbinol-C-Atom durch eine Methylgruppe substituiert sein. Ein weiteres Kriterium ist das Vorhandensein von Methylenprotonen in Nachbarschaft zum stereogenen Kohlenstoff, wodurch die Anwendbarkeit der Methode noch weiter eingeschränkt wird. Folgende Abbildung zeigt zwei Modellmoleküle (**50**, **51**), deren Konfigurationsaufklärung nach Derivatisierung mit dem Mosher-Derivat 2-NMA (**49**) gelungen ist (Abb. 35).

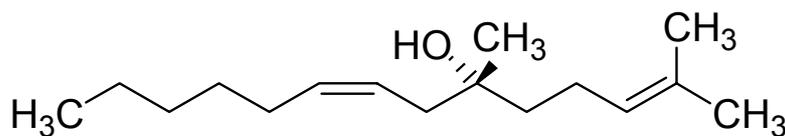
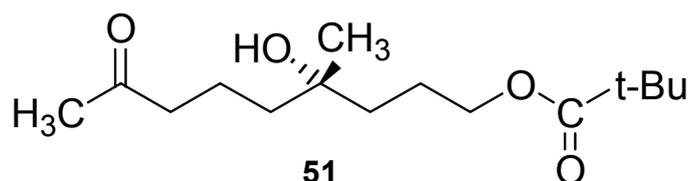
**50****51**

Abbildung 35: Tertiäre Alkohole (**50**, **51**), für die eine Aufklärung des stereogenen Zentrums mit 2-NMA (**49**) möglich ist.

Es ist anzunehmen, daß aufgrund der sterischen Hinderung der tertiären Hydroxygruppe von Curcutetraol (**40**) durch einen phenolischen Alkohol die Methode nach Takahishi nicht angewendet werden konnte. Des weiteren würden die primäre und phenolische Alkoholgruppe von **40** ihrerseits mit 2-NMA reagieren, so daß eine Auswertung, besonders beim Einsatz geringer Mengen, nicht möglich wäre.

7.2.2.1 Ableitung der absoluten Konfiguration durch Drehwertvergleich

Die Bestimmung der Konfiguration konnte folglich nicht durch chemische Derivatisierung erfolgen. Daher sollte zunächst durch Vergleich des Drehwertes von (+)-Curcutetraol (**40**) mit Literaturdaten strukturell ähnlicher, synthetisierter Verbindungen ein Anhaltspunkt hinsichtlich der Konfiguration erhalten werden.



$S(-)$, $[\alpha]_D^{20} = -14.8$ (Ethanol, c 1.61), $S(-)$, $[\alpha]_{546}^{24} = -8.39$ (Ethanol, c 1.0)
 -16.7 (Chloroform, c 1.45),
 -15.9 (Aceton, c 1.50)

Abbildung 36: Synthetisierte Verbindungen (-)-**52** und (-)-**53**.

Verbindung (-)-**52** wurde von Archelas et al. synthetisiert und der Drehwert in verschiedenen Lösungsmitteln gemessen. Es zeigte sich, daß die (S)-Konfiguration in jedem verwendeten Lösungsmittel (Ethanol, Chloroform, Aceton) auch in unterschiedlichen Konzentrationen einen negativen Drehwert besitzt (Abb. 36).⁷³

Während **52** keine phenolische Hydroxygruppe enthält, unterscheidet sich die von Casiraghi et al. synthetisierte Verbindung **53** durch die Anwesenheit einer Hydroxymethylgruppe am stereogenen Zentrum sowie einer phenolischen Hydroxygruppe.⁷⁴ Auch (S)-**53** besitzt einen negativen Drehwert. Da die isolierte Verbindung Curcutetraol (**40**) einen positiven Drehwert besitzt ($[\alpha]_D^{20} = +5.24$ (c = 0.0074, Methanol)), liegt nach Vergleich mit den strukturell ähnlichen Verbindungen **52** und **53** die Vermutung nahe, daß es sich im Falle von **40** um eine (R)-Konfiguration handeln könnte.

7.2.2.2 *Ableitung der absoluten Konfiguration durch CD-Berechnung*

Zur Überprüfung der Schlußfolgerungen aus dem Drehwertvergleich wurde eine Konfigurationsaufklärung durch quantenchemische CD-Rechnungen durchgeführt.^c

Bei der Circular-Dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) handelt es sich um eine einfache und schnelle Methode, die den Vorteil besitzt, daß sie direkt zwischen zwei Enantiomeren unterscheiden kann. Üblicherweise wird versucht, die aufgenommenen CD-Spektren mit denen strukturell ähnlicher Verbindungen zu vergleichen, oder die Spektren anhand von empirischen oder semiempirischen Methoden zu interpretieren. Allerdings sind die bekannten Oktanten- und Sektoren-Regeln oder die Bestimmung der Excitonischen Chiralität auf bestimmte Substanzklassen beschränkt.^{75,76,77} Eine Alternative zu diesen Methoden stellt die quantenchemische Berechnung des CD-Spektrums der Verbindung und der anschließende Vergleich mit dem Experiment dar.

Zu Beginn der quantenchemischen Berechnung wird eine Konformationsanalyse durchgeführt, deren Ziel es ist, alle Konformere von **40** mit einem energetischen Minimum aufzufinden. Für jede Minimumstruktur wird im folgenden ein CD-Spektrum berechnet. Die Überlagerung dieser Einzel-CD-Spektren führt im Anschluß zum Gesamt-CD-Spektrum von **40**. Parallel zur Berechnung des CD-Spektrums erfolgt die Berechnung des UV-Spektrums, und durch den Vergleich dieses theoretischen UV-Spektrums mit dem experimentellen kann der „UV-Shift“ ermittelt werden.⁷⁸ Durch die im Zuge der quantenchemischen Berechnung gemachten Näherungen und Vereinfachungen wird diese Korrektur nötig und auch für das Gesamt-CD-Spektrum durchgeführt. Abschließend erfolgte der Vergleich des korrigierten theoretischen CD-Spektrums mit dem experimentell aufgenommenen und die Zuordnung der absoluten Konfiguration.

Der Vergleich des mit dem CNDO/2S-Ansatz berechneten CD-Spektrums mit dem experimentell ermittelten ließ noch keine eindeutige Aussage hinsichtlich der absoluten Konfiguration von **40** zu (Abb. 37). Allerdings suggerierte die Gegenüberstellung eher eine (S)-Konfiguration, da das für (S)-**40** berechnete Spektrum in den gleichen Wellenlängenbereichen Maxima aufwies.

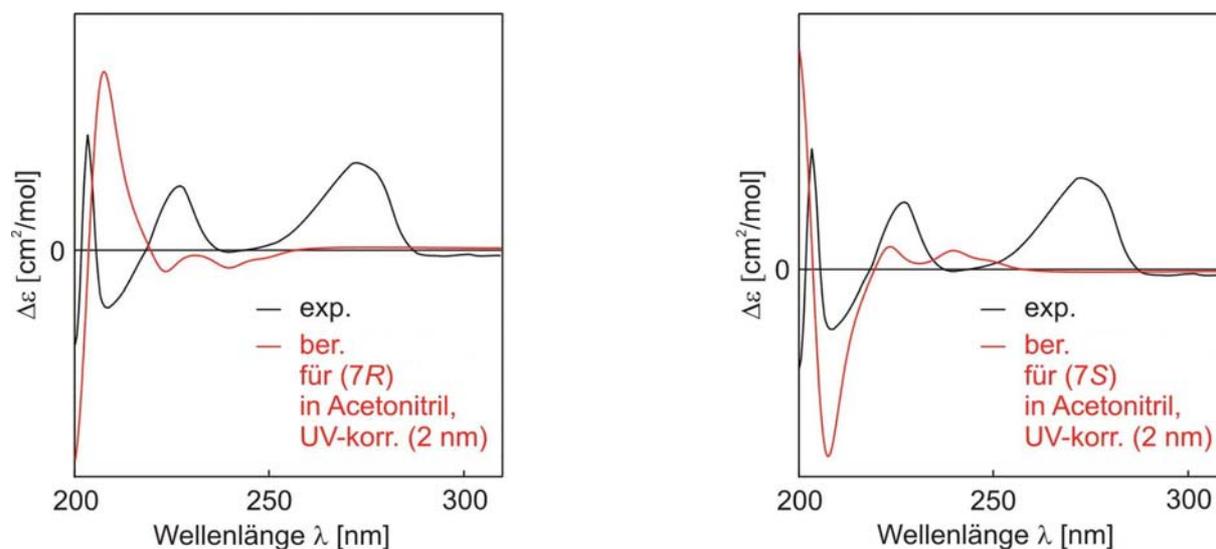


Abbildung 37: Vergleich der mit dem CNDO/2S-Ansatz berechneten Gesamt-CD-Spektren für (7R)-**40** (links) und (7S)-**40** (rechts) mit dem experimentellen CD-Spektrum von **40**.

Um diesen ersten Hinweisen genauer nachzugehen, wurde im folgenden die OM2-Methode herangezogen. Sie verwendet einen gegenüber der CNDO/2S-Methode optimierten Parametersatz und simuliert die Lösungsumgebung. Nach Berücksichtigung des Lösungsmittels Acetonitril beobachtete man ein nahezu spiegelbildliches Verhalten zwischen dem experimentellen CD-Spektrum und der CD-Rechnung für (7R)-**40** (Abb. 38, links) sowie in Konsequenz die gute Übereinstimmung zwischen gemessener und für (7S)-**40** simulierter Kurve (Abb. 38, rechts).

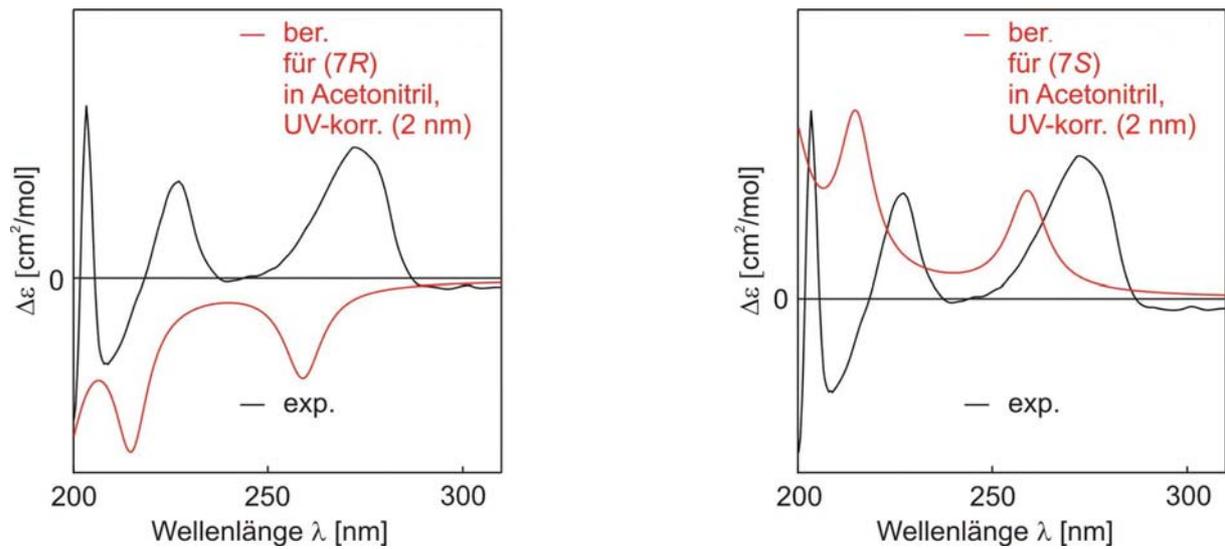


Abbildung 38: Vergleich der mit dem OM2-Ansatz berechneten Gesamt-CD-Spektren für (7*R*)-**40** (links) und (7*S*)-**40** (rechts) unter Berücksichtigung des Lösungsmittels Acetonitril mit dem experimentellen CD-Spektrum.

Die durch die quantenchemischen CD-Berechnungen erhaltenen Ergebnisse bestimmen die (*S*)-Konfiguration des stereogenen Zentrums C-7 von (+)-Curcutetraol (**40**) (Abb. 39). Dies steht im Gegensatz zur (*R*)-Konfiguration, die aufgrund vergleichender Drehwertmessungen vermutet werden konnte.

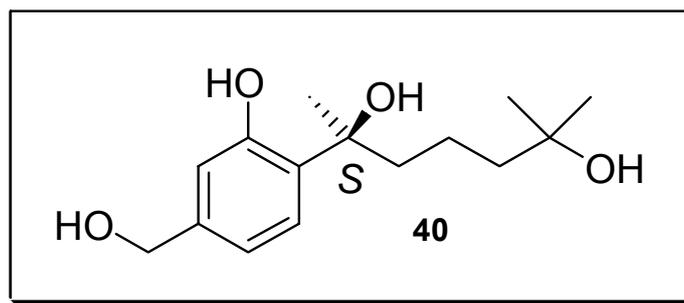


Abbildung 39: Absolute Konfiguration von (+)-Curcutetraol (**40**) nach Berechnung des CD-Spektrums.

7.2.2.3 Bestimmung der Enantiomerenreinheit

7.2.2.3.1 Ermittlung der Enantiomerenreinheit von Curcutetraol durch NMR-spektroskopische Untersuchung mit Hilfe des Shift-Reagenzes Pr(hfc)₃ (54)

Bereits kleine Mengen an Shift-Reagenz in der NMR-Probe führen zu einer Verschiebung der Signale. In der Regel werden zu diesem Zweck paramagnetische Lanthanoidverbindungen verwendet. Verbindungen mit Europium(III) und Ytterbium(III) bewirken im allgemeinen einen Tieffeld-Shift, während Verbindungen mit Praseodym(III) eine Hochfeld-Verschiebung induzieren. Verbindungen mit nukleophilen Gruppen (z.B. -OH) komplexieren reversibel das Lanthanoid-Zentralatom, wodurch Enantiomergemische in diastereomere Metallkomplexe überführt werden. Bei steigender Konzentration an Verschiebungsreagenz werden die Signale für die selben Protonen auseinandergezogen. Die Verschiebungen der NMR-Absorption wachsen mit der Stabilität der Komplexe und mit zunehmender Konzentration an Verschiebungsreagenz. Durch Integration der Signale kann schließlich der Enantiomerenüberschuß bestimmt werden.

Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit von (+)-Curcutetraol (**40**) wurde das Verschiebungsreagenz Praseodym(III) tris[3-(heptafluorpropylhydroxymethylen)-D-camphoat] (**54**) verwendet (Abb. 40). Mit Pr(hfc)₃ (**54**) können, im Vergleich zu Europium (III), größere $\Delta\delta$ -Werte im ¹H-NMR-Spektrum bei geringeren Konzentrationen an Verschiebungsreagenz erzielt werden.

Die Anwesenheit paramagnetischer Ionen führt zu einer Verbreiterung der Signale, weshalb sich die Auswertung der gemessenen Spektren als schwierig erweisen kann. Da die Verbreiterung proportional zum Quadrat der magnetischen Flußdichte B_0 ist, wurden die Messungen für Curcutetraol (**40**) an einem 200 MHz NMR- anstelle eines 600 MHz NMR-Spektrometers aufgenommen.⁷⁹

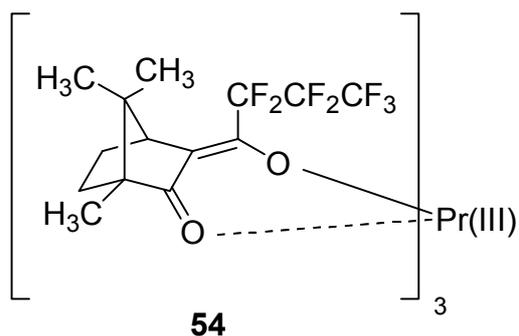


Abbildung 40: Verschiebungsreagenz Praseodym(III) tris[3-(heptafluorpropylhydroxymethylen)-D-camphoat] (**54**).

Protische Lösungsmittel neigen ihrerseits zu Komplexbildung mit dem Verschiebungsreagenz. Infolgedessen wurde für diesen Versuch auf $[D_4]$ Methanol als Lösungsmittel verzichtet und statt dessen das unpolare $[D_1]$ Chloroform verwendet (Abb. 41).

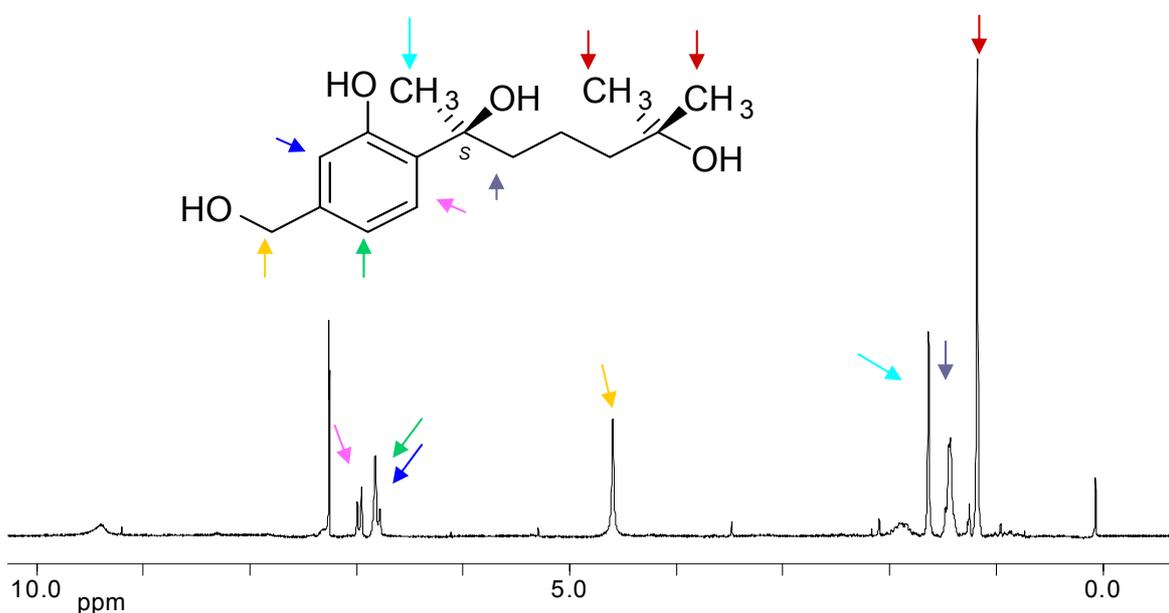


Abbildung 41: ^1H -NMR-Spektrum von Curcutetraol (**40**) in $[D_1]$ Chloroform, 200 MHz, vor der Zugabe von **54**.

Die Bestimmung der Enantiomerenreinheit von (+)-Curcutetraol (**40**) erfolgte durch die stufenweise Zugabe von 10 μl einer 0.2 M Lösung des Verschiebungsreagenzes

Pr(hfc)₃ (**54**) zu einer Lösung von 5 mg Curcutetraol (**40**, 1.86 μmol) in 0.5 ml CDCl₃. Nach jeder Zugabe wurde ein ¹H-NMR-Spektrum aufgenommen.

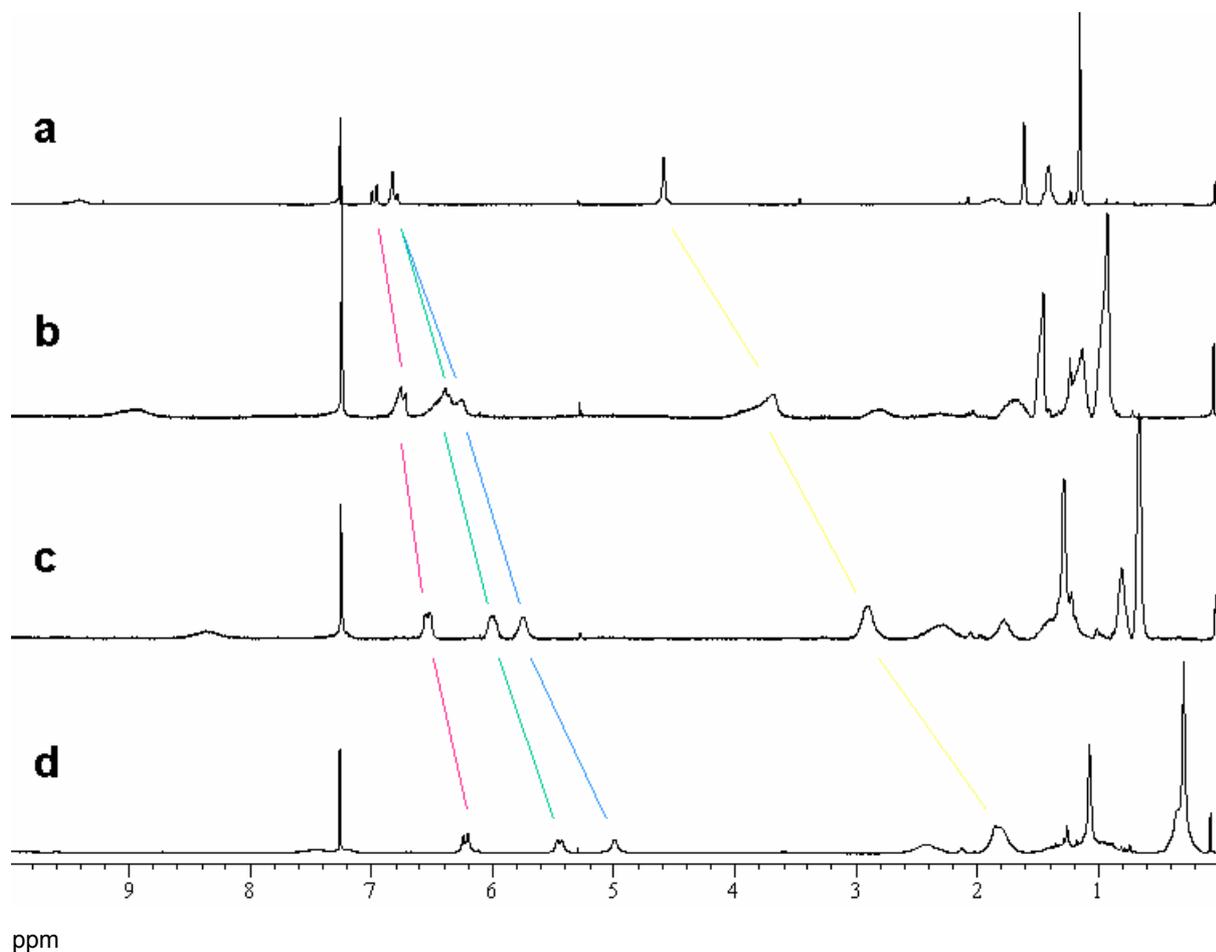


Abbildung 42: ¹H-NMR-Spektren von Curcutetraol (**40**) in [D₁]Chloroform (**a**), nach Zugabe von 2.5 mg Pr(hfc)₃ (**54**) (**b**), 5 mg **54** (**c**) und 7.5 mg **54** (**d**), 200 MHz.

Schon bei einer Konzentration von $3.9 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ **54** (Abb. 42, **b**) erkennt man den induzierten Hochfeldshift der Protonensignale im Vergleich zu **40** vor der Zugabe (Abb. 42, **a**). Die Zuordnung der jeweiligen Signale erfolgte durch Integration und deren Vergleich untereinander. Ab einer Konzentration von $7.8 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ **54** (Abb. 42, **c**) erreicht man eine deutliche Trennung der aromatischen Protonen, ohne eine Auftrennung in Enantiomere zu beobachten. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von **54** auf $11.7 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ führt zu einem fortgesetzten Hochfeldshift, wobei die Signale der schon im Hochfeldbereich befindlichen Protonen immer mehr zusammenfallen (Abb. 42, **d**). Obwohl bis zu einer Endkonzentration von $0.033 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ **54** gemessen wurde, konnte bei keinem Signal eine eindeutige Aufspaltung beobachtet werden.

Da keines der Protonensignale von (+)-Curcutetraol (**40**) eine deutliche Aufspaltung zeigte, liegt der Schluß nahe, daß (+)-**40** trotz des Vorliegens der Teilstruktur eines tertiären benzyllischen Alkohols als enantiomerenreine Verbindung isoliert wurde.

7.2.2.3.2 Analyse durch HPLC an chiralen Phasen

Um die Schlußfolgerungen aus dem Versuch mit dem Verschiebungsreagenz $\text{Pr}(\text{hfc})_3$ (**54**) zu verifizieren, wurde eine Probe von **40** durch Chromatographie an chiralen Phasen untersucht (Tab. 6).⁸⁰

Tabelle 6: Verwendete chirale HPLC-Säulen und Fließmittel.

Säule	Fließmittel
Chiralpak AS/9 250x4,6	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 15:1:1 + 0,1%TFA
Chiralpak AD-H/33 250x4,6	Acetonitril
Chiralcel OD/21 250x4,6	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 15:1:1 + 0,1%TFA
	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 5:1:1
Chiralpak AD-H/33 + AD 20µm	Acetonitril/Ethanol/Methanol 100:1:1
	Acetonitril/Ethanol/Methanol 50:1:1
	Acetonitril/Ethanol/Methanol 50:6:3
	Acetonitril
Whelk-O 1 R, R 250x4mm	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 15:1:1 + 0,1%TFA
	<i>n</i> -Heptan/ <i>i</i> -Propanol/Methanol 10:1:1 + 0,1% DEA
	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 20:1:1 + 0,1% DEA
	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 15:1:1
	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 6:1:1
Chiralcel OJ/37 250x4,6	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 15:1:1 + 0,1%TFA
	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 15:1:1
	<i>n</i> -Heptan/Ethanol/Methanol 5:1:1

Parallel zum HPL-chromatographischen Lauf erfolgte die Aufnahme einer CD-Spur. Lägen zwei Enantiomere vor, so würde man schon bei einer leichten Antrennung der HPLC-Peaks einen Vorzeichenwechsel der CD-Spur erkennen. Abbildung 43 zeigt ein Beispiel einer HPL-chromatographischen Analyse. Die einzelnen Peaks wurden durch ihre UV-Spektren identifiziert. Nur für den Hauptpeak konnten das für **40** charakteristische UV-Spektrum gemessen werden, während es sich bei den kleineren Peaks um Verunreinigungen handelt.

Es konnte bei keiner HPL-chromatographischen Analyse eine Trennung von **40** beobachtet werden. Auch die CD-Spur zeigte jeweils nur einen Peak ohne Vorzeichenwechsel. Die Analyse bestätigt somit das Ergebnis der NMR-Experimente mit $\text{Pr}(\text{hfc})_3$ (**54**) und steht damit im Einklang mit einer Enantiomerenreinheit von (+)-Curcutetraol (**40**).

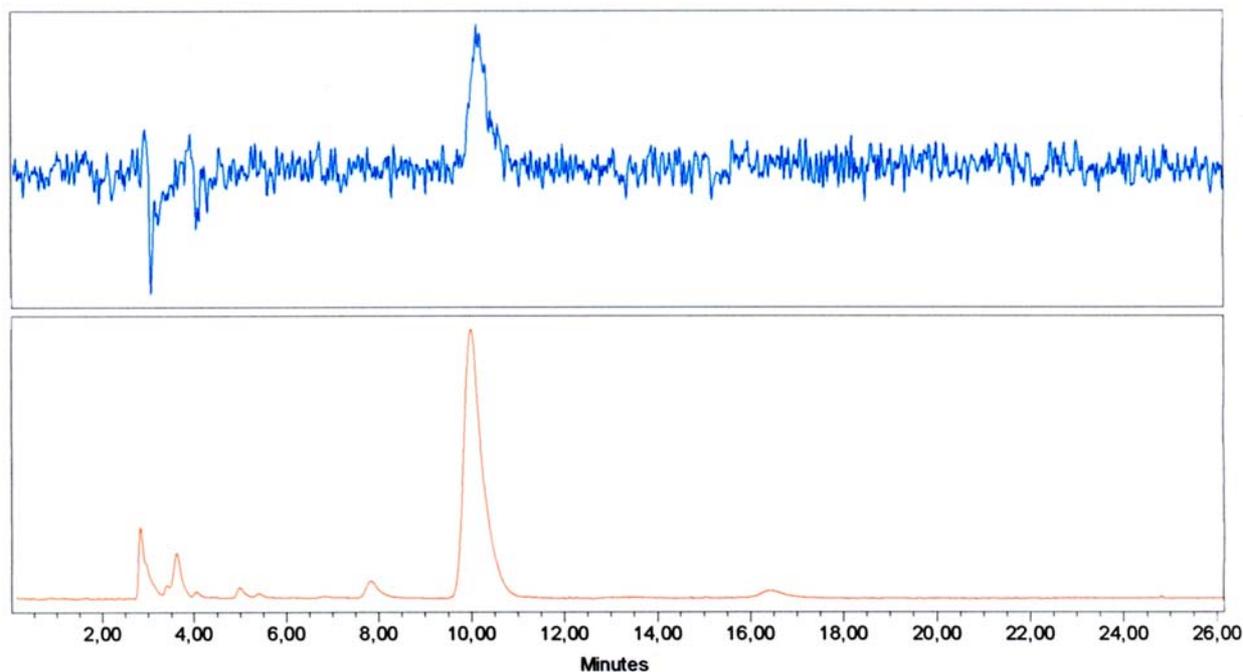


Abbildung 43: HPLC-Spur von Curcutetraol (**40**) an Chiralcel OJ/37 250 * 4.6 mit *n*-Hept:EtOH:MeOH 15:1:1. Oben: CD-Spur, unten: UV-Spur (190-800 nm).

7.3 Reinigung von Curcutetraol über Kieselgel

Im Zuge der Isolierung sollte eine geringe Menge von Curcutetraol (**40**) HPL-chromatographisch über Normalphase (Kieselgel, Chloroform/Methanol 90:10) gereinigt werden. Es stellte sich heraus, daß **40** nicht eluiert wurde. Es konnte jedoch eine Substanz identifiziert werden, die sich ebenfalls mit Anisaldehyd/Schwefelsäure-Lösung anfärben ließ. Dieses Artefakt wurde gereinigt und seine Struktur aufgeklärt.

7.3.1 Strukturaufklärung der unbekanntes Verbindung

Das FAB(+)-Massenspektrum von **55** zeigt einen Peak bei $m/z = 282.2$ und unterscheidet sich somit um 14 Masseneinheiten von Curcutetraol (**40**). Diese Differenz spricht für eine Vergrößerung des Moleküls um eine CH_2 -Gruppe. Im IR-Spektrum konnten keine signifikanten Änderungen beobachtet werden.

Das $^1\text{H-NMR}$ von **55** (Abb. 44) unterscheidet sich von dem des Curcutetraols (**40**) durch ein zusätzliches Singulett bei $\delta_{\text{H}} = 3.21$, dessen Integration drei Protonen entspricht. Außerdem fallen die Protonen der diastereotopen CH_2 -Gruppe von **40** zu einem Signal zusammen.

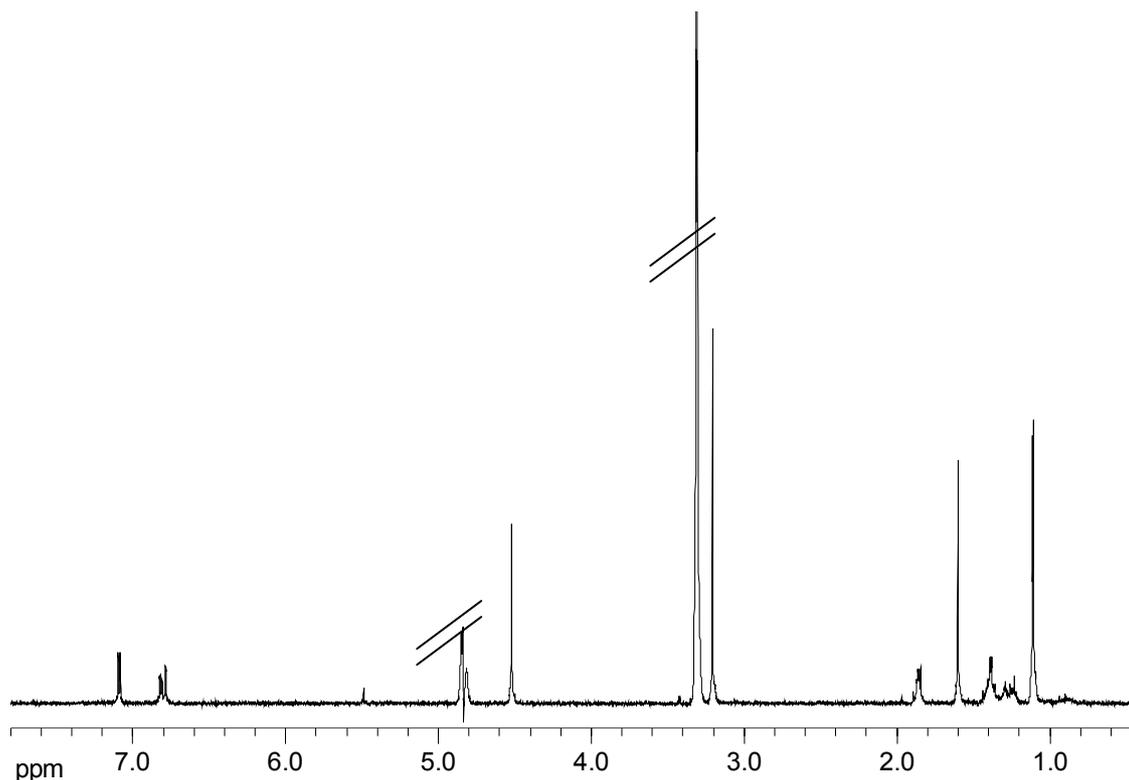


Abbildung 44: ^1H -NMR-Spektrum von **55** in $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum sind 16 Kohlenstoffatome detektierbar. Durch Abgleich mit dem DEPT-NMR-Spektrum konnte das neue Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 50.5$ als eine CH_3 -Gruppe identifiziert werden. Für die Signale dreier Kohlenstoffatome konnten deutliche Shift-Veränderungen beobachtet werden, während die restlichen Signale relativ unverändert blieben. So liegt der ^{13}C -NMR-Shift für das bei **40** als C-6 detektierte Kohlenstoffatom nun bei $\delta_{\text{C}} = 128.8$, C-7 verschiebt sich zu $\delta_{\text{C}} = 78.0$ und C-8 zu $\delta_{\text{C}} = 41.4$. Da sich nur die Signale der Kohlenstoffatome von C-6 bis C-8 verändert haben, liegt die Vermutung nahe, daß die Veränderung des Moleküls in dieser Region aufgetreten ist.

Im HMBC-Spektrum zeigt die zusätzliche CH_3 -Gruppe eine Fernkopplung zu dem quartären Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 83.5$. Zum gleichen Kohlenstoff koppelt auch die Methylgruppe bei $\delta_{\text{H}} = 1.60$. Ferner koppelt diese Methylgruppe zu dem quartären Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 128.8$ und der CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{C}} = 41.4$ weshalb sich folgende Teilstruktur (Abb. 45) formulieren läßt.

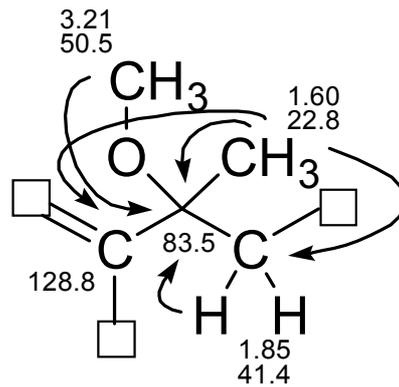


Abbildung 45: Teilstruktur von 7-O-Methylcurcutetraol (**55**).

Die HMBC-Kopplungen der restlichen Signale führten zum Grundgerüst von Curcutetraol (**40**). Somit lässt sich folgende Struktur formulieren und die Substanz als 7-O-Methylcurcutetraol (**55**) identifizieren (Abb. 46).

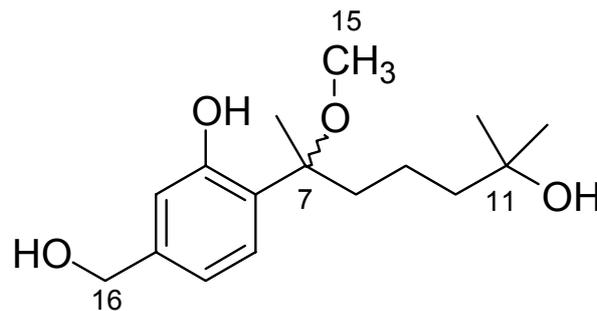


Abbildung 46: Struktur von 7-O-Methylcurcutetraol (**40**).

Das hochaufgelöste Massenspektrum bestätigt das Ergebnis und die Summenformel $C_{16}H_{26}O_4$. Bei der HPL-chromatographischen Trennung von Curcutetraol (**40**) an Kieselgel erfolgt eine Wasserabspaltung und nach Entstehung des Carbokations Anlagerung von Methanol. Bei dieser Reaktion erfolgt die Racemisierung des stereogenen Zentrums an C-7.

Tabelle 7: NMR-spektroskopische Daten von 7-O-Methylcurcutetraol (**40**), HMBC- und COSY-Korrelationen beziehen sich auf die Positionen.

Position	δ_C [ppm]	δ_H [ppm] (mult., J_{HH} [Hz], Integr.)	HMBC
1	156.9		
2	116.0	6.78 (d, 1.6, 1H)	1, 4, 6, 15
3	143.7		
4	119.0	6.82 (dd, 8.2, 1.6, 1H)	2, 6, 15
5	128.3	7.09 (d, 8.2, 1H)	1, 3, 7
6	128.8		
7	83.5		
8	41.4	1.85 (m, 1H)	7, 9, 14
9	19.9	1.28 (br, 2H)	8, 10
10	45.0	1.38 (br, 2H)	9, 11, 12, 13
11	71.3		
12	29.1	1.09 (s, 3H)	10, 11
13	29.1	1.10 (s, 3H)	10, 11
14	22.8	1.58 (s, 3H)	6, 7, 8
15	50.5	3.21 (s, 3H)	7
16	64.7	4.50 (s, 2H)	2, 3, 4

7.4 Strukturaufklärung von Curcutriolamid

Ein weiterer neuer Naturstoff konnte mit einer Ausbeute von 2.4 mg aus der Kulturlösung des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 isoliert werden. Er soll im folgenden Curcutriolamid (**41**) genannt werden.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb 47) ist für den aromatischen Bereich das gleiche Aufspaltungsmuster zu beobachten wie für Curcutetraol (**40**). Die Integration des Signals bei $\delta_{\text{H}} = 2.27$ entspricht einem Proton. Ferner ist bei $\delta_{\text{H}} = 1.05$ ein Dublett mit einer Kopplungskonstante von 6.7 Hz zu beobachten, dessen Integration drei Protonen entspricht.

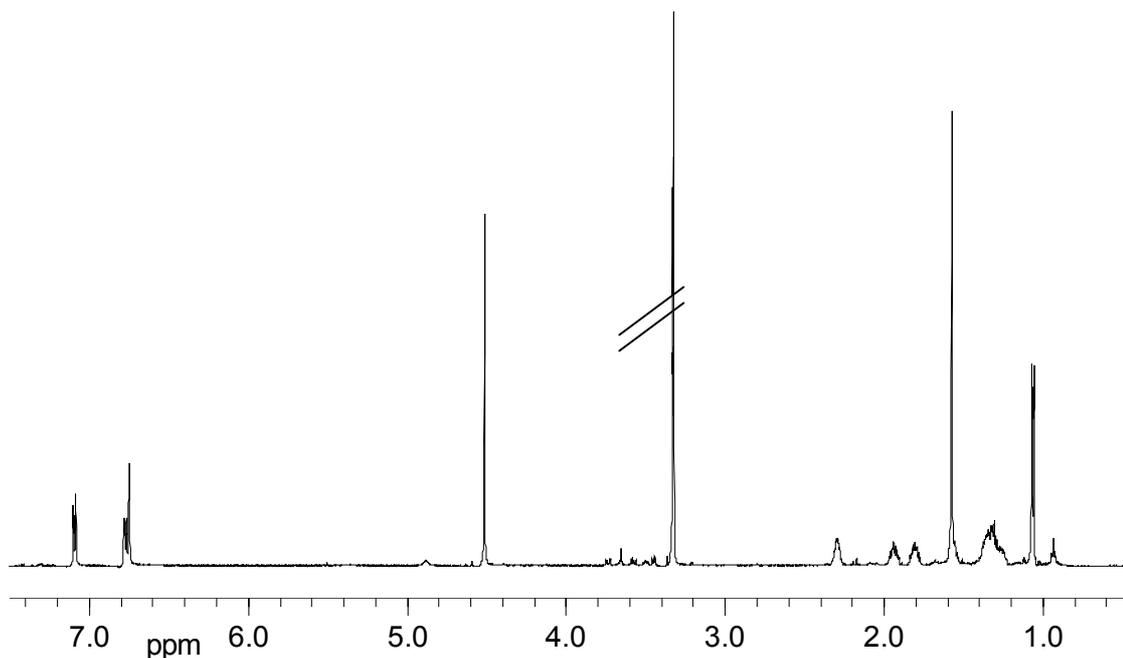


Abbildung 47: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **41** in $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz.

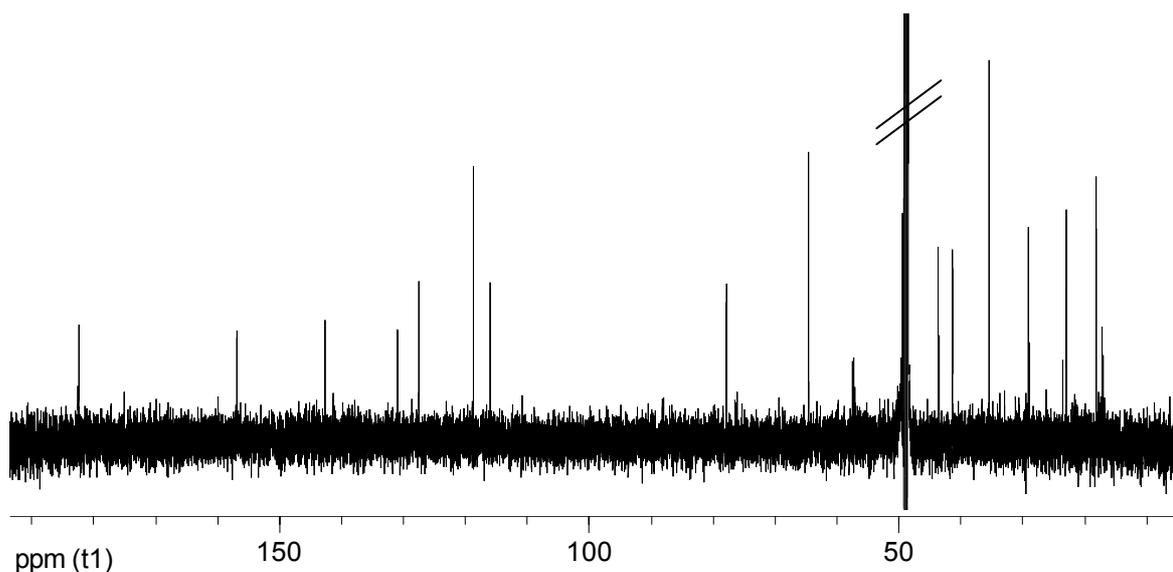


Abbildung 48: ^{13}C -NMR-Spektrum von **41** in $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum (Abb. 48) weist deutlichere Veränderungen als das ^1H -NMR-Spektrum im Vergleich zu **40** auf. Insgesamt sind 15 Kohlenstoffatome detektierbar, die durch Abgleich mit dem DEPT-NMR-Spektrum als fünf quartäre Kohlenstoffatome, drei aromatische und eine aliphatische CH-Gruppe, sowie vier CH_2 - und zwei CH_3 -Gruppen identifiziert werden können. Auffällig sind die Signale bei $\delta_{\text{C}} = 35.5$ und 182.5 , da bei Curcutetraol (**40**) keine Signale in diesem Bereich zu beobachten sind.

Das ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (Abb. 49) zeigt neben den schon bei Curcutetraol (**40**) beobachteten Kopplungen für den aromatischen Teil ferner eine Kopplung der beiden Signale bei $\delta_{\text{H}} = 1.05$ und 2.27 .

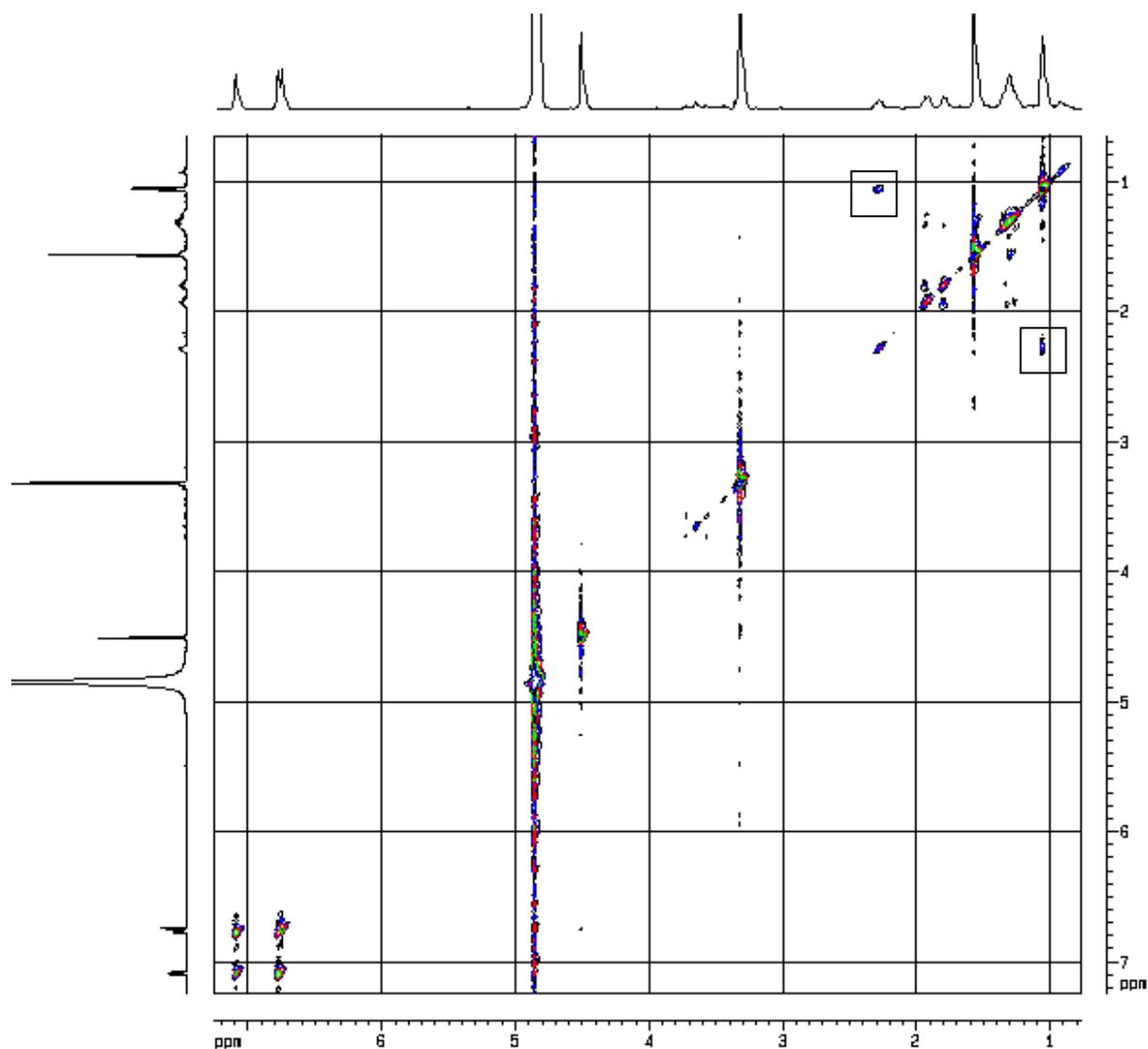
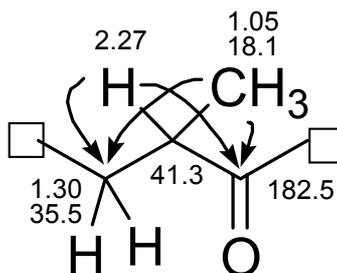
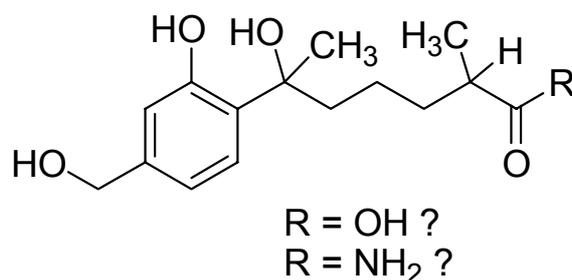


Abbildung 49: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von **41**, $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz.

Im HMBC-Spektrum zeigt das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 1.05$, das einer Methylgruppe entspricht, eine Fernkopplung zum Kohlenstoffsignal bei $\delta_{\text{C}} = 41.3$. Diesem Kohlenstoff kann nach Auswertung des HSQC-Spektrums das Proton bei $\delta_{\text{H}} = 2.27$ zugeordnet werden. Weiterhin zeigen beide Protonen ($\delta_{\text{H}} = 1.05$ und 2.27) gemeinsame Fernkopplungsbeziehungen zu den Kohlenstoffsignalen $\delta_{\text{C}} = 35.5$ und 182.5 . Nach Abgleich mit dem DEPT-NMR-Spektrum kann das Signal bei $\delta_{\text{C}} = 35.5$ als Methylengruppe identifiziert werden. Der quartäre Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 182.5$ entspricht aufgrund seiner Verschiebung vermutlich einem Carbonylkohlenstoff. Aus diesen Informationen lässt sich folgende Teilstruktur (Abb. 50) ableiten.

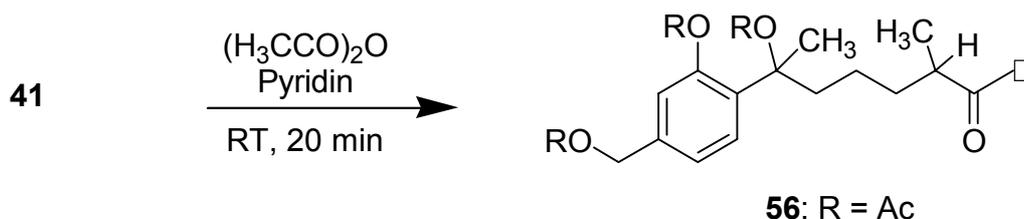
Abbildung 50: Strukturfragment von **41**.

Die weitere Auswertung der 2D-NMR-Spektren führte zur Identifizierung des neuen Naturstoffs **41**. Offen blieb zunächst die Frage, ob es sich bei **41** um eine Carbonsäure oder um ein -amid handelt. Aufgrund der ^{13}C -NMR-Verschiebung des Carbonylkohlenstoffs konnte hinsichtlich der Funktionalisierung keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Abbildung 51: Der neue Naturstoff **41**: Carbonsäure oder -amid?

Einen ersten Hinweis in Bezug auf die Carbonylgruppe lieferte das IR-Spektrum. Carbonsäuren zeigen normalerweise eine Bande zwischen $1725\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$, Amide dagegen zwischen $1600\text{-}1690\text{ cm}^{-1}$. Die vorliegende Bande im IR-Spektrum bei 1648 cm^{-1} könnte somit auf ein Amid deuten.

Um eine definitive Aussage über die Konstitution von **41** treffen zu können, sollte eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt werden. Von der isolierten Substanz konnte zu Beginn der Strukturaufklärung kein auswertbares Massenspektrum erhalten werden. Folglich sollte **41** mit Essigsäureanhydrid in Pyridin acetyliert werden (Schema 7).⁸¹

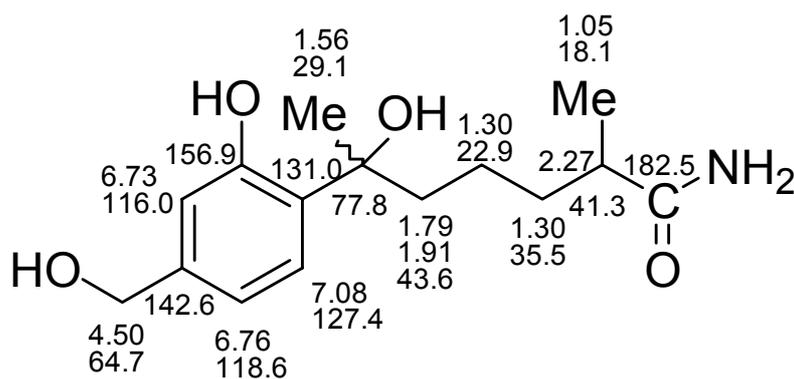
Schema 7: Acetylierung von **41**.

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der acetylierten Verbindung beweist die Anwesenheit von drei Hydroxylgruppen bei dem Naturstoff **41**. Das niederaufgelöste FAB(+)-Massenspektrum zeigt einen Peak bei $m/z = 408.2$, bei dem es sich um das Molekülion $[\text{M} + \text{H}]^+$ handelt. Durch das hochaufgelöste Massenspektrum konnte das dreifach acetylierte Curcutriolamid (**56**) identifiziert werden und die Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_7$ bestätigt werden.

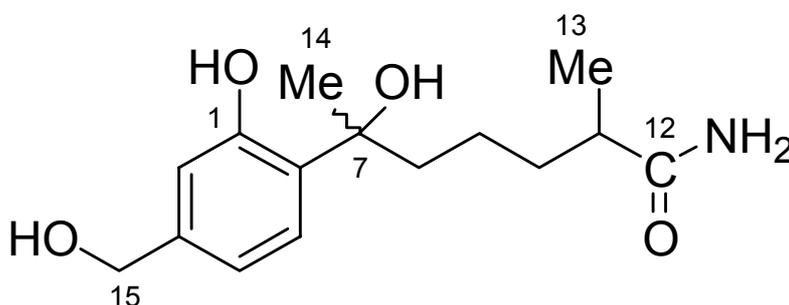
Nachdem durch das FAB(+)-Massenspektrum die Summenformel der acetylierten Verbindung (**54**) bewiesen wurde, konnte schließlich durch die Aufnahme eines FAB(-)-Massenspektrums auch das Molekülion von Curcutriolamid (**41**) detektiert werden. HRFAB(-)MS-Analyse bestätigte die Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ für Curcutriolamid (**41**, Abb. 52).

Tabelle 8: NMR-spektroskopische Daten von Curcutriolamid (**41**) HMBC-Korrelationen beziehen sich auf die Positionen.

Position	δ_{C} [ppm]	δ_{H} [ppm] (mult., J_{HH} [Hz], Integr.)	HMBC
1	156.9		
2	116.0	6.73 (s, 1H)	1, 4, 6, 15
3	142.6		
4	118.6	6.76 (d, 7.7, 1H)	2, 6, 15
5	127.4	7.08 (d, 7.7, 1H)	1, 2, 3, 7
6	131.0		
7	77.8		
8	44.6	1.79, 1.91 (m, 1H)	7, 9
9	22.9	1.30 (br, 2H)	8, 10
10	35.5	1.30 (br, 2H)	9, 11
11	41.3	2.27 (br, 1H)	9, 10, 12, 13
12	182.5		
13	18.1	1.05 (d, 6.7, 3H)	10, 11, 12
14	29.1	1.56 (s, 3H)	6, 7, 8, 9
15	64.7	4.50 (s, 2H)	2, 3, 4



41 (a)



41 (b)

Abbildung 52: Struktur von Curcutriolamid (**41**) mit NMR-Verschiebungen (a) und Numerierung (b).

7.4.1 Konfiguration von Curcutriolamid und Problemstellung

Die optische Aktivität des Naturstoffs Curcutriolamid (**41**) wird durch zwei stereogene Kohlenstoffatome in C-7 und C-11 beschrieben. Im ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt **41** teilweise verdoppelte Signale, liegt also im Diastereomeren-Gemisch vor.

Zur Bestimmung der Konfiguration von **41** wurde eine CD-Messung durchgeführt. Es sollte wie bei Curcutetraol (**40**) die Konfiguration mittels quantenchemischer CD-Berechnungen bestimmt werden. Bemerkenswert war jedoch, daß Curcutriolamid (**41**) trotz zweier stereogener Zentren keine CD Aktivität zeigt. Auch unter Verwendung von verschiedenen Lösungsmitteln wurde kein CD-Spektrum erhalten. Berücksichtigt man, daß für die CD-Aktivität ein Chromophor in chiraler Umgebung verantwortlich ist, kann man für Curcutriolamid (**41**) eine Racemisierung an C-7 im Gegensatz zu Curcutetraol (**40**) postulieren. Folglich wird die optische Drehung nur durch Position C-11 beeinflusst, welche sich für eine Aufnahme eines CD-Spektrums räumlich zu weit vom Chromophor entfernt befindet.

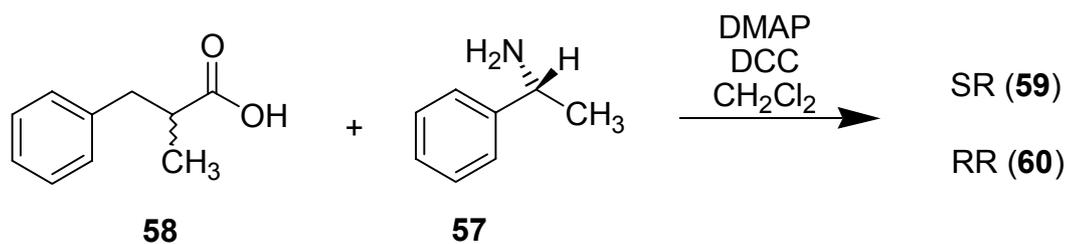
Methoden der Konfigurationsaufklärung durch chemische Derivatisierung erfordern das Vorliegen reaktiver funktioneller Gruppen in der Nähe des stereogenen Zentrums. Geht man im Falle des Curcutriolamids (**41**) aufgrund der fehlenden CD-Aktivität davon aus, daß Position C-7 racemisiert ist, so bleibt die Aufklärung der Konfiguration des stereogenen Zentrums C-11. Angesichts der sehr geringen noch zur Verfügung stehenden Menge (1 mg) des Naturstoffs **41** bestand nur die Möglichkeit für einen einzigen Derivatisierungsversuch, der allerdings durch die Anwesenheit von drei freien Hydroxygruppen erschwert sein sollte.

Wir entschieden uns für die Verseifung zur Säure, die im Anschluß durch Umsetzung mit beiden Enantiomeren von 1-Methylbenzylamin (**57**) in die entsprechenden Amide umzusetzen waren.

7.4.2 Modellreaktion zur Bestimmung der absoluten Konfiguration stereogener CH-Gruppen in α -Position zu einer Carbonsäure

Nagai et al. beschrieben ein Verfahren zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von Carbonsäuren durch chemische Derivatisierung der Säuregruppe mit (*R*)- und (*S*)-Phenylglycinmethylester und nachfolgende NMR-spektroskopische Analyse.⁸² Diese Methode als Grundlage nehmend wurde eine Modellreaktion zur Bestimmung der absoluten Konfiguration der Position C-11 entworfen. Hierbei fungiert als Testsäure das Racemat der α -Methylhydrozimtsäure (**58**). Sie ist am stereogenen Zentrum durch eine Methyl- und eine Methylengruppe substituiert und besitzt somit strukturelle Ähnlichkeit mit **41**. Als chirales Derivatisierungsreagenz sollte das kommerziell leicht, und vor allem enantiomerenrein erhältliche (*R*)- und (*S*)-1-Methylbenzylamin verwendet werden.

Das Racemat der Zimtsäure (**58**) wurde mit (*R*)-1-Methylbenzylamin (**57**) in wasserfreiem Dichlormethan in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid (**59**, DCC) und Dimethylaminopyridin (**60**, DMAP) umgesetzt (Schema 8).⁸³



Schema 8: Reaktion von α -Methylhydrozimtsäure (**58**) mit (*R*)-Methylbenzylamin (**57**).

Nachfolgende HPL-chromatographische Reinigung an Kieselgel (*iso*-Hexan/Ethylacetat 3:1) liefert die Diastereomere **59** und **60**. Die ^1H -NMR-Spektren der beiden Diastereomere zeigen deutliche Unterschiede (Abb. 53).

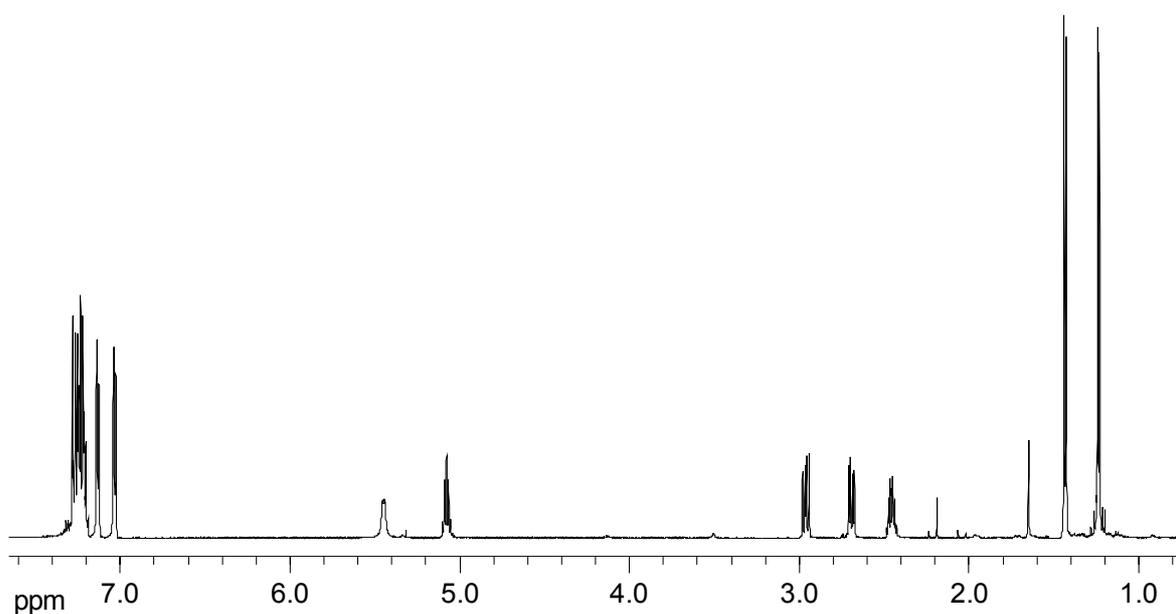
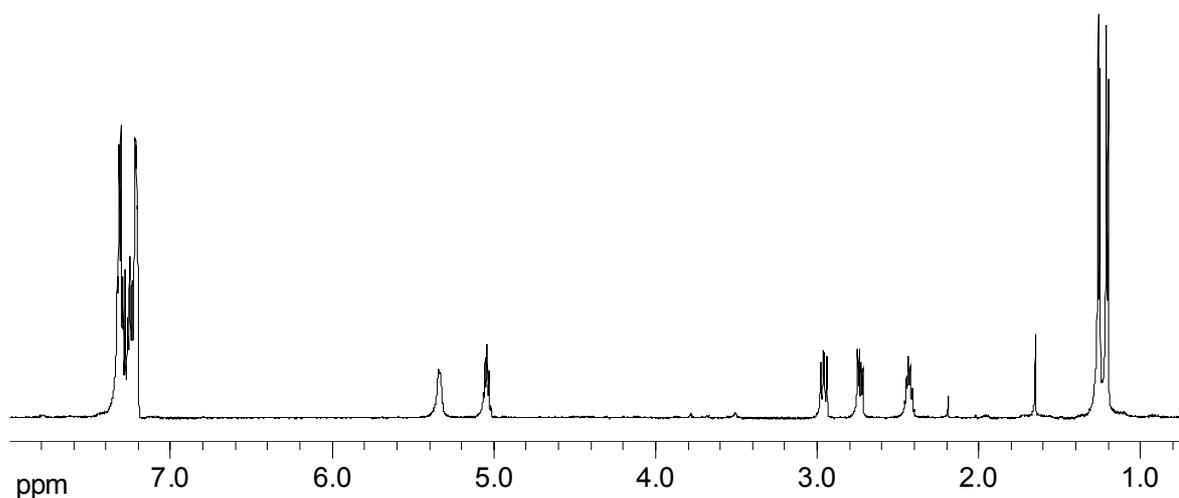


Abbildung 53: ¹H-NMR-Spektren der getrennten Diastereomeren **59** (oben) und **60** (unten), [D₁]Chloroform, 600 MHz.

Durch Auswertung der HSQC- und HMBC-Spektren lassen sich die entsprechenden Protonensignale den Säure- bzw. den Aminteilstrukturen zuordnen. Durch die *s-trans* Konformation von Amidbindungen kann eine Planarität der H-CO-NH-CH-Bindung vorausgesetzt werden.⁸⁴ Durch entsprechende Anordnung der Substituenten in den

erhaltenen Diastereomere (Abb. 54) erkennt man deren Einflüsse auf die einzelnen Protonen.

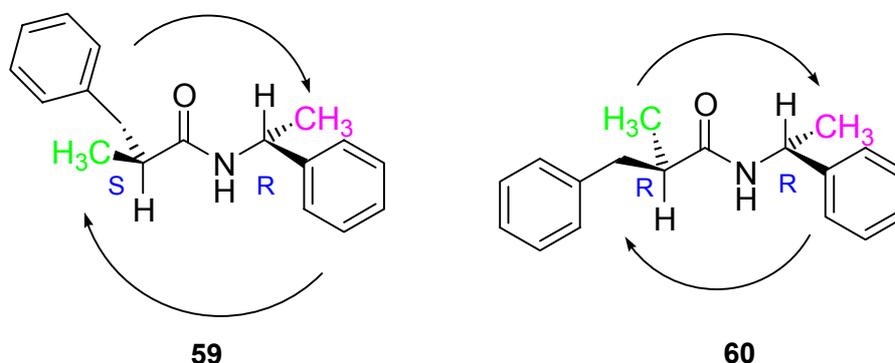


Abbildung 54: Räumliche Darstellung der Diastereomere (*S**R*)-**59** und (*R**R*)-**60**.

Die beiden Aromaten bewirken einen Hochfeldshift der Protonen, die sich in ihrem Abschirmungsbereich befinden. Betrachtet man z.B. die Methylgruppe der Säureeinheit, so bewirkt der im (*S*/*R*)-Diastereomer gegenüberliegende Aromat des Methylbenzylamins einen Hochfeldshift im Vergleich zu dem (*R*/*R*)-Diastereomer, bei dem die Methylgruppe gegenüber liegt. Ebenso erfährt die CH₃-Gruppe des Methylbenzylamins im (*S*/*R*)-Diastereomer einen Hochfeldshift im Vergleich zum (*R*/*R*)-Diastereomer. Die Methylengruppe der Zimtsäure hingegen wird im (*R*/*R*)-Diastereomer ins Tieffeld verschoben. Mit Hilfe dieser Modelle lassen sich die erhaltenen ¹H-NMR-Spektren den entsprechenden Diastereomeren zuordnen (Abb. 55, Tabelle 9).

Tabelle 9: Ausgewählte ¹H-NMR-Verschiebungen für (*S**R*)-**59** und (*R**R*)-**60**.

Position	59 ; δ _H [ppm]	60 ; δ _H [ppm]
Säure CH	2.33	2.36
Säure CH ₃	1.11	1.14
Säure CH ₂	2.64/2.86	2.59/2.86
Amin CH	4.95	4.98
Amin CH ₃	1.16	1.34

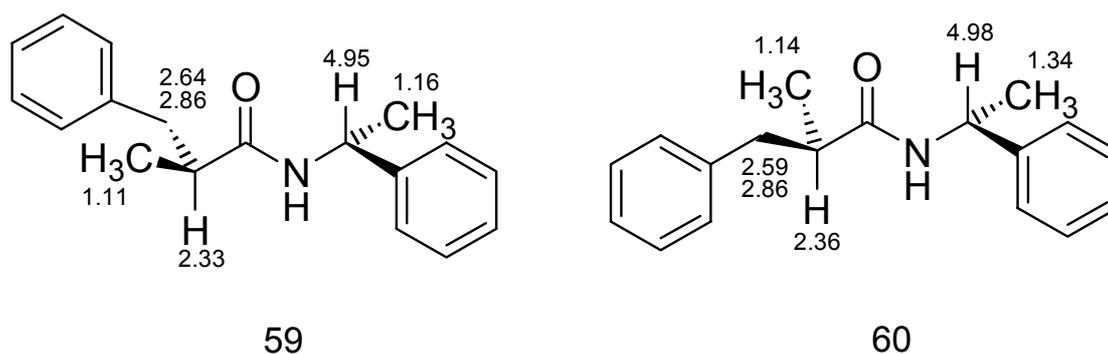


Abbildung 55: (*SR*)- **59** und (*RR*)- **60** mit ausgewählten $^1\text{H-NMR}$ -Verschiebungen

Der analoge Versuch mit (*S*)-Methylbenzylamin (**57**) lieferte die entsprechenden Ergebnisse, wobei auch das gemischte Diastereomer (*R/S*) HPL-chromatographisch zuerst eluiert wurde. Durch die Kristallisation des (*R/R*)-Produkts und die röntgenspektroskopische Untersuchung konnten die Schlußfolgerungen bestätigt werden.

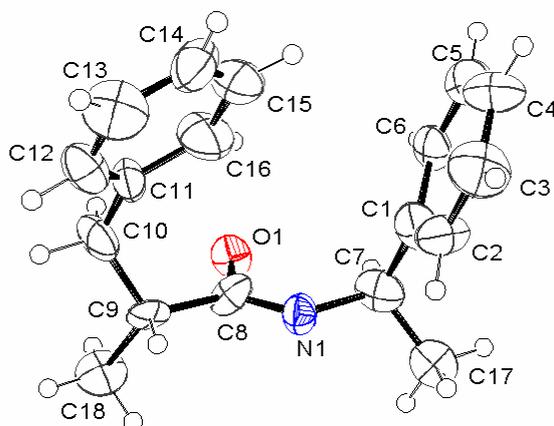


Abbildung 56: Struktur von **60** im Kristall.

7.4.2.1 Auswertung der Modellreaktion

Der größte $\Delta\delta_{\text{H}}$ Wert ($\delta_{\text{H}RR} - \delta_{\text{H}SR} = 0.18$) konnte für die Methylgruppe der Aminteilstruktur beobachtet werden. Die übrigen $\Delta\delta_{\text{H}}$ Werte variieren in den Bereichen 0.3-0.5 ppm. Das von Nagai et al. beschriebene Verfahren unter Verwendung von (*R*) und (*S*)-Phenylglycinmethylester erzielt $\Delta\delta_{\text{H}}$ Werte zwischen 0.02 und 0.07 für die im Abschirmungsbereich befindlichen Protonen. Demzufolge ist das entworfene Modell

zur Bestimmung der Konfiguration eines stereogenen Zentrums in α -Position zu einer Carbonsäure eine schnelle und gut auswertbare Methode.

7.4.2.2 Reaktion in kleinem Maßstab

Da Naturstoffe in der Regel in sehr kleinen Mengen isoliert werden, wurde der gleiche Versuchsansatz noch einmal in kleinem Maßstab durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden mehrere Versuchsreihen in Eppendorfbehältern durchgeführt, bei denen jeweils ca. 1 mg Methylhydroxymizsäure umgesetzt wurden. Es hat sich herausgestellt, daß auf absolute Wasserfreiheit geachtet werden muß, weshalb der Versuch unter Argon durchgeführt wurde. Des weiteren führte ein kurzes Erwärmen (20 min) der Probe im Wasserbad bei 37°C zum gewünschten Produkt.

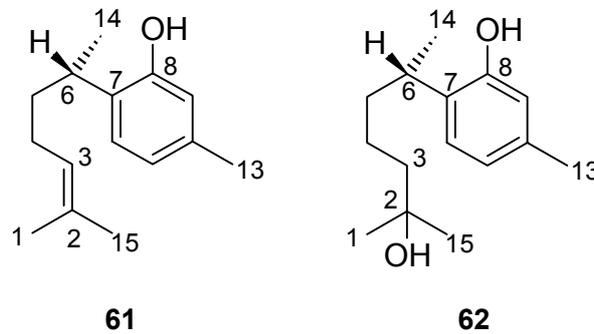
7.4.2.3 Konfiguration von Curcutriolamid

Obwohl mit der Derivatisierung im kleinen Maßstab gute Erfolge erzielt werden konnten, war es nicht möglich, dieses Verfahren auf Curcutriolamid (**41**) anzuwenden. Ein Grund hierfür war die geringe Menge an isolierter Substanz, von der ein Teil schon zur Derivatisierung für die Massenspektrometrie verwendet wurde. Weiterhin erwiesen sich die primäre und phenolische OH-Gruppe als störend bei der Reaktion. Auch eine Acetylierung vor der Umsetzung mit dem Amin führte nicht zum gewünschten Erfolg.

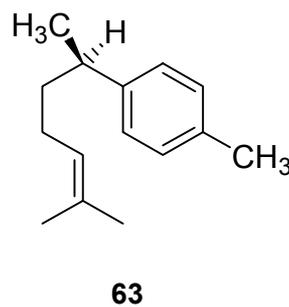
7.4.3 Bisabolan-Sesquiterpene aus marinen Organismen

Die neuen isolierten Naturstoffe **40** und **41** besitzen ein Bisabolan-Grundgerüst. Während aromatische Sesquiterpenoide aus Landlebewesen schon mehrfach isoliert wurden, ist ihre Identifizierung aus marinen Organismen noch nicht sehr oft gelungen. Die ersten phenolischen Bisabolan-Sesquiterpenoide, (-)-Curcuphenol, (-)-Curcuhydrochinon und (-)-Curcuchinon wurden von McEnroe et al. aus der Gorgonie *Pseudopterogorgia rigida* isoliert.⁸⁵ Später konnte (+)-Curcuphenol (**61**) und (+)-Curcudiol (**62**) aus dem marinen Schwamm *Didiscus flavus* isoliert und aufgeklärt werden.⁸⁶ Inzwischen wurde (+)-Curcudiol (**62**) in weiteren Vertretern der Gattung *Didiscus* identifiziert,⁸⁷ wie auch in den marinen Schämmen *Epipolasis* sp. und

Arenochalina sp..^{88,89} Infolgedessen gelten Schwämme als hauptsächliche Quelle mariner phenolischer Bisabolan-Sesquiterpenoide.

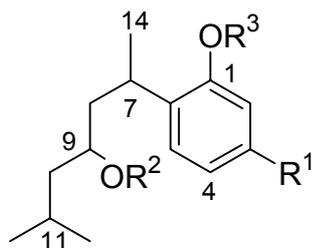


Diese sesquiterpenoiden Phenole erhielten ihre Namen in Anlehnung an α -Curcumen (**63**). Curcumene sind eine im Pflanzenreich weit verbreitete Gruppe von Sesquiterpenen, isoliert z.B. aus *Curcuma aromatica*, einem Ingwergewächs.



(+)-Curcuphenol (**61**) zeigte moderate Aktivität in verschiedenen Krebszelllinien, wie P-388, HCT-8 oder A-549, während (-)-Curcuphenol antibakterielle Aktivität gegen *Staphylokokkus aureus* besitzt. (+)-Curcuphenol (**61**) und (+)-Curcudiol (**62**) besitzen außerdem Aktivität gegen *Candida albicans*.

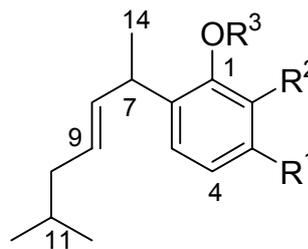
Aus dem marinen Schwamm *Parahigginsia* sp. wurden 1999 von Chen et al. die Sesquiterpene Parahigginol A-D (**64-67**) und Parahigginisäure (**68**) isoliert.⁹⁰



64: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$

65: $R^1 = \text{CHO}$, $R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{H}$

66: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{Ac}$, $R^3 = \text{H}$



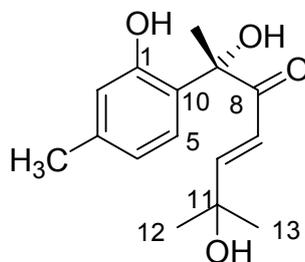
67: $R^1 = \text{CHO}$, $R^2 = \text{OH}$, $R^3 = \text{H}$

68: $R^1 = \text{COOH}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Allerdings wurde eine Aufklärung der Konfiguration im Fall der Parahigginole nicht vorgenommen. Auch wenn bei **64** ein sekundärer Alkohol am stereogenen Zentrum vorliegt, wurde kein Versuch der Konfigurationsaufklärung beschrieben.

7.4.4 Strukturverwandte Bisabolane aus weiteren Quellen

1996 isolierten Yu et al. Ligustiphenol (**69**) aus dem Wurzelextrakt von *Ligusticum sinence*.⁹¹ *L. sinence* wird in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Störungen des Magen-Darm-Trakts, Erkältungen und als Schmerzmittel eingesetzt.

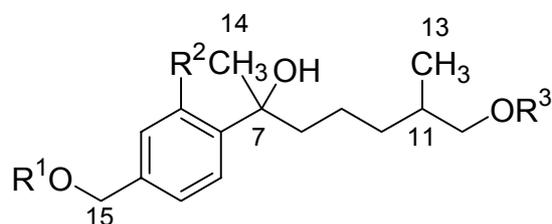


69

Das pflanzliche (*S*)-**69** besitzt einen negativen Drehwert ($[\alpha]_{\text{D}}^{24} = -75.7$ ($c = 0.053$, CHCl_3)), und einen positiven Cotton-Effekt bei 285 nm von $\Delta\epsilon = +3.18$ (Methanol). Die Bestimmung der Konfiguration erfolgte anhand von Vergleichsmessungen mit anderen α -Hydroxy- α -phenylketonen.

Aus einer Kulturlösung von *Penicillium* sp. isolierten Zeeck et al. die Waraterpole (**70-72**).⁹² Anhand des ^{13}C -NMR-Spektrums wurde für das stereogene Zentrum in C-7 ein Diastereomerenverhältnis von 1.3:1 festgelegt. Es konnte aber nicht bestimmt werden, welches Diastereomer im Überschuss vorliegt. Die Bestimmung des stereogenen

Zentrums in C-11, bei dem es sich um eine CH-Gruppe handelt wie im Falle von Curcutetraol (**40**) und Curcutriolamid (**41**), konnte nicht vorgenommen werden.



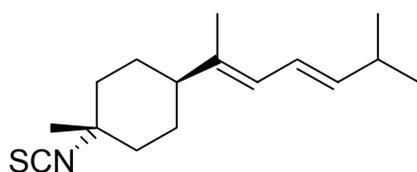
70: $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = H$

71: $R^1 = H, R^2 = OH, R^3 = Ac$

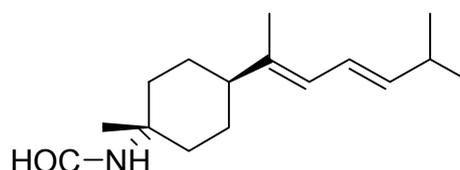
72: $R^1 = Ac, R^2 = OH, R^3 = H$

7.4.5 Stickstoffhaltige Sesquiterpene mit Bisabolan-Grundgerüst

Die ersten stickstoffhaltigen Bisabolan-Sesquiterpene, 3-Isothiocyanattheonellin (**73**) und 3-Formamidtheonellin (**74**), wurden 1984 von Nakamura et al. aus dem marinen Schwamm *Theonella swinhoei* isoliert.⁹³ Ein Isocyanat-Abkömmling der Theonelline konnte aus der Nacktschnecke *Phyllidia* sp. isoliert werden.⁹⁴

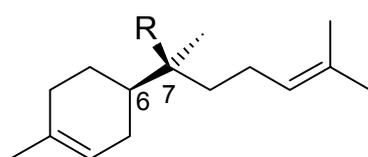


73



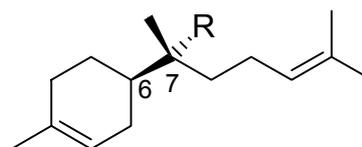
74

Aus dem marinen Schwamm *Halichondria* sp konnten weitere stickstoffhaltige Sesquiterpene isoliert werden. Es handelt sich hierbei um ein Amin (**75**) und ein Isothiocyanat (**76**) des Bisabolens.⁹⁵



75: $R = NH_2$

76: $R = NCS$



77: $R = NH_2$

78: $R = NCO$

Gleichzeitig gelang es Gulavita et al., ein Amin und ein Isocyanat aus dem Schwamm *Ciocalypta* sp. zu isolieren, die sich von den aus *Halichondria* sp. isolierten kaum unterscheiden. Obwohl beide Schwämme zur gleichen Ordnung Halichondrida gehören, besitzen sie an Position C-7 unterschiedliche Konfiguration. Während es sich bei **75** und **76** um eine (*S*)-Konfiguration handelt, wurden für **77** und **78** eine (*R*)-Stereochemie beobachtet. Die Aufklärungen stützen sich jeweils auf röntgenspektroskopische Analysen nach Überführung desamins in einen Harnstoff.

7.4.6 Einordnung der Ergebnisse

Der neue marine Naturstoff Curcutetraol (**40**) ist mit seinen vier Hydroxylgruppen das erste Tetraol und damit der polarste Vertreter aus der Gruppe der phenolischen sesquiterpenoiden Naturstoffe vom Bisabolan-Typ. Während die bisher identifizierten marinen Bisabolan-Sesquiterpenoide aus Makroorganismen isoliert wurden, ist (+)-Curcutetraol (**40**) das erste Mitglied dieser Reihe, das aus einem marinen Mikroorganismus isoliert werden konnte. Weiterhin ist es das erste marine Sesquiterpenoid mit einer tertiären Alkoholgruppe in *ortho*-Position zu einem Phenol. Es konnte gezeigt werden, daß auch beim Vorliegen nur eines stereogenen Zentrums die Bestimmung der absoluten Konfiguration von Curcutetraol (**40**) nicht anhand vergleichender Drehwertmessungen vorgenommen werden kann. Der erstmalige Einsatz quantenchemischer Berechnungsmethoden für ein phenolisches Bisabolan-Sesquiterpenoid mit einem tertiären Alkohol am stereogenen Zentrum führte zur Aufklärung der absoluten Konfiguration von Curcutetraol (**40**). Die Ergebnisse dieser Berechnungen stimmen mit der für Ligustiphenol (**69**) bestimmten Konfiguration überein.

Durch die Isolierung und Strukturaufklärung von Curcutriolamid (**41**) gelang es erstmals, ein stickstoffhaltiges Mitglied aus der Reihe der aromatischen Bisabolan-Sesquiterpenoide aus einem marinen Mikroorganismus zu isolieren und aufzuklären. Bisher konnte lediglich die Identifizierung von marinen, nicht aromatischen Sesquiterpenoiden beschrieben werden.

Aufgrund der unterschiedlichen Aktivitäten der in der Literatur beschriebenen phenolischen Bisabolan-Sesquiterpenoide besteht die Möglichkeit, daß auch Curcutetraol (**40**) und Curcutriolamid (**41**) biologische Aktivitäten besitzen. Waraterpol

(70) zeigte Aktivität gegen *Microsporum canis*. Obwohl die Curcutetraol (40) und Curcutriolamid (41) enthaltende Fraktion vier im Screening auf *Staphylokokkus aureus* und *Candida albicans* nicht aufgefallen ist, bleibt eine Aktivität der Naturstoffe abzuwarten.

8 Sekundärmetaboliten aus dem Aminosäurestoffwechsel

8.1 Isolierung

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der zweiten Fraktion des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 nach Säulenchromatographie deutete auf das Vorliegen eines Naturstoffs in verhältnismäßig großer Menge. Re-Chromatographie (RP-18) der Fraktion führte zur Isolierung von 193 mg eines farblosen Naturstoffs (**37**).

8.2 Strukturaufklärung

Die LC-ESI-MS-Analyse von **37** zeigt einen Peak bei $m/z = 265.1$, bei dem es sich um das Molekülion $[\text{M} + \text{H}]^+$ handelt. Daraus folgt das Vorliegen einer geraden Anzahl an Stickstoffatomen.

Das UV-Spektrum von **37** weist ein Absorptionsmaximum bei 201 nm auf.

Das CD-Spektrum zeigt einen starken Cotton-Effekt bei 207 nm. Dies, sowie ein Drehwert von $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +25$, weist auf optische Aktivität der Verbindung und die Anwesenheit eines oder mehrerer stereogener Zentren hin.

Das IR-Spektrum zeigt bei 3407 cm^{-1} überlagerte OH- oder NH-Valenzschwingungen. Weiterhin eine Carbonylbande bei 1649 cm^{-1} , die eventuell auch ein Carbonsäureamid sein könnte und bei 1579 cm^{-1} eine Bande, die darauf hindeuten könnte, daß eine Carbonsäure zumindest partiell als Salz vorliegt. Eine ausgeprägte Bande bei 1397 cm^{-1} weist auf CH_3 -Deformationsschwingungen.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 57) erkennt man zwei Singulets ($\delta_{\text{H}} = 1.15$ und 1.31), deren Integration zwei CH_3 -Gruppen entsprechen. Das Signal bei $\delta_{\text{H}} = 4.56$ erscheint als Dublett vom Dublett und kann durch Abgleich mit dem DEPT-NMR als Methinproton identifiziert werden. Das Multiplett bei $\delta_{\text{H}} = 7.14\text{--}7.26$, dessen Integration 5 Protonen entspricht, deutet auf einen unsubstituierten Benzolring. Des weiteren weist das Spektrum diastereotope Protonen zweier CH_2 -Gruppen ($\delta_{\text{H}} = 2.86$ und 3.29 sowie 2.33 und 2.47) auf.

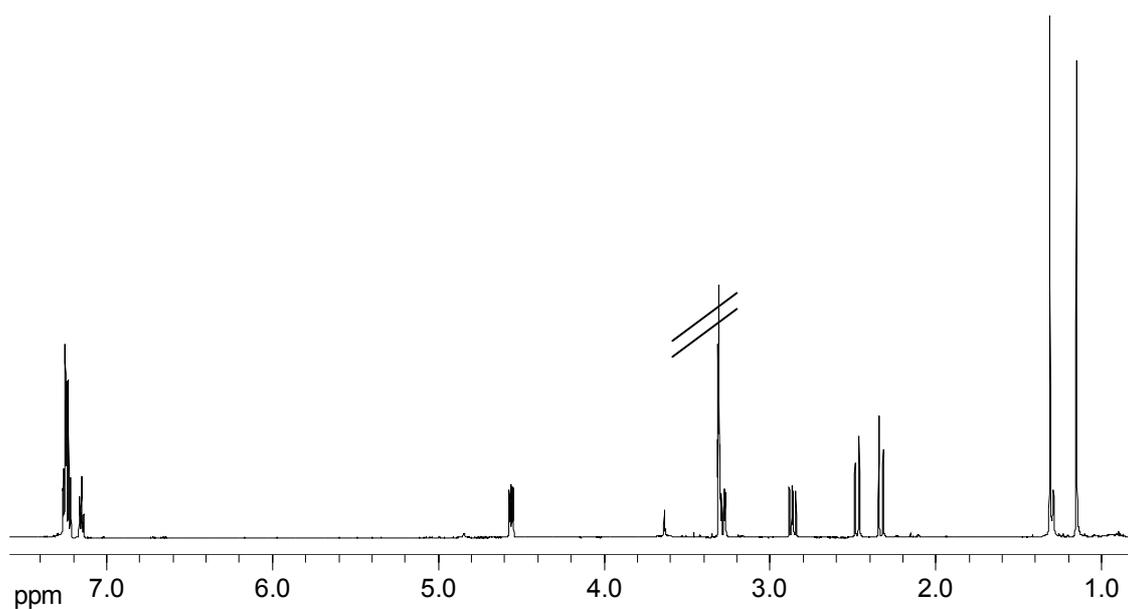


Abbildung 57: $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von **37**, $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz.

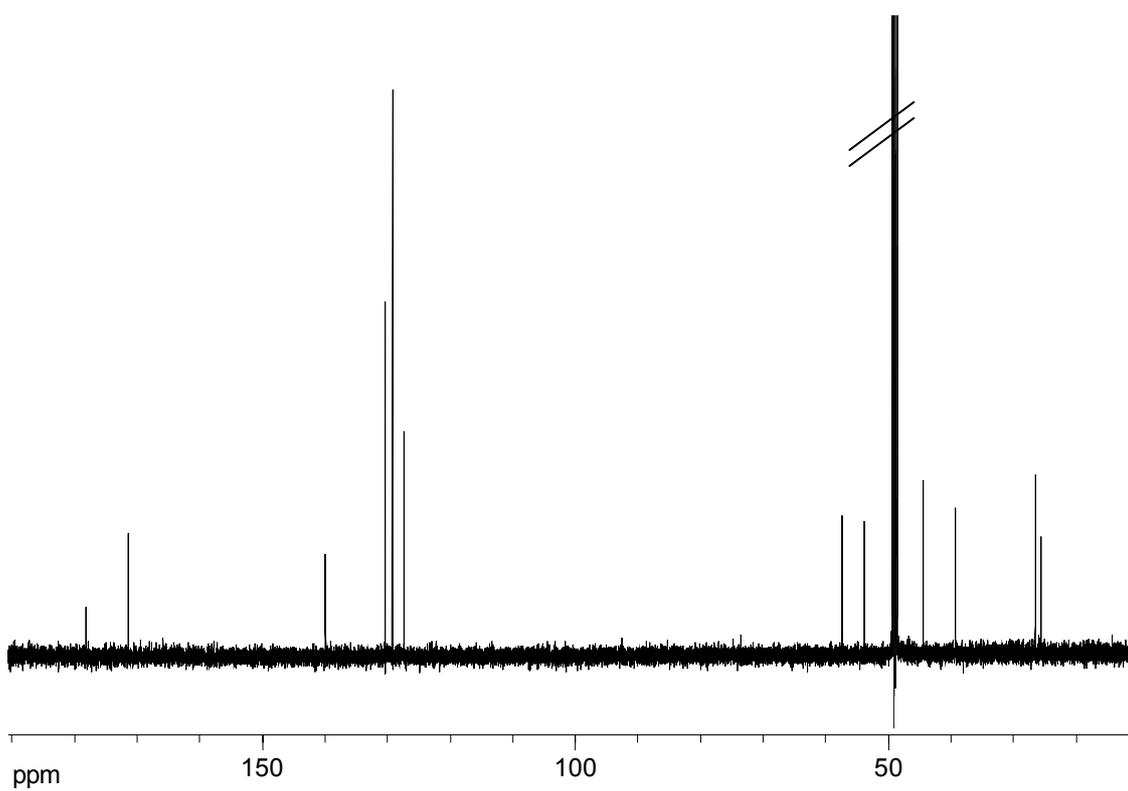


Abbildung 58: $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum von **37**, $[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz.

Anhand des ^{13}C -NMR-Spektrums (Abb. 58) kann man 14 Kohlenstoffsignale identifizieren. Davon entsprechen, nach Abgleich mit dem DEPT-NMR-Spektrum, vier Signale quartären Kohlenstoffatomen und fünf aromatischen bzw. einer aliphatischen CH-Gruppe, wobei die Signale bei $\delta_{\text{C}} = 129.2$ und 130.3 jeweils zwei CH-Gruppen des Aromaten entsprechen. Des weiteren erkennt man zwei CH_2 - und zwei CH_3 -Gruppen.

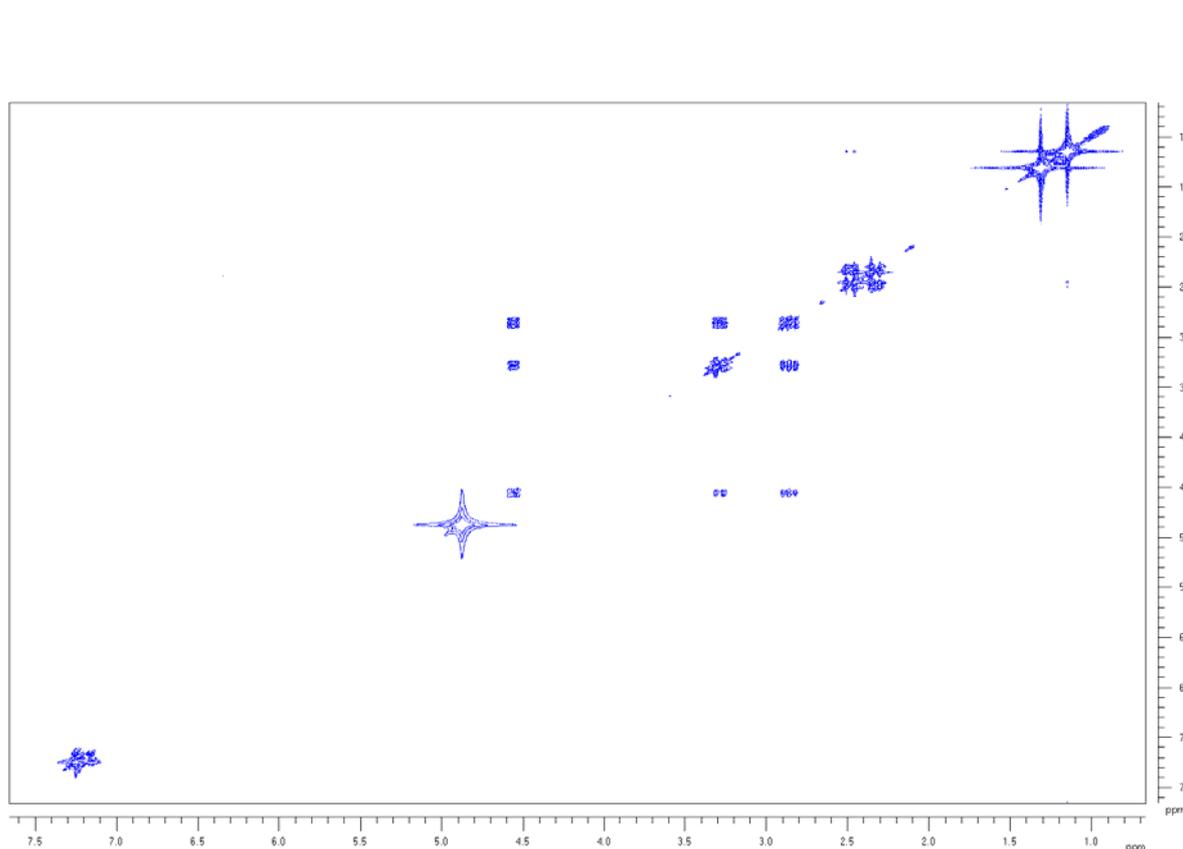


Abbildung 59: ^1H - ^1H -COSY-Spektrum von **37**.

Das ^1H - ^1H -COSY-Spektrum (Abb. 59) zeigt die miteinander koppelnden diastereotopen Protonen ($\delta_{\text{H}} = 2.33$ und 2.47), sowie eine Fernkopplung der CH_2 -Gruppe zu den beiden CH_3 -Gruppen bei $\delta_{\text{H}} = 1.15$ und 1.31 . Da es sich bei den beiden Methylsignalen um Singuletts handelt, sind sie vermutlich über einen quartären Kohlenstoff verbunden, an den sich die CH_2 -Gruppe anschließt.

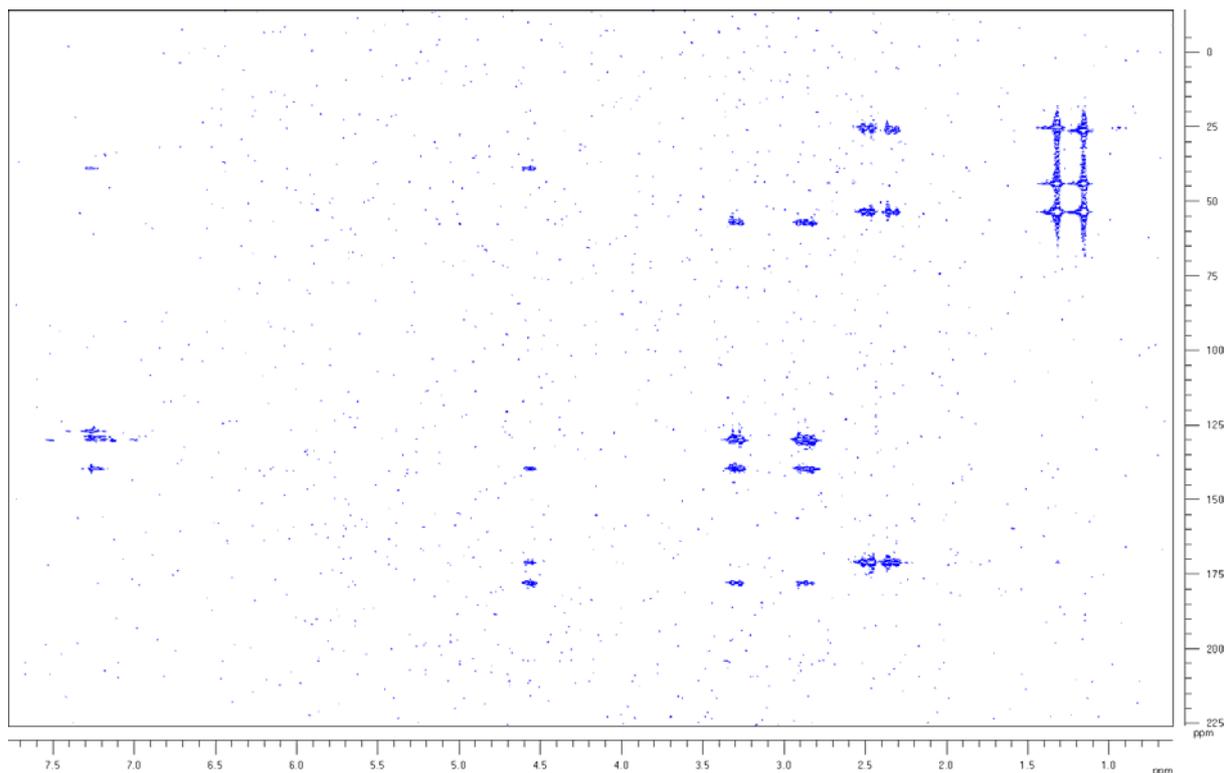


Abbildung 60: HMBC-Spektrum von **37**, [D₄]Methanol, 400 MHz

Das HMBC-Spektrum (Abb. 60) bestätigt diese Vermutung durch die gemeinsame Korrelation der CH₃-Gruppen zu einem quartären Kohlenstoff bei $\delta_C = 54.0$, der wegen seiner charakteristischen Verschiebung noch durch ein Stickstoffatom substituiert zu sein scheint. Da die Protonen der CH₂-Gruppe eine Korrelation zu einem Kohlenstoffatom bei $\delta_C = 171.4$ zeigen, kann man β -Valin als Teilfragment (Abb. 61) formulieren.

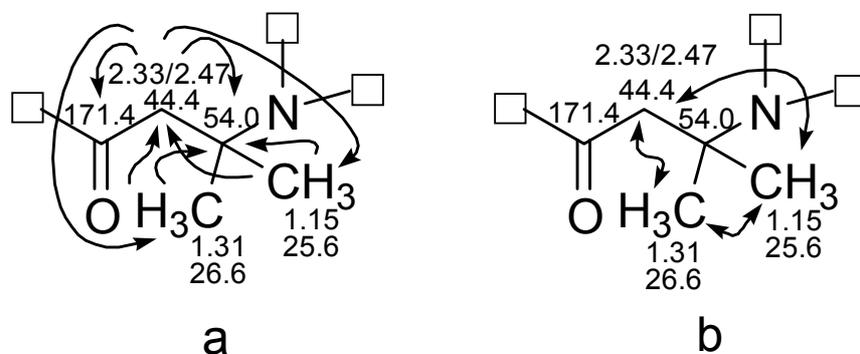


Abbildung 61: Strukturfragment I für **37**, **a**: HMBC-Korrelationen, **b**: COSY-Korrelationen.

Die im ^1H - ^1H -COSY-Spektrum koppelnden geminalen Protonen der diastereotopen CH_2 -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 2.86$ und 3.29) zeigen weiterhin eine gemeinsame Kopplungen zu der CH -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 4.56$, welches die charakteristische Verschiebung eines α -Protons der Aminosäuren zeigt. Die im HMBC-Spektrum beobachtete Kopplung der CH_2 -Gruppe zum quartären, aromatischen Kohlenstoffatom bei $\delta_{\text{C}} = 139.9$, der sich im HMBC-Spektrum mit den übrigen aromatischen Signalen zu einem Benzolring zusammenfügen lässt und die Kopplung der CH -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 4.56$) zum Carbonylkohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 178.2$ lassen auf die Aminosäure Phenylalanin als zweites Strukturfragment schließen (Abb. 62).

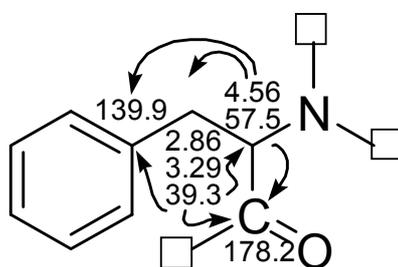


Abbildung 62: Strukturfragment II für **37** mit HMBC-Kopplungen.

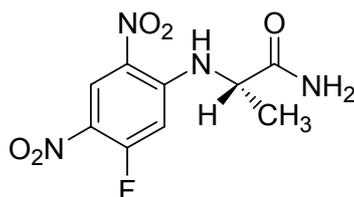
Das α -Proton der Phenylalanin-Teilstruktur zeigt eine HMBC-Kopplung auf den quartären Carbonylkohlenstoff des β -Valin-Fragments bei $\delta_{\text{C}} = 171.4$. Somit können die beiden Teilfragmente über eine Amidbindung zusammengefügt werden. Durch das hochaufgelöste Massenspektrum konnte die Summenformel $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ bestätigt und Phenamid (**37**) als isolierte Verbindung identifiziert werden. Bisher wurde der fungizide Naturstoff Phenamid erst einmal aus *Streptomyces albospinus* isoliert.⁹⁶

Tabelle 10: NMR-spektroskopische Daten von Phenamid (**37**); die HMBC- und COSY-Korrelationen beziehen sich auf die Positionsnummern.

Position	δ_C	δ_H (mult., J_{HH} [Hz], Integr.)	HMBC	COSY
1	39.3	2.86 (dd, 14.0, 9.8, 1H) 3.29 (dd, 14.0, 4.1, 1H)	2, 8, 9, 14	2
2	57.5	4.56 (dd, 9.8, 4.1, 1H)	1, 3, 8, 14	1
3	171.4			
4	44.4	2.33 (d, 15.0, 1H) 2.47 (d, 15.0, 1H)	3, 5, 6, 7	6, 7
5	54.0			
6	25.6	1.15 (s, 3H)	4, 5, 7	4, 7
7	26.6	1.31 (s, 3H)	4, 5, 6	4, 6
8	178.2			
9/13	130.4	7.25 (dd, 6.7, 1.6, 2H)	1, 10, 11, 14	
10/12	129.2	7.23 (dd, 7.8, 7.2, 2H)	9, 11, 14	
11	127.3	7.15 (tt, 7.2, 1.6, 1H)	9, 10, 14	
14	139.9			

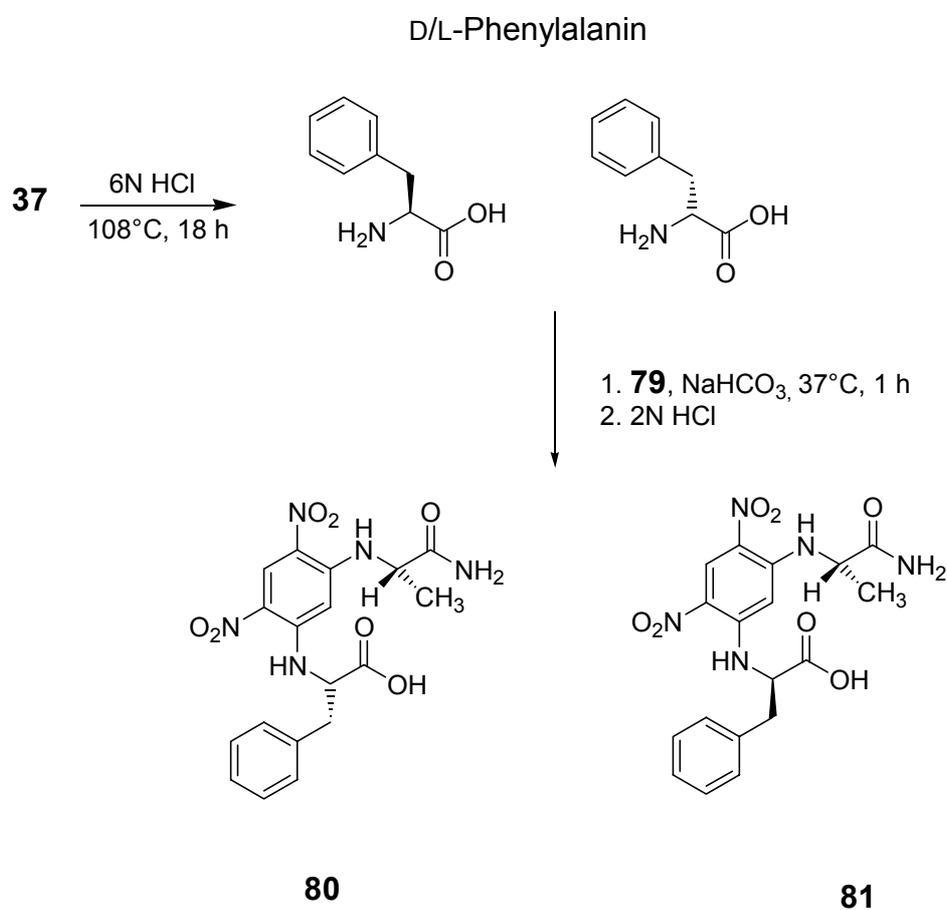
8.2.1 Bestimmung der absoluten Konfiguration von **37** nach Marfey

Die bisher beschriebene Aufklärung der absoluten Konfiguration von Phenamid (**37**) durch Makkar et al. erfolgte durch die Synthese von Phenamid (**37**) mit L- und D-Phenylalanin und anschließendem Vergleich der gemessenen CD-Spektren des isolierten Naturstoffs mit den synthetisierten Verbindungen. Bedauerlicherweise können der Literatur nur die Schlußfolgerungen, jedoch nicht die Spektren bzw. deren Beschreibungen entnommen werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des stereogenen Zentrums von Phenylalanin das Verfahren nach Marfey angewandt.⁹⁷ Marfey's Reagenz (**79**, 1-Fluoro-2,4-dinitrophenyl-5-L-alaninamid, FDAA), die chirale Variante des Sanger's Reagenz,⁹⁸ eignet sich zur Derivatisierung von Aminosäuren, um das vorliegende Enantiomer zu identifizieren. Hierfür wird nicht nur die durch saure Hydrolyse erhaltene Aminosäure des Naturstoffs, sondern auch parallel ein Gemisch der zu bestimmenden D/L-Aminosäure und der D- oder L-Aminosäure mit FDAA umgesetzt (Schema 9).⁹⁹ Durch anschließende RP-18 HPL-chromatographische Trennung der drei Versuchsansätze können die erhaltenen Diastereomere anhand der Retentionszeiten verglichen werden.



79

Die saure Hydrolyse von **37** liefert die darin enthaltene freie Aminosäure Phenylalanin. Durch nukleophile Substitution des Fluors reagiert Phenylalanin mit FDAA (**79**).



Schema 9: Saure Hydrolyse von **37** und Derivatisierung von D/L-Phenylalanin mit Marfey (**79**).

Aufgrund des stereogenen Zentrums von FDAA, bilden sich bei einem Enantiomer Aminosäure zwei Diastereomere. Es wird angenommen, daß das L-Aminosäure-FDAA-Diastereomer (**80**) eine stärkere Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Säuregruppe und der Säureamidgruppe zeigt als das D-Aminosäure-FDAA-

Diastereomer (**81**), worauf das unterschiedliche chromatographische Verhalten zurückzuführen ist.¹⁰⁰

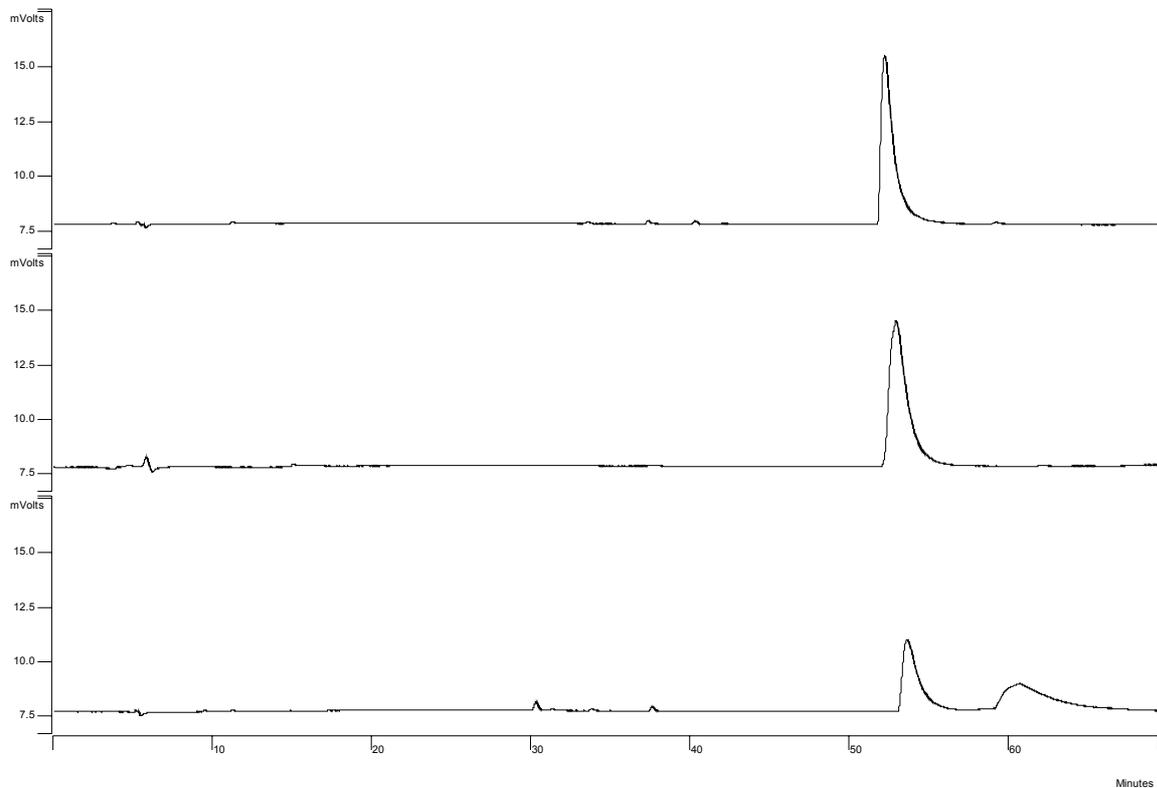


Abbildung 63: HPL-Chromatogramme nach Derivatisierung mit Marfey's Reagenz. **oben**: Sauer hydrolysiertes Phenamid, **mitte**: L-Phenylalanin und **unten**: Gemisch D/L-Phenylalanin.

Durch chromatographischen Vergleich des sauer hydrolysierten Phenamids mit L-Phenylalanin bzw. dem Gemisch aus D/L-Phenylalanin konnte die absolute Konfiguration des stereogenen Zentrums in Phenamid eindeutig als L festgelegt werden (Abb. 63).

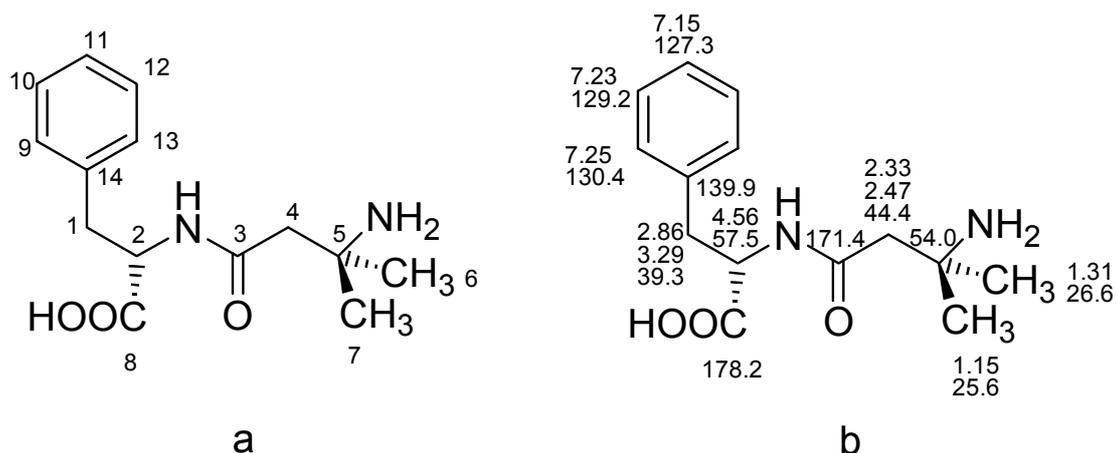


Abbildung 64: Struktur von Phenamid (**37**) mit **a**: Numerierung und **b**: NMR-Verschiebungen.

8.2.2 Einkristallstrukturanalyse

Nach einigen Wochen Lagerung des Naturstoffs (**37**) im Kühlschrank konnten Kristalle erhalten werden, die röntgenspektroskopisch vermessen wurden.

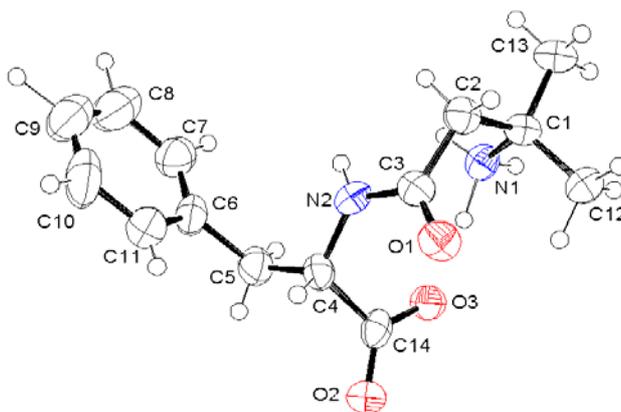
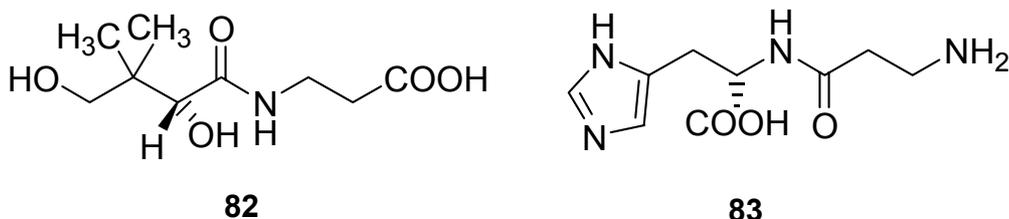


Abbildung 65: Röntgenstruktur des Naturstoffs Phenamid (**37**).

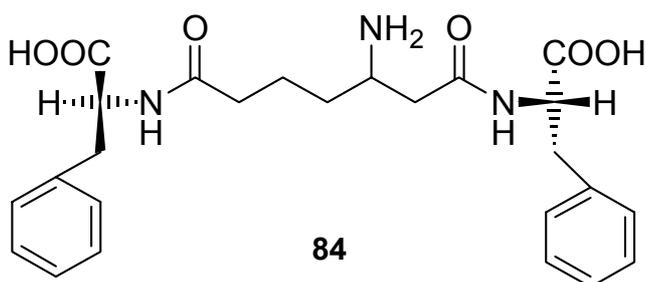
8.3 β -Aminosäuren

Bei einem Strukturfragment von Phenamid (**37**) handelt es sich um eine β -Aminosäure: β -Valin. Natürlich vorkommende Aminosäuren sind größtenteils α -Aminosäuren, d.h. Carboxy- und Amino-Gruppen sind über ein gemeinsames α -

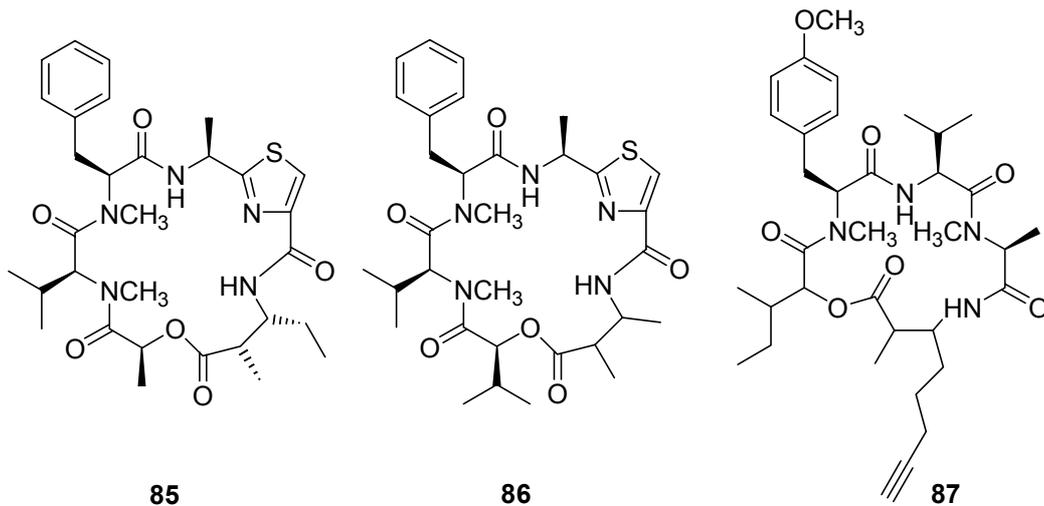
Kohlenstoffatom verknüpft. Eine der häufig in der Natur vorkommenden β -Aminosäuren ist β -Alanin. Es tritt als Baustein in der Pantothersäure (**82**) auf, die zu den wasserlöslichen Vitaminen des B-Komplexes zählt. Weiterhin ist sie Bestandteil des Carnosins (**83**), einer nicht-proteinogenen Aminosäure, die im Muskelgewebe des Menschen und vieler Tiere vorkommt.



Obwohl natürlich vorkommende Peptide üblicherweise aus α -Aminosäuren aufgebaut sind wurde von Beispielen berichtet, die β -Aminosäuren als Bausteine enthalten. Das Tripeptid **84**, isoliert aus einem mit dem Schwamm *Dysidea fragilis* assoziierten Bakterium, ist aus zwei L-Phenylalanin und einer β -Aminosäure aufgebaut.¹⁰¹ Bei der β -Aminosäure handelt es sich um β -Aminopimelinsäure, die zum ersten Mal als Teil eines Naturstoffs isoliert wurde. Die verwandte Diaminopimelinsäure (DAP) wurde als Bestandteil eines Peptidoglycans identifiziert, welches eine starke antivirale Aktivität besitzt.¹⁰² DAP gilt weiterhin als Vorläufer der Lysin-Biosynthese in Bakterien und höheren Pflanzen.



Von den bisher aus marinen Cyanobakterien isolierten makrocyclischen Peptiden enthalten ca. 65% entweder β -Aminosäuren oder β -Hydroxysäuren.¹⁰³ Beispielsweise konnten mehrere cyclische Peptide, die Guineamide (**85–87**), aus dem marinen Cyanobakterium *Lyngbya majuscula* isoliert werden.¹⁰⁴ Guineamid A (**85**) besitzt 2-Methyl-3-aminopentansäure als Teilstruktur, Guanamid B (**86**) 2-Methyl-3-aminobuttersäure und Guanamid C (**87**) 2-Methyl-3-amino-oct-7-ensäure.



Seit einiger Zeit erregen die β -Aminosäuren besonderes Interesse als Kandidaten zum Einsatz als Peptidmimetica in der medizinischen Chemie. Der Nachteil von physiologisch aktiven Peptiden, bestehend aus α -Aminosäuren, im medizinischen Gebrauch besteht in der geringen Bioverfügbarkeit und ihren relativ geringen Halbwertszeiten, besonders nach oraler Applikation. Diese Peptide werden verhältnismäßig schnell durch Proteasen abgebaut. Eine Möglichkeit zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit besteht im Einsatz von sogenannten β -Peptiden. Diese haben den Vorteil, daß sie eine außerordentliche Stabilität gegenüber dem Abbau durch Proteasen und Peptidasen, einschließlich der aggressivsten wie Pronase und Proteinase K besitzen.¹⁰⁵

8.4 Reinigung

Die weitere Reinigung der zweiten Fraktion des Rohextraktes des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 führte zur Isolierung einer Fraktion, die aufgrund der dünnschichtchromatographischen Analyse und der relativen Integrationen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum annähernd sauber erschien. Zweifache HPL-chromatographische Reinigung an RP-18 mit unterschiedlichen Anteilen an Acetonitril/Wasser führte zu keiner signifikanten Änderung der $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der isolierten Fraktion, die in einer Menge von 3 mg erhalten werden konnte.

8.4.1 Strukturaufklärung

Das $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Abb. 66) der isolierten Fraktion deutet auf das Vorliegen mehrerer Aminosäuren aufgrund charakteristischer Signale im Bereich zwischen 4.0 und 4.5 ppm. Diese sind typisch für die α -Protonen der Aminosäuren, und so entsprechen die Integrationen der Signale bei $\delta_{\text{H}} = 4.03, 4.06, 4.20$ und 4.36 auch jeweils einem Proton. Die Integration der beiden Dubletts im aromatischen Bereich ergeben jeweils zwei Protonen ($\delta_{\text{H}} = 6.70$ und 7.04), während die beiden Dubletts bei $\delta_{\text{H}} = 0.93$ und 1.09 jeweils eine Methylgruppe identifizieren. Die Integration der Signale bei $\delta_{\text{H}} = 3.55, 3.06, 1.94$ und 1.80 entsprechen jeweils zwei Protonen. Bei den restlichen Signalen, die bei $\delta_{\text{H}} = 1.24, 2.01, 2.09, 2.30, 2.48, 3.36$ und 3.49 liegen, handelt es sich jeweils um ein Proton.

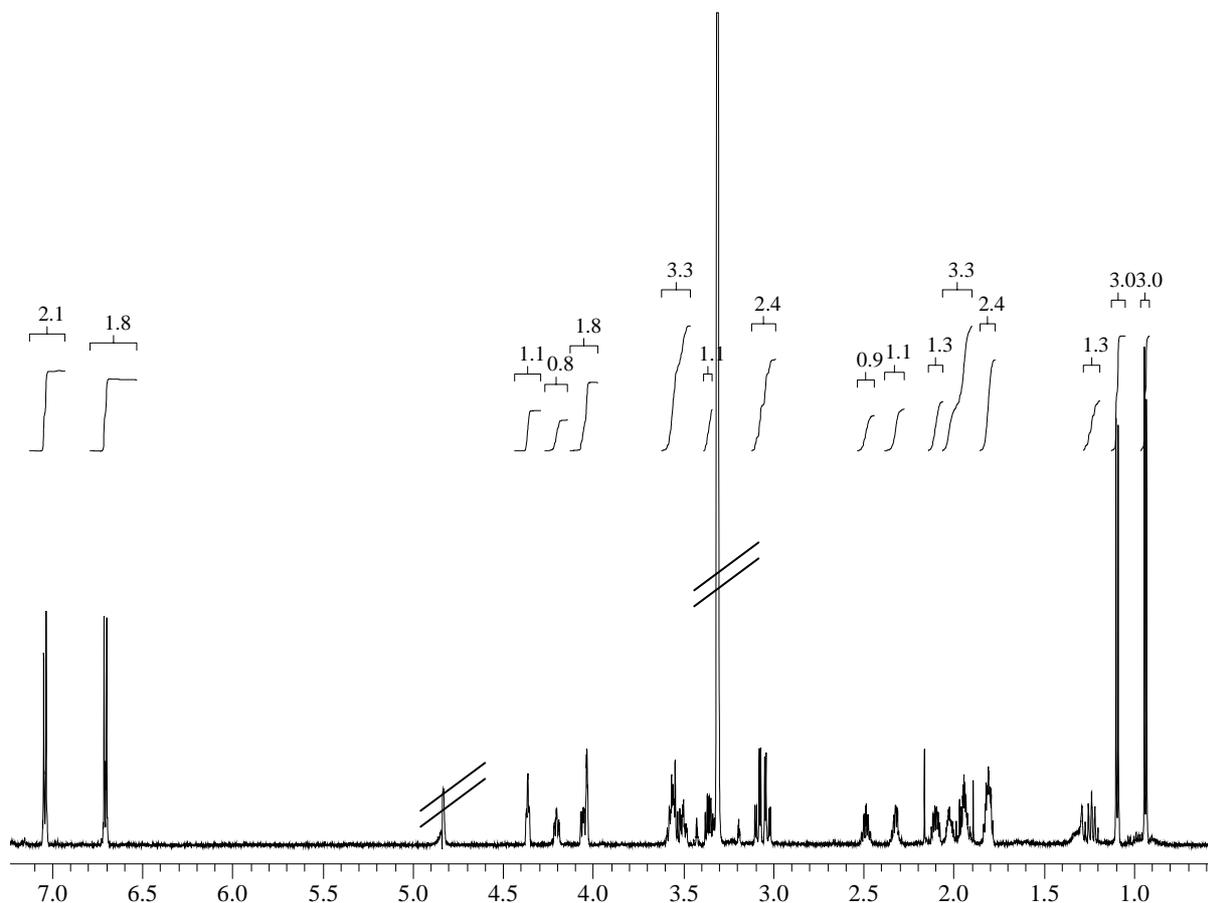


Abbildung 66: ^1H -NMR-Spektrum der isolierten Fraktion, $[\text{D}_4]\text{Methanol}$, 600 MHz.

Im ^{13}C -NMR-Spektrum können insgesamt 24 Kohlenstoffatome detektiert werden. Davon entsprechen zwei CH_3 - und sieben CH_2 -Gruppen, sowie vier aromatische CH - und fünf aliphatische CH -Gruppen sowie sechs quartäre Kohlenstoffatome.

Das Aufspaltungsmuster der aromatischen Dubletts im ^1H -NMR-Spektrum ($\delta_{\text{H}} = 6.70$ und 7.04) und ihre Kopplungskonstante von $^3J_{\text{HH}} = 8.8$ Hz deutet auf das Vorliegen einer 1,4-disubstituierten Benzol-Teilstruktur. Außer einer wechselseitigen Kopplung der beiden Signale im HMBC-Spektrum zeigen sie weiterhin eine gemeinsame Kopplung zu einem quartären Kohlenstoffsignal bei $\delta_{\text{C}} = 157.8$, welches aufgrund seiner Tieffeldverschiebung durch ein Heteroatom substituiert sein könnte. Nur die aromatische CH -Gruppe mit $\delta_{\text{H}} = 6.70$ und $\delta_{\text{C}} = 116.3$ koppelt mit dem quartären Kohlenstoff bei $\delta_{\text{C}} = 127.8$, nicht jedoch das CH bei $\delta_{\text{H}} = 7.04$ und $\delta_{\text{C}} = 116.3$. Dies zeigt eine wechselseitige Kopplung zu der diastereotopen CH_2 -Gruppe bei $\delta_{\text{H}} = 3.04$ und 3.08 / $\delta_{\text{C}} = 37.8$. Die weitere Auswertung des HMBC-Spektrums läßt eine aliphatische CH -Gruppe ($\delta_{\text{H}} = 4.36$ und $\delta_{\text{C}} = 58.0$) anschließen. Berücksichtigt man die

Vermutung, daß in der isolierten Fraktion Aminosäuren als Teilstrukturen vorliegen, kann man Tyrosin als Baustein formulieren.

Da die beiden Methylgruppen bei $\delta_H = 0.93$ und 1.09 zu Dubletts aufgespalten sind, sind sie jeweils mit einer CH-Gruppe substituiert, was auf Valin oder Leucin als weiteren Bestandteil hinweist. Bei der Auswertung des HMBC- und 1H - 1H -COSY-Spektrums zeigen die Methylgruppen Kopplungen zu zwei CH-Gruppen, von denen eines dem α -CH entspricht ($\delta_H = 4.03$ und $\delta_C = 61.6$). Somit wäre Valin identifiziert.

Bei den restlichen Signalen im 1H -NMR-Spektrum handelt es sich ausschließlich um CH- und CH_2 -Gruppen. Besonders die Auswertung des HSQC-Spektrums erweist sich als schwierig, da gerade im ^{13}C -NMR-Spektrum einige Signale sehr nah beieinander liegen. Durch die Auswertung des 1H - 1H -COSY-Spektrums lassen sich zwei Ketten von jeweils drei CH_2 -Einheiten identifizieren. Eine Kette besteht aus CH_2 -Gruppen mit diastereotopen Protonen, angefangen mit $\delta_H = 3.49$ und 3.55 , gefolgt von $\delta_H = 1.94$ und 2.01 . Die abschließende CH_2 -Gruppe ($\delta_H = 1.94$ und 2.30) zeigt außerdem eine HMBC Korrelation zu einer α -CH-Gruppe bei $\delta_H = 4.20$ und $\delta_C = 61.2$. Mit der zweiten Kette verhält es sich ähnlich. So beginnt sie mit einer CH_2 -Gruppe mit $\delta_H = 3.36$ und 3.55 , an die sich die zwei weitere CH_2 -Gruppen ($\delta_H = 1.80$ und $1.24 / 20.9$) anschließen. Der Abschluß bildet wieder eine α -CH-Gruppe bei $\delta_H = 4.06$.

Es gibt nur zwei Aminosäuren, Arginin und Prolin, die eine solche CH_2 -Kette enthalten. Da die Tieffeldverschiebung der endständigen CH_2 -Gruppe auf eine Substitution durch ein Heteroatom hinweist, muß zur Unterscheidung ein anderes Merkmal herangezogen werden. Arginin besitzt eine Guanidin-Einheit, dessen Kohlenstoffsignal üblicherweise eine Verschiebung um 158 - 159 ppm zeigt. Im ^{13}C -NMR-Spektrum ist nur ein Signal zu detektieren, das dieser Verschiebung entsprechen würde ($\delta_C = 157.8$). Dieses konnte jedoch eindeutig Tyrosin zugeordnet werden. Infolgedessen können beide CH_2 -Ketten zu zwei Prolin-Einheiten zusammengefügt werden.

Die jeweiligen Carbonylkohlenstoffatome wurden aufgrund der Korrelationen der α -Protonen zugeordnet. Während $\delta_H = 4.03$ eine Kopplung zu $\delta_C = 167.4$ zeigt, koppelt $\delta_H = 4.06$ zu $\delta_C = 170.6$ und $\delta_H = 4.20$ zu $\delta_C = 172.4$. Die Zuordnung für Valin, Prolin war Prolin relativ eindeutig, jedoch das α -Proton ($\delta_H = 4.36$) von Tyrosin zeigte Kopplungen zu zwei Carbonylkohlenstoffen, $\delta_C = 170.6$ und 166.8 . Da $\delta_C = 170.6$ als der Carbonylkohlenstoff von Prolin identifiziert worden war, kann $\delta_C = 166.8$ Tyrosin zugeordnet werden (Abb. 67).

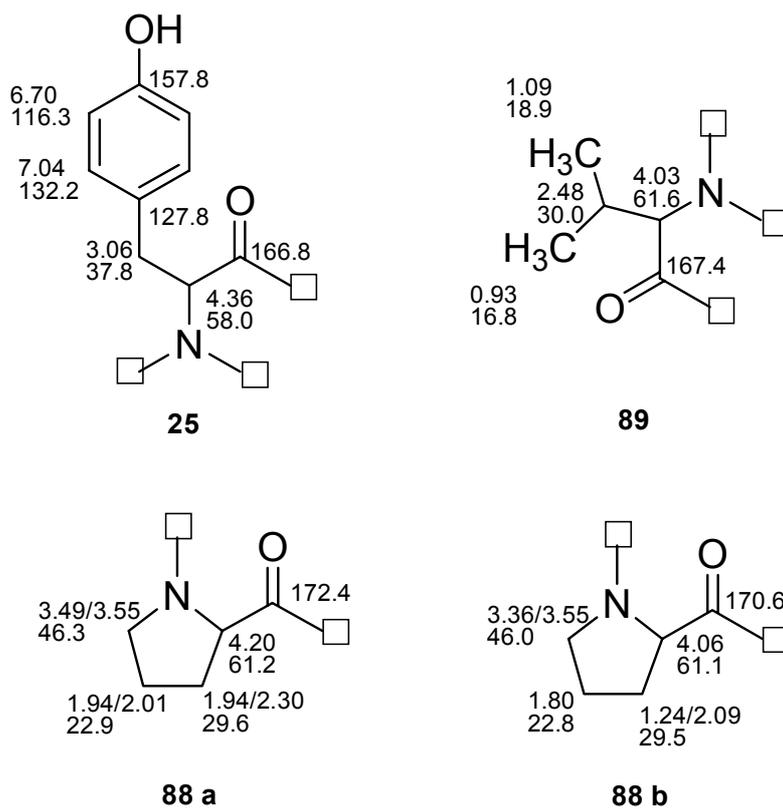


Abbildung 67: In der isolierten Fraktion identifizierte Aminosäuren.

Tabelle 11: NMR-spektroskopische Daten der in der isolierten Fraktion vorliegenden Aminosäuren, HMBC-Korrelationen beziehen sich auf die Positionsnummern.

Position	δ_{H} [ppm] (mult., J_{HH} [Hz], Integr.)	δ_{C} [ppm]	HMBC
Prolin (88 b)			
1		170.6	
2	4.06 (dd, $J = 8.7, 6.2, 1\text{H}$)	61.1	1, 3
3	1.24 (m, 1H); 2.09 (m, 1H)	29.5	2, 4
4	1.80 (m, 2H)	22.8	2, 3, 5
5	3.35 (m, 1H); 3.55 (m, 1H)	46.0	2, 3, 4
Valin (89)			
1		167.4	
2	4.03 (br, 1H)	61.6	1, 3, 4, 5
3	2.48 (m, 3H)	30.0	2, 4, 5
4	0.93 (d, $J = 6.7, 3\text{H}$)	16.8	2, 3, 5
5	1.09 (d, $J = 7.2, 3\text{H}$)	18.9	2, 3, 4
Prolin (88 a)			
1		172.4	
2	4.20 (dd, $J = 7.2, 7.7, 1\text{H}$)	61.2	1, 3
3	1.94 (m, 1H); 2.30 (m, 1H)	29.6	1, 2, 4
4	1.94 (m, 1H); 2.01 (m, 1H)	22.9	2, 3, 5
5	3.49 (m, 1H); 3.55 (m, 1H)	46.3	2, 3, 4
Tyrosin (25)			
1		166.8	
2	4.36 (dd, $J = 5.6, 4.6, 1\text{H}$)	58.0	1, 3, 4
3	3.04 (dd, $J = 14.4, 4.6, 1\text{H}$); 3.08 (dd, $J = 14.4, 5.6, 1\text{H}$)	37.8	1, 2, 4, 5
4		127.8	
5 + 9	7.04 (d, $J = 8.8, 2\text{H}$)	132.2	3, 7
6 + 8	6.70 (d, $J = 8.8, 2\text{H}$)	116.3	4
7		157.8	

8.4.2 Zusammensetzung der Teilfragmente

Die mehrfache Reinigung der isolierten Fraktion sowie die zueinander passenden relativen Integrationen der Protonensignale im ^1H -NMR-Spektrum lassen vermuten, daß es sich bei der isolierten Fraktion um eine saubere Verbindung handelt. Die einzelnen Aminosäuren sollten über Amidbindungen miteinander verknüpft sein. Obwohl lediglich das α -Proton der Aminosäure Tyrosin (**25**) HMBC-Kopplungen zu zwei Carbonylkohlenstoffatomen zeigt, können weitere Bindungen nicht ausgeschlossen werden. Ausgehend von den identifizierten Aminosäuren Tyrosin (**25**), Valin (**89**), Prolin (**88 a**) und Prolin (**88 b**) können folgende Strukturvarianten angenommen werden.

- Die vier Aminosäuren liegen als offenkettiges Tetrapeptid vor
- Die vier Aminosäuren liegen als cyclisches Tetrapeptid vor
- Die vier Aminosäuren liegen als zwei verschiedene Diketopiperazine vor

Obwohl die $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Werte für das Vorliegen einer einzigen Verbindung sprechen, besteht die Möglichkeit, daß es sich bei der isolierten Fraktion um ein 1:1 Gemisch zweier Diketopiperazine handelt, die sich mit den gewählten Trennverfahren nicht isolieren ließen. Aus zahlreichen Hefen und Pilzen konnten bereits Diketopiperazine isoliert werden.¹⁰⁶ Während cyclo-(L-Pro-L-Val) (**38**) als ein Sekundärmetabolit des marinen Bakterium *Micrococcus* sp. identifiziert wurde,¹⁰⁷ gelang die Isolierung von cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (**39**) aus der Fermentationskultur von *Vibrio parahaemolyticus* (Abb. 68).¹⁰⁸

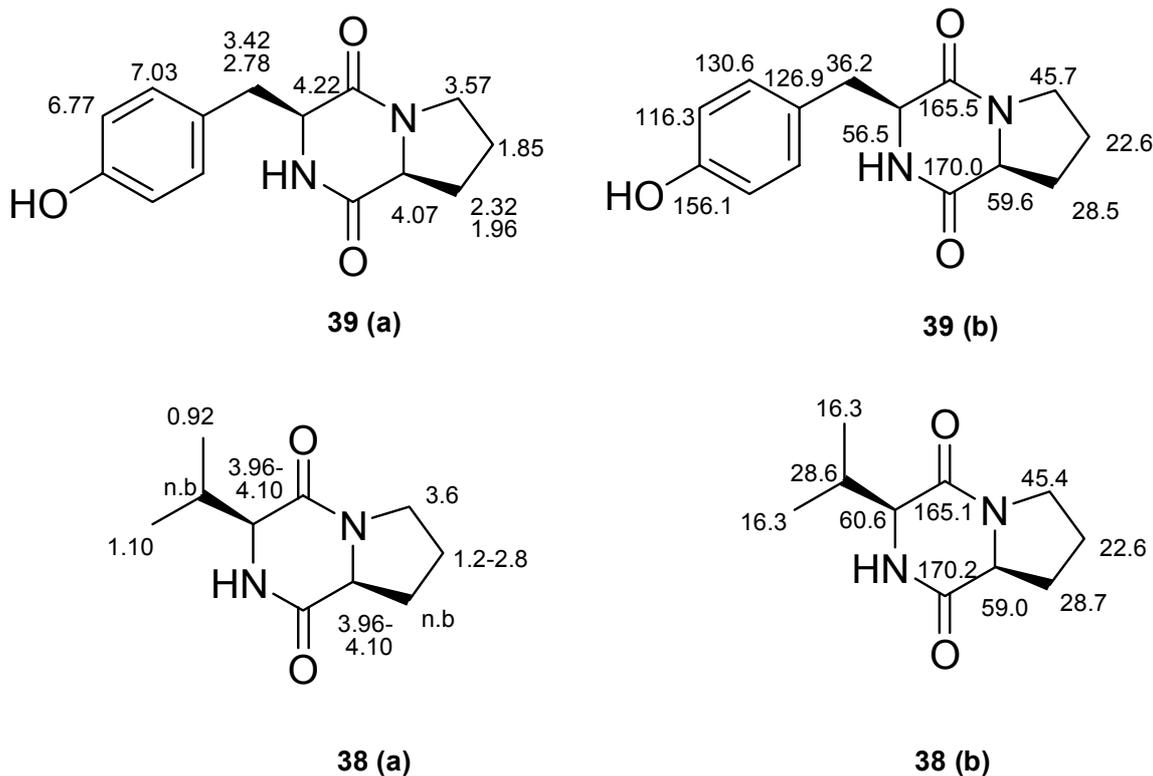


Abbildung 68: $^1\text{H-NMR}$ -**(a)** und $^{13}\text{C-NMR}$ -**(b)**-spektroskopische Daten von cyclo-(L-Pro-L-Val) (**38**) und cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (**39**), $[\text{D}_1]\text{Chloroform}$. Der Literatur entnommen.

Auch die Bildung eines Tetrapeptids kann aufgrund der bisher gesammelten NMR-spektroskopischen Daten nicht ausgeschlossen werden. Kawagishi et al. beschrieben

die Isolierung des Cyclotetrapeptids cyclo-(L-Pro-L-Tyr-L-Pro-L-Val-) (**90**, Abb. 69) aus dem Bakterium *Lactobacillus helveticus*.¹⁰⁹

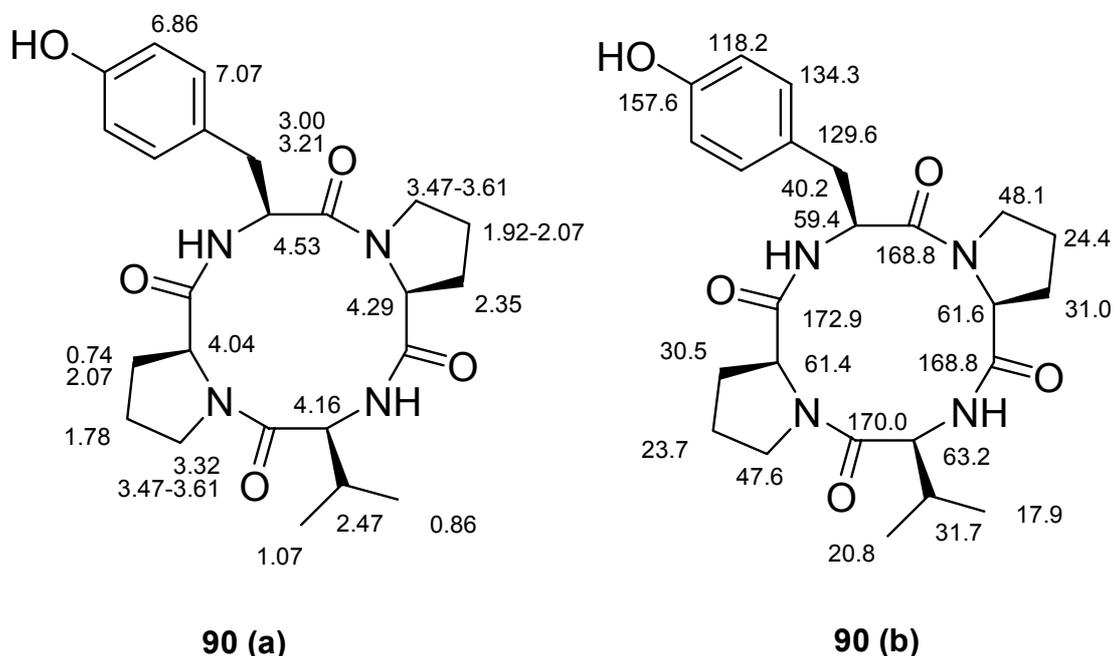


Abbildung 69: NMR-spektroskopische Daten des Cyclotetrapeptids cyclo-(L-Pro-L-Tyr-L-Pro-L-Val) (**90**): (a) ^1H -NMR-Verschiebungen, (b) ^{13}C -NMR-Verschiebungen, $[\text{D}_1]\text{Chloroform}$. Der Literatur entnommen.

Die Gegenüberstellung der gemessenen NMR-spektroskopischen Daten der isolierten Fraktion mit den NMR-Verschiebungen der Diketopiperazine (**38** und **39**) und des Tetrapeptids (**90**) lassen keine eindeutige Schlußfolgerung zu. Die deutlichsten Unterschiede zwischen cyclischem Di- und Tetrapeptid sind bei den α -Protonen der Aminosäuren zu beobachten. Einer ^1H -NMR-Verschiebung des α -Protons des Tyrosins (**25**) von $\delta_{\text{H}} = 4.53$ beim cyclischen Tetrapeptid (**90**) steht eine Verschiebung von $\delta_{\text{H}} = 4.22$ bei cyclo-(L-Pro-L-Tyr) (**39**) gegenüber. Keine dieser Verschiebungen steht im Einklang mit dem gemessenen Wert von $\delta_{\text{H}} = 4.36$. Auch eine beobachtete ^1H -NMR-Verschiebung bei der isolierten Verbindung von $\delta_{\text{H}} = 4.20$ für ein α -Proton eines Prolins (**91 a**) spricht für keines der cyclischen Peptide. Beim cyclischen Tetrapeptid (**90**) konnten für Prolin jeweils $\delta_{\text{H}} = 4.29$ und 4.04 detektiert werden, während die ^1H -NMR-Verschiebungen der Diketopiperazine für diese Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 3.96$ - 4.10 liegen.

Es ist anzunehmen, daß sich im Falle eines offenkettigen Tetrapeptids die NMR-spektroskopischen Daten der α -Protonen von denen der Cyclopeptide unterscheiden.

Da es zu Beginn der Strukturaufklärung nicht möglich war, auch mit verschiedenen spektrometrischen Methoden ein aussagekräftiges Massenspektrum zu erhalten, wurden zur Auswertung der isolierten Fraktion weitere NMR-spektroskopische Messungen durchgeführt.

8.4.3 Weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen

Bei einer routinemäßigen Aufnahme von HMBC-Spektren wird eine Wartezeit von 60 ms zwischen dem ersten Protonenpuls und dem ersten Kohlenstoffpuls für die Entwicklung der heteronuklearen Kopplung gewählt. Unter diesen Bedingungen wird ein optimaler Transfer für Korrelationssignale erreicht, bei denen die Kopplungskonstante ungefähr 8 Hz beträgt. Hierbei sind manche Korrelationen sehr klein oder treten gar nicht auf. Besonders bei der Strukturaufklärung unbekannter Naturstoffe bedeutet die Einstellung der Wartezeit ein großes Problem, da die Werte der Kopplungskonstanten nicht bekannt sind.

Bei der vorliegenden isolierten Fraktion gilt es, weitere Kopplungen als die im Routinespektrum detektierten zu identifizieren. Um zusätzliche $^3J_{\text{CH}}$ -Kopplungen von den α -Protonen zu den Carbonylsignalen beobachten zu können, wurde ein weiteres HMBC-Experiment aufgenommen. Diesmal wurde die Wartezeit derart optimiert, daß Korrelationssignale, deren Kopplungskonstanten ungefähr 3 Hz betragen, identifiziert werden können.

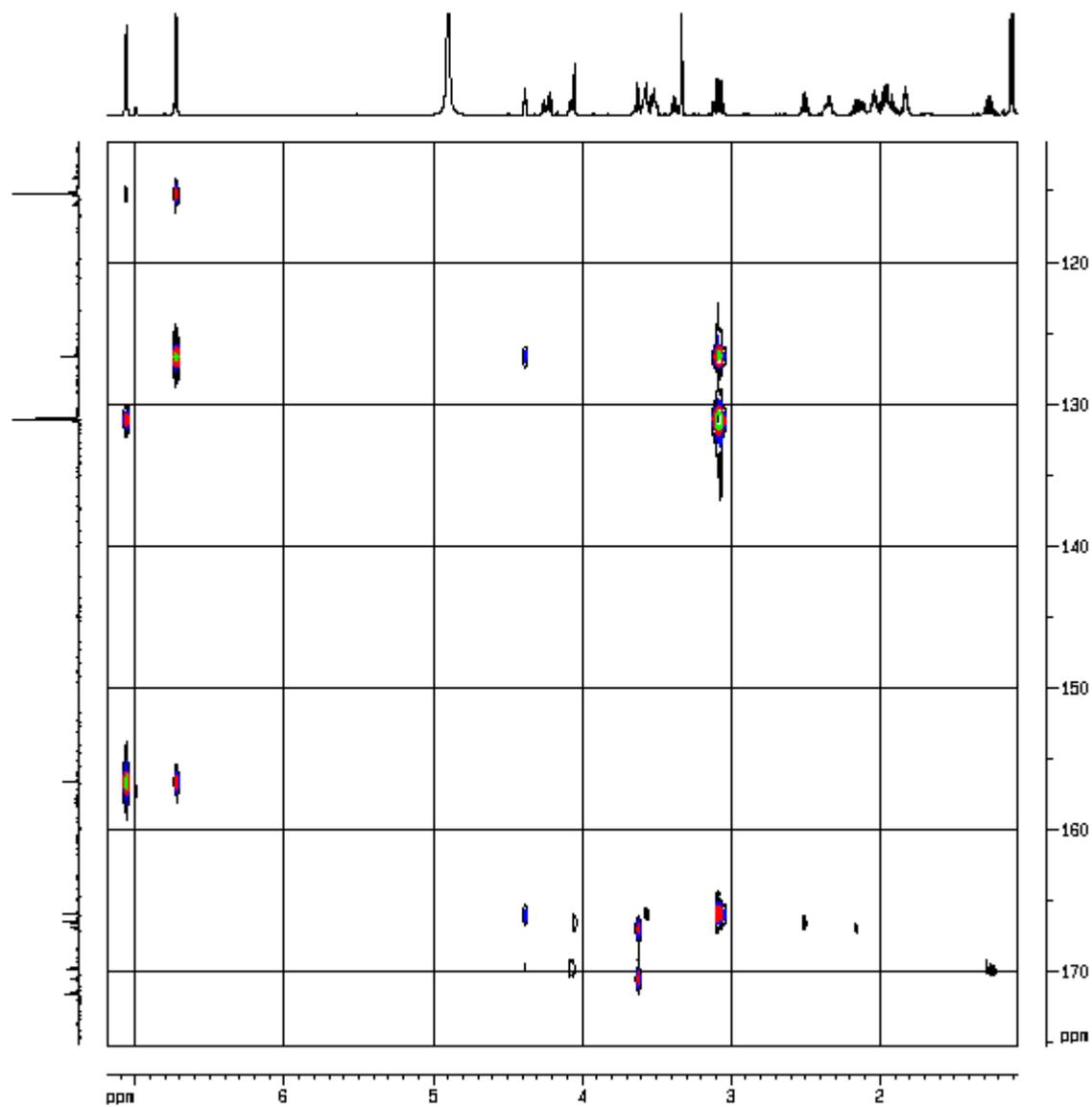


Abbildung 70: HMBC-Spektrum der isolierten Fraktion, Kreuzsignale mit Kopplungskonstanten um 8 Hz, Ausschnitt.

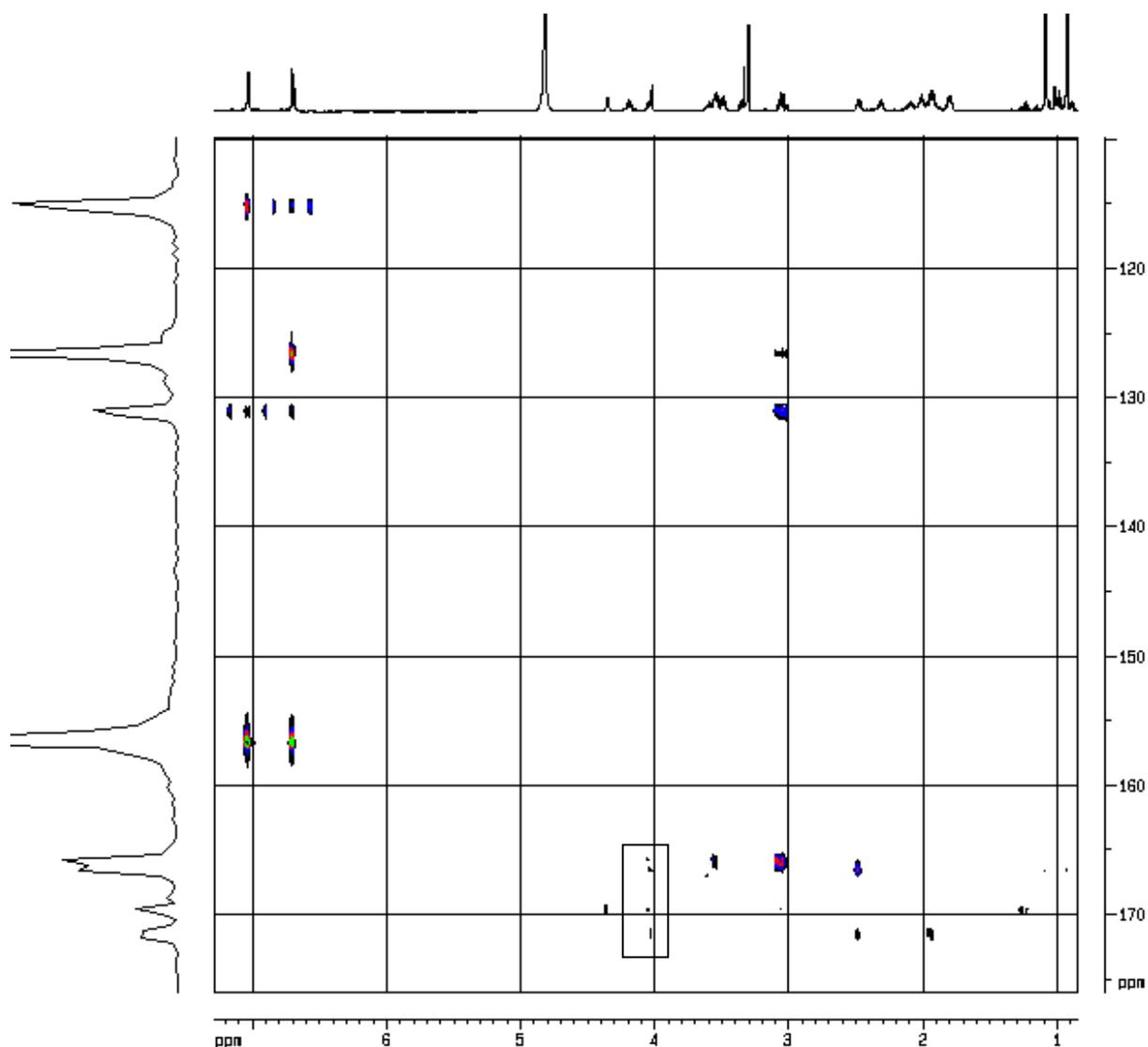
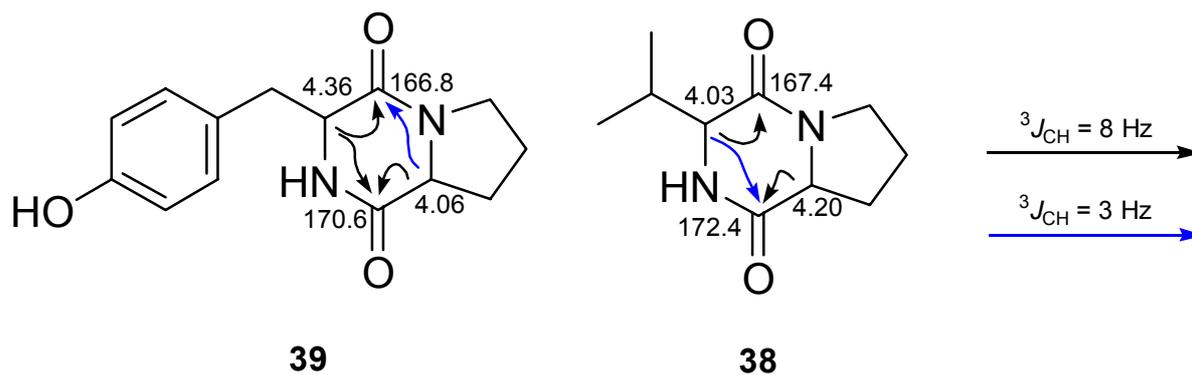


Abbildung 71: HMBC-Spektrum der isolierten Fraktion, Kreuzsignale mit Kopplungskonstanten um 3 Hz, Ausschnitt.

Durch die Aufnahme des zweiten HMBC-Spektrums konnte eine weitere Korrelation des α -Proton von Valin (**89**) detektiert werden. Neben der schon beobachteten Kopplung von $\delta_{\text{H}} = 4.03$ zu $\delta_{\text{C}} = 167.4$ koppelt es auch zu $\delta_{\text{C}} = 172.4$, dem Carbonylkohlenstoff eines Prolins (**88**). Weiterhin koppelt $\delta_{\text{H}} = 4.06$ nun auch zu $\delta_{\text{C}} = 166.8$, dem Carbonylkohlenstoff des Tyrosins (**25**) (Abb. 71).

Infolgedessen kann für die isolierte Fraktion das Vorliegen zweier Diketopiperazine, cyclo-(Pro-Tyr) (**39**) und cyclo-(Pro-Val) (**38**), im Verhältnis 1:1 angenommen werden (Abb. 72).

Abbildung 72: Diketopiperazine **38** und **39** mit HMBC-Korrelationen.

Obwohl nach der Identifizierung zusätzlicher $^3J_{CH}$ -Korrelationen die NMR-spektroskopischen Daten für das Vorliegen der beiden Diketopiperazine **38** und **39** sprechen, weisen besonders die gemessenen ^1H -NMR-Verschiebungen der α -Protonen der Aminosäuren erstaunlich große Abweichungen im Vergleich zu den der Literatur entnommenen Werten auf (Tab. 12).

Tabelle 12: Vergleich der gemessenen ^1H -NMR-Verschiebungen der α -Protonen mit Literaturwerten.

	$\delta_{\text{H}}(\text{gem. Wert} - \text{Diketopiperazin Lit.})$ [ppm]	$\delta_{\text{H}}(\text{gem. Wert} - \text{Tetrapeptid Lit.})$ [ppm]
Prolin (88 b)	-0.01	+0.02
Prolin (88 a)	+0.24 - +0.01	-0.09
Valin (89)	+0.07 - -0.07	-0.13
Tyrosin (25)	+0.14	-0.27

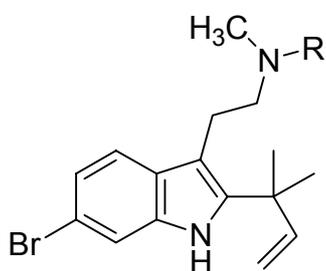
Sowohl der Vergleich der gemessenen α -Protonen mit den Werten der Diketopiperazine als auch mit den Werten des Tetrapeptids führt zu Differenzen der NMR-Verschiebungen zwischen -0.01 und $+0.14$ ppm beziehungsweise $+0.02$ und -0.27 ppm. Aufgrund der NMR-spektroskopischen Daten konnten keine eindeutigen Übereinstimmungen gefunden werden.

Auf Basis der Annahme, daß zwei Diketopiperazine (**38** und **39**) in der isolierten Verbindung vorliegen, wurden weitere massenspektrometrische Analysen durchgeführt mit besonderer Beachtung des niedermolekularen Bereichs.

Infolgedessen konnten beide Diketopiperazine im hochaufgelösten Massenspektrum detektiert werden, jedoch mit verhältnismäßig großen Abweichungen von 42 ppm für cyclo-(Pro-Val) (**38**) und 32 ppm für cyclo-(Pro-Tyr) (**39**). Die Synthese des offenkettigen Tetrapeptids soll Aufklärung über das spektroskopische und spektrometrische Verhalten des Peptids bringen.

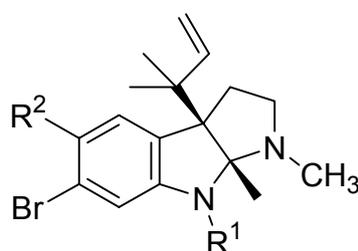
9 Studie zum Vorkommen von biologisch aktiven Sekundärstoffen in Meeresorganismen aus gemäßigten Gewässern

Während der Sekundärstoffwechsel wirbelloser Tiere der Antarktis relativ gut untersucht ist, ist über die Sekundärmetaboliten wirbelloser Tiere gemäßigter und arktischer Gewässer, bis auf wenige Ausnahmen, verhältnismäßig wenig bekannt. Ein relativ intensiv erforschter Organismus ist das Moostierchen *Flustra foliacea*, das schon vor einiger Zeit als Quelle neuer Naturstoffe identifiziert wurde. Die aus *F. foliacea* isolierten Naturstoffe besitzen eine Pyrrolo[2,3-b]indol-Teilstruktur, welche auch im für die Behandlung der Alzheimerschen Krankheit diskutierten Acetylcholinesterase-Inhibitor Physostigmin vorkommt.^{110,111} Bisher wurden 13 Alkaloide aus dem in der Nordsee vorkommenden Moostierchens beschrieben.^{112,113} Das von Lysek et al. isolierte Deformylflustrabromin (**91**) besitzt eine schwache cytotoxische Aktivität ($IC_{50} = 5.8 \mu M$ gegen HCT-116 Darmkrebszellen).¹¹⁴ Einige weitere Alkaloide aus *Flustra foliacea* zeigen muskelrelaxierende Effekte und antimikrobielle Aktivität. Insgesamt ist aber über die biologische Aktivität der bromierten Indolalkaloide aus *F. foliacea* wenig bekannt.



92: R = CHO (Flustrabromin)

91: R = H (Deformylflustrabromin)



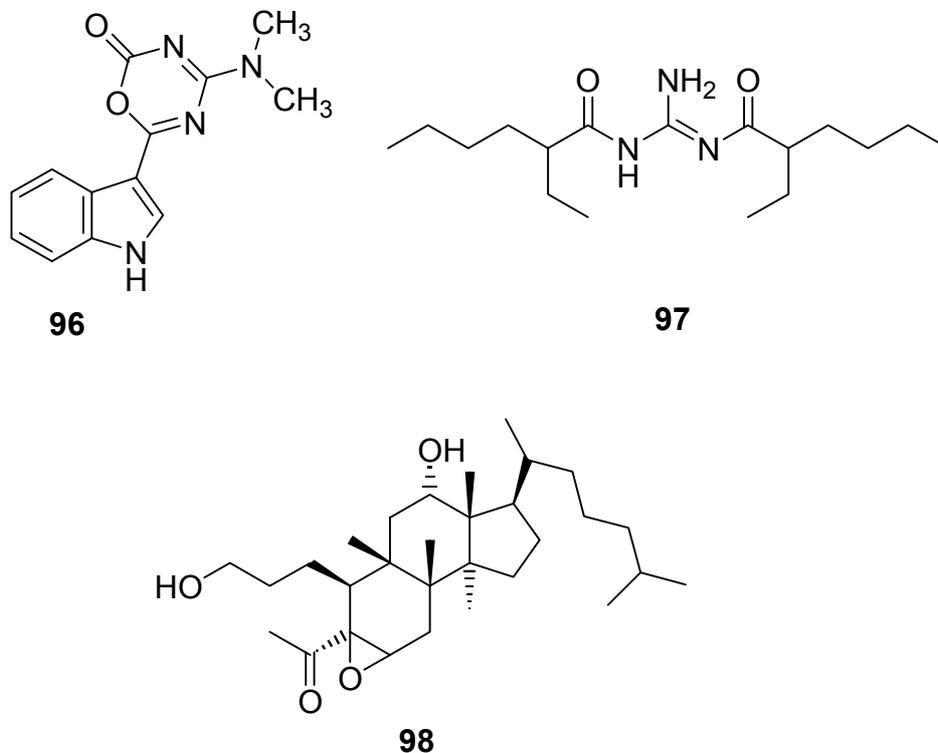
93: R¹ = Prenyl, R² = H (Flustramin A)

94: R¹ = H, R² = Prenyl (Flustramin D)

95: R¹ = H, R² = H (Dihydroflustramin C)

Ein weiteres Indolalkaloid, Alboinon (**96**), konnte von Bergmann et al. aus der Seescheide *Dendrodoa grossularia* isoliert werden.¹¹⁵ Die Seescheide kommt in der Nordsee und in der baltischen See vor. Die Nacktschnecke *Limacia clavigera* lebt entlang der Küsten von Norwegen, Großbritannien und Frankreich, und ist durch ihre eigenwillige Musterung leicht zu identifizieren. Da sie keine Schale besitzt, liegt die Vermutung nahe, daß sie sich durch Sekundärmetaboliten gegen Angreifer schützt. Die Extraktion der Nacktschnecke führte zur Isolierung und Aufklärung von

Limaciamin (**97**), einem symmetrischen Diacylguanidin.¹¹⁶ Das degradierte Triterpenoid Lovenon (**98**) wurde aus einer weiteren, in der Nordsee gesammelten Nacktschnecke, *Adalaria loveni*, isoliert.¹¹⁷



9.1 Einleitung und Aufgabenstellung

Trotz aller Fortschritte auf den Gebieten der Wirkstoffentwicklung im Pflanzenschutz und in der Pharmaforschung besteht nach wie vor ein großer Bedarf an neuen innovativen Leitstrukturen und Wirkstoffen. Dies bezieht sich in der Agrochemie insbesondere auf Verbindungen, die optimal ökologisch verträglich, in kleineren Mengen selektiv wirksam und dennoch kostengünstiger als bereits am Markt etablierte Produkte sind. In der Pharmaforschung besteht ein großes Interesse an Wirkstoffen gegen nahezu alle Stoffwechselerkrankungen, immunologische Krankheitsformen, verschiedene Krebserkrankungen, neuro-degenerative Erkrankungen sowie parasitäre, virale und bakterielle Infektionen.

Eine wichtige Plattform bei der Suche nach neuen Wirkstoffen bildet die Auswahl origineller Naturstoffquellen. Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Nutzbarkeit des Potentials mariner Naturstoffe aus bisher kaum untersuchten seßhaften oder sich nur langsam fortbewegenden Makroorganismen der Nordsee,

Spitzbergens und des europäischen Nordmeeres im Hinblick auf ihre Einsetzbarkeit im Pflanzenschutz oder in der Pharmaforschung und die Beurteilung dieser Organismen als Quelle neuer Wirkstoffe. Die Durchführung erfolgte im Rahmen eines vom BMBF geförderten Verbundprojekts „Marine Naturstoffe des Nordmeers“ in Zusammenarbeit mit dem Alfred-Wegener-Institut und der BASF AG.

9.2 Beschreibung der Organismen

Im Rahmen dieses Projektes wurden im Benthos vorkommende Lebewesen untersucht. Diese charakterisieren sich dadurch, daß sie sich dicht über, auf dem oder im Meeresboden aufhalten. Kennzeichnend für die meisten Vertreter ist ihre fehlende oder eingeschränkte Mobilität.¹¹⁸

Es wurden ca. 60 verschiedene Makroorganismen zur biologischen Testung bearbeitet, die einen Querschnitt aus den abundanten, sessilen oder sich langsam fortbewegenden Meerestieren darstellen. So wurden Vertreter der Stämme Porifera (Schwämme), Cnidaria (Nesseltiere), Mollusca (Weichtiere), Bryozoa (Moostiere), Annelida (Ringelwürmer), Crustacea (Krebse), Echinodermata (Stachelhäuter), Tunicata (Manteltiere) und Chordata (Chordatiere) ausgewählt.

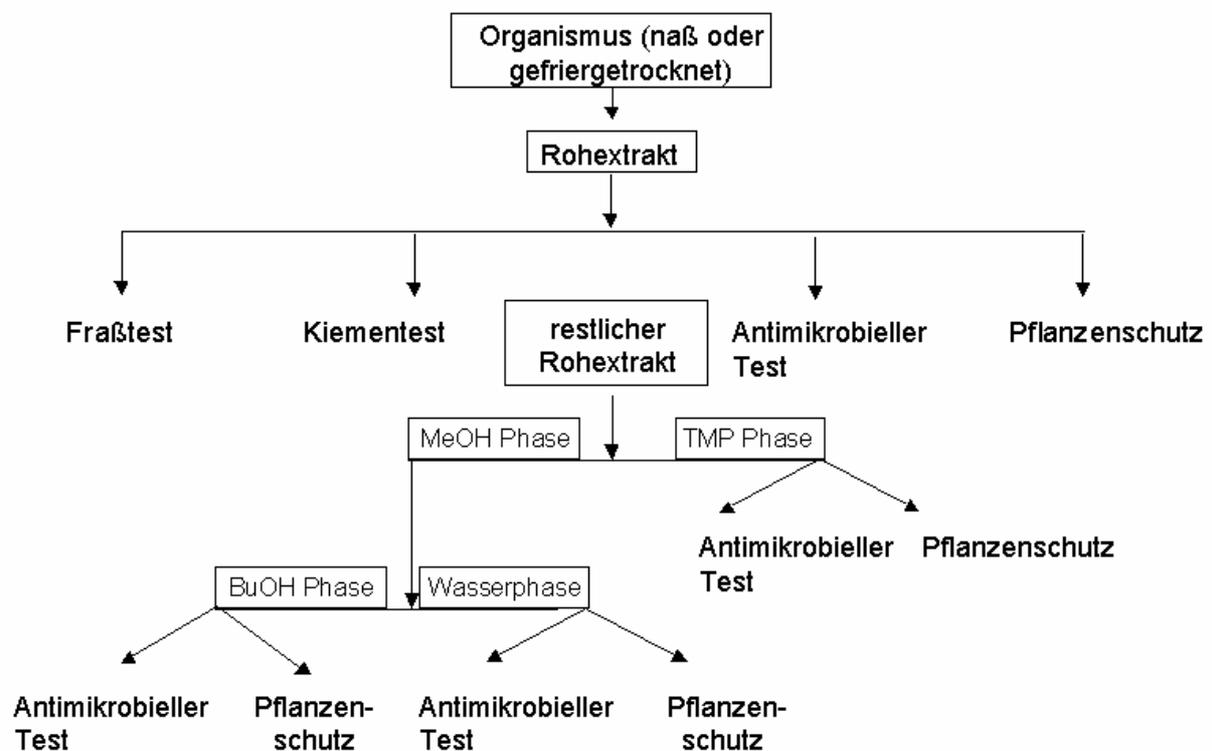
9.3 Herkunft der Organismen

Geographisch konzentrieren sich die Organismen auf Schelf und Küsten der Polarmeere sowie der Nordsee. Die Sammlung der Organismen erfolgte bis zu einer Tiefe von 25 Meter durch Taucher, tiefer liegende Organismen wurden mit einer Dredsche gesammelt. Einige Muschelarten (z.B. *Mya arenaria*, *Cerastoderma edule*) konnten von Hand gesammelt werden.

9.4 Bearbeitung der Organismen

Die gesammelten und gereinigten Organismen wurden sofort in Plastiktüten eingefroren, einige wurden gefriergetrocknet. Die Organismen wurden vollständig extrahiert. Handelte es sich um Schalentiere (Mollusken), so wurden die Schalen abgetrennt. Zu diesem Zweck wurden Lösungsmittel verwendet, die umfassend alle Verbindungen herauslösen und durch abschließende Filtration vom Exoskelett abtrennen.¹¹⁹ So wurde das gefrorene bzw. gefriergetrocknete Material mehrmals mit

Dichlormethan/Methanol (1:1) extrahiert. Die einzelnen Extrakte wurden vereinigt und konzentriert (Rohextrakt; R). Durch Ausschütteln (Phasenverteilung) des getrockneten Rohextraktes mit Methanol und *iso*-Octan (TMP; T) können unpolare Komponenten (z.B. Lipide, β -Carotine oder Fette) von den polaren Verbindungen getrennt werden. Die Methanolphase wurde mehrmals mit *iso*-Octan gewaschen und anschließend eingengt. Die eingengte Methanolphase wurde mit Wasser aufgenommen und gegen *n*-Butanol ausgeschüttelt. In der Wasserphase (W) sammeln sich Salze und sehr polare organische Verbindungen, während sich Alkaloide besser in der *n*-Butanolphase (B) lösen.



Schema 10: Extraktionsschema

9.5 Screeningprogramme

Alle Rohextrakte bzw. Verteilungsfractionen der Organismen wurden mindestens einem, bei Vorliegen genügender Mengen auch mehreren biologischen Tests unterzogen (Schema 10). Da für die verschiedenen Tests verhältnismäßig große Mengen an Substanz zur Verfügung gestellt werden mußten, konnten etwa fünf Organismen lediglich bis zum Rohextrakt bearbeitet werden.

9.5.1 Pflanzenschutz-Screening Tests der BASF

Zur Überprüfung der Nutzbarkeit der Organismen als Quelle für den Pflanzenschutz wurden die Extrakte in Zusammenarbeit der BASF AG Ludwigshafen entweder im Mikrotest, im Gewächshaus oder beidem auf fungizide Aktivität untersucht. Im Mikrotest wird die fungizide Aktivität der Extrakte auf nicht obligat auf Pflanzen wachsende Phytopathogene (z.B. *Botrytis cinerea* – Grauschimmel an Paprika, *Phytophthora infestans* – Kräuterräule bei Tomaten, *Pyricularia oryzae* – Reisbranderreger) bei verschiedenen Konzentrationen geprüft. Während hier der Substanzbedarf relativ gering ist, benötigt man wesentlich mehr Extrakt für den Gewächshaus test. Dafür liefert dieser auch realitätsnähere Ergebnisse. Hier wird z.B. auf Pathogene wie *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* (Weizenmehltau), *Puccinia recondita* (Weizenbraunrost), *Plasmopara viticola* (Rebenperonospora), *Alternaria solani* (Erreger der Blattfleckenkrankheit der Tomate) getestet.

9.5.2 Fraßabschreckung

Zur Untersuchung der Frage, in wie weit die marinen Organismen chemische Abwehrsubstanzen als Fraßschutz oder zum Konkurrenzkampf produzieren, wurde in Kooperation mit Heike Lippert (AWI-Bremerhaven) von einigen Organismen die fraßhemmende Wirkung getestet. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedenen Konsumenten, dem in Spitzbergen häufig vorkommenden Amphipoden *Anonyx nugax* und dem Seestern *Asterias rubens*, in Laborversuchen künstliches Futter mit und ohne Extrakt angeboten.

9.5.3 Elektrophysiologischer Assay

Im Rahmen dieses Projektes wurden in Kooperation mit Ute Postel (AWI-Bremerhaven) die physiologischen Wirkmechanismen von Sekundärmetaboliten auf systemischer bzw. zellulärer Ebene an potentiellen Zielorganismen durchgeführt. Diese Mechanismen bilden die Grundlage für die Wirkungsweise der Naturstoffe im Ökosystem und geben somit Aufschluß über die Funktionsweise von Ökosystemen. Zahlreiche Predatoren sessiler mariner Invertebranten sind Vertreter der Klasse der Krebstiere (Crustacea). Aus diesem Grund diente die isolierte, perfundierte Kieme der

Strandkrabbe *Carcinus maenas* als Bioassay-System zur Untersuchung der Wirkmechanismen von biologisch aktiven marinen Naturstoffen. Gemessen wurden die transepitheliale Potentialdifferenz und die Ammonium-Exkretionsrate.

9.5.4 Antimikrobieller Assay

Das Auftreten Antibiotika resistenter Krankheitserreger lenkt das Interesse der Pharmaforschung verstärkt auf das Auffinden antibiotischer und antifungischer Substanzen. Aus diesem Grund wurden Fraktionen der extrahierten Organismen einem antimikrobiellen Vollzellassay-Screeningprogramm unterzogen. Der Vorteil dieses Assays liegt in der leichten Durchführbarkeit im Labor, sowie in der schnellen Identifizierung aktiver Fraktionen innerhalb von 24 Stunden. Als Testerreger wurden das Methicillin-resistente Bakterium *Staphylokokkus aureus* sowie der Hefepilz *Candida albicans* ausgewählt. Beide Erreger stellen ein zunehmendes Gesundheitsproblem in Krankenhäusern, insbesondere bei immungeschwächten Patienten dar.¹²⁰

9.5.4.1 Prinzip des antimikrobiellen Assays

Bei den antimikrobiellen Assays handelt es sich um Mikro-Verdünnungsreihen, die in einer 96-Well-Mikrotiterplatte (12 x 8 Vertiefungen) durchgeführt werden. Diese Methode hat gegenüber den üblichen Agar-Diffusionstechniken den Vorteil, daß sie schneller ist, nur 0.1 mg der Fraktionen benötigt und 32 fach empfindlicher ist als der Agar-Diffusionstest.¹²¹

Zur Vorbereitung der Assays werden die Erregerstämme (MRSA, *C. albicans* WT = wild type, *C. albicans* AmBR = Amphotericin B resistent) über Nacht in einem sterilen Medium inkubiert. Um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten, wird die Bakterienkonzentration durch Messung der optischen Dichte mit Hilfe eines Densitometers bestimmt. Die Pilzzellen hingegen können unter einem Mikroskop gezählt werden. Nach Ermittlung der jeweils benötigten Menge an Zellsuspension wird in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte ein definiertes Volumen pipettiert. Da die Aktivität anhand einer Verdünnungsreihe ermittelt wird, werden in die oberste Reihe der Mikrotiterplatte die in DMSO gelösten zu untersuchenden Proben pipettiert. Die Anfangskonzentration beträgt 1 mg/ml, wovon 5 µl beim Test auf *S. aureus* und 10 µl

bei *C. albicans* verwendet werden. Davon ausgehend wird die Konzentration in insgesamt 7 Stufen auf jeweils die Hälfte der vorhergehenden Konzentration verdünnt. Nachdem die Bakteriensuspension mit den Testfraktionen versetzt wurde, wird die Mikrotiterplatte für 24 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt, bevor die Ergebnisse abgelesen werden können.

Um falsch-positive bzw. falsch-negative Ergebnisse auszuschließen, werden bei jedem Assay Kontrollsubstanzen mitgetestet. Als negative Kontrolle dient das Lösungsmittel DMSO, als positive Kontrolle Vancomycin bzw. Amphotericin B.

9.6 Das Mengenproblem

Den geringsten Substanzbedarf erforderte der antimikrobielle Test in der Mikrotiterplatte, wobei pro getesteter Fraktion und Test nur 10 bzw. 5 µl Extrakt in einer Konzentration von 1 mg/ml benötigt werden. Bei den restlichen Tests hingegen war der Bedarf ausgesprochen hoch. Abgesehen von den 250 mg für die Gewächshaustests wurden für die Fraßabschreckung ca. 3 g pro Extrakt benötigt, was auf die spezielle Zubereitung der Extrakte zurückzuführen ist. Etwa die gleiche Menge wurde für die Kiemenversuche benötigt.

Von der Hälfte der Organismen standen nur ca. 50 g gefriergetrocknetes Ausgangsmaterial zur Verfügung. Im Durchschnitt wurden 23 % Rohextrakt erhalten, bei den Weichtieren hingegen wurde nur eine Ausbeute von 4 % an Rohextrakt erzielt. Auch wenn in einigen Screening-Programmen Aktivität nachgewiesen wurde, so war es aufgrund des jeweiligen hohen Substanzbedarfs nicht möglich, diese Aktivität in den jeweiligen Fraktionen zu verfolgen. Denn auch für eine gereinigte Verbindung würden im Kiementest oder bei der Fraßabschreckung die gleiche Menge benötigt werden. Die bioaktivitätsgeleitete Isolierung aktiver Naturstoffe mit den verwendeten Test setzt eine hohe Probenmenge der getesteten Substanz oder eine Möglichkeit der schnellen Wiederbeschaffung voraus. Beides war in diesem Verbundprojekt nicht gegeben, wodurch es nicht möglich war, in der gegebenen Zeit die geringen Aktivitäten einzelner Fraktionen zu verfolgen.

9.7 Chemisches Screening

Neben der Testung auf verschiedene biologische Aktivitäten wurden einige Organismen einem sogenannten chemischen Screening unterzogen. Dabei wurden Fraktionen ausgewählt, von denen nach Abzug der Menge für die jeweiligen Tests noch genug Material vorhanden war. Bei einer Fraktion handelt es sich um die *n*-Butanolfraktion von *Synoicum turgens*, einem Manteltierchen. Sie wurde über Sephadex LH-20 mit Methanol in 16 Fraktionen aufgereinigt. Jede Fraktion wurde ¹H-NMR-spektroskopisch und dünnschichtchromatographisch untersucht. Es erfolgte eine Auswahl der Fraktionen nach Menge und „Reichhaltigkeit“ der ¹H-NMR-Spektren. Infolgedessen wurde eine Fraktion ausgewählt und HPL-chromatographisch untersucht. Die weitere Auftrennung führte schließlich zur Isolierung der Nucleoside Uridin und Desoxyadenosin.

Ein weiterer Organismus, der in ausreichender Menge vorhanden war, ist die Seenelke *Metridium senile* (Cnidaria). Auch hier wurde die restliche Menge an *n*-Butanolfraktion an Sephadex LH-20 mit Methanol aufgereinigt. Hierbei konnte Linolensäure in größeren Mengen isoliert und identifiziert werden.

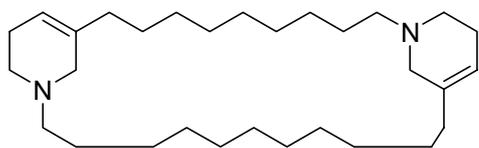
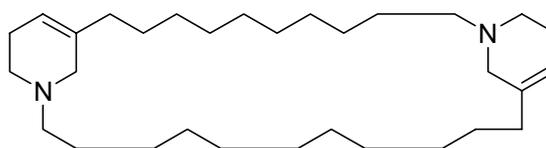
9.8 Ergebnisse

Das Hauptaugenmerk lag zu Beginn auf den Pflanzenschutzscreenings der BASF, da sie den größten Substanzbedarf zeigten. Auch wenn einige Verteilungsfractionen geringe Aktivitäten zeigten, war das Ausmaß der Aktivität nicht signifikant. Auffällig waren die Verteilungsfractionen von einigen Mollusken, z.B. *Artica islandica* (B), *Cardium edule* (T, B) und *Buccinum undatum* (W) durch ihre Aktivität gegen *Plasmopara viticola*, jedoch waren sie inaktiv gegenüber den restlichen Pathogenen. Die *n*-Butanol-Fraktion von *Liocarcinus holsatus* (Crustacea) zeigte Aktivität gegen *Botrytis cinerea*. Von den getesteten Organismen zeigte sich *Hormathia nodosa* (Cnidaria) als fraßhemmend im Amphipodentest. Im Kiementest erwies sich die butanolische Fraktion der Seescheide *Ciona intestinalis* als auffällig. In den antimikrobiellen Tests zeigte sich jedoch keine der untersuchten Organismen als aktiv (Tab.13).¹²²

Tabelle 13: Hitliste der bearbeiteten Organismen und ihre beobachteten Aktivitäten

Organismus	Stamm-Klasse	Herkunft	Fraktion	Aktivität
<i>Ciona intestinalis</i>	Chordatier-Seescheide	Nordsee	B	Elektrophysiologischer Assay
<i>Hormathia nodos</i>	Nesseltier-Blumentier	Spitzbergen	R	Fraßtest
<i>Liocarcinus holatus</i>	Gliederfüßler-Krebse	Nordsee	B	<i>Botrytris cinerea</i>
<i>Cardium edule</i>	Weichtier-Muschel	Spitzbergen	T, B	<i>Plasmopora viticola</i>
<i>Buccinum undatum</i>	Weichtier-Muschel	Spitzbergen	W	<i>Plasmopora viticola</i>
<i>Artica islandica</i>	Weichtier-Muschel	Spitzbergen	B	<i>Plasmopora viticola</i>

Von allen untersuchten Makroorganismen zeigte der Schleimschwamm *Haliclona viscosa* die signifikanteste Aktivität im Fraßschutzassay. Infolgedessen konnten von der Arbeitsgruppe Köck in Bremerhaven zwei makrocyclische Verbindungen X3 (**99**) und X4 (**100**) isoliert werden, die jeweils zwei lange gesättigte und unfunktionalisierte Alkylketten besitzen.¹²³

**99: X3****100: X4**

Während sich die 3-Alkyltetrahydropyridin-Substruktur eindeutig aus dem NMR-Spektrum ableiten läßt, erfolgte die Bestimmung der Kettenlänge über MS/MS. **99** und **100** sind verwandt mit den von Fusetani et al. isolierten Haliclaminen.¹²⁴

9.9 Schlußfolgerung

Ein Grund für die schwache biologisch aktive Ausbeute der Organismen aus gemäßigten und polaren Gewässern könnte durch die Breitengradhypothese erklärt werden.^{125,126} Sie beschreibt eine inverse Beziehung zwischen chemischer Verteidigung und dem Breitengrad. In höheren Breiten kommt es zu einer geringeren Häufigkeit an chemischen Schutzmechanismen. Umgekehrt ist das Vorkommen an Sekundärmetaboliten zur chemischen Abwehr in tropischen Gewässern größer. Eventuell wirkt sich die Populationsdichte und der Druck durch Fraßangreifer nicht so sehr auf den Selektionsdruck der benthischen Lebewesen aus, und sie sind deshalb in geringerem Maße als die tropischen Organismen zur Entwicklung chemischer Verteidigung verpflichtet.

Die Nutzbarkeit mariner Naturstoffe aus bisher kaum untersuchten seßhaften oder sich nur langsam fortbewegenden Makroorganismen der Nordsee, Spitzbergens und des europäischen Nordmeeres als Quelle neuer Wirkstoffe erwies sich als sehr eingeschränkt im Hinblick auf die durchgeführten Screeningprogramme. Allerdings müssen die benthischen Lebewesen in den wenig erforschten gemäßigten und polaren Gewässern Möglichkeiten gefunden haben, miteinander zu kommunizieren und sich zu verteidigen. Um festzustellen, ob es sich hierbei auch um interessante Wirkstoffe handelt, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

V Experimenteller Teil

10 Geräte, Materialien und allgemeine Arbeitsmethoden

10.1 Analytik

Chromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf DC-Fertigplatten (Kieselgel 60 F₂₅₄ oder RP-18) der Firma Merck durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte bei Tageslicht und UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm sowie durch Anfärben der Banden in einer Tauchlösung mit verdünnter Schwefelsäure (33%) oder einer Anisaldehyd-Lösung (0,5 ml Anisaldehyd in 9 ml MeOH mit 0,5 ml conc. H₂SO₄ und 0,1 ml Eisessig) und anschließendem Erhitzen. Die Säulenchromatographie wurde in zylindrischen Glassäulen an Kieselgel (SiO₂) bzw. RP-18 (LiChroprep®), Korngröße 40-63 µm, der Firma Merck unter Druck (Flash-Chromatographie) durchgeführt. Für die Gelchromatographie wurde Sephadex LH-20 der Firma Pharmacia verwendet.

Optische Drehwerte

Perkin-Elmer 241 Polarimeter. Als Lichtquelle wurde eine Natriumdampfampe verwendet. Die Messung wurde in einer 5 cm Küvette durchgeführt. Es werden die Temperatur, das Lösungsmittel sowie die Konzentration c in g/cm⁻³ angegeben.

UV/Vis-Spektren

Perkin-Elmer UV/Vis-Spektrometer Lambda 16 oder Photodiodenarray-Spektrometer Hewlett-Packard HP 8452 A. Angegeben werden die Absorptionsmaxima in nm und die molaren Extinktionskoeffizienten ϵ . Die Spektren wurden bei Raumtemperatur in 1 cm Standard-Quarzküvetten aufgenommen.

CD-Spektren

S. A. Jobin Yvon CD-6-Dichrograph. Angegeben werden die Wellenlängen λ der Maxima, Minima und Nulldurchgänge der CD-Kurven in nm sowie deren differentielle Absorbens $\Delta\epsilon$ und das verwendete Lösungsmittel.

IR-Spektren

Perkin-Elmer Spektrometer 1000 (FT-IR). Die Wellenzahlen $\tilde{\nu}$ sind in cm^{-1} angegeben und die Bandenintensitäten werden als stark (s), mittel (m), schwach (w) und breit (br) beschrieben. Die Substanzen wurden als KBr-Preßling oder als Film auf KBr gemessen.

$^1\text{H-NMR-Spektren}$

Bruker AMX 600 (600.19 MHz). Das angegebene Lösungsmittel wurde als interner Standard verwendet. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm, die der Kopplungskonstanten J in Hz. Die Signalmultiplizität wird wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multipllett und verbreiterte Signale sind mit br gekennzeichnet.

$^{13}\text{C-NMR-Spektren}$

Bruker AMX 600 (150.92 MHz). Das angegebene Lösungsmittel wurde als interner Standard verwendet. Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm.

Massenspektren

Massenspektren wurden mit den Spektrometern Finnigan MAT 95 Q (Elektronenstoßionisation, EI), und SM 1 B Varian MAT (Fast Atom Bombardment, FAB) erhalten. Angegeben werden die Ionisierungsmethode, die Massenzahl m/z und die relativen Intensitäten in %, bei Hochauflösungsmessungen (HR-MS) zudem die berechnete Masse des Molekülions. EI Proben wurden auf den Platinfaden einer DCI-Schubstange aufgetragen (Direkteinlaß), die Elektronenenergie betrug 70 eV. FAB-Proben wurden auf einem Kupfer-Target in einer *m*-Nitrobenzylalkohol- oder einer Glycerin-Matrix gelöst und mit einem 4kV Xe-Atomstrahl ionisiert.

HPLC

Die Trennung und Reinigung der Substanzen wurden mit einem HPLC-Gerätesystem der Fa. Varian (Varian Prep Star 218, Varian Pro Star 320 UV/Vis Detektor, ERC Sedex 75 Lichtstredetektor und dem Computerprogramm Varian Chromatography Workstation 5) durchgeführt.

Es wurden präparative Säulen (LiChrorep RP-18, 25-40 μm , LiChrorep RP-8, 25-40 μm , LiChrorep RP-2, 25-40 μm , LiChrorep Si-60, 25-40 μm) sowie semipräparative Säulen (250x10 mm, Phenomenex Luna RP-18, 5 μm) und analytische Säulen (LiChrospher Si 60, 5 μm , Microsorb-MV RP-18, 5 μm) verwendet. Es wurden HPLC-grade-Lösungsmittel (Fa. Acros Organics, Geel/Belgien bzw. Fa. Merck, Darmstadt) verwendet. Reinstwasser wurde mit einer Anlage der Firma Millipore erhalten.

10.2 Antimikrobieller Assay

Die Assays wurden jeweils in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (8 x 12) durchgeführt. Die Fraktionen wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml DMSO getestet.

10.2.1 *Staphylokokkus aureus*

Material

Kulturmedium: GYT (1.0 g Glucose, 2.5 g Hefeextrakt, 5.0 g Trypton, 1 L deionisiertes Wasser)

Erregerstamm: *Staphylokokkus aureus*

Standard: Vancomycin (1 mg/ml DMSO)

Testdurchführung

1. 10 ml des sterilen Kulturmediums mit 1 ml einer definierten Bakterienkultur impfen.
2. Zellsuspension über Nacht schütteln und bei 37°C inkubieren.
3. Zellsuspension 1:100 verdünnen und die Bakterienkonzentration durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm, mit Hilfe eines Densitometers, bestimmen (Absorption zwischen 0.04-0.06).
4. Ermittlung der benötigten Menge an Zellsuspension (11 ml/ Platte).
5. Suspension noch einmal 1:10 verdünnen.
6. 100 µl des sterilen Mediums werden zur Kontrolle in die Bohrungen G11 und H11 gegeben.
7. 195 µl der Zellsuspension in 1-12 der Reihe A.
8. 100 µl Zellsuspension in die restlichen Kavitäten.
9. 5 µl der zu testenden Fraktionen in die Vertiefungen A1-A10, 5 µl reines DMSO in A11 (Negativkontrolle) und 5 µl Standardlösung in A12 (Positivkontrolle).
10. Gut durchmischen und jeweils 100 µl der ersten Reihe in die nächste transferieren und durchmischen. Diesen Vorgang bis Reihe H fortsetzen. Die letzten 100 µl der Reihe H verwerfen.
11. Platten über Nacht bei 37°C inkubieren.

Auswertung der Meßergebnisse

Die Aktivität wird mit Hilfe eines Elisa Platereader, durch Messung der optischen Dichte, bestimmt. Ist eine Testfraktion aktiv, das heißt der Wachstum für *S. aureus* ist

gehemmt, so erscheint die Flüssigkeit in der Vertiefung der Titerplatte farblos. Bei Inaktivität der Testfraktion bzw. zu großer Verdünnung trübt sich die Zelllösung, da sich die Bakterien vermehrt haben. Dies ist auch schon mit bloßem Auge erkennbar. Die Minimale Hemmkonzentration (MIC) entspricht der Konzentration, bei der gerade noch kein Bakterienwachstum erkennbar ist.

10.2.2 *Candida albicans*

Material

Kulturmedium: RPMI 1640 Medium (CC pro GmbH, Neustadt/W., Deutschland)

Erregerstamm: *Candida albicans*

Indikator: alamarBlue® (AccuMed International, Westlake, OH, USA)

Standard: Amphotericin B (0.5 mg/ml DMSO)

Testdurchführung

1. 5 ml des sterilen Kulturmediums mit der Bakterienkultur impfen.
2. Zellsuspension über Nacht schütteln und bei 37°C inkubieren.
3. Zellsuspension 1:100 verdünnen und unter dem Mikroskop die Anzahl an Zellen eines bestimmten Volumens auszählen. Konzentration bestimmen.
4. Zellsuspension von *C. albicans* in RPMI 1640 Medium mit einer Konzentration von 10^4 Zellen/ml herstellen.
5. Zugabe des alamarBlue® Indikators (10 µl je ml Zellsuspension).
6. 195 µl der Zellsuspension in 1-12 der Reihe A, 100 µl in die restlichen Kavitäten.
7. 10 µl der zu testenden Fraktionen in die Vertiefungen A1-A10, 5 µl reines DMSO in A11 (Negativkontrolle) und 5 µl Standardlösung in A12 (Positivkontrolle).
6. Gut durchmischen und jeweils 100 µl der ersten Reihe in die nächste transferieren und durchmischen. Diesen Vorgang bis Reihe H fortsetzen. Die letzten 100 µl der Reihe H verwerfen.
7. Platten über Nacht bei 37°C inkubieren.

Auswertung der Meßergebnisse

Die Detektion erfolgt durch einen zu beobachtenden Farbwechsel von der am Anfang im oxidierten Zustand vorliegenden blauen Farbe zu einer roten Farbe in der reduzierten Form. Der Farbumschlag wird durch die Stoffwechselaktivität des

Mikroorganismus hervorgerufen. Kann sich also der Pilz ungehindert vermehren, so wird der Farbstoff reduziert

Verdünnungsreihe

Assay	<i>Staphylokokkus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
	Testfraktion (10 mg/ml)	Standard (1 mg/ml)	Testfraktion (10 mg/ml)	Standard (5 mg/ml)
A	250 µg/ml	25 µg/ml	500 µg/ml	250 µg/ml
B	125 µg/ml	12.5 µg/ml	250 µg/ml	125 µg/ml
C	62.5 µg/ml	6.25 µg/ml	125 µg/ml	62.5 µg/ml
D	31.25 µg/ml	3.125 µg/ml	62.5 µg/ml	31.25 µg/ml
E	15.625 µg/ml	1.5625 µg/ml	31.25 µg/ml	15.625 µg/ml
F	7.8 µg/ml	0.78 µg/ml	15.625 µg/ml	7.8 µg/ml
G	3.9 µg/ml	0.39 µg/ml	7.8 µg/ml	3.9 µg/ml
H	1.95 µg/ml	0.195 µg/ml	3.9 µg/ml	1.95 µg/ml

10.3 Das marine Sedimentbakterium CNH 741

Eine Probe des marinen Sedimentbakteriums CNH 741 wurde von der Arbeitsgruppe Fenical 1999 bei der Insel Little San Salvador in einer Tiefe von 10 Meter gesammelt. Das Bakterium wurde in einem auf Meerwasser basierendem Medium kultiviert (1.6 % Agar, 1 % Stärke, 0.4 % Hefeextrakt, 0.2 % Tryptone und 100 % Meerwasser). Die Fermentation erfolgte in Fernbach-Behältern unter Schütteln für 8-10 Tage bei einer Temperatur von 23°C. Der Ansatz im 1-L-Maßstab wurde mit Ethylacetat extrahiert, die Fermentationslösung bei einem Ansatz von 20 mal einem Liter wurde an XAD-16 absorbiert und mit Aceton extrahiert. Der 20-L-Ansatz 3.7 g Rohextrakt.

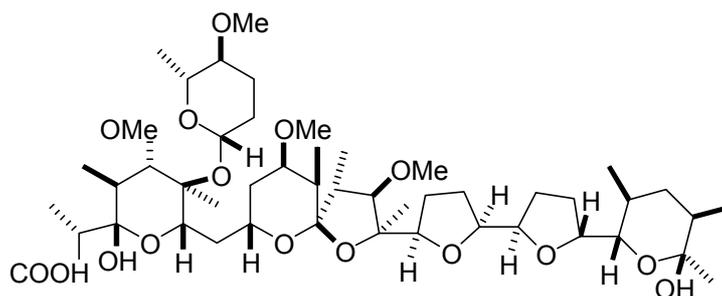
10.3.1 Isolierung

Der eingeeengte Rohextrakt wurde durch Umkehrphasenchromatographie an RP-18 unter Druck in sieben Fraktionen aufgereinigt. Die Menge an stationärer Phase betrug das 32fache an Rohextrakt. Begonnen wurde mit Wasser/Methanol 90:10, gefolgt von 80:20, 60:40, 40:60, 20:80 und 100 % Methanol. Abschließend wurde mit MeOH/DCM 1:1 gespült um unpolare Substanzen zu eluieren. Das Volumen jeden Schrittes betrug das 2½ fache des Säulenvolumens.

11 Biologisch aktive Sekundärmetaboliten

Fraktion sieben (MeOH/DCM 1:1) nach der Umkehrphasenchromatographie wurde mittels RP-18 HPLC (100% MeOH, isokratisch) aufgereinigt und Septamycin (**42**) sowie 3-O-Methylseptamycin (**43**) isoliert.

11.1 Septamycin (**42**)



42

Ausbeute	0.2 mg (ca. 0.005% des Rohextrakts), farbloses Pulver.
Aktivität	7.8 µg/ml (<i>Staphylokokkus aureus</i>)
DC	R _f = 0.38 (RP-18, MeOH).
Drehwert	[α] _D ²⁰ = + 0.1 (c = 0.0001; Methanol).
¹ H-NMR	([D ₁]Chloroform, 600 MHz): δ = 0.82 (d, J = 5.7 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 7.2, 3H), 0.98 (d, J = 8.6, 3H), 1.00 (d, J = 7.2, 3H), 1.01 (d, J = 6.1, 3H), 1.06 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.16 (m, 1H), 1.22 (s, 3H), 1.26 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 1.28 (s, 3H), 1.32 (m, 1H), 1.33 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.48 (m, 2H), 1.49 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.72 (m, 2H), 1.76-1.80 (m, 5H), 1.84 (br, 1H), 1.93 (br, 2H), 2.10 (dt, J = 9.5, 6.7 Hz, 1H), 2.15 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.47 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 2.81 (m, J = 9.0, 4.3 Hz, 1H), 3.33-3.35 (m, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.47 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.54 (br, 1H), 3.70 (dd, J = 7.6, 7.1, 1H), 3.79-3.82 (m, 2H), 3.92 (dd, J = 6.1, 1.4 Hz, 1H), 3.99 (m, J = 11.9, 1.9 Hz, 1H), 4.30 (dt, J = 7.6, 2.4 Hz, 1H), 4.56 (m, J = 5.7, 1.4 Hz, 1H), 4.86 ppm (dd, J = 9.0, 1.9 Hz, 1H).
¹³ C-NMR	([D ₁]Choroform, 150.9 MHz): δ = 9.9 (CH ₃), 11.5 (2 x CH ₃), 12.0 (CH ₃), 12.6 (CH ₃), 16.9 (CH ₃), 17.3 (CH ₃), 18.5 (CH ₃), 23.0 (CH ₂),

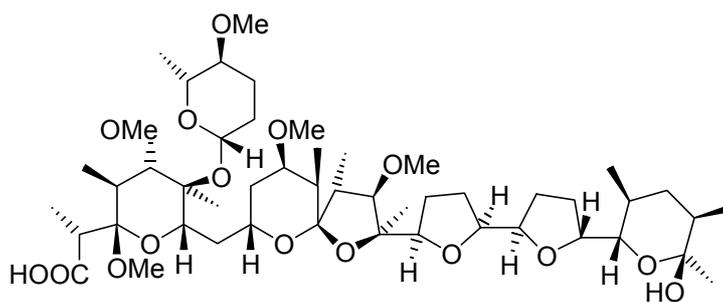
24.2 (CH₂), 25.6 (CH₂), 27.7 (CH₂), 28.4 (CH₃), 29.2 (CH₂), 29.4 (CH₃), 31.3 (CH₂), 31.8 (CH₂), 32.5 (CH₂), 32.7 (CH), 36.8 (CH₂), 36.9 (CH), 39.6 (CH), 40.7 (CH), 45.2 (CH), 46.1 (CH), 56.8 (OCH₃), 58.9 (OCH₃), 60.2 (OCH₃), 61.2 (OCH₃), 61.6 (OCH₃), 67.5 (CH₂), 74.0 (CH), 74.3 (CH), 79.2 (CH), 79.3 (CH), 79.8 (CH), 80.2 (CH), 80.3 (C_q), 80.4 (CH), 83.3 (C_q), 83.5 (CH), 88.8 (CH), 94.7 (CH), 96.5 (CH), 96.9 (C_q), 99.6 (C_q), 106.7 (C_q), 180.7 ppm (C_q).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3306 (br), 2926(s), 2852 (m), 1610 (w), 1460 (m), 1374 (m), 1164 (m), 1100 (m), 1060 (m), 949 (w), 755 cm⁻¹ (m).

HR-ESI-MS ber.: 932.5947 [M + NH₄]⁺ gef.: 932.5992 [M + NH₄]⁺

Summenformel C₄₈H₈₂O₁₆

11.2 3-O-Methylseptamycin (43)



43

Ausbeute 0.1 mg, farbloses Pulver.

DC R_f = 0.62 (RP-18, MeOH).

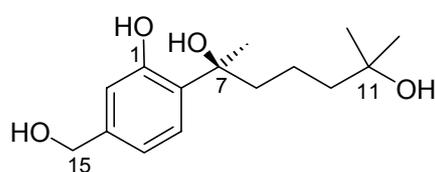
¹H-NMR ([D₁]Chloroform, 600 MHz): δ = 0.87 (3H), 0.92 (3H), 0.97 (3H), 0.98 (3H), 1.00 (3H), 1.10 (3H), 1.11 (1H), 1.22 (s, 3H), 1.26 (CH₃), 1.31 (3H), 1.37 (1H), 1.46 (3H), 1.54 (m, 1H), 1.58 (m, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.75 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.81 (m, 2H), 2.00 (br, 1H), 2.02 (br, 2H), 2.05 (br, 1H), 2.20 (br, 1H), 2.22 (m, 1H), 2.61 (q, *J* = 7.3, 1H), 2.81 (m, *J* = 5.1, 4.7, 2.0, 1H), 3.20 (s, 3H), 3.30 (br, 1H), 3.31 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.33 (br, 1H), 3.34 (br, 1H), 3.35 (s, 3H), 3.41 (s, 3H), 3.54 (s, 3H), 3.54 (br, 1H), 3.51 (m, 1H), 3.61 (br, 1H), 3.77 (dd, *J* = 12.0, 1.7, 1H),

	3.96 (m, $J = 11.2, 1.8, 1\text{H}$), 4.05 (br, 1H), 4.13 (m, 1H), 4.82 ppm (br, 1H), sechs Protonen nicht identifizierbar.
^{13}C -NMR	($[\text{D}_1]$ Chloroform, 150.9 MHz): $\delta = 10.3$ (CH ₃), 10.9 (CH ₃), 11.8 (CH ₃), 12.1 (CH ₃), 13.0 (CH ₃), 18.6 (CH ₃), 27.7 (CH ₂), 28.2 (CH ₃), 31.6 (CH ₂), 32.0 (2 x CH ₂), 34.5 (CH), 37.5 (CH), 37.5 (CH ₂), 40.5 (CH), 40.6 (CH), 45.0 (CH), 46.1 (CH), 48.0 (OCH ₃), 57.2 (OCH ₃), 57.9 (OCH ₃), 60.7 (OCH ₃), 61.6 (CH ₃), 62.0 (OCH ₃), 69.3 (CH), 74.6 (CH), 77.6 (CH), 79.6 (CH), 80.4 (CH), 80.5 (C _q), 81.2 (CH), 81.8 (C _q), 81.9 (CH), 84.7 (CH), 88.2 (CH), 95.2 (CH), 96.8 (CH), 97.2 (C _q), 99.6 (C _q), 106.7 3(C _q), 177.6 ppm (C _q), 8 Kohlenstoffsignale nicht identifizierbar.
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3401$ (br), 2925 (s), 2853 (m), 1736 (m), 1657 (w), 1460 (m), 1100 cm^{-1} (m).
HR-ESI-MS	ber.: 951.5657 [M + Na] ⁺ gef.: 951.5459 [M + Na] ⁺
Summenformel	$\text{C}_{49}\text{H}_{84}\text{NaO}_{16}$

12 Isoprenoide Sekundärmetaboliten

Fraktion vier (Wasser/MeOH 40:60) nach der Umkehrphasenchromatographie wurde mittels HPLC (RP-18, Wasser/Acetonitril 70:10 bis 50:50 über 20 Minuten) in weitere 16 Fraktionen aufgereinigt. Aus Fraktion 12 konnte mittels RP-2 HPLC (Wasser/Acetonitril 60:40) die neuen Verbindungen Curcutetraol (**40**) und Curcutriolamid (**41**) isoliert werden.

12.1 Curcutetraol (**40**)

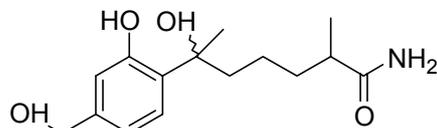


40

Ausbeute	14.8 mg (ca. 0.39% des Rohextrakts), hellbraunes Öl.
DC	$R_f = 0.72$ (Kieselgel, 9:1 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, Detektion mit Anisaldehyd).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = + 5.24$ ($c = 0.0074$; Methanol).
$^1\text{H-NMR}$	($[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz): $\delta = 1.09$ (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.30-1.40 (br, 4H), 1.58 (s, 3H), 1.79 (m, $J = 11.3, 4.5, 1.2$ Hz, 1H), 1.91 (m, $J = 11.3, 4.5, 1.2$ Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 6.74 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.77 (dd, $J = 7.7, 1.6$ Hz, 1H), 7.10 ppm (d, $J = 7.7$ Hz, 1H).
$^{13}\text{C-NMR}$	($[\text{D}_4]$ Methanol, 150.9 MHz): $\delta = 20.1$ (CH_2), 29.1 (3 x CH_3), 44.6 (CH_2), 45.1 (CH_2), 64.8 (CH_2), 71.4 (C_q), 78.0 (C_q), 116.1 (CH), 118.8 (CH), 127.6 (CH), 131.3 (C_q), 142.8 (C_q), 157.0 ppm (C_q).
CD	(CH_3CN): λ ($\Delta\epsilon$) = 211 (-1.47), 216 (0.00), 229 (2.83), 249 (0.00), 281 (3.56), 323 nm (0.00).
UV/Vis	(MeOH): λ_{max} (ϵ) = 219 (13534), 278 nm (7490).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3306$ (br), 2921 (s), 2851 (s), 1630 (w), 1578 (w), 1429 (s), 1296 (w), 1156 (w), 1032 (m), 942 (w), 877 (w), 816 (w), 754 cm^{-1} (m).
MS (EI, 70eV)	m/z (%) = 268 (3) $[\text{M}]^+$, 250 (8) $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$, 232 (51) $[\text{M} - 2 \text{H}_2\text{O}]^+$, 217 (36) $[\text{M} - 2 \text{H}_2\text{O} - \text{CH}_3]^+$, 189 (100), 167 (67) $[\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_3]^+$.
HR-EI-MS	ber.: 268.1675 $[\text{M}]^+$ gef.: 268.1661 $[\text{M}]^+$

Summenformel $C_{15}H_{24}O_4$

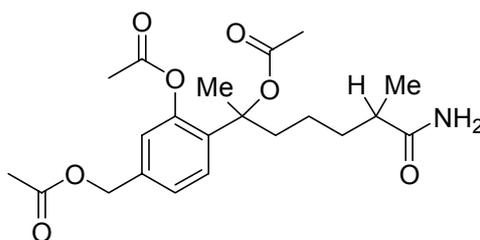
12.2 Curcutriolamid (41)



41

Ausbeute	2.42 mg (ca. 0.06 % des Rohextrakts), hellbraunes Öl.
DC	$R_f = 0.52$ (Kieselgel, 9:1 $CHCl_3/MeOH$, Detektion mit Anisaldehyd).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = -3.75$ ($c = 0.0003$; Methanol).
1H -NMR	($[D_4]$ Methanol, 600 MHz): $\delta = 1.05$ (d, $J = 6.7$, 3H), 1.30 (m, 4H), 1.56 (s, 3H), 1.79 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 2.27 (m, 1H), 4.50 (s, 2H), 6.73 (s, 1H), 6.76 (d, $J = 7.7$, 1H), 7.08 ppm (d, $J = 7.7$ Hz, 1H).
^{13}C -NMR	($[D_4]$ Methanol, 150.9 MHz): $\delta = 18.1$ (CH_3), 22.9 (CH_2), 29.1 (CH_3), 35.5 (CH_2), 41.3 (CH), 44.6 (CH_2), 64.7 (CH_2), 77.8 (C_q), 116.0 (CH), 118.6 (CH), 127.4 (CH), 131.0 (C_q), 142.6 (C_q), 156.9 (C_q), 182.5 ppm (C_q).
UV/Vis	(MeOH): $\lambda_{max} (\epsilon) = 203$ (138523), 282 nm (18014).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3369$ (br), 2924 (s), 2853 (m), 1648 (s), 1427 (s), 1032 (m), 876 (w), 712 cm^{-1} (w).
HR-FAB-MS	ber.: 280.1549 $[M - H]^-$ gef.: 280.1558 $[M - H]^-$
Summenformel	$C_{15}H_{23}NO_4$

12.2.1 Acetylierung von 41



56

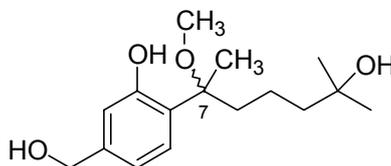
Curcutriolamid (**41**, 1.5 mg, 5.4 μmol) wurde mit einem Überschuß an Essigsäureanhydrid (1 ml, 10.6 mmol) und 0.5 ml Pyridin vier Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Evaporation konnte die Probe massenspektrometrisch vermessen werden.

DC $R_f = 0.7$ (RP-18, 1:1 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, Detektion mit Anisaldehyd).

HR-FAB-MS ber.: 408.2022 $[\text{M} + \text{H}]^+$ gef.: 408.2079 $[\text{M} + \text{H}]^+$

Summenformel $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{NO}_7$

12.3 7-O-Methylcurcutetraol (**55**)



55

Aufreinigung von Curcutetraol (**40**) an der Normalphase (Kieselgel) mit Chloroform/Methanol 90:10 führte zur Methylierung der Hydroxygruppe an C-7.

DC $R_f = 0.2$ (RP-18, 50:50 Acetonitril/Wasser, Detektion mit Anisaldehyd).

$^1\text{H-NMR}$ ($[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz): $\delta = 1.09$ (s, 3H), 1.10 (s, 3H), 1.28 (br, 2H), 1.38 (br, 2H), 1.58 (s, 3H), 1.85 (m, 2H), 3.21 (s, 3H), 4.50 (s, 2H), 6.78 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H), 7.10 ppm (d, $J = 8.2$ Hz, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_4]$ Methanol, 150.9 MHz): $\delta = 19.9$ (CH_2), 22.8 (CH_3), 29.1 (2 x CH_3), 41.4 (CH_2), 45.0 (CH_2), 50.5 (CH_3), 64.7 (CH_2), 71.3 (C_q), 83.5 (C_q), 116.0 (CH), 119.0 (CH), 128.3 (CH), 128.8 (C_q), 143.7 (C_q), 156.9 ppm (C_q).

UV/Vis (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 225 (2445), 275 nm (122).

IR (KBr): $\tilde{\nu} = 3400$ (br), 2919 (s), 1659 (m), 1433 (s), 876 cm^{-1} (w).

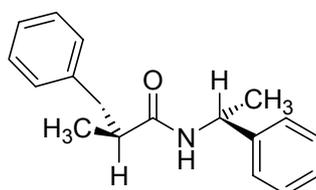
HR-FAB-MS ber.: 282.1831 $[\text{M}]^+$ gef.: 282.1812 $[\text{M}]^+$

Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{O}_4$

12.4 Modellreaktion

69 mg racemische α -Methylhydrozimtsäure (**58**, 0.4 mmol) wurde in 0.5 ml wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Nach Zugabe von Dicyclohexylcarbodiimid (80 mg, 0.4 mmol) und 4-Dimethylaminopyridin (10 mg, 0.08 mmol) ließ man die Reaktionslösung 5 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurden 50 μ l D- α -Methylbenzylamin (**57**, 0.4 mmol) zugegeben. Nach 2 h bei RT können die Diastereomere (**59**, **60**) HPL-chromatographisch an Kieselgel (Isohexan/Ethylacetat 30:10, isokratisch) getrennt werden.

12.4.1 (S/R)-Diastereomer (**59**)



59

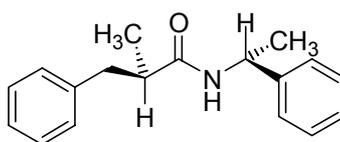
Ausbeute	8.4 mg (12 %), farbloser Feststoff.
DC	$R_f = 0.32$ (Kieselgel, 3:1 Isohexan/Ethylacetat).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = + 221.4$ (c= 0.0003; Methanol).
$^1\text{H-NMR}$	($[\text{D}_1$]Chloroform, 600 MHz): $\delta = 1.11$ (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 1.16 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.33 (m, $J = 8.9, 7.2, 6.1$ Hz, 1H), 2.64 (dd, $J = 13.8, 6.1$ Hz, 1H), 2.86 (dd, $J = 13.8, 8.9$ Hz, 1H), 4.95 (m, $J = 7.2, 6.6$ Hz, 1H), 7.10-7.23 ppm (m, 10H).
$^{13}\text{C-NMR}$	($[\text{D}_1$]Chloroform, 150.9 MHz): $\delta = 18.4$ (CH_3), 22.1 (CH_3), 41.4 (CH_2), 44.7 (CH), 49.0 (CH), 126.8 (2 x CH), 127.0 (CH), 128.0 (CH), 129.1 (2 x CH), 129.3 (2 x CH), 129.7 (2 x CH), 140.6 (C_q), 143.9 (C_q), 175.0 ppm (C_q).
UV/Vis	(MeOH): $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 205$ (16280), 257 nm (187).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3288$ (s), 2970 (w), 2930 (w), 1639 (s), 1547 (s), 1452 (m), 1248 (m), 1081 (w), 746 (w), 699 (s) cm^{-1} .

MS (EI, 70eV) m/z (%) = 268 (7) $[M + H]^+$, 267 (33) $[M]^+$, 252 (10) $[M - CH_3]^+$ 176 (41) $[C_{11}H_{14}NO]^+$, 148 (20) $[C_9H_{10}NO]^+$, 120 (31) $[C_8H_{10}N]^+$, 105 (95) $[C_8H_9]^+$, 91 (100), 77 (24).

HR-EI-MS ber.: 267.1623 $[M]^+$ gef.: 267.1615 $[M]^+$

Summenformel $C_{18}H_{21}NO$

12.4.2 (*R/R*)-Diastereomer (60)



60

Ausbeute 7.6 mg (11 %), farblose, nadelförmige Kristalle.

DC R_f = 0.25 (Kieselgel, 3:1 Isohexan/Ethylacetat).

Drehwert $[\alpha]_D^{20} = + 5.2$ ($c = 0.00039$; Methanol).

1H -NMR ($[D_1]$ Chloroform, 600 MHz): δ = 1.14 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.34 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H), 2.36 (m, $J = 8.8, 6.6, 6.1$ Hz, 1H), 2.59 (dd, $J = 13.8, 6.1$ Hz, 1H), 2.86 (dd, $J = 13.8, 8.8$ Hz, 1H), 4.98 (m, $J = 7.2, 6.6$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 6.65$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 7.10-7.18 ppm (br, 6H).

^{13}C -NMR ($[D_1]$ Chloroform, 150.9 MHz): δ = 18.4 (CH_3), 21.9 (CH_3), 40.8 (CH_2), 44.4 (CH), 48.6 (CH), 126.5 (2 x CH), 126.6 (CH), 127.4 (CH), 128.8 (2 x CH), 128.9 (2 x CH), 129.4 (2 x CH), 140.2 (C_q), 143.3 (C_q), 174.9 ppm (C_q).

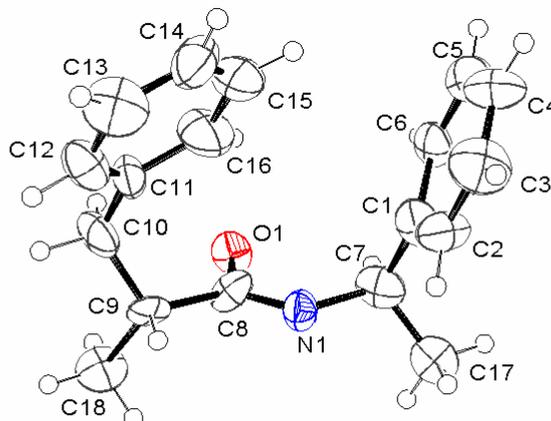
UV/Vis (MeOH): λ_{max} (ϵ) = 201 (18070), 258 nm (273).

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ = 3308 (s), 2975 (m) 2931 (w), 1640 (s), 1538 (s), 1494 (m), 1449 (m), 1245 (m), 743 (m), 698 (s) cm^{-1} .

MS (EI, 70eV) m/z (%) = 267 (36) $[M]^+$, 268 (8) $[M + H]^+$, 252 (11) $[M - CH_3]^+$ 176 (46) $[C_{11}H_{14}NO]^+$, 148 (20) $[C_9H_{10}NO]^+$, 120 (30) $[C_8H_{10}N]^+$, 105 (84) $[C_8H_9]^+$, 91 (100), 77 (26).

HR-EI-MS ber.: 267.1623 $[M]^+$ gef.: 267.1615 $[M]^+$

Summenformel $C_{18}H_{21}NO$

12.4.3 Einkristallstruktur-Analyse von **60**

Kristallstrukturdaten von **60**: Kenn-Nummer hn028; Meßtemperatur 200 K; Strahlung Mo-K α , $\lambda = 0.71073$; monoklin; Raumgruppe P21, $a = 10.1101 (3) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$; $b = 12.3959 (4) \text{ \AA}$, $\beta = 101.7075 (14)^\circ$, $c = 25.0414 (9) \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$; Volumen 3072.99 (17) \AA^3 ; $Z = 8$; $\delta_{\text{ber.}} = 1.156 \text{ [g/cm}^3\text{]}$; Absorptionskoeffizient $\mu = 0.071 \text{ [mm}^{-1}\text{]}$; F(000) 1152; Kristallabmessungen 0.08x0.13x0.85 mm; 21609 gesammelte Reflexe, 8212 unabhängige Reflexe [$R(\text{int}) = 0.110$]; Strukturlösung SIR97, Strukturverfeinerung SHELXL-97; Goodness-of-fit on F^2 0.999; Endverfeinerte Parameter [$|I > 2\sigma(I)|$] $R1 = 0.0612$, $wR2 = 0.0895$, alle Daten $R1 = 0.1364$, $wR2 = 0.1061$; Restelektronendichte 0.21 und -0.20 e\AA^{-3} .

Tabelle 14: Atomkoordinaten und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter (\AA^2) von **60**. $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalen U_{ij} -Tensors.

Atom	x	y	z	$U(\text{eq})$
O1	1.0426(5)	0.5557(5)	0.4465(2)	0.044(2)
N1	0.8122(7)	0.5810(6)	0.4247(3)	0.041(3)
C1	0.7628(9)	0.6155(9)	0.3288(5)	0.053(4)
C2	0.6281(8)	0.5821(8)	0.3111(3)	0.059(4)
C3	0.5801(10)	0.5388(9)	0.2610(4)	0.080(4)
C4	0.6588(11)	0.5296(10)	0.2236(4)	0.076(5)
C5	0.7954(10)	0.5617(7)	0.2374(4)	0.063(4)
C6	0.8416(8)	0.6034(7)	0.2887(3)	0.048(3)
C7	0.8142(10)	0.6608(8)	0.3825(4)	0.055(4)
C8	0.9212(10)	0.5321(8)	0.4530(4)	0.044(4)
C9	0.9066(7)	0.4421(7)	0.4918(3)	0.040(3)
C10	0.9590(10)	0.3356(8)	0.4748(4)	0.060(4)
C11	0.8806(10)	0.2870(9)	0.4231(4)	0.046(4)
C12	0.8056(9)	0.1966(9)	0.4231(4)	0.057(4)
C13	0.7345(11)	0.1521(11)	0.3756(6)	0.087(5)

C14	0.7341(13)	0.2008(10)	0.3264(5)	0.072(5)
C15	0.8012(12)	0.2912(11)	0.3252(4)	0.086(5)
C16	0.8832(12)	0.3376(9)	0.3729(4)	0.089(5)
C17	0.7405(9)	0.7613(8)	0.3936(4)	0.053(3)
C18	0.9762(9)	0.4719(8)	0.5519(3)	0.059(3)

Tabelle 15: Bindungslängen (Å) von **60**.

Atome	Abstand	Atome	Abstand
O1-C8	1.304(12)	C11-C12	1.353(15)
N1-C8	1.329(12)	C14-C15	1.313(18)
N1-C7	1.451(12)	C15-C16	1.429(15)
N1-H71	0.88(5)	C2-H2	0.9497
C3-H3	0.9501	C4-H4	0.9502
C5-H5	0.9493	C6-H6	0.9498
C7-H7	1.0004	C9-H9	0.9991
C10-H10B	0.9895	C10-H10A	0.9899
C12-H12	0.9486	C1-C6	1.411(13)
C13-H13	0.9493	C1-C7	1.453(16)
C14-H14	0.9486	C1-C2	1.406(13)
C15-H15	0.9499	C2-C3	1.360(13)
C16-H16	0.9501	C3-C4	1.351(15)
C17-H17A	0.9797	C4-C5	1.411(15)
C17-H17C	0.9807	C5-C6	1.376(12)
C17-H17B	0.9803	C7-C17	1.506(14)
C18-H18A	0.9802	C8-C9	1.506(13)
C18-H18C	0.9800	C9-C10	1.515(13)
C18-H18B	0.9802	C9-C18	1.571(11)
C10-C11	1.500(14)		

Tabelle 16: Bindungswinkel (°) von **60**.

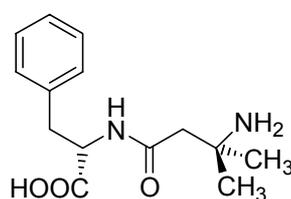
Atome	Winkel	Atome	Winkel
C7-N1-C8	124.5(8)	C8-C9-C10	112.2(7)
C7-N1-H71	119(4)	C9-C10-C11	116.0(8)
C8-N1-H71	110(3)	C12-C11-C16	118.7(9)
C10-C11-C16	119.2(9)	C10-C11-C12	122.0(9)
C11-C12-C13	121.8(10)	C12-C13-C14	120.4(12)
C13-C14-C15	119.3(12)	C14-C15-C16	122.6(11)
C11-C16-C15	117.0(10)	C3-C2-H2	118.35
C1-C2-H2	118.40	C2-C1-C6	113.3(9)
C4-C3-H3	119.22	C2-C1-C7	123.2(9)
C2-C3-H3	119.28	C6-C1-C7	123.5(9)
C3-C4-H4	120.37	C1-C2-C3	123.2(9)
C5-C4-H4	120.21	C2-C3-C4	121.5(10)
C6-C5-H5	121.10	C3-C4-C5	119.4(9)
C4-C5-H5	121.22	C4-C5-C6	117.7(9)
C1-C6-H6	117.58	C1-C6-C5	124.8(9)
C5-C6-H6	117.61	N1-C7-C17	110.4(8)
C17-C7-H7	107.32	C1-C7-C17	113.2(9)
N1-C7-H7	107.40	N1-C7-C1	110.8(8)
C1-C7-H7	107.44	O1-C8-N1	122.1(9)
C18-C9-H9	107.42	N1-C8-C9	120.2(8)
C10-C9-H9	107.36	O1-C8-C9	117.7(8)
C8-C9-H9	107.33	C10-C9-C18	111.1(7)
H10A-C10-H10B	107.37	C8-C9-C18	111.1(7)
C11-C10-H10B	108.29	C11-C10-H10A	108.27

C9-C10-H10A	108.29	C9-C10-H10B	108.29
C11-C12-H12	119.14	C13-C12-H12	119.05
C14-C13-H13	119.84	C12-C13-H13	119.72
C13-C14-H14	120.37	C15-C14-H14	120.37
C16-C15-H15	118.64	C14-C15-H15	118.76
C11-C16-H16	121.48	C15-C16-H16	121.55
C7-C17-H17B	109.40	C7-C17-H17A	109.51
H17A-C17-H17C	109.57	H17B-C17-H17C	109.38
C7-C17-H17C	109.46	H17A-C17-H17B	109.51
H18B-C18-H18C	109.52	H18A-C18-H18C	109.36
C9-C18-H18B	109.52	C9-C18-H18A	109.41
H18A-C18-H18B	109.44	C9-C18-H18C	109.58

13 Sekundärmetaboliten aus dem Aminosäurestoffwechsel

Fraktion zwei (Wasser/MeOH 80:20) nach der Umkehrphasenchromatographie lieferte fast sauberes Phenamid. Abschließende Reinigung erfolgte HPL-chromatographisch an RP-18 (Wasser/Acetonitril 90:10 zu 70:30). Es wurden 193 mg reines Phenamid (**37**) als farbloses Pulver erhalten sowie ein Gemisch aus zwei Diketopiperazinen im Verhältnis 1:1.

13.1 Phenamid (**37**)



37

Ausbeute	193 mg (ca. 5 % des Rohextrakts), farbloses Pulver.
DC	$R_f = 0.72$ (Kieselgel, 90:10 $\text{CHCl}_3/\text{Methanol}$).
Drehwert	$[\alpha]_D^{20} = +25$ ($c = 0.0037$; Methanol).
$^1\text{H-NMR}$	($[\text{D}_4]$ Methanol, 600 MHz): $\delta = 1.15$ (s, 3H), 1.31 (s, 3H), 2.33 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 2.47 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 2.86 (dd, $J = 14.0, 9.8$ Hz, 1H), 3.29 (dd, $J = 14.0, 9.8, 4.1$ Hz, 1H), 4.56 (dd, $J = 9.8, 4.1$ Hz, 1H), 7.15 (tt, $J = 7.2, 1.5$ Hz, 1H), 7.23-7.25 ppm (m, $J = 7.2, 1.5$ Hz, 4H).
$^{13}\text{C-NMR}$	($[\text{D}_4]$ Methanol, 150.9 MHz): $\delta = 25.6$ (CH_3), 26.6 (CH_3), 39.3 (CH_2), 44.4 (CH_2), 54.0 (C_q), 57.5 (CH), 127.3 (CH), 129.2 (2 x CH), 130.4 (2 x CH), 139.9 (C_q), 171.4 (C_q), 178.2 ppm (C_q).
CD	(CH_3OH): λ ($\Delta\epsilon$) = 207 (0.58), 225 nm (0.00).
UV/Vis	(MeOH): λ_{max} (ϵ) = 201 nm (11622).
IR	(KBr): $\tilde{\nu} = 3407$ (br), 2930(s), 1649 (s), 1579(s), 1387 (s), 1321 (w), 698 (w), 540 (w), 487 cm^{-1} (w).
MS (EI, 70eV)	m/z (%) = 264 (3) $[\text{M}]^+$, 249 (22), 148 (94), 120 (33), 91 (100), 74 (24).
HR-Maldi-FTMS ber.:	265.1552 $[\text{M} + \text{H}]^+$
gef.:	265.1544 $[\text{M} + \text{H}]^+$

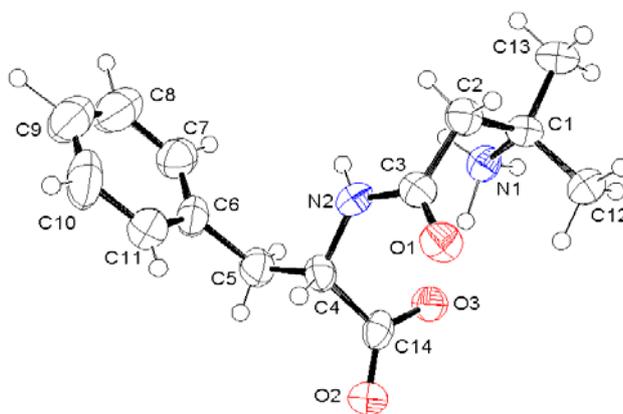
Summenformel $C_{14}H_{20}N_2O_3$

13.1.1 Derivatisierung nach Marfey

1 mg Phenamid (**37**, 3.7 μmol) wurde in 1 ml 6 N Salzsäure gelöst und 11 h bei 108° C im Ölbad erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die überschüssige Salzsäure zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mit 100 μl Marfey Reagenz (1% in Aceton) (**79**, 3.7 μmol) und 20 μl 1M NaHCO_3 Lösung versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 1 h im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach Abkühlen und Zugabe von 20 μl 2N Salzsäure wurde das Lösungsmittel zur Trockene eingedampft. Das Produkt wurde in einer Mischung aus DMSO/Wasser 1:1 (2 ml) aufgenommen. Nach der gleichen Vorschrift wurde parallel mit dem sauer hydrolysierten Phenamid eine Mischung aus D/L Phenylalanin und reines L Phenylalanin mit Marfey-Reagenz umgesetzt. Durch anschließende HPL-chromatographische Trennung (RP-18) und Vergleich des sauer hydrolysierten Phenamids (**37**) mit den Standardsubstanzen ließen sich die Diastereomere (**59**, **60**) identifizieren und L-Phenylalanin als Einheit von Phenamid (**37**) bestimmen.

Gradient. 10%-60% A über 60 min, Laufmittel A: Acetonitril, Laufmittel B: Wasser + TFA (pH = 3), Flußrate: 1 ml/min, Detektion bei 340 nm.

13.1.2 Einkristallstruktur-Analyse von **37**



Kristallstrukturdaten von **37**: Kenn-Nummer hn020; Meßtemperatur 200 K; Strahlung Mo-K α , $\lambda = 0.71073$; monoklin; Raumgruppe P21, $a = 9.8353 (8) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$; $b = 6.1191 (4) \text{ \AA}$, $\beta = 94.636 (4)^\circ$, $c = 12.2685 (12) \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$; Volumen $735.94 (10) \text{ \AA}^3$; $Z = 2$; $\gamma_{\text{ber.}} = 1.193 \text{ [g/cm}^3\text{]}$; Absorptionskoeffizient $\mu = 0.084 \text{ [mm}^{-1}\text{]}$; F(000) 284; Kristallabmessungen $0.03 \times 0.09 \times 0.16 \text{ mm}$; 9159 gesammelte Reflexe, 2476 unabhängige Reflexe [$R(\text{int}) = 0.179$]; Strukturlösung SIR97, Strukturverfeinerung SHELXL-97; Goodness-of-fit on F^2 0.907; Endverfeinerte Parameter [$I > 2\sigma(I)$] $R1 = \sigma 0.0539$, $wR2 = 0.0821$, alle Daten $R1 = 0.1646$, $wR2 = 0.1099$; Restelektronendichte 0.35 und -0.26 e\AA^{-3} .

Tabelle 17: Atomkoordinaten und äquivalente isotrope Auslenkungsparameter (\AA^2) von **37**. $U(\text{eq})$ ist definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalen U_{ij} -Tensors.

Atom	x	y	z	$U(\text{eq})$
O1	0.9094(3)	0.5008(6)	0.6232(3)	0.0473(12)
O2	0.6443(3)	0.1516(6)	0.7195(3)	0.0496(12)
O3	0.5841(3)	0.4530(5)	0.6238(3)	0.0448(11)
N1	0.6190(4)	0.8704(8)	0.5388(4)	0.0411(16)
N2	0.7834(4)	0.6908(7)	0.7367(3)	0.0398(17)
C1	0.7547(4)	0.8961(8)	0.4893(4)	0.0400(17)
C2	0.8686(5)	0.8834(9)	0.5837(4)	0.0419(19)
C3	0.8594(4)	0.6756(9)	0.6504(4)	0.0397(19)
C4	0.7365(5)	0.4935(9)	0.7866(4)	0.0388(17)
C5	0.6481(6)	0.5551(12)	0.8789(5)	0.050(3)
C6	0.7224(5)	0.6846(10)	0.9713(4)	0.0471(19)
C7	0.6809(6)	0.8872(10)	0.9973(5)	0.062(3)
C8	0.7497(8)	1.0077(14)	1.0819(6)	0.085(3)
C9	0.8607(8)	0.9218(14)	1.1400(6)	0.079(3)
C10	0.9039(7)	0.7169(16)	1.1147(5)	0.083(3)
C11	0.8356(7)	0.5985(12)	1.0298(5)	0.062(3)
C12	0.7645(6)	0.7152(9)	0.4060(5)	0.048(2)
C13	0.7544(7)	1.1211(9)	0.4366(5)	0.051(2)
C14	0.6485(4)	0.3535(9)	0.7027(4)	0.0408(19)

Tabelle 18: Bindungslängen (Å) von **37**.

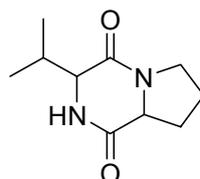
Atome	Abstand	Atome	Abstand
O1-C3	1.234(6)	C8-C9	1.360(11)
O2-C14	1.254(7)	C9-C10	1.368(13)
O3-C14	1.269(6)	C10-C11	1.396(10)
N1-C1	1.519(6)	C2-H2A	0.98(5)
N2-C3	1.348(6)	C2-H2B	0.97(4)
N2-C4	1.446(7)	C4-H4	1.08(4)
N1-H1C	0.92(4)	C5-H5A	0.87(5)
N1-H1B	0.88(4)	C5-H5B	0.99(5)
N1-H1A	1.14(7)	C7-H7	1.00(4)
N2-H2	0.87(4)	C8-H8	1.11(7)
C1-C13	1.521(7)	C9-H9	1.18(7)
C1-C2	1.547(7)	C10-H10	0.90(5)
C1-C12	1.515(8)	C11-H11	0.85(4)
C2-C3	1.519(8)	C12-H12A	1.06(6)
C4-C5	1.530(8)	C12-H12B	0.93(4)
C4-C14	1.549(7)	C12-H12C	1.01(4)
C5-C6	1.521(8)	C13-H13A	1.02(4)
C6-C7	1.351(9)	C13-H13B	0.89(4)
C6-C11	1.380(8)	C13-H13C	1.05(4)
C7-C8	1.402(10)		

Tabelle 19: Bindungswinkel (°) von **37**.

Atome	Winkel	Atome	Winkel
C3-N2-C4	119.4(4)	C8-C-C10	119.1(7)
H1B-N1-H1C	112(4)	C9-C10-C11	120.4(7)
C1-N1-H1B	112(3)	C6-C11-C10	120.6(7)
C1-N1-H1C	107(3)	O2-C14-C4	117.4(4)
C1-N1-H1A	106(2)	O3-C14-C4	117.3(5)
H1A-N1-H1C	108(3)	O2-C14-O3	125.3(4)
H1A-N1-H1B	111(4)	C1-C2-H2A	108(2)
C3-N2-H2	120(3)	C1-C2-H2B	106(2)
C4-N2-H2	119(3)	C3-C2-H2A	107(2)
N1-C1-C13	107.0(4)	C3-C2-H2B	108(3)
N1-C1-C2	107.6(4)	H2A-C2-H2B	115(3)
C2-C1-C12	112.7(4)	N2-C4-H4	110(2)
C2-C1-C13	109.9(4)	C5-C4-H4	111(2)
C12-C1-C13	111.9(4)	C14-C4-H4	108(2)
N1-C1-C12	107.5(4)	C4-C5-H5A	100(3)
C1-C2-C3	112.0(4)	C4-C5-H5B	111(3)
O1-C3-C2	122.5(4)	C6-C5-H5A	108(3)
N2-C3-C2	115.2(4)	C6-C5-H5B	109(3)
O1-C3-N2	122.0(5)	H5A-C5-H5B	115(4)
N2-C4-C5	109.1(5)	C6-C7-H7	122(2)
N2-C4-C14	111.1(4)	C8-C7-H7	116(2)
C5-C4-C14	107.9(4)	C7-C8-H8	123(3)
C4-C5-C6	114.4(5)	C9-C8-H8	117(3)
C5-C6-C7	121.2(5)	C8-C9-H9	126(3)
C5-C6-C11	120.5(6)	C10-C9-H9	115(3)
C7-C6-C11	118.3(5)	C9-C10-H10	117(4)
C6-C7-C8	121.4(6)	C11-C10-H10	122(4)
C7-C8-C9	120.2(7)	C6-C11-H11	118(3)

C10-C11-H11	122(3)	C1-C13-H13A	113(2)
C1-C12-H12A	110(3)	C1-C13-H13B	109(2)
C1-C12-H12B	106(3)	C1-C13-H13C	104(2)
C1-C12-H12C	111(3)	H13A-C13-H13B	106(3)
H12A-C12-H12B	108(4)	H13A-C13-H13C	112(3)
H12A-C12-H12C	113(4)	H13B-C13-H13C	112(4)
H12B-C12-H12C	109(4)		

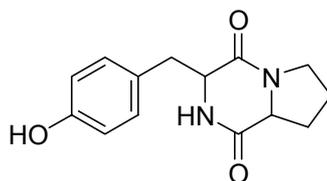
13.2 cyclo-(Pro-Val) (38)



38

Ausbeute	n.b. (liegt im Gemisch vor)	
DC	$R_f = 0.18$ (RP-18, Wasser/MeOH 7.5:2.5).	
$^1\text{H-NMR}$	([D ₄]Methanol, 600 MHz): Pro: $\delta = 1.94$ (m, 2H), 2.01 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 4.20 (dd, $J = 7.2, 7.2, 1\text{H}$); Tyr: $\delta = 3.04$ (dd, $J = 14.4, 4.6, 1\text{H}$), 3.08 (dd, $J = 14.4, 5.6, 1\text{H}$), 4.36 (dd, $J = 5.6, 4.6, 1\text{H}$), 6.70 (d, $J = 8.8, 2\text{H}$), 7.04 ppm (d, $J = 8.8, 2\text{H}$).	
$^{13}\text{C-NMR}$	([D ₄]Methanol, 150.9 MHz): Pro: $\delta = 22.9$ (CH ₂), 29.6 (CH ₂), 46.3 (CH ₂), 61.2 (CH), 172.4 (C _q); Tyr: $\delta = 37.8$ (CH ₂), 58.0 (CH), 116.3 (2 x CH), 127.8 (C _q), 132.2 (2 x CH), 157.8 ppm (C _q).	
HR-FAB-MS	ber.: 197.1290 [M + H] ⁺	gef.: 197.1372 [M + H] ⁺

13.3 cyclo-(Pro-Tyr) (39)



39

Ausbeute	n.b. (liegt im Gemisch vor)	
DC	$R_f = 0.18$ (RP-18, Wasser/MeOH 7.5:2.5).	
$^1\text{H-NMR}$	([D ₄]Methanol, 600 MHz): Pro: $\delta = 1.80$ (m, 2H), 1.24 (m, 1H), 2.09	

	(m, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.55 (m, 1H), 4.06 ppm (dd, $J = 8.7, 6.2, 1H$); Val: $\delta = 0.93$ (d, $J = 6.7, 3H$), 1.09 (d, $J = 7.2, 3H$), 2.48 (m, 3H), 4.03 ppm (d, $J = 2.06, 1H$).
^{13}C -NMR	([D ₄]Methanol, 150.9 MHz): Pro: $\delta = 22.8$ (CH ₂), 29.5 (CH ₂), 46.0 (CH ₂), 61.1 (CH), 170.6 ppm (C _q); Val: $\delta = 16.8$ (CH ₃), 18.9 (CH ₃), 30.0 (CH), 61.6 (CH), 167.4 ppm (C _q).
HR-FAB-MS	ber.: 261.1239 [M + H] ⁺ gef.: 261.1323 [M + H] ⁺

VI Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AWI	Alfred-Wegener-Institut
ber.	berechnet
br	verbreitert
CD	Circulardichroismus
CNH	Culture Number H
COSY	Correlation Spectroscopy
CTP	Cyridintriphosphat
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	<i>N,N</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMAP	4-Dimethylaminopyridin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
ESI	Electrospray-Ionisation
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
FAB	Fast-Atom Bombardment
g	Gramm
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde(n)
HCT	Darmkrebszelllinie
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
HPL(C)	High Performance Liquid (Chromatography)
HR-FAB	High Resolution Fast-Atom Bombardment
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%
IR	Infrarot-Spektroskopie
LD	Letale Dosis
[M] ⁺	Molekülion
μ	mikro
m	mili
M	Molar
<i>m/z</i>	Masse-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
Me	Methyl
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MIC	minimum inhibition concentration
min	Minute(n)
MRSA	Methicillin-Resistenter <i>Staphylokokkus aureus</i>
MS	Massenspektrum

n	nano
n.b.	nicht bestimmt
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
2-NMA	2-Methoxy-2-phenyl-2-(trifluormethyl)essigsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear-Overhauser-Effect Spectroscopy
ppm	parts per million
R _f	Relative Wanderungsgeschwindigkeit, Rückhaltefaktor
RP	Reverse Phase
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TMP	2,2,4-Trimethylpentan
UV	Ultraviolett
Vis	visible

VII Literaturverzeichnis

- 1 A. Bechthold, *Pharmazie in unserer Zeit* **1997**, 1, 12-16.
- 2 D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.
- 3 D. J. Faulkner, *Tetrahedron* **1977**, 33, 1421-1443.
- 4 J. W. Blunt, B. R. Copp, M. H. G. Munro, P. T. Northcote, M. R. Prinsep. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, 20, 1-48.
- 5 G. R. Pettit, J. F. Day, J. L. Hartwell, H. B. Wood, *Nature* **1970**, 227, 962-963.
- 6 G. R. Pettit, C. L. Herald, D. L. Doubek, D. L. Herald, E. Arnold, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 6846-6848.
- 7 K. J. Hale, M. G. Hummersone, S. Manaviazar, M. Frigerio, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 413-453.
- 8 R. G. Kerr, J. Lawry, K. A. Gush, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 8305-8308.
- 9 M. G. Haygood, S. K. Davidson, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 4612-4616.
- 10 G. M. Cragg, D. J. Newman, R. B. Weiss, *Semin. Oncol.* **1997**, 24, 156-163.
- 11 D. Mendola, *Drugs from the Sea*, 1. Aufl. (Hrsg.: N. Fusetani), Karger, Basel, **2000**, 120-133.
- 12 D. A. Evans, P. H. Carter, E. M. Carreira, J. A. Prunet, A. B. Charette, M. Lautens, *Angew. Chemie*, **1998**, 110, 2526-2530, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2354-2359.
- 13 D. A. Evans, P. H. Carter, E. M. Carreira, A. B. Charette, J. A. Prunet, M. Lautens, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7540-7552.
- 14 K. Ohmori, Y. Ogawa, T. Obitsu, Y. Ishikawa, S. Nishiyama, S. Yamamura, *Angew. Chem.* **2000**, 112, 2376-2379, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 37, 229-2294.
- 15 N. Fusetani, *Drugs from the sea*, 1. Aufl. Karger, Basel, **2000**, 1-5.
- 16 C. F. Verschraegen, K. Glover (PharmaMar/NCI/Ortho Biotech), *Curr. Opin. Investig. Drugs* **2001**, 2, 1631-1638.
- 17 M. Minuzzo, S. Marchini, M. Broggin, G. Faircloth, M. D'Incalci, R. Mantovani, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2000**, 97, 6780-6784.
- 18 A. Kanzaki, Y. Takebayashi, X-Q. Ren; H. Miyashita; S. Mori, S-I. Akiyama, Y. Pommier, *Mol. Cancer Ther.* **2002**, 1, 1327-1334.
- 19 E. J. Corey, D. Y. Gin, R. S. Kania *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9202-9203.
- 20 C. Cuevas, M. Pérez, M. J. Martin, J. L. Chicharro, C. Fernández-Rivas, I. Manzanares, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2545-2548.
- 21 K. L. Rinehart, *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 1-27.
- 22 P. G. Canonico, W. L. Pannier, J. W. Huggins, K. L. Rinehart, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1982**, 22, 696-697.
- 23 D. M. Shin, P. Y. Holoye, W. K. Murphy, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1991**, 29, 145-149.
- 24 R. B. Weiss, B. L. Peterson, S. L. Allen, *Invest. New Drugs*, **1994**, 12, 41-43.
- 25 R. Sakai, K. L. Rinehart, V. Kishore, B. Kundu, G. Faircloth, J. B. Gloer, J. R. Carney, M. Namikoshi, F. Sun, R. G. Hughes, D. G. Grávalos, T. G. de Quesada, G. R. Wilson, R. M. Heid, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 2819-2834.
- 26 D. M. Vera, M M. Joullie, *Med. Res. Rev.* **2002**, 22, 102-145.
- 27 N. B. Perry, L. Ettouati, M. Litaudon, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, S. Parkin, H. Hope, *Tetrahedron* **1994**, 50, 3987-3992.
- 28 P. Molina, P. M. Fresneda, S. Delgado, J. A. Bleda, *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1005-1007.

- 29 A. Ahaidar, D. Fernandez, O. Perez, G. Danelon, C. Cuevas, I. Manzanares, F. Albericio, J. A. Joule, M. Alvarez, *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 6191-6194.
- 30 M. Murata, H. Naoki, S. Matsunaga, M. Satake, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7098-7107.
- 31 M. Murata, A.-M. Legrand, Y. Ishibashi, M. Fukui, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4380-4386.
- 32 F. Gusowsky, J. W. Daly, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *39*, 1633-1639.
- 33 M. Murata, H. Naoki, T. Iwashita, S. Matsunaga, M. Saaki, A. Yokoyama, T. Yasumoto, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2060-2062.
- 34 T. J. Mincer, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, W. Fenical, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5005-5011.
- 35 S. Omura, T. Fujimoto, K. Ootoguro, K. Matsuzaki, R. Moriguchi, H. Tanaka, Y. Sasaki, *J. Antibiot.* **1991**, *44*, 113-116.
- 36 R. H. Felting, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 355-357, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 369-371.
- 37 J. N. Collie, *Proc. Chem. Soc.* **1907**, *23*, 230-231.
- 38 A. J. Birch, F. W. Donovan, *Aust. J. Chem.* **1953**, *6*, 360-368.
- 39 N. M. Packter, *Biosynthesis of Acetate-derived Compounds*, Wiley, London, **1973**.
- 40 J. Rohr, *Angew. Chem.* **2000**, *39*, 2847-2849.
- 41 D. A. Hopwood, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2465-2497.
- 42 R. McDaniel, D. A. Hopwood, S. Ebert-Khosla, C. Khosla, *Science* **1993**, *262*, 1546-1550.
- 43 L. Ruzicka, *Experientia* **1953**, *9*, 357-367.
- 44 F. C. Czygan, *Biogene Arzneistoffe*, Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft, Braunschweig, **1984**, S. 12.
- 45 F. Lynen, *Angew. Chem.* **1965**, *77*, 929-944.
- 46 P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181-222.
- 47 M. Rohmer, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565-574.
- 48 S. Hecht, W. Eisenreich, P. Adam, S. Amslinger, K. Kis, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2001**, *98*, 14837-14842.
- 49 F. Rohdich, S. Hecht, K. Gärtner, P. Adam, C. Krieger, S. Amslinger, D. Arivoni, A. Bacher, W. Eisenreich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **2002**, *99*, 1158-1163.
- 50 S. Seemann, B. T. S. Bui, M. Wolff, D. Tritsch, N. Campos, A. Boronat, A. Marquet, M. Rohmer, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 4513-4515, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4337-4339.
- 51 W. Gao, R. Löser, M. Raschke, M. A. Dessoy, M. Fulhorst, H. Alperman, L. A. Wessjohann, M. Zenk, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2716-2719, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2604-2607.
- 52 A. R. Knaggs, *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 525-560.
- 53 A. R. Knaggs, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 269-292.
- 54 Y. Asano, J. J. Lee, T. L. Shieh, F. Spreafico, C. Kowal, H. G. Floss, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 4314-4320.
- 55 C. Peschko, W. Steglich, *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 9477-9481.
- 56 C. E. Salomon, T. Deerinck, M. H. Ellisman, D. J. Faulkner, *Marine Biology* **2001**, *139*, 313-319.
- 57 C. A. Bewley, N. D. Holland, D. J. Faulkner, *Experientia* **1996**, *52*, 716-722.
- 58 U. Gräfe, R. Schlegel, M. Bergholz, *Pharmazie* **1984**, *39*, 661-670.
- 59 C. Keller-Juslén, H.D. King, Z.L. Kis, A. von Wartburg, *J. Antibiot.* **1975**, *28*,

- 854-9.
- 60 M.J.O. Anteunis, N.A. Rodios, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **1978**, *87*, 753-64.
- 61 C. Keller-Juslén, H. D. King, Z. L. Kis, A. von Wartburg, *J. Antibiot.* **1975**, *28*, 854-859.
- 62 M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, **1995**.
- 63 N. O. Rodios, M. J. O. Anteunis, *J. Antibiotics*, **1978**, *4*, 294-301.
- 64 T. J. Petcher, H-P. Weber, *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1974**, 697-698.
- 65 R. L. Harned, P. H. Hidy, *Antimicrob. Agents Chemotherapy* **1951**, *1*, 594-596.
- 66 X. C. Cheng, P. R. Jensen, W. Fenical, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 605-607.
- 67 J. W. Westley, *Advances appl. Micorbiol.* **1977**, *22*, 177-223.
- 68 D. E. Cane, T-C. Liang, H. Hasler, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 7274-7281.
- 69 E. Stahl, A. Glatz, *J. Chromatogr.* **1982**, *240*, 518-521.
- 70 J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 512-519.
- 71 G. R. Sullivan, J. A. Dale, H. S. Mosher, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2143-2147.
- 72 H. Takahashi, N. Kato, M. Iwashima, K. Iguchi, *Chem. Lett.* **1999**, *11*, 1881-1882.
- 73 A. Archelas, R. Furstoss, *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6112-6114.
- 74 G. Casiraghi, F. Bigi, G. Casnati, G. Sartori, P. Soncini, F. G. Gasparri Fava, M. Ferrari Belicchi, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1779-1785.
- ^c Ich danke Herrn Dipl. Chem. Matthias Reichert, Würzburg, für die Durchführung der Berechnung.
- 75 G. Snatzke, *Chem. Unserer Zeit* **1982**, *16*, 160-168.
- 76 K. Mislow, E. Bunnenberg, R. Records, K. Wellmann, C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1342-1349.
- 77 K. Nakanishi, N. Berova, R. W. Woody, *Circular Dichroism: Principles and Applications*, Wiley, New York, **2000**.
- 78 G. Bringmann, S. Busemann, *Natural Product Analysis* (Hrsg.: P. Schreier, M. Herderich, H.-U. Humpf, W. Schwab), Vieweg, Wiesbaden, **1998**, S. 195-212.
- 79 D. Parker, *Chem. Rev.* **1991**, *91*, 1441-1457.
- 80 In Zusammenarbeit mit Aventis Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt.
- 81 H. Henecka: in *Methoden Org. Chemie (Houben-Weyl), Band VIII* (Hrsg.: E. Müller), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1952**, S. 547-549.
- 82 Y. Nagai, T. Kusumi, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1853-1856.
- 83 R. Hoye, D. O. Koltun, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4638-4643.
- 84 R. Barker, *Organic Chemistry of Biological Compounds*, Prentice-Hall: New Jersey, **1971**, 99.
- 85 F. McEnroe, W. Fenical, *Tetrahedron* **1978**, *34*, 1661-1664.
- 86 A. E. Wright, S. A. Pomponi, O. J. McConnell, S. Komoto, P. J. McCarthy, *J. Nat. Prod.* **1987**, *50*, 976-978.
- 87 D. Taşdemir, T. S. Bugni, G. C. Mangalindan, G. P. Concepción, M. K. Harper, C. M. Ireland, *Turk. J. Chem.* **2003**, *27*, 273-279.
- 88 N. Fusetani, M. Sugano, S. Matsunaga, K. Hashimoto, *Experientia* **1987**, *43*, 1234-1235.
- 89 M. S. Butler, R. J. Capon, R. Nadeson. A. A. Beveridge, *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 619-623.
- 90 C-Y. Chen, Y-C. Shen, Y-J. Chen, J-H. Sheu, C-Y. Duh, *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 573-576.
- 91 D. Q. Yu, F. Z. Xie, R. Y. Chen, Y. H. Huang, *Chin. Chem. Lett.* **1996**, *7*, 721-722.

- 92 P. Henne, R. Thiericke, S. Grabley, K. Hütter, J. Wink, E. Jurkiewicz, A. Zeeck, *Liebigs Ann. Chem.* **1993**, *5*, 565-571.
- 93 H. Nakamura, J. Kobayashi, Y. Ohizumi, Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5401-5404.
- 94 N. K. Gulavita, E. D. de Silva, M. R. Hagadone, P. Karuso, P. J. Scheuer, G. D. van Duyne, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5136-5139.
- 95 B. W. Sullivan, D. J. Faulkner, K. T. Okamoto, M. H. M. Chen, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5134-5136.
- 96 N. S. Makkar, T. E. Nickson, M. Tran, N. Biest, M. Miller-Widman, J. Lawson, C. I. McGary, R. Stonard, *J. Antibiotics* **1995**, *48*, 369-374.
- 97 P. Marfey, *Carlsberg Res. Commun.* **1984**, *49*, 591-596.
- 98 F. Sanger, *Biochem. J.* **1945**, *39*, 507-515.
- 99 G. G. Harrigan, W. Y. Yoshida, R. E. Moore, D. G. Nagle, T. H. Corbett, F. A. Valeriote, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 1221-1225.
- 100 H. Brueckner, C. Gah, *J. Chromatogr.* **1991**, *555*, 81-95.
- 101 S. De Rosa, A. De Giulio, G. Tommonaro, S. Popov, A. Kujumgiev, *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1454-1455.
- 102 T. Oku, J. Imanishi, T. Kishida, *Antiviral Res.* **1986**, *6*, 233-239.
- 103 W. H. Gerwick, L. T. Tan, N. Sitachitta in *The Alkaloids. Chemistry and Biology*, Vol. 57 (Hrsg.: G. A. Cordell), Academic Press, San Diego, **2001**, 75-184.
- 104 L. T. Tan, N. Sitachitta, W. H. Gerwick, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 764-771.
- 105 D. Seebach, S. Abele, J. Schreiber, B. Martinoni, A. K. Nussbaum, H. Schild, H. Schulz, H. Hennecke, R. Woessner, F. Bitsch, *Chimia* **1998**, *52*, 734-739.
- 106 P. G. Sammes, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1975**, *32*, 51-118.
- 107 A. C. Stierle, J. H. Cardellina, F. L. Singleton, *Experientia* **1988**, *44*, 1021.
- 108 R. Bell, S. Carmeli, N. Sar, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1587-1590.
- 109 H. Kawagishi, A. Somoto, J. Kuranari, A. Kimura, S. Chiba, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3439-3440.
- 110 J. S. Carlé, C. Christophersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4012-4013.
- 111 L. Peters, G. M. König, H. Terlau, A. D. Wright, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1633-1637.
- 112 P. B. Holst, U. Anthoni, C. Christophersen, P. H. Nielsen, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 997-1000.
- 113 U. Anthoni, P. H. Nielson, M. Pereira, C. Christophersen, *Comp. Biochem. Physiol.* **1990**, *96B*, 431-437.
- 114 N. Lysek, E. Rachor, T. Lindel, *Z. Naturforsch. C: Biosci.* **2002**, *57c*, 1056-1061.
- 115 T. Bergmann, D. Schories, B. Steffan, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2055-2060.
- 116 E. I. Graziani, R. J. Anderson, *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 285-286.
- 117 E. I. Graziani, T. M. Allen, R. J. Anderson, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 1763-1766.
- 118 P. Tardent, *Meeresbiologie*, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1993**, 91-136.
- 119 G. R. Pettit, Y. Kamano, R. Aoyagi, C. L. Herald, D. L. Doubek, J. M. Schmidt, J. J. Rudloe, *Tetrahedron* **1985**, *41*, 985-994.
- 120 T.M. File, Jr. *CHEST* **1999**, *115*, 3s-8s.
- 121 J.N. Eloff, *Planta Medica* **1998**, *64*, 711-713.
- 122 H. Lippert, R. Brinkmeyer, T. Mülhaupt, K. Iken, *Polar Biol.* **2003**, *26*, 591-600.
- 123 C.A. Volk, M. Koeck, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3567-3569.
- 124 N. Fusetani, K. Yasumoto, S. Matsunaga, H. Hirota, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 6891-6894.

-
- 125 G. J. Bakus, G. Green, *Science* **1974**, 185, 951-953.
126 G. Green, *Mar Biol* **1977**, 40, 207-215.

Lebenslauf

Name: Tanja Michaela Mülhaupt
Geburtsdatum: 28. März 1973
Geburtsort: Waldshut

Schulbildung

Sept. 1979 - Juli 1983: Grundschule, Grießen
Sept. 1983 - Juli 1989: Realschule, Tiengen
Sept. 1989 - Juni 1992: Ernährungswissenschaftliches Gymnasium,
Waldshut

Studium

1993 - 1997: Studium der Pharmazie an der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen-Nürnberg
Mai 1997 - Oktober 1997: Praktikum bei Beiersdorf-Lilly (jetzt Lilly Research
Laboratories), Department Präformulierung,
Hamburg
November 1997 – April 1998: Praktikum in der Apotheke am Lerchenfeld,
Hamburg
16.07.1998: Approbation als Apothekerin

Dissertation

Januar 2000 - September 2003: Experimentelle Arbeiten zur Dissertation: Isolierung
und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten
aus marinen Mikroorganismen nach biologischen
und chemischen Gesichtspunkten (Betreuer: Prof.
Dr. Th. Lindel).
Juli 2001 – Mai 2002: Forschungsaufenthalt bei Prof. Dr. W. Fenical an
der Scripps Institution of Oceanography, San
Diego, USA, Kurzzeitstipendium für Doktoranden
des DAAD.

Beschäftigungen

August 1998 - Dezember 1998: Apothekerin in der Manstein Apotheke, Hamburg
Januar 1999 - Dezember 1999: Apothekerin in der Adler Apotheke Asbach,
Westerwald