



# Steinschwämme: Stars unter den Naturstoffproduzenten oder Wirte der Stars?

Carole A. Bewley und D. John Faulkner\*

Die Steinschwämme sind nahezu einzigartig unter den marinen Invertebraten, weil sie Sekundärmetaboliten aus sehr vielen unterschiedlichen Verbindungsklassen enthalten. Nach der Definition des Begriffs „Steinschwamm“ werden wir die Chemie dieser Organismen zusammenfassen und die meisten der bekannten Verbindungen von Bedeutung beschreiben. Anschließend werden wir anhand von Beispielen die Strategien erläutern, die wir zur Strukturaufklärung cyclischer Peptide ange-

wandt haben. Während die meisten Untersuchungen von Naturstoffen mit der Strukturaufklärung abgeschlossen sind, wurden wir davon gefesselt, daß viele Metaboliten von Steinschwämmen den Sekundärmetaboliten von Mikroorganismen ähneln. Wir beschloßen daher, die Herkunft zweier bioaktiver Verbindungen auf zellulärer Ebene zu untersuchen. Aus den Zellen des Schwamms *Theonella swinhoei* konnten wir drei Arten von Mikroorganismen isolieren und die Metabo-

liten aus allen Zelltypen analysieren, sogar nachdem die Zellen fixiert worden waren. Es ist zwar vermutet worden, daß sowohl Swinholid A als auch die bicyclischen Peptide von Cyanobakterien (Blaualgen) produziert werden, doch unsere Ergebnisse belegen eindeutig, daß dies nicht der Fall ist.

**Stichwörter:** Antipilzmittel • Antitumormittel • Makrocyclen • Naturstoffe • Peptide

## 1. Einleitung

Steinschwämme sind unter den Meeresorganismen für ihre Fähigkeit bekannt, eine große Zahl unterschiedlicher biologisch aktiver Metaboliten zu bilden. Zu den repräsentativen Verbindungen gehören Polyketide, cyclische Peptide, Alkaloide, Pigmente und neuartige Sterine. Diese extreme Strukturvielfalt der Metaboliten entzog sich einer einfachen chemotaxonomischen Erklärung, bis wir nachwiesen, daß symbiontische Mikroorganismen für die Produktion einiger repräsentativer Verbindungen verantwortlich sind.<sup>[1]</sup> In diesem Beitrag werden wir die den Steinschwämmen zugeschriebenen chemischen Fähigkeiten zusammenfassen und unsere Untersuchungen über die chemischen Beziehungen zwischen einem Steinschwamm und seinen Symbionten erläutern.

## 2. Was ist ein Steinschwamm?

Die Schwammordnung Lithistida (Porifera, Demospongiae) ist eine künstliche Gruppe von Arten verschiedenen

Ursprungs, die zusammengefaßt wurden, weil sie Skelette haben, die hauptsächlich aus miteinander verwachsenen oder ineinander verhakten Nadeln, die Desmen genannt werden, bestehen.<sup>[2]</sup> Das starre Skelett verbundener Desmen bestimmt die Form des Steinschwamms und dient dazu, ihn in äußere (Ectosom) und innere Gewebe (Endosom) zu unterteilen. Wegen der unterschiedlichen Herkunft der Steinschwämme könnte man erwarten, daß es bei den Metaboliten kein chemotaxonomisches Leitmotiv gibt. Außerdem würde man nicht mit dem verstärkten Auftreten biologisch aktiver Verbindungen in Schwämmen rechnen, die mechanisch so gut durch einen Schild aus verwachsenen Kieselsäurenadeln geschützt sind. Steinschwämme haben einen weit zurückreichenden Stammbaum, der sich anhand von Fossilienfunden gut bis ins Kambrium verfolgen läßt. Heutzutage kommen Steinschwämme hauptsächlich in tieferen Gewässern vor, was beim Sammeln zu beträchtlichen logistischen Problemen führt und der Grund dafür ist, daß sich die chemischen Untersuchungen auf solche Gattungen konzentrieren, die in Tiefen wachsen, die beim normalen Flaschentauchen erreichbar sind. Eine Zusammenfassung der taxonomischen Klassifizierung der Steinschwämme<sup>[3]</sup> findet sich in Abbildung 1.

## 3. Die Chemie der Steinschwämme

Das chemotaxonomische Prinzip, das der Chemie der Steinschwämme zugrundeliegt, ist das, daß es kein solches gibt. Fast jede Verbindungsklasse ist scheinbar zufällig vertreten. Allerdings ist der Anteil an biologisch aktiven

[\*] Prof. Dr. D. J. Faulkner  
Scripps Institution of Oceanography  
University of California at San Diego  
La Jolla, CA 92093-0212 (USA)  
Fax: (+1) 619-534-2997  
E-mail: jfaulkner@ucsd.edu  
Dr. C. A. Bewley  
Laboratory of Chemical Physics, NIDDK  
National Institutes of Health, Bldg. 5, Room B135  
Bethesda, MD 20892 (USA)  
E-mail: bewley@speck.niddk.nih.gov

- Stamm Porifera  
 Klasse Demospongiae  
 Unterklasse Tetractinomorpha  
 Ordnung Lithistida  
 Familie Theonellidae  
 Gattungen ***Discodermia*, *Jereicopsis*,  
*Racodiscula*, *Theonella***  
 Familie Phymatellidae  
 Gattungen ***Neosiphonia*, *Reidispongia***  
 Familie Phymaraphinidae  
 Gattung *Kaliapsis*  
 Familie Corallistidae  
 Gattungen ***Callipelta*, *Corallistes*,  
*Homophymia*, *Macandrewia***  
 Familie Neopeltidae  
 Gattung *Neopelta*  
 Familie Pleromidae  
 Gattung ***Pleroma***  
 Familie Dorydermidae  
 Gattung *Anaderma*  
 Familie Scleritodermidae  
 Gattungen ***Aciculites*, *Amphibleptula*,  
*Microscleroderma*, *Scleritoderma*,  
*Tabropane***  
 Familie Siphonidiidae  
 Gattungen *Gastrophanella*, *Leiodermatium*,  
*Siphonidium*  
 Familie Desmantiidae  
 Gattung *Desmanthus*  
 Familie Petromicidae  
 Gattung *Petromica*  
 Familie Vetulinidae  
 Gattung *Vetulina*

Abb. 1. Aktuelle Klassifikation der heute noch lebenden Steinschwämme.<sup>[3]</sup>  
 Gattungen, für die Metaboliten beschrieben wurden, sind fett gedruckt.

Verbindungen mit ungewöhnlichen Strukturen sehr hoch, so daß man dies vielleicht als Grundprinzip ansehen kann.

### 3.1. Sterine

Bereits bei den ersten Untersuchungen von Steinschwämmen wurden ungewöhnliche Verbindungen gefunden. 1981 identifizierten Djerassi und Mitarbeiter die 4-Methylidensterine Conicasterin **1** und Theonellasterin **2** als Hauptsterine aus *Theonella conica* und *T. swinhoei*.<sup>[4]</sup> Zwei Jahre später beschrieb dieselbe Arbeitsgruppe die Isolierung von Pulchra-sterin **3** und anderen  $\Delta^7$ -Sterinen aus dem neuseeländischen Tiefseeschwamm *Aciculites pulchra*.<sup>[5]</sup>  $\Delta^7$ -Sterine sind keine normalen Schwammsterine, sondern sie finden sich normalerweise bei Seesternen und Seegurken.<sup>[6]</sup> Die 4-Methylidensterine scheinen ausschließlich in *Theonella*-Arten vorzukommen, obwohl 4-Methylsterine oft in Dinoflagellaten gefunden werden.<sup>[6, 7]</sup> Wenig später wurden auch die entsprechenden 3-Keto-4-methylidensterine Theonellasteron **4** und Conicasteron **5**, zusammen mit den Diels-Alder-Addukten Bisconicasteron **6** und Bistheonellasteron **7**, sowie neun weitere 4-Methylidensterine mit zusätzlichen Sauerstoffunktionalitäten aus *T. swinhoei* isoliert.<sup>[8–10]</sup> Interessanterweise wurden die 3-Keto-4-methylidensterine **4** und **5** in kristalliner Form aus dem Schwammgewebe gewonnen.<sup>[8]</sup> Wenig später stellte sich heraus, daß in *Jereicopsis graphidiophora*<sup>[11]</sup> und *Microscleroderma spirophora*<sup>[12]</sup> die normalen  $3\beta$ -Hydroxysterine durch  $3\beta$ -Methoxysterine ersetzt sind, zu denen auch der Bis-Enolether **8** gehört.<sup>[12]</sup>

### 3.2. Makrolide und Acetogenine

Die Isolierung und Identifizierung von Swinholid A **9** war für die Naturstoffchemiker eine wertvolle Lektion in der

D. John Faulkner erhielt seinen B.Sc. am Imperial College in London und promovierte dort auch bei Sir Derek Barton in synthetischer Organischer Chemie. Nach Postdokoranden-Aufenthalten bei R. B. Woodward an der Harvard University und bei W. S. Johnson an der Stanford University wurde er Mitglied der Fakultät der Scripps Institution of Oceanography an der University of California in San Diego, wo er jetzt Professor für Meereschemie ist. Nach heftigem Drängen seiner Kollegen, sich „stärker mit marinen Dingen zu beschäftigen“, wandte er seine Aufmerksamkeit der Chemie mariner Naturstoffe zu und hat diesen Wechsel seines Forschungsschwerpunktes nie bereut. Seine Forschungsinteressen umfassen die Strukturaufklärung mariner Naturstoffe, deren biomedizinisches Potential sowie ihre Rolle in den Lebens- und Stoffkreisläufen des Meeres.

Carole Ann Bewley, geboren 1963, erhielt 1985 ihren B.Sc. in Chemie an der San Diego State University. Nach einem Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von Prof. Jean Rivier am Salk Institute for Biological Studies begann sie ihre Dissertation bei Prof. D. John Faulkner an der Scripps Institution of Oceanography, University of California, in San Diego, die sie 1995 abschloß. Gegenwärtig arbeitet sie als Cancer Research Institute Postdoctoral Fellow im Labor von Dr. G. Marius Clore an den National Institutes of Health.



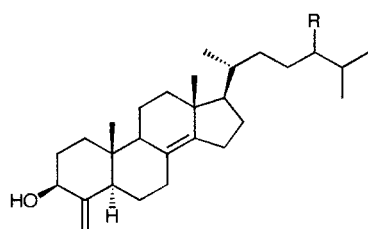
D. J. Faulkner



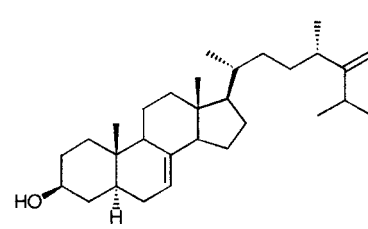
C. A. Bewley

Kunst der Strukturaufklärung. Swinholid A, eine potente cytotoxische Verbindung aus *T. swinhoei*, wurde zunächst für ein monomeres 22gliedriges Lacton gehalten,<sup>[13]</sup> während Misakinolid A aus *Theonella* sp. zuerst als monomeres 20gliedriges Lacton identifiziert wurde, dem eine disubstituierte Doppelbindung im Lactonring fehlt.<sup>[14]</sup> Für beide Verbindungen ergaben die Elementaranalysen die erwarteten Werte, und das Massenspektrum für Misakinolid A wies sogar ein starkes  $[M + H]^+$ -Signal für das Monomer auf. Auf die symmetrischen dimeren Strukturen von Swinholid A und Misakinolid A wurde man erstmals bei der Strukturaufklärung von Bistheonellid A **10** und Bistheonellid B aus *Theonella* sp. aufmerksam, als man als Veresterungsprodukt von Bistheonellid A **10**, das spektroskopisch mit Misakinolid A identisch war,<sup>[15, 16]</sup> ein unsymmetrisches Tribenzoat identifizierte und zudem ein „dimeres“ Molekülion im Massenspektrum auftrat. Die dimere 44gliedrige Ringstruktur und die absolute Konfiguration von Swinholid A **9** wurden eindeutig röntgenkristallographisch bestätigt.<sup>[17]</sup> Seitdem wurden mehrere dimere Makrolide aus der Familie der Swinholide<sup>[18, 19]</sup> und Bistheonellide<sup>[20]</sup> zusammen mit dem Preswinholid A **11**,<sup>[21]</sup> dem Monomer von Swinholid A **9**, beschrieben. Von diesen Verbindungen war Swinholid A die cytotoxischste,<sup>[22]</sup> weswegen seine Konformation<sup>[23]</sup> und mögliche Synthesen intensiv untersucht wurden, was in der Entwicklung von zwei exzellenten Totalsynthesen gipfelte.<sup>[24, 25]</sup>

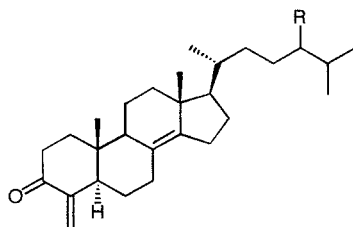
Die Röntgenstrukturanalyse von Discodermolid **12**, einer immunsuppressiven und cytotoxischen Verbindung aus *Discodermia dissoluta*, ergab eine neuartige „Polypropionat“-Struktur.<sup>[26]</sup> Wegen des ungewöhnlichen und möglicherweise nützlichen biologischen Eigenschaftsprofils – u. a. stabilisiert Discodermolid Microtubuli stärker als Taxol<sup>[27]</sup> – und der tatsächlichen oder erwarteten Schwierigkeit, größere Mengen aus natürlichen Quellen zu gewinnen, wurde die Verbindung Gegenstand vieler Synthesebemühungen.<sup>[28, 29]</sup> Die Calyculine, deren Struktur anhand der von Calyculin A **13**<sup>[30]</sup> beispielhaft dargestellt ist, sind eine Gruppe von acht tumorhemmenden Verbindungen aus *Discodermia calyx*, die die Proteinphosphatasen 1 und 2A inhibieren. Die Calyculine B, E und F sind bezüglich der Bindungen C2-C3 und C6-C7 geometrische Isomere von Calyculin A, während die Calyculine C, D, G und H eine homologe Reihe bilden und alle eine Methylgruppe am C-Atom 32 haben.<sup>[31–34]</sup> *Discodermia polydiscus* enthält das cytotoxisch und fungizid wirkende makrocyclische Lactam Discodermid **14**.<sup>[35]</sup>



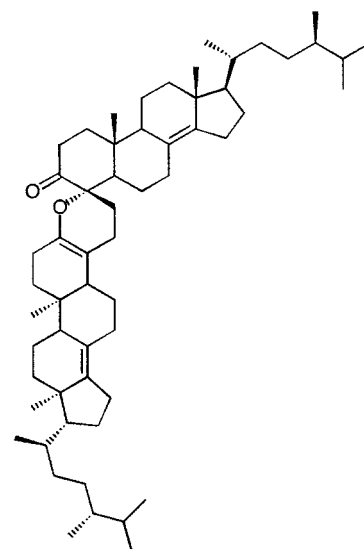
1, R =  $\beta$ -Me, Conicasterin  
2, R =  $\alpha$ -Et, Theonellasterin



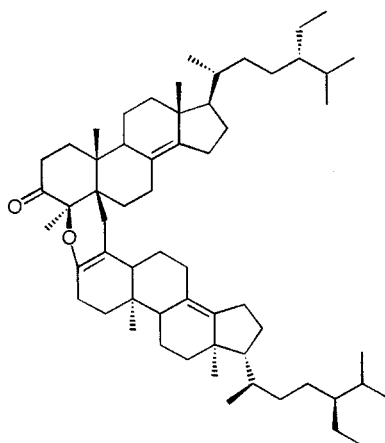
3 Pulchrasterin



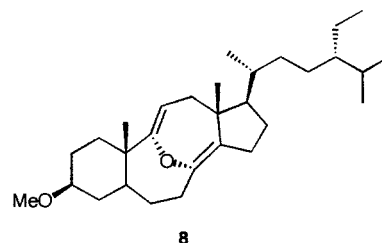
4, R =  $\alpha$ -Et, Theonellasteron  
5, R =  $\beta$ -Me, Conicasteron



6 Bisconicasteron



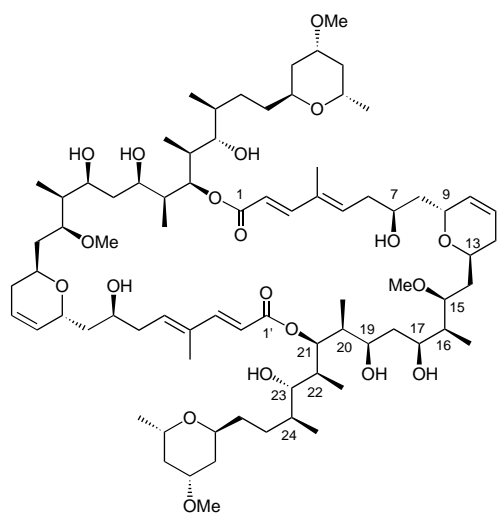
7 Bistheonellasteron



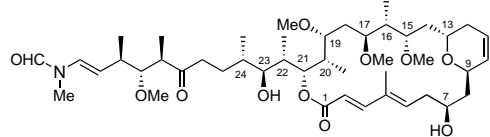
8

1988 wurde aus einer vor Okinawa vorkommenden *Theonella*-Art Onnamid A **15** isoliert.<sup>[36]</sup> Onnamid A, dessen Struktur stark der des Insektentoxins Pederin ähnelt,<sup>[37]</sup> hat antivirale Eigenschaften und wurde deshalb von Hong und Kishi synthetisiert.<sup>[38]</sup> Weitere neun Verbindungen aus der Onnamid-Reihe wurden später zusammen mit ihrer cytotoxischen Wirkung gegen die Zelllinie P388 beschrieben.<sup>[39, 40]</sup> Die Theopederine, hier exemplarisch dargestellt anhand von Theopederin A **16**, sind cytotoxische Metaboliten aus *Theonella* sp. mit geringfügig einfacheren Strukturen.<sup>[41]</sup> Die komplexesten Makrolide aus *Theonella* sp. sind die cytotoxischen Theonezole A **17**, B und C, die stereochemisch bislang nur unvollständig charakterisiert sind.<sup>[42, 43]</sup>

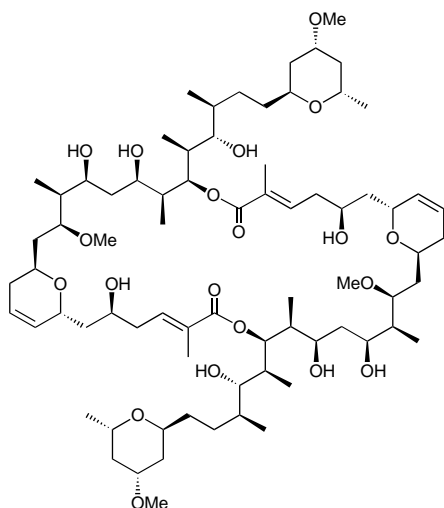
*Neosiphonia superstes* ist ein Tiefsee-Steinschwamm, der mit dem Schleppnetz gefangen wurde. Aus ihm wurden die Makrolide Superstolid A **18**<sup>[44]</sup> und dessen 24,25-Dehydroderivat Superstolid B<sup>[45]</sup> sowie die Sphinxolide B **19**, C und D<sup>[46]</sup>



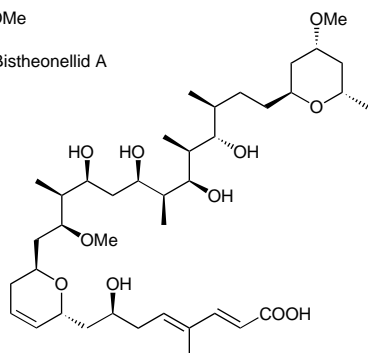
9 Swinholid A



vgl. Scytophycin C

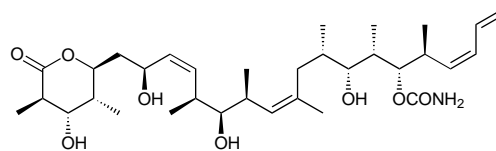


10 Bistheonellid A

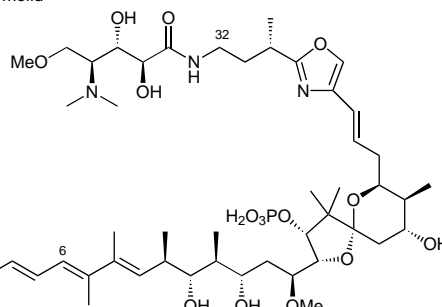


11 Preswinolid A

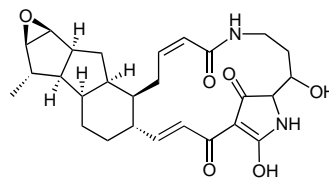
isoliert – allesamt stark cytotoxische Verbindungen. Sphinoxolid selbst wurde ursprünglich aus einer nicht identifizierten pazifischen Nacktschnecke der Ordnung Nudibranchia ge-



12 Discodermolid



13 Calyculin A



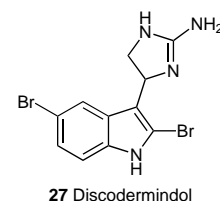
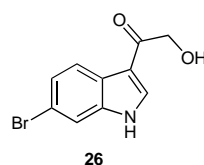
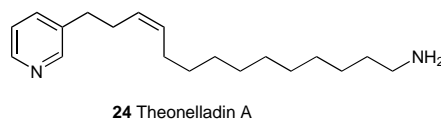
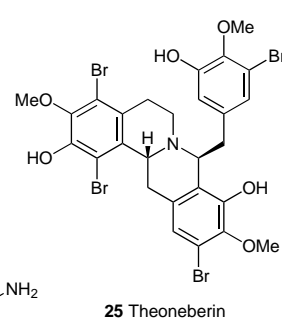
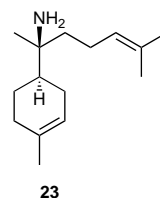
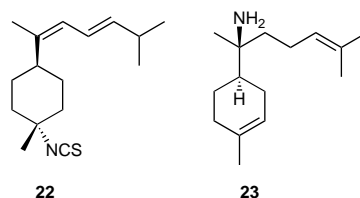
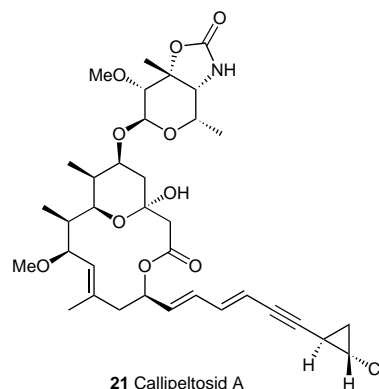
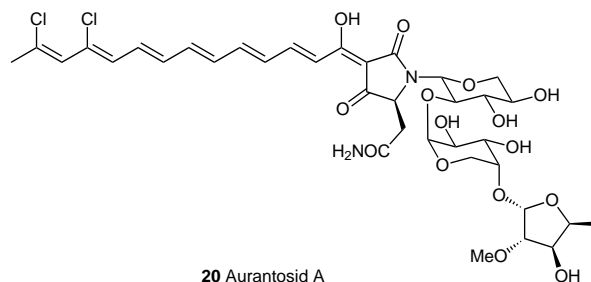
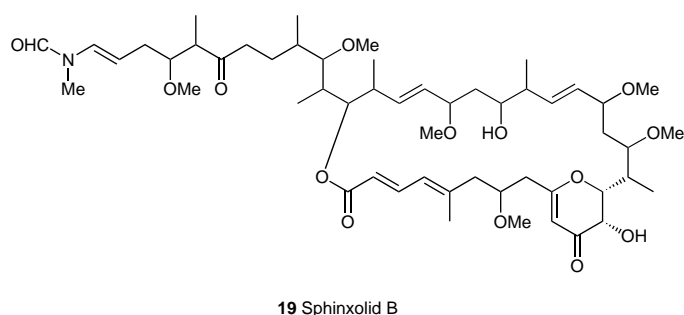
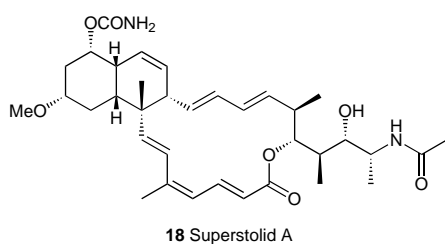
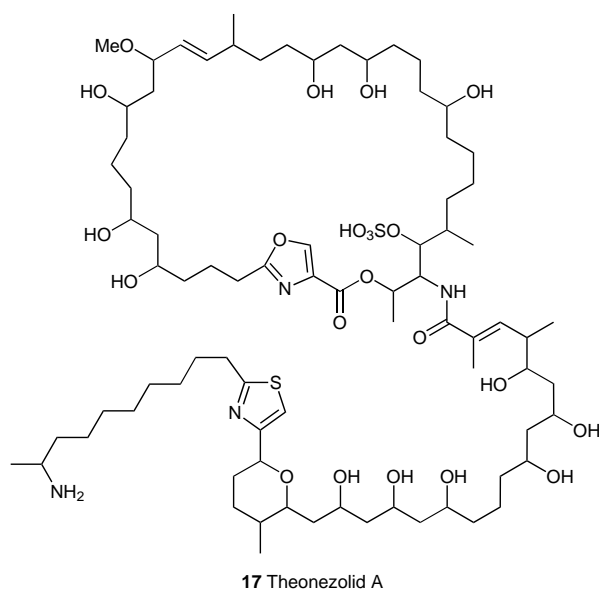
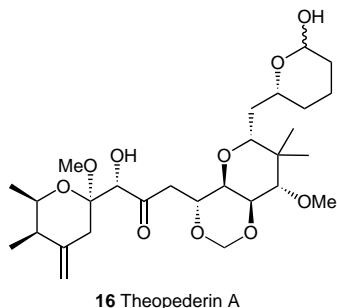
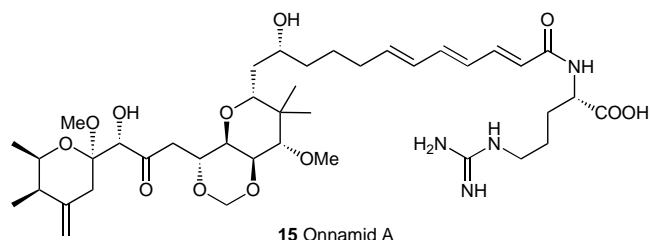
14 Discodermid

wonnen, die offensichtlich einen Schwamm gefressen hatte, der dieses Makrolid enthielt.<sup>[47]</sup> Die Sphinoxolide B **19** und D wurden außerdem zusammen mit zwei verwandten cytotoxischen Makroliden, Reidispongolid A und B, aus *Reidispongia coerulea* isoliert, einem Schwamm, der ebenfalls mit dem Schleppnetz aus einer Tiefe von 500 m in der gleichen Region südlich von Neukaledonien gefangen wurde.<sup>[48]</sup>

Es gibt zwei Arten von Steinschwämmen, die chlorierte Acetogenine mit zusätzlichen Zuckersubstituenten enthalten. Die Auranoside A **20** und B sind cytotoxische, orangefarbene Pigmente aus einer japanischen *Theonella*-Art.<sup>[49]</sup> Eine neukaledonische Art von *Callipelta* enthält die Callipeltoside A **21**, B und C, die mit ihrer Chlorcyclopropylgruppe höchst ungewöhnliche Makrolide sind.<sup>[50, 51]</sup>

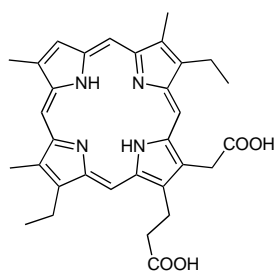
### 3.3. Alkaloide und andere stickstoffhaltige Basen

Sieben Bisabolen-Sesquiterpene (repräsentiert durch Theonellinisocyanat **22**) aus *Theonella swinhoei* aus Okinawa<sup>[52]</sup> sowie Aminobisabolen **23** aus *Theonella* sp. (ebenfalls aus Okinawa)<sup>[53]</sup> gehören zu den ersten stickstoffhaltigen Metaboliten, die aus Steinschwämmen isoliert wurden. Theonelladin A **24** ist eines von vier antineoplastischen (geschwulsthemmenden) Pyridinalkaloiden aus einer aus Okinawa stammenden Probe von *T. swinhoei*.<sup>[54]</sup> Verbindungen aus den beiden oben genannten Alkaloidklassen werden gewöhnlich in Schwämmen gefunden, die nicht zu den Steinschwämmen gehören. Einer der ungewöhnlichsten Na-

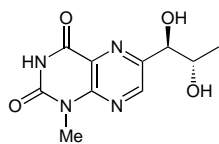


turstoffe aus *Theonella* sp. ist das schwach antimikrobielle und cytotoxische Isochinolinalkaloid Theoneberin **25**,<sup>[55]</sup> das einem terrestrischen Alkaloid ähnelt. Die relativ einfach aufgebauten Metaboliten Ethyl-6-brom-3-indolcarboxylat und 3-Hydroxyacetyl-6-bromindol **26** wurden aus dem Tiefsee-Steinschwamm *Pleroma menoui* isoliert,<sup>[56]</sup> während *D. polydiscus* das mäßig cytotoxische, bromierte Indolderivat Discodermindol **27** enthält.<sup>[57]</sup>

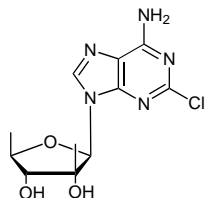
Die natürliche Funktion von fünf cytotoxischen Porphyrin-pigmenten aus einer neukaledonischen Art der Gattung *Corallistes*, zu denen auch Corallistin A **28** gehört, liegt noch im Dunkeln, denn bis in die Tiefe von 300 m, aus der der Schwamm gesammelt wurde, dringt fast kein Licht.<sup>[58, 59]</sup> Andere *Corallistes*-Arten enthalten Pteridine, z.B. 1-Methylpteridin-2,4-dion aus *C. fulvodesmus*, das 6-Dihydroxy-



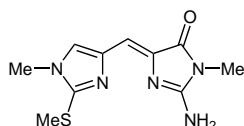
28 Corallistin A



29



31 Kumusin



30 Corallistin

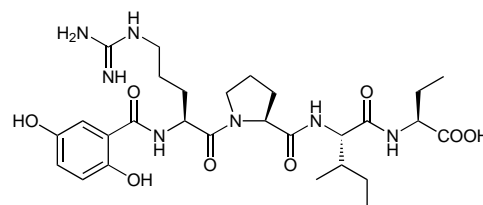
propyl-Derivat **29** aus *C. undulatus*<sup>[60]</sup> oder Corallistin **30** (ebenfalls aus *C. fulvodesmus*).<sup>[61]</sup> Schließlich wurde das chlorierte Nucleosid Kumusin **31**, das mäßig immunsuppressiv und cytotoxisch wirkt, ebenfalls aus *Theonella* sp. isoliert.<sup>[62]</sup>

### 3.4. Peptide

1993 veröffentlichten Fusetani und Matsunaga einen ausgezeichneten Übersichtsartikel über „Bioaktive Peptide aus Schwämmen“, in dem auch die Peptide aus Steinschwämmen detailliert beschrieben werden.<sup>[63]</sup> Wir möchten diesen Artikel nicht nachahmen, sondern werden stattdessen unseren Schwerpunkt auf die große Vielfalt von Peptidverbindungen in Steinschwämmen legen und den genannten Artikel lediglich aktualisieren. Die auffälligsten Eigenschaften der Peptide aus Steinschwämmen sind das ungewöhnlich breite Spektrum der biologischen Wirkungen und das fast regelmäßige Vorkommen von nichtproteinogenen sowie D-Aminosäuren.

#### 3.4.1. Lineare Peptide

Dieselbe *Theonella*-Art, die die Cyclotheonamide produziert (siehe Abschnitt 3.4.2), enthält auch den Thrombininhibitor Nazumamid A **32**, ein relativ einfaches Tetrapeptid, in dem der N-Terminus in Form eines 2,5-Dihydroxybenzamids blockiert ist.<sup>[64]</sup> Im Unterschied dazu sind die Polytheonamide A–C aus *T. swinhoei* stark cytotoxische lineare Peptide aus 48 Aminosäuren, für

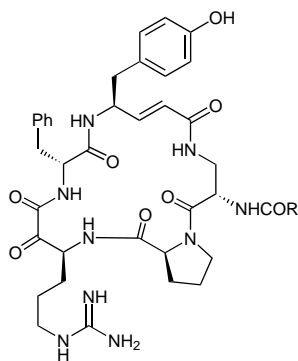


32 Nazumamid A

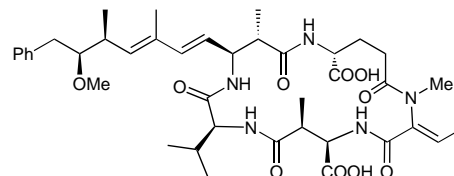
die eine ungewöhnlich große Zahl von *tert*-Leucinresten charakteristisch ist.<sup>[65]</sup>

#### 3.4.2. Cyclische Peptide

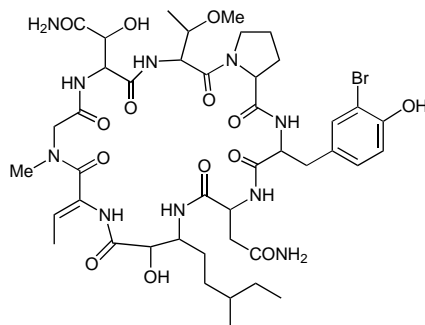
Zwei der bemerkenswerteren cyclischen Peptide aus Steinschwämmen sind die Cyclotheonamide A **33** und B **34** aus einer japanischen *Theonella*-Art, die 1990 als wirksame Thrombininhibitoren beschrieben wurden.<sup>[66]</sup> Die  $\alpha$ -Ketoamidfunktion der Cyclotheonamide erregte die Aufmerksamkeit der Arbeitsgruppen, die sich mit FK506 und Cyclosporin befaßten, und so wurde Cyclotheonamid wenig später synthetisiert und dabei die Zuordnung der absoluten Konfiguration korrigiert.<sup>[67]</sup> Es folgten eine Reihe von Untersuchungen, in denen die molekulare Grundlage des Wirkmechanismus als Serinproteaseinhibitor aufgeklärt wurde,<sup>[68]</sup> weitere Synthesestudien<sup>[69]</sup> und die Strukturaufklärung von drei weiteren Analoga, den Cyclotheonamiden C–E.<sup>[70]</sup> Motuporin **35** ist ein Cytotoxin, das aus einer *Theonella swinhoei*-Probe aus Papua-Neuguinea isoliert wurde und als starker Hemmstoff der Proteinphosphatase 1 wirkt.<sup>[71]</sup> Die Struktur dieses Pen-



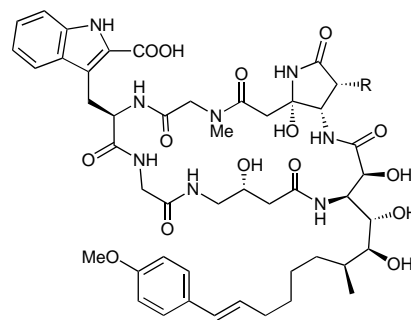
33, R = H, Cyclotheonamid A  
34, R = Me, Cyclotheonamid B



35 Motuporin



36 Perthamid B



37, R = OH, Microsclerodermin A  
38, R = H, Microsclerodermin B

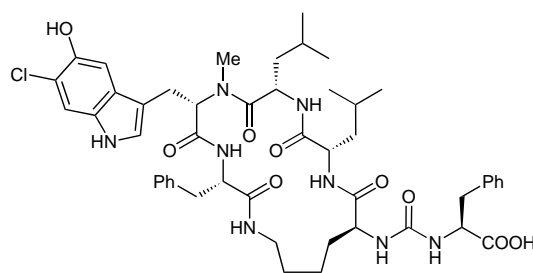
tapeptids unterscheidet sich von der des aus Cyanobakterien stammenden Metaboliten Nodularin<sup>[72]</sup> durch die Substitution von (*S*)-Arginin gegen (*S*)-Valin. Perthamid B **36**, das die Bindung von Interleukin-1 $\beta$  an EL4.1.6-Zellen schwach hemmt, ist ein cytotoxisches cyclisches Octapeptid aus einer australischen *Theonella*-Art.<sup>[73]</sup> Eine neukaledonische Tiefseeart von *Microscleroderma* enthält zwei fungizide cyclische Peptide, Microsclerodermin A **37** und B **38**, die einen sehr komplexen  $\beta$ -Aminosäurerest haben.<sup>[74]</sup>

Keramamid A **39**, das die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums hemmt, wurde aus einer *Theonella*-Art isoliert, die vor Okinawa gesammelt wurde. Die Verbindung ist ein cyclisches Hexapeptid, das eine ungewöhnliche Harnstoffgruppe in der Seitenkette trägt.<sup>[75]</sup> Konbamid **40**, ein Calmodulin-Antagonist, ist ein sehr ähnliches cyclisches Hexapeptid mit einer Harnstoffgruppe; es wurde von der gleichen Arbeitsgruppe aus einer anderen *Theonella*-Probe aus Okinawa isoliert. Die vorgeschlagene Struktur von Konbamid **40** wurde allerdings kürzlich aufgrund einer Synthesestudie in Frage gestellt.<sup>[76]</sup> Obwohl die Keramamide B **41** und C–H aus demselben Schwamm stammen, haben sie eine völlig andere Struktur als Keramid A **39**; alle enthalten eine  $\alpha$ -Ketoamidfunktion und entweder einen Oxazol- (Keramamid B **41**, C, D, E) oder einen Thiazolrest (Keramamid F, G, H) im Peptidringssystem.<sup>[77–79]</sup> Orbiculamid **43** ist ein cytotoxisches Peptid aus einer japanischen *Theonella*-Art, das eng mit Keramid D verwandt ist.<sup>[80]</sup> Die Discobahamine A und B aus Tiefseeproben von *Discodermia* sp., die vor den Bahamas gesammelt wurden, unterscheiden sich nur in ihren Seitenketten von Keramid D.<sup>[81]</sup>

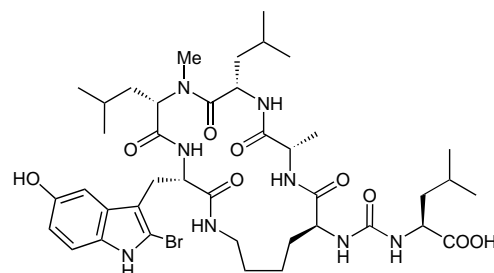
### 3.4.3. Cyclische Depsipeptide

1984 beschrieben Fusetani et al. Discodermin A als antibakterielles cyclisches Tetradecapeptid-Lacton aus *Discodermia kiiensis*.<sup>[82]</sup> Danach wurden auch die Strukturen der Discodermine B–H veröffentlicht,<sup>[83–86]</sup> doch mußten die Strukturen der Discodermine A **44** sowie B–D korrigiert werden.<sup>[86]</sup> Außerdem wurden weitere biologische Aktivitäten in dieser Gruppe gefunden: Discodermin A **44** hemmt die tumorfördernde Wirkung von Okadaätsäure,<sup>[87]</sup> die Discodermine A–D sind potente Hemmstoffe der Phospholipase A<sub>2</sub>,<sup>[88]</sup> und alle Discodermine sind cytotoxisch. Die Discokiolide A **45** und B–D sind cytotoxische Depsipeptide aus *D. kiiensis*, die als Seitenkette eine einzigartige oxazolhaltige  $\beta$ -Hydroxysäuregruppe haben.<sup>[89]</sup>

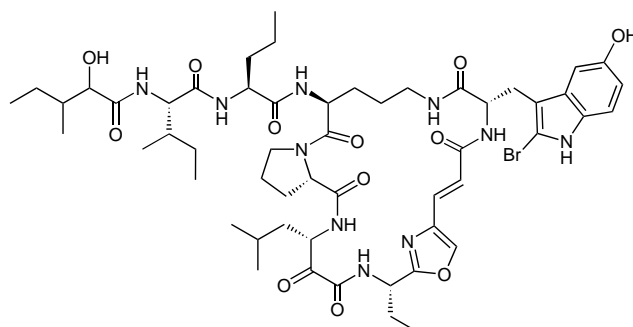
1986 beschrieb die Arbeitsgruppe von Kitagawa die Isolierung der Theonellapeptolide, die die Zellteilung in befruchteten Seeigelleiern hemmten, und zeigte, daß Theonellapeptolid Id **46** ein cyclisches Depsipeptid ist.<sup>[90]</sup> Wenig später isolierten Nakamura et al. dieselbe Verbindung unter dem Namen Thionellamin B aus einer aus Okinawa stammenden *Theonella*-Art und beschrieben ihre Aktivität als Inhibitor der  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.<sup>[91]</sup> In der Folgezeit wurden fünf weitere Theonellapeptolide (Ia, Ib, Ic, Id, IId) als cytotoxische Tridecapeptid-Lactone aus *Theonella swinhoei* beschrieben.<sup>[92–95]</sup> Polydiscamid A **47**, das aus *Discodermia polydiscus*



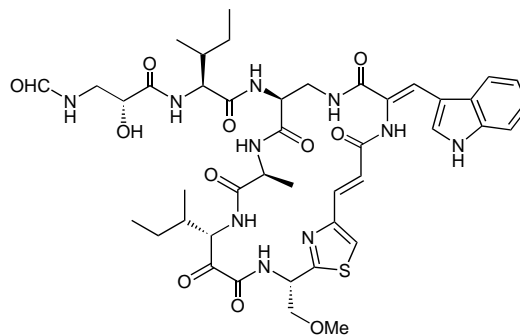
**39** Keramid A



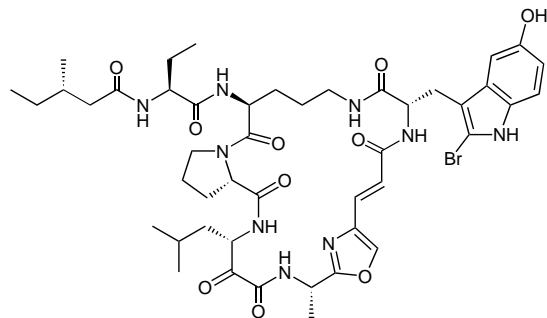
**40** Konbamid



**41** Keramid B

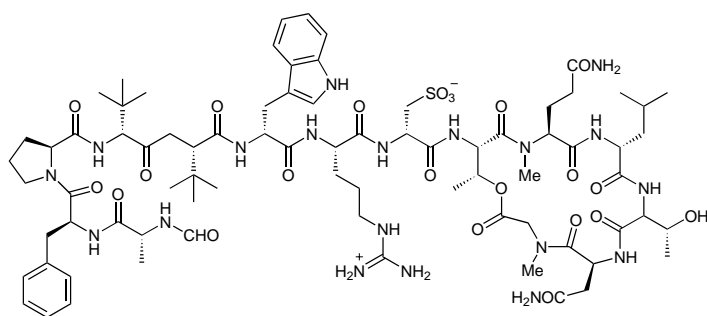


**42** Keramid F

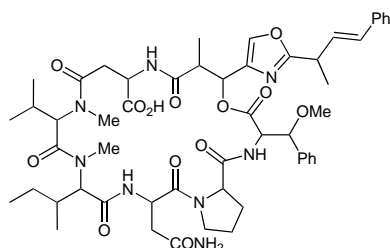


**43** Orbiculamid

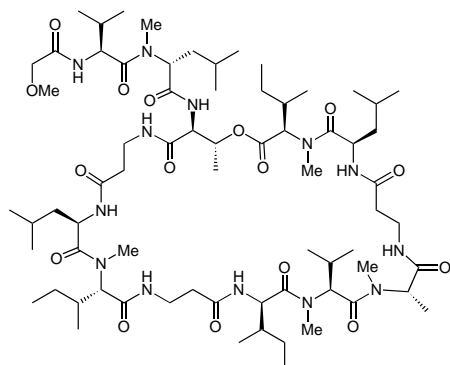




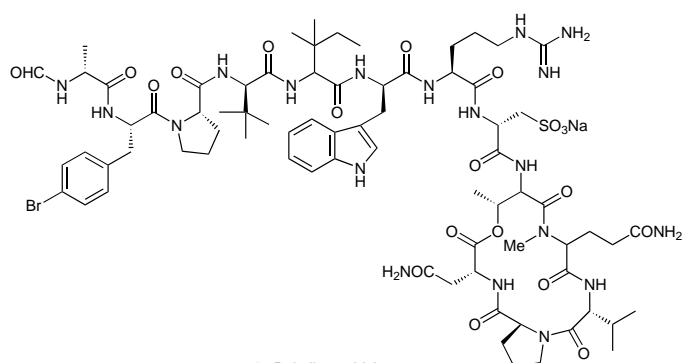
44 Discodermin A



45 Discokiolid A



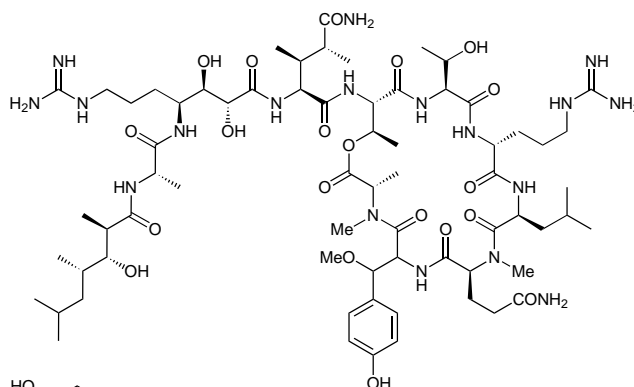
46 Theonellapeptid I d



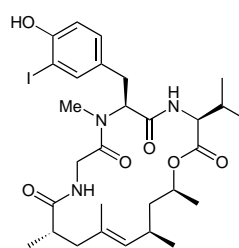
47 Polydiscamid A

isoliert wurde, ist ebenfalls ein cytotoxisches cyclisches Tridecapeptid-Lacton, allerdings mit einem kleineren Ring.<sup>[96]</sup>

Vor kurzem berichtete die Arbeitsgruppe von Minale über eine Reihe cyclischer Depsipeptide aus einer neukaledonischen *Callipelta*-Art. Bei der Strukturaufklärung der Callipeltine A **48**, B und C, die fungizid und cytotoxisch sowie gegen HIV wirken, wurde eine Seitenkette mit einem ungewöhnlichen Polypropionatrest identifiziert.<sup>[97, 98]</sup> Neben



48 Callipeltin A



49 Neosiphoniamolid A

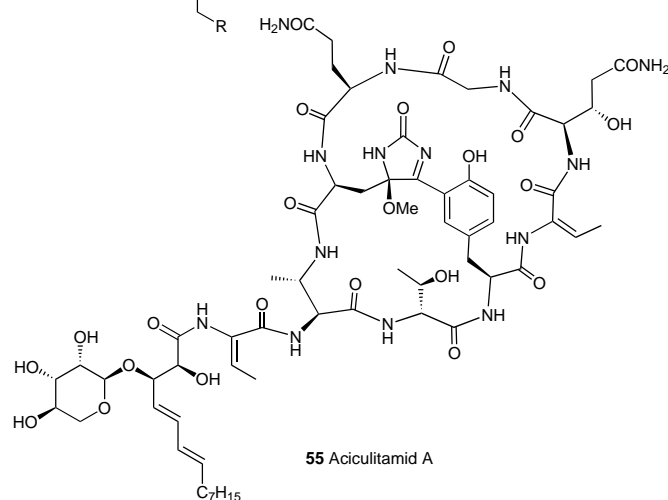
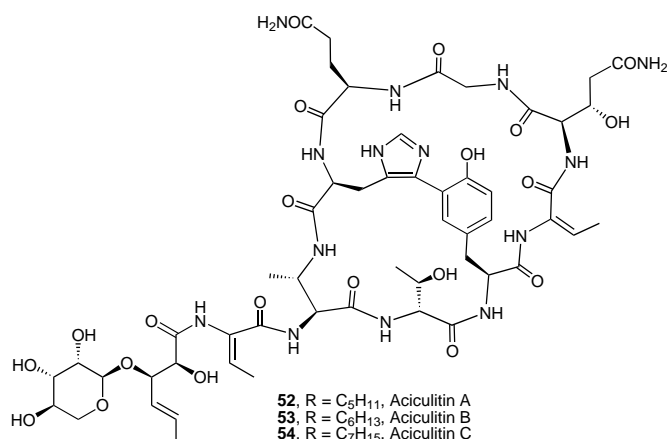
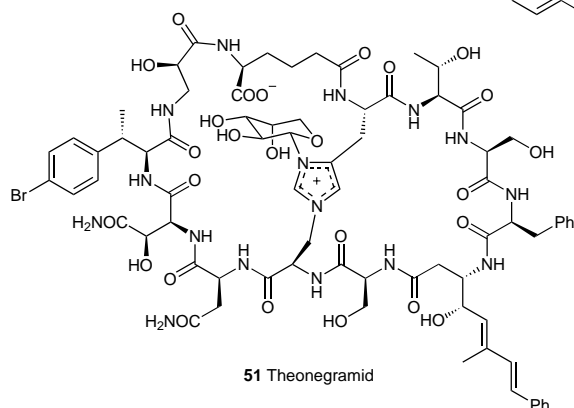
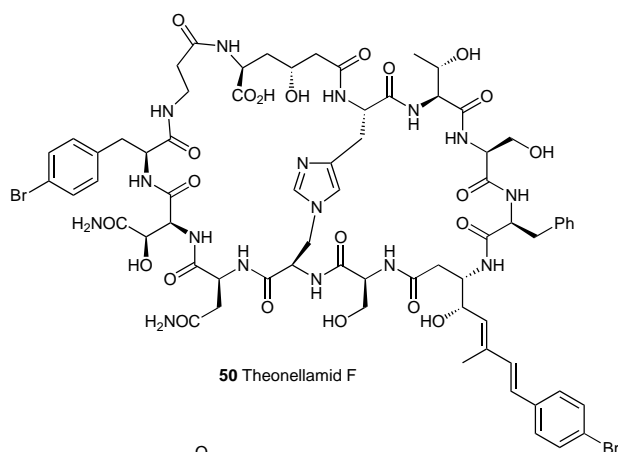
den bereits besprochenen Sphinxoliden (siehe Abschnitt 3.2) enthält *Neosiphonia superstes* das kleine cyclische Depsipeptid Neosiphoniamolid A **49**; in seiner Struktur ähnelt es sehr den Geodiamoliden und Jaspamiden, die bereits früher aus Schwämmen isoliert wurden, die nicht zu den Steinschwämmen zählen.<sup>[99]</sup>

### 3.4.4. Bicyclische Peptide

Der 1989 erschienene Artikel von Matsunaga et al. über die Strukturaufklärung des fungiziden bicyclischen Peptids Theonellamid F **50** aus einer japanischen *Theonella*-Art war ein Meilenstein in der Geschichte der marinen Naturstoffchemie, denn er zeigte die elegante Lösung eines Strukturproblems, dessen Schwierigkeitsgrad die damaligen technischen Möglichkeiten eigentlich überstieg.<sup>[100]</sup> Dadurch angeregt untersuchten wir eine philippinische Probe von *Theonella swinhoei*, aus der wir Theonegramid **51** isolierten, das erste Glycopeptid aus einem Steinschwamm.<sup>[101]</sup> Matsunaga und Fusetani haben danach die Strukturen der cytotoxischen bicyclischen Peptide Theonellamid B und C sowie der cytotoxischen Glycopeptide Theonellamid A, D und E veröffentlicht.<sup>[102]</sup> Die Strukturaufklärung der cytotoxischen und fungiziden bicyclischen Lipoglycopeptide Aciculitin A–C **52–54** sowie der Artefakte Aciculitamid A **55** und B aus *Aciculites orientalis* ist zweifellos das komplexeste Problem, das in unserem Labor gelöst wurde<sup>[103]</sup> und auf das wir im nächsten Abschnitt näher eingehen werden.

## 4. Die Strukturaufklärung cyclischer Peptide aus Steinschwämmen

Meistens können die Strukturen cyclischer Peptide, Depsipeptide und Glycopeptide mit Standardmethoden aufgeklärt

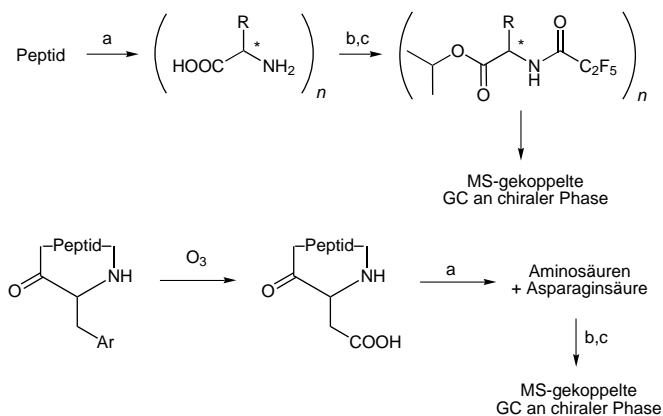


werden, mit denen der Chemiker, der sich mit marinen Naturstoffen befaßt, vertraut ist. Dennoch gilt es immer wieder, Neues zu lernen und Verbesserungen einzuführen. Wir halten die von uns bevorzugte Isolierungsmethode für eine solche Verbesserung. Als wir *Aciculites orientalis* mit Methanol extrahierten, erhielten wir einen Rohextrakt, der zwar stark fungizid wirkte, aber sehr schlechte NMR-Spektren ergab. Im Verlauf der Reinigung, bei der wir bei den meisten chromatographischen Schritten Methanol als Elutionsmittel verwendeten, nahm die fungizide Wirkung ab, und die Spektren wurden besser, bis wir schließlich die Artefakte Aciculitamid A **55** und B isoliert hatten. Beide Verbindungen enthielten eine Methoxygruppe, die von der Addition des Lösungsmittels an ein Autoxidationsprodukt herrührte. Eine neue Probe des Schwamms extrahierten wir ohne Methanol und erhielten daraufhin durchweg erheblich bessere Ergebnisse.<sup>[103]</sup> Der Schwamm wird zerkleinert und lyophilisiert, dann nacheinander mit Hexan und Ethylacetat bei Raumtemperatur extrahiert. Nach vollständiger Entfernung der organischen Lösungsmittel wird der Schwamm mit Wasser/Acetonitril (1/1) bei Raumtemperatur extrahiert, bis die Extrakte keine fungizide Wirkung und/oder im Dünnschichtchromatogramm keine positive Farbreaktion auf Peptide mehr aufweisen. Das Acetonitril wird im Rotationsverdampfer und das verbleibende Wasser durch Lyophilisieren entfernt. Das so erhaltene Pulver ist erheblich reiner als der entsprechende Methanolextrakt.

Eine interessante Eigenschaft der Peptide aus Steinschwämmen ist das Vorkommen ungewöhnlicher Aminosäuren. Diese Aminosäuren können meist mit Hilfe von <sup>1</sup>H- und <sup>13</sup>C-NMR-Daten zusammen mit COSY-, TOCSY-, HMBC- und HMQC-NMR-Messungen identifiziert werden. Schwierigkeiten treten auf, wenn die Aminosäuren nicht durch normale Peptidbindungen verknüpft sind, sondern durch ungewöhnliche Bindungen wie die zwischen Histidin und Alanin in Theonellamid F **50** und Theonegramid **51** oder die zwischen Histidin und Tyrosin in den Aciculitinen **52–54**. In solchen Fällen (besonders bei Aciculitamid A **55**) ist eine Kombination von HMBC- und ROESY-NMR-Daten erforderlich, um die Position der nichtpeptidischen Bindung zwischen den Resten zu bestimmen. Die Reihenfolge, in der die einzelnen Aminosäuren durch Peptid- oder Lactonbindungen verknüpft sind, wird durch die C-H-Korrelationen über zwei und drei Bindungen bestimmt. In einigen bicyclischen Peptiden können die benötigten Korrelationsdaten allerdings nicht ermittelt werden, weil das Molekül entweder eine Konformation mit Diederwinkeln einnimmt, die ungeeignet für eine skalare Kopplung sind, oder eine, die sich schnell im Vergleich zur zeitlichen Auflösung der NMR-Messung ändert. Dies ist bei den Aciculitinen **52–54** der Fall, so daß keine weitreichende Kopplung über diejenigen Peptidbindungen hinweg auftrat, die den Verknüpfungsstellen der beiden Ringe des Bicyclus benachbart waren. Gelöst wurde das Problem mit einer ROESY-NMR-Messung, mit der der kleine Abstand zwischen Wasserstoffatomen, die an benachbarte Aminosäurereste gebunden sind, nachgewiesen werden konnte.<sup>[103]</sup>

Die Peptide aus Steinschwämmen enthalten oft D- und L-Aminosäuren, so daß die Bestimmung der absoluten Kon-

figuration einer jeden Aminosäure ein sehr wichtiger Teil der Strukturanalyse ist. Die Methode der Wahl hierfür ist in unserer Arbeitsgruppe die MS-gekoppelte Gaschromatographie an chiraler Phase, bei der wir ein Säurehydrolysat der Peptide einsetzen, weil für diese Methode die geringste Substanzmenge erforderlich ist und – was noch wichtiger ist – weil die Identität der Signale durch MS bestätigt werden kann (Schema 1, oben). Die Voraussetzung dafür ist, daß man



Schema 1. Bestimmung der absoluten Konfiguration von Aminosäuren in einem Peptid. Oben: Hydrolyse des Peptids und Derivatisierung der freigesetzten Aminosäuren für die MS-gekoppelte GC-Analyse an chiraler Phase. Unten: Ozonolyse eines Peptids mit einer substituierten aromatischen Aminosäure; es entsteht ein Peptid, das statt dessen Asparaginsäure enthält, die dann mit GC-MS an chiraler Phase identifiziert werden kann. a) 5N HCl, 100 °C, 16 h; b) CH<sub>3</sub>COCl, Isopropanol, 100 °C, 45 min; c) (C<sub>2</sub>F<sub>5</sub>CO)<sub>2</sub>O, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 100 °C, 45 min.

über Referenzproben für die D- und L-Aminosäuren verfügt; daher kann bei ungewöhnlichen Aminosäuren die Bestimmung der absoluten Konfiguration problematisch sein. Es gibt allerdings zwei mögliche Lösungen. Oft erhält man Referenzproben ungewöhnlicher Aminosäuren von großzügigen Kollegen, die die Verbindungen isoliert oder synthetisiert haben, oder aber man synthetisiert sie selbst. Anderenfalls kann man das Peptid vor der Hydrolyse chemisch modifizieren, um die ungewöhnliche Aminosäure in eine der Stan-

dardaminosäuren zu überführen, und bestimmt dann die absolute Konfiguration der neugebildeten Aminosäure. So können beispielsweise ringsubstituierte aromatische Aminosäuren durch Ozonolyse in Asparaginsäure umgewandelt werden, die dann über GC-MS an chiraler Phase identifiziert wird (Schema 1, unten). Bei den Aciculitinen **52**–**54** konnten die beiden aromatischen Aminosäuren Histidin und Tyrosin durch unterschiedliche Ozonolysedauer voneinander unterschieden werden, weil der heteroaromatische Ring schneller oxidiert wird als der phenolische Ring. Wir haben auch versucht, die absolute Konfiguration eines einzelnen Aminosäurerestes durch die Verknüpfung von Molecular-Modeling-Resultaten mit ROESY-NMR-Messungen zu bestimmen, können dies für kleine Peptide aber nicht empfehlen, es sei denn, das Peptid hätte ein nahezu starres Ringsystem.

## 5. Viele Metaboliten von Steinschwämmen ähneln Verbindungen aus anderen Quellen

Auch wenn wir wissen, daß die Bewertung der Ähnlichkeit zwischen chemischen Strukturen sehr subjektiv ist, werden in Tabelle 1 einige der offensichtlicheren Ähnlichkeiten zwischen Metaboliten aus Steinschwämmen und Naturstoffen aus anderen Quellen gezeigt. Es besteht eine geringe Wahrscheinlichkeit, daß Theonellinisocyanat **22** und Theonelladin A **24** fälschlicherweise *T. swinhoei* zugeschrieben wurden, sie tatsächlich aber von anderen Schwämmen synthetisiert werden. So etwas kann passieren, wenn ein Taxonom nur eine Probe aus einer gemischten Sammlung identifiziert oder wenn der Steinschwamm die Verbindung aus dem Meerwasser oder von einem anderen Schwamm während des Sammelvorgangs aufgenommen hat. In anderen Fällen wissen wir, daß bestimmte Metaboliten von Steinschwämmen in anderen Schwämmen nachgewiesen wurden: Wir haben beispielsweise Swinholid A **9** aus einer von den Philippinen stammenden *Ircinia*-Art isoliert. Doch auch wenn wir die unklaren Beispiele unberücksichtigt lassen, bleiben wir mit der Beobachtung von Kitagawa et al.<sup>[17]</sup> konfrontiert, daß eine Teilstruktur

Tabelle 1. Einige Verbindungen aus Steinschwämmen, die Verbindungen aus anderen Quellen ähneln.

| Art                          | Verbindung                         | verwandte Verbindung | Herkunft der verwandten Verbindung  |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------|---|
| <i>Theonella</i> sp.         | Theonellasterin <b>2</b>           | 3-Methylsterine      | Dinoflagellaten <sup>[7]</sup>  |
| <i>T. swinhoei</i>           | Swinholid A <b>9</b>               | Scytophycin C        | Cyanobakterium ( <i>Scytonema pseudohofmanni</i> ) <sup>[104]</sup>         |
| <i>Theonella</i> sp.         | Onnamid A <b>15</b>                | Pederin              | Ölkäfer ( <i>Paederus</i> spp.) <sup>[37]</sup>                             |
| <i>Theonella</i> sp.         | Theopederin A <b>16</b>            | Pederin              | Ölkäfer ( <i>Paederus</i> spp.) <sup>[37]</sup>                             |
| <i>Neosiphonia superstes</i> | Sphinxolid B <b>19</b>             | Scytophycin C        | Cyanobakterium ( <i>Scytonema pseudohofmanni</i> ) <sup>[104]</sup>         |
| <i>Neosiphonia superstes</i> | Sphinxolid B <b>19</b>             | Rhizopodin           | Myxobakterium ( <i>Myxococcus stipitatus</i> ) <sup>[105]</sup>             |
| <i>Reidisporgia coerulea</i> | Reidisporgiolide (vgl. <b>19</b> ) | Halichondramid       | Schwamm ( <i>Halichondria</i> sp.) <sup>[106]</sup>                         |
| <i>T. swinhoei</i>           | Theonellinisothiocyanat <b>22</b>  | 3-Isocyantheonellin  | Schwamm ( <i>Halichondria</i> , z. B. <i>lendenfeldi</i> ) <sup>[107]</sup> |
| <i>T. swinhoei</i>           | Theonelladin A <b>24</b>           | Niphatesine          | Schwamm ( <i>Niphates</i> sp.) <sup>[108]</sup>                             |
| <i>Corallistes</i> sp.       | Corallistin A <b>28</b>            | Chlorophylle         | Pflanzen und Algen  |
| <i>T. swinhoei</i>           | Motuporin <b>35</b>                | Nodularin            | Cyanobakterium ( <i>Nodularia spumigena</i> ) <sup>[109]</sup>              |
| <i>Theonella</i> sp.         | Keramamid A <b>39</b>              | Ferintosäure         | Cyanobakterium ( <i>Microcystis aeruginosa</i> ) <sup>[110]</sup>           |
| <i>Neosiphonia superstes</i> | Neosiphoniamolid A <b>49</b>       | Chondramide          | Myxobakterium ( <i>Chondromyces crocatus</i> ) <sup>[111]</sup>             |
| <i>Neosiphonia superstes</i> | Neosiphoniamolid A <b>49</b>       | Geodiamolid          | Schwamm ( <i>Geodia</i> sp.) <sup>[112]</sup>                               |
| <i>Discodermia dissoluta</i> | Discodermid <b>14</b>              | Alteramid A          | Meeresbakterium ( <i>Alteromonas</i> sp.) <sup>[113]</sup>                  |
| <i>Discodermia dissoluta</i> | Discodermid <b>14</b>              | Ikarugamycin         | Bodenbakterium ( <i>Streptomyces</i> sp.) <sup>[114]</sup>                  |

von Swinholid A **9** einem Teil von Scytophycin C aus dem filamentösen Cyanobakterium *Scytonema pseudohofmanni* auffallend ähnelt,<sup>[104]</sup> sogar bis hin zur identischen absoluten Konfiguration aller zwölf Stereozentren, die die beiden Moleküle gemeinsam haben. Eine solche Ähnlichkeit kann nicht unberücksichtigt bleiben.

Als erste beobachteten Fusetani und Mitarbeiter 1984, daß Discodermin A **44** Aminosäuren enthält, die bis dahin nur in Peptiden aus Bakterien gefunden wurden, und spekulierten zunächst ohne greifbare Indizien darüber, daß diese Peptide bakteriellen Ursprungs sein könnten.<sup>[82]</sup> Bis 1993, vielleicht auch früher, ist diese Hypothese dahingehend leicht verändert worden, daß viele Autoren die Metaboliten der Steinschwämme nun symbiontischen Cyanobakterien zuschrieben.<sup>[115]</sup> Zwei Faktoren beeinflussten diesen Umschwung. Der erste war die Ähnlichkeit zwischen cyanobakteriellen Metaboliten und Verbindungen aus Steinschwämmen, wie oben bereits erläutert wurde. Der zweite war die Gegenwart symbiontischer filamentöser Bakterien in Steinschwämmen, die, unter dem Rasterelektronenmikroskop betrachtet, im Aufbau dem filamentösen symbiontischen Cyanobakterium *Oscillatoria spongelliae* gleichen, das man im Schwamm *Dysidea herbacea* gefunden hatte.

Nicht bei allen Steinschwämmen finden sich filamentöse Mikroorganismen in den inneren Geweben. Wir analysierten die Steinschwämme unserer Sammlung und fanden heraus, daß das Vorkommen filamentöser Mikroorganismen (Abb. 2) mit der fungiziden Wirkung eines Rohextraktes des Schwamms und, wenn die Metaboliten identifiziert waren, mit dem Vorkommen von Peptiden mit aromatischen  $\beta$ -Aminosäuren korrelierte (Tabelle 2). Aromatische und aliphatische  $\beta$ -Aminosäuren sind als Bestandteile cyclischer Peptide aus Cyanobakterien zwar bekannt (Tabelle 3), aber wir konnten uns der Hypothese nicht anschließen, daß die Filamente aus Cyanobakterien bestehen sollten, denn Photo-

synthese-Organismen wie Cyanobakterien gedeihen nicht ohne Licht und Steinschwämme findet man oft in großen Tiefen, in Höhlen und an anderen schattigen Orten. Außerdem findet man die Filamente nur im Inneren des Schwamms, wo sie in einem Skelettgerüst aus verwachsenen Kieselsäurenadeln eingeschlossen sind, die das Licht abschirmen (Abb. 2). Das heißt nicht, daß es keine Steinschwämme gibt, die Cyanobakterien enthalten: Steinschwämme aus Flachwasser beherbergen in ihren äußeren Geweben symbiontische einzellige Cyanobakterien, doch hält man deren Zelldichte für zu gering, um die relativ großen Mengen an cyclischen Peptiden zu synthetisieren, die man aus Steinschwämmen isolieren kann. Um dieses Rätsel aufzuklären, beschlossen wir, die zelluläre Lokalisation von Metaboliten in einer vor den Palau-Inseln gesammelten Flachwasserprobe von *Theonella swinhoei* zu untersuchen.

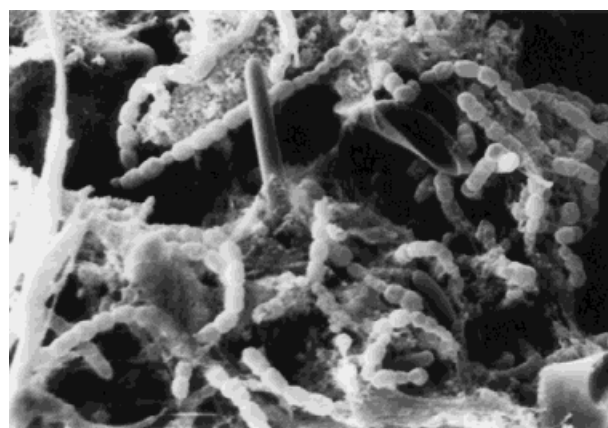
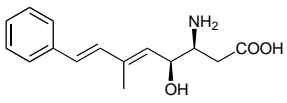
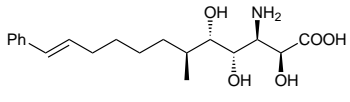
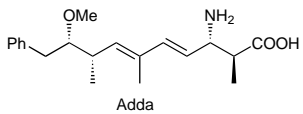
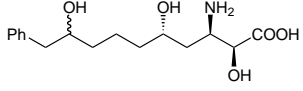
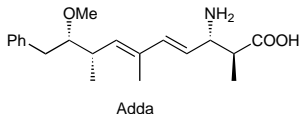
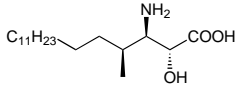


Abb. 2. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Theonella swinhoei*; die filamentösen Bakterien im Inneren des Schwamms sind deutlich sichtbar.

Tabelle 2. Korrelationen zwischen dem Vorkommen symbiontischer filamentöser Bakterien, fungizider Wirkung und Sekundärmetaboliten.

| Probennummer | Organismus                   | Fundort       | filamentöse Bakterien | fungizide Wirkung | $\beta$ -Aminosäuren | Verbindungen                                   |
|--------------|------------------------------|---------------|-----------------------|-------------------|----------------------|--|
| NCI-007      | <i>Theonella swinhoei</i>    | Negros        | +                     | +                 | +                    | Theonegramid <b>51</b>                         |
| NCI-013      | <i>Aciculites orientalis</i> | Negros        | –                     | +                 | –                    | Aciculitine <b>52–54</b>                       |
| NCI-036      | <i>T. swinhoei</i>           | Negros        | +                     | +                 | +                    | Theonegramid <b>51</b>                         |
| NCI-141      | <i>T. swinhoei</i>           | Siquijor      | +                     | +                 | +                    | Theonegramid <b>51</b>                         |
| NCI-154      | <i>Theonella</i> sp.         | Siquijor      | –                     | +                 | –                    | Aurantoxide (vgl. <b>20</b> )                  |
| NCI-1010     | <i>Theonella</i> sp.         | Siquijor      | +                     | +                 | +                    | Theonegramid <b>51</b>                         |
| NCI-1919     | <i>Theonella</i> sp.         | Siquijor      | +                     | +                 | +                    | Theonegramid <b>51</b>                         |
| NCI-1933     | <i>Scleroderma</i> sp.       | Cuyo          | –                     | –                 | –                    | unbekannt                                      |
| NCI-1934     | <i>Discoderma</i> sp.        | Cuyo          | +                     | +                 | +                    | unbekanntes Peptid                             |
| NCI-1935     | <i>Discoderma</i> sp.        | Cuyo          | +                     | +                 | +                    | unbekanntes Peptid                             |
| 93-085       | <i>T. swinhoei</i>           | Palau-Inseln  | +                     | +                 | +                    | Theopalauamid <b>62</b> , Swinholid A <b>9</b> |
| 93-087       | <i>T. swinhoei</i>           | Palau-Inseln  | +                     | +                 | +                    | Theopalauamid <b>62</b> , Swinholid A <b>9</b> |
| 95-001       | <i>T. swinhoei</i>           | Palau-Inseln  | +                     | +                 | +                    | Theopalauamid <b>62</b> , Swinholid A <b>9</b> |
| R-1385       | <i>Corallistes</i> sp.       | Neukaledonien | –                     | –                 | –                    | Corallistine (vgl. <b>28</b> )                 |
| R-1401       | <i>Corallistes</i> sp.       | Neukaledonien | –                     | –                 | –                    | Pyrrole  |
| R-1407       | <i>Reidisporgia coerulea</i> | Neukaledonien | –                     | –                 | –                    | Reidisporgiolide (vgl. <b>19</b> )             |
| R-1408       | <i>Neosiphonia superstes</i> | Neukaledonien | –                     | –                 | –                    | Sphinxolide (vgl. <b>19</b> )                  |
| R-1466       | <i>Microscleroderma</i> sp.  | Neukaledonien | +                     | +                 | +                    | Microsclerodermine ( <b>37</b> , <b>38</b> )   |
| L1978-279    | <i>T. conica</i>             | Rotes Meer    | –                     | –                 | –                    | Sterine (vgl. <b>1</b> )                       |
| L1979-541    | <i>T. swinhoei</i>           | Rotes Meer    | +                     | ?                 | +                    | Swinholid A <b>9</b>                           |

Tabelle 3.  $\beta$ -Aminosäuren, die in Peptiden aus Steinschwämmen und Cyanophyten gefunden wurden.

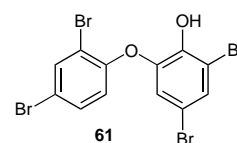
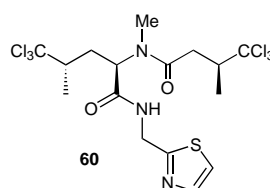
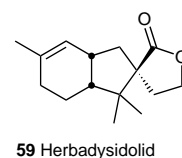
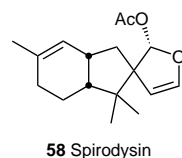
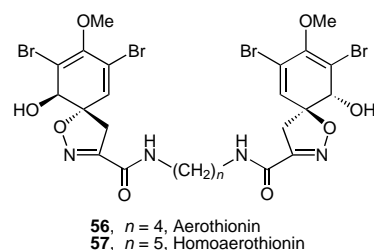
| $\beta$ -Aminosäure   | Quelle   |
|---|--|
|    | Theonegramid <b>51</b><br><i>Theonella swinhoei</i><br>Schwamm <sup>[101]</sup>            |
|    | Microsclerodermine <b>37, 38</b><br><i>Microscleroderma</i> sp.<br>Schwamm <sup>[74]</sup> |
|    | Motuporin <b>35</b><br><i>Theonella swinhoei</i><br>Schwamm <sup>[71]</sup>                |
|    | Scytonemin A<br><i>Scytonema</i> sp. U-3-3<br>Cyanobakterium <sup>[116]</sup>              |
|   | Nodularin<br><i>Nodularia spumigena</i><br>Cyanobakterium <sup>[72]</sup>                  |
|  | Calophycin<br><i>Calothrix fusca</i> EU-10-1<br>Cyanobakterium <sup>[117]</sup>            |

Adda = (2S,3S,8S,9S)-3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-diensäure.

## 6. Zelluläre Lokalisation von Swinholid A und cyclischen Peptiden aus *Theonella swinhoei*

### 6.1. Hintergrund

Es gibt mehrere Methoden, mit denen man die zelluläre Lokalisation von Metaboliten in Schwämmen untersuchen kann. 1983 berichteten wir, daß die bromierten Metaboliten Aerothionin **56** und Homoaerothionin **57** aus *Aplysina fistularis* in als Sphaerulocyten bezeichneten Schwammzellen lokalisiert sind und nicht in Bakterien: Wir bestimmten mit einer energiedispersiven Röntgenanalyse in Kombination mit einem Transmissionselektronenmikroskop die intrazelluläre Lokalisation von Brom.<sup>[118]</sup> Man könnte auch selektive Färbemethoden benutzen, um unter dem Lichtmikroskop chemische Verbindungen in Zellen nachzuweisen. Diese Methoden beruhen auf dem direkten Nachweis einer spezifischen chemischen Verbindungsklasse, lassen aber nicht die Identifizierung einer individuellen Verbindung zu.

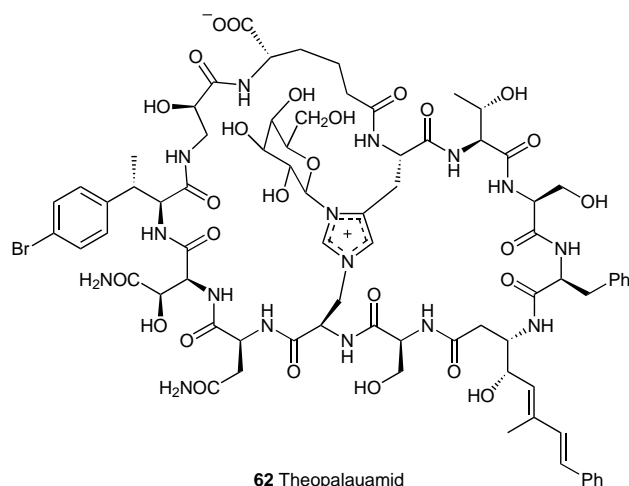


Ein wichtiger Durchbruch bei der Untersuchung der zellulären Lokalisation von Metaboliten war unsere Entdeckung, daß diese in guten Ausbeuten auch aus Zellen isoliert werden konnten, die zuvor mit Formaldehyd oder Glutaraldehyd fixiert worden waren. So konnten wir *Dysidea herbacea* in unterschiedliche Zelltypen auftrennen, indem wir den Schwamm in Einzelzellen zerteilten, diese fixierten und die Cyanobakterien von allen anderen Zelltypen abtrennten. Dazu benutzten wir ein Zellsortiergerät, das Zellen erkennt und aussortiert, die fluoreszierende Photosynthesepigmente enthalten. So erhielten wir eine Fraktion fluoreszierender Zellen, die zu mehr als 99% aus filamentösen Cyanobakterien bestand, soweit sich dies im Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskop beurteilen ließ. Nachdem die Zellen mehrfach gewaschen worden waren, um alle Spuren des Fixierungsmittels zu entfernen, wurden sie in Methanol aufgeschlossen und der Inhalt mit GC-MS oder NMR-Spektroskopie analysiert. In einer Probe von *D. herbacea* vom Großen Barriereriff, die einen großen Anteil an Cyanobakterien enthielt, fanden sich die Sesquiterpene Spirodysin **58** und Herbadysidolid **59** in der Zellfraktion, die hauptsächlich Schwammzellen und einige nichtphototrophe Bakterien enthielt, während das chlorierte Aminosäurederivat 13-Desmethyldysidysidenin **60** aus dem filamentösen Cyanobakterium *Oscillatoria spongeliae* extrahiert wurde.<sup>[119]</sup> Eine Probe von *D. herbacea* von den Palau-Inseln enthielt den bromierten Diphenylether **61** in den Cyanobakterienzellen und nicht in den Schwammzellen. Die mikroskopische Untersuchung von Schnitten des Schwamms im polarisierten Licht ergab jedoch, daß sich Kristalle des bromierten Diphenylethers **61** knapp unter der Oberfläche des Schwamms befanden. Wahrscheinlich wurde der bromierte Metabolit also aktiv von den Cyanobakterien ausgeschieden und kristallisierte, als er mit dem Meerwasser in Berührung kam.<sup>[120]</sup>

Um die Lokalisation der Metaboliten in *T. swinhoei* zu bestimmen, konnten wir die oben beschriebenen Methoden jedoch nicht anwenden, denn es gab keine spezifischen Reagentien, um Swinholid A oder cyclische Peptide anzu-färben, und wir konnten die Zellen nicht anhand der Fluoreszenz im Zellsortiergerät trennen. Daher begannen wir, mit Methoden zur Trennung der Zellen nach ihrer Dichte zu experimentieren.

## 6.2. Metaboliten einer Probe von *T. swinhoei* von den Palau-Inseln

Ein wichtiger Schritt bei jeder Lokalisierung von Metaboliten in einem Schwamm besteht darin, die spektralen Charakteristika der Schwammmetabolite zu identifizieren und aufzuzeichnen. Drei Proben von *T. swinhoei* wurden vor den Palau-Inseln, Westliche Karolinen, gesammelt und sofort einer Zelltrennung unterworfen. Repräsentative Proben der Schwämme wurden für die chemischen Untersuchungen eingefroren; diese ergaben, daß die chemische Zusammensetzung der drei Schwämme identisch war. Die gefriergetrockneten Zellen wurden wie beschrieben extrahiert (siehe Abschnitt 4). Die Hexan- und Dichlormethan-Extrakte enthielten große Mengen an Theonellasterin **2**, während der Ethylacetat-Extrakt nennenswerte Anteile an Swinholid A **9** enthielt. Im Wasser/Acetonitril-Extrakt befand sich eine Verbindung, die anfangs wie ein einheitliches cyclisches Peptid aussah, die aber dann in zwei ineinander überführbare cyclische Peptide aufgetrennt wurde.<sup>[122]</sup> Die Hauptkomponente Theopalauamid **62**, ein bicyclisches Peptid, das früher



P951 genannt wurde,<sup>[121]</sup> ist eng mit Theonegramid **51** verwandt, das früher aus einer Probe von *T. swinhoei* von der Insel Negros, Philippinen,<sup>[101]</sup> isoliert worden war, und unterscheidet sich von dieser Verbindung nur dadurch, daß der Zucker D-Arabinose durch D-Galactose ersetzt ist.<sup>[122]</sup> Den neuen Zucker konnten wir problemlos identifizieren, doch der Nachweis, daß die Peptidstruktur in beiden Verbindungen identisch war, war kompliziert und zeitraubend.

Details der Strukturaufklärung von Theopalauamid **62** und seinem Umwandlungsisomer sind kürzlich veröffentlicht worden.<sup>[122]</sup>

## 6.3. Untersuchung der zellulären Lokalisation

Rückblickend erwies sich als größter Vorteil des Steinschwamms *Theonella swinhoei*, daß die Schicht verschmolzener Desmen, die Ectosom und Endosom voneinander trennt, es ermöglicht, einfach und sauber das echte einzellige Cyanobakterium *Aphanocapsa feldmanni*, das nur im Ectosom vorkommt, von dem filamentösen Bakterium zu trennen, das man nur im Endosom findet. Schwammzellen und einzelne Eubakterien fanden wir im Ectosom und im Endosom. Nachdem wir die Schwammproben grob auseinander geschnitten hatten, um ectosomales und endosomales Gewebe zu trennen, wurde jede Gewebeprobe mit einem Omega-1000-Entsafter zerkleinert.<sup>[123]</sup> Die auf dem Filter angesammelten Gewebeteile wurden in einer Lösung aus 1.25 % Glutardialdehyd und 1.9 % Formaldehyd in filtriertem (0.2 µm) Meerwasser, pH 8.15, suspendiert. Nach Filtrieren durch ein 42-µm-Nylonfilter wurde die Zellsuspension durch fraktionierende Zentrifugation getrennt, wobei einzelne Zellpellets (Volumen je 1 mL) aus Schwammzellen, filamentösen Bakterien, einzelligen Bakterien sowie einzelligen Cyanobakterien aus dem Ectosom erhalten wurden (siehe großes Bild am Anfang des Aufsatzes). Jede Zellfraktion, von der jeweils drei Proben präpariert worden waren, wurde dreimal durch Resuspendieren in sterilem filtriertem Seewasser und anschließendes Zentrifugieren gewaschen.<sup>[121]</sup>

Die Zellpellets wurden elektronenmikroskopisch und mit zwei chemischen Analysenmethoden untersucht. Für die chemischen Analysen wurden die Pellets mit Methanol extrahiert, die Extrakte unter Stickstoff getrocknet und in CDCl<sub>3</sub> gelöst. Die Extrakte aus den Schwammzellen und den Cyanobakterien waren vollständig in CDCl<sub>3</sub> löslich, während die Extrakte aus den filamentösen Bakterien und den einzelligen Bakterien sich nur unvollständig lösten, so daß das unlösliche Material aus diesen Fraktionen unter Stickstoff getrocknet und in [D<sub>6</sub>]DMSO gelöst werden mußte. Jede Fraktion wurde mit <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie an einem 500-MHz-Gerät untersucht; 512 Scans waren notwendig, um zufriedenstellende Spektren zu erhalten. Die Spektren wurden mit Spektren von Referenzlösungen (je 1 mM) von Swinholid A **9** und Theopalauamid **62** verglichen, die auf demselben Gerät aus 128 Scans erhalten worden waren. Aus den Spektren (Abb. 3) ging klar hervor, daß sich Swinholid A **9** nur in der leichtesten Fraktion, die ein Gemisch aus heterotrophen einzelligen Bakterien enthielt, und Theopalauamid **62** in der Fraktion mit den filamentösen Bakterien befand. Diese Ergebnisse wurden ebenso durch HPLC-Analysen (Abb. 4) bestätigt wie der Befund, daß die Schwammzell-Fractionen und die ectosomalen Fractionen von *A. feldmanni* keine bioaktiven Metaboliten enthielten. Die Dreifachbestimmungen ergaben bei allen Zelltypen identische Ergebnisse und erhöhten so die Aussagekraft der experimentellen Daten. Aufgrund der halbquantitativen Durchführung der Untersuchungen können wir vorhersagen,

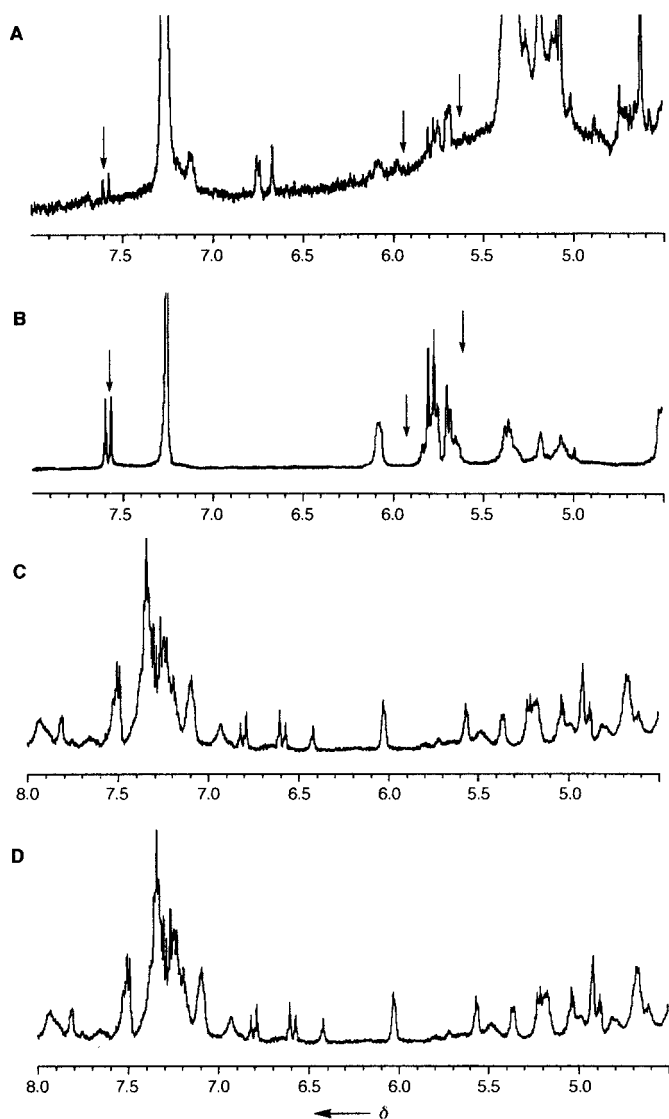


Abb. 3.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von einem Extrakt gereinigter einzelliger Eubakterien (A), einer Referenzprobe von Swinholid A **9** (B), einem Extrakt gereinigter filamentöser nichtphototropher Bakterien (C) und einer Referenzprobe von Theopalauamid **62** (D). Die Spektren wurden mit einem 500-MHz-Spektrometer (Varian Unity) aufgenommen. Die Spektren der Zellextrakte wurden aus 512 Scans erhalten, die Spektren der Referenzproben aus 128 Scans.

daß die Mengen an biologisch aktiven Substanzen, die von den Symbionten gebildet werden, nicht vernachlässigbar sind.

## 7. Schlußfolgerungen

Obwohl wir gezeigt haben, daß die bioaktiven Metaboliten Swinholid A **9** und Theopalauamid **62** in symbiontischen einzelligen und filamentösen Bakterien lokalisiert sind und daß sie vermutlich auch von den Symbionten produziert werden, warnen wir vor einer verallgemeinernden Aussage über die biosynthetische Herkunft anderer Metaboliten, bis weitere Untersuchungen einen Trend aufzeigen. Die statistische Korrelation zwischen dem Vorkommen cyclischer Peptide, die aromatische  $\beta$ -Aminosäuren enthalten, und dem

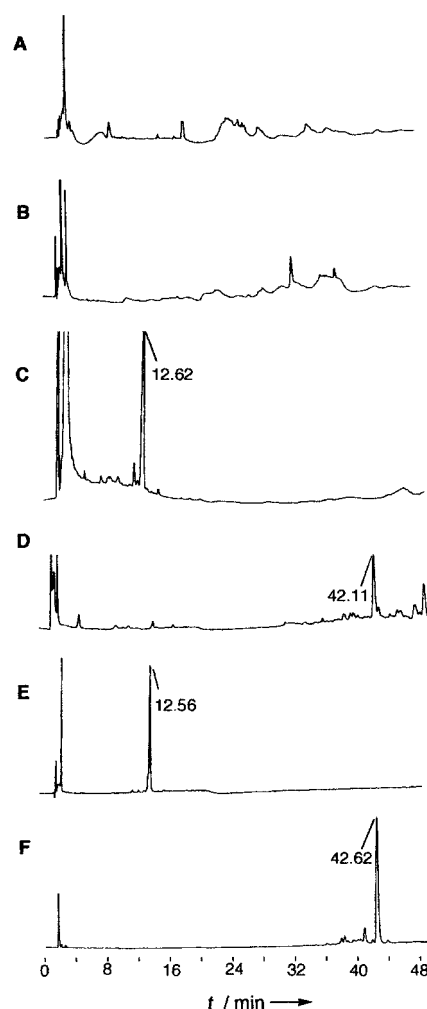


Abb. 4. HPLC-Elutionsdiagramme der Extrakte von gereinigten Schwammzellen (A), gereinigten einzelligen Cyanobakterien (B), gereinigten filamentösen nichtphototrophen Bakterien (C) und von der gemischten Population heterotropher Eubakterien (D). Außerdem sind die Elutionsdiagramme der Referenzproben von Theopalauamid **62** (E) und Swinholid A **9** (F) gezeigt. Die gleichzeitige Injektion von Swinholid A und dem Extrakt aus einzelligen Eubakterien sowie von Theopalauamid und dem Extrakt aus filamentösen Bakterien ergab jeweils nur ein einziges Signal bei der Elution von der HPLC-Säule (Spektren nicht abgebildet).

Vorkommen filamentöser Bakterien erscheint hoch genug, um einen tatsächlichen Zusammenhang nahezulegen, aber dies muß noch bestätigt werden. Wir glauben auch nicht, daß alle Peptide aus Steinschwämmen von filamentösen Bakterien gebildet werden, denn in einigen Schwämmen, die Peptide ohne aromatische  $\beta$ -Aminosäuren bilden, konnten wir keine Filamente finden.

Es gehört zu den kuriosen Entdeckungen, die wir mit dem Elektronenmikroskop gemacht haben, daß die filamentösen Bakterien, die man früher für Cyanobakterien gehalten hatte, in Wirklichkeit keine Photosynthese betreiben und nicht die notwendigen zellulären Strukturen für die Photosynthese (Thylakoide) aufweisen. Wir haben die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen der filamentösen Bakterien aus *T. swinhoei* von den Palau-Inseln mit Aufnahmen von der Ultrastruktur anderer filamentöser nichtphototropher Prokaryonten verglichen und haben eine

starke Ähnlichkeit mit filamentösen gleitenden Bakterien aus der Familie der Beggiatoaceae festgestellt. Wir haben allerdings keine sicheren Hinweise darauf, daß die filamentösen Symbionten wirklich Beggiatoaceae sind; vielmehr wird ihre taxonomische Zuordnung erst nach phylogenetischen Untersuchungen mit molekularbiologischen Methoden möglich sein. Bislang wurde zwar noch nichts über die Chemie von *Beggiatoa* veröffentlicht, doch interessanterweise wurden bei Untersuchungen an anderen entfernt verwandten nichtphototrophen gleitenden Bakterien (Myxobakterien) einige Metaboliten isoliert, die denen aus Steinschwämmen ähneln.<sup>[124]</sup>

Die beschriebenen Forschungsarbeiten stellen vielleicht die Anwendbarkeit der Chemotaxonomie auf Schwämme in Frage. Prinzipiell kann man chemotaxonomischen Beziehungen zwischen Schwämmen nicht trauen, wenn die Metaboliten nicht von den Schwämmen gebildet werden. Dennoch ist es möglich, daß die Assoziationen zwischen symbiontischen Bakterien und Wirtsschwämmen so stabil und phylogenetisch so alt sind, daß die Metaboliten, die von den Symbionten produziert werden, tatsächlich auch für den Wirtsschwamm repräsentativ sind. In diesem Fall können wir jeden Schwamm, der einzigartige Symbionten beherbergt, chemotaxonomisch als Einzelorganismus betrachten. Die Evolution der Sekundärmetaboliten bleibt Gegenstand von Spekulationen, weil die einzelnen Verbindungen keine Fossilien hinterlassen. Nach einer einfachen Anwendung von Darwins Prinzipien sollten die Sekundärmetaboliten sich aus den Primärmetaboliten durch eine Reihe zufälliger Mutationen entwickelt haben, die dazu dienten, schrittweise neue Metaboliten herzustellen, die die Fitness (die Überlebensfähigkeit) des Produzenten steigerten.<sup>[125]</sup> Wenn die Symbionten sich entwickelt haben, um Metaboliten zu produzieren, die die Überlebensfähigkeit des Wirts steigern, und diese Assoziation stabil ist, dann kann man annehmen, daß sich auch der Wirt dementsprechend entwickelt hat. Der Wert der Chemotaxonomie für Steinschwämme hängt also von der Stabilität der Wirt-Symbiont-Beziehung ab. Von daher erscheint die Isolierung von Swinholid A **9** aus einer *Ircinia*-Art von den Philippinen und das Fehlen der Swinholide in allen bislang untersuchten Proben von *T. swinhoei* von den Philippinen problematisch und läßt auf eine weniger stabile oder weniger weit entwickelte symbiontische Assoziation zwischen dem produzierenden Bakterium und *T. swinhoei* schließen. Andererseits spricht der Befund, daß alle Proben von *T. swinhoei* aus dem Indischen und dem Pazifischen Ozean, die wir untersucht haben, sehr ähnliche bicyclische Peptide (z. B. Theopalauamid **62** und Theonegramid **51**) sowie große Populationen von filamentösen Bakterien enthielten, für stabile Wirt-Symbiont-Beziehungen (siehe Tabelle 2), obgleich dazu noch weitere Untersuchungen notwendig sind.

Unsere Forschungen haben ebenso viele Fragen aufgeworfen wie sie beantwortet haben. Wir kennen die Identität des filamentösen Bakteriums nicht, in dem Theopalauamid **62** lokalisiert wurde. Bei Swinholid A **9**, das einer Zellfraktion zugeordnet wurde, die ein Gemisch einzelliger Bakterien enthielt, ist die Situation noch undurchsichtiger. Die offensichtliche Lösung dieses Problems besteht darin, die Bakterien in Reinkultur zu züchten und zu bestimmen, welcher Stamm Swinholid A **9** enthält. Wir wissen von mindestens

einem erfolglosen Versuch, symbiontische Bakterien, die Swinholid A produzieren, aus *T. swinhoei* zu kultivieren. Wir sind allerdings nicht wirklich überrascht, daß der gewünschte Symbiont nicht kultiviert werden konnte. Es erscheint ganz logisch, daß ein Mikroorganismus, der an ein Leben als Symbiont angepaßt ist, nicht bereitwillig Routine-Kulturbedingungen akzeptiert.

Die gute Nachricht für den Chemiker, der sich mit marinen Naturstoffen befaßt, ist die, daß es wahrscheinlich viele weitere Populationen von Steinschwämmen gibt, die neue biologisch aktive Metaboliten enthalten. Jede Probe muß sorgfältig gesammelt und die darin enthaltenen Verbindungen gereinigt werden, denn man kann nicht davon ausgehen, daß jede Probe einer bestimmten Art von Steinschwämmen exakt dasselbe Sekundärmetaboliten-Muster aufweist. Wir prophezeien, daß Steinschwämme in vorderster Front bei naturstoffchemischen Untersuchungen bleiben werden und daß sie einige der besten experimentellen Modellsysteme für weitere Studien über die Symbiose in Schwämmen liefern werden.

Eingegangen am 3. Juni 1997 [A 232]  
Übersetzt von Dr. Burkard Neuß, Jülich

- [1] C. A. Bewley, Dissertation, University of California, San Diego, **1995**.
- [2] P. R. Bergquist, *Sponges*, University of California Press, Berkeley, CA, **1978**, S. 140.
- [3] M. Kelly-Borges, S. A. Pomponi, *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1994**, *3*, 87–103.
- [4] E. Kho, D. K. Imagawa, M. Rohmer, Y. Kashman, C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 1836–1839.
- [5] B. V. Crist, X. Li, P. R. Bergquist, C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4472–4479.
- [6] F. J. Schmitz in *Marine Natural Products: Chemical and Biological Perspectives*, Vol. 1 (Hrsg.: P. J. Scheuer), Academic Press, New York, **1978**, S. 241–297.
- [7] Y. Shimizu, M. Alam, A. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1059.
- [8] M. Kobayashi, K. Kawazoe, T. Katori, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 1773–1778.
- [9] Y. Inouye, Y. Sugo, T. Kusumi, N. Fusetani, *Chem. Lett.* **1994**, 419–420.
- [10] Y. Sugo, Y. Inouye, N. Nakayama, *Steroids* **1995**, *60*, 738–742.
- [11] M. V. D'Auria, L. Gomez Paloma, L. Minale, R. Riccio, C. Debitus, C. Lévi, *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 311–320.
- [12] V. Costantino, E. Fattorusso, A. Mangoni, M. Akinin, E. M. Gaydou, *Steroids* **1994**, *59*, 181–184.
- [13] S. Carmely, Y. Kashman, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 511–514.
- [14] R. Sakai, T. Higa, Y. Kashman, *Chem. Lett.* **1986**, 1499–1502.
- [15] Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto, R. Sakai, T. Higa, Y. Kashman, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6225–6228.
- [16] Der Name Misakinolid A scheint zugunsten der Bezeichnung Bis-theonellid A aufgegeben worden zu sein.
- [17] I. Kitagawa, M. Kobayashi, T. Katori, M. Yamashita, J. Tanaka, M. Doi, T. Ishida, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3710–3712.
- [18] M. Kobayashi, J. Tanaka, T. Katori, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 2960–2966.
- [19] S. Tsukamoto, M. Ishibashi, T. Sasaki, J. Kobayashi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 3185–3188; **1993**, 1273 (Erratum).
- [20] J. Kobayashi, S. Tsukamoto, A. Tanabe, T. Sasaki, M. Ishibashi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2379–2383.
- [21] J. S. Todd, K. A. Alvi, P. Crews, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 441–445.
- [22] M. Kobayashi, K. Kawazoe, T. Okamoto, T. Sasaki, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 19–26.
- [23] M. Doi, T. Ishida, M. Kobayashi, I. Kitagawa, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3629–3632.
- [24] I. Paterson, K.-S. Yeung, R. A. Ward, J. G. Cumming, J. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 9391–9392; I. Paterson, K.-S. Yeung, R. A.



- Ward, J. D. Smith, J. G. Cumming, S. Lamboley, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9467–9486; I. Paterson, J. G. Cumming, R. A. Ward, S. Lamboley, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9393–9412; I. Paterson, J. D. Smith, R. A. Ward, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9413–9436; I. Paterson, R. A. Ward, J. D. Smith, J. G. Cumming, K.-S. Yeung, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 9437–9466.
- [25] K. C. Nicolau, K. Ajito, A. P. Patron, H. Khatuya, P. K. Richter, P. Beritano, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3059–3060.
- [26] S. P. Gunasekera, M. Gunasekera, R. E. Longley, G. K. Schulte, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4912.
- [27] E. ter Haar, R. J. Kowalski, E. Hamel, C. M. Lin, R. E. Longley, S. P. Gunasekera, H. S. Rosenkranz, B. W. Day, *Biochemistry* **1996**, *35*, 243–250.
- [28] J. B. Nerenberg, D. T. Hung, P. K. Somers, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12621–12622.
- [29] A. B. Smith III, Y. Qiu, D. R. Jones, K. Kobayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12011–12012.
- [30] Isolierung: Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto, S. Fujita, T. Furuya, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2780–2781; Synthese: D. A. Evans, J. R. Gage, J. L. Leighton, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9434–9453; N. Tanimoto, S. W. Gerritz, A. Sawabe, T. Noda, S. A. Filla, S. Masamune, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 674–677; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 673–675.
- [31] Y. Kato, N. Fusetani, S. Matsunaga, K. Hashimoto, K. Koseki, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3930–3932.
- [32] S. Matsunaga, H. Fujiki, D. Sukata, N. Fusetani, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2999–3006.
- [33] S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5605–5606.
- [34] A. Okada, K. Watanabe, K. Umeda, M. Miyakado, *Agr. Biol. Chem.* **1991**, *55*, 2765–2771.
- [35] S. P. Gunasekera, M. Gunasekera, P. McCarthy, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4830.
- [36] S. Sakemi, T. Ichiba, S. Kohmoto, G. Saucy, T. Higa, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 4851–4853.
- [37] A. Furusaki, T. Watanabe, T. Matsumoto, M. Yanagiya, *Tetrahedron Lett.* **1968**, 6301–6304.
- [38] C. Y. Hong, Y. Kishi, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9693–9694.
- [39] S. Matsunaga, N. Fusetani, Y. Nakao, *Tetrahedron* **1992**, *48*, 8369–8376.
- [40] J. Kobayashi, F. Itagaki, H. Shigemori, T. Sasaki, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 976–981.
- [41] N. Fusetani, T. Sugawara, S. Matsunaga, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 3828–3832.
- [42] J. Kobayashi, K. Kondo, M. Ishibashi, M. R. Walchli, T. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6661–6665.
- [43] K. Kondo, M. Ishibashi, J. Kobayashi, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 8355–8362.
- [44] M. V. D'Auria, C. Debitus, L. G. Paloma, L. Minale, A. Zampella, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6658–6663.
- [45] M. V. D'Auria, L. G. Paloma, L. Minale, A. Zampella, C. Debitus, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1595–1597.
- [46] M. V. D'Auria, L. G. Paloma, L. Minale, A. Zampella, J.-F. Verbist, C. Roussakis, C. Debitus, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 8657–8664; **1993**, *49*, 10439 (Erratum).
- [47] G. Guella, I. Mancini, G. Chiasera, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 237–246.
- [48] M. V. D'Auria, L. G. Paloma, L. Minale, A. Zampella, J.-F. Verbist, C. Roussakis, C. Debitus, J. Patissou *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4829–4834.
- [49] S. Matsunaga, N. Fusetani, Y. Kato, H. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9690–9692.
- [50] A. Zampella, M. V. D'Auria, L. Minale, C. Debitus, C. Roussakis, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 11085–11088.
- [51] A. Zampella, M. V. D'Auria, L. Minale, C. Debitus, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 3243–3248.
- [52] Isolierung: H. Nakamura, J. Kobayashi, Y. Ohizumi, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5401–5404; Synthese: Y. Ichikawa, *Synlett* **1991**, 715–716; Y. Ichikawa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1992**, 2135–2139.
- [53] I. Kitagawa, N. Yoshioka, C. Kamba, M. Yoshikawa, Y. Hamamoto, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 928–931.
- [54] Isolierung: J. Kobayashi, T. Murayama, Y. Ohizumi, T. Sasaki, T. Ohta, S. Nozoe, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 4833–4836; Synthese: A. V. R. Rao, G. R. Reddy, B. V. Rao, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4545–4547.
- [55] J. Kobayashi, K. Kondo, H. Shigemori, H. Ishibashi, T. Sasaki, Y. Mikami, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 6680–6682.
- [56] G. Guella, I. Mancini, D. Duhet, B. Richer de Forges, F. Pietra, *Z. Naturforsch. C Biosci.* **1989**, *44*, 914–916.
- [57] H. H. Sun, S. Sakemi, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4307–4308.
- [58] M. D'Ambrosio, A. Guerriero, C. Debitus, O. Ribes, B. Richer de Forges, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta* **1989**, *72*, 1451–1454.
- [59] M. D'Ambrosio, A. Guerriero, C. Debitus, O. Ribes, F. Pietra, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1489–1496.
- [60] A. Guerriero, M. D'Ambrosio, F. Pietra, C. Debitus, O. Ribes, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1962–1970.
- [61] C. Debitus, M. Cesario, J. Guilhem, C. Pascard, M. Païs, *Tetrahedron Lett.* **1989**, *30*, 1535–1538.
- [62] T. Ichiba, Y. Nakao, P. J. Scheuer, N. U. Sata, M. Kelly-Borges, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3977–3980.
- [63] N. Fusetani, S. Matsunaga, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1793–1806.
- [64] Isolierung: N. Fusetani, Y. Nakao, S. Matsunaga, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7073–7074; Synthese: K. Hayashi, Y. Hamada, T. Shioiri, *ibid.* **1992**, *33*, 5075–5076.
- [65] T. Hamada, T. Sugawara, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 609–612.
- [66] N. Fusetani, S. Matsunaga, H. Matsumoto, Y. Takebayashi, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 7053–7074.
- [67] M. Hagihara, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 6570–6571.
- [68] A. Y. Lee, M. Hagihara, R. Karmacharya, M. W. Albers, S. L. Schreiber, J. Clardy, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12619–12620; B. E. Maryanoff, X. Qiu, K. P. Padmanabhan, A. Tulinsky, H. R. Almond, P. A. Gordon, M. N. Greco, J. A. Kauffman, K. C. Nicolau, A. Liu, P. H. Brungs, N. Fusetani, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8048–8052.
- [69] P. Wipf, H. Kim, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 5592–5594; J. G. Deng, Y. Hamada, T. Shioiri, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1811–1813; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1729–1731; B. E. Maryanoff, M. N. Greco, H.-C. Zhang, P. Andrade-Gordon, J. A. Kauffman, K. C. Nicolau, A. Liu, P. H. Brungs, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1225–1239; H. M. M. Bastiaans, J. L. van der Baan, H. C. J. Ottenheim, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 5963–5966; J. Deng, Y. Hamada, T. Shioiri, *ibid.* **1996**, *37*, 2261–2264.
- [70] Y. Nakao, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 1115–1122.
- [71] E. D. de Silva, D. E. Williams, R. J. Andersen, H. Klux, C. F. B. Holmes, T. M. Allen, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1561–1564.
- [72] K. L. Rinehart, K. Harada, M. Namikoshi, C. Chen, C. A. Harvis, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8557–8558.
- [73] N. K. Gulavita, S. A. Pomponi, A. E. Wright, D. Yarwood, M. A. Sills, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 6815–6818.
- [74] C. A. Bewley, C. Debitus, D. J. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7631–7636.
- [75] J. Kobayashi, M. Sato, M. Ishibashi, H. Shigemori, T. Nakamura, Y. Ohizumi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 2609–2611.
- [76] J. Kobayashi, M. Sato, T. Murayama, M. Ishibashi, M. R. Walchi, M. Kanai, J. Shoji, Y. Ohizumi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1050–1052; M. Ishibashi, Y. Li, M. Sato, J. Kobayashi, *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *4*, 293–296; siehe auch: U. Schmidt, S. Weinbrenner, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1432–1433; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1336–1338.
- [77] J. Kobayashi, F. Itagaki, H. Shigemori, M. Ishibashi, K. Takehashi, M. Ogura, S. Nagasawa, T. Nakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7812–7813.
- [78] F. Itagaki, H. Shigemori, M. Ishibashi, T. Nakamura, T. Sasaki, J. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 5540–5542.
- [79] J. Kobayashi, F. Itagaki, H. Shigemori, T. Takao, Y. Shimonishi, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 2525–2532.
- [80] N. Fusetani, T. Sugawara, S. Matsunaga, H. Hirota, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 7811–7812.
- [81] S. P. Gunasekera, S. A. Pomponi, P. J. McCarthy, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 79–83.
- [82] S. Matsunaga, N. Fusetani, S. Konosu, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 5165–5168.
- [83] S. Matsunaga, N. Fusetani, S. Konosu, *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 855–856.

- [84] S. Matsunaga, N. Fusetani, S. Konosu, *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 236–241.
- [85] G. Ryu, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 8251–8254.
- [86] G. Ryu, S. Matsunaga, N. Fusetani, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 13409–13416.
- [87] J. Yatsunami, H. Fujiki, A. Komori, M. Suganuma, S. Nishiwaki, S. Okabe, R. Nishiwaka, T. Ohta, S. Matsunaga, N. Fusetani, T. Sugimura, *Proceedings of the 1st International Congress on Vitamins and Biofactors in Life Sciences, J. Nutritional Sci. Vitaminol.* **1992**, 333 (Sonderband).
- [88] N. Fusetani, *New J. Chem.* **1990**, *14*, 721–728.
- [89] H. Tada, T. Tozoy, Y. Terui, F. Hayashi, *Chem. Lett.* **1992**, 431–434.
- [90] I. Kitagawa, M. Kobayashi, N. K. Lee, H. Shibuya, Y. Kawata, F. Sakiyama, *Chem. Pharm. Bull.* **1986**, *34*, 2664–2667.
- [91] H. Nakamura, J. Kobayashi, Y. Nakamura, Y. Ohizumi, T. Kondo, Y. Hirata, *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 4319–4322.
- [92] I. Kitagawa, N. K. Lee, M. Kobayashi, H. Shibuya, *Chem. Pharm. Bull.* **1987**, *35*, 2129–2132.
- [93] I. Kitagawa, N. K. Lee, M. Kobayashi, H. Shibuya, *Tetrahedron* **1991**, *47*, 2169–2180.
- [94] M. Kobayashi, N. K. Lee, H. Shibuya, T. Momose, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 1177–1184.
- [95] M. Kobayashi, K. Kanzaki, S. Katayama, K. Ohashi, H. Okada, S. Ikegami, I. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 1410–1415.
- [96] N. K. Gulavita, S. P. Gunasekera, S. A. Pomponi, E. V. Robinson, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1767–1772.
- [97] A. Zampella, M. V. D'Auria, L. G. Paloma, A. Casapullo, L. Minale, C. Debitus, Y. Henin, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6202–6209.
- [98] M. V. D'Auria, A. Zampella, L. G. Paloma, L. Minale, C. Debitus, C. Roussakis, V. Le Bert, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 9589–9596.
- [99] M. V. D'Auria, L. G. Paloma, L. Minale, A. Zampella, C. Debitus, J. Perez, *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 121–123.
- [100] S. Matsunaga, N. Fusetani, K. Hashimoto, M. Walchli, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2585–2588.
- [101] C. A. Bewley, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 4849–4852; **1995**, *60*, 2644 (Erratum).
- [102] S. Matsunaga, N. Fusetani, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1177–1181.
- [103] C. A. Bewley, H. He, D. H. Williams, D. J. Faulkner, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4314–4321.
- [104] M. Ishibashi, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, C. Xu, J. Clardy, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 5300–5306.
- [105] F. Sasse, H. Steinmetz, G. Höfle, H. Reichenbach, *J. Antibiotics* **1993**, *46*, 741–748.
- [106] M. R. Kernan, T. F. Molinski, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 5014–5020.
- [107] K. E. Kassühlke, B. C. M. Potts, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3747–3749.
- [108] J. Kobayashi, T. Murayama, S. Kosuge, F. Kanda, M. Ishibashi, Y. Ohizumi, T. Ohta, S. Nozoe, J. Sasa, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1990**, 3301–3303.
- [109] K. L. Rinehart, K. Harada, M. Namikoshi, M. H. G. Munro, J. W. Blunt, P. E. Mulligan, V. R. Beasley, A. M. Dahlem, W. W. Carmichael, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 8557–8558.
- [110] D. E. Williams, M. Craig, C. F. B. Holmes, R. J. Andersen, *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 570–575.
- [111] R. Jansen, B. Kunze, H. Reichenbach, G. Höfle, *Liebigs Ann.* **1996**, 285–290.
- [112] W. R. Chan, W. F. Tinto, P. S. Marchand, L. J. Torado, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 3091–3093.
- [113] H. Shigemori, M.-A. Bae, K. Yazawa, T. Sasaki, J. Kobayashi, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4317–4320.
- [114] S. Ito, Y. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1977**, 1813–1820.
- [115] Siehe z. B.: J. Kobayashi, M. Ishibashi, *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 1753–1769; Lit. [62].
- [116] G. L. Helms, R. E. Moore, W. P. Niemczura, G. M. L. Patterson, K. B. Tomer, M. L. Gross, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 1298–1307.
- [117] S.-S. Moon, J. L. Chen, R. E. Moore, G. M. L. Patterson, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 1097–1103.
- [118] J. E. Thompson, K. D. Barrow, D. J. Faulkner, *Acta Zoologica* **1983**, *64*, 199–210.
- [119] M. D. Unson, D. J. Faulkner, *Experientia* **1993**, *49*, 349–353.
- [120] M. D. Unson, N. D. Holland, D. J. Faulkner, *Mar. Biol.* **1994**, *119*, 1–11.
- [121] C. A. Bewley, N. D. Holland, D. J. Faulkner, *Experientia* **1996**, *52*, 716–722.
- [122] E. W. Schmidt, C. A. Bewley, D. J. Faulkner, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1254–1258.
- [123] Eines der Probleme bei der Feldforschung ist, daß man den Großteil der Laborausrüstung nicht mitnehmen kann. Der Entsafter, der aus der Küche von Larry Sharron ausgeliehen war und später durch ein anderes Gerät ersetzt wurde, erwies sich als hervorragender Ersatz für ausgefeiltere Laborausrüstung.
- [124] H. Reichenbach, G. Höfle, *Biotech. Adv.* **1993**, *11*, 219–277.
- [125] Eine zeitgemäße Definition von Naturstoffen könnte sein: „Überreste einer riesigen kombinatorischen Bibliothek von Verbindungen, die schrittweise aus Primärmetaboliten synthetisiert und durch evolutionären Druck auf die produzierenden Organismen selektiert wurden.“