

**Charakterisierung der enzymatischen Abwehrreaktion in
Schwämmen der Gattung *Aplysina*
und
Isolierung von Bromotyrosinalkaloiden aus
*Aplysina insularis***

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Thomas Fendert
aus Wildflecken**

Würzburg, 2000

Meinen Eltern

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation " Charakterisierung der enzymatischen Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina* und Isolierung von Bromotyrosinalkaloiden aus *Aplysina insularis* " selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem erkläre ich, daß ich bisher noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg, den

Eingereicht am: 20.10.2000

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. P. Proksch

Gutachter: Prof. Dr. H. J. Gross

Tag des Promotionskolloquiums: 31.01.2001

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. P. Proksch für das interessante Thema sowie für seine hilfreichen wissenschaftlichen Anregungen bedanken. Ebenso möchte ich mich für sein ständiges Interesse und seine große Hilfsbereitschaft bedanken. Ferner bedanke ich mich bei ihm für die Möglichkeit eröffnet zu haben an zwei Taucherkursionen nach Indonesien teilnehmen zu dürfen, die mir sicherlich lange als positive in Erinnerung bleiben werden.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. F.-C. Czygan für die stete Diskussionsbereitschaft über fachliche und fachfremde Themen.

Herrn Dr. V. Wray (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig) danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren und für seine freundliche und geduldige Unterstützung bei der Interpretation der Spektren.

Bei Frau Dr. A. Schön (Institut für Biochemie der Universität Würzburg) möchte ich mich für die freundliche Unterstützung bei der Interpretation der Kinetikexperimente bedanken.

Herrn Prof. Dr. W. Kaiser und seinen Mitarbeitern (Botanisches Institut der Universität Würzburg) danke ich für die kleinen und großen Hilfen, die ich im Laufe meiner Dissertation auf freundliche Art und Weise erhalten habe.

Herrn Prof. Dr. G. Bringmann (Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg) möchte ich mich für die Hilfe bei der Formulierung des Nitrilhydratase-Reaktionsmechanismus bedanken.

Herrn Dr. K. Baumann (Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie) möchte ich für die freundschaftliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Für die Identifizierung der bearbeiteten Schwämme möchte ich mich herzlich bei Herrn Dr. R.W.M. van Soest (Instituut voor Systematiek en Populatiebiologie der Universität Amsterdam) bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. Rainer Ebel danke ich für die Einarbeitung in die Enzymatik der *Aplysina*-Schwämme.

Frau Cornelia Beckert und Frau Almut Krüger danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und den Austausch im Bereich der Enzymatik.

Frau Dr. RuAn Edrada danke ich für die nette Hilfe bei der Auswertung der NMR-Spektren.

Herrn Dr. Bambang W. Nugroho danke ich für die selbstlosen und lustigen Indonesischstunden.

Frau Hilde Merkert (Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg) danke ich für die freundliche Einweisung in die Methoden der *in-situ*-Hybridisierung.

Frau Dr. Christiane Löffler danke ich für die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit und für die schöne Zeit bei der Arbeit.

Meinem Studienkollegen Herrn Dr. Helmut Schlager danke ich für seine Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit und für seine tiefe Freundschaft.

Meinen Kollegen und Herrn Dr. Frank Bohnenstengl, Herrn Dr. Peter Schupp, Frau Dr. Claudia Eder sowie Herrn Michael Assmann danke ich für die sehr freundschaftliche und sympathische Zusammenarbeit. Besonders Herrn Dr. Peter Schupp gilt mein tiefer Dank für seine Freundschaft sowohl während der Arbeit als auch bei privaten Unternehmungen.

Meiner Freundin Frau Huberta Eckert danke ich für Ihre liebevolle Unterstützung während der Dissertation und ihre moralische Stütze.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre immerwährende Wärme und Unterstützung während des Studiums und der Dissertation.

1	Einleitung	1
1.1	Marine Naturstoffe	2
1.2	Chemische Abwehrmechanismen in marinen Ökosystemen.....	5
1.3	Wundinduzierte Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung <i>Aplysina</i>	12
1.4	Zielsetzung der Arbeit	16
2.	Material und Methoden.....	17
2.1	Schwammaterial	17
2.1.1	<i>Aplysina insularis</i> (Durchassaing & Michelotti, 1864).....	18
2.1.2	<i>Aplysina cauliformis</i> (Carter, 1882).....	20
2.2	Chemikalien	21
2.3	Geräte.....	22
2.4	Chromatographische Methoden	24
2.4.1	Dünnschichtchromatographie (DC).....	24
2.4.2	Säulenchromatographie.....	25
2.4.2.1	Normalphasen-Chromatographie.....	25
2.4.2.2	Gelpermeations-Chromatographie.....	25
2.4.2.3	Umkehrphasen-Chromatographie.....	25
2.4.3	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC).....	25
2.5	Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus dem marinen Schwamm <i>Aplysina insularis</i>	27
2.5.1	Isolierungsschema der Sekundärmetabolite	27
2.5.1.1	Extraktionsmethode	27
2.5.1.2	Isolierung der Sekundärmetabolite	27
2.5.2	Strukturaufklärung der isolierten Sekundärmetabolite	28
2.5.2.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	28
2.5.2.2	Massenspektroskopie (MS)	29
2.5.2.3	NMR-Spektroskopie	30
2.5.2.4	CD-Spektroskopie	30
2.6	Untersuchungen zur Enzymatik der wundinduzierten Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung <i>Aplysina</i> am Beispiel <i>Aplysina cauliformis</i>	31
2.6.1	Vorbereitung und Aufarbeitung des Schwammmaterials	31
2.6.1.1	Rohextraktgewinnung	31
2.6.1.2	Rohextraktentsalzung	31
2.6.1.3	Proteinbestimmung.....	32
2.6.2	Nachweis der Enzymaktivität	32
2.6.2.1	Isoxazolin-spaltendes Enzym	32

2.6.2.1.1	Herstellung der Substratlösungen	32
2.6.2.1.2	Durchführung des <i>In-vitro</i> -Assays	33
2.6.2.1.3	HPLC-Nachweis der Enzymaktivität	33
2.6.2.2	Nitrilhydratase.....	33
2.6.2.2.1	Herstellung der Substratlösungen	33
2.6.2.2.2	Durchführung des <i>In-vitro</i> -Assays	33
2.6.2.2.3	DC-Nachweis der Enzymaktivität.....	34
2.6.2.2.4	HPLC-Nachweis der Enzymaktivität	34
2.6.3	Auswahl des Schwammmaterials	34
2.6.4	Charakterisierung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms	35
2.6.4.1	Temperatur-Optimum	35
2.6.4.2	pH-Optimum	36
2.6.4.3	Alternative enzymatische Amidumsetzungen.....	37
2.6.4.3.1	Amidase A-6691	37
2.6.4.3.2	Penicillin-Amidase	38
2.6.4.4	Substratspezifität	38
2.6.4.5	Untersuchungen zur Kinetik.....	39
2.6.4.5.1	Umsetzung in deuteriertem Lösungsmittel.....	39
2.6.4.5.2	Kinetische Hemmung	40
2.6.4.5.3	Bestimmung der V_{max} -und K_m -Werte	41
2.6.5	Charakterisierung der Nitrilhydratase.....	43
2.6.5.1	Temperatur-Optimum	43
2.6.5.2	pH-Optimum	43
2.6.5.3	Puffer-Optimierung	44
2.6.5.4	Überprüfung enzymatischer Dienonumsetzungen	45
2.6.5.4.1	Dienon-Umsetzung im Schwammextrakt.....	45
2.6.5.4.2	Dienon-Umsetzung durch die Amidase A-6691	46
2.6.5.5	Beeinflussung der Enzymaktivität.....	46
2.6.5.5.1	Einfluß unterschiedlicher Agenzien auf die Enzymaktivität	46
2.6.5.5.2	Einfluß ausgewählter Kationen nach EDTA-Behandlung	49
2.6.5.6	Stabilitätsuntersuchungen.....	50
2.6.5.7	Substratspezifität	51
2.6.5.8	Interne Sauerstoffumlagerung	52
2.6.5.9	Bestimmung von V_{max} und K_m	52
3.	Ergebnisse und Diskussion.....	55
3.1	Bromotyrosinalkaloide aus <i>Aplysina insularis</i>	55
3.1.1	HPLC-Analyse von Schwammextrakten	55

3.1.2 Isolierte Inhaltsstoffe aus <i>Aplysina insularis</i>	60
3.1.2.1 Strukturaufklärung von 14-oxo-Aerophobin-2	65
3.1.2.2 Strukturaufklärung der übrigen isolierten Schwamminhaltsstoffe.....	69
3.2 Charakterisierung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms	87
3.2.2 pH-Optimum	92
3.2.3 Substratspezifität	93
3.2.4 Alternative enzymatische Amidumsetzungen.....	99
3.2.5 Substratumsetzung in deuteriertem Lösungsmittel	101
3.2.6 Kinetische Hemmung.....	103
3.2.7 Bestimmung von V_{\max} und K_m	103
3.2.8 Proteingehalt im Schwammgewebe.....	105
3.2.9 Diskussion	107
3.3 Charakterisierung der Nitrilhydratase.....	110
3.3.1 Temperatur-Optimum	111
3.3.2 pH-Optimum und Pufferoptimierung	111
3.3.3 Substratspezifität	114
3.3.4 Einfluß unterschiedlicher Agenzien auf die Enzymaktivität	116
3.3.5 Überprüfung alternativer enzymatischer Nitrilumsetzungen	120
3.3.6 Bestimmung von V_{\max} und K_m	120
3.3.7 Intramolekulare Sauerstoffumlagerung	124
3.3.8 Stabilitätsuntersuchungen.....	127
3.3.9 Diskussion	128
4. Zusammenfassung	131
5. Literaturverzeichnis	137
6. Abkürzungsverzeichnis	152
7. Publikationsliste	153

1 Einleitung

Aus der Neugier der ersten Naturstoffpioniere wie F.W. Sertürner, der 1805 erstmals Morphin aus Opium isolierte, entstand im 19. Jahrhundert im Zeitalter der Industrialisierung der aufkommende Drang der Wissenschaftler die wirksamen Substanzen aus altbewährten Arzneipflanzen zu isolieren und damit deren Wirkung zu verstehen lernen. Im Laufe der Zeit wurden die reinen Naturstoffe jedoch durch chemische Weiterbehandlung und Abwandlung den Bedürfnissen einzelner Krankheitsbilder immer besser angeglichen, so daß sie oft nur noch als Leitstrukturen und Ideengeber für die Entwicklung neuer Arznei- und Pflanzenschutzstoffe dienten. Trotz hochtechnisierter Möglichkeiten der kombinatorischen Chemie, die durch die Kombination unterschiedlichster Strukturbestandteile miteinander eine Vielzahl neuer Arzneistoffe hervorzubringen vermag, hat die Naturstoffchemie immer noch einen großen Stellenwert bei der Suche nach innovativen Leitstrukturen für Arznei- und Pflanzenschutzstoffe.

Mit Kenntnis von Molekülstruktur und Wirkung der Naturstoffe kam jedoch auch die Frage nach deren Bedeutung für den Produzenten auf. So läßt sich die weite Verbreitung biologisch aktiver Naturstoffe mit dem Selektionsdruck, der durch Umwelteinflüsse wie Fraßfeinde oder Krankheitserreger, auf Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere ausgeübt wird erklären. Durch diese äußeren Einflüsse haben sich optimal angepaßte hochwirksame chemische Abwehrmechanismen in den unterschiedlichsten Lebensformen ausgebildet (Harborne, 1993). Der Frage nach dem Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität von Naturstoffen und deren ökologischer bzw. physiologischer Bedeutung für die produzierenden Organismen ist jedoch noch weitgehend ungeklärt und wird erst seit wenigen Jahren intensiver erforscht.

Während Sertürners Suche nach dem Morphin der ursprünglichen Naturstoffsuche aus dem Bereich terrestrischer Pflanzen mit ethnopharmazeutischer Prägung entsprach, hat sich die breiter angelegte Suche nach möglichen Naturstoffressourcen seit Mitte des 20. Jahrhunderts auf die Quellen Mikroorganismen und marine Organismen ausgeweitet. Im marinen Habitat haben sich vor allem die wirbellosen Lebewesen wie Moostierchen, Seescheiden und Schwämme als überaus reiche Quellen mariner Naturstoffe mit außergewöhnlichen Strukturen und breiten biologischen Wirkungsspektren erwiesen.

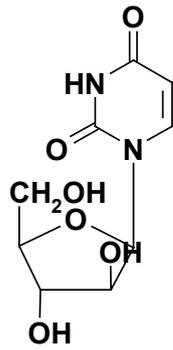
Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß annähernd 70% der Erdoberfläche von Ozeanen bedeckt sind und von heute insgesamt 34 bekannten Tierstämmen 33 im marinen Habitat vertreten sind läßt sich erahnen welches große Potential an Naturstoffen dieser Lebensraum bietet. Betrachtet man den terrestrischen Lebensraum und das Süßwasser so sind hier

lediglich 13 Tierstämme angesiedelt (Tardent, 1993; König und Wright, 1997) aus denen sich jedoch der Löwenanteil der bisher bekannten Naturstoffe rekrutiert.

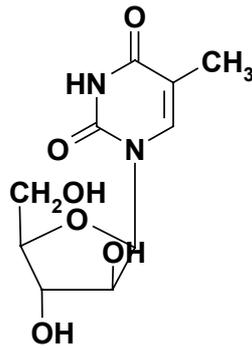
1.1 Marine Naturstoffe

Die Geschichte der bis heute annähernd 10.000 marinen Naturstoffe (MarinLit, 1998) begann mit der Entdeckung der Nukleosidanaloga Spongouridin und Spongothymidin (Abb. 1.1-1) aus dem Schwamm *Cryptothetya crypta* durch Bergmann und Feeney (1951). Auf Basis dieser beiden Schwamminhaltstoffe wurde das Virustatikum Vidarabin (Abb. 1.1-1), auch Ara-A genannt, entwickelt, das heute in Form von fünf Fertigarzneimitteln in Europa und in den USA gegen Herpeserkrankungen eingesetzt wird (Rote Liste, 2000; Pharmazeutische Stoffliste, 2000). Nachdem Vidarabin (Abb. 1.1-1) bereits in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts als Arzneimittel Anwendung fand wurde es 1984 als natürlicher Inhaltsstoff der Hornkoralle *Eunicella cavolini* von Cimino *et al.* (1984a) beschrieben und erfuhr damit einen Statuswandel vom partialsynthetisch abgewandelten Naturstoff zum reinen Naturstoff mit mariner Herkunft. Die Entdeckung der beiden Nukleosidanaloga von Bergmann und Feeney (1951) wurde von der Isolierung mehrerer Prostaglandinderivate aus der Hornkoralle *Plexaura homomalla* von Weinheimer und Spraggins (1969) gefolgt, die heute als eigentlicher Beginn der zielgerichteten marinen Naturstoffforschung angesehen wird.

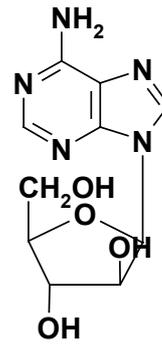
In der Folge wurde eine Vielzahl biologisch aktiver mariner Naturstoffe von großer struktureller Variabilität isoliert, die vornehmlich den Substanzgruppen der Alkaloide, Acetogenine und Terpenoide zugeordnet werden konnten (Faulkner, 1995). Zu letzterer Gruppe zählen Avarol und Avaron (Abb. 1.1-1) aus Schwämmen der Gattung *Dysidea*, die durch ihre *in vitro* Hemmung der HIV-1-Replikation im Kampf gegen AIDS von großem Interesse sind (Sarin *et al.*, 1987; Sarma *et al.*, 1993). Neben virustatischen Naturstoffen konnte auch eine Reihe antitumoraler Inhaltsstoffen aus Meereslebewesen isoliert werden, die sich aufgrund ihrer vielversprechenden Wirkungen bereits in der klinischen Prüfung befinden (Maroun *et al.*, 1989; Newmann *et al.*, 1992; Jayson *et al.*, 1994; Munro *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1994). Beispiele hierfür sind Bryostatin 1 (Abb. 1.1-1) aus dem Moostierchen *Bugula neritina* (Munro *et al.*, 1987) und Didemnin B (Abb. 1.1-2) aus der Seescheide *Tridemnum solidum* (Rinehart *et al.*, 1981). Während Bryostatin 1 (Abb. 1.1-1) eine selektive zytotoxische Wirkung gegen Leukämiezellen aufweist (Kraft *et al.*, 1993; Schmitz *et al.*, 1993), findet Didemnin B (Abb. 1.1-2) bei unterschiedlichen Tumorerkrankungen in klinischen Test seine Anwendung (Maroun *et al.*, 1989; Newman *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1994).



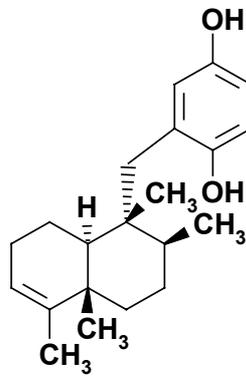
Spongouridin



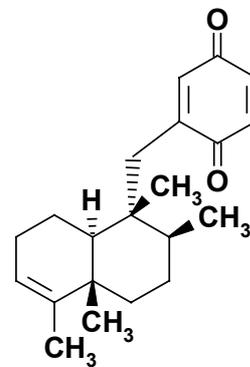
Spongthymidin



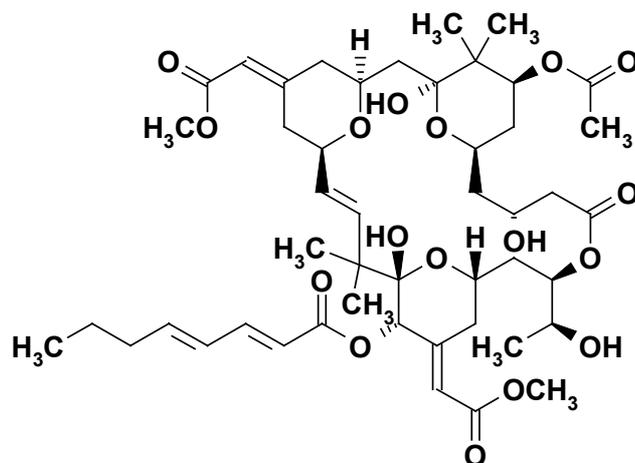
Vidarabin (Ara-A)



Avarol



Avaron



Bryostatin 1

Abb. 1.1-1 Beispiele mariner Naturstoffe mit biologischer Aktivität.

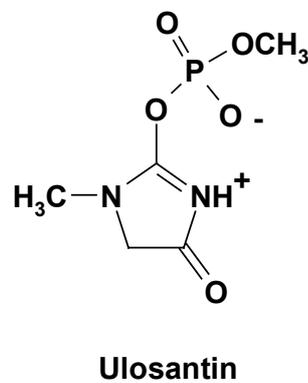
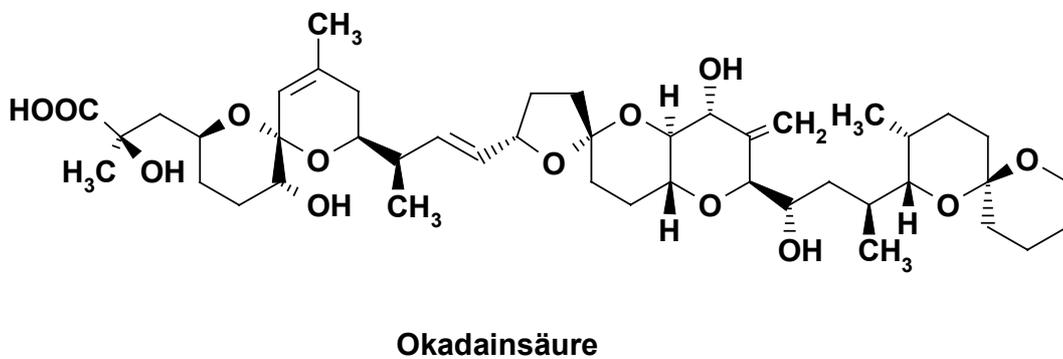
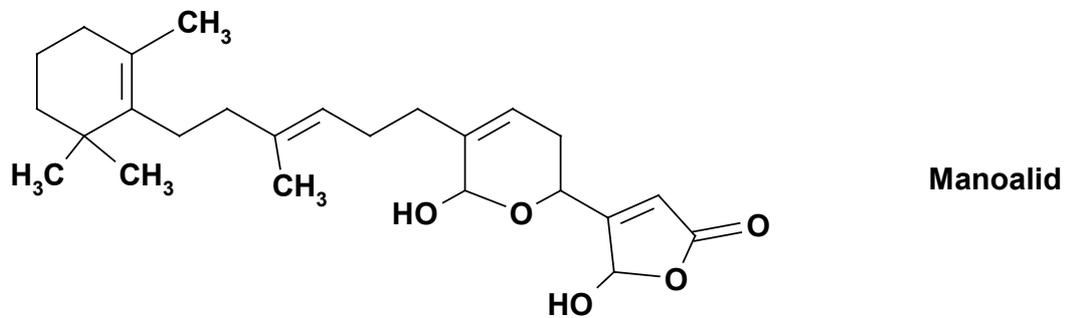
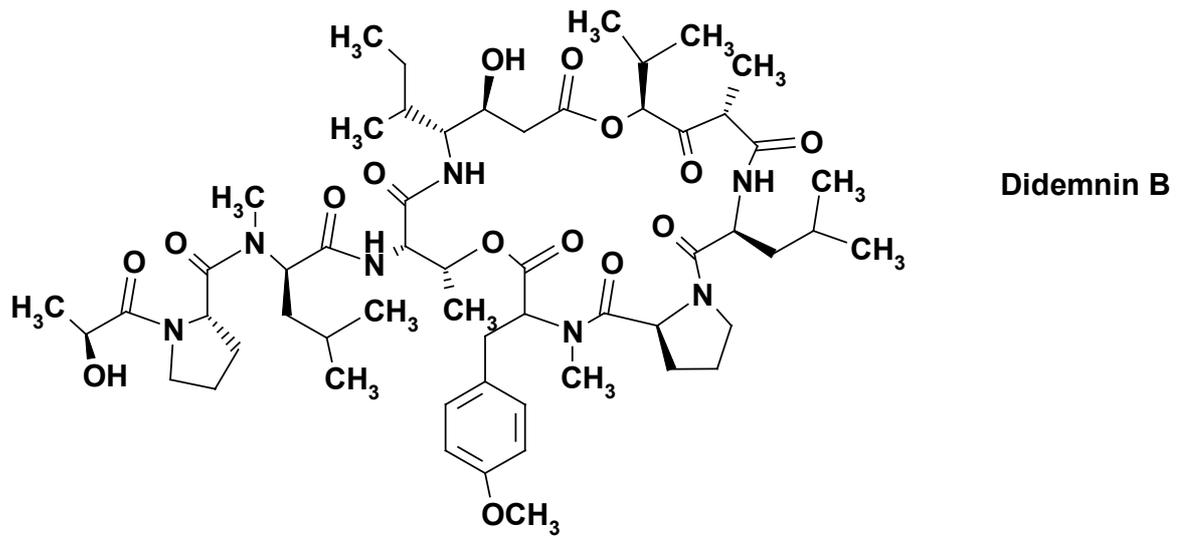


Abb. 1.1-2 Beispiele mariner Naturstoffe mit biologischer Aktivität.

Im Sesquiterpen Manoalid (Abb. 1.1-2) fand man einen interessanten Schwamm-inhaltsstoff aus *Luffariella variabilis* mit antiinflammatorischer Wirkung (De Silva und Scheuer, 1980). Das nichtsteroidale Terpenoid führt über eine Hemmung der Enzyme Phospholipase A₂ (Glaser *et al.*, 1989) und 5-Lipoxygenase (De Vries *et al.*, 1988) zu einem entzündungshemmenden Effekt. Auch hier befinden sich bereits Derivate der Substanz in der klinischen Prüfung (Potts und Faulkner, 1992).

Als „molecular tool“ dient die erstmals aus Schwämmen der Gattung *Halichondria* isolierte Okadainsäure (Abb. 1.1-2) (Tachibana *et al.*, 1981), die genau genommen als Sekundärmetabolit von Dinoflagellaten über die Nahrungskette in den Schwamm gelangt (Mebs, 1989). Sie wird wegen ihrer Eigenschaft die Proteinkinasen 1 und 2A spezifisch zu hemmen (Ishihara *et al.*, 1989, Cohen *et al.*, 1990) bevorzugt in der medizinischen Forschung eingesetzt.

Als letztes Beispiel biologisch aktiver mariner Naturstoffe sei das insektizide Ulosantin (Abb. 1.1-2) genannt, das 1993 von Van Wangenen *et al.* aus dem Schwamm *Ulosa ruetzleri* isoliert wurde (Van Wangenen *et al.*, 1993). Dieser relativ unkompliziert gebaute Inhaltsstoff wirkt über eine Hemmung der Acetylcholinesterase höchst toxisch auf Larven des Tabakhornwurms und stellt ein stark wirksames Insektizid dar, das handelsüblichen Pflanzenschutzstoffen in seiner Wirkstärke vergleichbar ist (Van Wangenen *et al.*, 1993).

1.2 Chemische Abwehrmechanismen in marinen Ökosystemen

Bei einer geschätzten Zahl von 3 bis 500 Millionen verschiedener Arten von Lebensformen in den Weltmeeren und der Präsenz von 33 der bisher 34 bekannten Tierstämme im marinen Habitat, bei lediglich 13 terrestrischen Tierstämmen (Tardent 1993; König und Wright, 1997), scheinen die Tiefen der Weltmeere eine noch weitgehend ungenutzte Quelle biologisch aktiver Stoffe zu sein, wenn man berücksichtigt, daß dieser Lebensraum erst seit ca. 50 Jahren unter diesem Aspekt erforscht wird (vgl. 1.1). Der enorme Konkurrenzkampf durch den unvergleichlichen Populations- und Artenreichtum in tropischen Korallenriffen (Jackson und Buss, 1975; Branch, 1984; Porter und Targett, 1988) ist die beste Voraussetzung für die Entwicklung hochwirksamer Abwehrmechanismen unterschiedlichster Ausprägung im täglichen Überlebenskampf der Riffbewohner (Harborne, 1993; Pawlik, 1993).

Während in tropischen Regenwäldern annähernd vergleichbare Bedingungen wie in tropischen Korallenriffen herrschen, unterscheiden sich beide Ökosysteme jedoch in Bezug auf ihre Naturstoffproduzenten. Die höheren Pflanzen sind im Regenwald die vorherrschenden Bewohner und Syntheseorte interessanter Sekundärmetabolite wohingegen im Korallenriff die wirbellosen Lebewesen die Hauptproduzenten von vorzugsweise toxischen Naturstoffen sind (Faulkner, 1997). Da der Großteil der Meereslebewesen eine weiche Körperhülle ohne morphologische Schutzmechanismen

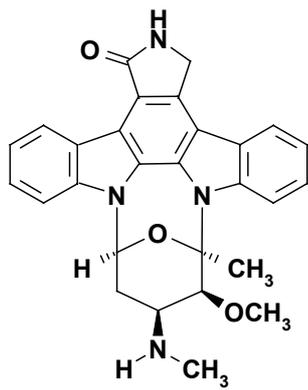
besitzt und zudem meist benthischen Ursprungs ist, ohne aktive Verteidigungs- bzw. Fluchtmöglichkeiten zu besitzen, haben sich viele dieser Lebewesen im Laufe der Evolution effektive chemische Abwehrmechanismen zu eigen gemacht. Grundlage dieser Abwehrmechanismen sind Sekundärmetabolite, die Aufgaben wie die Abwehr von Fraßfeinden (z.B. Schupp und Paul, 1994), die Verhinderung von Überwuchs durch konkurrierende Nachbarn (z.B. Porter und Targett, 1988), die Verhinderung des „Biofouling“ (z.B. Thompson *et al.*, 1985) oder den Schutz vor übermäßiger Sonneneinstrahlung (z.B. Dunlap *et al.*, 1986) übernehmen.

Nach Isolierung und Charakterisierung der biologisch wirksamen Inhaltsstoffe ist jedoch nicht immer klar, ob die Sekundärmetabolite auch eigene Biosyntheseprodukte der untersuchten Organismen sind. So können zum Beispiel Schwämme, die ihre Nahrung durch Filtrieren von Meerwasser gewinnen, aus der Nahrung stammende Abwehrstoffe akkumulieren und für ihre eigenen Abwehrzwecke nutzen. Als Beispiel sei die Okadainsäure (Abb. 1.1-2) aus Schwämmen der Gattung *Halichondria* genannt (Tachibana *et al.*, 1981), deren Ursprungsorganismen Dinoflagellaten sind (Mebs, 1989). Auch im Fall des sich von Seescheiden der Art *Eudistoma toevalensis* ernährenden Plattwurms *Pseudoceros concineus* konnte gezeigt werden, daß er seine Abwehrstoffe, die sogenannten Staurosporine (Abb. 1.2-1) und deren Derivate, nicht selbst synthetisiert sondern durch die Nahrung aufnimmt (Schupp *et al.*, 1999). Nachdem Staurosporin (Abb. 1.2-1) als bakterieller Sekundärmetabolit von *Streptomyces*-stämmen bekannt ist, drängt sich der Verdacht auf, daß auch die Seescheide das Staurosporin nicht selbst synthetisiert sondern entweder durch die eingestrudelte Nahrung akkumuliert oder durch Symbiose mit *Streptomyces*-bakterien im eigenen Gewebe einlagert und so zur Abwehr nutzt.

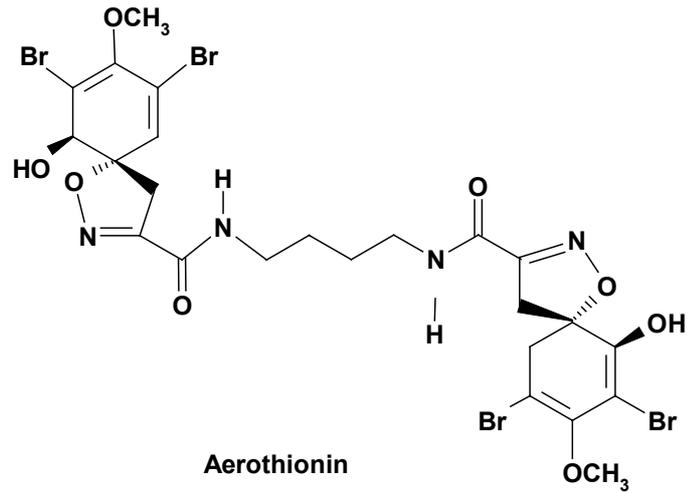
Im Folgenden sind einige Beispiele für ökologische Abwehrmechanismen in diversen Meereslebewesen aufgeführt, um die unterschiedlichen Funktionen chemischer Abwehr im marinen Habitat zu veranschaulichen.

Schutz vor Sonneneinstrahlung durch marine Naturstoffe.

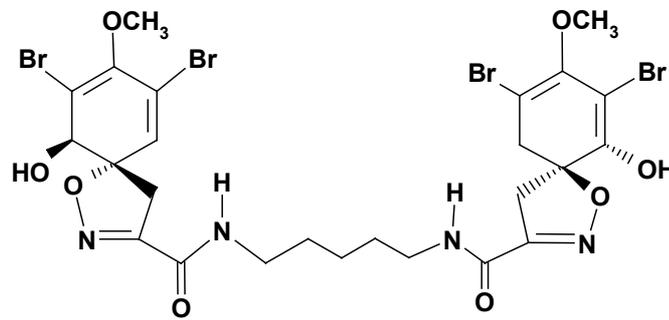
Im flachen Wasser des Riffwatts oder der Lagune über einer Riffplattform ist die Sonneneinstrahlung für benthische Riffbewohner gerade in tropischen Korallenriffen extrem hoch. Die hohe UV-Strahlung des Sonnenlichts kann als Streßfaktor jedoch fatale Auswirkungen auf Wachstum und Stoffwechsel der betroffenen Organismen haben, wovor



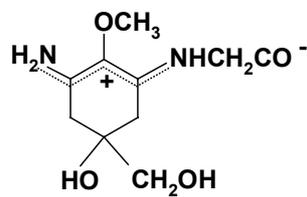
Staurosporin



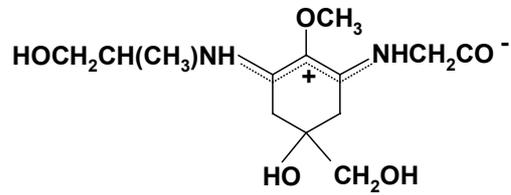
Aerothionin



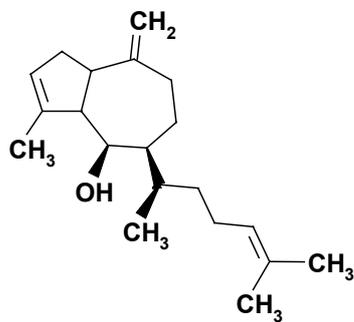
Homoaerothionin



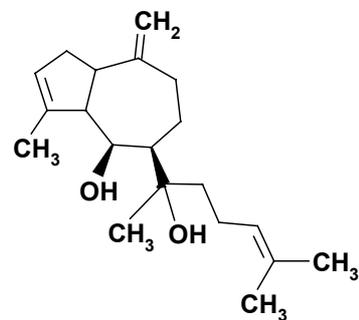
Palythin



Palythanol

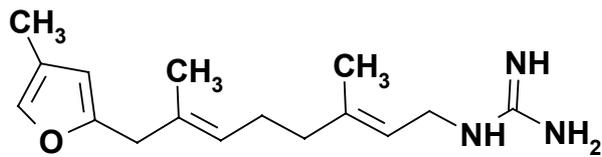


Pachydictyol A

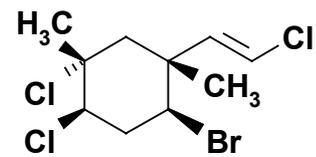


Dictyol E

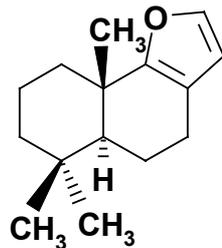
Abb. 1.2-1 Marine Naturstoffe mit ökologischen Abwehrfunktionen.



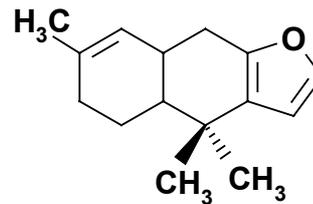
Siphonodictidin



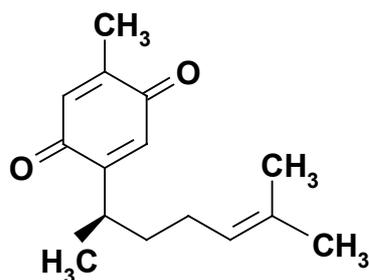
Chloromertensen



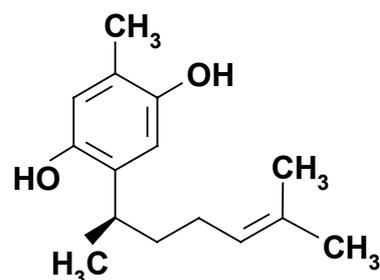
Pallescensin A



Furodysin



Curcuchinon



Curcuhydrochinon

Abb. 1.2-2 Marine Naturstoffe mit ökologischen Abwehrfunktionen.

sich besonders exponierte Individuen schützen müssen, um keinen entscheidenden Nachteil im Konkurrenzkampf des Rifflebens zu haben. Wie Dunlap und Chalker (1986) zeigen konnten, weisen Palythin und Palythinol (Abb. 1.2-1) als Inhaltsstoffe der Steinkoralle *Acropora formosa* UV-Maxima bei 320nm bzw. 332nm auf und filtern damit den Großteil der schädlichen ultravioletten Strahlung aus dem Sonnenlicht. Ihre Untersuchungen ergaben ebenfalls eine Abhängigkeit der Konzentration beider Inhaltsstoffe von der Tiefe, in der die untersuchte Korallen vorkamen. So nahm die Konzentration beider Sekundärmetabolite mit zunehmender Tiefe und damit auch schwindender UV-Strahlung ab, woraus sich ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Produktion beider Substanzen und der UV-Licht-Exposition ergab (Dunlap und Chalker, 1986).

Schutz vor Biofouling.

Das Phänomen des Biofouling auf jeglicher Art von Oberfläche im Meerwasser birgt besonders für sessile marine Invertebraten, wie Schwämme und Seescheiden enorme Gefahren. Da bei diesem Prozeß Oberflächen von im Wasser befindlichen Bakterien und Larven epibiontischer Invertebraten binnen kürzester Zeit besiedelt und überwachsen werden (Bakus *et al.*, 1986, 1990), ergeben sich daraus vielschichtige Probleme für benthische Wirtsorganismen. Mögliche negative Effekte auf den Wirt sind beispielsweise das Absterben befallener Gewebeteile durch Ausscheiden von pathogenen Substanzen durch die besiedelnden Bakterien (Paul, 1992, Correa und Sanchez, 1996) oder Abbrechen besiedelter Gewebeteile durch Erhöhung des Strömungswiderstandes. Für Filtrierer wie Schwämme kann die Ausbildung eines Bakterien- bzw. Epibionten-Biofilms auf der Oberfläche zusätzlich noch zur Verstopfung lebensnotwendiger Einstromkanäle, den sogenannten Ostia führen oder durch Konkurrenz um Nahrung mit den Epibionten zu einer verminderten Nahrungsaufnahme führen (Oswald *et al.*, 1984).

Um dieses Biofouling zu verhindern gibt der karibische Schwamm *Aplysina fistularis* anhaltend die bromierten Tyrosinderivate Aerothionin und Homoaerothionin (Abb. 1.2-1) in Konzentrationen an das Umgebungswasser ab, die verhindern, daß Epibionten wie die Alge *Macrocystis pyrifera* sich auf seiner Oberfläche ansiedeln (Thompson *et al.*, 1985; Thompson, 1985; Walker *et al.*, 1985). Auch für die Braunalge *Dictyota menstrualis* die wie der Schwamm *Aplysina fistularis* kaum Anzeichen von Biofouling zeigt, konnte nachgewiesen werden, daß sie Substanzen produziert, die eine Oberflächenbesiedlung durch Epibionten verhindert. Anders als bei dem Schwamm wurden von der Braunalge die Abwehrstoffe nicht an das umgebende Wasser abgegeben, sondern in den Oberflächenstrukturen des Organismus eingelagert (Schmitt *et al.*, 1995). Schmitt *et al.* (1995) fanden heraus, daß Larven des Moostierchens *Bugula neritina* nur bei unmittelbarem Kontakt mit der Algenoberfläche abgeschreckt wurden. Als für diesen Effekt verantwortliche Inhaltsstoffe konnten die Diterpene Pachydictyol A und Dictyol E (Abb. 1.2-1) isoliert werden.

Marine Naturstoffe und ihre Rolle bei allelopathische Interaktionen.

Die hohe Besiedlungsdichte im tropischen Korallenriff bringt einen enormen Konkurrenzdruck im Kampf um Platz und Nahrung im Benthos mit sich, der viele Organismen dazu bewegt sich durch Verdrängung bzw. Überwuchs benachbarter Riffbewohner einen entscheidenden Vorteil zu verschaffen. Führt man sich die Vielzahl toxischer Naturstoffe vor Augen, die bereits aus diesem Ökosystem isoliert wurden, liegt der Schluß nahe, daß allelopathische Effekte eine entscheidende Rolle beim Wettbewerb der sessilen Lebewesen im Riff spielen. Tatsächlich gibt es einige Studien, die belegen, daß

toxische Sekundärmetabolite den Überwuchs von Invertebraten und Algen durch benachbarte Mitstreiter verhindern (Porter und Targett, 1988; Turon *et al.*, 1996).

Der Bohrschwamm *Siphonodictyon coralliphagum* zum Beispiel nutzt den giftigen Inhaltsstoff Siphonodictidin (Abb. 1.2-2), um zu verhindern, daß er von Korallen der Art *Acropora formosa* überwachsen wird (Sullivan *et al.*, 1981, 1983). Als Wirkmechanismus des ungewöhnlichen Guanidinderivats konnte eine Hemmung des Korallenwachstums durch Unterdrückung der Zooxanthellen-Photosynthese ausfindig gemacht werden (Sullivan *et al.*, 1981, 1983). Im Fall der australischen Rotalge *Plocamium hamatum* konnten De Nys *et al.* (1991) anhand mehrerer Experimente zeigen, daß das chlorierte Cyclohexanderivat Chloromertensen (Abb. 1.2-2) Gewebsnekrosen bei Weichkorallen der Art *Sinularia cruciata* hervorruft. Wie die Untersuchungen weiter ergaben, zeigten lediglich Weichkorallen Nekrosen, die in direktem Kontakt mit Chloromertensen (Abb. 1.2-2) und damit zu den Algen standen. Ebenso wie die Braunalgeninhaltsstoffe Pachydictyol A und Dictyol E (Abb. 1.2-1) verhinderte auch Chloromertensen (Abb. 1.2-2) Biofouling. Zusätzlich weist das chlorierte Cyclohexanderivat auch abschreckende Wirkung bei Fischen auf und stellt so einen marinen Naturstoff dar, dem vielschichtige ökologische Bedeutungen zukommen (De Nys *et al.*, 1991).

Fraßhemmende marine Sekundärmetabolite.

Neben dem enormen Konkurrenzdruck, der in tropischen Korallenriffen besonders auf den benthischen Organismen lastet, kommt für eben diese Lebensformen aufgrund ihrer exponierten Lage und meist auffälligen Färbung noch die Gefahr hinzu räuberischen Fischen als Beuteobjekt zu dienen. Bei einer Häufigkeit von ca. 150.000 zufälligen Bissen pro Quadratmeter pro Tag durch Fische im tropischen Korallenriff (Carpenter, 1986), sind effektive Verteidigungsmechanismen der sessilen Riffbewohner nötig, um ihr Überleben in diesem Ökosystem zu sichern. Zahlreiche Veröffentlichungen belegen, daß toxische Sekundärmetabolite ihre Produzenten nachhaltig vor derartigen Schädigungen beschützen können (Bakus *et al.*, 1986; Paul, 1992; Pawlik, 1993; Schupp und Paul, 1994; Ebel *et al.*, 1997; Thacker *et al.*, 1998).

Zur Untersuchung isolierter Inhaltsstoffe auf deren fraßhemmende Eigenschaften wurden diese in früheren Arbeiten in Laborversuchen mit unterschiedlichen Testorganismen auf deren Wirkung hin getestet (Braekmann und Dalozé, 1986), während heutige Untersuchungen mehr auf Freilandexperimenten mit natürlich vorkommenden Fischpopulationen basieren (Meyer und Paul, 1995; Pawlik *et al.*, 1995; Schupp *et al.*, 1999). Bei den Freilandassays werden Rohextrakte oder isolierte Inhaltsstoffe der Testorganismen

in deren natürlichen Konzentrationen, gewichts- oder volumenbezogen, in künstliches Futter eingearbeitet und als Futterstücke definierter Größe und Fläche im Riff an entsprechenden Vorrichtungen ausgebracht (Schupp, 2000). Über definierte Zeiträume wird beobachtet welche Flächen einzelner Futterstücke von den Fischen gefressen werden. Als Vergleich dienen hierzu Futterstücke ohne jeglichen Zusatz von Rohextrakt oder Inhaltsstoff.

In Studien von Thompson *et al.* (1985) konnte mit Hilfe des Test-Fisches *Clinocottus analis* die fraßabschreckende Wirkung der Substanzen Aerothionin (Abb. 1.2-1), Pallescenin A und Furodysin (Abb. 1.2-2) nachgewiesen werden. Das aus dem kalifornischen Schwamm *Aplysina fistularis* stammende Aerothionin (Abb. 1.2-1) zeigt somit neben seiner entscheidenden Rolle bei der Verhinderung des Biofouling bei der gleichen Schwammart (s.o.) auch eine abschreckende Wirkung auf räuberische Riffische. Aerothionin stellt somit wie Chloromertensen (Abb. 1.2-2) aus der Rotalge *Plocamium hamatum* einen Naturstoff mit mehrfacher ökologischer Bedeutung für seinen Produzenten dar (s.o.). Pallescenin A und Furodysin (Abb. 1.2-2) stammen aus dem kalifornischen Schwamm *Dysidea amabilis* und stellen wie Aerothionin stark wirksame fischabschreckende Inhaltsstoffe dar, die ihre weichhäutigen, ungeschützten Produzenten effektiv vor Fraßfeinden schützen.

Nicht nur Schwämme müssen sich vor den Riffischen gegen Verbiß schützen, auch Korallen sind vor den unzähligen Attacken durch Fische, wie z.B. Papagaienfische, nicht sicher. Im Fall der karibischen Rindenkorallen *Pseudopterogorgia acerosa* und *Pseudopterogorgia rigida* ergaben Untersuchungen der Rohextrakte beider Korallenarten beeindruckende Wirkungen bei der Abschreckung von räuberischen Fischen sowohl in Labor- wie auch in Freilandexperimenten (Harvell *et al.*, 1988). Nach Isolierung und Charakterisierung der verantwortlichen Inhaltsstoffe ergaben sich die Strukturen der Terpene Curcuchinon und Curcuhydrochinon (Abb. 1.2-2). Die reinen Sekundärmetabolite besaßen in den durchgeführten Assays wie zuvor die Rohextrakte ebenfalls fischabschreckende Wirkung (Harvell *et al.*, 1988). Harvell und Fenical (1989) konnten weiter zeigen, daß innerhalb einer Koralle in polyptenragenden Zweigen die Konzentrationen von Curcuhydrochinon (Abb. 1.2-2) höher waren als im grundständigen Achsengewebe. Somit ließ sich auf einen Schutz der Polypen durch die isolierten Terpene schließen. Interessanterweise verhielt sich die Verteilung von Skelettnadeln in beiden Geweben genau entgegengesetzt, woraus auf den Schutz des grundständigen Achsengewebes vor räuberischen Invertebraten, wie z.B. Schnecken, durch Skelettnadeln geschlossen wurde.

1.3 Wundinduzierte Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina*

Alle unter 1.2 beschriebenen Abwehrmechanismen stellen konstitutive Mechanismen dar, die entweder auf einer Akkumulation von toxischen Inhaltsstoffen im zu schützenden Gewebe oder auf einer kontinuierlichen Ausscheidung giftiger Inhaltsstoffe beruhen. Eine weitere Abwehrmöglichkeit stellt die induzierbare Abwehr dar, bei der die eigentlichen Abwehrstoffe erst durch einen äußeren Reiz gebildet werden. Solche äußeren Reize können zum Beispiel Gewebnekrosen durch eindringende Mikroorganismen oder großflächige Verletzungen durch Fraßfeinde sein. Bei der induzierbaren Abwehr können nach einem erfolgten Reiz die entsprechenden Verteidigungssubstanzen auf zweierlei Art gebildet werden. So können die Abwehrstoffe entweder de novo synthetisiert werden oder durch spezifische Enzyme aus inaktiven Vorstufen, die im Gewebe kumuliert vorliegen, bei Verletzungen gebildet werden. Im terrestrischen Bereich ist die induzierbare Abwehr wie zum Beispiel die de novo Synthese von Phytoalexinen durch pilzbefallene Pflanzen (Bailey und Mansfield, 1982) oder die Freisetzung von HCN aus cyanogenen Glykosiden (Jones, 1988) weitverbreitet (Harborne, 1994).

Als erste induzierbare chemische Abwehrreaktion im marinen Lebensraum kann die Arbeit von Teeyapant und Proksch (1993) angesehen werden, die im mediterranen Schwamm *Aplysina aerophoba* (syn. *Verongia aerophoba*) einen wundinduzierten enzymatischen Abbau von biologisch inaktiven bromierten Tyrosinalkaloiden zu biologisch aktiven Produkten beschreiben konnten (Proksch und Ebel, 1998).

Der im Mittelmeer und um die Kanarischen Inseln omnipresente Goldschwamm *Aplysina aerophoba* reichert große Mengen bromierter Tyrosinalkaloide in seinem Gewebe an. Diese Alkaloide besitzen als charakteristisches Merkmal eine ungewöhnliche Spirocyclohexadienisoxazolin-Einheit mit variablen Seitenkettensubstituenten. Für die beiden Hauptinhaltsstoffe Isofistularin-3 und Aerophobin-2 (Abb. 1.3-1) konnten Teeyapant und Proksch (1993) einen Anteil von 10% des Schwammtrockengewichts errechnen. Bei Verletzung des Schwammgewebes kommt es, vermutlich durch Zelldekompartimentierung, zum Aufeinandertreffen von Enzym und Alkaloiden, worauf beide Alkaloide als Vorstufen enzymatisch zu den biologisch aktiven Abwehrstoffen Aeroplysinin-1 und Dienon (Abb. 1.3-1) abgebaut werden (Teeyapant und Proksch, 1993).

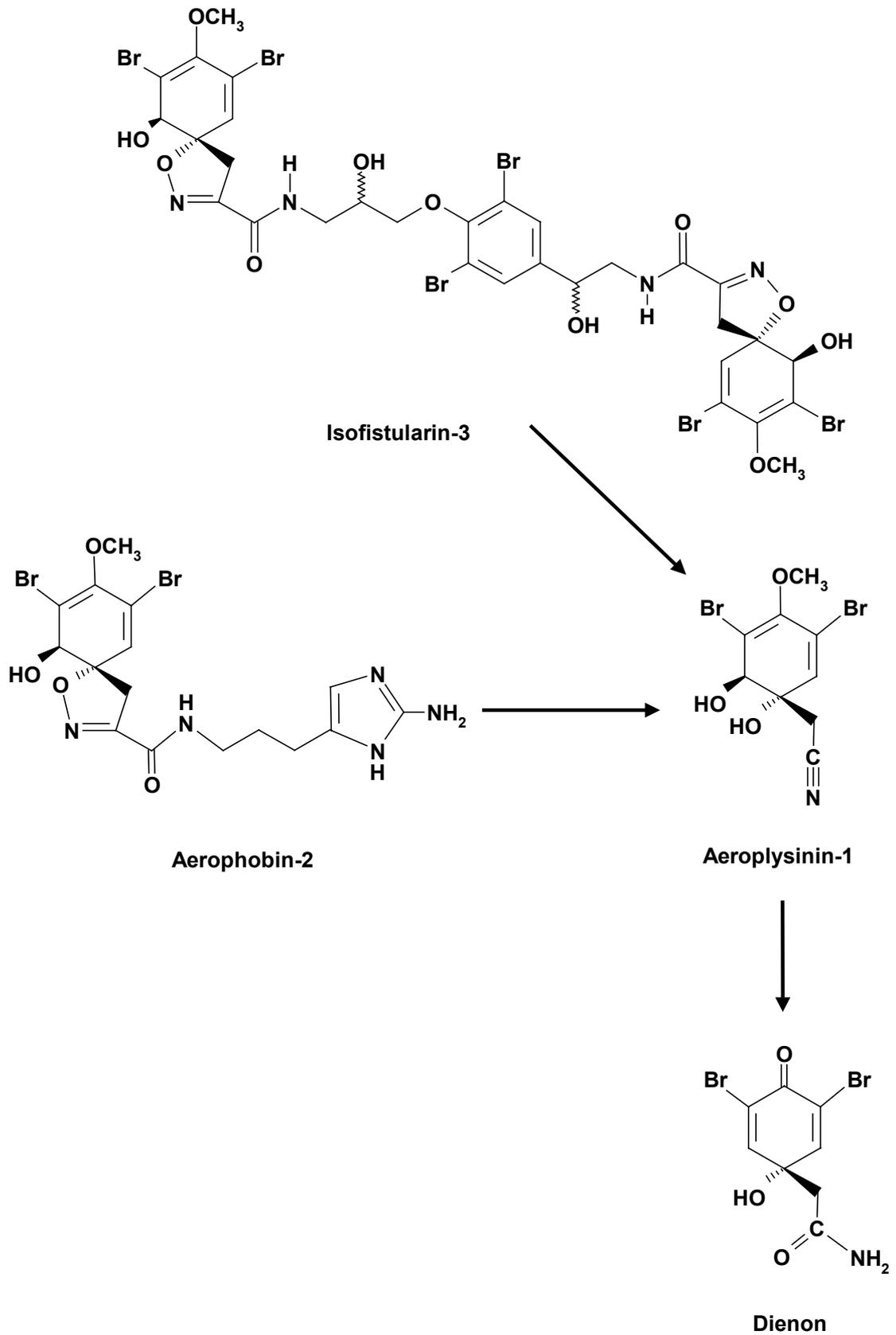


Abb. 1.3-1 Wundinduzierte enzymatische Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina*.

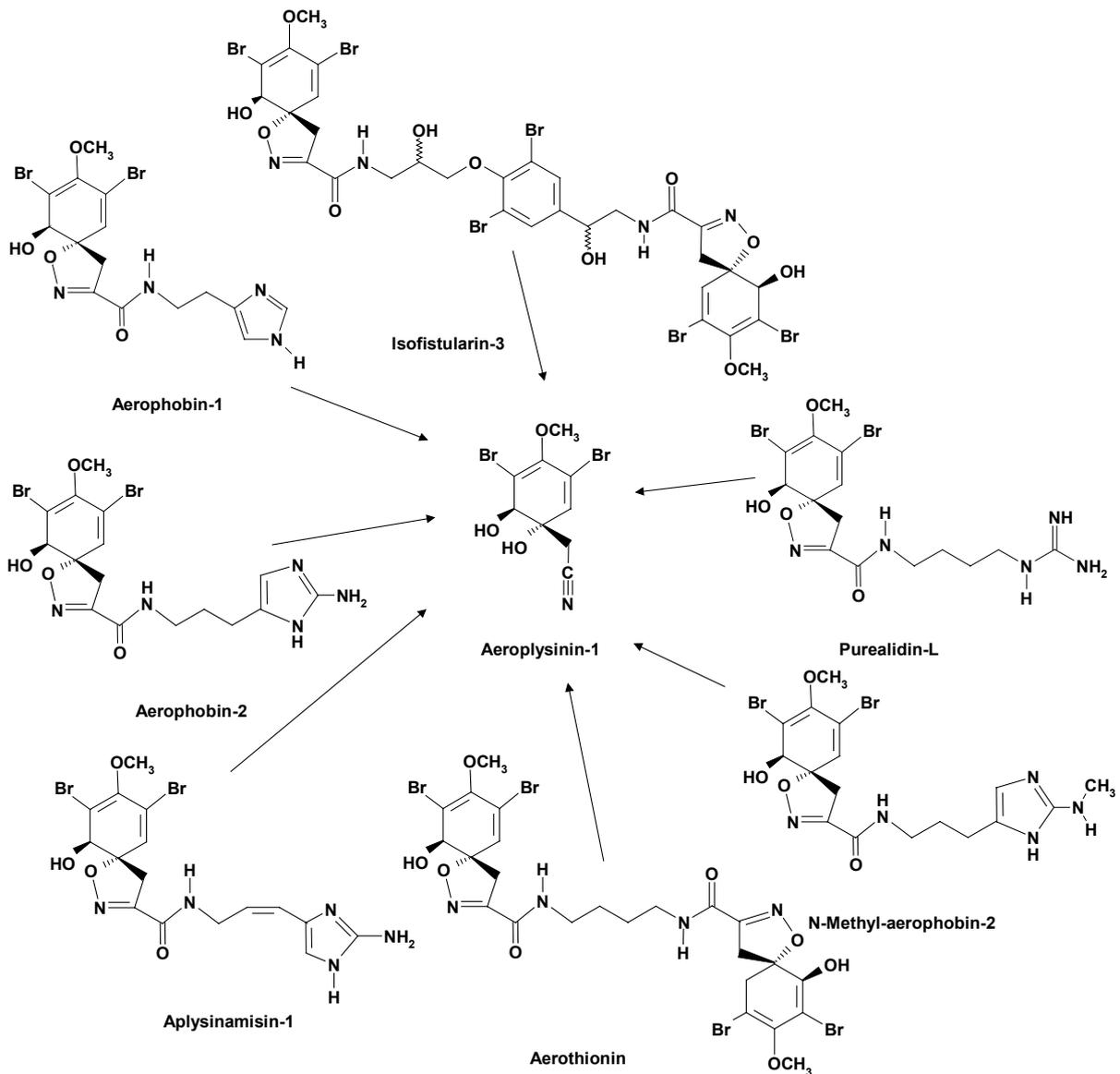


Abb. 1.3-2 Natürliche Vorstufen der enzymatischen Abwehrreaktion in *Aplysina*-Schwämmen.

In vergleichenden Untersuchungen zwischen den biologisch inaktiven Vorstufen Isofistularin-3 und Aerophobin-2 (Abb. 1.3-1) und den gebildeten Abwehrstoffen Aeroplysinin-1 und Dienon (Abb. 1.3-1) besitzen die Abwehrstoffe eine ausgeprägte Wirkung sowohl gegen terrestrische wie auch marine gram-positive und gram-negative Bakterien (Teeyapant *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996). Darüber hinaus konnten mutagene, hämolytische sowie bemerkenswerte zytotoxische Wirkungen von Aeroplysinin-1 und Dienon (Abb. 1.3-1) beobachtet werden (Teeyapant *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996). Nach Untersuchungen von Koulmann *et al.* (1996) scheinen beim Aeroplysinin-1 (Abb. 1.2-1) Radikalbildungen für die zytotoxische Wirkung verantwortlich zu sein. Genaue Wirkmechanismen für beide

Substanzen sind jedoch noch nicht bekannt. Im Test mit den marinen Algenarten *Coscinodiscus wailesii* und *Prorocentrum minimum* zeigten beide Abwehrstoffe eine Hemmung des Zellwachstums und konnten in weiteren Experimenten eine abschreckende Wirkung gegen die marine polyphage Schnecke *Littorina littorea* aufweisen (Weiss *et al.*, 1996). Bei Wirksamkeitsnachweisen gegen Fische zeigten beide Abwehrstoffe eine Toxizität bei Larven des Fisches *Blennius pavo* (Weiss, 1995) sowie eine fraßhemmende Wirkung auf den karibischen Riffisch *Thalassoma bifasciatum* (Ebel *et al.*, 1997).

Die anfänglichen Ergebnisse von Teeyapant und Proksch (1994) bezüglich der enzymatischen Umsetzung der genuinen bromierten Spirocyclohexadienisoaxazolinalkaloide Isofistularin-3 und Aerophobin-2 (Abb. 1.3-1) gaben schon erste Hinweise auf die Beteiligung von zwei aufeinanderfolgenden Enzymen, die an dem Abwehrprozeß beteiligt sein mußten. Nämlich ein erstes sogenanntes Aerophobin-spaltendes Enzym (Isoxazolin-spaltendes Enzym) (Ebel, 1998), das zunächst aus den Vorstufen Isofistularin-3 und Aerophobin-2 das Säurenitril Aeroplysinin-1 bildet (Abb.1.3-1) und ein zweites Enzym, welches das Säurenitril zum Säureamid Dienon umsetzt (Abb. 1.3-1). Teeyapant (1994) konnte weiterhin eine erste Charakterisierung der enzymatischen Gesamtreaktion vornehmen und zeigte, daß ein optimaler Ablauf der Reaktion in einem pH-Bereich von 5.5 bis 6.0 bei Temperaturen von 55°C bis 60°C stattfand. Die im *In-vitro*-Assay (Teeyapant, 1994) innerhalb von wenigen Sekunden vollständig ablaufende Reaktion konnte von Ebel *et al.* (1997) im Freilandexperiment *in-vivo* am lebenden Organismus bestätigt werden, wobei die Umsetzung der im unverletzten Schwamm genuin vorkommenden Isoxazolinalkaloide nach 40 Sekunden vollständig abgeschlossen war und Dienon (Abb. 1.3-1) als Hauptprodukt resultierte.

In weiteren *In-vitro*-Untersuchungen ging Ebel (1998) weiter auf die Charakterisierung der Abwehrreaktion ein und konnte zeigen, daß fünf weitere natürliche Bromoisoxazolinalkaloide mit unterschiedlichen Seitenketten aus verschiedenen Schwammarten der Gattung *Aplysina* wie Isofistularin-3 und Aerophobin-2 (Abb. 1.3-2) auch eine nahezu quantitative Umsetzung erfuhren (Abb. 1.3-2). Von Ebel (1998) wurde ebenfalls der Nachweis erbracht, daß die Umsetzung des Alkaloids Aerophobin-2 (Abb. 1.3-1) lediglich von Schwämmen der Familie Verongidae und hier der Gattung *Aplysina* im *In-vitro*-Assay durchgeführt wurde, nicht jedoch von Schwämmen anderer Familien und Gattungen. Damit konnte der für die Gattung *Aplysina* spezifische Charakter der beschriebenen Abwehrreaktion herausgestellt werden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung dieser Arbeit war sowohl auf die Suche nach neuen Bromotyrosinalkaloiden aus Schwämmen der Gattung *Aplysina*, wie auch auf die nähere Charakterisierung der wundinduzierten, enzymatischen Abwehrreaktion in Schwämmen dieser Gattung ausgerichtet.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde aus einer Sammlung karibischer Schwämme der Familien Aplysinidae und Aplysinellidae anhand von HPLC-Untersuchungen der Schwammrohextrakte eine Zuordnung der untersuchten Schwammarten aufgrund ihrer Verteilungsmuster der Inhaltsstoffe im HPLC-Chromatogramm durchgeführt. Darüber hinaus wurde anhand von HPLC-Untersuchungen der Schwamm *Aplysina insularis* ausgewählt, da dieser die größte Vielfalt an Bromotyrosinalkaloiden im HPLC-Chromatogramm versprach. Diese Alkaloide wurden isoliert und in ihrer Struktur mittels verschiedener spektroskopischer Methoden (UV/Vis, MS, NMR) aufgeklärt. Nach der Strukturaufklärung wurden die isolierten Sekundärmetabolite auf eventuelle chemotaxonomische Eigenschaften hin untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit bestand in der näheren Charakterisierung der enzymatischen Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina*. Bevorzugtes Interesse galt hier der bisher nur in Ansätzen erforschten zweiten von zwei aufeinanderfolgenden enzymatischen Reaktionen, die einer Nitrilhydratase zuzuschreiben ist, wie im Rahmen dieser Arbeit dargelegt werden konnte. Nach Auswahl des karibischen Schwammes *Aplysina cauliformis* aufgrund der größten Nitrilhydrataseaktivität im Vergleich mit mehreren Schwämmen der gleichen Gattung wurde die Charakterisierung der Abwehrreaktion hinsichtlich optimaler pH- und Temperatur-Bedingungen durchgeführt. Weitere Interessenschwerpunkte der Charakterisierung waren die jeweiligen Substratspezifitäten der beiden Enzyme sowie die Aufklärung der Reaktionsmechanismen und Aussagen zum reaktiven Zentrum der Nitrilhydratase.

2. Material und Methoden

2.1 Schwammaterial

Das untersuchte Schwammaterial (s. Tab. 2.2-1) wurde unmittelbar nach dem Abernten eingefroren, im tiefgefrorenen Zustand nach Würzburg transportiert und dort in Tiefkühltruhen bei -20°C gelagert. Vor der weiteren Verwendung wurde das Material grob zerkleinert, gefriergetrocknet und anschließend pulverisiert.

Art	Familie	Herkunft
<i>Aplysina aerophoba</i>	Aplysinidae	Mittelmeer ¹
<i>Aplysina archeri</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Aplysina cauliformis</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Aplysina cavernicola</i>	Aplysinidae	Mittelmeer ²
<i>Aplysina fistularis</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Aplysina fulva</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Aplysina insularis</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Aplysina lacunosa</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Verongula gigantea</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Verongula rigida</i>	Aplysinidae	Bahamas ³
<i>Aiolochoia crassa</i>	Aplysinellidae	Bahamas ³

Tab. 2.1-1 Untersuchte Schwämme aus der Ordnung Verongida

- ¹: Schwammaterial aus Ronvinji (Kroatien, Sammlung 1992 und 1993), Banyuls (Frankreich, Sammlung 1995) und L'Estartit (Spanien)
- ²: Schwammaterial aus Neapel (Italien, Sammlung 1993) und Marseille (Frankreich, Sammlung 1997)
- ³: Schwammaterial aus der Karibischen See (Bahamas, Sammlung 1995)

2.1.1 *Aplysina insularis* (Durchassaing & Michelotti, 1864)



Abb. 2.1-1: *Aplysina insularis*

Stamm:	Porifera
Klasse:	Demospongia
Ordnung:	Verongida
Familie:	Aplysinidae
Gattung:	<i>Aplysina</i>

Der Gelbe Tubenschwamm wurde im August 1995 von Dr. Arno Kunze vor der Südwestküste der Insel Long Island (Bahamas) in einer Tiefe von 1 bis 2 Metern erschnorchelt.

Im natürlichen Habitat kommt der Gelbe Tubenschwamm (*Aplysina fistularis*) mit seiner reich ornamentierten Oberfläche in Abhängigkeit von Tiefe und Wasserbewegung in verschiedenen Wuchsformen vor und kann aufgrund dessen in zwei unterschiedliche Arten eingeteilt werden (van Soest, 1998). Während die gelb bis orange gefärbten Schwammröhren, die einer gemeinsamen Basis entspringen, im turbulenten Flachwasser kurz und gedrungen sind (*Aplysina insularis*), zeigen sie in tieferen Gewässern besonders an steilen Riffhängen einen sehr langen, ins offene Wasser ragenden Wuchs (*Aplysina fulva*). Das untersuchte Schwammfragment bestand aus einer einzelnen Tube von 5 cm Höhe und 2 cm Durchmesser mit einem terminalen Osculum von 0.7 cm im Durchmesser, wobei sich

eine kurze Tube als Anhängsel an der Haupttube befand. Die Außenfarbe war bereits schwarz, während das Innere eine dunkelbraune Färbung zeigte. Auf der ansonsten glatten Oberfläche konnten einige längliche, flache Vertiefungen ausgemacht werden. Die Hauptbestandteile des Skeletts sind langgestreckte bernsteinfarbene Sponginfasern mit einem Durchmesser von 38-100 μm und ununterbrochenem Mark von 14-47 μm im Durchmesser (36-62% der Faserdurchmesser einschließend). Im durchscheinenden Licht zeigte sich das Fasermark charakteristisch schwarz bis dunkelbraun eingefärbt. Die Einzelfasern bilden ein Netzwerk aus gestreckt-polygonalen Maschen mit einer Ausdehnung von 800-900 x 1200-1500 μm . Diese Eigenschaften sind typische Merkmale für *Aplysina insularis* (Durchassaing & Michelotti, 1864), welcher als verkümmerte Wuchsform von *Aplysina fistularis* (Pallas, 1766) gilt (van Soest, 1998).

Eine Probe dieses Schwammes ist im Zoologischen Museum von Amsterdam unter der Registriernummer ZMA POR 11059 hinterlegt.

2.1.2 *Aplysina cauliformis* (Carter, 1882)



Abb. 2.1-1: *Aplysina cauliformis*

Stamm:	Porifera
Klasse:	Demospongia
Ordnung:	Verongida
Familie:	Aplysinidae
Gattung:	<i>Aplysina</i>

Wie auch der Gelbe Tubenschwamm (s. 2.1.1) wurde der Rauhporige Seilschwamm oder Lavendel-Fingerschwamm im August 1995 von Herrn Dr. Arno Kunze auf den Bahamas gesammelt. Die Sammlung erfolgte im gleichen Gebiet wie beim Gelben Tubenschwamm (s. 2.1.1) in einer Tiefe von 3 Metern.

Dieser im natürlichen Habitat außen violett und im Inneren gelb gefärbte, verzweigte Fingerschwamm zeigt gewöhnlich sowohl eine aufrechte sowie kriechende Wuchsform. Seine harte Oberfläche fühlt sich aufgrund vieler kleiner kegelartiger Auswüchse rauh an.

Ein zur genauen Identifizierung untersuchter Schwammzweig wies eine Länge von 5 cm und einen Durchmesser von 2 cm auf, und ist unter der Registriernummer ZMA POR 15335 im Zoologischen Museum von Amsterdam hinterlegt. Die Probe zeigte im Inneren wie auf der Oberfläche eine durchgehend schwarze Färbung mit zwei sphinkterartig vertieften Osculi auf

einer Seite. Das Skelett war aus bernsteinfarbenen Sponginfasern mit einem Durchmesser von 90-200 μm zusammengesetzt. Aus diesen Fasern bauten sich dreidimensionale polygonale Maschen mit einer Maschenweite von 600-900 μm auf. Die Fasern waren durch ein zelluläres im durchscheinenden Licht dunkelbraun bis schwarz gefärbtes Mark gekennzeichnet und zeigten einen Durchmesser von 20-40 μm . Als Faser : Mark Verhältnis konnte ein Quotient von 2.6 bis 7 errechnet werden, wobei das Mark 14-40% vom Faserdurchmesser ausmachte.

2.2 Chemikalien

a) Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, ausgenommen den im nächsten Abschnitt angegebenen, wurden in der Reinheitsstufe „pro analysi“ oder einer vergleichbaren Qualität von den gängigen Herstellern, vor allem den Firmen Merck, Sigma, Roth, Fluka u. a., bezogen.

b) Lösungsmittel

Zur Isolierung der Schwamminhaltsstoffe wurden die Lösungsmittel Methanol, Ethylacetat, Aceton, *n*-Butanol und Dichlormethan in technischer Qualität vom Chemischen Institut der Universität Würzburg bezogen und vor Gebrauch destilliert.

Für die biochemischen Untersuchungen notwendiges Methanol wurde in der Qualität Methanol LiChrosolv HPLC der Firma Merck verwendet. Das für die biochemischen Untersuchungen verwendete Wasser wurde vor Gebrauch durch Ionenaustausch über eine NANOpure -Anlage der Firma Barnstead gereinigt.

c) Chromatographiemedien

Dünnschichtchromatographie-Platten (Aluminium)

Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm Merck

Dünnschichtchromatographie-Platten (Glas)

RP-18 F_{254S}, Schichtdicke 0.25 mm Merck

Kieselgel 60, 0.04-0.063 mm Korngröße Merck

Sephadex LH-20, 25-100 μm Korngröße Sigma

LOBAR-Säule, Lichroprep RP-18,

40-63 μm Korngröße, Größe B (25 mm x 310 mm) Merck

PD-10 Fertigsäule, 5 ml Säulenvolumen Pharmacia Biotech

Desalting Fertigsäule, 5 ml Säulenvolumen Pharmacia Biotech

d) HPLC-Fließmittel

Methanol LiChroSolv HPLC

Merck

Phosphorsäure pH 2.0 (=0.15%ig): NANOpore -Wasser (s. b) mit *ortho*-Phosphorsäure 85% (Fa. Merck) auf einen pH-Wert von 2.0 eingestellt

e) Puffersysteme

Ammoniak-Puffer	Kaliumphosphat-Puffer
Citrat-Puffer	Piperazin-Puffer
HEPES-Puffer	Tris/HCl-Puffer

Alle Puffer wurden bei Raumtemperatur mit NANOpore -Wasser (s. b) als Lösungsmittel hergestellt. Zunächst wurde die benötigte Menge Puffersubstanz in 90% des Endvolumens gelöst und anschließend auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit Hilfe einer kalibrierten pH-Elektrode durch Zugabe von 0.5 N HCl bzw. 0.5 N NaOH unter Rühren der Lösung auf einem Magnetrührer. Nach erfolgter Einstellung wurde auf 100% des Endvolumens mit NANOpore -Wasser aufgefüllt.

2.3 Geräte

Fraktionssammler	ISCO Cygnet Pharmacia LKB RediFrac
Gefriertrockner	Christ Alpha 2-4 mit Anlagensteuerung LDC-1M Drehschiebervakuumpumpe DUO 004 B (Fa. Balzers)
Heizblock	2099-DA (Fa. Liebisch)
Injektionsspritzen	Duratec, Hamilton
Kaffeemühle	Braun
Mixer	8010-G (Fa. Waring)
Magnetrührer	Cenco
Niederdruck-Pumpe	Duramat (Fa. ProMinent)
pH-Meßsystem	Digital-pH-Meter 646 mit Elektrode WTW pH350 (Fa. Knick)
Rotationsverdampfer	Büchi Rotavapor RE 111
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 102
UV-Lampen	Camag (Wellenlängen: 254 und 366 nm)
UV/Vis-Spektralphotometer	Perkin-Elmer Lambda 2 mit Software PECSS

	Version 3.3
Vakuumfiltration	Supelco
Waagen	Mettler AT 200
	Mettler AT 250
	Mettler PE 1600
Zentrifugen	Laborzentrifuge Sigma 2-15 (7826 x g)
	Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed
	Centrifuge mit Rotor SS-34 (Fa. Du Pont)

HPLC-Anlagen:

HPLC-Anlage, Firma Knauer:

- ◆ Steuereinheit (HPLC-Programmer 50)
- ◆ 2 Fließmittelpumpen (HPLC Pump 64)
- ◆ hochdruckseitiger Gradientenmischer
- ◆ Injektoreinheit mit 20 µl Probenschleife
- ◆ UV-Festwellenlängendetektor (Variable wavelength UV Monitor 655A der Firma Merck/Hitachi)
- ◆ Schreiber und Integrator (Shimazu Chromatopac C-R6A)

HPLC-Anlage, Firma Gynkotek:

- ◆ Steuerung und Auswertung (PC mit Gynkosoft Software, Version 5.5)
- ◆ niederdruckseitiger Gradientenmischer und Fließmittelentgaser (Degasser GT-103)
- ◆ Fließmittelpumpe (M 480)
- ◆ Probengeber mit variablen Dosierungseinrichtung für Volumina von 10 bis 250 µl (GINA 50)
- ◆ Photodiodenarraydetektor (UVD 340S)
- ◆ Schreiber (Firma NEC P60)
- ◆ Säulenofen (Firma Knauer A0585, Temperierung stets auf 20°C)

2.4 Chromatographische Methoden

2.4.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Dünnschichtchromatographie sowohl in der Naturstoffisolierung wie auch in der biochemischen Untersuchung der ausgewählten Schwämme eingesetzt.

Sie fand in der Naturstoffisolierung ihren Einsatz als schnelle und einfach zu handhabende Methode, um Fließmittelzusammensetzungen, Extraktzusammensetzungen sowie den Reinheitsgrad durch Säulenchromatographie erhaltener Fraktionen zu überprüfen. In der biochemischen Untersuchung der enzymatischen Abwehrreaktion in *Aplysina*-Schwämmen wurde die DC genutzt, um eine qualitative Bestimmung der Substratumsetzung durchzuführen.

Im Rahmen der Isolierungsarbeiten wurden beide der unter 2.2 aufgeführten DC-Plattentypen herangezogen und mit Fließmittelgemischen entwickelt, die denen der jeweils zu überprüfenden Säulentrennung entsprach. Hierbei wurden die DC-Platten entsprechend dem verwendeten Säulenmaterial ausgewählt. In allen Fällen wurden die DC-Kammern mit einem Fließmittelvolumen so beschickt, daß ein Flüssigkeitsstand von 0.5 cm erreicht wurde mit anschließender 30minütiger Kammersättigung. Die Laufhöhe der auf 10 cm Höhe zurecht geschnittenen DC-Platten betrug 8 bis 9 cm. Nach Entwicklung und Trocknung der DC-Platten wurde bei 254 und 366 nm detektiert. In einzelnen Fällen wurde zur Identifizierung der stickstoffhaltigen Verbindungen mit Dragendorffs Reagens besprüht.

Bei der DC-Anwendung während der biochemischen Arbeiten wurde ausschließlich auf ein Fließmittel („Fließmittel S“ nach Teeyapant, 1994) zurückgegriffen, das sich wie folgt zusammensetzte:

Ethylacetat	:	Methanol	:	Wasser	:	Eisessig
100		13.5		9		1

Unter Verwendung dieses Fließmittels konnte für das eingesetzte Substrat Aeroplysinin-1 einen R_f -Wert von 0.8 und für das entstehende Produkt Dienon einen R_f -Wert von 0.6 reproduzierbar erhalten werden. Es wurde im übrigen verfahren wie oben beschrieben, mit der Ausnahme, daß ausschließlich bei 254 nm detektiert wurde.

Dragendorffs Reagens R (EuAB 1997):

Zu einer Mischung von 0.85 g basischem Bismutnitrat, 40 ml Wasser und 10 ml Essigsäure 98% wurden 20 ml Kaliumiodidlösung 40% hinzu gegeben und beide Lösungen miteinander vermischt.

2.4.2 Säulenchromatographie

2.4.2.1 Normalphasen-Chromatographie

Nach Vortrennung des Schwammrohextrakts durch Flüssig-Flüssig-Verteilung wurde die erhaltene *n*-Butanol- bzw. Ethylacetat-Phase zur ersten Trennung jeweils an einer Kieselgelsäule chromatographiert. Die Säulen hatten einen Innendurchmesser von 5 cm und eine Länge von 100 cm, wovon jedoch nur ca. 75 cm mit Kieselgel (s. 2.2) gepackt wurden. Als Laufmittel wurde ein Gemisch aus Dichlormethan und Methanol verwendet. Für die *n*-Butanol-Phase wurde eine Zusammensetzung von 1:1, für die Ethylacetat-Phase eine Zusammensetzung von 95:5 gewählt.

2.4.2.2 Gelpermeations-Chromatographie

Als zweiter Schritt folgte eine Auftrennung einzelner Fraktionen der Kieselgel-Trennung mit Hilfe einer Gelpermeations- oder Größenausschluß-Chromatographie, welche mit einer Säule der gleichen Länge und des gleichen Innendurchmessers wie unter 2.4.2.1 beschrieben durchgeführt wurde. Die Säule war bis auf eine Höhe von ca. 75 cm mit Sephadex -Material (s. 2.2) gepackt und wurde mit einem Gemisch aus Dichlormethan/Methanol (1:1) chromatographiert.

2.4.2.3 Umkehrphasen-Chromatographie

Bereits vortrennte Fraktionen wurden mit dieser chromatographischen Methode weiter aufgereinigt. Besonders geeignet für diese Verfahren sind polare Fraktionen bzw. Substanzgemische, die sich über Kieselgel- und Gelpermeationssäulen nicht mehr weiter aufreinigen lassen. Als Säulen wurden vorgepackte RP-18 Lobar -Säulen (s. 2.2) mit einem Laufmittelgemisch von Methanol und Wasser hatten verwendet (s. 2.5.1.2). Ein Zusatz von Trifluoressigsäure (TFA) in einer Konzentration von 0.5 % zum Laufmittel diente einer verbesserten Auftrennung der Substanzen.

2.4.3 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die HPLC ausschließlich für analytische Zwecke wie zum Beispiel Überprüfung einzelner Fraktionen während der Isolierung und Aufreinigung von Schwamm-inhaltsstoffen genutzt. Neben der Reinheitsprüfung isolierter Verbindungen wurde

die HPLC auch für Substanz- und Extraktanalysen anhand von UV-Spektren-Vergleichen mit einer Spektrenbibliothek herangezogen.

In der Regel wurden Proben zunächst in Methanol aufgenommen oder verdünnt und 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend stets in einem Volumen von 20 µl in die HPLC-Anlage injiziert. Als Trennsäule diente in allen Fällen eine Vertexsäule Eurospher 100-C18 (125 x 4 mm ID, Korngröße 5 µm, Firma Knauer) in Kombination mit einer Vertexvorsäule Eurospher 100-C18 (5 x 4 mm ID, Korngröße 5 µm, Firma Knauer). Die aufgetragenen Schwamminhaltsstoffe wurden mit verschiedenen Fließmittelgradienten und einer Flußrate von 1 ml min⁻¹ von der Säule eluiert. Als Elutionsmittelsystem kamen Phosphorsäure pH 2.0 als Elutionsmittel A (s. 2.2) und Methanol als Elutionsmittel B (s. 2.2) zum Einsatz. Die Detektionswellenlängen der Gynkotek-HPLC-Anlage lagen bei 210, 254, 280 und 366 nm, die der Knauer-Anlage befanden sich bei 254, 260 und 282 nm. Während die Trennsäule bei der Gynkotek-Anlage dank eines Säulenofens konstant auf 20°C gehalten werden konnte, war die Trennsäule der Knauer-Anlage der jeweiligen Raumtemperatur ausgesetzt.

Während der Isolierung der Sekundärstoffe aus *Aplysina insularis* wurde folgender Gradient verwendet:

Zeit	Elutionsmittel A	Elutionsmittel B
[min]	[%]	[%]
0	90	10
5	90	10
40	0	100
45	0	100

Bei allen biochemischen Untersuchungen zur enzymatischen Abwehrreaktion in *Aplysina cauliformis* wurde nachstehender Gradient gewählt:

Zeit	Elutionsmittel A	Elutionsmittel B
[min]	[%]	[%]
0	90	10
2	90	10
18	0	100
23	0	100

2.5 Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus dem marinen Schwamm *Aplysina insularis*

Zur Auswahl des geeigneten Schwammmaterials für die Naturstoffisolierung standen insgesamt 55 Spezies zur Verfügung, die auf einer Sammelreise durch die Karibik im August 1995 von Dr. Arno Kunze gesammelt und identifiziert wurden. Diese 55 Arten gehörten den Schwammfamilien Aplysinellidae und Aplysinidae an. Während *Aiolochoia crassa* den einzigen Vertreter der Aplysinellidae darstellte, wurden aus der Familie der Aplysinidae die Vertreter *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Aplysina lacunosa*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina archeri*, *Verongula gigantea* und *Verongula rigida* auf ihre Rohextraktzusammensetzung hin untersucht.

Hierzu wurden kleine Proben gefriergetrockneten Schwammmaterials (200 mg) mit Methanol (50 ml) mehrere Stunden unter Rühren extrahiert, anschließend der Extrakt vom unlöslichen Rückstand durch Filtration abgetrennt und nach Zentrifugation bei 10.000 rpm mittels HPLC (2.4.3) analysiert.

2.5.1 Isolierungsschema der Sekundärmetabolite

2.5.1.1 Extraktionsmethode

Eine Menge von 112.3 g tiefgefrorenen Schwamms wurde über 70 Stunden gefriergetrocknet und ergab 17.6 g nach vollständigem Entzug des Wassers. Das gefriergetrocknete Material wurde mit einem Messer in 1-2 cm große Stücke geschnitten, pulverisiert und anschließend für jeweils mehrere Stunden unter Rühren dreimal mit 300 ml Methanol extrahiert. Nach dem Filtrieren wurde der so erhaltene Extrakt unter vermindertem Druck am Rotavapor zur Trockene eingengt.

2.5.1.2 Isolierung der Sekundärmetabolite

Der zur Trockene eingengte Rohextrakt wurde in 200 ml Wasser aufgenommen und gegen Ethylacetat (5 x 200 ml) ausgeschüttelt. Im Anschluß wurde die Wasser-Phase mit wassergesättigtem *n*-Butanol (5 x 200 ml) extrahiert. Nachdem die beiden organischen Extrakte am Rotavapor zur Trockene eingengt worden waren, erfolgte deren Auswaage (EtOAc, 1.2 g und Butanol, 1.2 g) und weitere Auftrennung.

Aufarbeitung der *n*-BuOH-Phase:

Zunächst erfolgte eine Vortrennung des Butanolextrakts über eine Sephadex-Säule (CH₂Cl₂/MeOH, 1:1). Alle erhaltenen Fraktionen dieser Trennung wurden vereinigt und weiter über eine Kieselgel-Säule gereinigt (CH₂Cl₂/MeOH, 80:20). Von den 6 erhaltenen Fraktionen wurden 4 nochmals über eine Sephadex-Säule mit Methanol als Fließmittel

gereinigt. Die erhaltenen Fraktionen wurden nachfolgend durch Mehrfach-Chromatographie über RP-18 Kieselgel-Säulen aufgereinigt (MeOH/H₂O, 1:1). Dabei wurden Aerophobin-1 (40.3 mg isolierte Menge, 0.36% des Frischgewichts), 2-(3,5-di-brom-4-methoxyphenyl)ethyltrimethylammoniumchlorid (33.7 mg, 0.030%), Purealidin L (29.3 mg, 0.026%), Aerophobin-2 (21.7 mg, 0.020%), 14-oxo-Aerophobin-2 (11.2 mg, 0.010%), Aplysinaminisin-2 (4.5 mg, 0.004%) und Aplysinaminisin-1 (3.4 mg, 0.003%) als Reinsubstanzen erhalten.

Aufarbeitung der EtOAc-Phase:

Eine erste Vortrennung erfolgte über eine Kieselgel-Säule (CH₂Cl₂/MeOH, 95:5), die nach dem Erhalt von 9 Fraktionen von einer weiteren Reinigung der Fraktionen 2-9 über eine Sephadex-Säule (CH₂Cl₂/MeOH, 1:1) gefolgt wurde. Die erhaltenen Fraktionen wurden mit Hilfe von RP-18 Kieselgel-Säulen (MeOH/H₂O/TFA; 80:20:0.01, 80:20:0, 70:30:0) durch mehrfache Chromatographie aufgereinigt. Bei dieser Reinigung wurden Aerothionin (91.8 mg, 0.083%), Fistularin-3 (72.4 mg, 0.065%), 11-oxo-Aerothionin (8.0 mg, 0.007%), 11-hydroxy-Aerothionin (7.4 mg, 0.007%), *p*-hydroxy-Benzoesäureethylester (4.2 mg, 0.004%), 11,19-dideoxy-Fistularin-3 (3.2 mg, 0.003%) und 7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat (3.2 mg, 0.003%) als Reinsubstanzen erhalten.

Die Detektion und Analyse der jeweiligen Fraktionen wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie an Kieselgel-Platten durchgeführt. Als Fließmittelgemische wurden die mobilen Phasen (CH₂Cl₂/MeOH) der jeweiligen Säulentrennung verwendet. Nach Entwicklung der DC-Platten wurde bei den Wellenlängen von 254 und 366 nm detektiert.

2.5.2 Strukturaufklärung der isolierten Sekundärmetabolite

2.5.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Als erster Schritt in der Strukturaufklärung diente der Vergleich von UV/Vis-Spektren isolierter Schwamminhaltsstoffe mit UV/Vis-Spektren einer Spektrenbibliothek der Gynkotek-HPLC-Anlage. In dieser Bibliothek konnte auf die UV/Vis-Spektren von ca. 80 reinen, strukturell bereits bekannten marinen Naturstoffen der Arbeitsgruppe von Professor Proksch zurückgegriffen werden. Durch mathematischen Vergleich der ersten und zweiten Ableitungen der Funktionen der Bibliotheksspektren mit denen der isolierten Inhaltsstoffe konnten unbekannte von bereits bekannten Sekundärmetaboliten unterschieden werden.

2.5.2.2 Massenspektroskopie (MS)

Zur Feststellung der Masse der isolierten Naturstoffe kamen drei Meßmethoden zum Einsatz das **FAB-MS**, das **APCI-MS** und das **ESI-MS**.

Die **FAB-Spektren** (**f**ast **a**tom **b**ombardment) wurden an einem Finnigan MAT 8430 Massenspektrometer bei Dr. Ludger Witte am Institut für Organische Chemie der Universität Braunschweig aufgenommen.

Bei dieser Methode werden die Proben in einer Glycerin-Matrix gelöst und mit einem Strahl schneller Xenon-Atome von hoher Energie (6 - 9 keV) beschossen. Besonders gut geeignet ist diese Technik für Moleküle mit großem Molekulargewicht bzw. mit einem hohen Anteil polarer funktioneller Gruppen.

Die **APCI-Spektren** (**a**tmospheric **p**ressure **c**hemical **i**onization) wurden an einem Finnigan MAT TSQ-7000 Massenspektrometer am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg aufgenommen. Diese sanfte Methode ist besonders gut für polare Substanzen geeignet, deren Molmasse aus Flüssigkeitsströmen wie z.B. aus laufenden Flüssigchromatographieanalysen bestimmt werden soll. Bei APCI-MS wird mit einer angelegten Dauerhochspannung gearbeitet.

Die methanolischen Lösungen der zu vermessenden Substanzen wurden direkt in das Massenspektrometer injiziert. Bei der anschließenden Messung wurde eine Temperatur von 200°C und eine Spannung von 4 eV im System angelegt.

ESI-Spektren (**e**lektrospray **i**onisation) wurden an einem Finnigan MAT TSQ-7000 Massenspektrometer am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Universität Würzburg aufgenommen. Diese Meßmethode ist ausgesprochen gut für polare, leicht ionisierbare Moleküle mit einer Molmasse über 100000 Dalton, wie z.B. Proteine und Nucleotide geeignet.

Lösungen der zu vermessenden Stoffe wurden mit reinem Methanol hergestellt und direkt in den Massenspektrometer injiziert. Bei einer Temperatur von 200°C und einer Spannung von 20 eV wurden anschließend die Messungen durchgeführt. In den meisten Fällen erscheint der Molekülpeak bei dieser Methode als größtes Signal, woraus sich die Möglichkeit zu MS/MS-Experimenten ergibt. Hierbei wird ein zweites Massenspektrum mit einem oder mehreren Ionenfragmenten eines Molekül-Ions aus dem Ursprungsspektrum durch Abspaltung funktioneller Gruppen erhalten. Um diese speziellen Ionenfragmente zu erhalten, muß bei der Fragmentierung das Molekül-Ion im Ursprungsspektrum fokussiert werden.

Im Fall einiger Enzymexperimente wurden Proben mit einem Gehalt von unter 1 mg interessanter Substanz mit Hilfe der HPLC/ESI-MS untersucht. Hierzu wurde eine Eurospher 100-C18 RP-Säule (60 x 2 mm ID, Firma Knauer) als Trennmedium für die untersuchten Substanzgemische verwendet. Es wurde der Standardgradient für die biochemischen Untersuchungen (s. 2.4.3) mit einer Flußrate von 0.2 ml/min gewählt. Die Detektionswellenlänge betrug 254 nm.

2.5.2.3 NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen (**nuclear magnetic resonance**) wurden sämtlich bei Dr. Viktor Wray in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig durchgeführt.

Zum Einsatz bei ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren kamen die NMR-Spektrometer Bruker DPX 300, ARX 400 und AVANCE DMX 600-jeweils bei einer Temperatur von 300 K. Mit Hilfe der Standardsoftware der Firma Bruker wurden Messungen für 1D- und 2D-NMR-Spektren durchgeführt. Zur Vermessung wurden die Proben in deuteriertem Lösungsmittel aufgenommen. Die chemische Verschiebung wurde innerhalb δ -Skala (bezogen auf TMS als Standard) in ppm aufgezeichnet, während die Kopplungskonstanten in Hertz (Hz) angegeben wurden.

Zur Aufklärung der Molekularstruktur der isolierten Sekundärmetabolite kamen im Rahmen der NMR-Untersuchungen unterschiedliche Meßtechniken zum Einsatz. Das **DEPT**-Spektrum (**d**istortionless **e**nhancement by **p**olarization **t**ransfer) gibt Aufschluß über die Multiplizität von Kohlenstoffatomen und ermöglicht somit die Identifizierung von Dupletts (CH), Tripletts (CH₂) und Quartetts (CH₃). ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren wurden sowohl eindimensional als auch zweidimensional als $^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY- und $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -COSY-Spektren aufgenommen.

2.5.2.4 CD-Spektroskopie

CD-Spektren (**circular dichroism**) wurden an einem Spektrometer CD 6 der Firma Jobin Yvon am Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg aufgenommen.

In der CD-Spektrometrie wird die unterschiedliche Fähigkeit von Molekülen, links und rechts polarisiertes Licht zu absorbieren, untersucht. Die zu vermessenden Substanzen wurden als methanolische Lösung in einer Konzentration von 0.1 mg/ml eingesetzt. Zur Messung wurden Glasküvetten mit einer Schichtdicke von 0.1 und 0.2 cm in Abhängigkeit der Intensität der resultierenden Spektren verwendet. Zur Berechnung und zum Ausdruck der

Spektren wurde die Standard-Software der Firma Jobin Yvon (Dicrograph Version 1.2) verwendet.

2.6 Untersuchungen zur Enzymatik der wundinduzierten Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina* am Beispiel *Aplysina cauliformis*

2.6.1 Vorbereitung und Aufarbeitung des Schwammmaterials

2.6.1.1 Rohextraktgewinnung

Das pulverisierte gefriergetrocknete Schwammmaterial (s. 2.1), in der Regel 2.5 g bzw. 5.0 g, wurde zunächst mit einer geringen Menge Seesand bei 4°C in einem vorgekühlten Mörser verrieben. Nach Zugabe von gekühltem Extraktionspuffer (10 ml bzw. 20 ml) wurde dreimal kräftig gemörkert, wobei man den Ansatz nach jedem Mörsern 5 min im Kühlschrank ruhen ließ. Anschließend wurde der Ansatz in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Hierzu wurde ein Spatel zu Hilfe genommen und der Mörser gegebenenfalls mit geringen Volumina Puffer nachgespült. Der Ansatz wurde bei 4°C und 12500 rpm für 30 min zentrifugiert. Für die folgende Entsalzung (s. 2.6.1.2) wurde der resultierende Überstand als Rohextrakt verwendet, während das Pellet verworfen wurde.

Als Standard-Puffersystem wurde für die Experimente, die das Aerophobin-abbauende Enzym betrafen (s. 2.6.4), ein 50 mM Piperazin-Puffer mit pH 5.77 verwendet, während für alle Untersuchungen, die die Nitrilhydratase betrafen, ein 100 mM HEPES-Puffer mit pH 7.5 eingesetzt wurde. Abweichungen von diesen Standard-Puffersystemen sind jeweils vermerkt.

2.6.1.2 Rohextraktentsalzung

Die zur Entsalzung verwendeten PD-10-Säulen wurden mit mindestens 25 ml, entsprechend 5 Säulenvolumina, des verwendeten Extraktionspuffers äquilibriert. Danach wurden 2.5 ml Rohextrakt je Säule aufgetragen und das anfallende Eluat verworfen. Um den entsalzten Rohextrakt zu erhalten, wurden 3.5 ml Extraktionspuffer aufgetragen und das Eluat diesmal nicht verworfen, sondern gesammelt und als "Enzymextrakt" für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Regeneration der Säulen erfolgte durch Spülen mit 10 ml des entsprechenden Puffers, anschließende Reinigung mit 10 ml 0.1 N NaOH und darauf folgendes Waschen mit 25 ml Nanopore-Wasser. Die Lagerung der Säulen fand bei 4°C in einem mit NaN_3 konserviertem Puffer statt.

Nach Herstellerangaben weisen die Säulen eine Ausschlußgröße von 10000 Dalton auf, so daß vom Säulenmaterial alle Substanzen mit einem größeren Molekulargewicht zunächst zurückgehalten werden, während Salze, niedermolekulare Proteine und andere Substanzen abgetrennt werden. Im Vergleich zum Rohextrakt zeigt der entsalzte Enzymextrakt eine 1.4 fache Verdünnung.

2.6.1.3 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts des Rohextrakts (s. 2.6.1.2) sowie des entsalzten Rohextrakts (s. 2.6.1.3) des Schwamms *Aplysina cauliformis* wurde die Methode nach Bradford gewählt (in Anlehnung an Bradford, 1976).

Zusammensetzung der Reagenslösung:

Um eine Lösung von 100 ml herzustellen wurden 10 mg Coomassie Brillantblau G-250 in 5 ml Ethanol 96% und 10 ml *ortho*-Phosphorsäure 85% gelöst, mit Wasser zu 100 ml verdünnt und filtriert.

Gehaltsbestimmung:

Zur Berechnung des Gehalts der Extrakte wurde eine Kalibriergerade aus 9 unterschiedlich konzentrierten Lösungen (0.003 bis 0.2 mg/ml) von Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin, Sigma[®]) im entsprechenden Puffer herangezogen.

Durchgeführter Assay:

Zu jeweils 50 µl der vorbereiteten Enzymextrakte wurden 2000 µl Reagenslösung hinzugegeben. Die Messung der UV-Absorption bei 595 nm erfolgte gegen einen Blindwert innerhalb einer Zeit von 10 bis 40 min. Beim Blindwert wurden 50 µl des verwendeten Puffers anstelle des Enzymextrakts verwendet.

Die untersuchten Enzymextrakte wurden als 1:100- und 1:50-Verdünnungen (mit dem verwendeten Puffer) für die Proteinbestimmung eingesetzt.

2.6.2 Nachweis der Enzymaktivität

2.6.2.1 Isoxazolin-spaltendes Enzym

2.6.2.1.1 Herstellung der Substratlösungen

Die natürlichen Substrate Isofistularin-3 und Aerophobin-2 sowie alle synthetischen Substrate wurden jeweils als methanolische Lösungen in einer Konzentration von 10 mg/ml

im *In-vitro*-Assay eingesetzt, entsprechend 8.98×10^{-3} mmol/ml für Isofistularin-3 und 1.98×10^{-2} mmol/ml für Aerophobin-2. Im Fall der Bestimmung der kinetischen Kenndaten K_m und V_{max} wurden wässrige Aerophobin-2-Lösungen zur Untersuchung eingesetzt.

2.6.2.1.2 Durchführung des *In-vitro*-Assays

Bei der Durchführung des Standard-*In-vitro*-Assays wurde mit Hilfe einer Eppendorf-Multipette zu jeweils 32 μ l Enzymextrakt 8 μ l Substratlösung in ein Eppendorf-Reagiergefäß hinzupipettiert. Um eine Durchmischung der Lösungen zu erreichen, wurde für 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert.

Der homogen durchmischte Reaktionsansatz wurde in einem temperierten Heizblock für exakt 20 min bei 50°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das Eppendorf-Reagiergefäß in flüssigen Stickstoff eingebracht.

Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem das Volumen des Enzymextrakts durch das gleiche Volumen des entsprechenden Extraktionspuffers ersetzt wurde.

2.6.2.1.3 HPLC-Nachweis der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde über die Abnahme des angebotenen Substrats ermittelt. Hierzu wurde der Ansatz nach Ablauf des Assays mit 400 μ l Methanol versetzt, ca. 1 min im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert, um denaturierte Proteine und suspendierte Partikel zu entfernen, welche die HPLC-Aufarbeitung stören könnten. 20 μ l des so gewonnenen Überstandes wurden zur HPLC-Analyse verwendet und nach der unter 2.4.3 dargestellten Methode chromatographiert.

2.6.2.2 Nitrilhydratase

2.6.2.2.1 Herstellung der Substratlösungen

Das verwendete natürliche Substrat Aeroplysinin-1 sowie die eingesetzten synthetischen Substrate wurden als methanolische Lösungen in einer Konzentration von 10 mg/ml im *In-vitro*-Assay eingesetzt.

2.6.2.2.2 Durchführung des *In-vitro*-Assays

Bei der Durchführung des Standard-*In-vitro*-Assays wurde mit Hilfe einer Eppendorf-Multipette zu jeweils 8 μ l Substratlösung 32 μ l Enzymextrakt in ein Eppendorf-Reagiergefäß hinzupipettiert, sodass beim Pipettieren gleichzeitig eine Durchmischung stattfand.

Der durchmischte Reaktionsansatz wurde für exakt 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das Eppendorf-Reagiergefäß in flüssigen Stickstoff eingebracht.

Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem das Volumen des entsalzten Enzymextrakts durch ein gleiches Volumen des entsprechenden Extraktions- bzw. Reaktionspuffers ersetzt wurde.

2.6.2.2.3 DC-Nachweis der Enzymaktivität

Zum schnellen, jedoch nicht exakt quantifizierbaren Nachweis der Enzymaktivität wurden nach Ablauf des Assays 4 µl des Reaktionsgemisches punktförmig mit einer Hamiltonspritze auf eine DC-Alufolie Kieselgel pipettiert. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels mit Hilfe eines Föns wurde die Platte über eine Laufstrecke von ca. 8 cm entwickelt. Bei einer Wellenlänge von 254 nm wurde nach Verdampfen des Fließmittels unter einer UV-Lampe detektiert. Das gebildete Reaktionsprodukt Dienon und das Substrat Aerolpysin-1 konnten jeweils anhand einer Fluoreszenzlöschung im Vergleich mit einer methanolischen Lösung der Reinsubstanz nachgewiesen werden (vgl. 2.4.1).

2.6.2.2.4 HPLC-Nachweis der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität wurde über die Abnahme des angebotenen Substrats ermittelt. Hierzu wurde der Ansatz nach Ablauf des Assays mit 400 µl MeOH (oder einem Gemisch aus 50 µl 0.5 N HCl und 350 µl MeOH) versetzt, ca. 1 min im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert, um denaturierte Proteine und suspendierte Partikel zu entfernen, welche die HPLC-Aufarbeitung stören könnten. 20 µl des so gewonnenen Überstandes wurden zur HPLC-Analyse verwendet und nach der unter 2.4.3 dargestellten Methode chromatographiert.

2.6.3 Auswahl des Schwammaterials

Aus der Familie der Aplysiniidae standen insgesamt sieben Arten unterschiedlicher Herkunft für eine eingehende Untersuchung zur Verfügung (s. Tab. 2.6-1). Stichproben der untersuchten Schwämme wurden wie unter 2.1 beschrieben behandelt, um so die zur Auswahl nötigen Enzymextrakte in Piperazin-Standardpuffer (s. 2.6.1.1) zu gewinnen. Jeder dieser Extrakte wurde im *In-vitro*-Assay (s. 2.6.2.1.2) mit Aerolpysin-1 als Substrat (s. 2.6.2.1.1) auf seine Fähigkeit hin getestet, Aerolpysin-1 zu Dienon abzubauen. Anhand der dünn-schichtchromatographischen Nachweismethode (s. 2.6.2.2.3) wurden die Enzymaktivitäten der einzelnen Schwammextrakte festgestellt und gegeneinander abgewogen.

Art	Herkunft
<i>Aplysina aerophoba</i>	Mittelmeer
<i>Aplysina archeri</i>	Bahamas
<i>Aplysina cauliformis</i>	Bahamas
<i>Aplysina cavernicola</i>	Mittelmeer
<i>Aplysina fistularis</i>	Bahamas
<i>Aplysina fulva</i>	Bahamas
<i>Aplysina lacunosa</i>	Bahamas

Tab. 2.6-1 Auf Enzymaktivität getestetes Schwammmaterial aus der Familie der Aplysinidae.

2.6.4 Charakterisierung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms

2.6.4.1 Temperatur-Optimum

Zunächst wurden 32 µl des Enzymextrakts in ein Reagiergefäß pipettiert und dieses verschlossen bei der jeweiligen Temperatur in einem Heizblock 5 min vorinkubiert. Im Anschluß wurden 8 µl Isofistularin-3-Lösung (s. 2.6.2.1.1) hinzugegeben, der gesamte Ansatz durch leichtes Klopfen des Reagiergefäßbodens vorsichtig gemischt und für 10 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Reagiergefäß in flüssigen Stickstoff gegeben, um die Reaktion abzustoppen. Zur HPLC-Analyse (s. 2.4.3) wurde die Probe wie unter 2.6.2.1.3 beschrieben behandelt.

Um den Enzymextrakt über einen möglichst großen Temperaturbereich zu untersuchen, wurden folgende Temperaturen für die Versuchsreihe gewählt:

10°C 20°C 30°C 40°C 45°C 50°C 55°C 60°C 70°C 80°C 90°C

Für jede Temperatur wurde ein Dreifachansatz mit jeweils drei Kontrollen getestet, um sicher zu stellen, daß die Umsetzung nicht aufgrund einer chemischen Zersetzung des Substrats bei erhöhten Temperaturen stattfand.

2.6.4.2 pH-Optimum

Ausgehend von einem Enzymextrakt in Piperazin-Standardpuffer (vgl. 2.6.1.2) kamen folgende Puffersysteme in einer Konzentration von 100 mM zur Anwendung:

- ◆ Citrat-Puffer: pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5
- ◆ Kaliumphosphat-Puffer: pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0
- ◆ Tris/HCl-Puffer: pH 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0

Abweichend vom Standard *In-vitro*-Assay (s. 2.6.2.1.2) wurden mehrere Änderungen vorgenommen. Zunächst wurden 32 µl Enzymextrakt mit jeweils 200 µl des entsprechenden Puffers in einem geschlossenem Reagiergefäß 5 min bei 50°C in einem Heizblock vorinkubiert, bevor 8 µl Isofistularin-3-Lösung (s. 2.6.2.1.1) hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde durch kurzes Schütteln gemischt und 10 min bei 50°C inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch flüssigen Stickstoff (s. 2.6.2.1.2). Im Anschluß wurden 20 µl 0.5 N HCl zugegeben, um den pH-Wert bei neutral bis schwach alkalischen Ansätzen in einen schwach sauren bzw. neutralen Bereich zu verschieben. Diese Maßnahme wurde durchgeführt, um eine Schädigung des HPLC-Säulenmaterials bei der anschließenden HPLC-Analyse zu verhindern. Im weiteren wurden 400 µl MeOH hinzupipettiert und der Ansatz behandelt wie unter 2.6.2.1.3.

Jeder der aufgeführten pH-Werte wurde im Dreifachansatz mit Dreifachkontrolle (s. 2.6.2.1.2) auf Enzymaktivität hin untersucht.

Das Pipettierschema in der Übersicht:

- ◆ 32 µl Enzymextrakt
- ◆ 200 µl 100mM Puffer
- ◆ 5 min Vorinkubation
- ◆ 8 µl Isofistularin-3-Lösung
- ◆ 10 min Inkubation
- ◆ 20 µl 0.5 N HCl
- ◆ 400 µl MeOH

2.6.4.3 Alternative enzymatische Amidumsetzungen

Zur Untersuchung auf Umsetzung der Bromoisoxazolinalkaloide durch Enzyme, die lediglich in der Lage sind, Amidbindungen innerhalb eines Moleküls zu spalten, wurden folgende zwei Amidasen bakterieller Herkunft der Firma SIGMA[®] ausgewählt:

- ◆ Amidase A-6691 aus dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa*
- ◆ Penicillin-Amidase aus dem Bakterium *Escherichia coli*

2.6.4.3.1 Amidase A-6691

Im Fall der Amidase A-6691 wurde ein 20 mM Kaliumphosphat-Puffer mit pH 7.2 als Lösungsmittel für den Assay verwendet. Als Referenz diente eine 29.5 mM Lösung von Benzylpenicillin-G (11 mg/ml, Kaliumphosphat-Puffer). Aerophobin-2 wurde aufgrund seiner relativ guten Wasserlöslichkeit als Substrat für diesen Versuch ausgewählt und ebenfalls in Form einer 29.5 mM (14.9 mg/ml) Kaliumphosphatpufferlösung eingesetzt.

Folgendes Pipettierschema kam zur Anwendung:

- ◆ 5 µl Enzymlösung (= 1.28 units)
- ◆ 50 µl Kaliumphosphat-Puffer pH 7.2
- ◆ 40 µl 29.5 mM Substratlösung (= 1.18 µmol)
- ◆ Inkubation bei 37°C

Die drei bei 37°C in einem Heizblock vorinkubierten Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein Reagiergefäß pipettiert und durch kurzes Schwenken gemischt. Danach wurde bei 37°C in einem Heizblock für 2, 5 und 10 min inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer wurden die Reagiergefäße in Eiswasser eingebracht und die Reaktion gestoppt. Dem anschließenden Zentrifugieren bei 4000 rpm für 2 min folgte die Zugabe von 900 µl MeOH. Nach kurzem Sonifizieren des Ansatzes in Ultraschallbad wurde erneut zentrifugiert (5 min, 10000 rpm), um denaturierte Proteine und suspendierte Partikel zu entfernen. Für die abschließende HPLC-Analyse (s. 2.4.3) wurde der Überstand verwendet.

Für jede Inkubationszeit wurden parallel drei Ansätze und ein Kontrollansatz durchgeführt.

2.6.4.3.2 Penicillin-Amidase

Hier wurden die gleichen Puffersysteme wie unter 2.6.4.3.1 beschrieben verwendet, jedoch mit einem pH von 7.8. Sowohl die Referenzlösung wie auch die Substratlösung waren bis auf die Verwendung des abgeänderten Puffers identisch mit den unter 2.6.4.3.1 beschriebenen.

Das Pipettierschema ergab sich wie folgt:

- ◆ 1 μ l Enzymlösung (= 1.75 units)
- ◆ 50 μ l Kaliumphosphatpuffer pH 7.8
- ◆ 40 μ l 29.5 mM Substratlösung (= 1.18 μ mol)
- ◆ Inkubation bei 37°C

Im weiteren Verlauf wurde wie unter 2.6.4.3.1 beschrieben verfahren.

2.6.4.4 Substratspezifität

Als Substrate für diesen Versuch dienten sowohl Naturstoffisolate aus marinen Schwämmen als auch synthetisch hergestellte Bromoisoxazolinderivate. Der Naturstoff Isofistularin-3 wurde stets als Referenz verwendet und dessen prozentualer Umsatz als Bezug mit 100% festgelegt. In dieser Versuchsreihe wurden sowohl die Referenz als auch alle Substrate als metholische Lösungen mit einer Konzentration von 10 mg/ml eingesetzt (vgl. 2.6.2.1.1). Der Assay wurde wie unter 2.6.2.1.2 beschrieben durchgeführt. Nach Ablauf des Assays wurden die Ansätze wie unter 2.6.2.1.3 beschrieben weiterbehandelt und per HPLC chromatographisch analysiert, die Detektionswellenlängen wurden je nach Absorptionsmaximum des getesteten Substrats ausgewählt.

Alle Substrate (Tab. 2.6-2) wurden in zwei oder drei parallelen Ansätzen gegen ebenfalls zwei bzw. drei Kontrollansätze auf Ihren Umsatz hin untersucht.

Naturstoffsubstrate	synthetische Substrate
Isofistularin-3	4-Bromspiroisoxazolinbromhydrinamid
Isofistularin-3-Derivat*	Spiroisoxazolindiolbenzylamid
Säureamidverbindung	Spiroisoxazolinepoxybisamid
Spiromethylester	PMP-Derivat
B 93/1	Spiroisoxazolindiolpyrrolidinamid
B 94	4-Bromspiroisoxazolinbromhydrin- methylester
	4-Bromspiroisoxazolindiolmethylester
	Spiroisoxazolindiol
	Spiroisoxazolinbromhydrinmethylester
	Spiroisoxazolindiolcarbonsäure

*: partialsynthetisch gewonnenes Produkt von Isofistularin-3 durch Inkubation bei erhöhter Temperatur mit Natriummethanolat

Tab. 2.6-2 Im Assay verwendete Substrate

2.6.4.5 Untersuchungen zur Kinetik

2.6.4.5.1 Umsetzung in deuteriertem Lösungsmittel

Um den Einfluß des Amidstickstoffs in der Seitenkette der Bromisoxazolinalkaloide und speziell des dort gebundenen Wasserstoffatoms auf eine Beteiligung an der enzymatischen Umsetzung hin zu untersuchen, wurde dieser Versuch in Form einer kinetischen Versuchsreihe wie folgt durchgeführt. Zwei Ansätze mit jeweils 1100 µl Enzymextrakt wurden in Eppendorf-Reagiergefäßen gefriergetrocknet und anschließend mit unterschiedlichen Lösungsmitteln auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Wobei ein Ansatz in Nanopore-Wasser (Referenzansatz) und ein Ansatz in D₂O (Versuchsansatz) gelöst wurde. Mit beiden Ansätzen wurde jeweils gleich verfahren.

Um die Kinetik der Umsetzungen zu verfolgen, sollte der Abbau des Substrats nach Ablauf folgender Reaktionszeiten abgestoppt werden:

0.5 min 1 min 2 min 3 min 5 min 10 min 15 min 20 min 30 min

Für jede Reaktionszeit wurden drei Ansätze parallel untersucht. Hierzu wurden zunächst 32 µl des bei 40°C vortemperierten Enzymextrakts in einem Reagiergefäß vorgelegt, anschließend 8 µl Isofistularin-3-Lösung (in deuteriertem MeOH bzw. MeOH, vgl. auch

2.6.2.1.1) direkt hinzupipettiert und bei 40°C in einem Heizblock inkubiert. Die Reagiergefäße befanden sich während des Pipettiervorgangs bereits im Heizblock bei der gewünschten Temperatur. Durch Einpipettieren der Substratlösung in den vorgelegten Enzymextrakt wurde das Mischen der Lösungen miteinander erreicht. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Abstoppen des Umsatzes durch sofortiges Einbringen der Reagiergefäße in flüssigen Stickstoff erreicht. Im Anschluß wurden 400 µl MeOH zugesetzt und die Proben wie unter 2.6.2.1.3 beschrieben weiterbehandelt und per HPLC chromatographisch analysiert.

Als Kontrollen für beide Ansätze dienten je drei Leeransätze, bei denen der jeweilige Puffer als Ersatz für den entsprechenden Enzymextrakt eingesetzt wurde. Die Kontrollansätze zeigten ansonsten in ihrer Zusammensetzung keine Abweichungen und wurden wie oben beschrieben behandelt. Die Inkubationszeit betrug jedoch nur 30 min.

2.6.4.5.2 Kinetische Hemmung

Um eine kinetische Hemmung synthetischer Substrate auf die Isofistularin-3-Umsetzung zu untersuchen, wurden vier Versuche durchgeführt. Hierzu wurden folgende synthetische Bromisoxazolinderivate eingesetzt (Strukturformeln s. 3.2.3):

- ◆ 4-Bromspiroisoxazolinbromhydrinmethylester (XII)
- ◆ 4-Bromspiroisoxazolindiolmethylester (XIV)
- ◆ Spiroisoxazolinbromhydrinmethylester (XVI)
- ◆ Spiroisoxazolindiolbenzylamid (VIII)

Bei allen vier im folgenden aufgeführten Versuchen wurden die synthetischen Alkaloide sowie Isofistularin-3 in einer Konzentration von 10 mg/ml in MeOH eingesetzt (s. 2.6.2.1.1). Daraus ergab sich ein Verhältnis der molaren Konzentrationen von Isofistularin-3 zu den getesteten Substraten von 1:3. Innerhalb einer Zeitreihe wurden bei den Versuchen 1 bis 3 je drei parallele Analysen mit einem Gemisch aus einem Hemmsubstrat und Isofistularin-3 auf den Einfluß des Hemmsubstrats auf den Isofistularin-3-Umsatz bei unterschiedlichen Inkubationszeiten getestet. Als Vergleich dienten drei parallele Isofistularin-3-Ansätze ohne Hemmsubstrat sowie drei parallele Kontrollen mit Isofistularin-3 ohne Hemmsubstrat und ohne Enzymextrakt, wobei das Endvolumen der Vergleichs- und Kontrollansätze durch Ersetzen der entsprechenden Lösungen mit MeOH bzw. Puffer gleich gehalten wurde. Für die Versuche verwendete Enzymextrakte wurden bei der jeweiligen Temperatur 5 min in einem Heizblock vorinkubiert. In Abwandlung zu 2.6.2.1.2 wurde bei allen Versuchen auf das Mischen der Reaktionsansätze vor Inkubation durch Zentrifugieren verzichtet. Dieses wurde

durch schnelles Zupipettieren der Substratlösung direkt in die vortemperierte Enzymlösung hinein erzielt, ohne die Gefäßwand mit Substratlösung zu benetzen.

- Versuch 1: In einem ersten Vorversuch wurde nur der Spiroisoxazolinbromhydrinmethylester als Hemmsubstrat eingesetzt. Die Assays wurden in Anlehnung an 2.6.2.1.2 mit Inkubationszeiten von 0.5 min, 1 min, 5 min, 10 min, 15 min und 20 min durchgeführt.
- Versuch 2: Es wurden die drei ersten aufgeführten Substrate jeweils in Assays nach 2.6.2.1.2 mit Inkubationszeiten von 1 min, 5 min, 10 min und 20 min auf eine hemmende Wirkung hin getestet.
- Versuch 3: Die Substrate 4-Bromspiroisoxazolinolmethylester und 4-Bromspiroisoxazolinbromhydrinmethylester wurden bei einer Temperatur von 35°C nach dem Standardassay (s. 2.6.2.1.2) für 0.5 min, 1 min, 2 min und 5 min auf eine Hemmwirkung hin untersucht.
- Versuch 4: Spiroisoxazolinolbenzylamid wurde in einer Einzelmessung nach 2.6.2.1.2 nur bei einer Zeit von 20 min im Gemisch mit Isofistularin-3 getestet. Für diesen Versuch wurde nur ein doppelter Ansatz durchgeführt.

Nach Durchführung der Versuche wurden die Ansätze nach 2.6.2.1.3 weiterbehandelt und mittels HPLC chromatographisch analysiert.

2.6.4.5.3 Bestimmung der V_{max} - und K_m -Werte

Bei diesem Versuch wurde der Schwamminhaltsstoff Aerophobin-2 aufgrund seiner relativ guten Wasserlöslichkeit ausgewählt, um in folgenden fünf Konzentrationen als Substrat getestet zu werden:

1.31 mM 2.63 mM 5.25 mM 10.5 mM 20.99 mM

Im Assay lag das Substrat durch die Zugabe der übrigen Reagenzien in den entsprechenden verdünnten Konzentrationen vor:

0.262 mM 0.526 mM 1.05 mM 2.10 mM 4.20 mM

Als Lösungsmittel diente der gleiche Puffer, der auch zur Herstellung des Extraktes verwendet wurde (Piperazin-Standardpuffer, s. 2.6.1.2).

Für jede Konzentration wurden drei Zeitreihen mit jeweils fünf identischen Reaktionszeiten gewählt. Es wurde pro Zeitreihe ein Reagiergefäß mit 56 µl Enzymextrakt und 392 µl Puffer beschickt und 5 min in einem Heizblock bei 50°C vorinkubiert. Anschließend wurden 112 µl der jeweiligen Substratlösung direkt in die enzymhaltige Lösung hineinpipettiert und somit die Reaktion gestartet. Nach Ablauf der unten aufgeführten Reaktionszeiten wurde aus dem Reagiergefäß jeweils eine Probe mit einem Volumen von 80 µl entnommen und in ein leeres Reagiergefäß pipettiert, das sich in einer Eiswasserlösung befand. Hierdurch wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Beendigung der Zeitreihe wurden 400 µl MeOH zu den gekühlten Proben pipettiert, diese nach 2.6.2.1.3 weiterbehandelt und per HPLC chromatographisch analysiert. Jede Substratkonzentration wurde anhand von drei nacheinander durchgeführten Zeitreihen auf die beschriebene Weise untersucht. Als Kontrolle diente für jede Substratkonzentration ein Ansatz, der bis auf den Ersatz des Enzymextrakts durch das gleiche Volumen Puffer mit dem Testansatz identisch war. Von diesem Kontrollansatz wurden lediglich fünf Proben nach 180 s Inkubationszeit entnommen.

Entnahmezeitpunkte der Proben aus dem Ansatz (Reaktionszeiten):

15 s 30 s 60 s 120 s 180 s

Pipettierschema in der Übersicht:

- ◆ 56 µl Enzymextrakt
- ◆ 392 µl Puffer
- ◆ 5 min bei 50°C vorinkubieren
- ◆ 112 µl Substratlösung
- ◆ Inkubation bei 50°C
- ◆ Probenentnahme

Die Ermittlung der kinetischen Kennwerte V_{\max} und K_m erfolgte anhand der Lineweaver-Burk-Methode.

2.6.5 Charakterisierung der Nitrilhydratase

2.6.5.1 Temperatur-Optimum

Bei der Durchführung dieser Versuchsreihe wurde die Enzymaktivität eines Enzymextrakts bei folgenden Temperaturen mittels HPLC festgestellt (s. 2.4.3):

10°C 22°C 30°C 40°C 45°C 50°C 55°C 60°C 70°C 80°C

Jede der gewählten Temperaturen wurde in drei parallel durchgeführten Ansätzen untersucht. Als Referenz diente lediglich eine Kontrolle je Temperatur (s. 2.6.2.2.2), da durch Vorversuche die Verfälschung des Versuchs durch thermische Zersetzung des Substrats Aeroplysinin-1 ausgeschlossen werden konnte. Der eigentliche Referenzwert ergab sich dann aus dem Mittelwert der zehn erhaltenen Einzelwerte.

Zunächst wurden jeweils 32 µl des für 5 min vortemperierten Enzymextrakts in ein Reagiergefäß pipettiert und in die entsprechende Temperiervorrichtung gegeben. Anschließend wurden 8 µl der Substrat-Lösung direkt in die vorgelegte Enzymlösung hineinpipettiert, somit durchmischt und das Reagiergefäß für 30 min bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Reaktion durch Einbringen der Reagiergefäße in flüssigen Stickstoff gestoppt (vgl. 2.6.2.2.2). Im Anschluß wurde wie unter 2.6.2.2.4 beschrieben verfahren und per HPLC (s. 2.4.3) analysiert.

2.6.5.2 pH-Optimum

Um den optimalen pH-Bereich der Nitrilhydratase einzugrenzen, wurden folgende vier Puffersysteme mit pH-Werten von 5.0 bis 10.0 in einer Konzentration von 100 mM getestet.

- ◆ Citrat-Puffer: 4.0; 4.5; 5.0; 5.5; 6.0; 6.5
- ◆ Kaliumphosphat-Puffer: 6.0; 6.5; 7.0; 7.5; 8.0
- ◆ Tris/HCl-Puffer: 7.0; 7.5; 8.0; 8.5; 9.0
- ◆ Ammoniak-Puffer: 9.0; 9.5; 10.0

Dabei wurde der Assay wie unter 2.6.2.2.2 beschrieben mit einem Standard-Enzymextrakt (vgl. 2.6.1.2) durchgeführt. Als einzige Abweichung vom Standardassay wurden die 32 µl Enzymextrakt zunächst mit 200 µl des jeweiligen Puffers durch Hinzupipettieren vermischt und 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Nach Zugabe der Substratlösung wurde der Ansatz durch kurzes Schütteln gemischt und nach Vorschrift weiter behandelt. Zur Analyse

aller Ansätze wurde wie unter 2.6.2.2.4 beschrieben verfahren und die HPLC-Methode gewählt (s. 2.4.3).

Für jeden einzelnen pH-Wert wurden drei parallele Ansätze sowie drei parallele Kontrollen durchgeführt (s. 2.6.2.2.2). Anhand der Kontrollen wurde gleichzeitig die pH-Stabilität des Substrats Aeroplysinin-1 untersucht.

Das Pipettierschema zum beschriebenen Versuch stellt sich wie folgt dar:

- ◆ 32 µl Enzymextrakt
- ◆ 200 µl Puffer
- ◆ 5 min vorinkubieren
- ◆ 8 µl Substratlösung
- ◆ 20 min Inkubation bei 20°C

2.6.5.3 Puffer-Optimierung

Nach Auswertung des unter 2.6.5.2 beschriebenen Versuchs standen zur Herstellung der Pufferlösungen für die folgenden Versuche im optimalen pH-Bereich des Enzyms zwischen 7.0 und 8.0 folgende drei Puffersysteme zur Disposition:

- ◆ Kaliumphosphat-Puffer: pKa (25°C) = 7.2
- ◆ HEPES-Puffer: pKa (25°C) = 7.5
- ◆ Tris/HCl-Puffer: pKa (25°C) = 8.2

Es wurden jeweils 100 mM Pufferlösungen hergestellt und der Assay wie unter 2.6.5.2 beschrieben durchgeführt. Die Auswertung der Ansätze erfolgte ebenfalls anhand der HPLC-Methode (s. 2.6.2.2.4), mit dem Unterschied, daß hier ein Gemisch aus 0.5 N HCl und MeOH (s. 2.6.2.2.2) zum Fällen der Proteine verwendet wurde. Der Grund für die Verwendung eines HCl-sauren MeOH-Gemisch lag in der Neutralisation des leicht basischen Reaktionsansatzes, um das anschließend zur HPLC-Analytik verwendete Säulenmaterial zu schonen.

Jedes der genannten Puffersysteme wurde mit Hilfe von drei parallel durchgeführten Ansätzen sowie drei parallelen Kontrollen (s. 2.6.2.2.2) getestet.

2.6.5.4 Überprüfung enzymatischer Dienonumsetzungen

Um eine eindeutige Unterscheidung zwischen Nitrilhydratase und Nitrilase (Kobayshi *et al.*, 1992; Yamada und Kobayashi, 1996) vornehmen zu können, wurde die Umsetzung des Säureamids Dienon durch eventuelle Enzyme im eigentlichen Enzymextrakt und durch die unspezifische Amidase A-6691 (vgl. 2.6.4.3) getestet.

2.6.5.4.1 Dienon-Umsetzung im Schwammextrakt

Ein mit Piperazin-Standardpuffer (vgl. 2.6.1.2) hergestellter Enzymextrakt wurde in diesem Versuch mit den drei Substraten Isofistularin-3, Aeroplysinin-1 und Dienon in unterschiedlichen Ansätzen versetzt und auf eine Umsetzung des entstandenen bzw. zugesetzten Dienons hin untersucht.

Hierzu wurden 32 µl Enzymextrakt mit 200 µl Kaliumphosphatpuffer (100 mM, pH 7.0) in einem Reagiergefäß vermischt und 5 min bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert. Als Inkubations- bzw. Reaktionstemperaturen wurden für die drei Substrate folgende Temperaturen gewählt:

- ◆ Isofistularin-3: 50°C
- ◆ Aeroplysinin-1: Raumtemperatur (22°C)
- ◆ Dienon: Raumtemperatur, 50°C

Nach Vorinkubation der Enzymextraktlösung bei der entsprechenden Temperatur wurden 8 µl des jeweiligen Substrats (10 mg/ml, MeOH) hinzugegeben und für 10 min bei den gewählten Temperaturen inkubiert. Durch Einbringen der Reagiergefäße in flüssigen Stickstoff wurde die Reaktion abgestoppt. Im Anschluß wurden die Proben für die HPLC-Analyse vorbereitet und schließlich ausgewertet (s. 2.6.2.2.4).

Auffällige Substanzpeaks aus den erhaltenen HPLC-Chromatogrammen, die im polaren Bereich keiner bekannten Substanz zugeordnet werden konnten, wurden mit Hilfe der HPLC-MS (s. 2.5.2.1) massenspektrometrisch ausgewertet.

Für jedes Substrat wurden zwei parallele Ansätze mit jeweils zwei Kontrollen (vgl. 2.6.2.2.2) untersucht.

Das zusammengefaßte Pipettierschema lautete wie folgt:

- ◆ 32 µl Enzymextrakt
- ◆ 200 µl Kaliumphosphat-Puffer
- ◆ 5 min Vorinkubation
- ◆ 8 µl Substrat
- ◆ 10 min Inkubation

2.6.5.4.2 Dienon-Umsetzung durch die Amidase A-6691

Einem Enzymvolumen von 2 µl (= 1.28 units) wurden 38 µl eines 20 mM Kaliumphosphat-Puffers (pH 7.2) und 10 µl Substratlösung (1 µmol) in einem Reagiergefaß zugegeben und im Anschluß für 2 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Es folgte eine 15-minütige Reaktionszeit bei 37°C, die durch das Einbringen der Reagiergefaße in flüssigen Stickstoff gestoppt wurde. Nach Zugabe von 200 µl MeOH wurde wie unter 2.6.2.2.2 beschrieben weiter verfahren und per HPLC (s. 2.4.3) ausgewertet.

Als Substratlösungen dienten 0.1 M Lösungen von Dienon und Benzylpenicillin-G in Kaliumphosphat-Puffer (s.o.).

Für jedes Substrat wurden drei parallele Ansätze mit drei Parallelkontrollen (s. 2.6.2.2.2) untersucht.

Im Pipettierschema ergab sich der Versuch wie folgt:

- ◆ 2 µl Enzym (= 1.28 units)
- ◆ 38 µl Kaliumphosphatpuffer (20 mM, pH 7.2)
- ◆ 10 µl Substrat (= 1 µmol)
- ◆ 2 min, 4000 rpm
- ◆ 15 min Inkubation bei 37°C

2.6.5.5 Beeinflussung der Enzymaktivität

2.6.5.5.1 Einfluß unterschiedlicher Agenzien auf die Enzymaktivität

Dieser Versuch wurde mit einem Enzymextrakt (s. 2.6.1.3) durchgeführt, der vor Verwendung nochmals entsalzt wurde. Hierzu wurden HiTrap Desalting Säulen der Firma

Pharmacia verwendet. Als Puffersystem wurde ein 10 mM HEPES-Puffer mit pH 7.5 verwendet. Jede der Säulen wurden zunächst mit 25 ml dieses Puffers equilibriert, bevor anschließend ein Extraktvolumen von 1.5 ml aufgetragen wurde. Zur Elution dienten 2.0 ml obigen Puffers, womit zugleich eine 1.3fache Verdünnung erzielt wurde (Desalting-Extrakt). Eine anschließende Reaktivierung der Säule erfolgte zunächst durch eine Reinigung mit 5 ml einer 0.5 N NaOH, die von einer Spülung mit 15 ml Nanopore-Wasser gefolgt wurde. Anschließend konnte die Säulen wie beschrieben weiterverwendet werden oder bis zur nächsten Nutzung nach Spülung mit 10 ml 0.2 M NaCl in 20%igem (m/m) Ethanol bei 4°C gelagert werden. Das Auftragen aller Lösungen wurde anhand einer Spritze des jeweiligen Volumens mit Lüeraufsatz mit einer Flußrate von ca. 5 ml/min manuell durchgeführt.

Im durchgeführten Assay wurden 32 µl Desalting-Extrakt zu Beginn mit 10 µl des Testagens für 10 min bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Nach Zusatz von 8 µl Aeroplysinin-1 Lösung (20 mg/ml, HEPES-Puffer) wurde der Ansatz nach kurzem Mischen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Reaktionsabbruch erfolgte durch Einbringen des Reagiergefäßes in flüssigen Stickstoff. Nach Zugabe von 5 µl 0.5 N HCl und 395 µl MeOH wurde wie unter 2.6.2.2.4 beschrieben weiterverfahren und analysiert. Jedes Testagens (s. Tab. 2.6-3) wurde anhand dreier paralleler Ansätze untersucht. Als Vergleich dienten drei Ansätze, bei denen das Agensvolumen durch Puffer ersetzt wurde. Um den Aeroplysinin-1-Umsatz ermitteln zu können, wurden drei Ansätze als Kontrolle ohne Enzymextrakt und ohne Agenslösung (vgl. 2.6.2.2.2) durchgeführt. Das Endvolumen dieser Kontrollen wurde durch Ersatz des Extrakt- und Substratvolumens durch Puffer erreicht.

Testagens	Konzentration im Assay 1 mM	Konzentration im Assay 5 mM
Hydroxylamin	x	-
Phenylhydrazin	x	-
L-Penicillamin	x	-
Semicarbazid	x	x
α,α' -Dipyridyl *	x	x
8-Hydroxychinolin *	x	x
EDTA	x	x
KCN	x	x
NaN_3	x	x
H_2O_2	x	-
FeCl_3	x	x
Ammoniumperoxydisulfat	x	x
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	x	-
Dithiothreitol	x	x
2-Mercaptoethanol	x	x
NaF	x	-
Urea pura °	x	x
HgCl_2	x	x
AgNO_3	x	x
CuSO_4	x	x
NaCl	x	-
MnCl_2	x	-
MgCl_2	x	-
CaCl_2	x	-
FeSO_4	x	x
AlCl_3	x	-
SnCl_2	x	-
ZnCl_2	x	x
NiCl_2	x	x
CoCl_2	x	x

Tab. 2.6-3 Getestete Agenzien

x = wurde durchgeführt

- = wurde nicht durchgeführt

* = α,α' -Dipyridyl und 8-Hydroxychinolin wurden in MeOH anstatt Puffer gelöst, dementsprechend wurde als Substratlösung eine methanolische Aeropylinin-1-Lösung gleicher Konzentration verwendet.

° = Urea pura (Harnstoff) wurde neben 1 und 5 mM Assaykonzentration auch in einer Konzentration von 10 mM (50 mM Konzentration der Lösung) im Assay getestet.

Im Assay wurden Agenzlösungen mit Konzentrationen von 5 mM bzw. 25 mM verwendet. Durch eine Verdünnung dieser Lösungen im Assay auf ein Fünftel kamen die Agenzien in den Konzentrationen 1 mM bzw. 5 mM im Assay zum Einsatz (s. Tab 2.6-3).

Der Versuch im Pipettierschema:

- ◆ 32 µl Desalting-Extrakt
- ◆ 10 µl Agens-Lösung
- ◆ 10 min bei 20°C inkubieren
- ◆ 8 µl Substratlösung
- ◆ 10 min bei 20°C inkubieren

2.6.5.5.2 Einfluß ausgewählter Kationen nach EDTA-Behandlung

Um die Rolle von Magnesium-, Calcium- und Manganionen für die Nitrilhydratase zu untersuchen, wurden bei diesem Versuch mit EDTA-Lösung vorbehandelte Desalting-Extrakte (s. 2.6.5.5.1) mit Überschußlösungen der genannten Kationen behandelt und auf Substratumsatz hin untersucht. Hierzu wurden 128 µl Desalting-Extrakt mit 20 µl EDTA-Lösung (100 mM) für 10 min bei Raumtemperatur nach kurzem Mischen inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl der jeweiligen Kationenlösung (200 mM) wurde wie zuvor für 10 min inkubiert, um anschließend nach Zusatz von 32 µl Aeroplysinin-1-Lösung (40 mg/ml, MeOH) und kurzem Mischen den Ansatz ein letztes Mal für 10 min zu inkubieren. Aus diesem Ansatz wurden dreimal 50 µl entnommen und in drei Eppendorf-Reagiergefäße pipettiert, die mit einer Mischung aus 5 µl 0.5 N NaOH und 395 µl MeOH versehen waren. Diese Reagiergefäße befanden sich bis zur Hälfte der Füllhöhe in einer Eiswasserlösung, wodurch nach Zupipettieren der 50 µl Reaktionsansatzlösung ein Abstoppen der Reaktion erreicht wurde. Im folgenden wurde wie unter 2.6.2.2.4 verfahren. Als Vergleich diente ein Ansatz, bei dem anstatt der 20 µl Kationenlösung das gleiche Volumen HEPES-Puffer (s. 2.6.5.5.1) eingesetzt wurde. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz durchgeführt, bei dem sowohl die Kationenlösung als auch die EDTA-Lösung durch das entsprechende Volumen HEPES-Puffer ersetzt wurden. Der Umsatz wurde anhand einer Blindprobe ermittelt, bei der 32 µl Aeroplysinin-1-Lösung mit insgesamt 168 µl HEPES-Puffer nach obiger Reihenfolge und Zeitabfolge behandelt wurden.

Der Versuch im Pipettierschema:

- ◆ 128 µl Desalting-Extrakt
- ◆ 20 µl EDTA-Lösung
- ◆ 10 min bei 20°C inkubieren
- ◆ 20 µl Kationen-Lösung
- ◆ 10 min bei 20°C inkubieren
- ◆ 32 µl Aeroplysinin-1-Lösung
- ◆ 10 min bei 20°C inkubieren

2.6.5.6 Stabilitätsuntersuchungen

Zur Erstellung eines Stabilitätsprofils der Nitrilhydratase bei unterschiedlichen pH-Werten wurde ein Enzymextrakt bei den pH-Werten 6.0, 7.0 und 8.0 bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht.

Für jeden pH-Wert wurde ein Gesamtansatz untersucht, aus dem zu nachstehenden Zeiten ein Aliquot zur Analyse entnommen wurde:

	0 Std.	1 Std.	2 Std.	4 Std.	6 Std.	
1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	6 Tage	7 Tage	14 Tage

Folgende Puffersysteme wurden in einer Konzentration von 100 mM für den Versuch ausgewählt und bei Raumtemperatur auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt:

- ◆ Citrat-Puffer: pH 6.0
- ◆ Kaliumphosphat-Puffer: pH 7.0
- ◆ Tris/HCl-Puffer: pH 8.0

Bei der eigentlichen Versuchsdurchführung wurde wie folgt verfahren: Für jeden pH-Wert wurden 1440 µl Enzymextrakt mit 9000 µl Puffer versetzt, gemischt und in einem lichtdurchlässigen 15 ml-Greiner-Röhrchen verschlossen bis zum eigentlichen Entnahmezeitpunkt stehengelassen. Kurz vor der Probenentnahme wurde der Ansatz einmal vorsichtig durchmischt und dreimal ein Volumen von 232 µl entnommen, welches jeweils in ein Eppendorf-Reagiergefäß gegeben wurde, in dem sich bereits 8 µl Aeroplysinin-1-Lösung (s. 2.6.2.2.1) als Vorlage befanden. Im Anschluß wurde 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert und das Reagiergefäß zum Stoppen der Reaktion in flüssigen Stickstoff gegeben. Im weiteren wurde wie unter 2.6.2.2.4 beschrieben mit den Proben verfahren. Bei der Versuchsreihe mit dem pH-Wert 8.0 wurde als Abweichung zu 2.6.2.2.4 anstatt der beschriebenen 400 µl MeOH ein Gemisch aus 50 µl 0.5 N HCl und 350 µl MeOH zugesetzt.

Das Pipettierschema im Überblick:

- ◆ 1440 µl Enzymextrakt
- ◆ 9000 µl Puffer
- ◆ Entnahmezeitpunkt
- ◆ 232 µl Probenentnahme
- ◆ 8 µl Substratlösung
- ◆ 10 min bei Raumtemperatur inkubieren

2.6.5.7 Substratspezifität

Die Untersuchung auf Umsetzung schwammfremder Substrate wurde mit dem natürlichen Substrat Aeroplysinin-1 als Vergleich und mit folgenden Substanzen vorgenommen:

- ◆ 3-Cyanopyridin
- ◆ 4-Cyanopyridin
- ◆ 2-Hydroxybenzonnitril
- ◆ 3-Aminobenzonnitril
- ◆ DL-Mandelsäurenitril
- ◆ 4-Nitrophenylacetonitril
- ◆ p-Tolylacetonitril
- ◆ 4-Hydroxyphenylacetonitril

Als Konzentration der Substratlösungen wurde die gleiche molare Konzentration gewählt, die auch in der Lösung des natürlichen Substrats Aeroplysinin-1 (10 mg/ml = 0.029 mM) verwendet wurde. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Großzahl der untersuchten Substanzen wurde MeOH als Lösungsmittel für alle verwendeten Substrate gewählt.

Es wurden für jedes Substrat drei parallele Ansätze zum Nachweis einer eventuellen Enzymaktivität in einem Assay nach 2.6.2.2.2 mit einer Inkubationszeit von 10 min durchgeführt. Als Kontrolle dienten je Substrat drei Ansätze mit Puffer anstelle des

verwendeten Enzymextrakts. Im folgenden wurde unter 2.6.2.2.4 beschrieben verfahren mit der Ausnahme, daß anstelle von 400 µl MeOH ein Gemisch aus 5 µl 0.5 N HCl und 395 µl MeOH verwendet wurde.

2.6.5.8 Interne Sauerstoffumlagerung

Um den Einfluß des Lösungsmittels der Enzymextraktlösung auf die Umsetzung von Aeroplysinin-1 zu Dienon untersuchen und damit Aussagen über den zugrundeliegenden Reaktionsmechanismus machen zu können, wurden zwei parallele Ansätze von je 64 µl Enzymextrakt gefriergetrocknet. Im Anschluß wurde das entfernte Wasser wieder ersetzt, beim ersten Ansatz durch Nanoporewasser und beim zweiten Ansatz durch ^{18}O -Wasser der Firma Sigma. Beiden Ansätzen wurden im Anschluß je 16 µl Aeroplysinin-1-Lösung (10 mg/ml in Nanopore- bzw. ^{18}O -Wasser) zugegeben und nach kurzem Mischen 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch Einbringen der Reagiergefäße in flüssigen Stickstoff wurden je Ansatz 10 µl 0.5 N HCl und 790 µl MeOH zugesetzt und verfahren wie unter 2.6.2.2.4 beschrieben. Um genaue Informationen über die Reaktionsprodukte zu erhalten, wurden die resultierenden Lösungen mit Hilfe der FAB-Massenspektrometrie untersucht (vgl. 2.5.2.1).

Als Kontrolle diente für jeden Ansatz eine Blindprobe ohne Enzymextrakt, bei der Puffer als Ersatzflüssigkeit im gleichen Volumen zugegeben wurde. Diese Kontrollansätze wurden ansonsten wie die Analysenansätze mit Enzymextrakt behandelt.

Das Pipettierschema in der Übersicht:

- ◆ 64 µl Enzymextrakt
- ◆ Gefriertrocknung
- ◆ 64 µl Lösungsmittel (Nanopore- bzw. ^{18}O -Wasser)
- ◆ µl Aeroplysinin-1-Lösung (in Nanopore- bzw. ^{18}O -Wasser)
- ◆ 20 min bei Raumtemperatur inkubieren

2.6.5.9 Bestimmung von V_{\max} und K_m

Zur genauen Bestimmung der kinetischen Kenngrößen V_{\max} und K_m wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Allen drei Versuchsreihen lag eine Messung der Substratabnahme durch enzymatischen Abbau über die Zeit zugrunde. Im folgenden sind die Konzentrationen der eingesetzten Substratlösungen (Aeroplysinin-1 in Nanopore-Wasser) sowie die gewählten Zeitpunkte innerhalb der Zeitreihen schematisch dargestellt.

Versuch 1:

Konzentration der eingesetzten Aeroplysinin-1-Lösungen in mmol/ml:

0.00737 0.01475 0.02212 0.02950 0.04428 0.0590

Getestete Aeroplysinin-1-Konzentrationen im Assay in $\mu\text{mol/ml}$:

1.47 2.95 4.42 5.90 8.86 11.8

Reaktionszeiten innerhalb der Zeitreihen:

15 s 30 s 60 s 120 s 300 s

Versuch 2:

Konzentration der eingesetzten Aeroplysinin-1-Lösungen in mmol/ml:

0.00737 0.0148 0.0295 0.0443 0.0590

Getestete Aeroplysinin-1-Konzentrationen im Assay in $\mu\text{mol/ml}$:

1.47 2.95 5.90 8.86 11.8

Reaktionszeiten innerhalb der Zeitreihen:

15 s 30 s 45 s 60 s 90 s 120 s

Versuch 3:

Konzentration der eingesetzten Aeroplysinin-1-Lösungen in mmol/ml:

0.0369 0.0738 0.147 0.221 0.295 0.442

Getestete Aeroplysinin-1-Konzentrationen im Assay in $\mu\text{mol/ml}$:

7.37 14.8 29.5 44.2 59.0 88.5

Reaktionszeiten innerhalb der Zeitreihen:

15 s 30 s 45 s 60 s 90 s 120 s

Bei Versuch 1 wurden bei jeder Konzentration für jede Reaktionszeit drei Einzelansätze mit jeweils 64 μl Enzymextrakt und 16 μl Substratlösung durchgeführt (doppelter Ansatz wie unter 2.6.2.2.2). Die bei Raumtemperatur durchgeführte Reaktion wurde durch Einbringen

der Reagiergefäße in flüssigen Stickstoff abgestoppt. Nach Zugabe von 50 µl 0.5 N HCl und 350 µl MeOH wurden die Ansätze wie unter 2.6.2.2.4 beschrieben weiter behandelt.

Im zweiten Versuch wurde für jede Konzentration ein Gesamtansatz mit 420 µl HEPES-Puffer (s. 2.6.1.2), 252 µl Enzymextrakt und 168 µl Substratlösung verwendet. Nach dem Mischen des Puffers mit dem Enzymextrakt wurde die Reaktion wie schon zuvor durch die Substratzugabe gestartet. Bei Erreichen der festgelegten Reaktionszeiten wurde mit Hilfe einer Multipette genügend Volumen aus dem Gesamtansatz entnommen, um dreimal ein Volumen von 40 µl in dafür vorgesehenen Eppendorf-Reagiergefäße zu pipettieren. Diese Reagiergefäße befanden sich in einer Eiswasserlösung und enthielten die bei Versuch 1 beschriebene Mischung aus 0.5 N HCl und MeOH. Somit wurden für jede Reaktionszeit und Substratkonzentration drei Einzelproben erhalten. Ansonsten wurde wie bei Versuch 1 verfahren.

Bis auf die oben aufgeführten Unterschiede in den Substratkonzentrationen wurde der Versuch 3 in der selben Weise wie Versuch 2 durchgeführt.

Allen Versuchen gemein war der dreifache Kontrollansatz pro getesteter Substratkonzentration wie unter 2.6.2.2.2 beschrieben.

Bei allen Versuchen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit für jede einzelne Aeropylsinin-1-Konzentration errechnet und daraus im Anschluß die Berechnung der jeweiligen V_{\max} - und K_m -Werte vollzogen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1 Bromotyrosinalkaloide aus *Aplysina insularis*

3.1.1 HPLC-Analyse von Schwammextrakten

Aus einer Vielfalt von 49 Schwammexemplaren der Familie Aplysinidae (7 verschiedene Arten) und 6 Schwämmen der Familie Aplysinellidae (nur *Aiolochoxia crassa*) wurde anhand von HPLC-Chromatogrammen (vgl. 2.4.3) identisch gewonnener Schwammrohextrakte eine Charakterisierung der 8 Schwammarten vorgenommen, ohne alle einzelnen Peaks der Chromatogramme detailliert bestimmten Inhaltsstoffen zuzuordnen. Bei der Auswertung der Chromatogramme wurde eine grobe Einteilung in polare und apolare Bereiche vorgenommen. Charakteristisch für den polaren Bereich waren Inhaltsstoffe wie Dienon (16), Aeroplysinin-1 (18), Aerophobin-1 (3) und -2 (2) sowie Aplysinamisin-1 (5) und Aplysinamisin-2 (6) (vgl. Abb. 3.1-6). UV-Spektren dieser Alkaloide ließen sich in den Chromatogrammen bei Retentionszeiten zwischen 10 und 22 Minuten anhand der Gynkotec-Spektrenbibliothek ausfindig machen. Der apolare Bereich der Chromatogramme wurde zwischen 26 und 35 Minuten festgelegt. Hier konnten anhand der Gynkotec-Spektrenbibliothek die Alkaloide 11-hydroxy-Aerotionin (8), 11-oxo-Aerotionin (9) sowie Aerotionin (7) selbst, Fistularin-3 (10) und seine Derivate erkannt werden. Beim Vergleich der Rohextrakt-UV-Spektren einzelner Substanzpeaks mit UV-Spektren von isolierten Reinsubstanzen der Spektrenbibliothek konnte aufgrund der Überlagerung der Substanzpeaks keine eindeutige Identifizierung vorgenommen werden. Es konnte lediglich eine Zuordnung der Substanzpeaks im Rohextraktchromatogramm zu bestimmten Bromoisoxazolinalkaloid-Grundkörpern vorgenommen werden. Eine eindeutige Zuordnung bzw. Identifizierung einzelner Isolate wie sie später durchgeführt wurden, war nur auf der Stufe isolierter reiner Inhaltsstoffe möglich.

Die 15 Vertreter der Art *Aplysina fistularis* zeigten einheitlich eine Vielzahl von Substanzpeaks sowohl im polaren wie auch im apolaren Bereich des Chromatogramms und ließen somit auf eine große Zahl von Bromoisoxazolinalkaloiden als Inhaltsstoffe schließen (Abb. 3.3-1). Die Qualität wie auch die Quantität der auftretenden Substanzpeaks blieb im Vergleich aller 15 Extrakte auffallend gleich. Aus den untersuchten Exemplaren der Art *Aplysina fistularis* wurde für die spätere Naturstoffisolierung ein Individuum ausgewählt, das eine ausreichende Masse aufwies. Die nähere Identifizierung dieses Schwamms ergab, daß es sich dabei um *Aplysina insularis* handelte (s. 2.1.1).

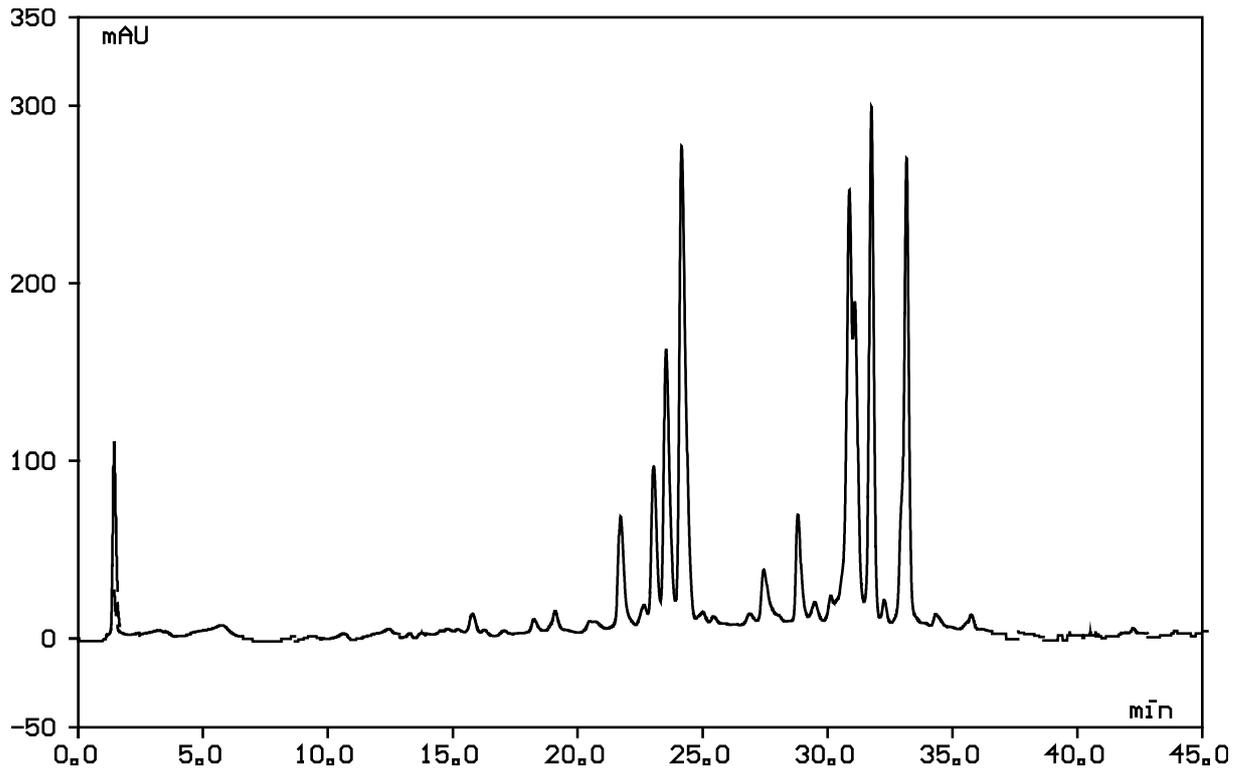


Abb. 3.1-1 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm von *Aplysina fistularis* ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Bei der Untersuchung der 6 Exemplare der Art ***Aplysina fulva*** konnte in den Chromatogrammen kein Unterschied zu *Aplysina fistularis* festgestellt werden. Dieses Ergebnis erklärt sich aus der Tatsache, daß die Art *Aplysina fistularis* nach neueren Untersuchungen in die beiden sehr eng verwandten Arten *A. insularis* und *A. fulva* unterschieden wird (vgl. 2.1.1), somit spiegelt sich die morphologische Verwandtschaft hier auch in der Zusammensetzung des Inhaltsstoffmusters wieder.

Alle 13 Exemplare der Art ***Aplysina cauliformis*** wiesen im Vergleich zu *A. fistularis* in den Chromatogrammen im apolaren Bereich des Spektrums lediglich einen Hauptsubstanzpeak mit wenigen kleinen Nebenpeaks auf (s. Abb. 3.1-2). Im polaren Bereich des Spektrums konnten zwar annähernd gleich viele Substanzpeaks registriert werden, diese zeigten jedoch deutlich geringere Intensitäten bezogen auf den Hauptsubstanzpeak, als dies im *A. fistularis*-Chromatogramm (Abb. 3.1-1) der Fall war. Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal zu *A. fistularis* war das Fehlen eines Substanzpeaks bei ca. 27 Minuten (s. Abb. 3.1-2).

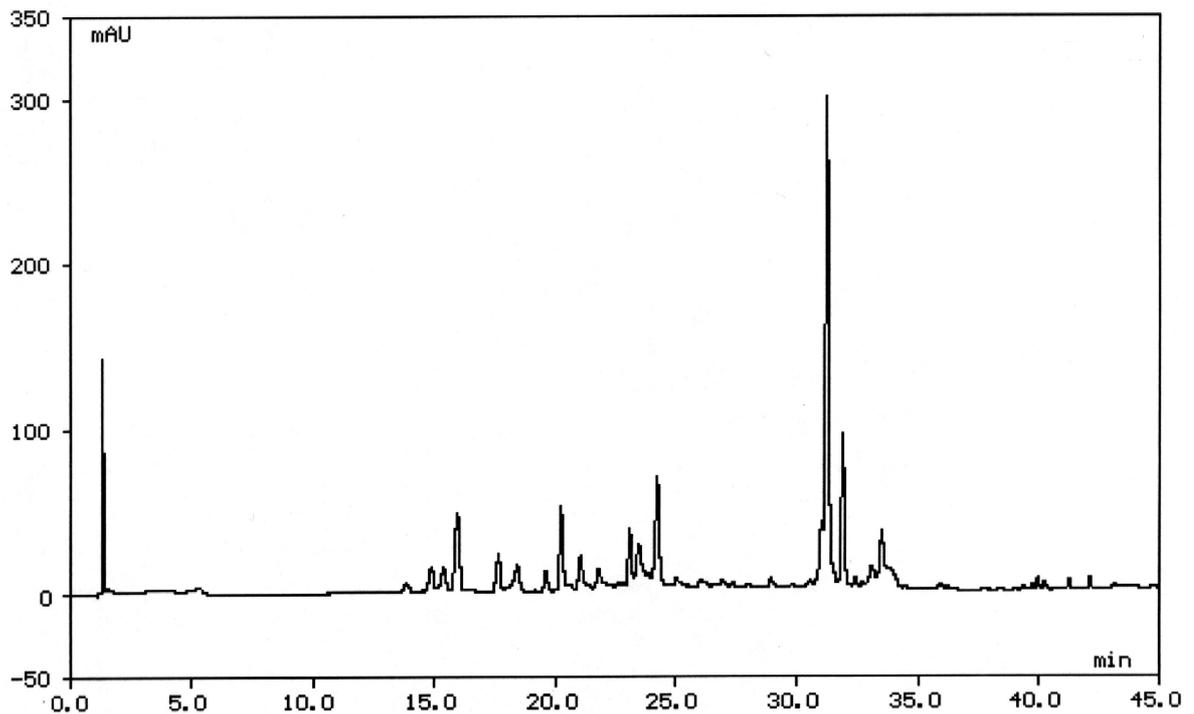


Abb. 3.1-2 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm für *Aplysina cauliformis* ($\lambda = 254$ nm).

Im Vergleich zu *A. fistularis* konnte bei allen 6 Exemplaren der Art ***Aplysina archeri*** lediglich ein qualitativ und quantitativ stark unterrepräsentierter polarer Bereich im Chromatogramm festgestellt werden. Die Zusammensetzung des apolaren Bereichs unterschied sich im wesentlichen durch das Vorhandensein eines Hauptpeaks zu Beginn der Elution, der von zweie bis drei kleineren Substanzpeaks gefolgt wurde (s. Abb. 3.1-3). Der Substanzpeak bei ca. 27 Minuten war wie bei *A. fistularis* vorhanden (Abb. 3.1-3).

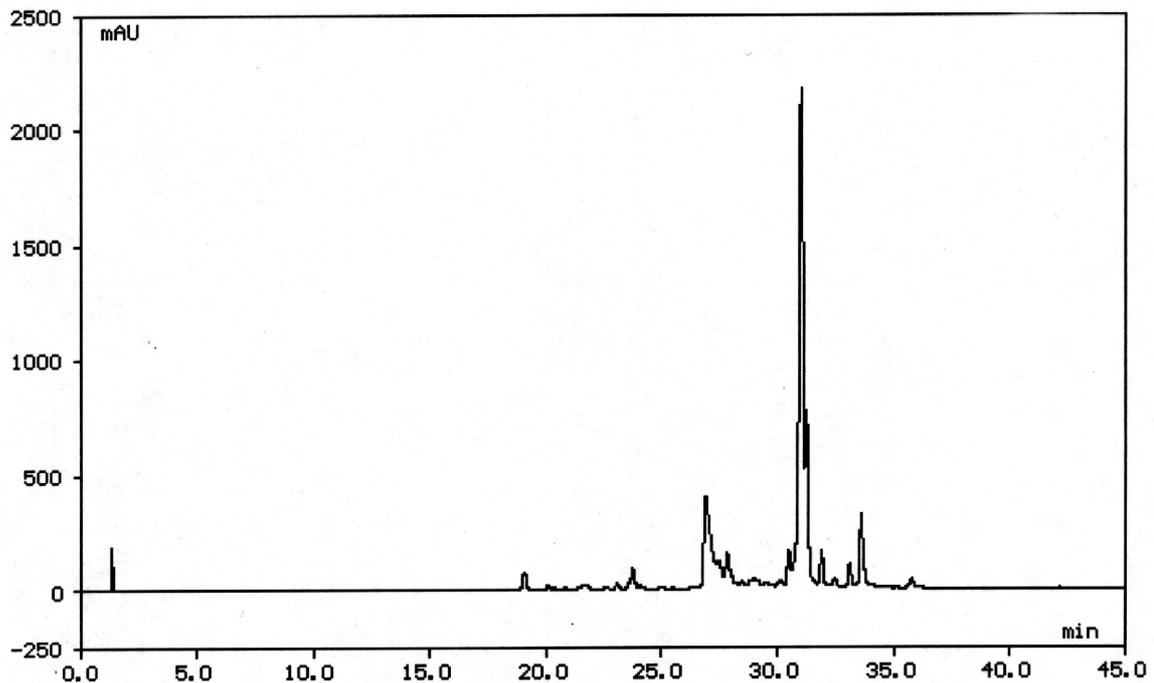


Abb. 3.1-3 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm von *Aplysina archeri* ($\lambda = 254$ nm).

Für die Chromatogramme der 2 Exemplare der Art *Aplysina lacunosa* konnte aufgrund der geringen Anzahl an Individuen kein repräsentatives Chromatogramm gewählt werden. Trotzdem sei erwähnt, daß beide Chromatogramme eine gewisse Übereinstimmung zeigten. So sind im polaren Bereich des Chromatogramms lediglich wenige kleinere Substanzpeaks zu erkennen. Der apolare Bereich zeigte große Ähnlichkeit mit dem Chromatogramm von *Aplysina archeri*, so daß das gesamte Chromatogramm dem von *A. archeri* sehr ähnlich kam (vgl. Abb. 3.1-3).

In den Chromatogrammen der 4 *Verongula gigantea*-Exemplare (Abb. 3.1-4) war der apolare Bereich im Vergleich zu *Aplysina fistularis* in Bezug auf die Anzahl und die Intensität der Substanzpeaks eindeutig unterrepräsentiert (Abb.3.1-1). So war eine Vielzahl der Substanzpeaks im polaren Bereich von größerer Intensität als die apolaren Substanzpeaks (s. Abb. 3.1-4). Eine klare Einteilung des Chromatogramms in polaren und apolaren Bereich wie bei *A. fistularis* konnte hier nicht eindeutig vorgenommen werden. Trotz geringer Individuenzahl und leicht abweichenden Chromatogrammen konnte ein repräsentatives Chromatogramm für diese Art gewählt werden (Abb. 3.1-4).

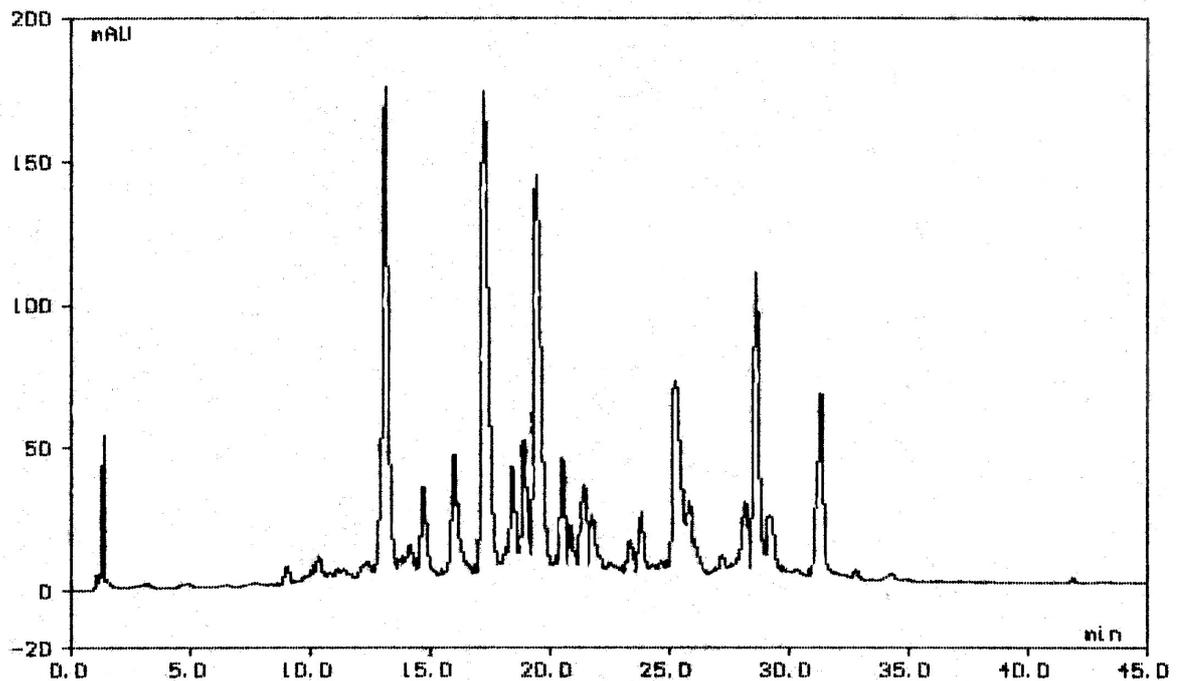


Abb. 3.1-4 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm *Verongula gigantea* ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

Beim Vergleich der Chromatogramme von 2 *Verongula rigida*-Exemplaren konnte aufgrund der Heterogenität beider Chromatogramme kein repräsentatives Chromatogramm für diese Art gewählt werden. Als einzige Gemeinsamkeit konnte das Fehlen von Substanzpeaks im apolaren Bereich des Chromatogramms festgestellt werden.

Bei der Untersuchung der 7 Exemplare der Art *Aiolochoia crassa* zeigte sich für die Chromatogramme der Rohextrakte im Vergleich zu den Chromatogrammen der Schwämme aus der Familie Aplysinidae ein recht eigenwilliges, aber dennoch typisches Bild (Abb. 3.1-5). Während im apolaren Bereich lediglich ein Peak bei ca. 28 Minuten zu erkennen war, zeigte sich bei ca. 25 Minuten der Hauptpeak des Chromatogramms (s. Abb. 3.1-5), der bei *Aplysina fistularis* lediglich als kleinerer Peak zwischen den beiden großen Bereichen zu erkennen war (s. Abb. 3.1-1). Als charakteristische Merkmale im polaren Bereich konnte sowohl der zweitgrößte Peak des Chromatogramms bei ca. 12 Minuten sowie eine für diese Art typische Überlagerung mehrerer Peaks im Bereich von 15 bis 17 Minuten festgestellt werden (s. Abb. 3.1-5).

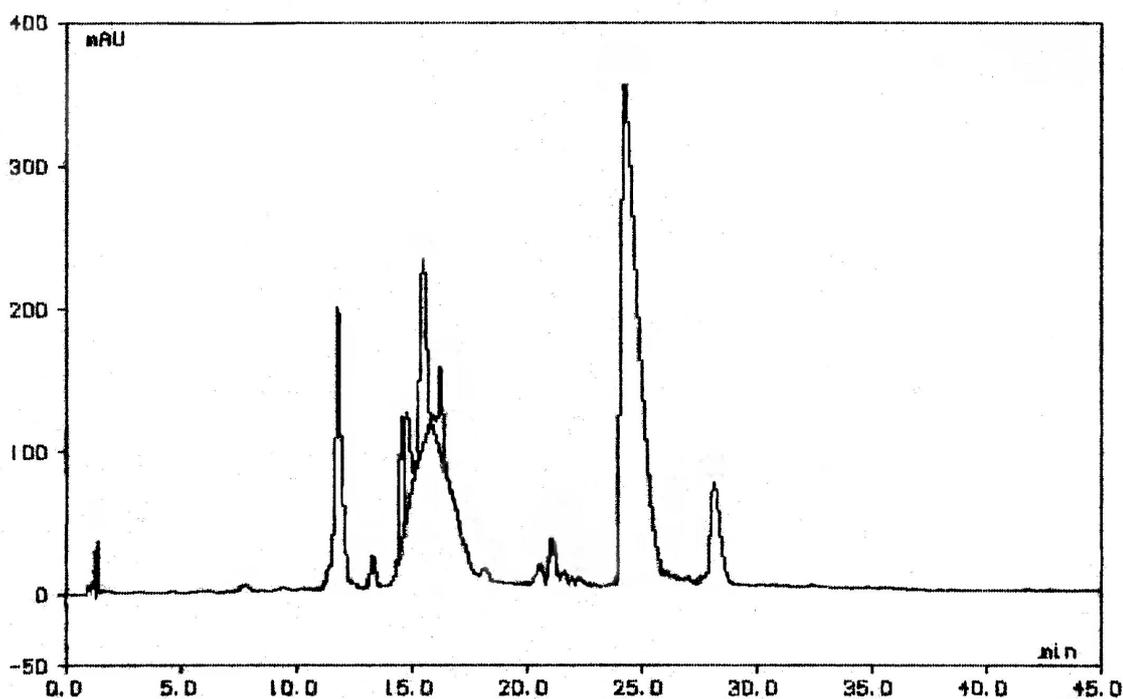
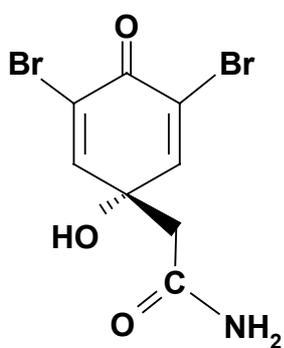


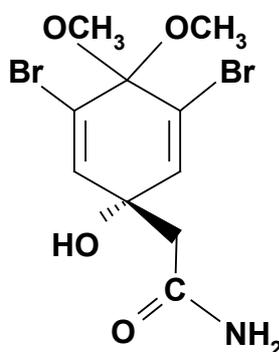
Abb. 3.1-5 Repräsentatives HPLC-Chromatogramm von *Aiolochoxia crassa* ($\lambda = 254$ nm).

3.1.2 Isolierte Inhaltsstoffe aus *Aplysina insularis*

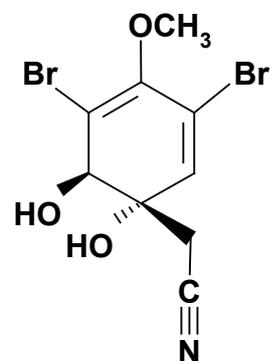
Schwämme aus der Familie der Aplysinidae sind für ihre charakteristischen Inhaltsstoffe, die sogenannten Bromotyrosinalkaloide, seit über dreißig Jahren bekannt. Als erste Vertreter dieser ungewöhnlichen Sekundärstoffgruppe wurden 1967 Dienon (16) und Dimethoxyketal (17) aus den karibischen Schwämmen *Aplysina cauliformis* und *Aplysina fistularis* isoliert und auf ihre biologische Wirksamkeit hin getestet (Sharma und Burkholder, 1967).



Dienon (16)



Dimethoxyketal (17)

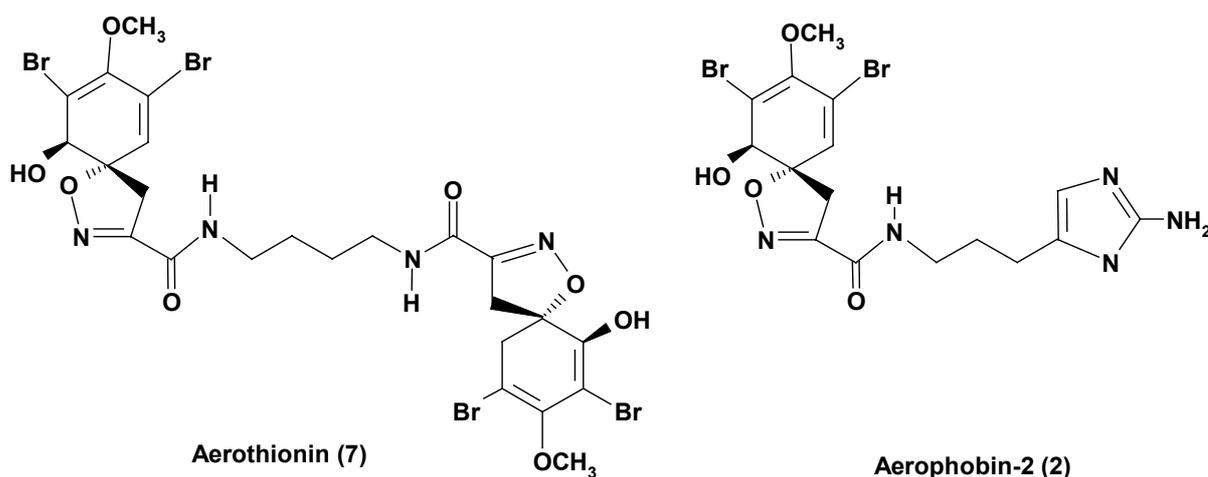


Aeroplysinin-1 (18)

Bei der Suche nach neuen antimikrobiellen Schwamminhaltsstoffen konnte für Dienon schließlich eine positive Wirkung gegen Gram-positive sowie Gram-negative Bakterien festgestellt werden (Sharma und Burkholder, 1967). In der Literatur sind bis heute für den Schwamm *Aplysina fistularis* annähernd dreißig weitere Bromotyrosinalkaloide isoliert und charakterisiert worden.

Seit seiner ersten Beschreibung 1766 wurden dem Schwamm *Aplysina fistularis* (Pallas 1766) aufgrund seiner unterschiedlichen Wuchsform in Abhängigkeit von Wassertiefe und Wasserumgebung mehrere Namen gegeben wie z.B.: *Verongia thiona*, *Verongia tenuissima* und *Verongia aurea*, die jedoch alle Synonyme für die gleiche Schwammart darstellen (Carney und Rinehart, 1995). Eingehendere zoologische und histologische Untersuchungen ergaben eine Aufteilung der Art *Aplysina fistularis* in die beiden Arten *Aplysina fulva* und *Aplysina insularis* (Pulitzer-Finali, 1986). Die Art *Aplysina insularis* stellt die eher verkümmerte Wuchsform von *Aplysina fistularis* dar (van Soest, 1998).

Die bisher beschriebenen bromierten Derivate der Aminosäure Tyrosin aus marinen Schwämmen lassen sich anhand ihrer Struktur in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen in die Bromotyrosinalkaloide im engeren Sinn wie zum Beispiel Dienon (16) und Dimethoxyketal (17) und zum anderen in die Bromoisoxazolinalkaloide wie zum Beispiel Aerothionin (7) und Aerophobin-2 (2) mit einem Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystem.



In der Literatur sind die Bromoisoxazolinalkaloide zahlenmäßig stärker vertreten und zeigen größere strukturelle Variationsmöglichkeiten, als dies bei den Bromotyrosinalkaloiden der Fall ist. Allen Bromoisoxazolinalkaloiden ist das Strukturelement des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems gemein, an dem sie durch NMR-Analyse leicht identifiziert werden können, da Variationen fast ausschließlich in der Seitenkette dieses

Ringsystems vorkommen, nicht jedoch im Spiroringssystem. Seitenkettenvariationen haben somit nur geringen Einfluß auf die chemische Verschiebung der NMR-Signale der Wasserstoff- bzw. Kohlenstoffatome und erlauben daher immer eine eindeutige Identifizierung des Ringsystems.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 14 Schwamminhaltstoffe aus dem Schwamm *Aplysina insularis* isoliert werden, wovon 13 den Bromotyrosinalkaloiden (1-13) zugeordnet werden können (Abb. 3.1-6). Von diesen 13 Bromotyrosinalkaloiden lassen sich 12 eindeutig den Bromoisoxazolinalkaloiden zurechnen (1-12). Während ein neues Bromoisoxazolinalkaloid (1) erstmals beschrieben werden konnte, wurden die übrigen Bromoisoxazolinalkaloide (2-12) sowie das isolierte Bromotyrosinalkaloid (13) und der *p*-Hydroxy-Benzoesäure-ethylester (14) in der Literatur bereits vorher beschrieben wurden.

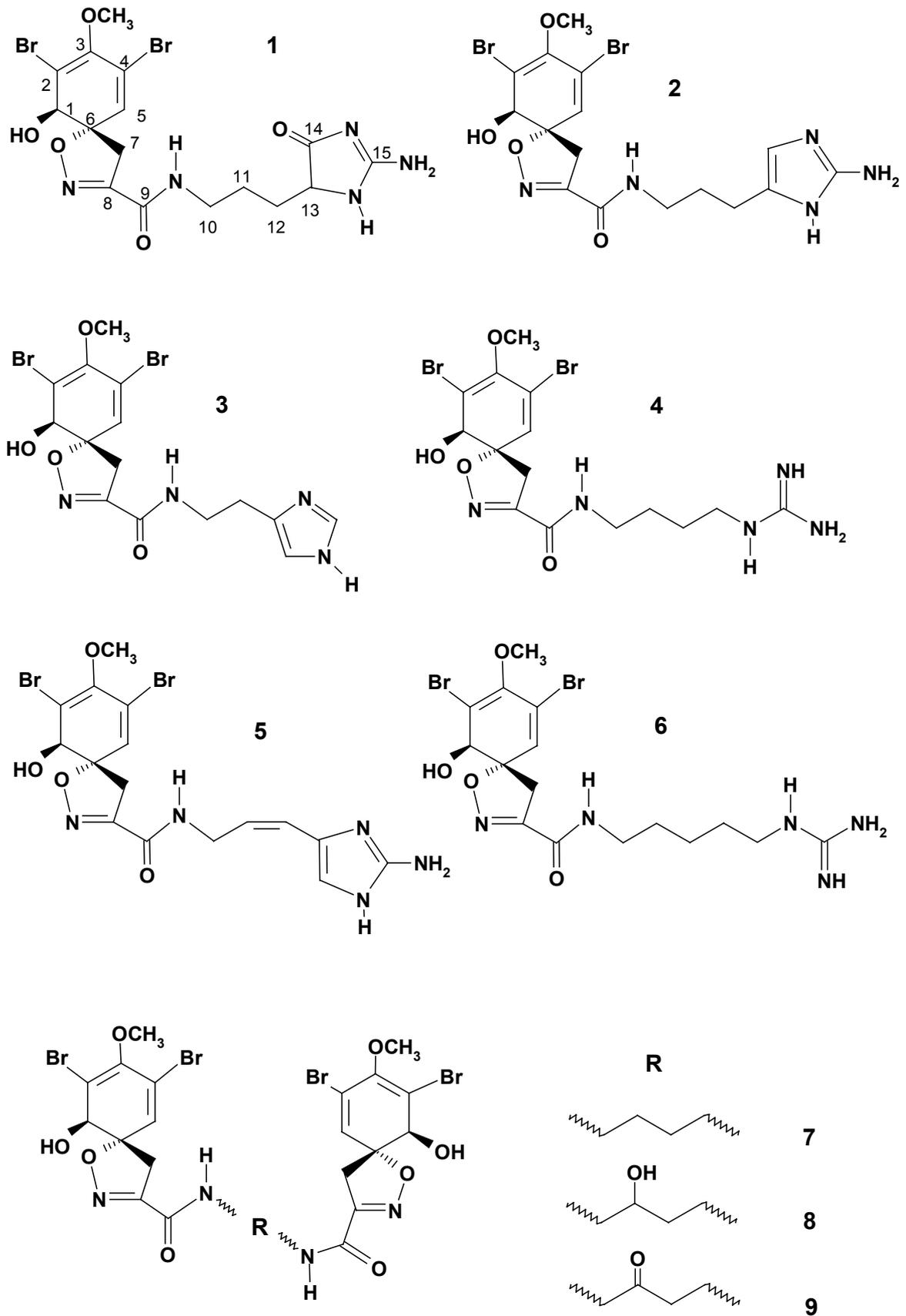
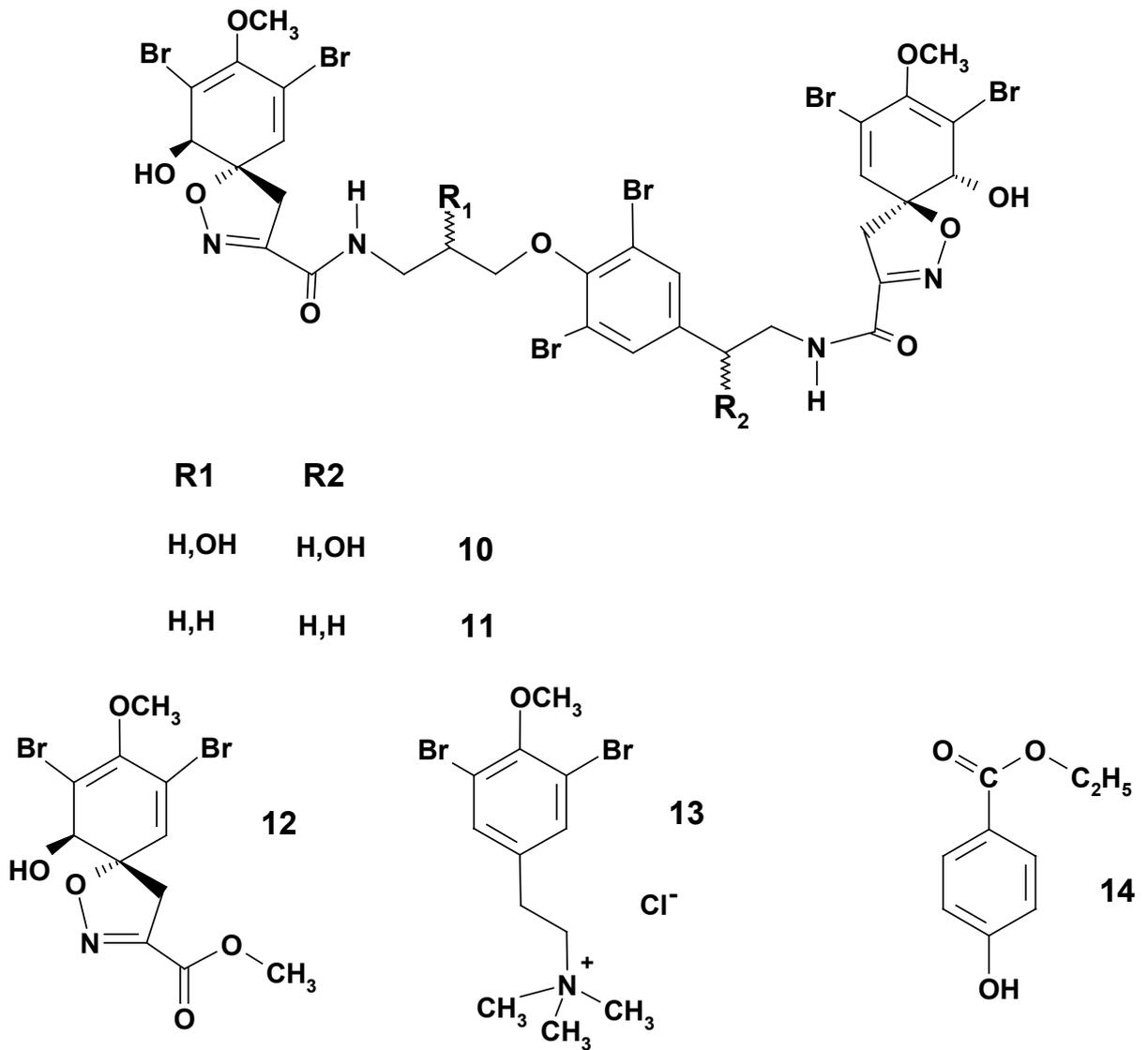
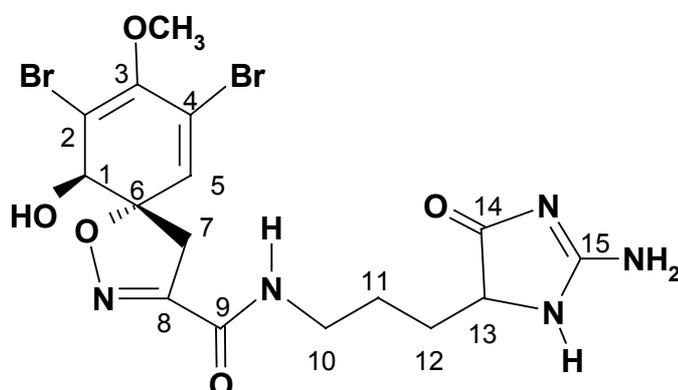


Abb. 3.1-6 Isolierte Schwamminhaltsstoffe aus *Aplysina insularis*.

Abb. 3.1-6 Isolierte Schwamminhaltsstoffe aus *Aplysina insularis*.

3.1.2.1 Strukturaufklärung von 14-oxo-Aerophobin-2



Die gereinigte Substanz lag als gelblich weißes Pulver von amorpher Beschaffenheit vor und zeigte nach HPLC-Analyse eine Reinheit von 100 %. Anhand eines ersten Vergleichs des UV-Spektrums der isolierten Substanz mit der Spektrenbibliothek der Gynkotek-HPLC-Datenbank (s. 2.5.2.1) konnte auf eine enge molekulare Verwandtschaft zu Aerophobin-2 geschlossen werden.

Nach FAB-MS ergab sich ein isotopischer Cluster in einem Verhältnis von 1:2:1 bei m/z $[M+H]^+$ 520, 522, 524. Dieser Cluster war ein eindeutiger Hinweis auf zwei Bromatome im Molekül und bestätigte die Ähnlichkeit in der Molekülstruktur zum bekannten Bromoisoxazolinalkaloid Aerophobin-2 (2). Bei der Fragmentierung ergab sich die für Aerophobin-2 (2) typische Spaltung des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems über ein stabiles aromatisches System, an dem bevorzugt am substituierten Benzolring eine weitere Spaltung zum stabilen Tropylium-Kation bei m/z 295 und dem instabilen Ion m/z 226 stattfand (Abb. 3.1-7). Das Tropylium-Kation war ein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems im Molekül. Das Ion m/z 226 verlor im weiteren Verlauf der Fragmentierung zunächst ein Sauerstoffatom (Ion m/z 210) und spaltete anschließend eine HCN-Gruppe ab, um das Ion m/z 183 zu bilden. Die im weiteren Verlauf entstandenen Ionen m/z 140, 126 und 112 stellten ebenfalls Tochterionen des Ions m/z 226 dar und bewiesen das Vorhandensein einer gesättigten aliphatischen Seitenkette im Molekül (Abb. 3.1-8).

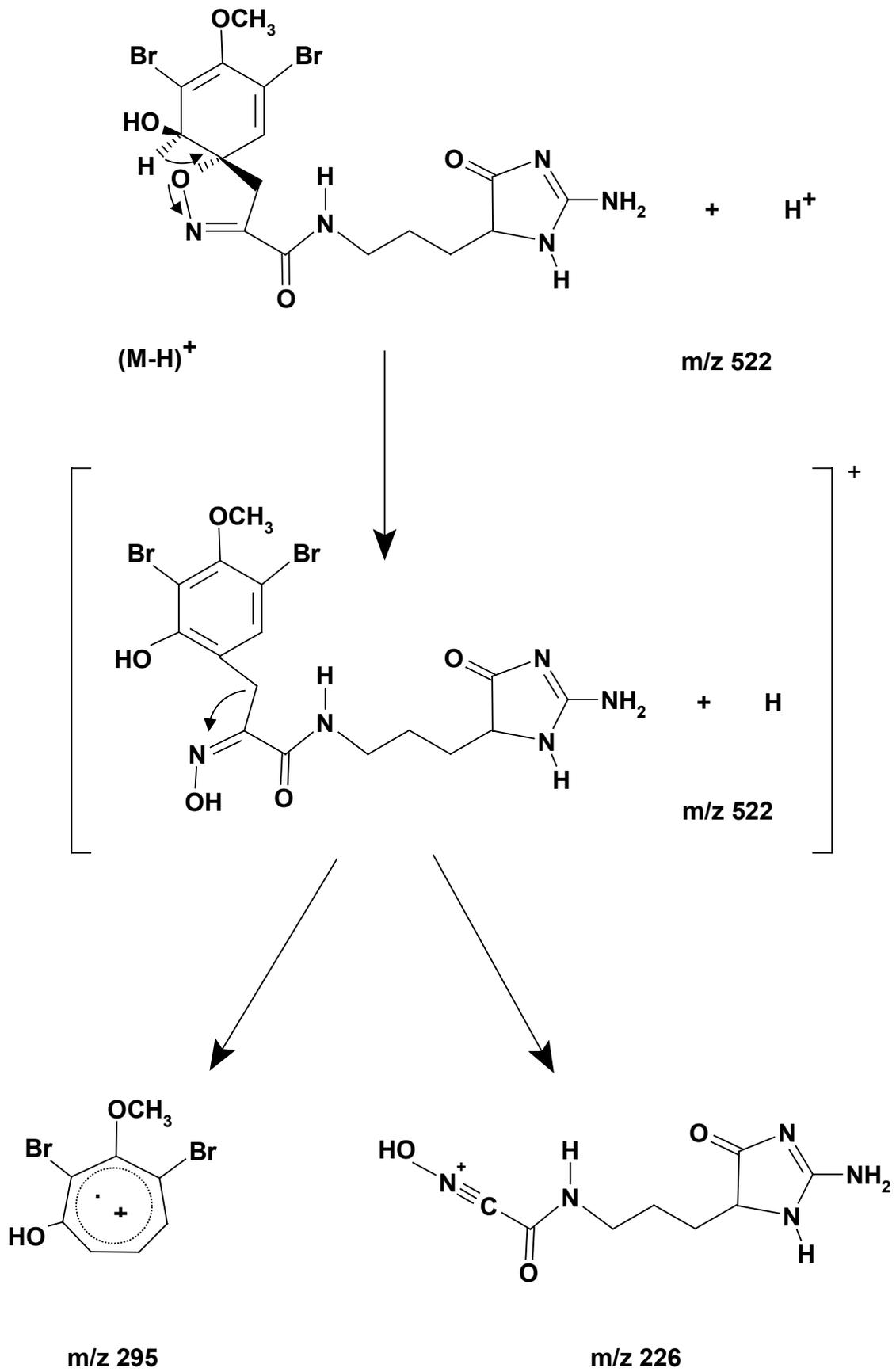


Abb. 3.1-7 Fragmentierung von 14-oxo-Aerophobin-2 (1).

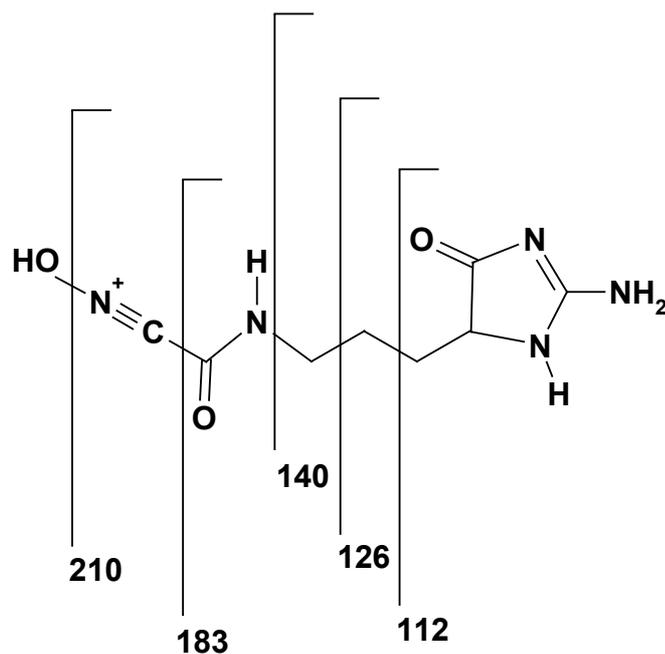
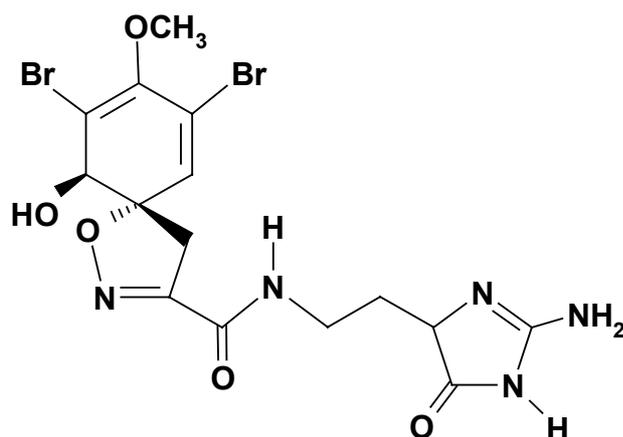


Abb. 3.1-8 Zerfallsschema des Ions m/z 226.

Im ^1H -NMR-Spektrum zeigten sich die für das Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystem charakteristischen Protonensignale des Aerophobin-2 (2) bei 4.13 ppm (1H, s, H-1), 6.46 ppm (1H, s, H-5), 3.13 ppm (1H, d, H-7b, $J = 18.3$ Hz) und 3.81 ppm (1H, d, H-7a, $J = 18.3$ Hz) (Tab. 3.1-1). Durch die charakteristischen ^{13}C -NMR-Signale der Kohlenstoffatome C-1 bis C-9 (Tab. 3.1-1) konnte die Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringstruktur ebenfalls bestätigt werden. Die Anwesenheit der aliphatischen Seitenkette von H-10 bis H-13 wurde durch ein ^1H - ^1H -COSY-Experiment belegt. Im Vergleich zum Aerophobin-2 (2) hingegen waren die Signale zum höheren Feld verschoben (Cimino *et al.*, 1983). Dieser Unterschied konnte durch den Verlust der Doppelbindung zwischen C-13 und C-14 im 14-oxo-Aerophobin-2 (1) und der damit verbundenen Anwesenheit des aliphatischen Kohlenstoffatoms C-13 begründet werden. Dieses aliphatische Kohlenstoffatom läßt sich auch im Puralidin K (15) finden.



Purealidin K (15)

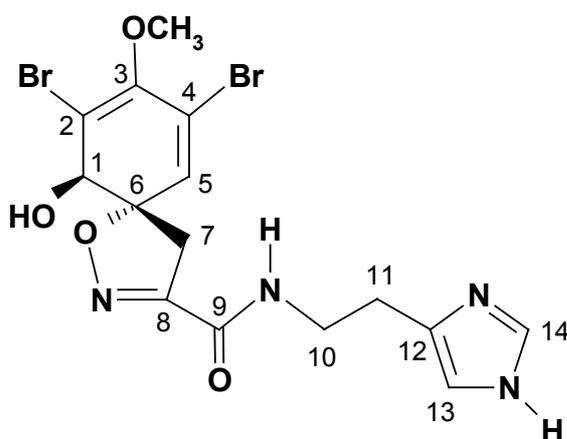
Der Verlust des Protonensignals von H-14 bei 6.47 ppm im Aerophobin-2 (2) gab einen eindeutigen Hinweis auf eine Veränderung in der Struktur des 14-oxo-Aerophobin-2 (1) an dieser Stelle. Durch charakteristische chemische ^{13}C -Verschiebungen (Tab. 3.1-1) und Vergleich der ^{13}C -NMR-Daten mit denen des Purealidin K (Abb. 3.1-9) (Kobayashi *et al.*, 1995) sowie unter Einbezug der Molekularmasse konnte die Struktur des neuen 14-oxo-Derivats des Aerophobin-2 (1) eindeutig ermittelt werden (Fendert *et al.*, 1999).

Die positiven Cotton-Effekte im CD-Spektrum ($c = 2.1 \times 10^{-4}$, MeOH) bei 245 nm ($\Delta^{20} E$: +1.9) und 287 nm ($\Delta^{20} E$: +1.7) erlauben die Schlußfolgerung, daß die absolute Konfiguration von C-1 und C-6 $1R$ bzw. $6S$ lautet (Mc Millan *et al.*, 1981). Damit entspricht die Konfiguration des (+)-14-oxo-Aerophobin-2 (1) den Ergebnissen bisheriger Untersuchungen zur absoluten Konfiguration der Isoxazolinalkaloide aus Mittelmeer- und der Karibik-Schwämmen. So wurden bis auf einzelne Alkaloide aus den Schwämmen *Psammaphysilla purpurea* (Pazifik) (Nakamura *et al.*, 1985), *Pseudoceratina verrucosa* (Neukaledonien) (Benharref *et al.*, 1996) und *Pseudoceratina* sp. (Karibik) (Aiello *et al.*, 1995) bisher ausschließlich (+)-Alkaloide aus Schwämmen der Gattung *Aplysina* und *Pseudoceratina* isoliert (Aiello *et al.*, 1995; Ciminiello *et al.*, 1994; 1997).

C No.	δ C	H No.	δ H
C-1	75,5 d	H-1	4.13 1H, s
C-2	114,1 s		
C-3	149,3 s		
C-4	122,8 s		
C-5	132,3 d		
C-6	92,3 s		
C-7	40,2 t	H-7b H-7a	3.13 1H, d, J = 18,27 3.81 1H, d, J = 18.26
C-8	155,3 s		
C-9	161,6 s	H-5	6.46 1H, s
C-10	39,9 t	H-10	3.34 - 3.37 m unter MeOH-Signal
C-11	29,8 t	H-11	1.65 1H, m 1.87 1H, m
C-12	25,6 t	H-12	1.65 2H,m
C-13	61,9 d	H-13	4.9 1H, t, J = 4.54 / 5.91 > 5.225
C-14	190,6 s		
C-15	171,4 s		
3-OCH ₃	60,4 q	3-OCH ₃	3.77 3H, s

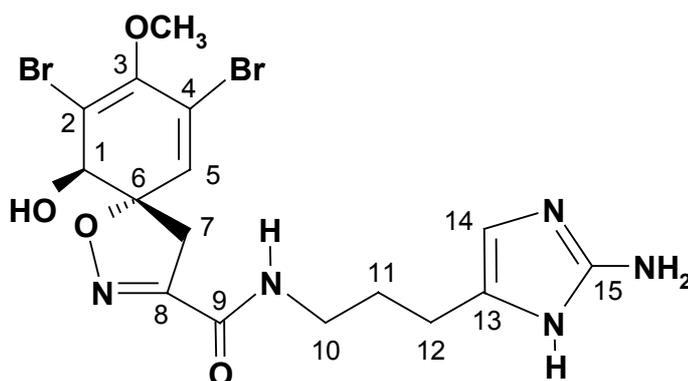
Tab. 3.1-1 ¹³C- und ¹H-NMR Daten von 14-oxo-Aerophobin-2 (1) in MeOH-*d*₄.

3.1.2.2 Strukturaufklärung der übrigen isolierten Schwamminhaltsstoffe



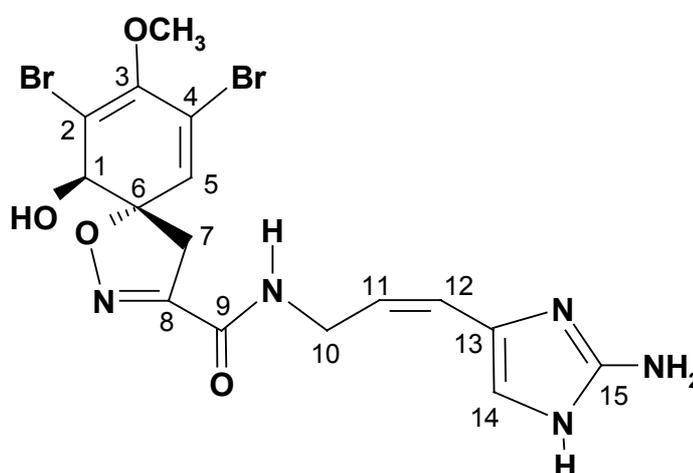
Aerophobin-1 (3) wurde als weißes amorphes Pulver isoliert. Im ESI-MS ergab sich ein für das zweifach bromierte Molekül typischer Cluster im Verhältnis von 1:2:1 bei m/z $[M+H]^+$ 475, 477, 479. Im CD-Spektrum konnten positive Cotton-Effekte ($c = 2.1 \times 10^{-4}$, MeOH) bei

252 nm ($\Delta^{20} E$: +1.6) und 286 nm ($\Delta^{20} E$: +1.4) festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der MS- und CD-Daten sowie durch einen Vergleich des UV-Spektrums nach HPLC mit der Spektrenbibliothek der HPLC-Gynkotek (s. 2.5.2.1) und durch eine Koelution mit der Reinsubstanz Aerophobin-1 (3) an der HPLC-Gynkotek konnte die Struktur für Aerophobin-1 (3) eindeutig aufgeklärt werden.



Aerophobin-2 (2) konnte als weißes Pulver von amorpher Beschaffenheit isoliert werden. Es ergab sich im ESI-MS ein Cluster für eine dibromierte Substanz bei m/z $[M+H]^+$ 504, 506, 508. Im ¹H-NMR-Spektrum konnten die für das Spirocyclohexadienisoaxazolin-Ringsystem charakteristischen Signale bei 4.12 ppm (H-1), 6.46 ppm (H-5), 3.13 ppm (H-7b) und 3.83 ppm (H-7b) erkannt werden (Tab. 3.1-2). Die Multiplizität der Signale bei 3.39 ppm (H-10), 1.88 ppm (H-11) und bei 2.58 ppm (H-12) (Tab. 3.1-2) deuteten auf eine aliphatische Seitenkette hin. Diese Annahme ließ sich durch einen Vergleich mit den Literaturdaten für Aerophobin-2 (2) bestätigen (Cimino *et al.*, 1983). Durch Vergleich der beiden Singulets bei 6.58 ppm (H-14) und 3.77 ppm (3-OCH₃) (Tab. 3.1-2) mit der gleichen Literaturstelle konnte deren Charakter als Wasserstoffatom am sp²-hybridisierten C-14 bzw. als Methylengruppe des Methoxyesters am C-3 eindeutig festgelegt werden. Aus den ESI-MS Daten und den ¹H-NMR Daten konnte auf die Struktur von Aerophobin-2 (2) geschlossen werden. Durch UV-Spektrenvergleich mit der Spektrenbibliothek der HPLC-Gynkotek und HPLC-Koelution mit der Reinsubstanz Aerophobin-2 (2) konnte die Struktur gleichermaßen bestätigt werden.

H No.	δ H
H-1	4.12 1H, s
H-5	6.46 1H, s
H-7b	3.13 1H, d, J = 18.30
H-7a	3.83 1H, d, J = 18.31
H-10	3.39 2H, t, J = 3.39
H-11	1.88 2H, q, J = 7.12
H-12	2.58 2H, t, J = 7.39
H-14	6.58 1H, s
3-OCH ₃	3.77 3H, s

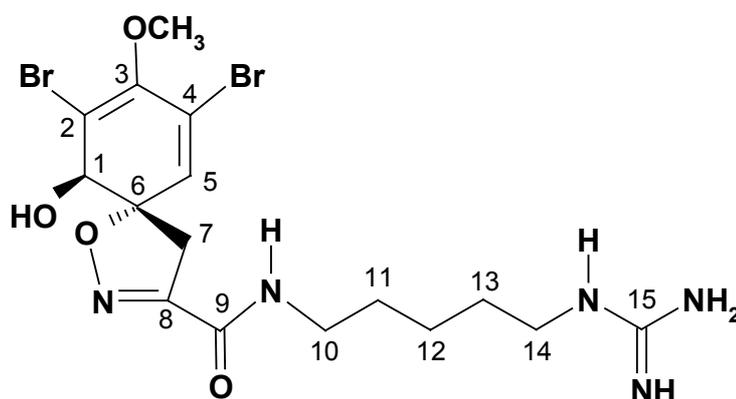
Tab. 3.1-2 ¹H-NMR Daten von Aerophobin-2 (2) in MeOH-*d*₄.

Aplysinamisin-1 (5) stand für die Untersuchungen als weißes amorphes Pulver zur Verfügung. Im ESI-MS konnte ein Cluster für eine zweifach bromierte Substanz im Verhältnis 1:2:1 bei m/z $[M+H]^+$ 502, 504, 506 als Hauptsignal erkannt werden. Nach Aufnahme des CD-Spektrums ergaben sich positive Cotton-Effekte ($c = 2.0 \times 10^{-4}$, MeOH) bei 244 nm ($\Delta^{20} E: +1.7$), 250 nm ($\Delta^{20} E: +1.7$), 263 nm ($\Delta^{20} E: +1.6$), 289 nm ($\Delta^{20} E: +1.0$) und 302 nm ($\Delta^{20} E: +0.9$). Die Signale im ¹³C- sowie ¹H-NMR-Spektrum (Tab. 3.1-3) für das Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystem (C-1 bis C-9; H-1, H-5, H-7a, H-7b) konnten eindeutig zugeordnet werden und zeigten große Übereinstimmung mit den Literaturwerten (Rodriguez *et al.*, 1993). Anhand der NMR-Daten für C-10 bis C-13 und H-10 bis H-12 konnte eine einfach ungesättigte aliphatische Seitenkette mit einer Doppelbindung zwischen C-11 (124.9 ppm) und C-12 erkannt werden, die mit den Literaturdaten für Aplysinamisin-1 (5) konform war (Rodriguez *et al.*, 1993). Bis auf eine geringfügige Abweichung bei C-15 (155.1 ppm im Gegensatz zu 151.5 ppm bei Rodriguez *et al.*, 1993), die auf eine tautomere Form der Guanidinstruktur des substituierten Imidazolrings schließen lässt, stimmten die ¹³C-

und $^1\text{H-NMR}$ -Daten für das Imidazolringsystem im Molekül mit denen des Aplysinamisin-1-Moleküls überein (Rodriguez *et al.*, 1993). Der Vergleich des UV-Spektrums mit der HPLC-Gynkotek-Spektrenbibliothek stützte die Struktur des Aplysinamisin-1-Moleküls (5) ebenfalls.

C No.	δ C	H No.	δ C
C-1	75.5 d	H-1	4.13 1H,s
C-2	114.2 d		
C-3	149.4 s		
C-4	122.8 s		
C-5	132.2 d	H-5	6.46 1H,s
C-6	92.5 s		
C-7	40.1 t	H-7b H-7a	3.14 1H, d, J = 18,24 3.84 1H, d, J = 18.21
C-8	155.3 s		
C-9	162.0 s		
C-10	39.4 t	H-10	4.12 2H, t, z.T. verdeckt
C-11	124.9 d	H-11	5.80 1H, d, J = 11.65
C-12	nicht vorhanden	H-12	6.24 1H, d, J = 11.70
C-13	117.2 d		
C-14	130.7 d	H-14	6.90 1H,s
C-15	155.1 s		
3-OCH ₃	60.4 q	3-OCH ₃	3.76 3H,s

Tab. 3.1-3 ^{13}C - und $^1\text{H-NMR}$ Daten von Aplysinamisin-1 (5) in MeOH-d_4 .

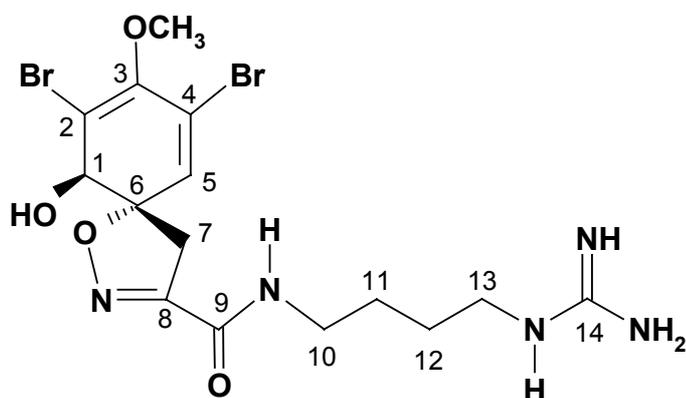


Aplysinamisin-2 (6) wurde als weißes amorphes Pulver isoliert, das im ESI-MS einen für dibromierte Substanzen charakteristischen Cluster bei m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 508, 510, 512 im Verhältnis 1:2:1 zeigte. Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte eindeutig das Vorliegen eines Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems mit H-1 (1H, s; 4.12 ppm), H-5 (1H, s; 6.46 ppm),

H-7b (1H, d, J = 18.27; 3.13 ppm) und H-7a (1H, d, J = 18.27; 3.82 ppm) nachgewiesen werden (Tab. 3.1-4). Mit H-10 (3.39 ppm), H-11 (1.66 ppm), H-12 (1.45 ppm), H-13 (1.66 ppm) und H-14 (3.22 ppm) erschienen im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum Signale (Tab. 3.1-4), die im Vergleich mit den Literaturwerten (Rodriguez *et al.*, 1993) einer aliphatischen Seitenketten zugeordnet wurden. Anhand der $^1\text{H-NMR}$ Daten und des Massenspektrums sowie der UV/VIS-Auswertung des HPLC-Chromatogramms der isolierten Substanz mit Hilfe der HPLC-Gynkotek-Spektrenbibliothek konnte nach einer zusätzlichen HPLC-Koelution mit der Reinsubstanz die Struktur als Aplysinamisin-2 (6) festgelegt werden.

H No.	δ H
H-1	4.12 1H,s
H-5	6.46 1H,s
H-7b	3.13 1H, d, J = 18.27
H-7a	3.82 1H, d, J = 18.27
H-10	3.39 2H, t z. T. verdeckt
H-11	1.66 2H, m
H-12	1.45 2H, m
H-13	1.66 2H, m
H-14	3.22 2H, t, J = 7.03
3-OCH ₃	3.77 3H, s

Tab. 3.1-4 $^1\text{H-NMR}$ Daten von Aplysinamisin-2 (6) in MeOH-*d*₄.

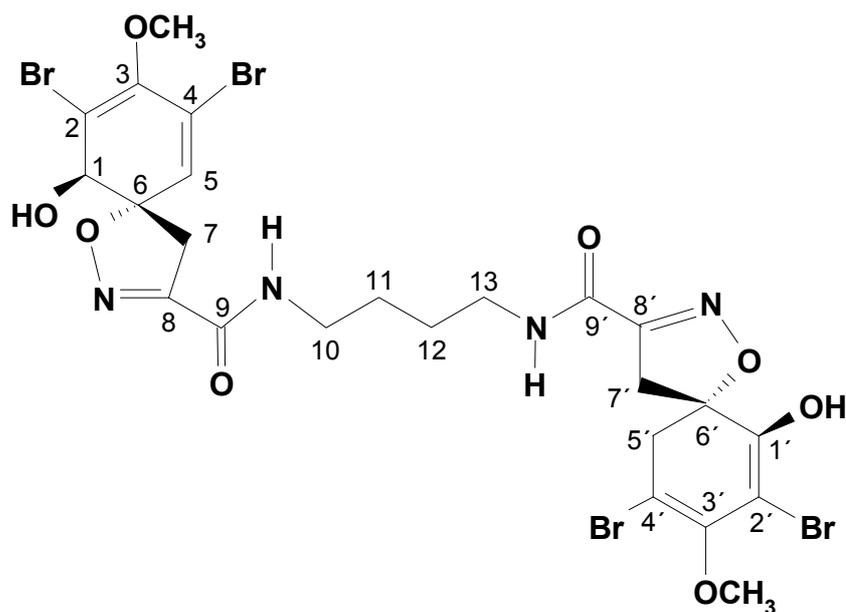


Purealidin L (4) konnte als weißes amorphes Pulver isoliert werden, dessen ESI-MS einen Cluster im Verhältnis 1:2:1 bei m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 494, 496, 498 zeigte, der für zweifach bromierte Verbindungen typisch ist. Das CD-Spektrum zeigte positive Cotton-Effekte ($c = 2.4 \times 10^{-4}$, MeOH) bei 247 nm ($\Delta^{20} E: +2.1$), 278 nm ($\Delta^{20} E: +1.7$) und 289 nm ($\Delta^{20} E: +1.6$). Wie bei den übrigen bekannten Bromoisoxazolinderivaten, die im Verlauf dieser Arbeit isoliert wurden, konnten auch hier anhand der ^{13}C - und $^1\text{H-NMR}$ -Spektren die entscheidenden Strukturmerkmale des Spirocyclohexadienisoxaolin-Ringsystems identifiziert werden (H-1, H-

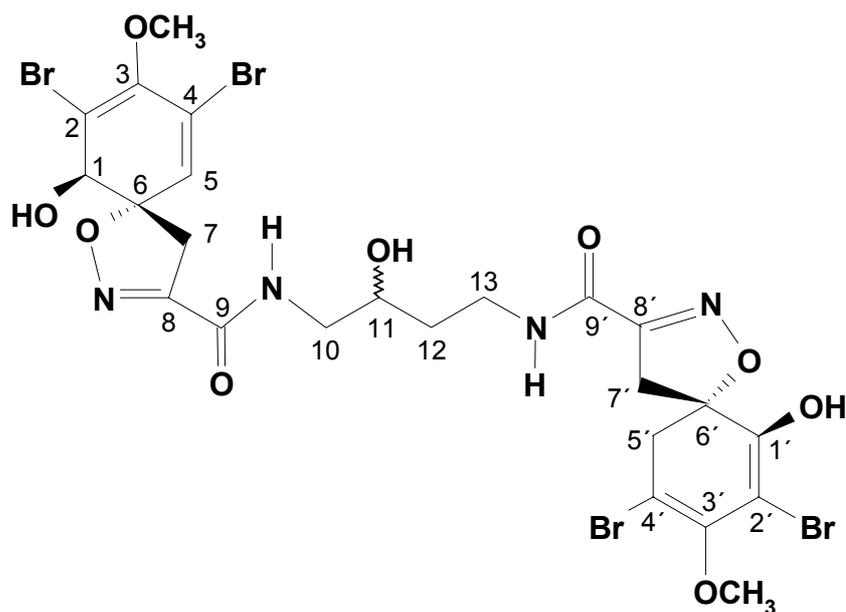
5, H-7b und H-7-a) (Tab. 3.1-5). Die Existenz einer aliphatischen Seitenkette (C-10, C-11, C-12 und C-13) wurde durch Vergleich der NMR-Daten mit den Literaturdaten für Puralidin L (4) geklärt. Auf das Vorhandensein einer Guanidinstruktur am Ende der aliphatischen Seitenkette wurde aufgrund der Übereinstimmung der ^{13}C -NMR Daten für C-14 mit den Literaturwerten für Puralidin L (4) (Kobayashi *et al.*, 1995) und Aplysinamisin-2 (6) (Rodriguez *et al.*, 1993) geschlossen, so daß letztlich die Struktur des Puralidin L (4) resultierte.

C No.	δ C	H No.	δ H
C-1	75.5 d	H-1	4.12 1H, s
C-2	114.1 s		
C-3	149.3 s		
C-4	122.8 s		
C-5	132.2 d	H-5	6.46 1H, d, J = 0.85
C-6	92.4 s		
C-7	39.7 t	H-7b H-7a	3.13 1H, d, J = 18.25 3.82 1H, d, J = 18.28
C-8	158.6 s		
C-9	161.7 s		
C-10	40.1 t	H-10	3.32-3.27 2H, m
C-11	27.6 t	H-11	1.62-1.71 2H, m
C-12	27.2 t	H-12	1.62-1.71 2H, m
C-13	42.1 t	H-13	3.23-3.27 2H, m
C-14	155.3 s		
3-OCH ₃	60.4 q	3-OCH ₃	

Tab. 3.1-5 ^{13}C - und ^1H -NMR Daten von Puralidin L in MeOH- d_4 .



Aerothionin (7) fiel als weißes amorphes Pulver nach der Isolierung an. Im ESI-MS fand sich ein Cluster im Verhältnis von 1:4:6:4:1 bei m/z $[M+H]^+$ 815, 817, 819, 821, 823, der auf ein Molekül mit vier Bromatomen schließen läßt. Positive Cotton-Effekte ließen sich im CD-Spektrum ($c = 1.8 \times 10^{-4}$, MeOH) bei 248 nm ($\Delta^{20} E: +2.3$) und 298 nm ($\Delta^{20} E: +1.5$) feststellen. Anhand von UV/VIS-Spektrenvergleich mit der Spektrenbibliothek der HPLC-Gynkotek und durch HPLC-Koelution mit der Reinsubstanz Aerothionin wurde unter Berücksichtigung der Molmasse auf die Struktur des Aerothionin (7) geschlossen.

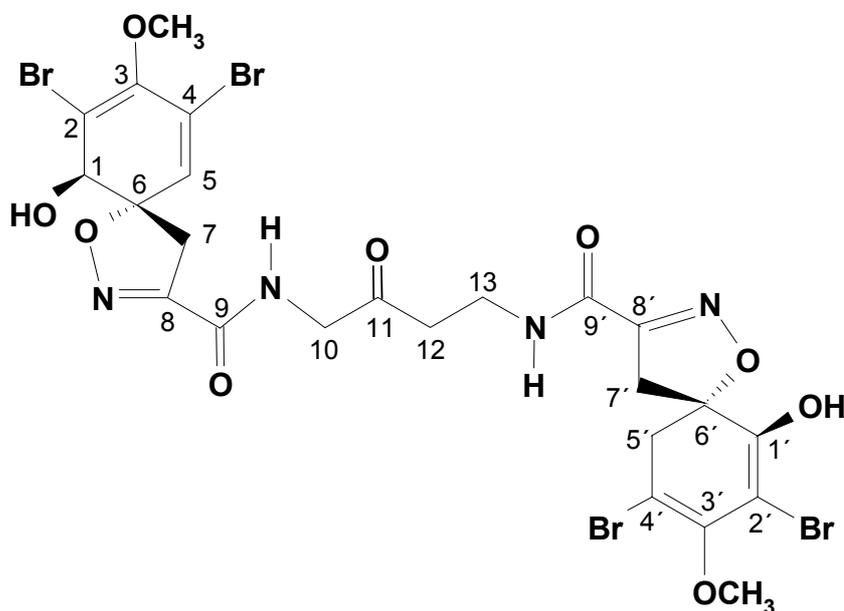


11-Hydroxy-Aerotherionin (8) stellte ein weißes pulverisiertes Isolat von amorpher Beschaffenheit dar. Für dieses Isolat wurde im ESI-MS ein Cluster im Verhältnis von 1:4:6:4:1 bei m/z $[M+H]^+$ 831, 833, 835, 837, 839 festgestellt. Ein so gearteter Cluster indiziert die Anwesenheit von vier Bromatomen im untersuchten Molekül. Im CD-Spektrum ($c = 1.3 \times 10^{-4}$, MeOH) konnten positive Cotton-Effekte bei 250 nm ($\Delta^{20} E: +2.3$) und 289 nm ($\Delta^{20} E: +0.7$) erkannt werden. Im 1H -NMR-Spektrum (Tab. 3.1-6) traten die meisten Signale als eng benachbarte Signalpaare auf, diese Tatsache legte den Schluß nahe, daß es sich bei der Substanz um ein Molekül handelte, welches sich aus zwei nahezu identischen Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystemen aufbaute. Im Vergleich mit den Literaturdaten (Acosta *et al.*, 1992) ließen sich die Signalpaare H-1/1', H-5/5' und H-7/7' (Tab. 3.1-6) schließlich wirklich zwei solcher Ringsysteme zuordnen. Die vier übrigen Signalmultipletts im Spektrum mußten somit eine die beiden Ringsysteme verbindende aliphatische Kette bilden. Während zwei der vier Signale im Vergleich zu rein aliphatischen Methylengruppen zu tieferem Feld verschoben sein mußten, da sich die Wasserstoffatome in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Seitenketten-Amidstickstoffen der Ringsysteme befanden, sollten die beiden übrigen Signale aufgrund des aliphatischeren Charakters des Umfelds zu höherem Feld verschoben sein. Mit H-11 existierte ein Signal (3.82 ppm) (Tab. 3.1-6), das dieser Überlegung nicht entsprach und somit den Schluß nahe legte, daß sich am Kohlenstoffatom C-11 neben dem vorgefundenen Wasserstoffatom ein elektronegativer Substituent befinden mußte. Durch Vergleich mit den Literaturdaten und unter Einbeziehung der Tatsache, daß die Wasserstoffatome der benachbarten Kohlenstoffatome der aliphatischen Seitenkette miteinander koppeln, kam als Substituent lediglich eine Hydroxyfunktion in Frage, wie auch

der Vergleich der $^1\text{H-NMR}$ -Daten mit den Literaturdaten für 11-hydroxy-Aerothionin (8) (Acosta *et al.*, 1992) ergab.

H No.	δ H
H-1/1'	4.76 1H, s 4.13 1H, s
H-5/5'	6.46 1H, s 6.46 1H, s
H-7/7'	b/b' 3.14 1H, d, J = 18.25 3.13 1H, d, J = 18.25 a/a' 3.83 1H, d, J = 18.23 3.82 1H, d, J = 18.28
H-10	3.41-3.35 2H, m unter MeOH verdeckt
H-11	3.82 2H, m verdeckt unter H-7a/a'
H-12b	1.71-1.59 1H, m
H-12a	1.87-1.76 1H, m
H-13	3.52-3.44 2H, m
3/3'-OCH ₃	3.77 6H, s

Tab. 3.1-8 $^1\text{H-NMR}$ Daten von 11-hydroxy-Aerothionin (8) in MeOH-*d*₄.

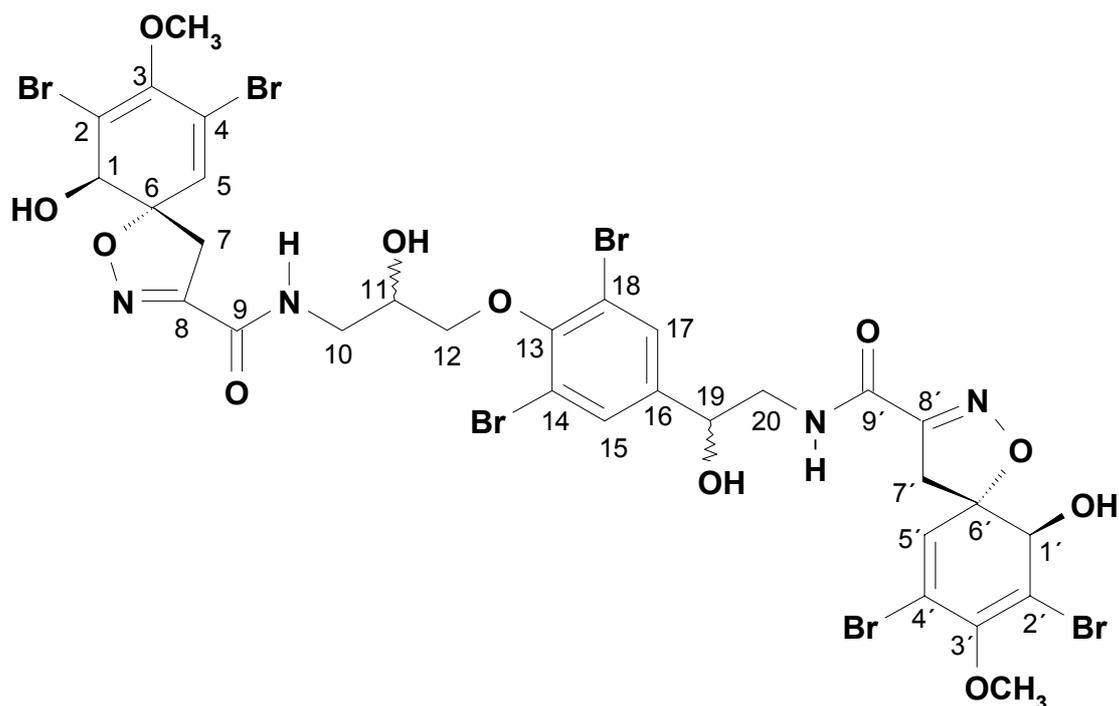


11-oxo-Aerothionin (9) wurde als weißes amorphes Pulver isoliert. Im ESI-MS ergab sich ein Cluster im Verhältnis 1:4:6:4:1 bei m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 829, 831, 833, 835, 837. Dieses Ergebnis ließ auf ein vierfach bromiertes Molekül schließen. Auch diese Substanz zeigte im CD-Spektrum ($c = 1.4 \times 10^{-4}$, MeOH) positive Cotton-Effekte bei 249 nm ($\Delta^{20} \text{E}: +1.9$) und 292 nm ($\Delta^{20} \text{E}: +1.1$). Wie zuvor bei 11-hydroxy-Aerothionin war auch hier anhand der $^1\text{H-NMR}$

Daten (Tab. 3.1-7) augenscheinlich, daß es sich um ein Molekül mit zwei Spirocyclohexadienisoaxazolin-Ringsystemen handelte (s.o.). Unter Hinzunahme der ^{13}C -NMR-Daten konnte diese Tatsache im Vergleich mit Literaturwerten (Acosta *et al.*, 1992) bestätigt werden. Größere Unterschiede zum 11-hydroxy-Aerothionin ergaben sich jedoch im Bereich der aliphatischen Seitenkette. Hier wurde kein Signal für H-11 festgestellt werden, insgesamt konnten nur drei aliphatische Protonensignale bei 4.18 ppm (H-10, 2H, s), 2.83 ppm (H-12, 2H, t) und 2.59 ppm (H-13, 2H, t) im ^1H -NMR-Spektrum (Tab. 3.1-7) entdeckt werden, die sich zudem noch deutlich in ihren chemischen Verschiebungen zum 11-hydroxy-Derivat unterschieden (vgl. Tab. 3.1-6). Die chemische Verschiebung zum tiefen Feld des Signals bei 4.18 ppm und dessen Singulettcharakter ließen den Schluß zu, daß es sich hierbei um H-10 handelte, das sich zwischen einem Säureamidstickstoff in der Seitenkette und einem benachbarten Carbonylkohlenstoff befand. Durch diese beiden angrenzenden Atome konnte es zu keiner Kopplung mit Nachbarprotonen kommen, womit sich der Singulettcharakter erklären ließ. Die erhöhten chemischen Verschiebungen für H-12 und H-13 stützten diese Annahme ebenso wie die typischen chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffatome C-10 bis C-13 (Tab. 3.1-7). Im Vergleich der NMR-Daten mit den Literaturdaten (Acosta *et al.*, 1992) für 11-oxo-Aerothionin (9) konnte dessen Struktur bestätigt werden.

C No.	δ C	H No.	δ H
C-1,1'	75,51 d	H-1,1'	4.16 1H, s 4.13 1H, s
C-2,2'	114,17 s		
C-3,3'	149,32 s		
C-4,4'	122,75 s		
C-5,5'	132,28 d 132,24 d	H-5,5'	6.48 1H, s 6.45 1H, s
C-6,6'	92,67 s 92,45 s		
C-7,7'	40,12 t 40,02 t	H-7b H-7b' H-7a H-7a'	3.15 1H, d, J = 18.28 3.12 1H, d, J = 18.26 3.83 1H, d, J = 18.26 3.81 1H, d, J = 18.24
C-8,8'	155,18 s 154,92 s		
C-9,9'	161,83 s		
C-10	48,61 t unter MeOH verdeckt	H-10	4.18 2H, s
C-11	205,72 s		
C-12	39,79 t	H-12	2.83 2H, t, J = 6.59
C-13	35,38 t	H-13	3.59 2H, t, J = 6.56
3,3'-OCH ₃	60,39 q	3,3'-OCH ₃	3.77 3H, s 3.77 3H, s

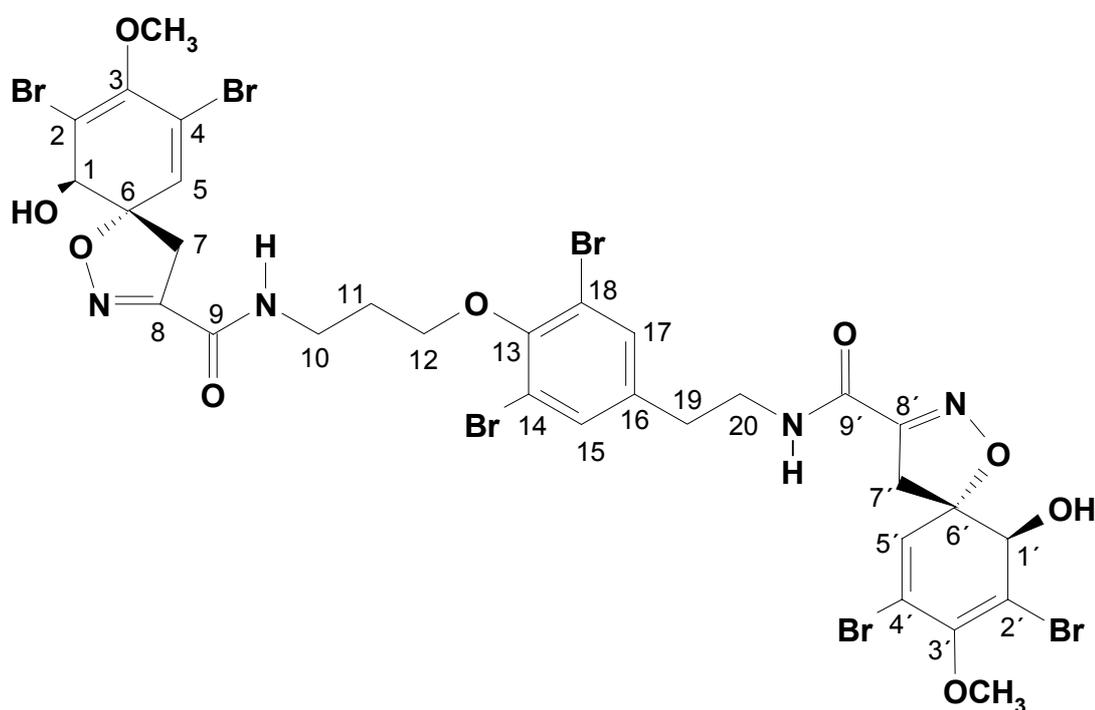
Tab. 3.1-7 ¹³C- und ¹H-NMR Daten von 11-oxo-Aerotionin in MeOH-d₄.



Fistularin-3 (10) wurde als weißes amorphes Pulver isoliert. Im ESI-MS konnte ein Cluster bei m/z $[M+H]^+$ 1109, 1111, 1113, 1115, 1117, 1119, 1121 festgestellt werden, der auf ein Molekül mit sechs Bromatomen schließen ließ. Auf das Vorliegen zweier Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsysteme konnte aufgrund der doppelten, voneinander leicht abweichenden typischen Signale (H-1/1', H-5/5', H-7a/a' und H-7b/b') für dieses Strukturmerkmal im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum geschlossen werden (Tab. 3.1-8). Die zwei aromatischen Wasserstoffatome H-15 und H-17 lieferten ein für symmetrische, isolierte Wasserstoffatome innerhalb eines mit zwei Bromatomen substituierten Benzolringes typisches, gemeinsames Singulettsignal bei 7.49 ppm im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (Tab. 3.1-8). Unter Berücksichtigung der Molekularmasse wurden damit erste Rückschlüsse auf die Molekularstruktur von Fistularin-3 (10) gezogen. Bei näherer Betrachtung der aliphatischen Wasserstoffatom-Signale (H-10, H-11, H-12, H-19, H-20) konnte durch die Aufnahme eines COSY-Spektrums auf zwei aliphatische Seitenketten (C-10 bis C-12 und C-19 bis C-20) geschlossen werden, von denen beide jeweils ein Kohlenstoffatom mit Hydroxysubstituent besaßen (C-11, C-19) (Tab. 3.1-8). Als Resümee aller Daten wurde die Struktur von Fistularin-3 (10) für das Molekül angenommen, die durch einen NMR-Daten-Vergleich mit den Literaturwerten bestätigt wurde (Gopichand und Schmitz, 1979).

H No.	δ H
H-1/1'	4.14 2H, s
H-5/5'	6.46 1H, s 6.45 1H, s
H-7b/b'	3.15 1H, d, J = 18.0 3.10 1H, d, J = 18.1
H-7a/a'	3.81 1H, d, J = 18.0 3.77 1H, d, J = 18.0
H-10a	3.55 1H, t, J = 13.8, 6.5
H-10b	3.55 1H, t, J = 13.2, 7.2
H-11	4.26 1H, dd, J = 5.2, 4.9
H-12a	4.10 1H, t, J = 9.2, 5.5
H-12b	4.10 1H, t, J = 8.5, 5.5
H-15/17	7.66 2H, s
H-19	4.81 1H, dd, J = 7.2, 4.9
H-20a	3.45 1H, dd, J = 13.6, 3.7
H-20b	3.45 1H, dd, J = 13.7, 7.4
3/3'-OCH ₃	3.77 6H, s

Tab. 3.1-8 ¹H-NMR Daten von Fistularin-3 (10) in MeOH-*d*₄.

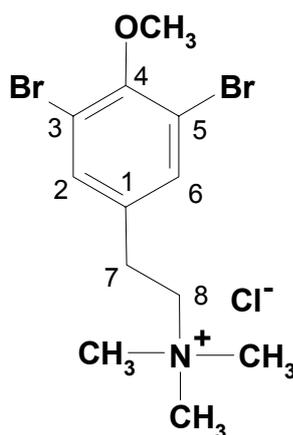


11,19-dideoxy-Fistularin-3 (11) wurde als gelblich-weißes amorphes Pulver isoliert. Die APCI-MS Analyse ergab im Spektrum ein Cluster von sieben Signalen bei m/z $[M+H]^+$ 1077, 1079, 1081, 1083, 1085, 1087, 1089, der für Moleküle mit sechs Bromatomen charakteristisch ist. Im CD-Spektrum ($c = 1.9 \times 10^{-4}$, MeOH) zeigten sich positive Cotton-

Effekte bei 248 nm ($\Delta^{20} E$: +1.3), 258 nm ($\Delta^{20} E$: +1.4), 287 nm, 286 nm und 295 nm (jeweils $\Delta^{20} E$: +1.2). Im 1H -NMR-Spektrum waren ähnlich wie im Fistularin-3 (10) doppelte Signalesätze eines Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems (H-1/1', H-5/5', H-7a/a' und H-7b/b'; s. Tab. 3.1-9) zu erkennen. Des weiteren konnten fünf Signale ausgemacht werden, die durch ihre Multiplizität auf zwei aliphatische Seitenketten schließen ließen (H-10, H-11, H-12 und H-19, H20) (Tab. 3.1-9). Durch das Auftreten des Singulett im tiefen Feld bei 7.51 (H-15/17) ppm mit zweifacher Intensität konnte auf ein symmetrisch substituiertes aromatisches Ringsystem geschlossen werden. Diese Feststellungen legten die Schlußfolgerung nahe, daß es sich um 11,19-dideoxy-Fistularin-3 handelte. Im Vergleich mit den 1H -NMR-Daten von 11,19-dideoxy-Fistularin-3 (11) (Kernan *et al.*, 1990) konnte dessen Struktur in Verbindung mit den MS-Daten eindeutig bestätigt werden.

H No.	δ H
H-1/1'	4.13 2H, s
H-5/5'	6.46 1H, s 6.45 1H, s
H-7b/b'	3.16 1H, d, J = 18.21 3.10 1H, d, J = 18.17
H-7a/a'	3.83 1H, d, J = 18.25 3.79 1H, d, J = 18.66 z.T. unter OCH ₃
H-10	3.63 2H, t, J = 6.98
H-11	2.15 2H, q, J = 6.55
H-12	4.10 2H, t, J = 6.07
H-15/17	7.51 2H, s
H-19	2.84 2H, t, J = 7.10
H-20	3.52 2H, t, J = 7.00
3/3'-OCH ₃	3.77 6H, s

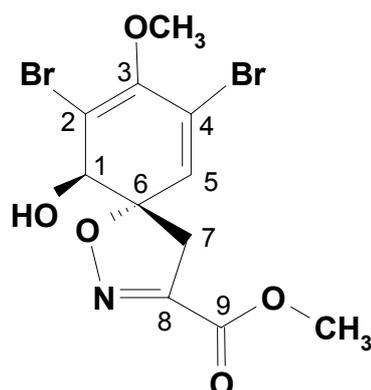
Tab. 3.1-9 1H -NMR Daten von 11,19-dideoxy-Fistularin-3 (11) in MeOH-*d*₄.



2-(3,5-di-brom-4-methoxyphenyl)-Ethyltrimethylammoniumchlorid (13) wurde als weißes amorphes Pulver isoliert. Ein Cluster im ESI-MS im Verhältnis von 1:2:1 bei m/z $[M+H]^+$ 350, 352, 354 wies auf ein Molekül mit zwei Bromatomen hin. Ein Singulett-Signal bei 7.65 ppm (H-2/6) (Tab. 3.1-10) mit der Intensität von zwei Wasserstoffatomen gab aufgrund seiner chemischen Verschiebung zum tiefen Feld im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum eindeutige Hinweise auf zwei H-Atome, die in unmittelbarer Nachbarschaft von zwei Bromsubstituenten an einem symmetrisch substituierten, aromatischen Ringsystem liegen mußten. Durch das Fehlen der für Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsysteme charakteristischen Signale bei 4.16 ppm (H-1) und 6.45 ppm (H-5) konnte es sich hier nicht um eine solches Ringsystem handeln. Zwar konnten Signale bei 3.14 ppm (H-7, s. Tab. XY) und 3.60 ppm (H-8, s. Tab. 3.1-10) ausgemacht werden, die den chemischen Verschiebungen für die typischen Signale für H-7b und H-7a im Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystem entsprechen. Durch die zugehörigen Kopplungskonstanten wurde jedoch klar, daß es sich hierbei um die Signale von vier Wasserstoffatomen einer aliphatischen Ethyl-Seitenkette handelte, wie es für ein Molekül wie das 2-(3,5-di-brom-4-methoxyphenyl)-Ethyltrimethylammoniumchlorid (13) typisch ist. Die zwei Singulett-Signale im hohen Feld bei 3.89 ppm (4-OCH₃) und 3.25 ppm (N(CH₃)₃), die für drei bzw. neun Wasserstoffatome standen, konnten isolierten Methylgruppen an einem Sauerstoff- bzw. Stickstoffmolekül zugeschrieben werden (Tab. 3.1-10). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der ESI-MS und durch Vergleich mit den $^1\text{H-NMR}$ -Literaturdaten für 2-(3,5-di-brom-4-methoxyphenyl)-Ethyltrimethylammoniumchlorid (13) (Ciminiello *et al.*, 1994) konnte die Struktur eindeutig ermittelt werden.

H No.	δ H
H-2/6	7.65 2H, s
H-7	3.14 2H, d, t, AB = A'B' J = 17.43 AB' = A'B J = nicht meßbar BB' = AA' J = 12.52
H-8	3.60 2H, d, t, AB = A'B' J = 17.33 AB' = A'B J = nicht meßbar BB' = AA' J = 12.34
4-OCH ₃	3.89 3H, s
N(CH ₃) ₃	3.25 9H, s

Tab. 3.1-10 ¹H-NMR Daten von 2-(3,5-di-brom-4-methoxyphenyl)-Ethyltrimethylammoniumchlorid (13) in MeOH-*d*₄.

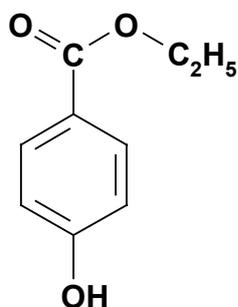


7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat (12) konnte als weißes amorphes Pulver isoliert werden. Am typischen Brom-Cluster im Verhältnis von 1:2:1 konnte bei m/z $[M+H]^+$ 396, 398, 400 im ESI-MS erkannt werden, daß zwei Bromatome im Molekül enthalten sein mußten. Anhand der ¹³C- und ¹H-NMR-Daten konnte das Vorhandensein des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems klar festgestellt werden (C-1 bis C-7 und H-1, H-5, H-7b, H-7a; s. Tab. 3.1-11). Da das ¹³C-NMR-Spektrum nur drei zusätzliche Signale bei 155.3 ppm (C-8), 164.0 ppm (C-9) und 53.2 ppm (9-OCH₃) zeigte, lag die Vermutung nahe, daß eine sehr kurze Seitenkette mit stark elektronegativen Substituenten vorlag (Tab. 3.1-11). Da für zwei dieser drei C-Signale keine entsprechenden H-Signale im ¹H-NMR-Spektrum vorhanden waren und das einzige H-Signal als isoliertes Singulett bei 3.90 ppm erschien, konnte unter Berücksichtigung der chemischen Verschiebung der C-Signale bei 155.3 ppm (C-8) und 164.0 ppm (C-9) zum tiefen Feld

angenommen werden, daß es sich bei der Seitenkette um einen Methylcarboxylatsubstituenten handelte (Tab. 3.1-11). Diese sich daraus ergebende Struktur konnte unter Einbeziehung der ESI-MS Daten und Vergleich mit den Literaturdaten für 7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat (12) (Aiello *et al.*, 1992, Ciminiello *et al.*, 1994) bestätigt werden.

C No.	δ C	H No.	δ H
C-1	75.5 d	H-1	4.16 1H, s
C-2	114.2 s		
C-3	149.4 s		
C-4	122.8 s		
C-5	132.3 d	H-5	6.45 1H, s
C-6	92.4 s		
C-7	40.2 t	H-7b H-7a	3.15 1H, d, J = 18.26 3.80 1H, d, J = 18.26
C-8	155.3 s		
C-9	164.0 s		
3-OCH ₃	60.4 t	3-OCH ₃	3.77 3H, s
9-OCH ₃	53.2 t	9-OCH ₃	3.90 3H, s

Tab. 3.1-11 ¹³C- und ¹H-NMR Daten von 7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat (12) in MeOH-*d*₄.



p-hydroxy-Benzoessäureethylester (14) wurde als weißes Pulver amorpher Beschaffenheit mit einer Masse von m/z $[M+H]^+$ 167 (ESI-MS) isoliert. Die Struktur wurde anhand von UV/VIS-Spektrenvergleich mit Hilfe der Gynkotek-Spektrenbibliothek und durch HPLC-Koelution mit der Reinsubstanz (Sigma) unter Einbeziehung der MS-Daten ermittelt. Als weiteres Kriterium zur Strukturaufklärung diente der Vergleich von unter identischen Bedingungen gewonnenen HPLC-Daten mit denen des isolierten p-hydroxy-Benzoessäureethylesters (14) aus *Verongia* ssp. (Teeyapant, 1994).

3.1.3 Diskussion

Für die Familie der Aplysinidae sind in den vergangenen 30 Jahren eine Vielzahl von bromierten Tyrosinderivaten als charakteristische Inhaltsstoffe in der Literatur beschrieben worden. So wurden alleine für den karibischen Schwamm *Aplysina fistularis* seit 1967 annähernd 30 unterschiedliche Sekundärmetabolite dieser Art beschrieben. Dieser Schwamm sowie der karibische Schwamm *Aplysina cauliformis* können heute als Pionierorganismen genannt werden, aus denen die ersten Vertreter dieser Substanzgruppe isoliert werden konnten (Sharma und Burkholder, 1967; Minale *et al.*, 1976). Während diese beiden Sekundärmetabolite Dienon (16) und Dimethoxyketal (17) noch von relativ einfacher Struktur waren, wurden die Strukturen späterer Isolate stereochemisch komplizierter, wie z. B. im Aerothionin (7) oder Fistularin-3 (10). Die große Zahl der bromierten Tyrosinderivate läßt sich jedoch chemisch relativ einfach in die Gruppe der Spirocyclohexadienisoxazolin-Derivate, auch Bromoisoxazolin-Derivate genannt (z.B. 2, 10), und die Bromotyrosin-Derivate unterteilen (z.B. 16, 13). Trotz der großen Anzahl unterschiedlicher Bromoisoxazolinalkaloide aus Schwämmen der Ordnung Verongida wurde bisher nur vereinzelt der Versuch unternommen anhand der Verteilungsmuster dieser Alkaloide in bestimmten Schwammarten chemotaxonomische Aussagen zu treffen (Ciminiello *et al.*, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für Schwämme der Arten *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina archeri* und *Aiolochoxia crassa* unter den gegebenen Bedingungen ein repräsentatives und damit charakteristisches HPLC-Chromatogramm bei einer Detektionswellenlänge von 254 nm ermittelt. Für die Schwämme der Art *Aplysina lacunosa*, *Verongula gigantea* und *Verongula rigida* konnte aufgrund der geringen Zahl untersuchter Individuen keine aussagekräftige Beurteilung der HPLC-Chromatogramme vorgenommen werden. Diese Methode bietet somit erstmals eine eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit verschiedener Schwämme der Ordnung Verongida auf biochemischer Ebene. Eine exakte qualitative und quantitative Analyse aller in den untersuchten Schwämmen vorkommenden Bromotyrosinderivate war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Eine solche Analyse würde jedoch eine statistische Absicherung der Ergebnisse dieser Arbeit darstellen.

In der vorliegenden Arbeit konnten aus dem karibischen Schwamm ***Aplysina insularis*** insgesamt 14 Inhaltsstoffe isoliert werden (Abb. 3.1-6), wovon 14-oxo-Aerophobin-2 (1) als neues Bromoisoxazolin-Alkaloid erstmals beschrieben werden konnte. Die übrigen Isolate waren bereits aus der Literatur bekannt, jedoch nicht für die Art *Aplysina insularis*. Als

einzigste Ausnahme sei Fistularin-3 (10) genannt, das bereits als Sekundärmetabolit aus diesem Schwamm von Ciminiello *et al.* (1996) isoliert und charakterisiert wurde.

Aerothionin (7) und seine Derivate 11-hydroxy-Aerothionin (8) und 11-oxo-Aerothionin (9) wurden zuvor unter anderem für den Schwamm *Aplysina fulva* beschrieben, nicht jedoch für die sehr eng verwandte Art *Aplysina insularis*. Vergleichende Untersuchungen der Inhaltsstoffmuster von *Aplysina insularis* und *Aplysina fulva* früherer Autoren (Ciminiello *et al.*, 1996) folgerten aus dieser Tatsache den chemotaxonomischen Charakter dieser drei Alkaloide für den Schwamm *Aplysina fulva*. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte diese Annahme jedoch eindeutig widerlegt werden, da die genannten Alkaloide auch in *Aplysina insularis* gefunden wurden.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde verdeutlicht, daß chemotaxonomische Fragestellungen im Bereich der Bromoisoxazoliinalkaloide nur mit Hilfe breit angelegter Untersuchungen durchgeführt werden können. So können Aussagen über das charakteristische Inhaltsstoffmuster einer Schwammart nur auf Basis einer Studie mit einer angemessen großen Zahl an Individuen einer Art durchgeführt werden, um die große Schwankungsbreite der Bromotyrosinalkaloidmuster in Schwämmen unterschiedlicher Herkunft interpretieren zu können. Dies scheint um so angebrachter, als trotz der über 30 Jahre währenden Erforschung dieser Alkaloide chemotaxonomische Arbeiten die große Ausnahme darstellen (Ciminiello *et al.*, 1996).

3.2 Charakterisierung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms

Bei der Untersuchung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms wurde an die Arbeiten von Ebel (Ebel, 1998; Ebel *et al.*, 1997) und Teeyapant (Teeyapant, 1994; Teeyapant und Proksch, 1993) angeknüpft, in denen dieses Enzym erstmalig für den Schwamm *Aplysina aerophoba* (Teeyapant und Proksch, 1993) teilweise charakterisiert wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Enzym für den untersuchten Schwamm *Aplysina cauliformis* unter den wichtigsten Gesichtspunkten charakterisiert, um einen Vergleich zu den bisher untersuchten Aerophobin-abbauenden Enzymen (= Isoxazolin-spaltende Enzyme) von Ebel und Teeyapant aus Schwämmen der gleichen Familie ziehen zu können.

Wie bereits von Teeyapant (Teeyapant und Proksch, 1993) und Ebel (Ebel *et al.*, 1997) beschrieben, handelt es sich bei diesem Enzym um ein durch Verwundung des Schwammgewebes freigesetztes Enzym, das innerhalb von Sekunden Protoxine wie Isofistularin-3 (19), Aerothionin (10) und Aerophobin-2 (2) in den biologisch aktiven Metabolit Aeroplysinin-1 (18) abbaut, um z.B. Fraßfeinde abzuschrecken (Abb. 3.2-1).

Im Fall des Isofistularin-3 (19) verläuft diese Umsetzung im Unterschied zu den übrigen untersuchten Substraten über Fistularin-1 (21) als Zwischenstufe (Teeyapant, 1994) (Abb. 3.2-2). Ebel konnte weiter zeigen, daß bei dieser Metabolisierung neben den biologisch aktiven Alkaloiden Aeroplysinin-1 (18) und Dienon (16) als unwirksames Produkt ein abgewandeltes Mittelstück des Isofistularin-3 (19) das Bisoxazolidon-Derivat (20) anfällt (Ebel, 1998) (Abb. 3.2-2).

Wie Teeyapant (1994) zeigen konnte, war diese Protoxin-Umsetzung allerdings das Ergebnis zweier aufeinanderfolgender enzymatischer Stoffwechselschritte, wobei die angebotenen Substrate zunächst durch das Isoxazolin-spaltende Enzym zu Aeroplysinin-1 (18) umgesetzt wurden (Teeyapant, 1994). Das folgende Enzym baute Aeroplysinin-1 (18) zum Endprodukt Dienon (16) um, dessen Wirkungen in mehreren biologischen Testsystemen gegen unterschiedliche Bakterienstämme und Krebszelllinien annähernd vergleichbar mit denen von Aeroplysinin-1 (18) waren (Sharma und Burkholder, 1967; Kreuter *et al.*, 1989; Teeyapant *et al.*, 1993; Koulmann *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1996), wobei eine insgesamt jedoch stärkere Wirkung für Aeroplysinin-1 (18) zu erkennen war.

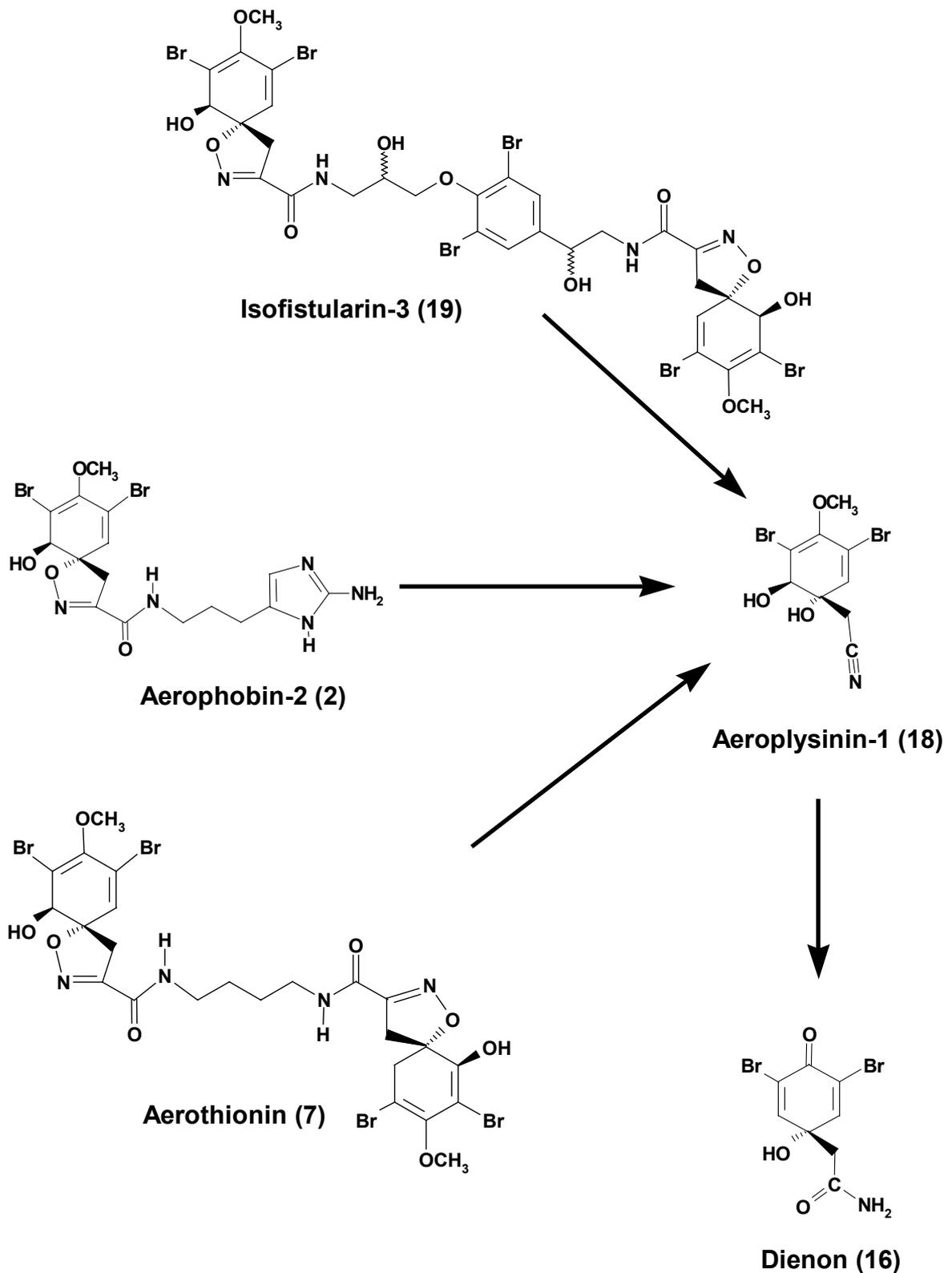


Abb. 3.2-1 Wundinduzierte enzymatische Abwehrreaktion in Schwämmen der Familie Aplysinidae.

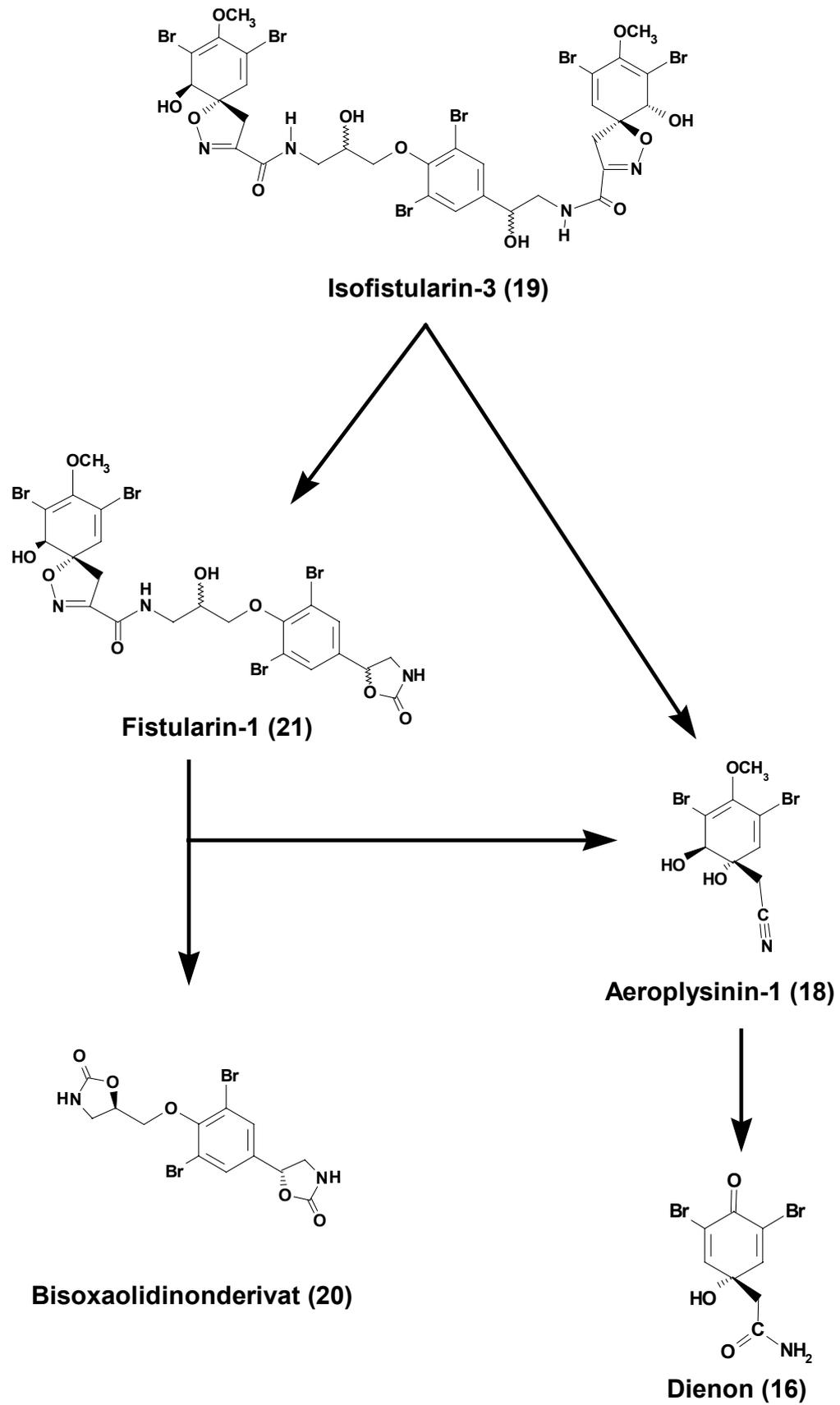


Abb. 3.2-2 Vollständige enzymatische Spaltung von Isofistularin-3.

3.2.1 Temperatur-Optimum

Zur Ermittlung des Temperaturoptimums des Isoxazolin-spaltenden Enzyms aus *Aplysina cauliformis* wurde der Umsatz von Isofistularin-3 (19) als Substrat in Temperaturintervallen von 10°C in einem Temperaturbereich von 10°C – 80°C ermittelt. Nachdem Ergebnisse von Teeyapant (1994) auf einen für das Enzym optimalen Temperaturbereich von 50°C - 60°C hindeuteten, wurde der Substratumsatz zwischen 40°C und 60°C in Intervallen von 5°C untersucht. Der Substratumsatz und damit die Aktivität des Enzyms wurden anhand der Peakflächendifferenzen aus einer Kontrolle (ohne Enzymzusatz) und der jeweiligen Probe mit Enzym errechnet (vgl. 2.6.4.1). Die Probe mit der höchsten Substratumsatzrate wurde gleich 100% gesetzt und für die Berechnung der relativen Umsatzraten aller übrigen Werte herangezogen. Da das verwendete Puffersystem bei Raumtemperatur auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurde, sich dieser jedoch bei Temperaturänderungen verschiebt, wurde zur Berechnung des exakten pH-Werts bei allen eingestellten Temperaturen ein dem Puffersystem entsprechender Korrekturfaktor herangezogen (Holtzhauer, 1988).

Auch für das untersuchte Isoxazolin-spaltende Enzym aus *Aplysina cauliformis* konnte die maximale Aktivität zwischen 50°C und 60°C festgestellt werden (Abb. 3.2-3). Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor gefundenen Daten von Teeyapant (1994) für das gleiche Enzym aus *Aplysina aerophoba*. Teeyapant verwendete als Meßgröße allerdings die Produktentstehung (Aerplysinin-1 (18) und Dienon (16)), wobei zu beachten ist, daß durch das Isoxazolin-spaltende Enzym als einziges Produkt Aerplysinin-1 (18) entsteht. Dieses wird anschließend durch das zweite Enzym unmittelbar in Dienon (16) umgesetzt (s. 3.2). Hieraus können sich jedoch aufgrund anzunehmender unterschiedlicher molarer Extinktionskoeffizienten und unterschiedlicher Absorptionsmaxima beider Substanzen Ungenauigkeiten bei der Produktmessung durch Peakflächenberechnung ergeben. Um diese Probleme zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Substratabnahme als Meßgröße verwendet. Der Abfall der Umsatzrate bei Temperaturen höher als 60°C läßt sich mit der beginnenden, hitzebedingten Denaturierung des Enzyms erklären. Bei 80°C kam es schließlich zur kompletten Inaktivierung des Enzyms (Abb. 3.2-3).

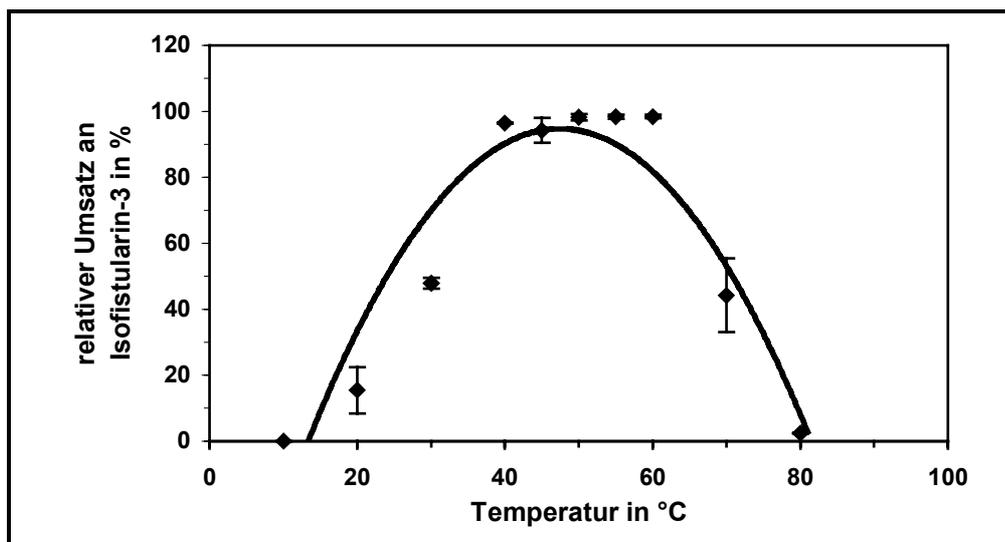


Abb. 3.2-3 Temperatureinfluß auf die Substratumsetzung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms aus *Aplysina cauliformis*

3.2.2 pH-Optimum

Um die Umsatzrate des angebotenen Substrats Isofistularin-3 (19) bei verschiedenen pH-Werten zu ermitteln, wurde die Peakflächendifferenz des Substrats aus der jeweiligen Probe und den Kontrollen bestimmt. Zur Ermittlung der relativen Substratumsatzrate wurde die höchste Umsatzrate gleich 100% gesetzt und für die weitere Berechnung verwendet. Wie auch bei 3.2.1 wurden die exakten pH-Werte der gewählten Puffersysteme mit Hilfe der entsprechenden Korrekturfaktoren für die Assay-Temperatur von 50°C berechnet (Holtzhauer, 1988).

Bei der Bestimmung des pH-Bereichs mit maximaler Substratumsetzung (Isofistularin-3 (19)) zeigte das Enzym optimale Umsatzraten zwischen pH 5.5 und 6.5 (Abb. 3.2-4) und weicht damit vom pH-Optimum ab, das von Teeyapant (1994) für das Isoxazolin-spaltende Enzym aus *Verongia aerophoba* (syn. *Aplysina aerophoba*) bei pH 5.0 gefunden wurde. Das in der vorliegenden Arbeit bestimmte pH-Optimum zwischen pH 5.5 und 6.5 bestätigt hingegen den von Ebel (1998) gefunden optimalen pH-Wert von 5.8 für dieses Enzym. Die große Abweichung zwischen den in dieser Arbeit beschriebenen Werten und den Werten von Teeyapant lassen sich eventuell durch die Verwendung unterschiedlicher Meßgrößen zur Bestimmung der Enzymaktivität erklären (vgl. 3.2.1).

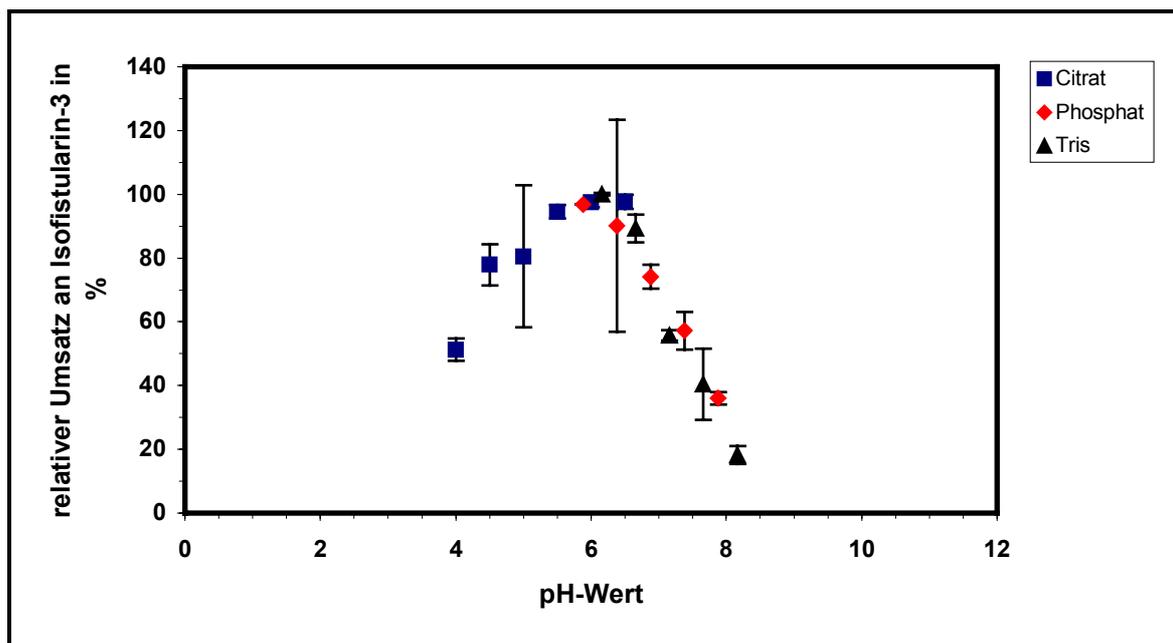


Abb. 3.2-4 Einfluß des pH-Werts auf den Substratumsatz des Isoxazolin-spaltenden Enzyms aus *Aplysina cauliformis*

3.2.3 Substratspezifität

In bereits von Ebel (1998) durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das in Schwämmen der Gattung *Aplysina* vorkommende Isoxazolin-spaltende Enzym natürlich vorkommende Bromoisoxazolinalkaloide mit einer intakten Spirocyclohexadienisoxazolin-Partialstruktur quantitativ abbaut. Ein bevorzugter Abbau bestimmter Bromoisoxazolinalkaloide konnte unter der gewählten Bedingungen jedoch nicht festgestellt werden. Ebel konnte ebenfalls feststellen, daß Enzymextrakte einer bestimmten *Aplysina*-Art im *In-vitro*-Enzymassay auch Bromoisoxazolinalkaloide umsetzten, die nicht als Inhaltsstoffe in dieser Schwammart, sondern in anderen *Aplysina*-Arten vorkamen. Getestete kommerziell erhältliche Benzyl-Nitril-Derivate im weiteren Sinn wie z.B. 3-Aminobenzenitril oder Salicylhydroxamsäure, die der Struktur der Bromoisoxazolinalkaloide vergleichsweise ähnlich waren, wurden in dieser Versuchsreihe durch das Enzym nicht umgesetzt (Ebel, 1998). Somit konnte eine Substratspezifität für die bromierte Spirocyclohexadienisoxazolin-Partialstruktur herausgestellt werden.

Um genauere Aussagen über die Substratspezifität der Enzymreaktion machen zu können, wurden natürlich vorkommende sowie synthetisch hergestellte Alkaloide, die eine oder mehrere Abwandlungen der bromierten Spirocyclohexadienisoxazolin-Partialstruktur aufwiesen, auf ihren Umsatz getestet. Als Bezugsgröße wurde wiederum der Umsatz an

Isofistularin-3 (I) (s. Abb. 3.2-6) gewählt, der zur Ermittlung des relativen Umsatzes aller übrigen Substrate gleich 100% gesetzt wurde. Aus Tabelle 3.2-1 ergab sich eine Mittlere Standardabweichung von $3.35\% \pm 2.83$, woraus ersichtlich wurde, daß die Verdünnungsfehler, Pipettierfehler sowie gerätebedingte Fehler einer relativ großen Schwankungsbreite unterlagen. Hieraus ließ sich schließen, daß Umsatzraten von 0 bis 6.1% als Schwankungen anzusehen sind, die durch mögliche Fehler verursacht wurden. Unter diesem Aspekt konnten die Substrate VI, XIV, XV und XVI mit einem maximalen Umsatz von 7.4% als Substanzen angesehen werden, deren Umsätze durch das Isoxazolin-spaltende Enzym im erweiterten Bereich der Schwankungsbreite möglicher Fehler dieser Methode lagen (Tab. 3.2-1). Somit konnte für diese vier Testsubstrate kein eindeutiger Umsatz festgestellt werden. Geringe Umsätze konnten hingegen für die Substrate V (8.7%, Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5) und XIII (9.3%, Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5) errechnet werden. Aufgrund der großen Standardabweichungen für die Substanzen III und IV von 8.7 bzw. 8.6 wurden deren Umsatzraten von 13.3% bzw. 11.4% eher kritisch bewertet und ließen somit nur unter Vorbehalt einen geringen Umsatz erkennen (Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5). Substrate mit zwar geringem, aber dennoch eindeutigem Umsatz durch das Isoxazolin-spaltende Enzym waren die Substanzen X, XI und XII. Hier konnten Umsatzraten von 14.4% bzw. 12.6% mit geringen korrespondierenden Standardabweichungen festgestellt werden (Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5). Bei ebenfalls sehr geringen Standardabweichungen ließen sich für die Substrate VIII (30.6%, Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5) und IX (20.6%, Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5) bemerkenswerte Umsätze errechnen, die deutliche Hinweise auf Strukturelemente gaben, die für die Enzymreaktion unbedingt erforderlich waren. Neben dem als Standard bzw. Vergleich eingesetzten Schwamminhaltsstoff Isofistularin-3 (I), dessen absoluter Umsatz von 90% als Bezugsgröße gleich 100% gesetzt wurde, wiesen die Substrate II und VII ebenfalls einen vollständigen Umsatz auf (100% relativer Umsatz, Tab. 3.2-1, Abb. 3.2-5).

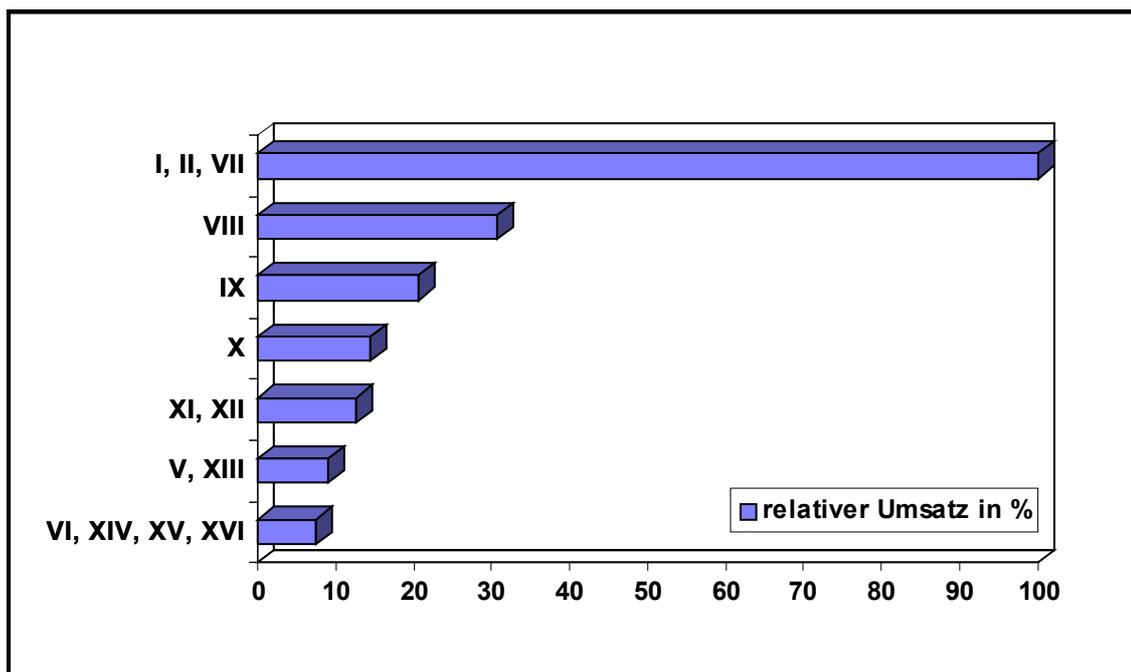


Abb. 3.2-1 Umsatzdiagramm der auf Substratspezifität untersuchten Substanzen

Aus den erhaltenen Umsatzraten ließen sich folgende Schlüsse für die Relevanz einzelner Strukturelemente im Substratmolekül bei der Umsetzung durch das Isoxazolin-spaltende Enzym ziehen:

1. Das Vorliegen eines intakten **Spirocyclohexadienisoxaolin-Ringsystems** im Molekül ist für einen Umsatz essentiell. Vergleicht man die Umsatzraten von Isofistularin-3 (I), II und VII von jeweils 100% mit den Umsatzraten der Verbindungen III (13.3%), V (8.7%) und VI (1.5%), die jeweils einen geöffneten Isoxazolinring besitzen, im Fall von Substrat III ansonsten aber eine völlige strukturelle Übereinstimmung mit I zeigen (Abb. 3.2-6), kann eindeutig auf die essentielle Bedeutung des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems geschlossen werden.
2. Die **Säureamidseitenkette** (R-CO-NHR) der Alkaloide stellte sich ebenfalls als essentieller Strukturbestandteil für die Umsetzung der angebotenen Moleküle durch das Enzym heraus. Im direkten Vergleich zweier natürlich vorkommender Bromisoxazolinalkaloide (II und IV, Abb. 3.2-6), die sich nur in der Seitenkette unterschieden, konnte gezeigt werden, daß das Substrat mit der Säureamidseitenkette (II) zu 100% umgesetzt wurde (Tab. 3.2-1), während das Substrat mit der

Methylesterseitenkette (IV) lediglich einen Umsatz von 11.4% durch das Isoxazolin-spaltende Enzym erfuhr (Tab. 3.2-1). Durch einen Vergleich der Umsatzraten der Substrate VIII und XI (Tab. 3.2-1) konnte der Einfluß unterschiedlicher Substitutionsmuster des Amidstickstoffs der Seitenkette untersucht werden. Im Fall des tertiären Amidstickstoffs bei Substrat XI (Abb. 3.2-5) konnte lediglich ein Umsatz von 12.6% festgestellt werden, während für Substrat VIII (Abb. 3.2-5) mit einem sekundären Amidstickstoff ein Umsatz von 30.6% verzeichnet wurde. Der im Vergleich zu Isofistularin-3 (I) nur ca. 30%ige Abbau von VIII läßt sich durch Abweichungen in der Cyclohexadien-Partialstruktur erklären. Somit kann gefolgert werden, daß für die Alkaloid-Umsetzung entweder ein primärer (II, Abb. 3.2-5) oder sekundärer (VIII, Abb. 3.2-5) Amidstickstoff in der Seitenkette vorliegen muß.

3. Vergleichende Untersuchungen von Umsatzraten des Substrats IX (20.6%, Tab. 3.2-1) mit dem Standard Isofistularin-3 (I, 100%, Tab. 3.2-1) zeigten, daß das Substrat mit der substituierten **Hydroxylgruppe in Position 1** des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems (IX, Abb. 3.2-6) im Vergleich zu einem Substrat mit freier Hydroxylgruppe in dieser Position (I, Abb. 3.2-6) bei ansonsten ähnlichen Strukturelementen (Spirocyclohexadienisoxazolinsystem, Amidseitenkette) einen weitaus geringeren Umsatz aufwies (Tab. 3.2-1). Dieser Schluß wurde unter der Annahme gezogen, daß der Bromierungsgrad der Substrate von geringerer Priorität als die freie Hydroxylgruppe in Position 1 ist, wie aus den Umsatzraten von 30.6% für VIII (Tab. 3.2-1) und 20.6% für IX zu ersehen ist. In beiden Molekülen ist eine Amidseitenkette mit sekundärem Amidstickstoff sowie die nichtbromierte Spirocyclohexadienisoxazolin-Grundstruktur gleicher Art enthalten (Abb. 3.2-6). Einziger Unterschied ist die Gestaltung der Sauerstofffunktion in Position 1 des Spirocyclohexadienylringes. Ein Substrat mit ebenfalls veränderter Sauerstofffunktion in Position 1, jedoch fehlender Amidseitenkette (X, Abb. 3.2-6), lag mit 14.4% Umsatzrate (Tab. 3.2-1) unter den Werten der beiden obigen Substrate und stützte damit die Aussagen, daß ohne freie Hydroxylgruppe in Position 1 des Spirocyclohexadienylringes und ohne Amidseitenkette des Bromspirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems nur

eine geringe Umsetzung des Moleküls durch das Isoxazolin-spaltende Enzym zu erwarten ist.

4. Wie schon unter Punkt 3 in diesem Abschnitt kurz erwähnt, konnte ein Einfluß des **Bromierungsgrades** der Substrate auf die Akzeptanz der Substrate durch das Isoxazolin-spaltende Enzym anhand der beiden Substrate VII und VIII (Abb. 3.2-6) untersucht werden. Während beim bromierten Substrat VII ein Umsatz von 100% beobachtet wurde, zeigte das nichtbromierte Analogon VIII eine Umsatzrate von lediglich 30.6%. Diese Tatsache wies eindeutig auf die Wichtigkeit der zweifachen Bromierung für einen maximalen Substratumsatz hin (Tab. 3.2-1). Anhand dieses Vergleichs konnte jedoch auch festgestellt werden, daß der Bromierungsgrad nicht zwingend notwendig für eine Umsetzung zu sein schien, da VIII auch ohne Bromierungs-substituenten zu immerhin 30.6% abgebaut wurde. Aus den Umsatzraten der Substrate XIV (7.4%, Tab. 3.2-1), XV (7.4%, Tab. 3.2-1) und XVI (7.3%, Tab. 3.2-1) war ersichtlich, daß der Bromierungsgrad in der Priorität in der Rangliste hinter der Amidseitenkette einzuordnen ist, da aufgrund der fehlenden Amidseitenketten keines der drei erwähnten Substrate (Abb. 3.2-6) einen zu berücksichtigenden Umsatz zeigte.

5. Ein Einfluß der **Sauerstofffunktion** in Position 3 des Spirocyclohexadienisoxazolin-Ringsystems auf den Substratumsatz konnte im Vergleich der Substanzen I, II und VII (Abb. 3.2-6) untersucht werden. Diese Verbindungen zeigten zwei unterschiedliche Sauerstoffsubstituenten - bei Substrat I und II fand sich der natürlich vorkommende Methoxyether als Enoether (Abb. 3.2-6), während bei Substrat VII an gleicher Stelle eine Ketofunktion mit fehlender zweiter Doppelbindung zwischen Kohlenstoffatom 2 und 3 im Cyclohexanring anzutreffen war (Abb. 3.2-6). Die für eine vollständige Umsetzung notwendigen Strukturmerkmale wie intakter Isoxazolinring, Säureamidseitenkette, freie Hydroxylfunktion in Position 1 und ausreichender Bromierungsgrad waren für die drei Substrate in gleicher Weise erfüllt. Alle drei Verbindungen zeigten einen Umsatz von 100% (Tab. 3.2-1), womit der Einfluß der in Bromisoxazolinalkaloiden genuin vorkommenden Methoxyfunktion an sich

auf die Umsetzung durch das Aerophobin-abbauende Enzym eher als weniger wichtig herausgestellt werden konnte.

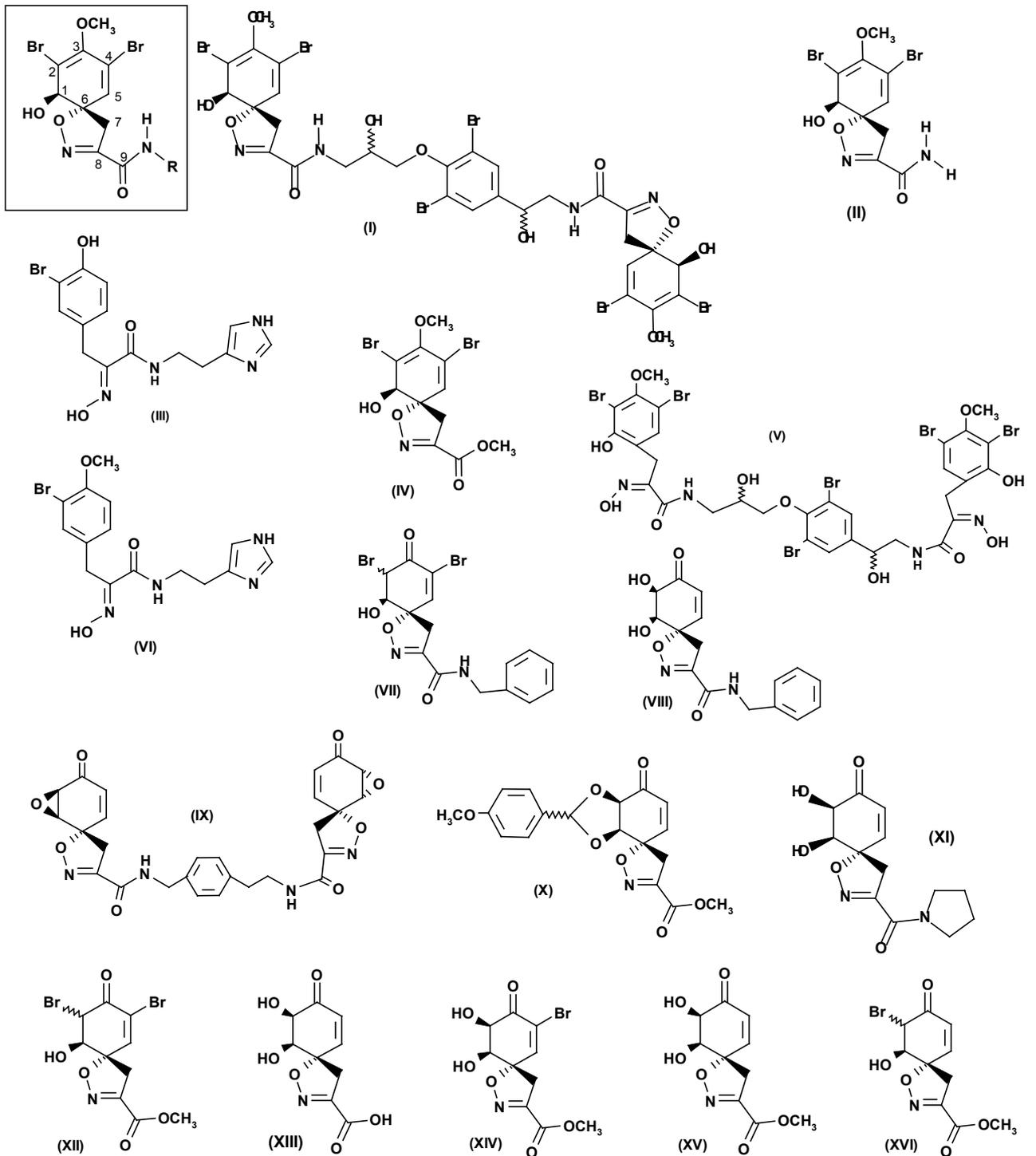


Abb. 3.2-6 Auf Substratspezifität der Isoxazolin-spaltenden Reaktion getestete Substanzen.

Naturstoffsubstrate	relative Umsatzrate in %
Isofistularin-3 (I)	100.0 ± 0.9
7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylamid (II)	100.0 ± 0.0*
B 94 (III)	13.3 ± 8.7
7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat (IV)	11.4 ± 8.6
Isofistularin-3-Derivat (V)	8.7 ± 1.4
B 93/1 (VI)	1.5 ± 0.9
synthetische Substrate	relative Umsatzrate in %
4-Bromspiroisoxazolinbromhydrinamid (VII)	100.0 ± 4.2
Spiroisoxazolindiolbenzylamid (VIII)	30.6 ± 0.2
Spiroisoxazolinepoxybisamid (IX)	20.6 ± 0.1
PMP-Derivat (X)	14.4 ± 2.3
Spiroisoxazolindiolpyrrolidinamid (XI)	12.6 ± 2.2
4-Bromspiroisoxazolinbromhydrinmethylester (XII)	12.6 ± 1.1
Spiroisoxazolindiolcarbonsäure (XIII)	9.3 ± 3.8
4-Bromspiroisoxazolindiolmethylester (XIV)	7.4 ± 7.0
Spiroisoxazolindiol (XV)	7.4 ± 3.2
Spiroisoxazolinbromhydrinmethylester (XVI)	7.3 ± 5.7

* = Substratpeakfläche lag unter der Erfassungsgrenze des UV-Detektors

Tab. 3.2-1 Umsatz unterschiedlicher Substrate durch das Isoxazolin-spaltende Enzym aus *Aplysina cauliformis*.

3.2.4 Alternative enzymatische Amidumsetzungen

Nach Untersuchung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms auf Substratspezifität (3.2.3) konnte die Schlußfolgerung gezogen werden, daß beim enzymatischen Abbau der Schwammalkaloide die Spaltung der Säureamidseitenkette eine Schlüsselrolle im Abbauprozess spielt (3.2.3). Daher wurden für die Untersuchung auf einen unspezifischen Alkaloidabbau zwei Amidasen als Testenzyme ausgewählt (2.6.4.3). Zum einen kam eine Penicillin-Amidase zum Einsatz, die speziell Benzylpenicillin-G als Substrat umzusetzen

vermag, somit also eine für dieses Substrat spezifische Amidase darstellt. Als zweites Enzym wurde die substratunspezifische Amidase A-6691 gewählt.

Wie aus Tab. 3.2-2 zu ersehen ist, konnte keinerlei Umsatz für das Bromisoxazolinalkaloid Aerophobin-2 (2) durch die Penicillin-Amidase verzeichnet werden, während dessen natürliches Substrat Benzylpenicillin-G zu 100% akzeptiert und abgebaut wurde.

Substrat	Umsatz nach 2 min	Umsatz nach 5 min	Umsatz nach 10 min
Benzylpenicillin-G	100%	100%	100%
Aerophobin-2 (2)	0%	0%	0%

Tab. 3.2-2 Substratabbau durch das Enzym Penicillin-Amidase.

Für die Amidase-A6691 wurde nicht das nach Herstellerangaben empfohlene Substrat Acetamid als Referenzsubstrat verwendet, sondern wie zuvor bei der Penicillin-Amidase auch Benzylpenicillin-G, um zu untersuchen, in welchem Ausmaß dieses Enzym als unspezifische Amidase für monocarboxylierte Säureamide Substrate abbaut, die von der Molekülstruktur aufwendiger gestaltet sind als das empfohlene Acetamid. Auch hier konnte wie beim ersten Enzym kein Aerophobin-2-Umsatz festgestellt werden (Tab. 3.2-3). Das gewählte Referenzsubstrat Benzylpenicillin-G hingegen zeigte in der gewählten Zeitreihe eine stetige Umsatzzunahme und bestätigte damit die Aktivität des eingesetzten Enzyms (Tab. 3.2-3).

Substrat	Umsatz nach 2 min	Umsatz nach 5 min	Umsatz nach 10 min
Benzylpenicillin-G	12.8% ± 2.05	14.2% ± 1.85	52.8% ± 2.25
Aerophobin-2 (2)	0%	0%	0%

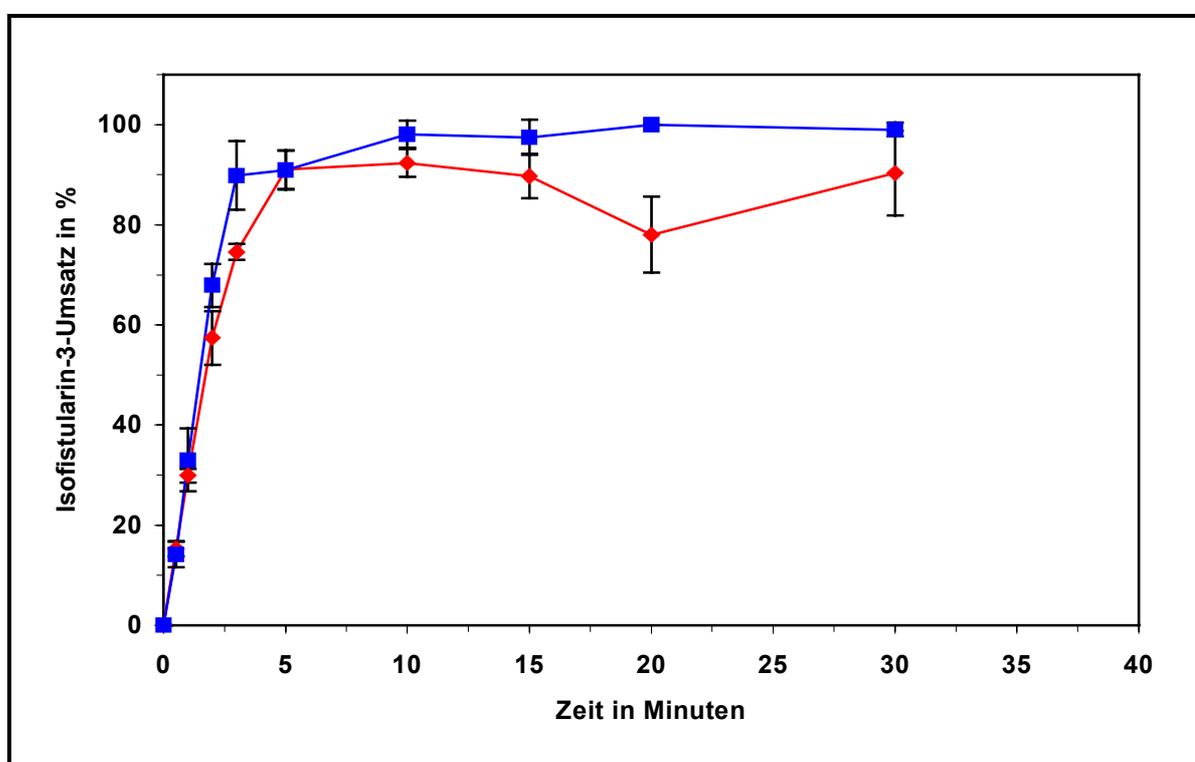
Tab. 3.2-3 Substratabbau durch das Enzym Amidase A-6691.

Weder die spezifische Penicillin-Amidase noch die unspezifische Amidase A-6691 zeigten einen Umsatz des Bromisoxazolinalkaloids Aerophobin-2 (2). Dies unterstreicht die Annahme, daß es sich beim Isoxazolin-spaltenden Enzym um ein spezifisches Enzym handelt, welches ausschließlich Bromisoxazolinalkaloide mit speziellen Anforderungen an die Molekülstruktur (3.2.3) als Substrate akzeptiert und zum Produkt Aeroplysinin-1(18) und einem zweiten strukturell variablen Spaltprodukt abbaut.

3.2.5 Substratumsetzung in deuteriertem Lösungsmittel

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um die Bedeutung des Amidwasserstoffatoms der Seitenkette der Bromoisoxazolinalkaloide beim Abbau durch das Isoxazolin-spaltende Enzym klären zu können. Aufgrund des deuterierten Wassers bzw. Methanols als Lösungsmittel tauschten alle Wasserstoffatome in den Substrat- und Enzymmolekülen gegen das um eine Masseneinheit schwerere Deuterium aus, das sich im Überschuß im Medium befand. Die von der Molekülgröße und Ladung her gleichen Isotope unterscheiden sich lediglich in ihrer Masse um annähernd den Faktor 2, so daß bei einer sehr spezifischen Enzymreaktion, die im Fall des Isoxazolin-spaltenden Enzyms durch die Ergebnisse dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.2.4), dieses Unterscheidungsmerkmal bei den gewählten, nicht optimalen Bedingungen von 40°C Reaktionstemperatur (vgl. 2.6.4.5.1) eventuell zu einem geringeren bzw. verlangsamten Substratumsatz führen könnte.

Sollte die Versuchsreihe mit deuteriertem Lösungsmittel tatsächlich einen deutlich geringeren bzw. langsameren Substratumsatz als die Vergleichsreihe mit Nanopore-Wasser zeigen, wäre dies ein Hinweis für die Schlüsselrolle des Amidwasserstoffatoms bei der enzymatischen Umsetzung der Bromoisoxazolinalkaloide.



blau = Funktion des Nanopore-Ansatzes

rot = Funktion des Ansatzes mit deuteriertem Wasser

Abb. 3.2-7 Isofistularin-3-Abbau in deuteriertem Wasser und in Nanopore-Wasser.

Wie der Abb. 3.2-7 zu entnehmen ist, konnte tatsächlich ein insgesamt etwas langsamerer und geringerer Substratumsatz für den deuterierten Ansatz ermittelt werden, der sich auch statistisch im linearen Bereich der beiden erhaltenen Umsatz-Zeit-Funktionen vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt 3 min (Abb. 3.2-8) belegen läßt. So wurde bei einem durchgeführten ANOVA-Test der Geraden im Bereich von 0.5 bis 3 min die Unabhängigkeit der Geraden voneinander mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% bestimmt. Wie aus Tab. 3.2-4 zu ersehen ist, überschritten sich die ermittelten Vertrauensbereiche der Regressionskoeffizienten beider Geraden hierbei nicht, womit die Unabhängigkeit beider Geraden statistisch bewiesen wurde.

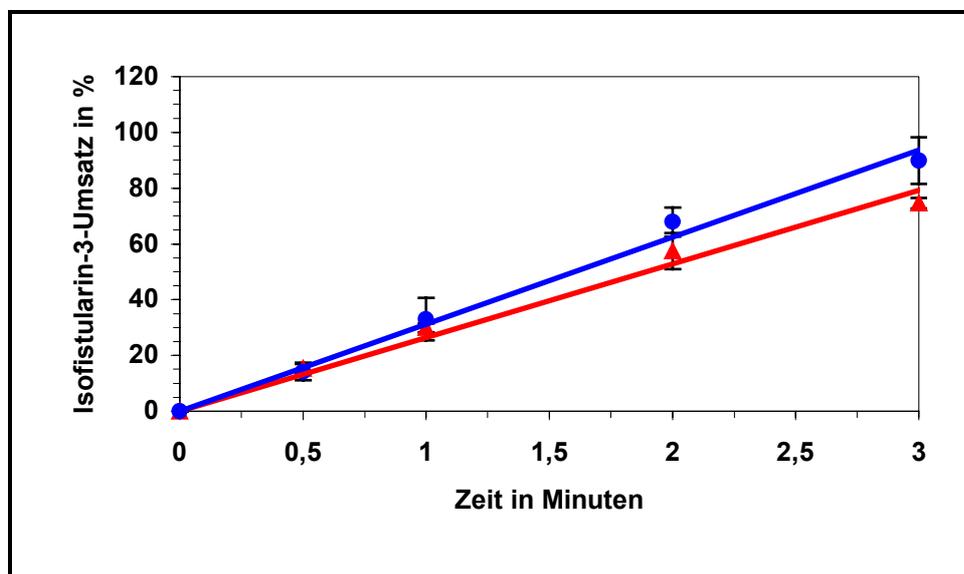
	Nanopore-Ansatz	Deuterium-Ansatz
Steigung	31.264	26.394
sdv (Steigung) (Standardabweichung der Steigung)	1.0150	0.7731
R ² (Korrelationskoeffizient)	0.95498	0.95696
p (Irrtumswahrscheinlichkeit)	5%	5%
Vertrauensbereich der Regressionskoeffizienten		
obere Grenze	33.498	28.096
untere Grenze	29.030	24.693

Tab. 3.2-4 Statistische Auswertung der Unabhängigkeit von Nanopore- und Deuterium-Ansatz anhand eines ANOVA-Tests.

Trotzdem erschien der zu verzeichnende Unterschied beider Funktionen nicht so deutlich wie erwartet, so daß das Ergebnis zwar wertvolle, aber dennoch keine exakten Aufschlüsse über die Rolle des Amidwasserstoffatoms bei der Reaktion lieferte.

So wies das erhaltene Ergebnis eindeutig auf einen Einfluß von Wasserstoffatomen am enzymatischen Alkaloidabbau hin. Dieser Einfluß könnte sich jedoch z. B. auf Bindungen zwischen Substrat und Enzymtasche, auf die Ladungsverteilung im Substratmolekül oder eventuell auf eine tragende Rolle des Amidwasserstoffs bei der Reaktionsinitialisierung

beziehen. Präzisere Aussagen ließen sich jedoch mit diesem Versuch nicht aufstellen und bedürfen weiterer, auf diesem Ergebnis aufbauender Untersuchungen.



blaue Linie = Datenreihe für Nanopore-Ansatz rote Linie = Datenreihe für Ansatz in deuteriertem Wasser

Abb. 3.2-8 Linearer Teil des Isofistularin-3-Abbaus in Nanopore-Wasser und in deuteriertem Wasser.

3.2.6 Kinetische Hemmung

Die unter 2.6.4.5.2 durchgeführten Untersuchungen zur kinetischen Hemmung des Isofistularin-3-Abbaus durch synthetische Spiroisoxazolinalkaloide wurden nur mit Substanzen durchgeführt, die in ausreichender Menge zur Verfügung standen. Aus den vier durchgeführten Versuchen ergab sich, daß der Isofistularin-3-Umsatz durch keines der zugemischten vier Substrate eine eindeutige Verlangsamung bzw. Verminderung erfuhr.

Während die Substrate XII, XIV und XVI (Abb. 3.2-5) als Einzelsubstrate in einem vorherigen Versuch (3.2.3) keinem erwähnenswerten Umsatz durch das Isoxazolin-spaltende Enzym unterlagen, konnte für Substrat VIII (Abb. 3.2-5) in diesem Versuch (3.2.3) ein Umsatz von ca. 30% verzeichnet werden (vgl. Tab. 3.2-1). Somit hatten weder die Verbindungen XII, XIV und XVI noch das Substrat VIII einen kompetitiv hemmenden Effekt auf den Isofistularin-3-Abbau.

3.2.7 Bestimmung von V_{\max} und K_m

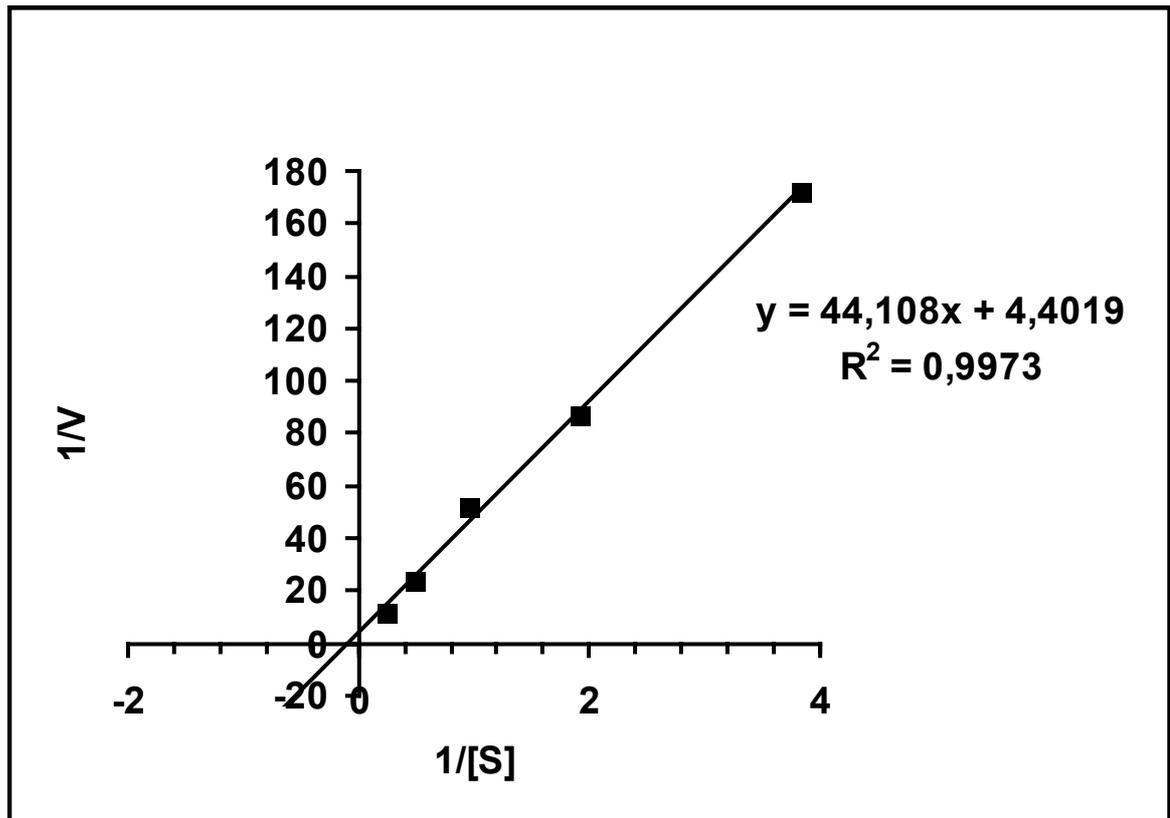
Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{\max} wurde eine Versuchsreihe mit 5 verschiedenen Substratkonzentrationen durchgeführt (s. 2.6.4.5.3). Als Substrat wurde bei dieser

Untersuchung Aerophobin-2 (2) in wässriger Lösung wegen seiner besseren Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Isofistularin-3 (19) eingesetzt. Ein Einsatz von Aerophobin-2 (2) schien ferner deshalb angebracht, weil eine methanolische Isofistularin-3-Lösung als Substratlösung nicht ganz auszuschließende denaturierende Effekte auf das Enzym hätte haben können und somit ein Ergebnisbeeinträchtigung nach sich gezogen hätte. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde aus der Abnahme der Substratmenge über die Zeit ermittelt (s. 2.6.4.5.3).

Für die Ermittlung von K_m und V_{max} wurde das doppelt-reziproke Auftrageverfahren von Lineweaver-Burk angewandt (Abb. 3.2-9) (Lineweaver und Burk, 1934; Burk, 1984). Hierbei entspricht der Ordinatenschnittpunkt dem Wert $1/V_{max}$ und der Abszissenschnittpunkt dem Wert $-1/K_m$. Nach der Berechnung der Ausgleichsgeraden (Abb. 3.2-9) ergab sich nach der gewählten Methode für K_m ein Wert von 10.0 mM und für V_{max} ein Wert von 13.6 mM/min. Der relativ hohe K_m -Wert deutet auf eine geringe Affinität des Enzyms zum Substrat hin. Bei dem ermittelten K_m -Wert von 10 mM errechnet sich für Aerophobin-2 (2) eine Konzentration von 5 mg/ml als halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit. Am Beispiel des in dieser Arbeit untersuchten Schwamms *Aplysina insularis* konnte festgestellt werden, daß der K_m -Wert von 10 mM für Aerophobin-2 (2) um das 25fache höher liegt als die Alkaloidkonzentration im Schwammgewebe. Bei einer Molmasse von 505 g/mol und einer Ausbeute von 22 mg Aerophobin-2 (2) aus 112 g tiefgefrorenen Schwammmaterials (vgl. 2.5.1) errechnet sich eine Konzentration von 0.4 mM für Aerophobin-2 (2) (Schwammgewicht gleich Schwammvolumen).

Im Vergleich zu bisher beschriebenen kinetischen Daten des Isoxazolin-spaltenden Enzyms aus *Aplysina aerophoba* von Teeyapant kann bezüglich der Michaelis-Menten-Konstante ein Unterschied von 5 mM für *Aplysina aerophoba* zu 10 mM für *Aplysina cauliformis* festgestellt werden (Teeyapant, 1994). Bei einer vergleichenden Betrachtung der V_{max} -Werte für diese beiden Schwämme ist ein wesentlich größerer Unterschied als bei den K_m -Werten festzustellen. So konnte Teeyapant (1994) eine V_{max} von 7.29 nM/min ermitteln, während im Rahmen dieser Arbeit ein Wert von 13.6 mM/min errechnet wurde.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte für K_m und V_{max} wurden lediglich aus einer einzigen Versuchsreihe errechnet, da das verwendete Substrat Aerophobin-2 (2) nur in begrenztem Maß zur Verfügung stand. Damit konnten weitere Untersuchungen mit Substratkonzentrationen, die sich idealerweise linear um den K_m -Wert verteilen sollten (Henderson, 1978), nicht durchgeführt werden.



V = Reaktionsgeschwindigkeit der jeweiligen Substratkonzentration in mM/s [S] = Substratkonzentration in mM

Abb. 3.2-9 Lineweaver Burk Plot zur Bestimmung von K_m und V_{max} .

3.2.8 Proteingehalt im Schwammgewebe

Bei der Untersuchung eines nach 2.6.1.2 gewonnenen Schwammrohextrakts von *Aplysina cauliformis* und des daraus resultierenden entsalzten Schwammrohextrakts (s. 2.6.1.3) wurde von 5.1g Schwammmaterial und 20ml Puffer ausgegangen. Als Extraktvolumina wurden 13.5ml für den Rohextrakt und 18.9ml für den entsalzten Rohextrakt ermittelt.

Bei der Proteinbestimmung wurde wie unter 2.6.1.4 beschrieben nach Bradford verfahren und anhand einer Eichgeraden aus 9 unterschiedlich konzentrierten Referenzproteinlösungen die Proteinonzentration in den Schwammextrakten bestimmt (Abb. 3.2-10).

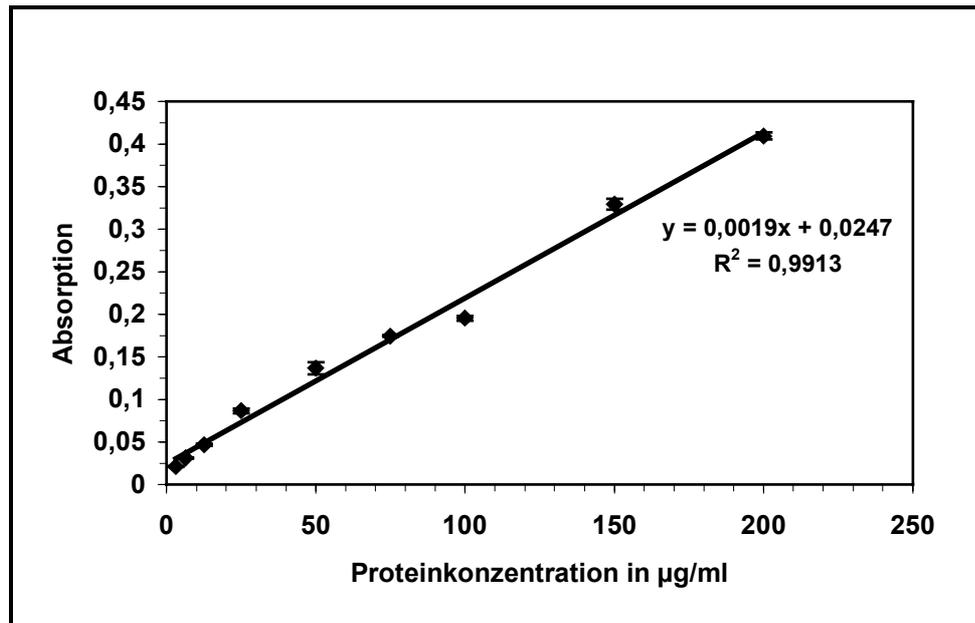


Abb. 3.2-10 Eichgerade der Proteinreferenzlösungen zur Proteinbestimmung.

Für den Schwammrohextrakt konnte eine Gesamtproteinmenge von 185.8 mg in einem Extraktvolumen von 13.5 ml errechnet werden. Ein etwas geringerer Gesamtproteingehalt von 125.1 mg in einem Volumen von 18.9ml wurde für den aus dem Schwammrohextrakt gewonnenen entsalzten Rohextrakt ermittelt. In Bezug auf das eingesetzte gefriergetrocknete Schwammmaterial von 5.1 g entsprachen die Gesamtproteinmengen 3.6% bzw. 2.5% des Schwammmaterials. Diese Ergebnisse stimmen mit den von Ebel gefundenen Proteinkonzentrationen für *Aplysina cauliformis* überein (Ebel, 1998).

Durch die durchgeführte Schwammrohextraktentsalzung wurde nach den gefundenen Ergebnissen bereits eine gewisse Aufreinigung erzielt. Bei identischer Enzymaktivität für beide Extraktstufen konnte aufgrund mehrfach durchgeführter Untersuchungen für den Entsalzungsschritt bei einer Gesamtproteinausbeute von 67.3% und einer Aktivitätsausbeute von 100% ein Reinigungsfaktor von 1.5 bestimmt werden. Dieser Reinnigungsschritt ließ sich durch den Verlust niedermolekularer Proteine mit einem Molekulargewicht < 10000 Dalton erklären, da dies die Ausschlußgröße des verwendeten Entsalzungsmaterials darstellte (s. 2.6.1.3).

Mit der ermittelten Proteinkonzentration von 6.62 mg Protein pro ml entsalztem Enzymextrakt konnte für die durchgeführten Enzymassays eine eingesetzte Proteinmenge von 211.84 µg, entsprechend 32 µl, im Standardassay errechnet werden (s. 2.6.2.1.2).

Unter Berücksichtigung der aus diesem Versuch gewonnenen Daten ließen sich folgende Verhältnismäßigkeiten berechnen. Im durchgeführten Standardassay (2.6.2.1.2) wurden in den 32 µl Enzymextrakt und 8 µl Isofistularin-3-Stammlösung (2.6.2.1.1) umgerechnet 8.6 mg gefriergetrocknetes Schwammmaterial und 0.08 mg Isofistularin-3 eingesetzt. Betrachtet man die natürlichen Verhältnisse im Schwamm so entspricht den eingesetzten 8.6 mg gefriergetrockneten Schwammmaterials, bei einem prozentualen Anteil von 0.41% (2.5.1.2) an Isofistularin-3 (19) bezogen auf das gefriergetrocknete Schwammmaterial, ein Äquivalent von 0.044 mg Isofistularin-3 (19). Somit wurden die durchgeführten Versuche unter physiologischen Bedingungen durchgeführt und spiegeln die natürlichen Gegebenheiten im Schwammgewebe wieder.

3.2.9 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte für das Isoxazolin-spaltende Enzym aus dem karibischen Schwamm *Aplysina cauliformis* gezeigt werden, daß mit einem Temperatur-Optimum im Bereich von 50°C bis 60°C und einem pH-Optimum in einem pH-Bereich von 5.5 bis 6.5 das Enzym die gleichen Rahmenbedingungen für die Umsetzung von Bromoisoxazolinalkaloiden benötigt wie die Isoxazolin-spaltenden Enzyme aus dem zuvor untersuchten Schwamm *Aplysina aerophoba* (Teeyapant, 1994) und verwandten Arten (Ebel, 1998; Teeyapant, 1994). Mit der Wiederfindung dieser Ergebnisse kann die von Ebel aufgestellte Theorie bestätigt werden, daß es sich bei diesem Enzym um ein biochemisches Charakteristikum für die Gattung *Aplysina* handelt (Ebel, 1998).

Während erste Untersuchungen zur Spezifität des Enzyms von Ebel (1998) mit natürlichen Substraten aus unterschiedlichen Schwämmen der Gattungen *Aplysina* und *Aiolochoxia* zeigten, daß alle natürlichen Bromoisoxazolinderivate nahezu vollständig umgesetzt wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit weiterführende Aussagen über die Spezifität des Isoxazolin-spaltenden Enzyms gemacht werden. Durch detaillierte Untersuchungen mit strukturell sehr eng verwandten künstlichen Substraten konnte erstmals die hohe Substratspezifität des Enzyms gezeigt werden. Darüber hinaus wurden erstmals definierte Strukturmerkmale im Bromoisoxazolinalkaloid-Molekül in ihrer Relevanz für die enzymatische Umsetzung bewertet und die Priorität einzelner Strukturmerkmale für die Umsetzung herausgearbeitet. So kann das Enzym lediglich Substrate umsetzen, welche die Grundstruktur des bromierten Spirocyclohexadienisoxazolin-Grundkörpers der Naturstoffe aufweisen. Substrate mit einem nicht intakten Isoxazolin-Ringsystem oder einer fehlenden Amidseitenkette mit einem freien Wasserstoffatom am Amidstickstoff erfahren keine Umsetzung durch das Isoxazolin-spaltende Enzym. Die beschriebene, bemerkenswert hohe Spezifität des Enzyms sowie die Tatsache, daß die natürlichen Bromoisoxazolinalkaloide

nicht durch Amidasen fremder Herkunft umgesetzt wurden, zeigen die Individualität sowohl der Substrate als auch des Enzyms für die Gattung *Aplysina*.

Durch die Ergebnisse zur kinetischen Hemmung der Umsetzung konnten die hohen Ansprüche des Enzyms an Reaktionsbedingungen und Substrat ebenfalls untermauert werden, da in keinem der vier durchgeführten Experimente mit insgesamt vier unterschiedlichen syntetischen Substraten eine Hemmung des Abbaus des natürlichen Substrats Isofistularin-3 (19) zu erkennen war. Aus den Untersuchungen zur Substratspezifität konnte gezeigt werden, daß das Vorkommen der Säureamidseitenkette am Isoxazolingrundgerüst mit mindestens einem Wasserstoffatom am Amidstickstoff für die Substratumsetzung von entscheidender Bedeutung ist. Im Vergleich zweier natürlich vorkommender Substrate, die sich lediglich darin unterschieden, daß die Amidseitenkette bei einem Alkaloid aus einem Formamidrest und bei dem anderen Alkaloid aus einem Formylmethylester bestand, wurde das Alkaloid mit dem Formamidrest durch das Enzym nahezu vollständig umgesetzt, während das Alkaloid mit dem Formylmethylester keinerlei Umsetzung erfuhr.

In einem weiteren Experiment zur Manifestierung der bedeutenden Rolle der Säureamidseitenkette bei der enzymatischen Abwehrreaktion wurde das Lösungsmittel durch Austausch von H_2O und CH_3OH durch D_2O und CD_3OD untersucht. Unter der Annahme, daß Wasserstoffatome wie z.B. das Seitenkettenamidwasserstoffatom eine entscheidende Rolle bei der Umsetzungsreaktion spielen, wurde postuliert, daß die Substratumsetzung im Vergleich zweier paralleler Versuchsreihen, von denen eine mit protoniertem und die andere mit deuteriertem Lösungsmittel durchgeführt wurde, für die Versuchsreihe mit deuteriertem Lösungsmittel einen niedrigeren Umsatz sowie eine veränderte Reaktionsgeschwindigkeit zeigen würde. Der in dieser Arbeit gefundene hemmende Effekt des deuterierten Lösungsmittels auf die enzymatische Umsetzungsreaktion unterstrich die Bedeutung von Wasserstoffatomen an der enzymatischen Umsetzungsreaktion der Bromoisoxazolinalkaloide durch das Aerophobin-abbauende Enzym aus *Aplysina cauliformis*. Eine exakte Aussage über eine eventuelle Schlüsselrolle des Wasserstoffatoms des Seitenkettenamidstickstoffatoms konnte mit diesem Ergebnis jedoch nicht getroffen werden. Als aufschlußreiches Ausgangsexperiment für intensivere Untersuchungen bezüglich dieser Fragestellung lieferte dieses Experiment jedoch wichtige Hinweise für den Reaktionsmechanismus der Substratumsetzung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms, der wie von Ebel angenommen einer "abnormalen Beckmann-Spaltung" ähnelt (Ebel, 1998). Durch die in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse

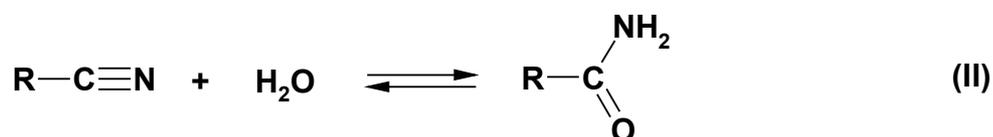
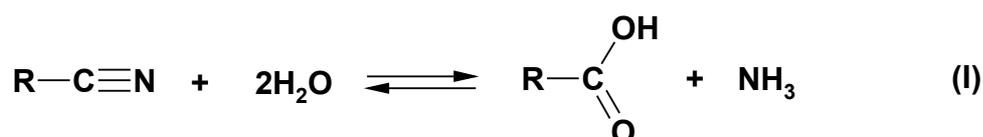
bezüglich der hohen strukturellen Anforderungen des Enzyms an seine Substrate konnte der von Ebel (1998) postulierte Reaktionsmechanismus gestützt werden.

Bezüglich der kinetischen Daten des Isoxazolin-spaltenden Enzyms konnte neben einer annähernd gleichen Michaelis-Menten-Konstante im Vergleich mit den Literaturdaten (Teeyapant, 1994) eine größere maximale Umsetzungsgeschwindigkeit gefunden werden. Damit scheinen sich gewisse Unterschiede des Isoxazolin-spaltenden Enzyms in verschiedenen Schwammarten der Gattung *Aplysina* anzudeuten, die in weiterführenden Arbeiten noch manifestiert werden müssen.

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wurden die gewählten Parameter für die Umsetzungsreaktion nach dem bisherigen Wissensstand über diese Molekülklasse weitestgehend so gewählt, daß sie den physiologischen Bedingungen des Isoxazolin-spaltenden Enzyms in seiner natürlichen Umgebung entsprechen. Ein maximaler Substratumsatz bei einer Temperatur von 50°C entspricht zwar nicht den üblichen physiologischen Gegebenheiten in Schwämmen aus tropischen Gewässern, läßt sich aber dennoch erklären. Geht man von der Tatsache aus, daß das Enzym nur unter Extrembedingungen, nämlich bei Zerstörung des Schwammgewebes und damit der Schwammzellen, aktiv wird, so läßt sich mutmaßen, daß es einer gewissen Aktivierungsenergie bedarf um seine Funktion zu erfüllen. Vergleicht man die Verletzung des Schwammgewebes mit der Verletzung von menschlichem bzw. pflanzlichem Gewebe so könnte es auch in Schwämmen Entzündungsmediatoren, wie z. B. Prostaglandine (Mutschler, 1996) oder Isoprastane (Müller, 1998), geben, die einen Schutz des Gesamtorganismus zum Ziel haben, um größeren Schaden zu vermeiden. Die Entzündungsmediatoren wirken auch als Aktivatoren für entsprechenden Abwehrprozesse, die unter normalen Bedingungen keine Aktivität besitzen (Mutschler, 1996; Müller, 1998). Unter der Annahme, daß im Schwammgewebe der Gattung *Aplysina* ebenfalls solche Entzündungsmediatoren bei Verletzungen freigesetzt werden, läßt sich die Funktion des Isoxazolin-spaltenden Enzyms bei Gewebeerletzungen erklären. Als Konsequenz dieser Überlegung läßt sich schlußfolgern, daß sich bei Verwendung von gefriergetrocknetem, unverletztem Schwammmaterial solche Entzündungsmediatoren nicht gebildet haben können und damit eine Aktivierung des Isoxazolin-spaltenden Enzyms erst durch eine Temperaturerhöhung möglich wird. Berücksichtigt man darüber hinaus die Tatsache, daß das Enzym im Temperaturbereich von 20 - 30°C immer noch beachtliche Umsatzraten zeigt und in karibischen Gewässern diese Temperaturen durchaus physiologische Werte darstellen, ergibt sich eine weitere Erklärung für die effektive Abwehrfunktion des Isoxazolin-spaltenden Enzyms.

3.3 Charakterisierung der Nitrilhydratase

Säurenitrile können anhand bisheriger Untersuchungen mit Bakterien und Pilzen auf zwei Wegen metabolisiert werden. Während Nitrilasen die direkte Umsetzung vom Säurenitril zur korrespondierenden Säure und Ammoniak katalysieren (Kobayashi und Shimizu, 1994; Komeda *et al.*, 1996) (Gleichung I), begünstigen Nitrilhydratasen die Hydratation von Säurenitrilen zu den entsprechenden Amiden (Kobayashi *et al.*, 1992; Yamada und Kobayashi, 1996) (Gleichung II).



Wendet man dieses Unterscheidungskriterium auf die von Teeyapant (1994) beschriebene enzymatische Umsetzungen von Bromisoxazolinalkaloiden in *Aplysina*-Schwämmen an, kann die Bildung des Säureamids Dienon (16) aus dem Säurenitril Aeroplysinin-1 (18) eindeutig einer Nitrilhydratase zugeschrieben werden (Abb. 3.3-1).

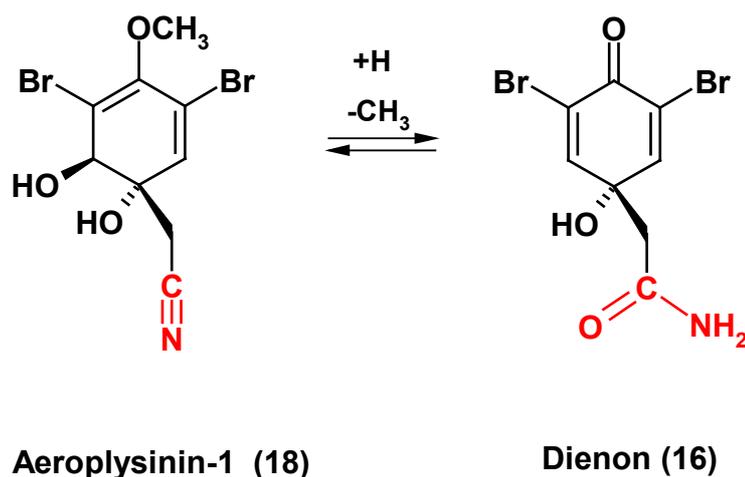


Abb. 3.3-1 Enzymatischer Aeroplysinin-1-Abbau in *Aplysina*-Schwämmen.

3.3.1 Temperatur-Optimum

Bei der Untersuchung des Temperatur-Optimums der Nitrilhydratase konnte mit einem Temperaturintervall für den größtmöglichen Aeroplysinin-1-Umsatz zwischen 20°C – 30°C (s. Abb. 3.3-2) der in der Literatur beschriebene optimale Temperaturbereich für den Großteil der Nitrilhydratasen bestätigt werden (Nagasawa *et al.*, 1986, 1987a, 1987b; Endo und Wanatabe, 1989; Hjort *et al.*, 1990; Payne *et al.*, 1997). Somit läuft diese zweite Reaktion im Rahmen der enzymatischen Abwehr im Schwamm *Aplysina cauliformis* bei Umgebungstemperatur des Schwammes ab und benötigt keine größere Aktivierungsenergie, wie dies beim Isoxazolin-spaltenden Enzym der Fall ist. Diese Tatsache spricht für die Annahme, daß ein rascher Ablauf der Schwammabwehrreaktion darauf ausgerichtet ist, in kürzester Zeit ihre Wirkung möglichst vollständig entfalten zu können.

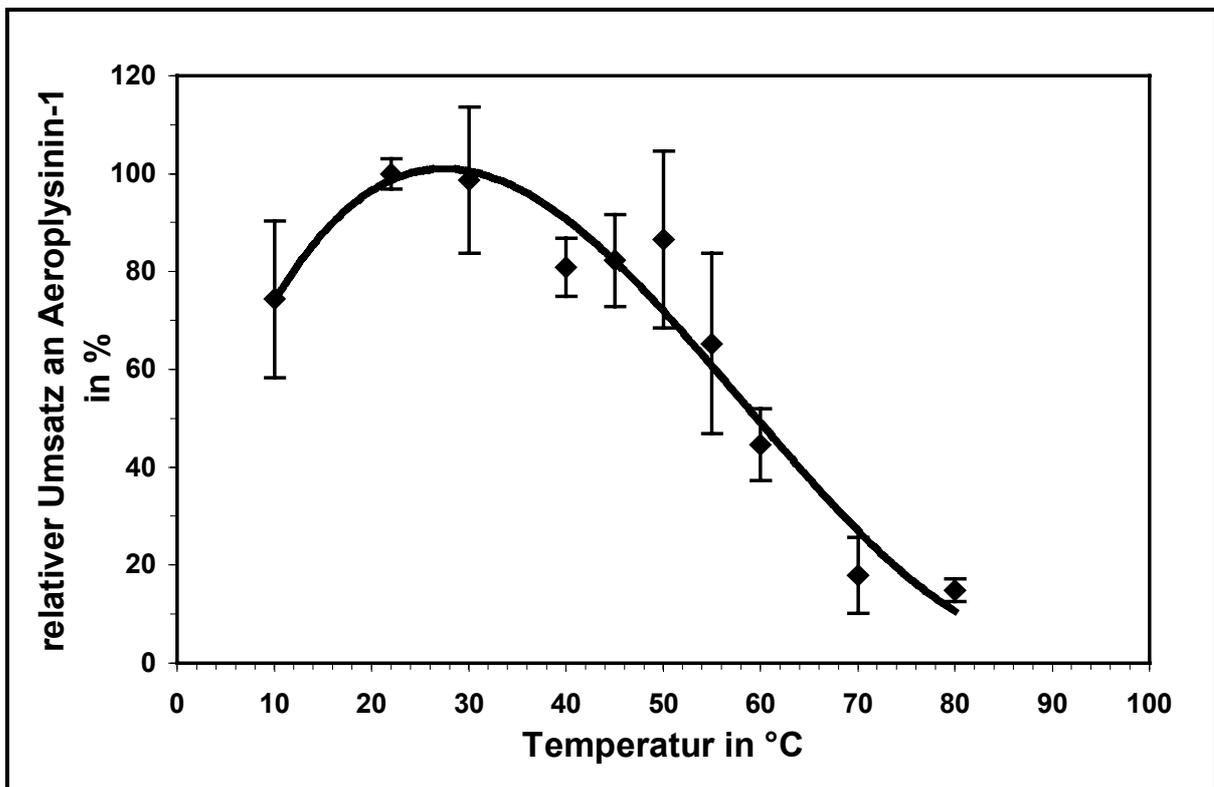


Abb. 3.3-2 Temperatureinfluß auf die Substratumsetzung der Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis*.

3.3.2 pH-Optimum und Pufferoptimierung

Als pH-Optimum konnte ein pH-Bereich von 7.0 bis 7.5 für die Nitrilhydratase ermittelt werden (Abb. 3.3-3). Hiermit steht das Enzym in Einklang mit den in der Literatur

beschriebenen Nitrilhydratase aus Bakterien (Asano *et al.*, 1982; Cramp und Cowan, 1999; Nagasawa *et al.*, 1986, 1987a, 1987b; Nelson *et al.*, 1991; Payne *et al.*, 1997) und Pilzen (Endo und Wanatabe, 1989; Hjort *et al.*, 1990; Maier-Greiner *et al.*, 1991; Nagamune *et al.*, 1991; Nagasawa *et al.*, 1988, 1991; Tsujimura *et al.*, 1996, 1997), die ihren optimalen pH-Bereich zwischen 7.0 und 8.0 besitzen.

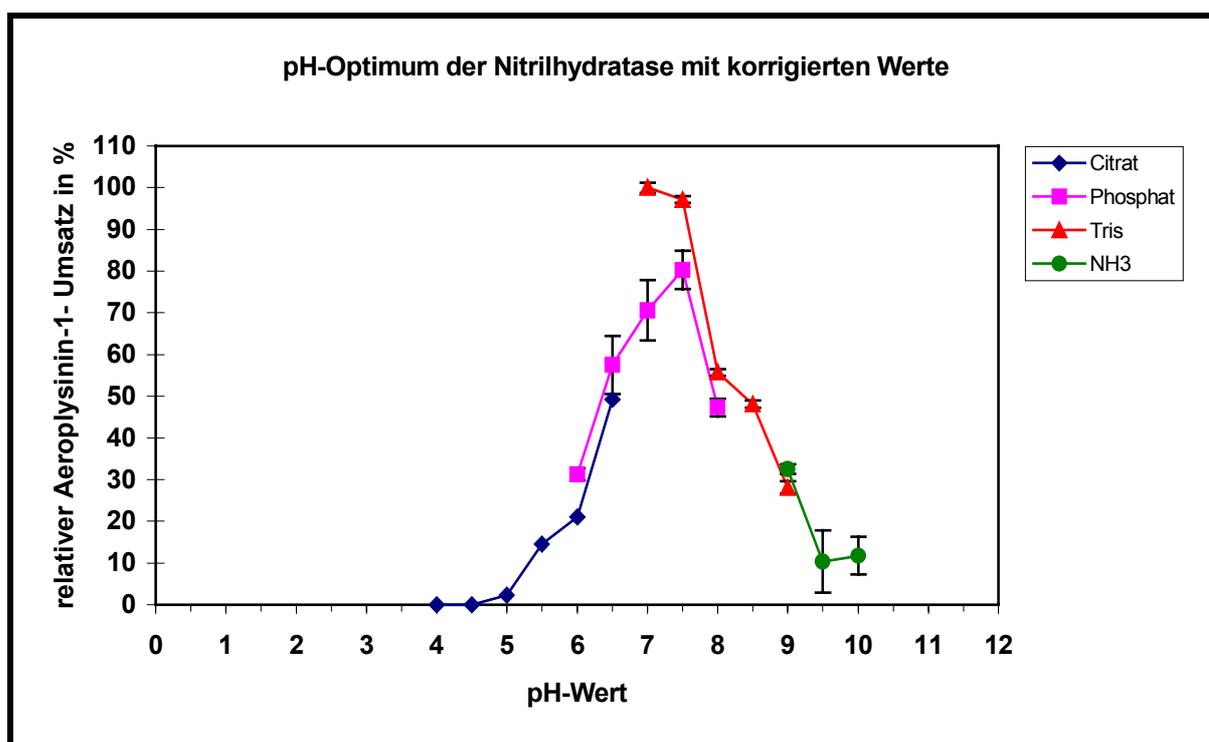


Abb. 3.3-3 Einfluß des pH-Werts auf den Substratumsatz der Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis*.

Eine Zerfallsreaktion des Säurenitrils Aeropylsinin-1 (18) durch neutrale bis leicht basische pH-Werte des Reaktionsmediums, wie sie für Säurenitrile typisch ist (Vollhardt und Schore, 2000), wurde anhand der Dreifachkontrollen für jeden betrachteten pH-Wert bei der Umsatzberechnung berücksichtigt. Die erhaltenen absoluten Aeropylsinin-1-Umsätze für den jeweiligen pH-Wert wurden um die Beträge der entsprechenden pH-Kontrollumsätze korrigiert und somit als bereinigte Aeropylsinin-1 (18) Umsätze für die weiteren Berechnungen verwendet (Abb. 3.3-3). Bei der Auswertung der pH-Kontrollumsätze konnte unter den gewählten Bedingungen eine für Aeropylsinin-1 (18) typische pH-abhängige Zersetzung ermittelt werden (Abb. 3.3-4). Anhand dieses Vorgehens konnte eindeutig auf eine kontrollierte enzymatische Umsetzung von Aeropylsinin-1 (18) im Schwammextrakt bzw. Schwammgewebe geschlossen werden und damit gleichzeitig eine Spontanumsetzung des Alkaloids durch pH-Wertveränderungen im Rahmen der Schwammabwehrreaktion

ausgeschlossen werden. Wie sich zeigte ergab die Spontanumsetzung des Aeroplysinin-1 (18) bei pH 8 eine der Enzymreaktion gleiche Umsatzrate von ca. 40% (vgl. Abb. 3.3-4). Mit steigendem pH-Wert stieg auch die Spontanumsetzung an und hatte ihre maximale Umsatzrate von 70% bei einem pH-Wert von 9.5 wohingegen die enzymatische Umsetzung des Aeroplysinin-1 (18) hier lediglich bei 10% lag (vgl. Abb. 3.3-4, Abb. 3.3-3).

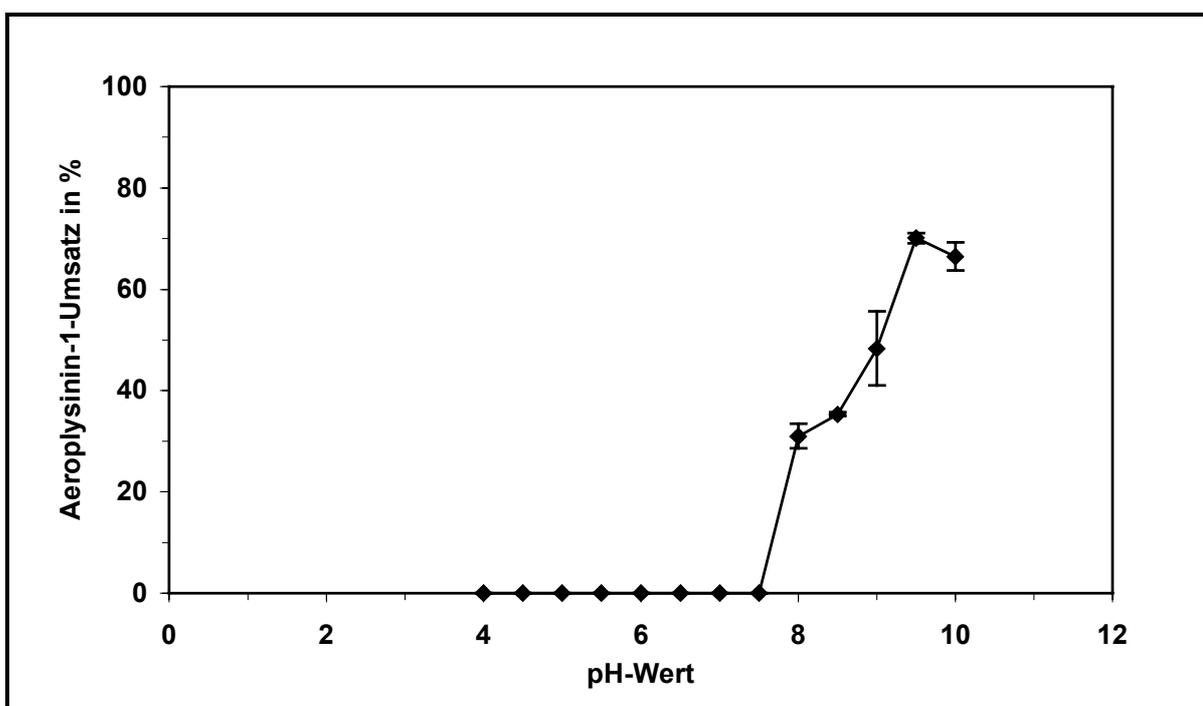


Abb. 3.3-4 pH-Wert abhängige spontane Aeroplysinin-1-Zersetzung.

Nach Ermittlung des pH-Bereichs mit maximalem Substratumsatz wurde durch eine Pufferoptimierung das in diesem Bereich optimale Puffersystem für weitere Untersuchungen bestimmt. Mit den drei ausgewählten Puffersubstanzen wurden Lösungen gleicher Molarität und gleichen pH-Werts hergestellt und diese unter identischen Bedingungen mit Proben des selben Enzymextrakts parallel getestet. Damit konnte lediglich das Puffersystem selbst, nicht jedoch die gewählten Reaktionsbedingungen für Umsatzunterschiede verantwortlich gemacht werden. Als am optimales Puffersystem wurde ein 100 mM HEPES-Puffer mit einem pH-Wert von 7.5 ausgewählt (Tab. 3.3-1). Zwar zeigte das Tris-Puffersystem einen nahezu identischen Umsatz, dieses wies jedoch einen pKa-Wert von 8.2 auf, der im Vergleich zum HEPES-Puffer mit einem pKa-Wert von 7.5 auf eine ungünstigere Pufferkapazität schließen läßt. Mit dem Zusammenfallen von gewähltem pH-Wert und pKa-Wert der Puffersubstanz besaß das HEPES-Puffersystem bei annähernd gleicher Umsatzrate für das Substrat eine größere Pufferkapazität und neben der größeren

Temperaturstabilität damit einen entscheidenden Vorteil gegenüber dem Tris-Puffersystem (Tab. 3.3-1). Das getestete Kaliumphosphat-Puffersystem zeigte mit einer Umsatzrate von lediglich 73.1% im Vergleich zum HEPES-Puffersystem mit 87.2% einen deutlich geringeren Wert und kam damit für weitere Untersuchungen trotz seiner besseren Temperaturstabilität nicht in Frage (Tab. 3.3-1).

Pufferparameter	KH ₂ PO ₄ -Puffer pH 7.5	Tris-Puffer pH 7.5	HEPES-Puffer pH 7.5
Aerophysinin-1-Umsatz [%]	73.1 ± 2.6	86.8 ± 1.5	87.2 ± 1.7
pKa-Wert (25°C)*	7.2	8.2	7.5
Temperatur- abweichung [#] (0 - 50°C) [pH / Grad °C]	- 0.004	- 0.028	-0.014

* = nach Sigma-Katalog, 1999

= nach Holtzhauer, 1988

Tab. 3.3-1 Pufferoptimierungsdaten

3.3.3 Substratspezifität

Für die Untersuchung auf Akzeptanz unterschiedlicher Substrate durch die Nitrilhydratase standen lediglich handelsübliche nichtbromierte aromatische Säurenitrile zur Verfügung, die der Struktur des Aerophysinin-1 (18) nur im weitesten Sinne entsprachen (Abb. 3.3-5). Von den 8 untersuchten Substraten zeigte im Vergleich zum natürlichen Substrat Aerophysinin-1 (18) keines einen erwähnenswerten Umsatz (Tab. 3.3-2). Bei den Verbindungen, die einen, wenn auch nur sehr geringen, Umsatz erfuhren (Tab. 3.3-2) konnte jedoch keinerlei Produktpeak im HPLC-Chromatogramm entdeckt werden, womit auf unspezifische Umsetzungen bzw. versuchsbedingte Fehlerquellen geschlossen werden kann, die von der Enzymreaktion unabhängig stattgefunden haben.

Substrat	relativer Substratumsatz in %
Aerophysinin-1 (18)	100.0 ± 0.2
3-Cyanopyridin (I)	0.1 ± 0.2
4-Cyanopyridin (II)	0
2-Hydroxybenzoesnitril (III)	0.2 ± 0.3
3-Aminobenzoesnitril (IV)	1.1 ± 0.8
DL-Mandelsäuresnitril (V)	2.3 ± 1.9
4-Nitrophenylacetoesnitril (VI)	0
p-Tolylacetoesnitril (VII)	1.8 ± 1.4
4-Hydroxyphenylacetoesnitril (VIII)	5.2 ± 1.7

Tab. 3.3-2 Relative Substratumsätze bezogen auf Aerophysinin-1 (18) als Standard.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis* keine unspezifische Umsetzung von aromatischen Säuresnitrilen bewirkt, sondern ausschließlich Aerophysinin-1 (18) als Substrat akzeptiert. Damit kann eine hohe Substratspezifität des Enzyms angenommen werden. In diesem Punkt stellt das Enzym im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen Nitrilhydratasen eine Ausnahme dar, da diese meist mehrere Substrate akzeptieren (Asano *et al.*, 1982; Cramp und Cowan, 1999; Hjort *et al.*, 1990; Nagasawa *et al.*, 1986, 1987b, 1991). Lediglich eine in der Literatur beschriebene Nitrilhydratase aus dem Pilz *Myrothecium verrucosa* setzte ausschließlich eines von mehreren angebotenen Substraten um (Maier-Greiner *et al.*, 1991).

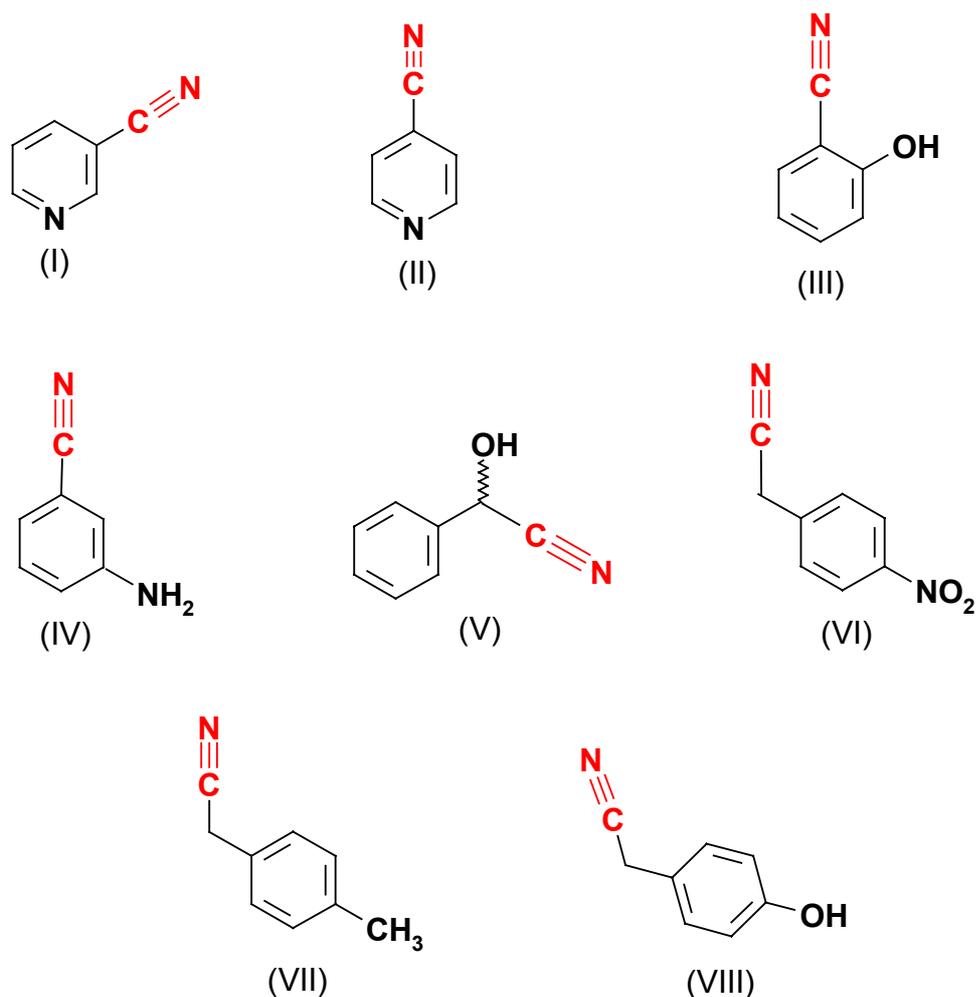


Abb. 3.3-5 Auf Substratspezifität getestete Substrate.

3.3.4 Einfluß unterschiedlicher Agenzien auf die Enzymaktivität

Eine starke Minderung der Nitrilhydratase-Aktivität war nach Zusatz von typischen Sulfhydrylreagenzien wie Hg^{2+} , Ag^+ und Cu^{2+} zu verzeichnen (s. Tab. 3.3-3). Dieses Ergebnis weist auf eine Beteiligung der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein im aktiven Zentrum des Enzyms hin, wie es in der Literatur (Brennan *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1997; Kobayashi und Shimizu, 1998, 1999) für unterschiedliche Nitrilhydratasen beschrieben wurde.

Die zweiwertigen Kobalt-, Nickel-, Zink- und Eisen-Ionen besaßen vermutlich aufgrund ihrer Bindung an essentielle Thiolgruppen ebenfalls hemmende Wirkung auf das Enzym (Tab. 3.3-3), was im Einklang mit den obigen Ergebnissen steht.

Ein weiteres entscheidendes Indiz für das Vorhandensein von essentiellen S-H-Gruppen im katalytisch aktiven Zentrum der Nitrilhydratase war das charakteristische Verhalten des

Enzyms gegenüber oxidierenden bzw. reduzierenden Agenzien (Lee und Wilson, 1971; Atkins und Nimmo, 1980). So konnte nach Zusatz des oxidierenden FeCl_3 eine nahezu vollständige Aktivitätsabnahme bei einer Assaykonzentration von 5 mM FeCl_3 zu verzeichnet werden (Tab. 3.3-3). Die übrigen oxidierenden Stoffe H_2O_2 , Ammoniumperoxodisulfat und $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ zeigten hingegen keinen entscheidenden Deaktivierungseffekt (Tab. 3.3-3). Bei den beiden stark reduzierenden Agenzien Dithiothreitol und 2-Mercaptoethanol (Suelter, 1990), die auch als Sulfhydrylgruppenstabilisatoren Einsatz finden (Lee und Wilson, 1971), konnte ein deutlicher, die Enzymaktivität steigernder Effekt registriert werden (Tab. 3.3-3).

Zusammengenommen sprechen diese Ergebnisse für das Vorhandensein einer oder mehrerer Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum der Nitrilhydratase hin, wie es für Enzyme dieser Klasse charakteristisch ist (Kobayashi und Shimizu, 1998, 1999).

Betrachtet man die Effekte, die bei Zusatz von Komplexbildnern zum entsalzten Enzymextrakt zu beobachten waren, so fällt auf, daß alle fünf gewählten Agenzien die Umsatzrate der Nitrilhydratase beeinflussten. Als Komplexbildner mit aktivitätssteigerndem Einfluß konnten KCN und NaN_3 ermittelt werden, während die Verbindungen 8-Hydroxychinolin, α, α' -Dipyridyl und EDTA in aufsteigender Reihenfolge einen aktivitätsmindernden Effekt auf den enzymatischen Abbau von Aeroplysinin-1 (18) hatten (Tab. 3.3-3). Dieser Sachverhalt lieferte eindeutige Hinweise auf die Beteiligung von mehrwertigen Metallkationen an der durch die Nitrilhydratase begünstigten Reaktion. Um nähere Aufschlüsse über die Identität dieser Metallionen zu erlangen, wurde in einem weiterführenden Experiment der Einfluß ausgewählte Metallionen auf die Enzymaktivität nach vorheriger Behandlung mit dem Komplexbildner EDTA untersucht (s.2.6.5.5.2). Es wurde angenommen, daß nach einer Inkubation des Enzymextrakts mit EDTA die Aktivität des Enzymextrakts zunächst abnehmen bzw. verschwinden würde, wie aus Tab. 3.3-3 nachvollziehbar ist. Nach anschließender Zugabe ausgewählter Metallionen in zweifach molarem Überschuß zum zugegebenen EDTA hätte bei Rückführung des von der Nitrilhydratase essentiell benötigten Kations die Aktivität des Enzyms steigen müssen. Nach Inkubation des Enzymextrakts mit EDTA trat tatsächlich ein vollständiger Aktivitätsverlust des Enzyms ein, der durch die zweiwertigen Ionen Mg^{2+} , Ca^{2+} sowie Mn^{2+} jedoch nicht wieder aufgehoben wurde. Daraus läßt sich schließen, daß diese Ionen keine entscheidende Bedeutung für die Nitrilhydratase besitzen. Es ist vielmehr anzunehmen, daß wie von Kobayashi und Shimizu (1998, 1999) beschrieben ausschließlich Kobalt- bzw. Eisen-Ionen als Kofaktoren für Nitrilhydratasen dienen. Eine eindeutige Klärung der Frage welches der beiden Metalle als positiv geladenes Zentralion innerhalb des Metal-Protein-Komplexes liegt

(Kobayashi und Shimizu, 1998, 1999; Huang *et al.*, 1997; Brennan *et al.*, 1996) konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden.

Bei Betrachtung der Carbonylreagenzien Hydroxylamin, Phenylhydrazin L-Penicillamin und Semicarbazid zeigte lediglich letzteres in höherer Konzentration einen hemmenden Einfluß auf die Umsetzungsbereitschaft der Nitrilhydratase, womit Carbonylgruppen als chemisches Strukturmerkmal im Enzym einen eher geringen Anteil am Aeroplysinin-1-Abbau besitzen dürften. Diese Schlußfolgerung deckt sich auch mit den Ergebnissen von Kobayashi und Shimizu (1999), wonach sich beim Typus der hochmolekularen Nitrilhydratase aus *Rhodococcus* sp. R312 um das Zentralion Kobalt dreimal Cystein und einmal Serin als Aminosäuren gruppieren. Als Liganden für das Zentralion dienen nach deren Annahmen die Sulfhydrylgruppen der Cysteinmolekül und zwei Amid-Stickstoffatome innerhalb der Aminosäurenkette.

Eine Beeinflussung der Nitrilhydrataseaktivität durch das denaturierende Agens Harnstoff (Suelter, 1990) in den Konzentrationen 1 mM, 5 mM (s. Tab. 3.3-3) und 10mM (97.0% ± 0.7) konnte nicht ausgemacht werden.

Die Ergebnisse der getesteten Metallkationen, in Form von Chloridsalzen, sowie des Anions Fluorid als NaF zeigten keinerlei Beeinflussung der Aeroplysinin-1-Umsetzung durch diese Ionen (s. Tab. 3.3-3).

Zusatzstoff	relativer Aeroplysinin-1- Umsatz in % bei 1 mM Zusatzstoff- Konzentration	relativer Aeroplysinin-1- Umsatz in % bei 5 mM Zusatzstoff- Konzentration
Ansatz ohne Zusatz	100.0 ± 1.1	100.0 ± 2.1
HgCl ₂	55.8 ± 2.7	38.6 ± 3.0
AgNO ₃	96.0 ± 2.5	38.6 ± 4.5
CuSO ₄	80.5 ± 4.1	52.3 ± 13.1
Hydroxylamin	98.9 ± 0.8	-
Phenylhydrazin	99.9 ± 0.7	-
L-Penicillamin	99.0 ± 0.5	-
Semicarbazid	95.6 ± 1.4	76.1 ± 4.0
α,α'-Dipyridyl	95.8 ± 1.2	88.3 ± 9.6
8-Hydroxychinolin	73.1 ± 11.4	96.1 ± 3.6
EDTA	86.5 ± 3.6	12.1 ± 3.0
KCN	101.5 ± 0.3	106.6 ± 0.2
NaN ₃	103.3 ± 0.2	105.0 ± 2.5
H ₂ O ₂	97.4 ± 0.5	-
FeCl ₃	86.3 ± 1.8	4.8 ± 5.7
Ammoniumperoxo-disulfat	93.4 ± 0.4	92.5 ± 0.9
Na ₂ S ₂ O ₄	99.7 ± 0.2	-
Dithiothreitol	105.0 ± 0.0	113.0 ± 0.9
2-Mercaptoethanol	105.0 ± 0.0	114.2 ± 1.8
NaF	101.1 ± 1.6	-
Urea pura	97.9 ± 0.9	95.4 ± 0.4
NaCl	102.1 ± 0.2	-
MnCl ₂	98.9 ± 1.0	-
MgCl ₂	100.2 ± 2.1	-
CaCl ₂	99.8 ± 2.8	-
FeSO ₄	88.4 ± 7.3	60.7 ± 1.3
AlCl ₃	99.3 ± 0.3	-
SnCl ₂	100.2 ± 1.5	-
ZnCl ₂	86.8 ± 1.4	84.8 ± 1.6
NiCl ₂	37.8 ± 1.3	14.8 ± 4.9
CoCl ₂	68.2 ± 1.9	55.9 ± 3.8

Tab. 3.3-3 Einfluß von Metallionen und Inhibitorsubstanzen auf die Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis*.

3.3.5 Überprüfung alternativer enzymatischer Nitrilumsetzungen

Unter den gewählten Bedingungen konnte für keinen der beiden Versuchsansätze (2.6.5.4.1) eine enzymatische Oxidation des Dienons (16) zur korrespondierenden Carbonsäure festgestellt werden.

Während im Versuch mit der unspezifischen Amidase A-6691 (2.6.5.4.2) das Referenzsubstrat Benzylpenicillin-G eine Umsetzung von $31.4\% \pm 4.7$ erfuhr, wurde Dienon (16) als Substrat nicht akzeptiert.

Im entsalzten Schwammrohextrakt von *Aplysina cauliformis* wurden zwar $96.2\% \pm 3.2$ Isofistularin-3 (10) und $83.1\% \pm 1.9$ Aeroplysinin-1 (18) zu Dienon (16) abgebaut. Eine weitere enzymatische Oxidation zur korrespondierenden Carbonsäure konnte jedoch auch in diesem Experiment weder bei den beiden letztgenannten Ansätzen, noch für den Dienon-Ansatz selbst beobachtet werden.

Damit wurde die zu Beginn dieses Kapitels aufgestellte Grundannahme, daß es sich bei dem Dienon-bildenden Enzym um eine Nitrilhydratase (s. 3.3) handelt, zweifelsfrei bewiesen.

3.3.6 Bestimmung von V_{\max} und K_m

Zur exakten Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante K_m war es zunächst nötig anhand von Vorversuchen den ungefähren Konzentrationsbereich zu ermitteln, in dem die Kenngröße für das Enzym angesiedelt war. Hierzu wurden zwei Versuche durchgeführt, in denen Aeroplysinin-1-Konzentrationen im Assay von jeweils 1.47 mM bis 11.8 mM auf deren Umsatz hin getestet wurden (s. 2.6.5.9 Versuche 1 und 2). Nach Auswertung dieser beiden Vorversuche wurde das entscheidende Experiment mit Substratkonzentrationen durchgeführt, die nach Henderson (1978) gezielt um den zu erwartenden K_m -Wert herum gewählt wurden (s. 2.6.5.9 Versuch 3). Um die enzymatische Reaktion der Nitrilhydratase nicht durch denaturierende Effekte des Substratlösungsmittels Methanol negativ zu beeinflussen wurden für sämtliche Experimente zur K_m - bzw. V_{\max} -Bestimmung wäßrige Aeroplysinin-1-Lösungen verwendet.

Zur Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante wurde bei allen drei Versuchen zunächst für jede Konzentration aus der Abnahme des Substrats über die Zeit die entsprechende Geschwindigkeit ermittelt. Die reziproken Werte dieser Geschwindigkeiten wurden anschließend gegen die reziproken Werte der dazugehörigen Substratkonzentration in einem Lineweaver-Burk-Plot aufgetragen (Lineweaver und Burk, 1934; Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1979; Burk, 1984). Durch Extrapolation der resultierenden

Regressionsgerade in den negativen Bereich der Ordinate und deren Schnittpunkt bei $1/V = 0$ wurde der Wert für $-1/K_m$ rechnerisch bestimmt. Ebenso wurde der Abszissenschnittpunkt der Regressionsgeraden für $1/[S] = 0$ rechnerisch ermittelt, der dem reziproken Wert von V_{max} entsprach.

In Versuch 1 wurden auf die beschriebene Weise 26 mM für K_m und 7,1 mM/min für V_{max} errechnet (Abb. 3.3-6). Als Ergebnisse aus dem zweiten Vorversuch (s. 2.6.5.9, Versuch 2) wurden für K_m eine Konzentration von 53 mM und für V_{max} eine Geschwindigkeit von 8.5 mM/min bestimmt (Abb. 3.3-7).

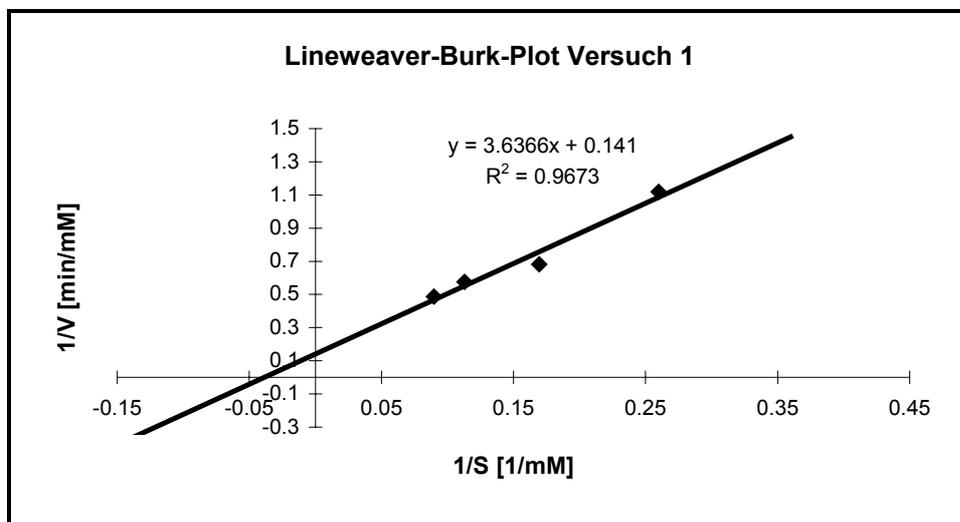


Abb. 3.3-6 Lineweaver-Burk-Plot Versuch 1.

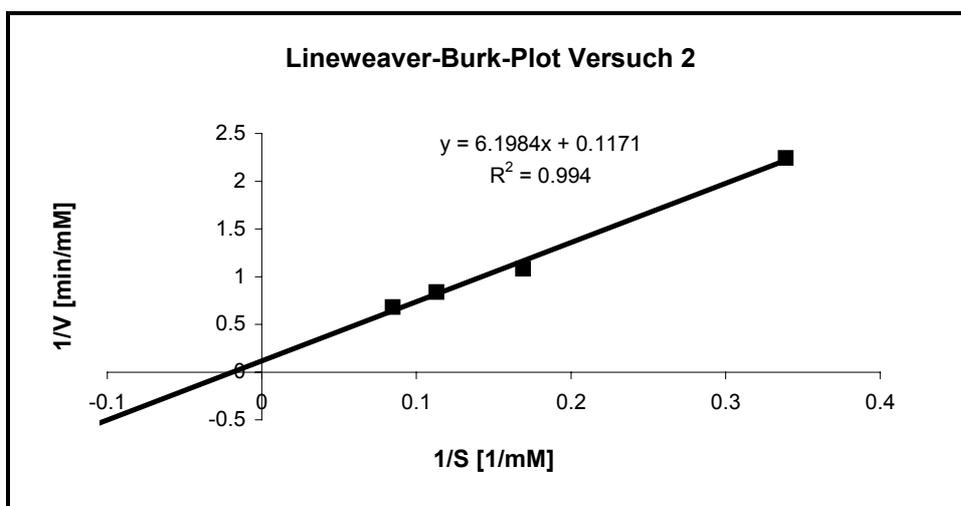


Abb. 3.3-7 Lineweaver-Burk-Plot Versuch 2.

Die Ergebnisse der beiden Vorversuche ließen auf einen K_m -Wert zwischen 20 mM und 50 mM schließen, so daß zur exakten Bestimmung Substratkonzentrationen von 7.4 mM bis 88.5 mM gewählt wurden, die sich wie oben beschrieben idealerweise um den Erwartungswert herum gruppieren. Im folgenden Hauptexperiment zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (s. 2.6.5.9, Versuch 3) konnte ein Wert von 84 mM für die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit der Nitrilhydratase (K_m) bestimmt werden (s. Abb. 3.3-8). Die Richtigkeit dieses Ergebnisses wird trotz der Abweichungen zu den Resultaten der Vorversuche durch die Lage des Wertes innerhalb der getesteten Substratkonzentrationsreihen bestätigt. Als V_{max} wurde eine Geschwindigkeit von 18.3 mM/min berechnet (Abb. 3.3-8).

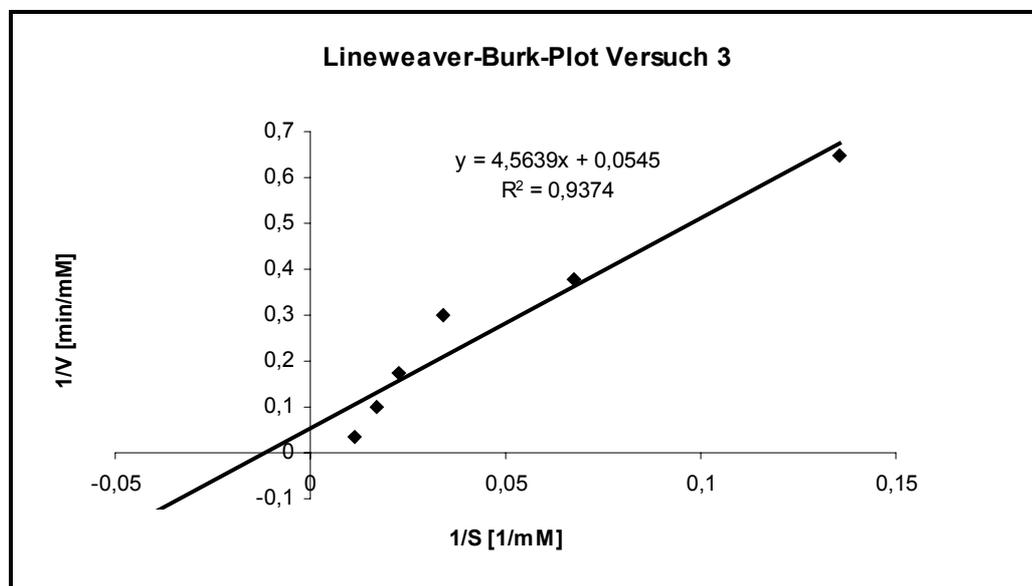


Abb. 3.3-8 Lineweaver-Burk-Plot Versuch 3.

Im Lineweaver-Burk-Plot des Hauptexperiments (Abb. 3.3-8) zeigen sich im Bereich der zum Nullpunkt benachbarten Wertepaare deutlich größere Abweichungen zur Regressionsgeraden für die Aeroplysinin-1-Konzentrationen 29.5 mM und 88.5 mM als bei den übrigen vier Testkonzentrationen (vgl. Abb. 3.3-8). Bei Betrachtung des Korrelationskoeffizienten der Regressionsgerade ($R^2 = 0.9374$) in Abb. 3.3-8 wird die relativ große Schwankungsbreite der Wertepaare um die Ausgleichsgerade deutlich. Um auszuschließen, daß zwei Substratkonzentrationen mit überdurchschnittlich abweichenden Umsätzen das Gesamtergebnis verfälschen, wurden die Resultate der genannten Konzentrationen in einer zweiten Berechnung nicht mit einbezogen (Abb. 3.3-9). Bei dieser Auswertung ergaben sich für K_m ein Wert von 81 mM und für V_{max} eine Geschwindigkeit von 18.1 mM/min bei einem Korrelationskoeffizient von $R^2 = 0.9892$ für die ermittelte

Regressionsgerade (vgl. Abb. 3.3-9). Trotz Ausschluß der beiden Konzentrationen 29.5 mM und 88.5 mM als Werte mit den größten Abweichungen von der Ausgleichsgeraden, ergaben sich nur minimale Änderungen für K_m und V_{max} , so daß die zuerst erhaltenen Resultate der Bestimmung inklusive dieser beiden Konzentrationen (Abb. 3.3-8) als repräsentatives Ergebnis angesehen werden können.

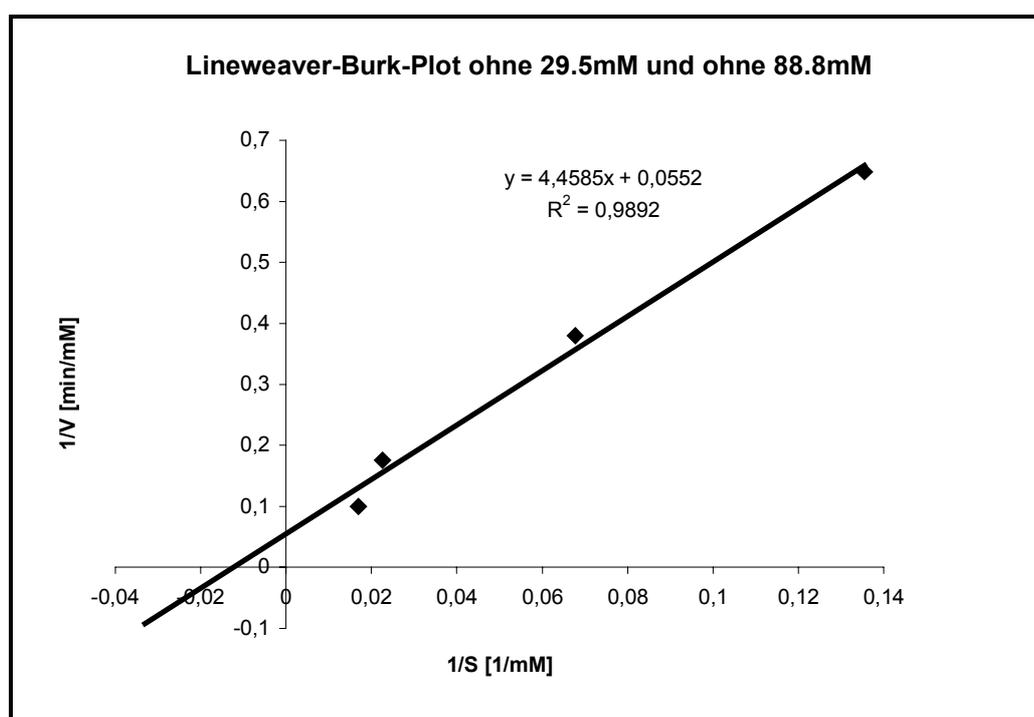


Abb. 3.3-9 Lineweaver-Burk-Plot Versuch 3 ohne Berücksichtigung der Substratkonzentrationen 29.5 mM und 88.5 mM.

Mit einem K_m von 84 mM liegt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit relativ hoch und ist damit ein Indiz für eine eher geringe Affinität der Nitrilhydratase zum Substrat Aeroplysinin-1 (18). Eine intensivere Diskussion dieses Ergebnisses kann an dieser Stelle nur unvollständig erfolgen, da ein Vergleich mit anderen vom Enzym akzeptierten Substraten aufgrund der festgestellten hohen Substratspezifität im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war (vgl. 3.3-3). Aufgrund der hohen Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) läßt sich jedoch in Zusammenhang mit der geringen Affinität der Nitrilhydratase zum natürlichen Substrat Aeroplysinin-1 (18) schließen, daß es sich wie angenommen um ein Abwehrenzym handelt, bei dem es auf eine möglichst schnelle Umsetzung des Substrats durch das Enzym ankommt. Dadurch läßt sich auch die geringe Affinität des Enzyms zum Aeroplysinin-1 (18) erklären. Da offensichtlich kein Konkurrenzsubstrat vorhanden zu sein scheint (vgl. 3.3.3), die Nitrilhydratase eine nachgewiesene hohe Maximalgeschwindigkeit zeigt und bei

Gewebsverletzung hohe Konzentrationen Aeroplysinin-1 (18) durch das Isoxazolin-spaltende Enzym bereitgestellt werden (vgl. 3.2.8) ist eine hohe Bindungsaffinität im diesem Fall offensichtlich nicht nötig, um eine schnelle und effektive Reaktion zu gewährleisten.

Im Literaturvergleich liegt der K_m -Wert der Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis* mit 84 mM um das drei- bis zehnfache höher als bei den bisher bekannten Nitrilhydratasen, die Konzentrationen von 8.4 mM (Cramp und Cowan, 1999) bis 34.6 mM (Nagasawa *et al.*, 1987) für die Michaelis-Menten-Konstante aufweisen.

Da aus jedem Mol Bromoisoxazolinalkaloid durch das Isoxazolin-spaltende Enzym ein Mol Aeroplysinin-1 freigesetzt wird, mit Ausnahme der Alkaloide Fistularin-3 und Aerothionin und deren Derivate (hier werden pro Mol Alkaloid zwei Mol Aeroplysinin-1 gebildet), kann man beispielsweise für den Schwamm *Aplysina insularis* (vgl. 2.5.1.2) eine Aeroplysinin-1-Molarität von 5.2 mM errechnen. Dies entspricht etwa sechs Prozent der Michaelis-Menten-Konstante von 84 mM. Vermutlich lassen sich die beiden Werte nicht ohne Einschränkung vergleichen, da die Verteilung von Alkaloid und Enzym innerhalb des Schwamms noch nicht näher untersucht ist und daher weitere Untersuchungen erfolgen müssen, um genauere Aussagen treffen zu können.

3.3.7 Intramolekulare Sauerstoffumlagerung

Diesem Experiment lag die Überlegung zugrunde, daß bei der enzymatischen Umsetzung von Aeroplysinin-1 (18) zu Dienon (16) die reaktionsbestimmende Wasseranlagerung an die Nitrilgruppe des Aeroplysinin-1 (18) auf zweierlei Arten verlaufen kann. Entweder als intramolekulare Anlagerung der Hydroxylgruppe in Position 1 an das Nitrilkohlenstoffatom in Position 8 (A) oder aber als Wasseranlagerung aus dem Medium an die Nitrilgruppe (B) (s. Abb. 3.3-10).

Im durchgeführten Experiment dienten zwei Ansätze in unterschiedlichen Lösungsmitteln der Klärung dieser Frage (vgl. 2.6.5.8), zum einen ein Ansatz mit ^{18}O -Wasser als Analyse und zum anderen ein Ansatz mit normalem ^{16}O -Wasser als Kontrolle. Sollte die Wasseranlagerung an die Nitrilgruppe des Aeroplysinin-1 (18) nun mit Wasser aus dem Medium stattfinden, hätte das Molekulargewicht des entstehenden Dienons (16) im Analysenansatz mit 327 g/mol um zwei Masseneinheiten höher liegen müssen als im Kontrollansatz mit 325 g/mol. Bei einer intramolekularen Umlagerung der Hydroxyfunktion von Position 1 zur Nitrilgruppe im selben Aeroplysinin-1-Molekül hätte das Molekulargewicht des entstandenen Dienons (16) im Analysenansatz hingegen keine Massenveränderung im Vergleich zum Kontrollansatz erfahren dürfen und bei 325g/mol liegen müssen.

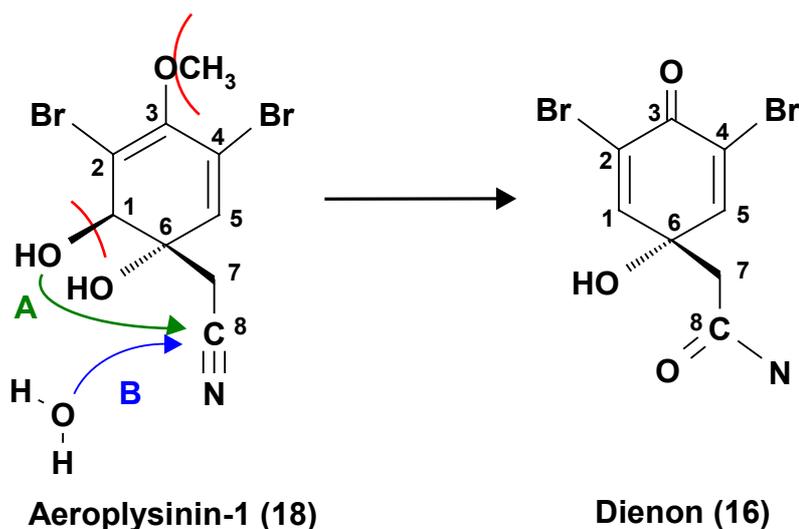


Abb. 3.3-10 Alternative Umsetzung von Aeroplysinin-1 (18) zu Dienon (16) durch die Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis*.

Bevor Proben beider Versuchsansätze per FAB-MS vermessen wurden, kam es zunächst zur Aufnahme von FAB-MS-Referenzspektren der beiden Reinsubstanzen Dienon (16) (Abb. 3.3-11) und Aeroplysinin-1 (18) (Abb. 3.3-12). Hierbei stellte sich heraus, daß beide Moleküle unter den gegebenen Bedingungen als Wasseraddukte vermessen wurden, und folglich einen Molekülionenpeak ergaben, der in seiner Masse um 18 Masseneinheiten größer war als die zu erwartende Massenzahl beider Alkaloide (Abb. 3.3-11 und Abb. 3.3-12).

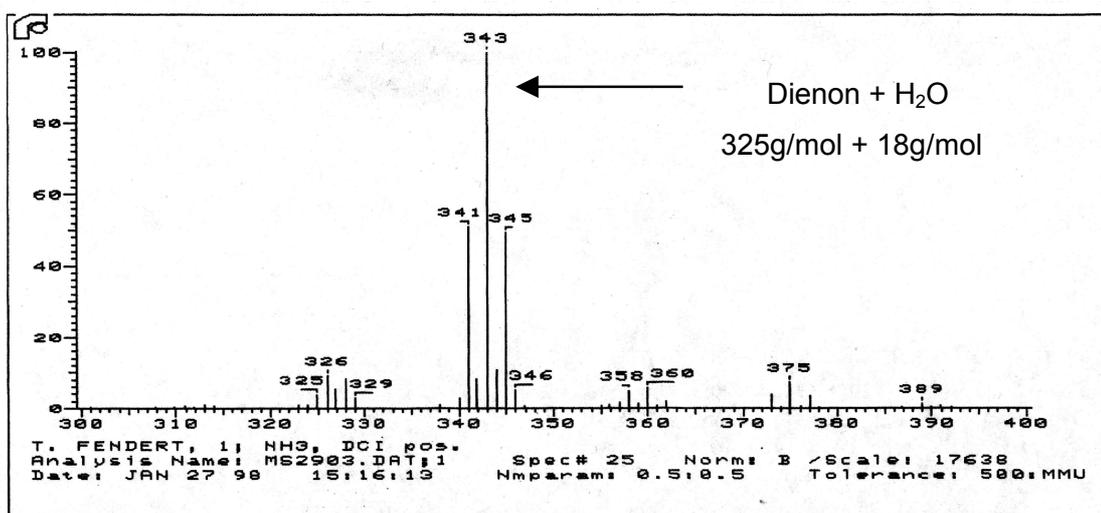


Abb. 3.3-11 FAB-MS-Spektrum von Dienon (16).

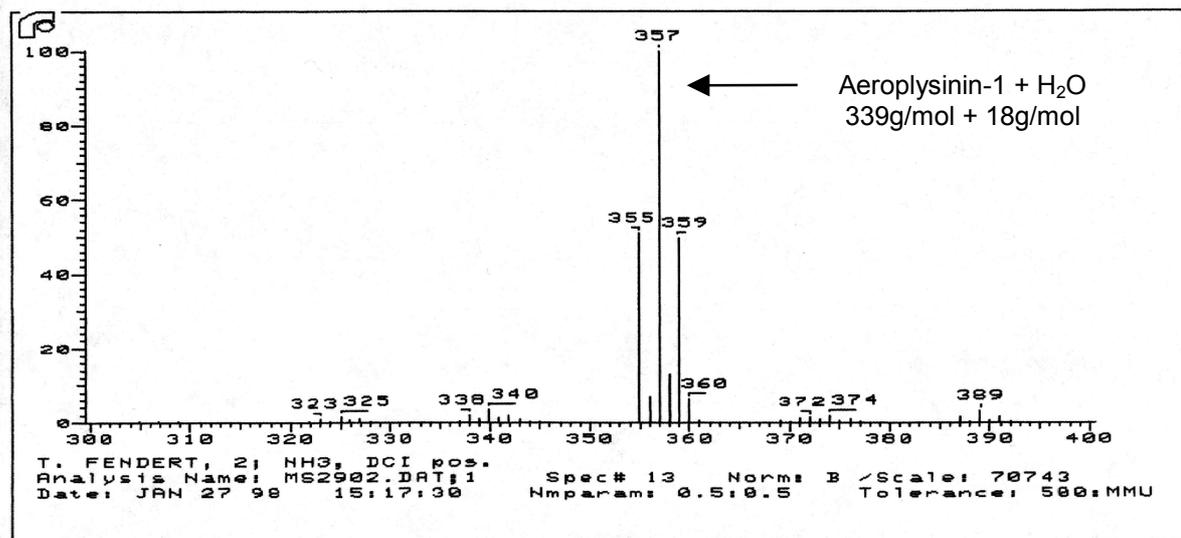


Abb. 3.3-12 FAB-MS-Spektrum von Aeroplysinin-1 (18).

Nach Vermessen des Analysenansatzes mit ^{18}O -Wasser mittels FAB-MS (2.5.2.2) zeigte das erhaltene Chromatogramm zwei isotopische Cluster im Verhältnis 1:2:1 bei m/z $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$ 341, 343, 345 und m/z $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$ 355, 357, 359 (Abb. 3.3-13).

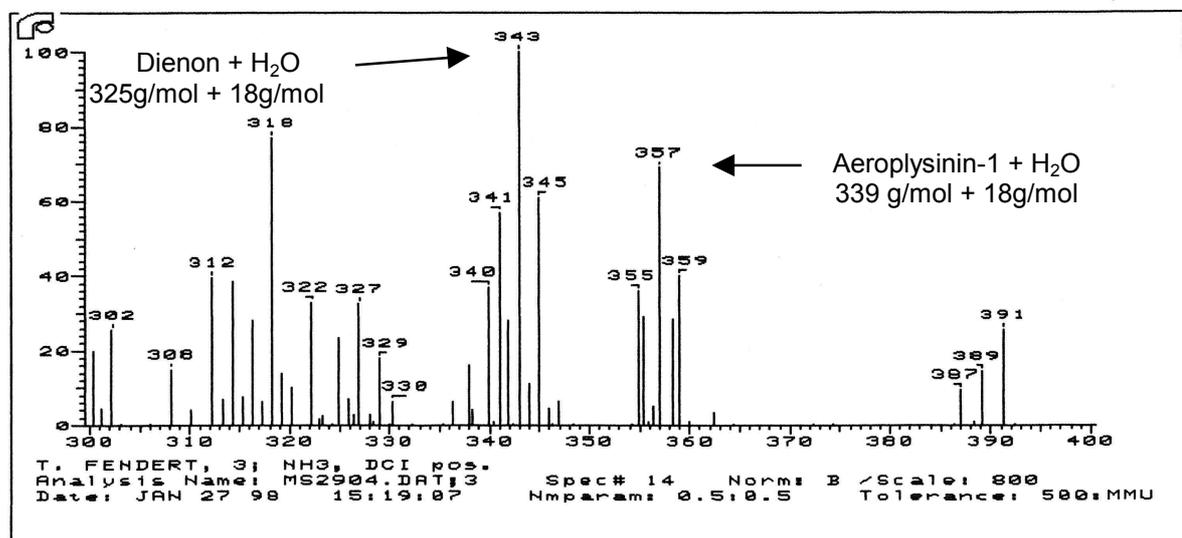


Abb. 3.3-13 Massenspektrum des O^{18} -Ansatzes nach Reaktionsablauf.

Diese Cluster weisen eindeutig auf Molekülpeaks von Dienon (16) plus Wasser und Aeroplysinin-1 (18) plus Wasser hin (vgl. Abb. 3.3-13). Betrachtet man sich den Molmassenpeak des entstandenen Dienons (16) von 343 g/mol, so errechnet sich nach Abzug des Wassermolekulargewichts von 18 g/mol eine Molmasse von 325 g/mol für das

entstandene Dienon (16). Daraus konnte geschlossen werden, daß die Bildung der Säureamidgruppe im Dienon (16) aus einer intramolekularen Umlagerung der Hydroxylgruppe von Position 1 an die Nitrilfunktion im selben Aeroplysinin-1-Molekül entsteht (vgl. Abb. 3.3-10, Möglichkeit A) und nicht durch eine Anlagerung eines Wassermoleküls aus dem Lösungsmittel an die Nitrilgruppe (vgl. Abb. 3.3-10, Möglichkeit B).

3.3.8 Stabilitätsuntersuchungen

Bei der Untersuchung der Stabilität der Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis* im Enzymextrakt bei Raumtemperatur wurde die größte Stabilität bei einem pH-Wert von 8.0 festgestellt. Die bemerkenswert hohe Stabilität über einen Zeitraum von 336 Stunden (Abb. 3.3-14), entsprechend 14 Tagen, bei diesem pH-Wert überrascht um so mehr, da in diesem basischen Milieu bei solch langer Lagerung bei Raumtemperatur eine Zersetzung der Eiweißstruktur des Enzyms zu erwarten gewesen wäre. Nachdem für die beiden pH-Werte 6.0 und 7.0 über den getesteten Zeitraum eine Abnahme der Enzymaktivität zu verzeichnen war (Abb. 3.3-14) und eine Umsetzung des Substrats Aeroplysinin-1 (18) aufgrund des jeweiligen pH-Wertes durch die Versuchsdurchführung und Ergebnisauswertung ausgeschlossen werden konnte (2.6.5.6), läßt sich die beobachtete Stabilität mit einer Anpassung des Enzyms an die Umgebungsbedingungen im Meerwasser erklären, dessen pH-Wert ebenfalls im leicht alkalischen Bereich liegt.

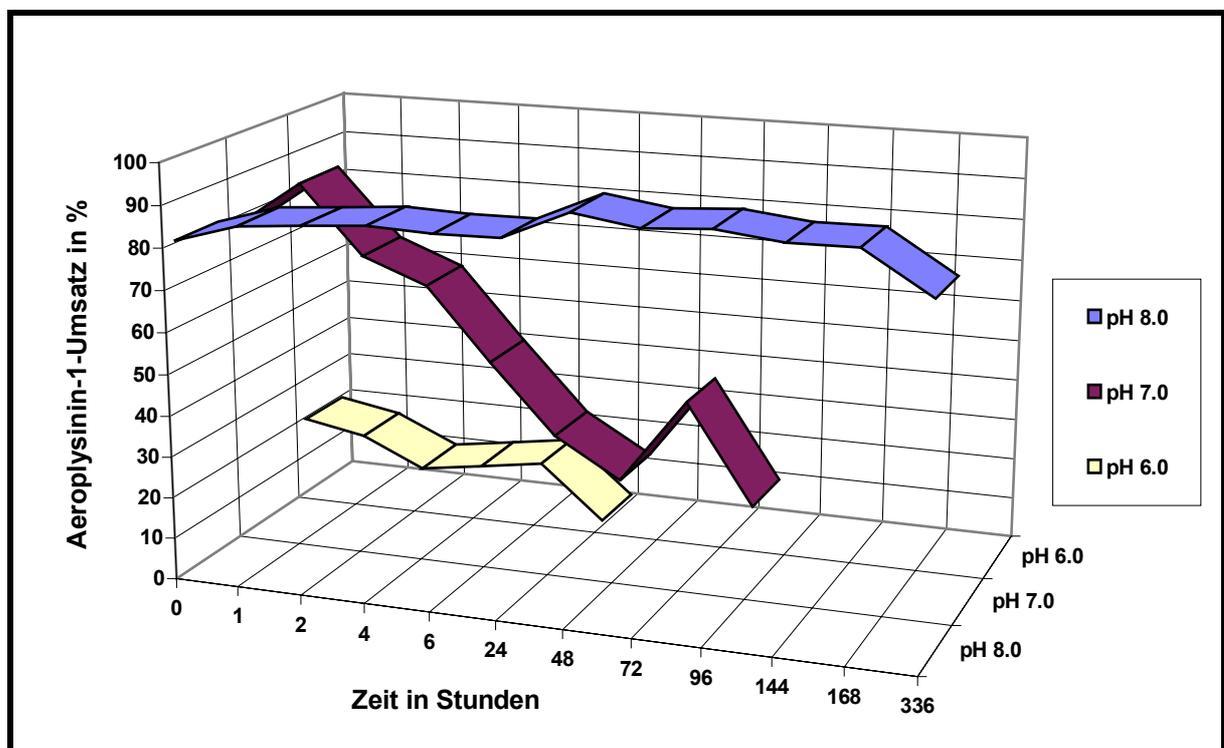


Abb. 3.3-14 Stabilität der Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis* im Enzymextrakt bei Raumtemperatur.

3.3.9 Diskussion

Durch die vorliegende Arbeit konnte der eindeutige Nachweis erbracht werden, daß bei der von Teeyapant und Proksch (1993) erstmals beschriebenen Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina* neben dem Isoxazolin-spaltenden Enzym ein zweites Enzym am Umsatz der Bromotyrosinderivate beteiligt ist. Durch nähere Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus konnte das Enzym eindeutig als Nitrilhydratase charakterisiert werden (vgl. 3.3.5 und 3.3.7).

Während das Isoxazolin-spaltende Enzym als erstes in der Reihe der beiden Abwehr-Enzyme aus *Aplysina cauliformis* hohe Werte bei pH- und Temperatur-Optimum zeigte (vgl. 3.2.1 und 3.2.2) konnten für die Nitrilhydratase aus dem gleichen Schwamm durchaus physiologische Maßzahlen für diese Kenngrößen bestimmt werden. So zeigte das Enzym in einem pH-Bereich von 7.0 bis 7.5 und einem Temperaturintervall von 20°C bis 30°C seine maximalen Aktivitäten und weist damit bezüglich der Reaktionsbedingungen die gleichen Anforderungen auf wie bisher beschriebene Nitrilhydratasen (vgl. 3.3.1 und 3.3.2). Bei Stabilitätsuntersuchungen zeigte das Enzym seine größte Stabilität erstaunlicherweise bei Raumtemperatur bei einem pH-Wert von 8. Hier konnte noch nach 14 Tagen eine Substratumsatzrate von über 70% registriert werden, während vorhergehende durchschnittliche Umsatzraten zwischen 80% und 90% lagen (s. 3.3.8).

Die in dieser Arbeit festgestellte hohe Substratspezifität des Isoxazolin-spaltenden Enzyms aus *Aplysina cauliformis* (s. 3.2.3) ließ eindeutig erkennen, daß es sich bei der untersuchten Abwehrreaktion um eine hochspezialisierte Art der chemischen Verteidigung in Schwämmen der Gattung *Aplysina* handelt, wie dies zuvor schon von Ebel (1998) beschrieben wurde. Dieser konnte in vergleichenden Untersuchungen von Schwämmen unterschiedlicher Gattungen zeigen, daß Bromoisoxazolinalkaloide als charakteristische Inhaltsstoffe der Gattung *Aplysina* ausschließlich von Schwammextrakten dieser Gattung nicht jedoch von Schwammextrakten anderer Gattungen zu den biologisch aktiven Produkten Aeroplysinin-1 (18) und Dienon (16) abgebaut werden (Ebel, 1998). Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zur Substratspezifität der Nitrilhydratase aus *Aplysina cauliformis* (s. 3.3.3), kann die Feststellung von Ebel (1998) präzisiert werden, da wie oben angedeutet sowohl das Isoxazolin-spaltende Enzym wie auch die Nitrilhydratase eine ausgesprochen hohe Substratspezifität aufweisen.

Im Rahmen der Untersuchungen zur Substratspezifität wurde ausschließlich Aeroplysinin-1 (18) durch das Enzym zum Produkt Dienon (16) umgewandelt, alle anderen angebotenen Säurenitrile mit annähernd ähnlichem Molekulargerüst (s. Abb. 3.3-5) wurden hingegen verschmäht (vgl. Tab. 3.3-2). Die Tatsache, daß keines der getesteten Nitrile einen zu berücksichtigenden Umsatz erfuhr (s. Tab. 3.3-2) bestätigt die Annahme, daß es sich um eine hochspezialisierte Nitrilhydratase handelt, was für diesen Enzymtypus ein eher untypisches Charakteristikum ist (Nagasawa und Yamada, 1989).

Zur näheren Charakterisierung der Nitrilhydratase wurde der Einfluß unterschiedlichster Agenzien auf die Enzymaktivität herangezogen (s. 3.3.4). Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihe konnte auf eine bedeutende Beteiligung von schwefelhaltigen Aminosäuren, vermutlich Cystein, am Aufbau des reaktiven Zentrums geschlossen werden. Alle getesteten Thiolreagenzien sowie oxidierendes Fe^{3+} und einige Schwermetallionen zeigten einen aktivitätsmindernden Effekt, der durch Erhöhung der Agenzkonzentrationen deutlich verstärkt wurde (vgl. Tab. 3.3-3). Bei Zusatz von Substanzen wie Dithiotreitol und 2-Mercaptoethanol hingegen, die einen stabilisierenden Einfluß auf Thiolgruppen besitzen, wurde ein aktivitätssteigernder Effekt auf die Nitrilhydratase beobachtet, der konzentrationsabhängig zunahm (vgl. Tab. 3.3-3).

Als zweites wichtiges Ergebnis dieses Experiments sei die entscheidende Rolle von zwei- bzw. dreiwertigen Metallionen bei der Enzymreaktion aufgrund der deaktivierenden Wirkung des Komplexbildners EDTA genannt (vgl. Tab. 3.3-3). Eine genauere Klärung der Identität der betreffenden Ionen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden, und bedarf einer detaillierteren Untersuchung mit aufgereinigtem Enzymmaterial. Anhand der durchgeführten Untersuchungen konnten jedoch Ca^{2+} -, Mg^{2+} - und Mn^{2+} -Ionen als für die Reaktion essentielle Ionen ausgeschlossen werden (vgl. 3.3.4).

Die getesteten Carbonylagenzien zeigten nur vereinzelt geringe Einflüsse auf die Aktivität der Nitrilhydratase (s. 3.3.4) und legen damit den Schluß nahe, daß Carbonylgruppen keine tragende Rolle bei der Reaktion spielen. Alle übrigen getesteten Substanzen zeigten unter den gewählten Bedingungen keine erwähnenswerten Einflüsse auf die Umsatzrate des Enzyms.

Für die Michaelis-Menten-Konstante ergab sich ein Wert von 84 mM, der bei einer maximalen Aeroplysinin-1-Molarität von 5.2 mM für das gewählte Beispiel *Aplysina insularis* um das 17fache höher liegt als die natürlich vorkommende Substratkonzentration, die jedoch innerhalb verschiedener Spezies auch stark variieren kann.

Durch Untersuchungen zur internen Sauerstoffumlagerung konnte gezeigt werden, daß es bei der enzymatischen Bildung des Säureamids Dienon (16) aus dem Säurenitril Aeroplysinin-1 (18) zu einer intramolekularen Sauerstoffumlagerung von Position 1 zu Position 8 kommt (s. 3.3.7). Auf Basis dieser Feststellung kann für die Nitrilhydratase folgender Reaktionsmechanismus angenommen werden. Der Angriff einer Base am Hydroxysubstituenten in Position 1 bedingt die Abspaltung des Protons und den gleichzeitigen Angriff des nucleophilen Sauerstoffrests der Hydroxygruppe am Nitrilkohlenstoffatom (s. Abb. 3.3-15). Gleichzeitig wird aus dem Medium ein Proton an den Nitrilstickstoff angelagert, es bildet sich ein zyklisches Zwischenprodukt. An diesem Zwischenprodukt greift nun unter Abspaltung der CH_3 -Gruppe ein Nucleophil am Methoxyether in Position 3 an, wodurch über eine mesomere Ladungsverschiebung im Molekül die Öffnung des Tetrahydrofuranringes und die Anlagerung eines Protons aus dem Medium an den Ketiminstickstoff bewirkt wird (s. Abb. 3.3-15), und somit das Produkt Dienon (16) entsteht.

4. Zusammenfassung

Marine Naturstoffe sind durch ihre oft außergewöhnlichen Strukturen eine unschätzbare Quelle bei der Suche nach neuen Wirksubstanzen und Leitstrukturen in Pharmazie und Pflanzenschutz. Über ihre kommerzielle Bedeutung hinaus jedoch spielen sie oft eine entscheidende Rolle im Überlebenskampf ihrer hauptsächlich wirbellosen Produzenten (Invertebraten) und geben somit Aufschluß über die marinen Ökosysteme in denen ihre Produzenten leben. Besonders benthische Invertebraten, wie marine Schwämme und Seescheiden haben sich im Laufe der Naturstoffforschung als Hauptquelle für interessante marine Naturstoffe herausgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in der Karibik und im Mittelmeer weitverbreitete Schwammgattung *Aplysina* unter zwei Gesichtspunkten näher betrachtet. Ein Teil der Untersuchungen basierte auf der Isolierung und Strukturaufklärung der Inhaltsstoffe und hier vornehmlich der Bromotyrosinalkaloide eines ausgewählten Gattungsvertreters. In einem zweiten Teil der Arbeit wurde die induzierbare enzymatische Abwehrreaktion der Gattung *Aplysina* näher charakterisiert und beschrieben.

Nach Untersuchung der Rohextraktinhaltsstoffmuster von insgesamt 55 karibischen Schwämmen der Familien Aplysinidae (sieben Arten mit insgesamt 49 Exemplaren) und Aplysinellidae (eine Art mit sechs Exemplaren) mittels HPLC wurde der Schwamm *Aplysina insularis* zur Isolierung und Strukturaufklärung seiner Inhaltsstoffe ausgewählt. Insgesamt wurden 13 Bromotyrosinalkaloide und ein Phenolderivat isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Folgende Bromotyrosinalkaloide konnten in ihrer Struktur als Inhaltsstoffe dieses Schwammes aufgeklärt werden: Aerophobin-1, Aerophobin-2, Aplysinamisin-1, Aplysininamisin-2, Purealidin L, Aerothionin, 11-hydroxy-Aerothionin, 11-oxo-Aerothionin, Fistularin-3, 11,19-dideoxy-Fistularin-3, 2-(3,5-dibrom-4-methoxyphenyl)-Ethyl-trimethylammoniumchlorid und 7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-Azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat. Als einziges Nichtalkaloid wurde *p*-hydroxy-Benzoesäureethylester isoliert. Neben diesen bereits bekannten Naturstoffen konnte 14-oxo-Aerophobin-2 als neues Bromoisoxazolinalkaloid erstmals beschrieben werden. Von den 13 bereits bekannten Isolaten konnten bis auf das Bromoisoxazolinalkaloid Fistularin-3 alle übrigen erstmals für den Schwamm *Aplysina insularis* beschrieben werden.

Im Rahmen der HPLC-Untersuchungen der Schwammrohextrakte konnte für die Arten *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina archeri* und

Aiolochoxia crassa unter den gegebenen Bedingungen ein charakteristisches HPLC-Spektrum erarbeitet werden.

Am Beispiel des karibischen Schwamms *Aplysina cauliformis* wurde die induzierbare enzymatische Abwehrreaktion in Schwämmen der Gattung *Aplysina* näher untersucht. Dabei wurde auf Ergebnissen aufgebaut, die auf Arbeiten mit dem mediterranen Schwamm *Aplysina aerophoba* basieren. Da sich diese Abwehrreaktion aus zwei aufeinander folgenden Enzymreaktionen aufbaut wurden die beiden Enzyme in separaten Versuchen charakterisiert.

Für das in der Abwehrreaktion vorgeschaltete Isoxazolin-spaltende Enzym konnten mit einem Temperaturoptimum zwischen 50°C und 60°C und einem pH-Optimum zwischen pH 5.5 und pH 6.5 die Ergebnisse aus *Aplysina aerophoba* bestätigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine bemerkenswert hohe Substratspezifität des Isoxazolin-spaltenden Enzyms für natürliche Bromoisoxazolinalkaloide gezeigt werden. Darüber hinaus konnte der essentielle Charakter einzelner Strukturbestandteile des Bromoisoxazolinalkaloidgerüsts erarbeitet werden. Während das Spirocyclohexadienisoaxazolin-Ringsystem, die Säureamidseitenkette und die freie Hydroxylgruppe in Position 1 von essentieller Bedeutung für die Umsetzung sind, bedingt eine fehlende Bromierung des Substrats lediglich einen verminderten Umsatz. Als für die Reaktion irrelevant stellte sich dagegen der Charakter der Sauerstofffunktion in Position 3 heraus. Neben der bedeutenden Rolle von Wasserstoffatomen im Substrat bzw. im Enzym bei der Umsetzungsreaktion konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Reaktion des Isoxazolin-spaltenden Enzyms nicht von unspezifischen Amidasen als Spontanumsetzung durchgeführt wird. Bei der Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante ergab sich ein Wert von 10 mM, der doppelt so hoch ist wie der Wert vom Isoxazolin-spaltenden Enzym aus *Aplysina aerophoba*.

Bei der Untersuchung des zweiten Enzyms der Abwehrreaktion konnte erstmals gezeigt werden, daß es sich hierbei um eine Nitrilhydratase handelt. Nitrilhydratasen setzen Säurenitrile zu den korrespondierenden Säureamiden um, was im Fall des Abwehrenzylms aus *Aplysina cauliformis* einer Umsetzung von Aeroplysinin-1 zu Dienon entspricht. Das Enzym besitzt in einem pH-Bereich von pH 7.0 bis pH 7.5 seine optimalen Umsatzraten, während sein Stabilitätsoptimum bei pH 8 liegt. Als Temperaturoptimum konnte ein Temperaturbereich von 20°C und 30 °C ermittelt werden. Für die Michaelis-Menten-Konstante ergab sich ein Wert von 84 mM, der um das drei- bis zehnfache höher liegt als die in der Literatur beschriebenen Werte für Nitrilhydratasen. Untersuchungen zur Substratspezifität ergaben, daß im Vergleich mit acht synthetischen, nichtbromierten

aromatischen Säurenitrilen ausschließlich das natürliche Alkaloid Aeroplysinin-1 als Substrat umgesetzt wurde. Der Einfluß unterschiedlichster Substanzen auf die Umsatzrate der Nitrilhydratase ergab, daß im aktiven Zentrum des Enzyms mit großer Wahrscheinlichkeit schwefelhaltige Aminosäuren eine entscheidende Rolle bei der Umsetzung spielen, was sich mit den in der Literatur gemachten Angaben für Nitrilhydratasen deckt. Durch Versuche zum Reaktionsmechanismus konnte erstmals eine intramolekulare Sauerstoffumlagerung für eine Nitrilhydratase beschrieben werden, wodurch der Reaktionsmechanismus als nucleophile Reaktion postuliert werden konnte.

Summary

In the search for new drugs and leadstructures in pharmacy and plant protection marine natural products play a very important role due to their extraordinary chemical structures. Moreover they very often are the major part of the defense system of invertebrates in marine tropical coral reefs in the daily struggle for life. Therefore marine natural products give sight to the complicated relations among the different inhabitants in marine ecosystems. Especially benthic Invertebrates like sponges and ascidians in tropical coral reefs showed to be the major source for marine natural products.

The marine sponge genus *Aplysina* commonly occurring in the Caribbean and the Mediterranean sea had been focused under two different aspects. One aspect of the research based upon the isolation and structure elucidation of the bromotyrosine alkaloids of a chosen representative of the sponge genus while the other aspect of this research was to investigate und characterize the wound induced enzymatic bioconversion of bromoisoxazolin alkaloids in sponges of the genus *Aplysina*.

After the examination of 55 crude extracts of Caribbean sponges belonging to the families Aplysinidae (seven species with 49 specimen) and Aplysinellidae (one species with six specimen) by HPLC the sponge *Aplysina insularis* was chosen for isolating it's constituents. Following 13 bromotyrosine alkaloids and one phenolic compound were isolated: 14-oxo-aerophobin-2, aerophobin-1, aerophobin-2, aplysininamisin-1, aplysininamisin-2, purealidin L, aerothionin, 11-hydroxy-aerothionin, 11-oxo-aerothionin, fistularin-3, 11,19-dideoxy-fistularin-3, 2-(3,5-dibrom-4-methoxyphenyl)-ethyltrimethylammoniumchlorid, 7,9-dibrom-6-hydroxy-8-methoxy-1-oxa-2-azaspiro[4.5]deca-2,7,9-trien-3-carboxylat and the phenolic compound *p*-hydroxy-benzoic-acid. The new bromoisoxazolin alkaloid 14-oxo-aerophobin-2 has been described for the first time while the other 13 previously described constituents could be found for the first time in *Aplysina insularis* except for fistularin-3.

As a result of the HPLC-investigation of the sponge crude extracts characteristic HPLC-chromatograms could be elaborated for the species *Aplysina fistularis*, *Aplysina fulva*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina archeri* and *Aiolochroia crassa*.

The wound induced enzymatic bioconversion of bromoisoxazolin alkaloids in sponges of the genus *Aplysina* was investigated in the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*. Previous research results from the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* served as a platform

for this investigation. Both enzymes of *Aplysina cauliformis* being involved in this bioconversion were worked up and characterized in separate experiments due to their different characters. Of the two enzymes the isoxazolin-splitting enzyme was the starting enzyme that was followed by the second enzyme transferring the product of the isoxazolin-splitting enzyme, aeroplysinin-1, into dienone the end product of the bioconversion.

The isoxazolin-splitting enzyme showed maximum conversion rates between 50°C and 60°C and at a pH range from pH 5.5 to pH 6.5. These results confirmed the previously described data for *Aplysina aerophoba*. Investigation of the substrate specificity showed that the isoxazolin-splitting enzyme of *Aplysina cauliformis* belongs to a class of enzymes that possess a very high grade of specificity for its substrates. In this investigation the essential character of different structure elements of the bromoisoxazolin alkaloids for the enzymatic conversion could be pointed out. It could be elaborated that the three following structure elements are absolute essential for the substrate to be accepted and converted by the enzyme: the intact spiroisoxazolin moiety, the amide side chain and the unsubstituted free hydroxygroup in position 1. The grade of bromine substitution of the spiroisoxazolin moiety showed to be not this important since a lack of bromine atoms just caused a decreased bioconversion rate. As irrelevant for the acceptance of the substrate by the enzyme the character of the oxygen substituent in position 3 showed to have no influence on the reaction. Furthermore hydrogen atoms seemed to play a certain role in the enzymatic reaction, as well as this reaction wasn't caused by unspecific amidases as investigations with two of such enzymes showed. For the Michaelis-Menten-constant a value of 10 mM could be calculated which is twice as much as the one for *Aplysina aerophoba*.

Investigating the second enzyme its reaction could be proofed to be the result of an enzyme belonging to the class of nitrile hydratases. It was the first time that a classification of this enzyme could be achieved by identifying that the nitrile aeroplysinin-1 was converted into the amide dienone without giving a further reaction to the corresponding acid. In a pH range from pH 7.0 to pH 7.5 and a temperature range from 20°C to 30°C the nitril hydratase showed its maximum conversion rates, while it was most stable at a pH of 8. For the Michaelis-Menten-constant a value of 84 mM could be calculated which lies three to ten times higher than literature values of the so far known nitrile hydratases. In a comparative study with eight nonbrominated aromatic nitriles only the natural substrate aeroplysinin-1 showed the acceptance and conversion by the nitrile hydratase of *Aplysina cauliformis*. An experiment with different substances added to the *in-vitro*-assay showed that there must be sulfurcontaining amino acids within the binding site of the enzyme, which correlates to the data about the previously known nitrile hydratases. In addition it could be shown for the first

time that the mechanism of the enzymatic reaction bases on an intramolecular oxygen shift that is part of a nucleophilic mechanism of the enzymatic reaction.

5. Literaturverzeichnis

- Acosta A.L. und Rodriguez A.D. (1992), 11-oxo-aerothionin: a cytotoxic antitumor bromotyrosine-derived alkaloid from the Caribbean marine sponge *Aplysina lacunosa*.
J. Nat. Prod. **55**, 1007-1012.
- Aiello A., Albrizio S., Ciminiello P., Constantino V., Fattorusso E., Magno S., Magneni A., Menna M. und Pansini M. (1992),
Seventh International Symposium on Marine Natural Products, Capri, Italy 5 - 10 Juli 1992.
- Aiello A., Fattorusso E., Menna M., Pansini M. (1995), Chemistry of Verongida sponges-V. Brominated metabolites from the sponge *Pseudoceratina* sp.
Biochem. Syst. Ecol. **23**, 377-381
- Asano Y., Fujishiro K., Tani Y. und Yamada H. (1982), Aliphatic nitrile hydratase from *Arthrobacter* sp. J-1. Purification and characterisation.
Agric. Biol. Chem. **46**, 1165-1174
- Atkins G.L. und Nimmo I.A. (1980), Current trends in the estimation of Michaelis-Menten parameters.
Anal. Biochem. **104**, 1-9
- Bailey J.A. und Mansfield J.W. (1982), Phytoalexins.
Blackie, Glasgow
- Bakus G.J, Targett N.M. und Schulte B. (1986), Chemical ecology of marine organisms: an overview.
Chem. Ecol. **12**, 951-987
- Bakus G.J., Schulte B., Wright M., Green G. und Gomez P. (1990), Antibiotics and antifouling in marine sponges: laboratory versus field studies.
In: Perspectives in sponge biology (ed.)
Smithsonian Institution Press, Washington, 102-108

- Benharref A., Pais M., Debitus C. (1996), Bromotyrosine alkaloids from the sponge *Pseodoceratina verrucosa*.
J. Nat. Prod. **59**, 177-180
- Bergmann W. und Feeny R.J. (1951), Nucleosides of sponges. Discovery of the arabinose-based nucleosides - *Thetya crypta*
Org. Chem. **16**, 981-987
- Braekmann J.C. und Daloz D.(1986), Chemical defence in sponges.
Pure Appl. Chem. **58**, 357-364
- Branch G.M. (1984), Competition between marine organisms: ecological and evolutionary implications.
Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. **22**, 429-593
- Brennan B.A., Almus G., Nelson M., Durney L.T. und Scarrow R.C. (1996), Nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* J1 contains a non-corrin cobalt ion with two sulfur ligands.
Am. Chem. Soc. **118**, 9194-9195
- Burk D. (1984), Enzyme kinetic constants: the double reciprocal plot.
Trends Biochem. Sci. **9**, 202-204
- Carney J.R. und Rinehart K.L. (1995), Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*.
Nat. Prod. **58**, 971-985.
- Carpenter R.C. (1986), Partitioning herbivory and its effects on coral algal communities.
Ecol. Monogr. **56**, 345-365
- Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S. und Pansini M. (1994), Chemistry of Verongida sponges III. Constituents of a Caribbean *Verongula* sp..
J. Nat. Prod. **57**, 1564-1569.

- Ciminiello P., Fattorusso E., Magno S. und Pansini M. (1996), Chemistry of Verongida sponges VI. Comparison of the secondary metabolic composition of *Aplysina insularis* and *Aplysina fulva*.
Biochem Syst. Ecol. **24**, 105-113.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Pansini M. (1997), Chemistry of Verongida sponges, VIII. Bromocompounds from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*.
Tetrahedron **53**, 6565-6572
- Cimino G., De Rosa S., De Stefano S., Self R. und Sodano G. (1983), The bromo-compounds of the true sponge *Verongia aerophoba*.
Tetrahedron Lett. **24**, 3029-3032.
- Cimino G., De Rosa S. und De Stefano S. (1984a), Antiviral agents from a gorgonian: *Eunicella cavolini*. One previously found in *Cryptothetya crypta*.
Experientia **40**, 339-340
- Cimino G., Sodano G., Self R. und Fenwick R.G. (1984), Fast atom bombardment mass spectra of complex halogenated metabolites from *Verongia* sp. sponges.
Gazz. Chim. Ital. **114**, 533-538.
- Cohen P., Holmes C.F.B. und Tsukitani Y. (1990), Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation.
TIBS **15**, 98-102
- Cornish-Bowden A. (1979), Fundamentals of enzyme kinetics.
Butterworths, London
- Correa J.A. und Sanchez P.A. (1996), Ecological aspects of algal infectious diseases.
Hydrobiologia **326/327**, 89-96
- Cramp R.A. und Cowan D.A. (1999), Molecular characterisation of a novel thermophilic nitrile hydratase.
Biochimica et Biophysica Acta **1431**, 249-260

- De Silva E.D. und Scheuer P.J. (1980), Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis*.
Tetrahedron Lett. **21**, 1611-1614
- De Vries G.W., Amdahl L., Mobasser A., Wenzel M. und Wheeler L.A. (1988), Preferential inhibition of 5-lipoxygenase activity by manoalide.
Biochem. Pharmacol **37**, 2899-2905
- Dunlap W.C. und Chalker B.E. (1986), Identification and quantification of near-UV absorbing compounds (S-320) in a hermatypic scleractinian.
Coral Reefs **5**, 155-159
- Dunlap W.C., Chalker B.E. und Oliver J.K. (1986), Bathymetric adaptations of reef-building corals at Davies Reef, Great Barrier Reef, Australia, III. UV-B absorbing compounds.
Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **104**, 239-248
- Ebel R., Brenzinger M., Kunze A., Gross H.J. und Proksch P. (1997), Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*.
J. Chem. Ecol. **23**, 1451-1462.
- Ebel R. (1998), Wundinduzierte Biotransformation bromierter Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina*: Biochemische Charakterisierung und ökologische Bedeutung.
Dissertation, Universität Würzburg
- Endo T. und Wanatabe I. (1989), Nitril hydratase of *Rhodococcus* sp. N-774
FEBS Lett. **243**, 61-64
- Fattorusso E., Minale L., Sodano G., Moody K. und Thomson R.H. (1970), Aerothionin, a tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*.
J. Chem. Soc., Chem. Commun., 752-753.
- Faulkner D.J. (1995), Marine natural products.
Nat. Prod. Rep. **12**, 223-269
- Faulkner D.J. (1997), Marine natural products.
Nat. Prod. Rep. **14**, 259-302

- Fendert T., Wray V., van Soest R.W.M. und Proksch P. (1999), Bromoisoxazolin alkaloids from the caribbean sponge *Aplysina insularis*.
Z. Naturforsch. **54c**, 246-252
- Glaser K.B., De Carvalho M.S., Jacobs R.S., Kernan M.R. und Faulkner D.J. (1989), Manoalide: Structure-activity studies and definition of the pharmacophore for phospholipase A₂ inactivation.
Mol. Pharmacol. **36**, 782-788
- Gopichand Y. und Schmitz F.J. (1979), Marine natural products: fistularin-1,-2 and -3 from the sponge *Aplysina fistularis* forma *fulva*.
Tetrahedron Lett. **41**, 3921-3924.
- Harborne, J.B. (1993), Ecological biochemistry.
Academic Press, London, UK
- Harvell C.D., Fenical W. und Green C.H. (1988), Chemical and structural defenses of Caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.). I. development of an in situ feeding assay.
Marine Ecology Progress Series **49**, 287-294
- Harvall C.D. und Fenical W. (1989), Chemical and structural defenses of Caribbean gorgonians (*Pseudopterogorgia* spp.): Intracolony localization of defense.
Limnology and Oceanography **34**, 382-389
- Henderson P.J.F. (1978), Statistical analysis of enzyme kinetic data in Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry, B113.
Elsevier-North Holland, Amsterdam, 1-43
- Hjort C.M., Godtfredsen S.E. und Emborg C. (1990), Isolation and characterisation of a nitrile hydratase from a *Rhodococcus* sp.
J. Chem. Tech. Biotechnol. **48**, 217-226
- Holtzhauer M. (1988), Biochemische Labormethoden. Springer Verlag, Heidelberg

- Huang W., Jia J., Cummings J., Nelson M., Schneider G. und Lindequist Y. (1997), Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron center in a novel fold.
Structure **5**, 691-699
- Isihara H., Martin B.L., Brautigan B.L., Karaki H., Ozaki H., Kato Y., Fusetani N., Watabe S., Hashimoto K., Uemura D. und Hartshorne D.J. (1989), Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **159**, 871-877
- Jackson J.B.C. und Buss L. (1975), Allelopathic and spatiel competition among coral reef invertebrates.
Proc. Natl. Acad. Sci. **72**, 5160-5163
- Jayson G.C, Prendiville J.A., Crowther D., McGown A., Young P. und Scheid C.(1994), A phase I trial of bryostatin 1 in advanced cancer.
Ann. Oncol **5**, 138
- Jones D.A. (1988), Cyanogenesis in animal-plant interactions.
In: Cyanide compounds in biology (ed.), Evered D., Harnett D.,
John Wiley, Chichester
- Kernan M.R., Cambie R.C. und Bergquist P.R. (1990), Chemistry of sponges VII. 11,19-dideoxyfistularin-3 and 11-hydroxyaerotherionin, bromotyrosine derivatives from *Pseudoceratina durissima*.
J. Nat. Prod. **53**, 615-622.
- Kobayashi J., Horma K., Sasaki T. und Tsuda M. (1995), Puralidins J-R, new bromotyrosine alkaloids from the Okinawan marine sponge *Psamaplysilla purpurea*.
Chem. Pharm. Bull. **43**, 403-407.
- Kobayashi M., Nagasawa T. und Yamada H. (1992), Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over.
Trends Biotechnol. **10**, 402-408
- Kobayashi M. und Shimizu S. (1994), Versatile nitrilases: nitrile-hydrolyzing enzymes.
FEMS Microbial. Lett. **120**, 217-224

- Kobayashi M. und Shimizu S. (1998), Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology.
Nature Biotechnology **16**, 733-736
- Kobayashi M. und Shimizu S. (1999), Cobalt proteins.
Eur. J. Biochem. **261**, 1-9
- König G.M. und Wright A.D. (1997), Meeresorganismen - Produzenten pharmakologisch aktiver Sekundärstoffe.
Pharmazie in unserer Zeit **6**, 281-288
- Komeda H., Hori Y., Kobayashi M. und Shimizu S. (1996), Transcriptional regulation of the *Rhodococcus rhodochrous* J1 *nitA* gene encoding a nitrilase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 10572-10577
- Koulmann A., Proksch P., Ebel R., Beekmann A.C., van Uden W., Konings A.W.T., Pedersen J.W., Pras N. und Woerdenbag H.J. (1996), Cytotoxicity and mode of action of aeroplysinin-1 and a related dienone from the sponge *Verongia aerophoba*.
Nat. Prod. **59**, 591-594
- Kraft A.S. (1993), Bryostatin 1: Will the oceans provide a cancer cure?
J. Nat. Cancer Inst. **85**, 1790-1791
- Kreuter M.H., Bernd A., Holzmann H., Müller-Klieser W., Maidhof A., Weißmann N., Kljajic' Z., Batel R., Schröder H.C. und Müller W.E.G. (1989), Cytotoxic activity of aeroplysinin-1 against lymphoma and epithelioma cells.
Z. Naturforsch. **44c**, 680-688
- Lee H.J und Wilson I.B. (1971), Enzymic parameters: measurement of V and K_m .
Biochim. Biophys. Acta **242**, 519-522
- Lineweaver H. und Burk D. (1934), The determination of enzyme dissociation constants.
J. Amer. Chem. Soc. **56**, 659-666

- Maier-Greiner U.H., Obermaier-Skrobranek B.M.M., Estermaier L.M., Kammerloher W., Freund C., Wülfing C., Burkert U.I., Matern D.H., Breuer M., Eulitz M., Küfrevioglu I. und Hartmann G.R. (1991), Isolation and properties of a nitrile hydratase from the soil fungus *Myrothecium verrucaria* that is highly specific for the fertilizer cyanamide and cloning of its gene.
Proc. Natl. Acad. Sci. (Biochemistry) **88**, 4260-4264
- MarinLit (1998), A marine literature database maintained by the Marine Chemistry Group. University of Canterbury, Christchurch, New Zealand
- Maroun J.A., Stewart D.J., Verma S. und Eisenhauer E. (1989), Phase I study of didemnin B given on a weekly schedule.
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. **30**, 1130
- Mebis D. (1989), Gifte im Riff.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Minale L., Cimino G., De Stefano S. und Sodano G. (1976), Natural products from porifera.
Fortschritte d. Chem. Org. Naturst. **33**, 1-72.
- Mc Millan J.A., Paul I.C., Goo Y.M., Rinehart K.L., Krueger W.C. und Pschigoda L.M. (1981), An x-ray study of aerothionin from *Aplysina fistularis* (PALLAS).
Tetrahedron Lett. **22**, 39-42.
- Moody K. (1972), Aerothionin und homoaerothionin:two tetrabromo-spirohexadienyl isoxazoles from *Verongia* sponges.
C. S. Perkin, 18-24.
- Müller M.J. (1998), Radically novel prostaglandines in animals and plants: the isoprostanes.
Chemistry and Biology **5**, 323-333
- Munro M.H.G., Luidbrand R.T. und Blunt J.W. (1987), The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms.
In: Scheuer P.J. (ed.), Bioorganic marine chemistry **1**, 93-185
Springer Verlag, Berlin

- Munro M.H.G., Blunt J.W., Lake R.J., Litaudon M., Battershill C.N. und Page M.J.(1994),
from seabed to sickbed: What are the prospects?
In: van Soest R.W.M., van Kempen T.M.G. und Braekman J.C. (ed.), Sponges in
time and space, 473-484 Balkema, Rotterdam
- Mutschler E. (1996), Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie;
mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie.
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Nagamune T., Honda J., Cho W. D., Kamiya N., Teratani Y., Hirata A., Sasabe H. und Endo
(1991), Crystallization of a photosensitive nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-
771.
J. Mol. Biol. **220**, 221-222
- Nagasawa T., Ryuno K., Yamada H. (1986), Nitrile hydratase of *Brevibacterium* R312-
purification and characterisation-
Biochemical and Biophysical Research Communications **139**, 1305-1312
- Nagasawa T. und Yamada H. (1987a), Nitrile hydratase is a quinoprotein. A possible new
function of pyrroloquinoline quinone: Activation of H₂O in an enzymatic hydration
reaction.
Biochemical and Biophysical research communications **147**, 701-709
- Nagasawa T., Nanba H., Ryuno K., Takeuchi K. und Yamada H. (1987b), Nitrile hydratase of
Pseudomonas chlororaphis B23.
Eur. J. Biochem. **162**, 691-698
- Nagasawa T., Takeuchi K. und Yamada H. (1988), Occurrence of a cobalt-induced and
cobalt-containing nitrile hydratase in *Rhodococcus rhodochrous* J1.
Eur. J. Biochem. **196**, 581-589
- Nagasawa T. und Yamada H. (1989), Microbial transformation of nitriles.
Trends Biotechnol. **7**, 153-158

- Nagasawa T., Takeuchi K. und Yamada H. (1991), Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of *Rhodococcus rhodochrous* J1.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **155**, 1008-1016
- Nakamura H., Wu H., Kobayashi J., Nakamura Y., Ohizumi Y. und Hirata Y. (1985), Puralidin, a novel enzyme activator from the Okinawan marine sponge *Psamaplysilla purea*.
Tetrahedron Lett. **26**, 4517-4520
- Nelson M.J., Jin H., Turner Jr. I.M., Grove G., Scarrow. R.C., Brennan B.A. und Que Jr. L. (1991), A novel iron-sulfur center in nitrile hydratase from *Brevibacterium* sp.
J. Am. Chem. Soc. **113**, 7072-7073
- Newman R.A., Benvenute J.A., Raber M.N., Raybould T.J.G., Bignami G.S. und Esparza L. (1992), Phase II clinical and pharmacokinetic study of didemnin B in patients with metastatic breast cancer.
Ann. Oncol. **3**, 154
- Oswald R.C., Telford N., Seed R. und Happey-Wood C.M. (1984), The effect of encrusting bryozoans on the photosynthetic activity of *Fucus serrata*.
Estuary and Coastal Shelf Science **19**, 697-702
- Paul V.J. (1992), Chemical defenses of marine benthic invertebrates.
In: Ecological roles of marine natural products (ed.)
Comstock Publishing Associates, Ithaca, 164-188
- Pawlik J.R. (1993), Marine invertebrate chemical defenses.
Chem. Rev. **93**, 1911-1922
- Payne M.S., Wu S., Fallon R.D., Tudor G., Stieglitz B., Turner Jr.I.M. und Nelson M.J. (1997), A stereoselektive cobalt-containing nitrile hydratase.
Biochemistry **36**, 5447-5454
- Pharmazeutische Stoffliste (2000), 12. Auflage.
ABDATA Pharma-Daten-Service, Eschborn

- Porter J.W. und Targett N.M. (1988), Allelochemical interactions between sponges and corals.
Biol. Bull. **175**, 230-239
- Potts B.C.M. und Faulkner D.J. (1992), Phospholipase A₂ inhibitors from marine organisms.
J. Nat. Prod. **55**, 1701-1717
- Proksch P. und Ebel R. (1998), Ecological significance of alkaloids from marine invertebrates.
In: Plant alkaloids: biochemistry, ecology and medical applications (ed.). Roberts M.F., Wink M.,
Plenum Publishing Corporation, New York
- Pulitzer-Finali G. (1986), A collection of West Indian Demospongiae (Porifera). In appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the West Indies.
Am. Mus. civ., St. Nat. Genova. **86**, 65-218.
- Rehm H. (1997), Der Experimentator: Proteinbiochemie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Rinehart K.L., Gloer J.C., Cook J.C., Mizesak S.A. und Scahill T.A. (1981), Structures of the didemnins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate.
J. Am. Chem. Soc. **103**, 1857-1859
- Rodriguez A.D. und Pina I.C. (1993), The structure of Aplysinamines I, II and III: new bromotyrosine-derived alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina cauliformis*.
Nat. Prod. **56**, 907-914.
- Rote Liste 2000 (2000), Arzneimittelverzeichnis des BPI.
Editio Cantor Verlag, Aulendorf
- Sarin P.S., Sun D., Thornton A. und Müller W.E.G. (1987), Inhibition of replication of the etiologic agent of acquired immune deficiency syndrome (human T-lymphotrophic retrovirus/lymphaedenopathy-associated virus) by avarol and avarone.
J. Natl. Cancer Inst. **78**, 663-666

- Sarma A.S., Daum T. und Müller W.E.G. (1993), Secondary metabolites from marine sponges.
Ullstein Mosby, Berlin
- Schmitt T.M., Hay M.E. und Lindquist N. (1995), Constraints on chemically-mediated coevolution: multiple functions of seaweed secondary metabolites.
Ecology **6**, 107-123
- Schmitz F.J., Bowden B.F. und Toth S.I. (1993), Antitumor and cytotoxic compounds from marine organisms.
In: Attaway D.H. und Zaborsky O.R. (ed.), *Marine biotechnology., Volume 1, Pharmaceutical and bioactive natural products.,* 197-308
Plenum press, New York
- Schupp P.J. (2000), Structure elucidation, biological activity and ecology of secondary metabolites from micronesian marine invertebrates.
Dissertation, Universität Würzburg
- Schupp P.J. und Paul V.J. (1994), Calcification and secondary metabolites in tropical seaweeds: variable effects on herbivorous fishes.
Ecology **75**, 1172-1185
- Schupp P., Wray V., Eder C., Schneider P., Herderich M., Paul V. und Proksch P.(1999), Staurosporine derivatives from the ascidian *Eudistoma toetalensis* and its predatory flatworm *Pseudoceros* sp.
J. Nat. Prod. **62**, 959-962
- Segel I.H. (1975), *Enzyme kinetics.*
Wiley, New York
- Sharma G.M. und Burkholder P.R. (1967), Studies of antimicrobial substances of sponges I.
Antibiotics **A20**, 200-203.
- Sigma-Katalog, 1999

- Stoll V. und Blanchard J. (1990), Buffers: principles and practice.
Methods Enzymol. **182**, 24-38
- Suelter C.H. (1990), Experimentelle Enzymologie. Grundlagen der Laborpraxis.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- Sullivan B., Djura P., McIntyre D.E. und Faulkner D.J. (1981), Antimicrobial constituents of the sponge *Siphonodictyon coralliphagum*.
Tetrahedron **37**, 979-982
- Sullivan B., Faulkner D.J. und Webb L. (1983), Siphonodictidine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon* sp. that inhibits coral growth.
Science **221**, 1175-1176
- Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikuchi H., Van Engen D., Clardy J., Gopichand Y. und Schmitz F.J. (1981), Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*.
Am. Chem. Soc. **103**, 2469-2471
- Tardent P. (1993), Meeresbiologie: Eine Einführung.
Thieme Verlag, Stuttgart
- Taylor S.A., Upchurch C. und Schold C. (1994), Phase II clinical trial of didemnin B in patients with recurrent or residual malignant gliomas.
Ann Oncol. **5**, 142
- Teeyapant R. und Proksch P. (1993), Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba*-Evidence for an induced chemical defense?
Naturwissenschaften **80**, 369-370
- Teeyapant R., Woerdenbag H.J., Kreis P., Hacker J., Wray V., Witte L. und Proksch P. (1993), Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*.
Z. Naturforsch. **48c**, 939-945

- Teeyapant R. (1994), Brominated secondary metabolites of the marine sponge *Verongia aerophoba* Schmidt and the sponge feeding gastropod *Tyrodina perversa* Gmelin: Identification, biological activities and biotransformation.
Dissertation, Universität Würzburg
- Thacker R.W., Becerro M.A., Lumbang W.A. and Paul V.J. (1998), Allelopathic interactions between sponges on a tropical reef.
Ecology **79**, 1740-1750
- Thompson J.E. (1985), Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I Biological evidence.
Marine Biology **88**, 23-26
- Thompson J.E., Walker R.P. und Faulkner D.J. (1985), Screening and bioassays for biologically active substances from forty marine sponge species from San Diego, California, USA.
Marine Biology **88**, 11-21
- Tsujimura M., Odaka M., Nagashima S., Yohda M. und Endo I. (1996), Photoreactive nitrile hydratase: the photoreaction site is located on the α subunit.
J. Biochem. **119**, 407-413
- Tsujimura M., Dohmae N., Odaka M., Chijimatsu M., Takio K., Yohda M., Hoshino M., Nagashima S. und Endo I. (1997), Structure of the photoreactive iron center of the nitrile hydratase from *Rhodococcus* sp. N-771.
The Journal of Biological Chemistry **272**, 29454-29459
- Turon X., Becerro M.A. und Uriz M.J. (1996), Seasonal patterns of toxicity in benthic invertebrates: the encrusting sponge *Crambe crambe*.
Oikos **75**, 33-40
- Van Soest R.M.W. (1998), persönliche Mitteilungen

- Van Wangenen B.C., Larsen R., Cardellina J.H. II, Randazzo D., Lidert Z.C. und Swithenbank C. (1993), Ulosantin, a potent insecticide from the sponge *Ulosa ruetzleri*.
J. Org. Chem. **58**, 335-337
- Vollhardt K.P.C. und Schore N.E. (2000), Organische Chemie.
Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Walker R.P., Thompson J.E. und Faulkner D.J. (1985), Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. II. Chemical evidence.
Marine Biology **88**, 27-32
- Weinheimer A.J. und Spraggins R.L. (1969), The occurrence of two new prostaglandine derivatives (15-epi-PGA2 and its acetate and methylester) in the gorgonian *Plexaura homomalla*.
Tetrahedron Letters **15**, 5185-5188
- Weiss B. (1995), Inhaltsstoffe des Schwammes *Verongia aerophoba*: Untersuchungen zur Biotransformation und biologischen Aktivität.
Diplomarbeit, Universität Würzburg
- Weiss B., Ebel R., Elbrächter M., Kirchner M. und Proksch P. (1996), Defense metabolites from the marine sponge *Verongia aerophoba*.
Biochem. Syst. Ecol. **24**, 1-12
- Yamada H. und Kobayashi M. (1996), Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide.
Biosci. Biotech. Biochem. **60**, 1391-1400

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
AIDS:	Acquired Immunodeficiency Syndrome
Ara-A:	Arabinofuranosyladenin
BSA:	bovine serum albumin
CD:	Circular Dichroism
COSY:	Correlation Spectroscopy
d:	Dublett
DC:	Dünnschichtchromatographie
DEPT:	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
EuAB:	Europäisches Arzneibuch
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI:	Electrospray Ionization
<i>et al.</i> :	und andere
FAB:	Fast Atom Bombardment
HIV:	Human Immunodeficiency Virus
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPLC:	Hochleistungsflüssigchromatographie
ID:	Innendurchmesser
m:	Multiplett
MeOH:	Methanol
MS:	Massenspektrometrie
<i>m/z</i> :	Masse pro Ladung
NMR:	Kernresonanz
q:	Quartett
RP:	reversed phase
rpm:	Umdrehungen pro Minute
R_f :	Retentions Factor
RT:	Raumtemperatur
s:	Singulett
sdv:	Standardabweichung
t:	Triplett
Tab.:	Tabelle
TMS:	Tetramethylsilan
UV:	Ultraviolett
UV/Vis:	Ultraviolett/Visible

7. Publikationsliste

a) Veröffentlichungen

Fendert T., Wray V., van Soest R.W.M. und Proksch P. (1999), Bromoisoxazolin alkaloids from the Caribbean sponge *Aplysina insularis*.
Z. Naturforsch. 54c, 246-252

Golldenstein K., Fendert T., Proksch P. und Winterfeldt E. (2000), Enantioselektive preparation and enzymatic cleavage of spiroisoxazoline amides.
Tetrahedron 56, 4173-4185

Friedrich A.B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P. und Hentschel U. (1999), Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH).
Marine Biology 134, 461-470

Proksch P., Ebel R., Eder C., Fendert T. und Schupp P. (1997), Pharmacologically active natural products used in chemical defense of marine sponges and tunicates.
In Müller W.E.G. (Hrsg.): Modern aspects in monitoring of environmental pollution in the sea. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse Sitzungsberichte 8, Akademie Gemeinnütziger Wissenschaften, Erfurt.

b) Posterbeiträge

Fendert T., Wray V., van Soest R., Lohse M.J., Wiryowidago S., Moka W., Assmann M. und Proksch P. (1998), Isolation of the β -adrenergic receptor kinase inhibitors halenaquinone and xestoquinone from the Indopacific sponge *Xestospongia* sp.
9th International symposium on marine natural products, Townsville, Australia.

Fendert T., Frobenius W., Müller C. und Proksch P. (1997), Isolation of a new bromotyrosine-derivative from the marine sponge *Aplysina fistularis insularis* and benzodiazepine-receptor affinities of selected bromotyrosine-derivatives.
1st Euroconference on marine natural products, Athen, Griechenland.

Lebenslauf

Name: Thomas Fendert

geboren am : 10.11.1967 in Bad Brückenau

Adresse: Jahnstraße 6
97772 Wildflecken

Eltern: Edmund und Renate Fendert, geb. Schuhmann

Familienstand: ledig

Werdegang: Volksschule Wildflecken: September 1974 bis Juli 1979
Franz-Miltenberger-Gymnasium Bad Brückenau:
September 1979 bis Juni 1988
Juni 1988 Abitur

Wehrdienst: Grundwehrdienst von Juli 1988 bis September 1989 in Wildflecken

Hochschulstudium: November 1989 bis Oktober 1993: Studium der Pharmazie an der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Erstes Staatsexamen: September 1991

Zweites Staatsexamen: Oktober 1993

Famulatur: Kreuzberg-Apotheke, Wildflecken

Praktisches Jahr: Kurfürsten-Apotheke, München: November 1993 bis Oktober 1994

Drittes Staatsexamen: Dezember 1994

Approbation zum Apotheker am 09.12.1994

Kreuzberg-Apotheke, Wildflecken: Januar 1995 bis September 1995 als angestellter
Apotheker

seit Oktober 1995: Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft im Arbeitskreis von Prof.
Dr. Proksch am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der
bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg