

Bromierte Pyrrol–Alkaloide aus karibischen
Schwämmen der Gattung Agelas:
Isolierung, Strukturaufklärung
und chemische Ökologie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe–Universität
in Frankfurt am Main

von
Michael Assmann

aus Trier
Frankfurt am Main (2000)

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe–Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Engels
1. Gutachter: PD Dr. Matthias Köck
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Griesinger
Datum der Disputation: 22.12.2000

Für Ursula, Eduard und Bernd.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe–Universität in Frankfurt am Main im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger unter Leitung von Herrn PD Dr. Matthias Köck in der Zeit von Januar 1998 bis November 2000 angefertigt.

An erster Stelle möchte ich Herrn PD Dr. Matthias Köck für die Überlassung des interessanten Themas, sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie für zahlreiche Diskussionen danken. Er gewährte mir viele Freiheiten, meine eigenen Ideen zu verwirklichen, und ermöglichte mir durch internationale Zusammenarbeiten meinen Horizont über das Frankfurter Labor hinaus zu erweitern.

Herrn Prof. Dr. Christian Griesinger danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen in seinem Arbeitskreis.

Herrn Prof. Ph.D. Joseph R. Pawlik (Center for Marine Science Research, University of North Carolina at Wilmington, USA) möchte ich danken, daß er mir die Teilnahme an drei Forschungsexpeditionen in die Bahamas an Bord der *R/V Edwin Link* bzw. *R/V Seward Johnson* ermöglichte, die die Grundlage der vorliegenden Arbeit waren. Ich danke ihm für sein großes Interesse am Fortgang der Arbeit und für zahlreiche Diskussionen. Aus seiner Gruppe möchte ich mich bei Greg McFall, Sebastian Engel und Sarah R. Kelly für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung von Assays herzlich bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Dr. Rob W. M. van Soest (Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam, Nederland) für die freundliche Unterstützung bei der taxonomischen Beschreibung der untersuchten Schwämme und für zahlreichen Diskussionen.

Ellen Lichte bin ich für ihr herausragendes Engagement bei der Umsetzung und Durchführung von HPLC–Analysen zu großem Dank verpflichtet.

Dr. Jochen Junker danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft bei Fragen zum Apple und zu L^AT_EX.

Herrn Dr. Gottfried Zimmermann und seinem Team in der NMR-Spektroskopie danke ich für die Aufnahme von NMR-Spektren. Für die Aufnahme von ESI-MS-Spektren an der Universität Frankfurt danke ich Frau Ilona Prieß.

Herrn Prof. Ph.D. Sven Zea (INVEMAR, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Santa Marta, Colombia) und Dr. Holger Hoffmann (Pharmazeutisch-chemisches Institut der Universität Heidelberg) danke ich für die Überlassung von Fotoaufnahmen.

Meinen Laborkollegen Ellen Lichte, Elke Stirnal und Dr. Till Kühn danke ich für die angenehme Atmosphäre im *Sponges in Time and Space*-Labor und allen Mitarbeitern des Arbeitskreises Griesinger möchte ich für die stets gute Zusammenarbeit während der letzten drei Jahre danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Ursula, Eduard und Bernd bedanken, die mir während der letzten drei Jahre verständnisvoll und aufmunternd zur Seite standen.

Das Format der vorliegenden Dissertation ist kumulativ. Große Teile wurden bereits veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht. Aus diesem Grund wurde darauf verzichtet, die experimentellen Daten dieser Ergebnisse nochmalig in dieser Arbeit zu erwähnen. Kopien der Publikationen (**P**) und der eingereichten Manuskripte (**M**) sowie experimentelle Daten unveröffentlichter Verbindungen sind im Anhang bzw. im Kapitel 5 zu finden.

P1

Assmann, M., Lichte, E., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (1999). New bromopyrrole alkaloid from the marine sponge *Agelas wiedenmayeri*. *Org. Lett.* **1**, 455–457.

P2

Assmann, M., Lichte, E., Pawlik, J. R. & Köck, M. (2000). Chemical defense of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**, 255–262.

P3

Lindel, T., Hochgürtel, M., Assmann, M. & Köck, M. (2000). Synthesis of the marine natural product *N* α -(4-bromopyrrolyl-2-carbonyl)-*L*-homoarginine, a putative biogenetic precursor of the pyrrole-imidazole alkaloids. *J. Nat. Prod.* **63**, 1566–1569.

M1

Assmann, M., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (2000). Description of *Agelas cerebrum* new species and re-description of *Agelas dilatata*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* eingereicht.

M2

Assmann, M., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (2000). New antifeedant bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Stylissa caribica*. *J. Nat. Prod.* eingereicht.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Kenntnisstand	5
2.1	Was ist ein Schwamm?	5
2.2	Schwämme der Gattung <i>Agelas</i>	7
3	Ergebnisse und Diskussion	11
3.1	Isolierung und Strukturaufklärung	12
3.1.1	<i>Agelas wiedenmayeri</i>	12
3.1.2	<i>Agelas</i> sp. und <i>Stylissa caribica</i>	15
3.1.3	<i>Agelas sventres</i>	17
3.2	Qualitative und quantitative HPLC–Analysen	19
3.2.1	Qualitative HPLC–Analyse	19
3.2.2	Quantifizierung von Pyrrol–Alkaloiden in <i>Agelas</i> spp.	21
3.3	Chemoökologische Untersuchungen	24
3.3.1	Fischversuche	24
3.3.2	<i>bacterial attachment</i> –Assay	29
3.3.3	<i>overgrowth</i> –Assay	31
3.4	Taxonomische Untersuchungen	32
4	Zusammenfassung	33
5	Material und Methoden	35
5.1	Materialsammlung	35
5.2	Taxonomische Bestimmungen	37

5.3	Extraktion	40
5.4	Chromatographische Methoden	41
5.4.1	Dünnschicht-Chromatographie	41
5.4.2	Gelpermeations-Chromatographie	42
5.4.3	Umkehrphasen-Chromatographie	42
5.4.4	Hochleistungs-Flüssigchromatographie	43
5.5	Spektroskopische Methoden	44
5.6	Quantifizierung der Inhaltsstoffe in <i>Agelas</i> spp.	45
5.7	Chemoökologische Untersuchungen	46
5.7.1	Fischversuche	46
5.7.2	<i>bacterial attachment</i> -Assay	48
5.7.3	<i>overgrowth</i> -Assay	49
5.8	Synthesen	51
5.8.1	Synthese von Pyrrol-2-yltrichlormethylketon	51
5.8.2	Synthese von Pyrrol-2-carbonsäuremethylester	52
5.8.3	Synthese von 4-Brompyrrol-2-carbonsäuremethylester	53
5.8.4	Synthese von Pyrrol-2-carbonsäureethylester	55
5.8.5	Synthese von 4-Brompyrrol-2-carbonsäure	56
5.8.6	Synthese von $N\alpha$ -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)- <i>L</i> -homoarginin	59
5.8.7	Sakaguchi-Test	61
5.9	Isolierte Brompyrrol-Alkaloide	62
5.9.1	4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure	62
5.9.2	$N\alpha$ -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)- <i>L</i> -homoarginin	63
5.9.3	Hymenidin	64
5.9.4	Oroidin	65
5.9.5	Sventrin	66
5.9.6	Monobromsceptrin	67
5.9.7	Sceptrin	68
5.9.8	Bromsceptrin	69
5.9.9	Dibromsceptrin	70

5.9.10	Ageliferin	71
5.9.11	Bromageliferin	72
5.9.12	Dibromageliferin	73
5.9.13	Monobromphakellin	74
5.9.14	Dibromphakellin	75
5.9.15	Monobromisophakellin	76
5.9.16	Dibromisophakellin	77
5.9.17	<i>N</i> -Methyl-dibromisophakellin	78
6	Farbtafeln	79
7	Literatur	97
8	Anhang	105
A	<i>R/V Edwin Link</i>	107
B	<i>R/V Seward Johnson</i>	113
C	Publikationen	119
D	Eingereichte Manuskripte	139

Abkürzungen und Akronyme

br	<i>broad</i> (NMR)
CD	Circulardichroismus
CHCl ₃	Chloroform
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
g	Gramm
d	Dublett (NMR)
dd	Dublett eines Dublett (NMR)
dt	Dublett eines Triplets (NMR)
1D	eindimensional
2D	zweidimensional
DC	Dünnschicht–Chromatographie
DEPT	<i>Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>et al.</i>	und andere
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HMBC	<i>Hetero Multinuclear Bond Coherence</i>
HPLC	<i>High–Performance Liquid Chromatography</i>
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Hetero Single Quantum Coherence</i>
IR	Infrarot

L	Liter
m	<i>medium</i> (IR)
m	Meter
m	milli-
m	Multiplett (NMR)
min	Minute
MS	Massenspektrometrie
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
m/z	Masse pro Ladung
μ	mikro-
n	nano-
NBA	3-Nitrobenzylalkohol
NC	<i>natural concentration</i> (natürliche Konzentration)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NH ₃	Ammoniak
ppm	<i>parts per million</i>
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphase)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	<i>strong</i> (IR)
s	Singulett (NMR)
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
t	Triplett (NMR)
t_R	Retentionszeit
TFA	Trifluoressigsäure
UV	Ultraviolett
V	Volt
w	<i>weak</i> (IR)

1 Einleitung

Naturstoffe stellen trotz aller Fortschritte der synthetischen Chemie nach wie vor wichtige Ideengeber für die Entwicklung neuer Leitstrukturen im Arzneimittel- und Pflanzenschutzbereich dar. Während bisher vor allem höhere Pflanzen und Mikroorganismen aus dem terrestrischen Lebensraum als Naturstoffquellen dienten, konzentriert sich in den letzten Jahren die Suche nach neuen Wirkstoffen mit potentiellm Nutzen für den Menschen zunehmend auf Organismen aus den Weltmeeren, die immerhin 71% der Erdoberfläche bedecken. Insbesondere ist hier die Gruppe der marinen Invertebraten (z. B. Schwämme, Ascidien und Nacktschnecken) zu nennen, auf die sich das Interesse richtet, weil sie eine Fülle von biologisch aktiven Naturstoffen produzieren (Faulkner, 2000a, 2000b).

Der marine Lebensraum weist eine beeindruckende Artenvielfalt auf. Im gesamten marinen Benthos sind alle Stämme und im Hartbodenbenthos fast alle Stämme sowie die große Mehrheit der Klassen des Tierreiches vertreten (Sommer, 1998). Das Hartbodenbenthos hat zwar nicht die höchste Artenzahl aller tierischen Lebensgemeinschaften, aber die größte Vielfalt verschiedener Bauplantypen (Ott, 1996; Sommer, 1998). Neben der hohen Biodiversität zeichnen sich bestimmte marine Lebensräume, wie beispielsweise die Korallenriffe, durch eine sehr hohe Besiedlungsdichte aus, die im terrestrischen Lebensraum allenfalls im tropischen Regenwald erreicht wird (siehe Abbildung 1.1).

Die Artenzahl mariner Organismen (Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen) kann dagegen zum jetzigen Zeitpunkt nur geschätzt werden. Zu gering ist bisher die Kenntnis über die Formenfülle, insbesondere in tieferen Wasserschichten. Allein für die Gruppe der marinen Invertebraten, die besonders reichhaltige und strukturell diverse Naturstoff-

quellen darstellen, wird eine Artenzahl von mehr als 200.000 angenommen (Braekman *et al.*, 1986). Trotz der großen Zahl von Naturstoffen aus dem marinen Bereich sind ihre biologischen und ökologischen Funktionen noch weitgehend unerforscht, da bisher die chemische Ökologie terrestrischer Ökosysteme im Vordergrund stand (Mebs, 1989).



Abbildung 1.1: Raum ist im Korallenriff beschränkt, was stellenweise zu extrem hoher Besiedlungsdichte führt [Photos: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999].

Durch das begrenzte Raumangebot sind die in einem Korallenriff lebenden Organismen, wie zum Beispiel Schwämme, einem starken intra- und interspezifischen Konkurrenzdruck ausgesetzt. Viele Schwämme besitzen einen weichen Körper, wachsen trotz auffälliger Färbung exponiert und sind aufgrund ihrer sessilen Lebensweise nicht in der Lage, sich einem möglichen Fraßfeind durch Flucht zu entziehen. Schwämme, die über keinen physikalischen Schutz verfügen, haben möglicherweise alternative Überlebensstrategien, wie z. B. eine chemische Verteidigung, entwickelt (Paul, 1992a; Pawlik, 1993).

Die strukturelle Vielfalt und hohen Konzentrationen von Sekundärmetaboliten in marinen Schwämmen lassen vermuten, daß diese Verbindungen eine wichtige ökologische Funktion besitzen. Die allelopathische Interaktion zwischen Schwämmen und Korallen (Sullivan *et al.*, 1983; Porter & Targett, 1988), die Besiedlungshemmung von Fäulnisorganismen (Davis *et al.*, 1991; Pawlik, 1992; Henrikson & Pawlik, 1995, 1998), der Schutz vor Mikroorganismen oder schädigender UV-Strahlung (Paul, 1992a) sind

mögliche Funktionen im Kampf um Raum, Ansiedlungsfläche und letztendlich für das Überleben. Die allgemein wichtigste Theorie zur Funktion von Schwamm-Sekundärmetaboliten besagt, daß sie fraßhemmend auf potentielle Fraßfeinde wirken (Paul, 1992b; Pawlik, 1993).

Erst mit Hilfe moderner Tauchtechnik sowie die Etablierung ökologisch relevanter Freiland- und Laborexperimente zur Überprüfung dieser Hypothesen hat in den letzten Jahren zu einem sprunghaften Wissenszuwachs über die ökologische Funktion von Sekundärmetaboliten in Invertebraten geführt (Bakus *et al.*, 1986; Pawlik *et al.*, 1987; Becerro *et al.*, 1994; McClintock *et al.*, 1994; Pennings *et al.*, 1994; Hay, 1996). Dies mag eine Erklärung dafür sein, daß man sich bisher relativ wenig mit Fragen zur chemischen Ökologie eines so komplexen Lebensraumes wie des Korallenriffs beschäftigte und marine Naturstoffe bisher nur unter dem Blickwinkel ihrer potentiellen Anwendung in Pharmazie und Medizin betrachtet wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Isolierung und Strukturaufklärung neuer bromierter Pyrrol-Imidazol-Alkaloide aus karibischen Schwämmen der Gattung *Agelas* sowie Untersuchungen zu ihrer chemischen Ökologie. Das Schwammmaterial wurde im Rahmen von vier Forschungsreisen in den Florida Keys und Bahamas gesammelt.

Der erste Teil der Arbeit beschreibt die Isolierung und Identifizierung der Sekundärstoffe aus den Schwämmen. Hierbei wurden die Schwammextrakte mit Hilfe verschiedener chromatographischer Methoden aufgetrennt und die Strukturen der isolierten Substanzen mit Hilfe spektroskopischer Methoden (2D NMR, MS, IR, UV, CD) aufgeklärt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die intra- und interspezifische Variation der isolierten Naturstoffe mittels HPLC bestimmt sowie ihre ökologische Bedeutung für die Schwämme in einer Reihe von Assays studiert. Die chemoökologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Ph.D. Joseph R. Pawlik (Center for Marine Science Research, University of North Carolina at Wilmington, USA) durchgeführt.

2 Kenntnisstand

2.1 Was ist ein Schwamm?

Schwämme (Phylum Porifera) gehören zu den ältesten mehrzelligen Organismen. Bereits im Präkambrium vor 640 bis 700 Millionen Jahren gab es schwammähnliche Organismen (Fosså & Nilsen, 1996). Die heute lebenden Schwämme sind in allen aquatischen Lebensräumen verbreitet, von tropischen Seichtwasserhabitaten bis in die tiefsten Ozeangräben, sowie im Süßwasser aller Kontinente und der Antarktis (van Soest, 1996; Kunzmann, 1996). Schwämme sind als Invertebraten eine ausschließlich benthisch lebende, primitive Tiergruppe, die einen niedrigen Entwicklungsgrad der zellulären Organisation besitzen. Ihr relativ einfacher Körperbau unterscheidet sich von den übrigen Metazoenstämmen durch das Fehlen hochdifferenzierter Gewebe und Organe. Vereinfacht gesagt, bestehen Schwämme lediglich aus zusammenwirkenden, individuellen Zellen, wobei die einzelnen Zelltypen sehr spezielle Funktionen, wie Nahrungstransport zu allen Teilen des Körpers, Kollagen- und Skelettabscheidung, übernehmen (Brusca & Brusca, 1990).

Trotz des relativ einfachen Körperbaus ist ein Schwamm von einem vergleichsweise komplizierten System von Wasserkanälen perforiert, wobei das Wasser durch feine Poren (Ostia) an der Oberfläche einströmt (siehe Abbildung 2.1). Innerhalb des Schwammkörpers erzeugen spezialisierte Kragengeißelzellen (Choanocyten), die mit einem Flagellum ausgestattet sind, einen kontinuierlichen Wasserstrom. Da Schwämme als Filtratfresser leben, ist dieser Wasserstrom entscheidend für die Nahrungsaufnahme. Mit dem einströmenden Wasser werden Sauerstoff, Detritus in fein suspendierter Form und viele Bakterien aufgenommen, die einen wesentlichen Teil der Nahrung darstel-

len. Schließlich strömt das filtrierte Wasser sowie Abfallstoffe durch eine oder mehrere größere Öffnungen (Oscula) aus dem Schwamm wieder heraus.

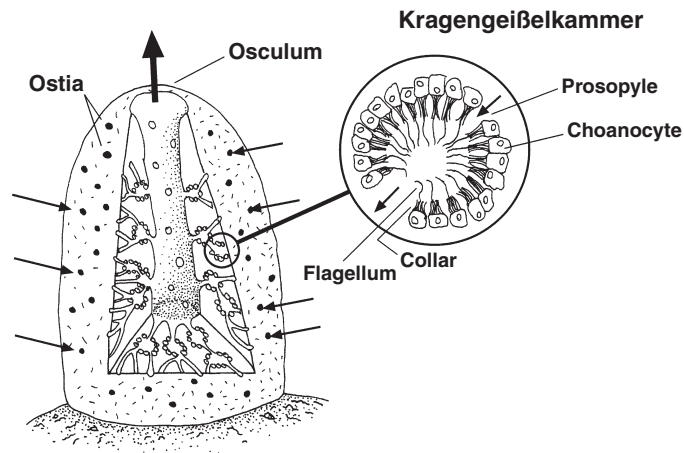


Abbildung 2.1: Kanalsystem-Organisation bei einem Schwamm mit Anschnitt, um die Anordnung der Kragengeißelkammern zu zeigen. Pfeile zeigen die Wasserströmung an (in Anlehnung an Kelly-Borges, 1997, verändert).

Wegen ihrer plastischen, oft inkrustierenden Wuchsform sind Schwämme meist nicht durch ihre äußere Morphologie zu bestimmen, sondern (nur) durch die Form ihres mineralischen Stützskeletts, welches meist aus diskreten Kiesel- oder Kalkelementen (Spicula, auch Skleren oder Nadeln genannt) besteht (van Soest, 1996). Bei der Klasse Calcarea (Kalkschwämme) bestehen diese aus Kalk in Form des Calcits (CaCO_3), bei der Klasse Hexactinellida (Glasschwämme) bestehen sie aus SiO_2 , bei den Demospongiae (Hornschwämme) werden die SiO_2 -Nadeln durch ein Gerüst aus Spongin, einem hornartigen Protein, ergänzt oder ersetzt (Brusca & Brusca, 1990).

Bis heute sind weltweit über 8000 verschiedene marine Schwammarten beschrieben, von denen die meisten der Klasse der Demospongiae angehören (van Soest, 1994). Die tatsächliche Artenzahl wird als etwa zweimal so hoch eingeschätzt (Hooper & Lévi, 1994). Insgesamt leben nur sehr wenige Arten im Süßwasser, die weltweite Artenzahl an Süßwasserschwämmen wird auf höchstens 300 geschätzt (Frost, 1991); in diese Zahl sind die noch zu entdeckenden Arten mit eingeschlossen.

2.2 Schwämme der Gattung *Agelas*

Schwämme der Gattung *Agelas* gehören zur Klasse der Demospongiae. Morphologisch sind sie durch ein Gerüst aus Spongin gekennzeichnet, in dem die für die Art charakteristischen Acanthostyle-Nadeln eingelagert sind (siehe Abbildung 2.2).

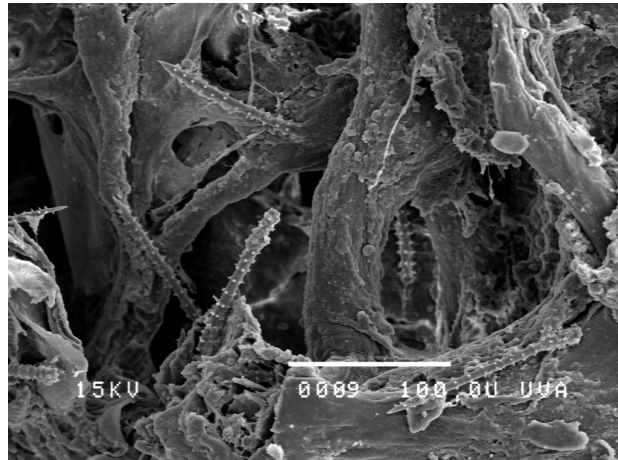


Abbildung 2.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Spongin-Fasern aus *Agelas cerebrum* mit den für *Agelas*-Schwämmen typischen Acanthostyle-Nadeln [Photo: M. Assmann].

Agelas-Schwämme zählen zu den weitverbreitetsten und dominierenden Arten in Lebensgemeinschaften karibischer Riffe. Bis heute sind 21 Arten aus der Karibik beschrieben, von denen zumindest 13 als richtig angesehen werden können (Assmann *et al.*, 2000b). Verglichen mit anderen Regionen auf der Welt ist die Diversität von *Agelas*-Schwämmen in der Karibik ungewöhnlich hoch. Während für den gesamten Indo-Pazifik zwölf nominale Arten beschrieben wurden, von denen vermutlich acht echte Arten sind, ist aus dem Mittelmeer nur eine Art, *Agelas oroides*, bekannt. Obwohl die Gattung aufgrund der charakteristischen Acanthostyle-Nadeln mikroskopisch einfach bestimmt werden kann, gestaltet sich die systematische Erfassung von *Agelas*-Schwämmen wegen der fehlenden Übereinstimmung von makroskopischen (Wuchsform, Oberflächenbeschaffenheit und Farben) und mikroskopischen Merkmalen (Anordnung der Spongin-Fasern und Nadeln sowie Größe und Aussehen der Nadeln) bis zur Art problematisch. Nicht zuletzt deswegen sind die Ergebnisse chemotaxonomischer Unter-

suchungen ein weiteres wichtiges Kriterium zur Klassifizierung dieser Gattung (Braekman *et al.*, 1992).

Die Chemie der *Agelas*-Schwämme ist sehr charakteristisch und wird von bromierten Pyrrol-2-carbonsäure-Derivaten dominiert. Anfang der siebziger Jahre wurden die Stammverbindungen 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure und Oroidin aus dem Mittelmeer stammenden Schwamm *Agelas oroides* isoliert (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973) (siehe Abbildung 2.3).

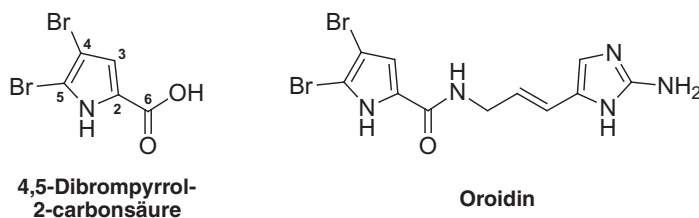


Abbildung 2.3: Stammverbindungen der Pyrrol-Imidazol-Alkaloide.

Betrachtet man die taxonomisch eng verwandten Familien Agelasidae und Axinellidae, so sind bisher mehr als 50 Vertreter der Pyrrol-Imidazol-Alkaloide beschrieben. Dabei handelt es sich überwiegend um intra- und intermolekulare Cyclisierungsprodukte des Oroidins, dem bekanntesten Vertreter mariner Pyrrol-Imidazol-Alkaloide. In Abbildung 2.4 sind exemplarisch einige Cyclisierungsprodukte des Oroidins gezeigt. Die Pyrrol-Imidazol-Alkaloide unterscheiden sich nicht nur durch die Modifikation, Cyclisierung sowie Dimerisierung des Oroidin-Gerüsts, sondern auch durch unterschiedliche pharmakologische Aktivitäten. So wurden z. B. Verbindungen mit cytotoxischen (Agelastatin A, D'Ambrosio *et al.*, 1993), antimikrobiellen (Sceptrin, Walker *et al.*, 1981) und fäulnishemmenden (Mauritiamin, Tsukamoto *et al.*, 1996) Eigenschaften isoliert.

Trotz der strukturellen Vielfalt der bromierten Pyrrol-Imidazol-Alkaloide haben erst wenige Arbeiten die ökologischen Funktion dieser Substanzklasse näher untersucht. Aufgrund ihrer Sessilität sowie ihre oft auffällige Färbung sind Schwämme ideale Beuteobjekten etwa für räuberische Fische. Trotzdem gehören Schwämme zu den Organismen, die nur wenige natürliche Feinde besitzen. So wiesen von 212 untersuchten Arten westindischer Riffische lediglich elf Arten einen Anteil von Schwämmen in ihrem Verdauungstrakt auf, der 6% oder mehr von der gesamten aufgenommenen Nahrung

betrug (Randall & Hartman, 1968). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese formuliert, daß Schwämme vermutlich über effektive physikalische und chemische Abwehrmechanismen gegenüber potentiellen Fraßfeinden verfügen.

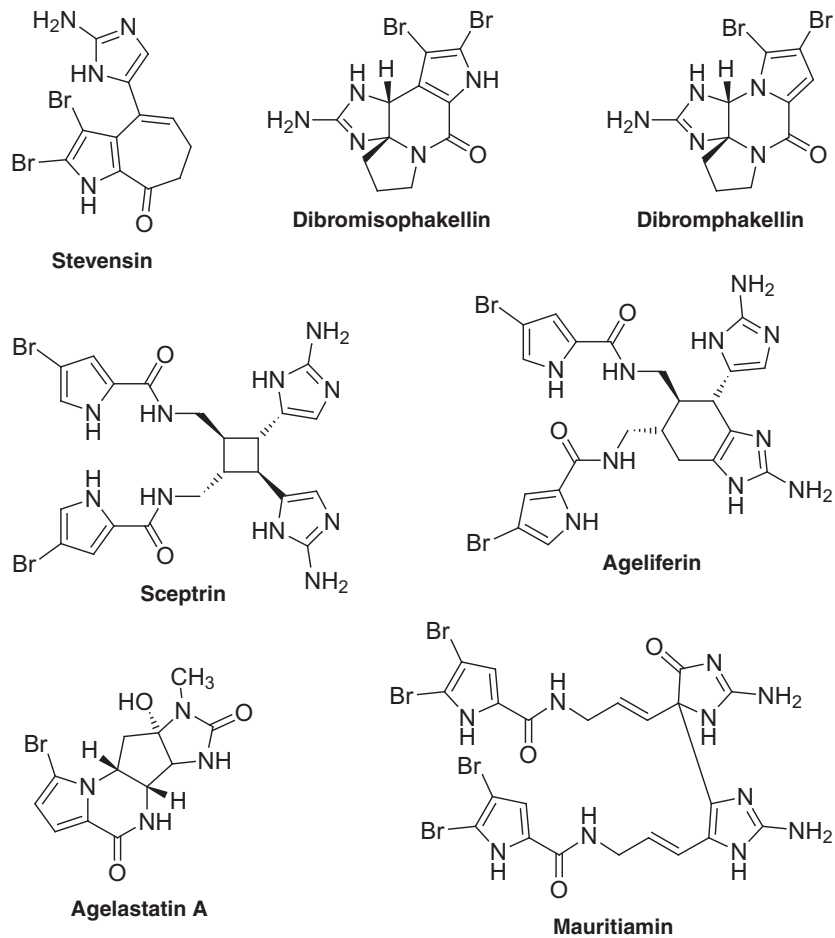


Abbildung 2.4: Ausgewählte Beispiele verschiedener Cyclisierungsprodukte des Oroidins.

Um das Vorliegen einer chemischen Abwehrstrategie zu überprüfen, untersuchten 1995 Pawlik *et al.* Rohextrakte von 71 verschiedenen Schwammarten der Klasse Demospongiae aus der Karibik hinsichtlich ihrer fraßabschreckenden Wirkung. Dabei zeigte sich in Aquariumversuchen, daß neben Schwämmen der Gattung *Aplysina* alle untersuchten Arten der Gattung *Agelas* stark fraßabschreckend gegenüber dem Fisch *Thalassoma bifasciatum* sind. In weiteren Studien konnte gezeigt werden, daß für Schwämme der Klasse Demospongiae Spongin und Kieselsäurenadeln zum Schutz vor Angriffen keine Rolle spielen (Chanas & Pawlik, 1995, 1996). Für *Agelas clathroides* wurden wenig

später 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure und Oroidin als die für die Fraßabschreckung verantwortlichen Sekundärmetaboliten in Aquarium- und Freilandversuchen identifiziert (Chanas *et al.*, 1996). Als weitere Vertreter aus der Reihe der bromierten Pyrrol-Imidazol-Alkaloide wurde vor kurzem Stevensin, welches bereits 1985 von Albizati & Faulkner aus einem nicht identifizierten Schwamm isoliert wurde, für den Schwamm *Axinella corrugata* als alleinverantwortlicher Sekundärmetabolit mit fraßabschreckender Eigenschaft nachgewiesen (Wilson *et al.*, 1999). Lindel *et al.* konnten in einer ersten systematischen Untersuchung von synthetischen Pyrrol-Imidazol-Alkaloide zeigen, daß der Pyrrol-Teil entscheidend für die Fraßhemmung ist und die Imidazol-Gruppe die Aktivität verstärkt (Lindel *et al.*, 2000a).

3 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zur Isolierung, Strukturaufklärung und chemischen Ökologie bromierter Pyrrol–Imidazol–Alkaloide aus karibischen Schwämmen der Gattungen *Agelas* und *Stylissa* und deren taxonomischen Klassifikation sind in den Publikationen **P1**, **P2**, **P3** und dem eingereichten Manuskript **M2** beschrieben und im Anhang aufgeführt. Ein weiteres Manuskript **M1** beschäftigt sich ausschließlich mit der taxonomischen Beschreibung zweier Schwämme und ist ebenfalls im Anhang enthalten. Im Kapitel 6 werden Photos zu den bearbeiteten Schwämmen als Farbtafeln gezeigt. Analytische und spektroskopische Daten zur Charakterisierung sind für alle isolierten Naturstoffe in Kapitel 5.9 aufgelistet. Ergänzend hierzu werden im Folgenden Ergebnisse vorgestellt und diskutiert, die nicht in den Publikationen und Manuskripten enthalten sind.

Zu Beginn werden Ergebnisse von der Isolierung und Strukturaufklärung von Sekundärmetaboliten aus den Schwämmen *Agelas wiedenmayeri*, *Agelas* sp., *Stylissa caribica* und *Agelas sventres* präsentiert. Anschließend werden Ergebnisse zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Sekundärmetaboliten in 125 *Agelas*–Schwämmen vorgestellt und die intra– und interspezifische Variation der isolierten Naturstoffe diskutiert. Die ökologische Funktion der bromierten Pyrrol–Imidazol–Alkaloide wurde in einer Reihe von Assays näher untersucht. Ausgewählte Ergebnisse dieser Assays zur fraßabschreckenden Wirkung gegenüber Fischen und zur antibakteriellen und wachstumshemmenden Bioaktivität werden vorgestellt und diskutiert. Ergebnisse zur taxonomischen Klassifizierung der im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten Schwämme schließen das Kapitel ab.

3.1 Isolierung und Strukturaufklärung

3.1.1 *Agelas wiedenmayeri*

Aus dem Dichlormethan/Methanol-Extrakt einer Probe von *Agelas wiedenmayeri*, die im Mai 1998 bei North Dry Rocks, Florida Keys, USA, gesammelt wurde, konnten die bekannten Brompyrrol-Alkaloide 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure, Oroidin und Bromageliferin als Hauptmetaboliten isoliert werden (Abbildung 3.1).

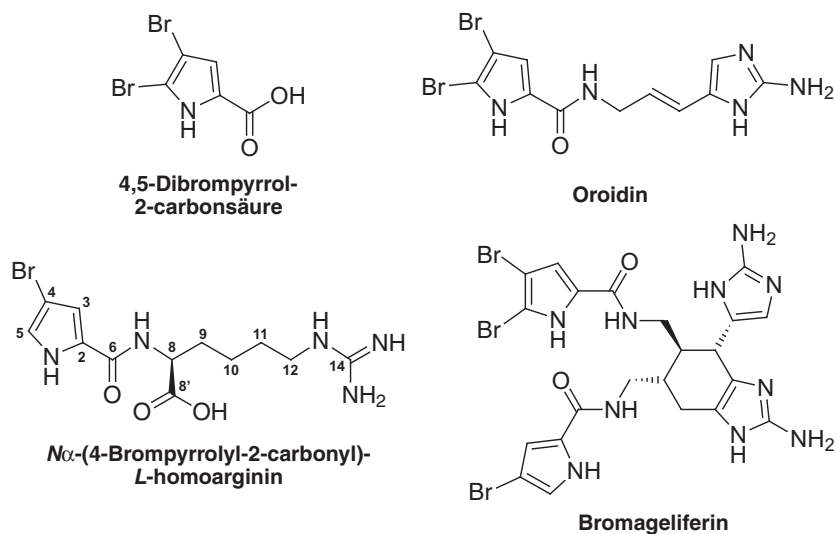


Abbildung 3.1: Bromierte Pyrrol-Alkaloide isoliert aus *Agelas wiedenmayeri*.

Die Strukturen wurden durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten aufgeklärt (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973; Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998). Daneben gelang es, eine in der Literatur bisher noch nicht beschriebene Verbindung, N α -(4-Bromopyrrolyl-2-carbonyl)-L-homoarginin, in einer Ausbeute von 5 mg zu isolieren (0.005% des Trockengewichts). Die Konstitutionsaufklärung mittels HRFAB-Massenspektrometrie, IR-, UV- sowie 1D und 2D NMR-Spektroskopie ist detailliert in Publikation **P3** beschrieben (Assmann *et al.*, 1999). Das Vorliegen einer Guanidin-Gruppe als charakteristisches Strukturmerkmal wurde durch die chemische Verschiebung von C-14 (156.6 ppm) und eine positive Farbreaktion im durchgeführten Sakaguchi-Test bestätigt. Der Sakaguchi-Test ist eine selektive Nachweisreaktion für

Guanidin-Derivate (Auterhoff & Kovar, 1977) (siehe Kapitel 5.8.7). Mit $N\alpha$ -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)- L -homoarginin bildete sich ein hellrosa gefärbter Niederschlag, der nach kurzer Zeit violett wurde.

Die absolute Konfiguration der neuen Verbindung ließ sich zunächst nicht bestimmen, da die Messung der optischen Aktivität, die in einer Mikroküvette (Schichtdicke 100 mm; Volumen 1 mL) durchgeführt wurde, bei allen Wellenlängen (Hg-Hochdrucklampe: 365 nm, 435 nm, 546 nm, 578 nm; Na-Spektrallampe: 589 nm) einen Drehwert von $[\alpha]_D^{20} 0^\circ$ ($c = 0.5275$ g/100 mL in H_2O) ergab, und somit auf das Vorliegen eines Racemats hindeutete. Eine weitere Ursache für dieses Ergebnis ist möglicherweise die Tatsache, daß nur wenig Substanz zur Messung eingesetzt werden konnte. Allerdings stand keine Kurzweg-Mikroküvette (Schichtdicke 10 mm; Volumen 0.1 mL) zur Verfügung, um der geringen Probenmenge Rechnung zu tragen. Aus diesen Gründen wurde zur Bestimmung der absoluten Konfiguration die Verbindung mittels Festphasen-Synthese an einem 2-Chlortritylchlorid-Polystyrol-Harz, ausgehend von (Fmoc/Pmc)-geschütztem L -Homoarginin, synthetisiert. Die Reaktionsführung und Analytik ist ausführlich in Publikation **P3** beschrieben. Der Naturstoff sowie die synthetische L -Verbindung wurden anschließend CD-spektroskopisch untersucht. Die CD-Spektren für beide Verbindungen sind in Abbildung 3.2 gezeigt.

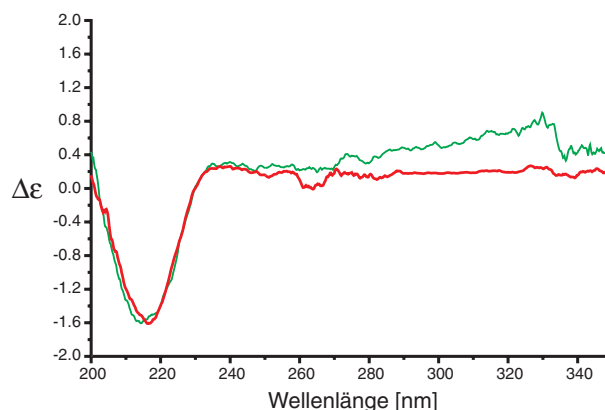


Abbildung 3.2: CD-Spektren von $N\alpha$ -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)- L -homoarginin. Naturstoff (grün): CD (H_2O): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 214 nm (-1.605), ($c = 7.9$ $\mu\text{mol/L}$); Syntheseprodukt (rot): CD (H_2O): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 216 nm (-1.61), ($c = 26$ $\mu\text{mol/L}$).

Aufgrund der negativen Cotton Effekte bei 216 nm ($\Delta\epsilon = -1.61$) für das synthetische *L*-Produkt und bei 214 nm ($\Delta\epsilon = -1.605$) für den Naturstoff konnte gezeigt werden, daß kein Racemat isoliert wurde. Die absolute Konfiguration von *N* α -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)-*L*-homoarginin wurde als *L* bestimmt.

3.1.2 *Agelas* sp. und *Stylissa caribica*

Während der Pawlik-Expedition 1998 wurden vor Sweetings Cay 560 mL Volumen Gewebeprobe von einem unbekanntem Schwamm, *Agelas* sp., in einer Tiefe von 15–18 m gesammelt. Nach dem Gefriertrocknen wurde das Schwammgewebe (102 g) der in Kapitel 5.3 beschriebenen Extraktionsprozedur unterzogen und eine *n*-Butanol-Phase (5.9 g) erhalten, deren HPLC-Profil in Abbildung 3.3 gezeigt ist.

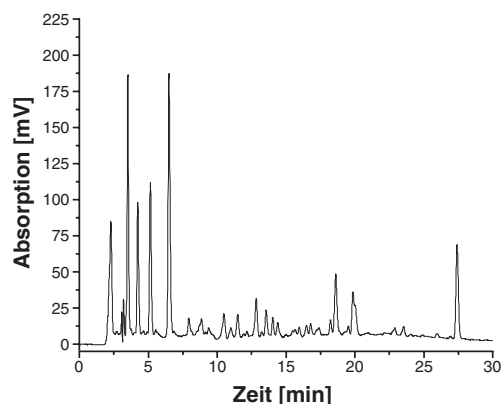


Abbildung 3.3: HPLC-Profil des Rohextraktes von *Agelas* sp. (Säule: Kromasil RP18, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$; Gradient: 20–50% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 30 min; Flußrate: 1 mL/min): Monobromisophakellin $t_R = 3.52$ min, Monobromphakellin $t_R = 4.23$ min, Dibromisophakellin $t_R = 5.15$ min, Dibromphakellin $t_R = 6.50$ min.

Die gelchromatographische Auftrennung der *n*-Butanol-Phase mit Sephadex® LH-20 lieferte insgesamt 18 Fraktionen. Die Fraktionen #4 (805 mg) und #5 (560 mg) enthielten die Hauptsekundärmetaboliten, die anschließend mittels präparativer HPLC gereinigt wurden. Dabei wurden folgende Trennbedingungen gewählt:

- Säule: Kromasil RP18, 16×250 mm + Vorsäule, $7 \mu\text{m}$
- Gradient: 5 min 5% MeCN/H₂O + 0.1% TFA – 35 min 30% MeCN/H₂O + 0.1% TFA
- Flußrate: 10 mL/min

Insgesamt wurden vier verschiedene bromierte Pyrrol-Alkaloide vom Phakellin-Strukturtyp isoliert, die bereits bekannten Alkaloide Monobromphakellin, Dibromphakellin (beide isoliert aus *Phakellia flabellata*, Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977) und Dibromisophakellin (isoliert aus *Acanthella carteri*, Fedoreyev *et al.*, 1986) sowie die neue Verbindung Monobromisophakellin (siehe Abbildung

3.4). Aus der Fraktion #4 konnten 35 mg Monobromphakellin [MS (ESI negativ): m/z (%) = 308 (100), 310 (99); HRMS(FAB positiv, NBA): m/z 310.0292 (berechnet für $C_{11}H_{13}N_5OBr$ 310.0303, Δ -1.1 mmu)] sowie 148 mg Dibromphakellin [MS (ESI negativ): m/z (%) = 386 (50), 388 (100), 390 (51); HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 387.9417 (berechnet für $C_{11}H_{12}N_5OBr_2$ 387.9408, Δ $+0.9$ mmu)] isoliert werden. Fraktion #5 enthielt 86 mg Monobromisophakellin [MS (ESI negativ): m/z (%) = 308 (27), 310 (28); HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 310.0290 (berechnet für $C_{11}H_{13}N_5OBr$ 310.0303, Δ -1.3 mmu)] und 28 mg Dibromisophakellin [MS (ESI negativ): m/z (%) = 386 (17), 388 (35), 390 (17); HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 387.9399 (berechnet für $C_{11}H_{12}N_5OBr_2$ 387.9408, Δ -0.9 mmu)].

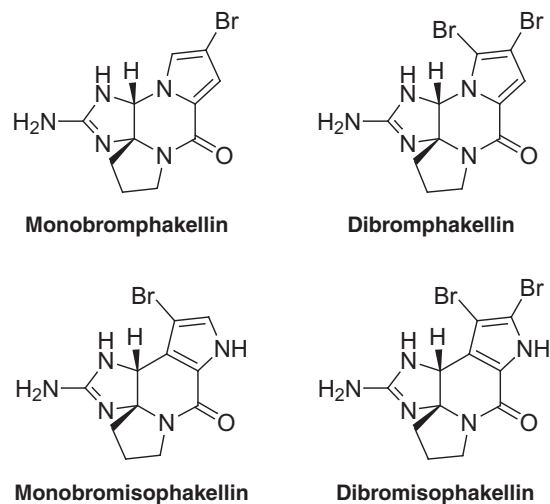


Abbildung 3.4: Bromierte Pyrrol-Alkaloide isoliert aus *Agelas* sp.

Die Strukturen wurden durch Vergleich der massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Daten mit literaturbekannten MS- und NMR-Daten bestimmt (Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977; De Nanteuil *et al.*, 1985; Fedoreyev *et al.*, 1986).

Pyrrol-Imidazol-Alkaloide dieses Cyclisierungsmusters konnten im Rahmen der vorliegenden Dissertation auch aus dem Schwamm *Stylissa caribica* isoliert werden. Der Hauptmetabolit dieses Schwamms ist *N*-Methyl-dibromisophakellin. Die Strukturaufklärung sowie Ergebnisse zur chemischen Ökologie dieser Verbindung sind im Manuskript **M2** beschrieben.

3.1.3 *Agelas sventres*

Während der Pawlik-Expedition 2000 wurde südlich von Bimini bei North Cat Cay in 18 m Tiefe eine Probe des Schwamms *Agelas sventres* gesammelt. Die taxonomische Identifizierung erfolgte noch an Bord der *R/V Seward Johnson* durch Prof. Ph.D. Sven Zea (INVEMAR, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Santa Marta, Colombia). Nach dem Gefriertrocknen wurde das Schwammgewebe (93.5 g) der in Kapitel 5.3 beschriebenen Extraktionsprozedur unterzogen und eine *n*-Butanol-Phase (4.32 g) erhalten, deren HPLC-Profil in Abbildung 3.5 gezeigt ist.

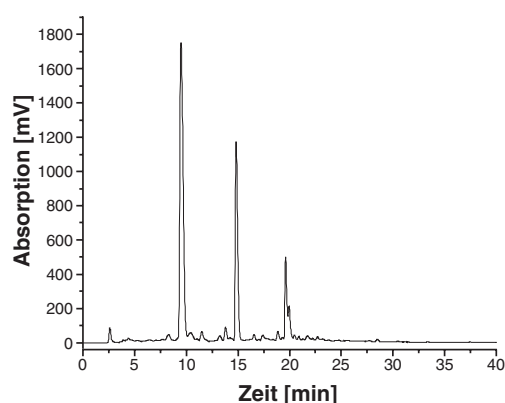


Abbildung 3.5: HPLC-Profil der *n*-Butanol-Phase von *Agelas sventres* (Säule: Kromasil RP18, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): Hymenidin $t_R = 9.49$ min, Oroidin $t_R = 14.81$ min, Sventrin $t_R = 19.61$ min, 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure $t_R = 19.96$ min.

Die gelchromatographische Auftrennung der *n*-Butanol-Phase mit Sephadex® LH-20 lieferte insgesamt 23 Fraktionen. Die Fraktionen #6 (220 mg) und #8 (730 mg) wurden näher untersucht und mittels präparativer HPLC unter folgenden Bedingungen gereinigt:

- Säule: Kromasil RP18, 16×250 mm + Vorsäule, $7 \mu\text{m}$
- Gradient: 5 min 10% MeCN/H₂O + 0.1% TFA – 35 min 35% MeCN/H₂O + 0.1% TFA
- Flußrate: 10 mL/min

Aus Fraktion #6 wurden 41 mg des bislang unbekanntes Pyrrol-Alkaloids Sventrin isoliert [MS (ESI negativ): m/z (%) = 400 (11), 402 (21), 404 (11)]. Sventrin ist ein

Oroidin-Derivat, welches am Pyrrol-Stickstoff zusätzlich eine Methyl-Gruppe trägt, zeigt aber ansonsten den identischen strukturellen Aufbau wie Oroidin (siehe Abbildung 3.6). Aus Fraktion #8 wurden die beiden bekannten Verbindungen Hymenidin (295 mg) [MS (ESI negativ): m/z (%) = 308 (27), 310 (27)] und Oroidin (285 mg) [MS (ESI negativ): m/z (%) = 386 (13), 388 (26), 390 (13)] isoliert. Hymenidin wurde erstmals von Kobayashi *et al.* im Jahr 1986 aus dem Schwamm *Hymeniacidon* sp. beschrieben. Oroidin und die in Fraktion #15 mittels HPLC qualitativ nachgewiesene 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure wurden bereits Anfang der siebziger Jahre aus dem Mittelmeer-Schwamm *Agelas oroides* isoliert (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973).

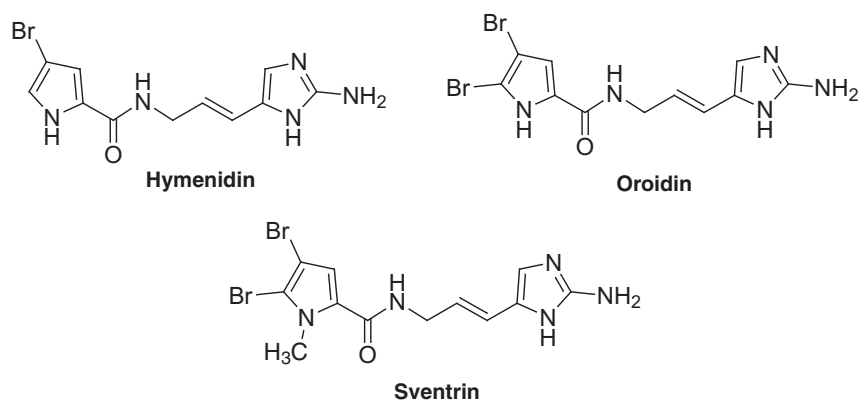


Abbildung 3.6: Isolierte Brompyrrol-Alkaloide aus *Agelas sventres*.

Die Strukturen der isolierten Brompyrrol-Alkaloide wurden durch Vergleich der massenspektrometrischen und NMR-spektroskopischen Daten mit literaturbekannten MS- und NMR-Daten aufgeklärt (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973; Kobayashi *et al.*, 1986, 1990; Olofson *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu den im nächsten Kapitel diskutierten Schwämmen ist in *Agelas sventres* neben Oroidin Hymenidin der Hauptmetabolit, während 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure nur in geringen Spuren im Schwammgewebe der untersuchten Probe enthalten ist.

3.2 Qualitative und quantitative HPLC–Analysen

Insgesamt wurden die Dichlormethan/Methanol–Rohextrakte von 125 Schwämme der Gattung *Agelas* mittels HPLC qualitativ untersucht und die Hauptsekundärmetaboliten quantitativ bestimmt. Die Gesamtzahl der untersuchten Rohextrakte verteilt sich wie folgt: *Agelas cerebrum* (12), *Agelas cervicornis* (15), *Agelas clathrodes* (24), *Agelas conifera* (24), *Agelas dilatata* (11), *Agelas dispar* (27), *Agelas sceptrum* (3), *Agelas* sp. (4) und *Agelas wiedenmayeri* (5).

3.2.1 Qualitative HPLC–Analyse

Bei der qualitativen HPLC–Analyse von Dichlormethan/Methanol–Rohextrakten zeigten sich drei charakteristische HPLC–Profile, die im Folgenden näher diskutiert werden. Das HPLC–Profil von *Agelas* sp. wurde bereits im Kapitel 3.1.2 gezeigt, und ist durch bromierte Phakelline und Isophakelline gekennzeichnet. Ein weiteres charakteristisches HPLC–Profil wird durch die beiden bromierten Pyrrol–Alkaloide Oroidin und 4,5–Dibrompyrrol–2–carbonsäure als Hauptmetaboliten bestimmt, und wurde als erstes im Rohextrakt von *Agelas clathrodes* gefunden (siehe Abbildung 3.7). Neben *Agelas clathrodes* zeigen folgende *Agelas*–Schwämme in ihrem Rohextrakt dieses Erscheinungsbild: *Agelas cervicornis*, *Agelas dispar* und *Agelas wiedenmayeri*.

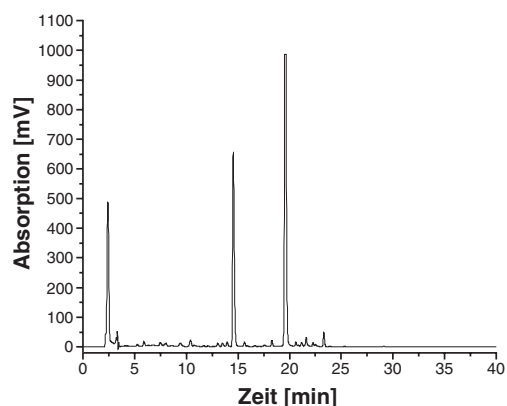


Abbildung 3.7: HPLC–Profil eines Rohextraktes vom *Agelas clathrodes*–Typ (Säule: Kromasil RP18, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): Oroidin $t_R = 14.52$ min, 4,5–Dibrompyrrol–2–carbonsäure $t_R = 19.57$ min.

In Rohextrakten von karibischen Schwämmen der Gattung *Agelas* ist ein weiteres HPLC-Profil vertreten, daß sich auffallend von den bisher besprochenen unterscheidet. Hier dominieren dimere Pyrrol-Alkaloide vom Sceptrin- und Ageliferin-Typ, die sich formal vom Oroidin ableiten (siehe Abbildung 3.8).

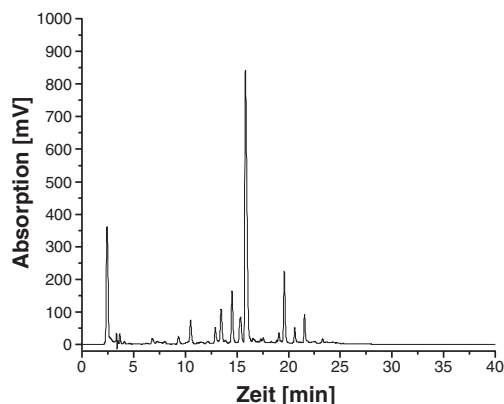


Abbildung 3.8: HPLC-Profil eines Rohextraktes vom *Agelas conifera*-Typ (Säule: Kromasil RP18, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): Sceptrin $t_R = 15.81$ min.

Neben *Agelas conifera* zeigen folgende *Agelas*-Schwämme in ihrem Rohextrakt dieses HPLC-Profil: *Agelas cerebrum*, *Agelas dilatata* und *Agelas sceptrum*. Das HPLC-Profil dieser Schwämme ist durch den Hauptmetaboliten Sceptrin gekennzeichnet.

3.2.2 Quantifizierung von Pyrrol-Alkaloiden in *Agelas* spp.

Nach der qualitativen HPLC-Analyse wurden die Hauptinhaltsstoffe in Dichlormethan/Methanol-Rohextrakten für alle Schwämme vom *Agelas clathrodes*-Typ und vom *Agelas conifera*-Typ mittels HPLC quantifiziert, um die intra- und interspezifische Variation zu untersuchen. Während die beiden Alkaloide Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure das HPLC-Profil der Schwämme vom *Agelas clathrodes*-Typ charakterisieren, wird das HPLC-Profil der Schwämme vom *Agelas conifera*-Typ durch das dimere Pyrrol-Imidazol-Alkaloid Sceptrin dominiert. Die Ergebnisse dieser Studie sind in den Tabellen 3.1 und 3.2 zusammengefaßt.

Tabelle 3.1: Konzentration von 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure (4,5DBrPCA) und Oroidin in *Agelas*-Schwämmen. Angegeben ist für jede Schwammart die untersuchte Probenanzahl und die Konzentration pro mL Schwammgewebe.

Schwammart	Probenanzahl	4,5DBrPCA [mg/mL ± SD]	Oroidin [mg/mL ± SD]
<i>Agelas cervicornis</i>	15	1.63 ± 0.87	0.77 ± 0.75
<i>Agelas clathrodes</i>	24	1.22 ± 0.64	0.93 ± 1.06
<i>Agelas dispar</i>	27	1.27 ± 0.70	0.59 ± 0.57
<i>Agelas wiedenmayeri</i>	5	2.00 ± 0.43	0.82 ± 0.75

Tabelle 3.2: Konzentration von Sceptrin in *Agelas*-Schwämmen. Angegeben ist für jede Schwammart die untersuchte Probenanzahl und die Konzentration pro mL Schwammgewebe.

Schwammart	Probenanzahl	Sceptrin [mg/mL ± SD]
<i>Agelas cerebrum</i>	12	3.52 ± 1.77
<i>Agelas conifera</i>	24	5.30 ± 2.16
<i>Agelas dilatata</i>	11	5.41 ± 2.11
<i>Agelas sceptrum</i>	3	5.25 ± 2.34

Für die untersuchten Schwämme vom *Agelas clathrodes*-Typ, *Agelas cervicornis*, *Agelas clathrodes*, *Agelas dispar* und *Agelas wiedenmayeri*, fällt auf, daß 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure im Durchschnitt in höheren Konzentrationen im Schwammgewebe enthalten ist als Oroidin. Als Gesamtmittelwert für alle 71 Proben (siehe Tabelle 3.1) ergibt sich für 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure eine Konzentration von 1.5 mg/mL, für Oroidin 0.8 mg/mL. Die natürliche Sceptrin-Konzentration im Gewebe von Schwämmen des *Agelas conifera*-Typs, *Agelas cerebrum*, *Agelas conifera*, *Agelas dilatata* und *Agelas sceptrum*, beträgt gemittelt über alle 50 Proben 4.9 mg/mL (siehe Tabelle 3.2) und liegt damit um mehr als das Drei- bzw. Sechsfache höher als die Konzentrationen für 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure bzw. Oroidin.

Exemplarisch sind die Einzelergebnisse der fünf untersuchten *Agelas wiedenmayeri*-Proben in Abbildung 3.9 gezeigt. Bei den in den Florida Keys gesammelten Schwammproben ist die Konzentration von 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure gegenüber Oroidin deutlich höher, während für die beiden Bahamas-Proben die Konzentration der beiden Alkaloide im Schwammgewebe nahezu identisch ist. Inwieweit diese Beobachtung einen generellen Trend darstellt, kann aufgrund der geringen Probenzahl abschließend nicht beurteilt werden.

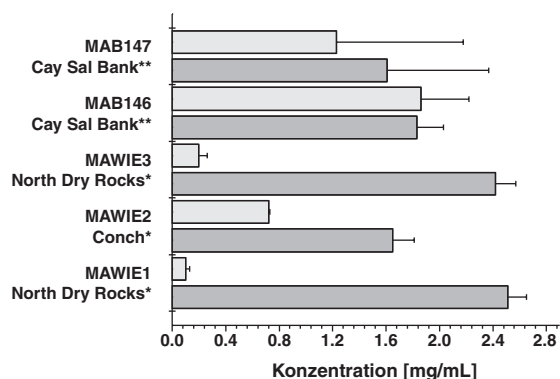


Abbildung 3.9: Konzentration von 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure (dunkelgrau) und Oroidin (hellgrau) in Proben von *Agelas wiedenmayeri*, die in den Florida Keys* und Bahamas** gesammelt wurden. Probenbezeichnung und Sammelort sind jeweils angegeben.

Für *Agelas conifera* sind die Ergebnisse in Abbildung 3.10 gezeigt. Die Sceptrin-Konzentration der 24 untersuchten Proben aus den Bahamas liegt über alle Proben gemittelt bei 5.3 mg/mL.

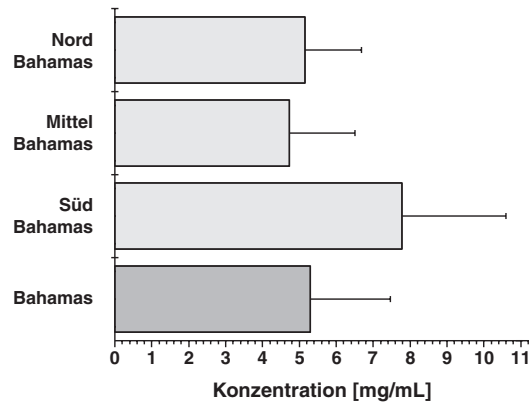


Abbildung 3.10: Konzentration von Sceptrin in *Agelas conifera*-Proben von den Bahamas.

Teilt man die Probenanzahl in drei geographische Regionen auf (Nord-Bahamas, Mittel-Bahamas, Süd-Bahamas), so ergibt sich ein signifikanter Unterschied nur für die Sceptrin-Mittelwerte zwischen den Mittel- und Süd-Bahamas (ANOVA, $F_{2,21} = 4.03$, $p \leq 0.05$; Tukey Test für lineare Kontraste, $\alpha = 0.05$; Zar, 1999). Diese Ergebnisse werden ausführlich in Publikation **P2** beschrieben und diskutiert (Assmann *et al.*, 2000a).

3.3 Chemoökologische Untersuchungen

3.3.1 Fischversuche

Während den Pawlik-Expeditionen 1999 und 2000 wurden an Bord der *R/V Seward Johnson* die Dichlormethan/Methanol-Rohextrakte von *Agelas cerebrum*, *Agelas cervicornis*, *Agelas clathrodes*, *Agelas conifera*, *Agelas dilatata*, *Agelas dispar*, *Agelas sceptrum*, *Agelas wiedenmayeri* und *Agelas* sp. bei natürlichen Konzentrationen im Aquariumversuch getestet. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.7.1, die Herstellung der Rohextrakte in Publikation **P2** beschrieben. Jeder Rohextrakt wurde an zwei verschiedenen Gruppen des karibischen Blaukopfflippfisches *Thalassoma bifasciatum* verfüttert. Jede Gruppe von Fischen umfaßte zehn Aquarienzellen, wobei sich in jeder Zelle mindestens ein Männchen und zwei Weibchen befanden. Alle getesteten Rohextrakte zeigten eine stark fraßabschreckende Wirkung (siehe Tabelle 3.3). Die Ergebnisse von Pawlik *et al.* aus dem Jahr 1995 für *Agelas clathrodes*, *Agelas conifera*, *Agelas dispar*, *Agelas sceptrum* und *Agelas wiedenmayeri* wurden bestätigt. Rohextrakte der Schwämme *Agelas cerebrum*, *Agelas cervicornis*, *Agelas dilatata* und *Agelas* sp. wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation erstmalig untersucht.

Neben Rohextrakten wurden auch Reinsubstanzen hinsichtlich ihrer fraßabschreckende Wirkung untersucht. Die mittels chromatographischer Methoden gereinigten Hauptmetaboliten von *Agelas conifera*, *Agelas wiedenmayeri* und *Stylissa caribica* wurden bei natürlichen Konzentrationen im Aquariumversuch getestet. Während für *Agelas wiedenmayeri* 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure und Oroidin fraßabschreckend auf *Thalassoma bifasciatum* wirken, konnte für den aus *Stylissa caribica* isolierten Hauptmetaboliten, *N*-Methyl-dibromisophakellin, ein fraßabschreckendes Potential nachgewiesen werden (siehe Publikation **P2** und Manuskript **M2**). Im Fall von *Agelas conifera*, aus dem die bromierten Pyrrol-Imidazol-Alkaloide Sceptrin, Bromsceptrin, Dibromsceptrin, Ageliferin, Bromageliferin und Dibromageliferin isoliert wurden (siehe Abbildungen 3.11 und 3.12), ist nur das dimere Pyrrol-Alkaloid Sceptrin bei natürlichen Konzentrationen im Aquariumversuch aktiv (siehe Publikation **P2**).

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Aquariumversuche von Dichlormethan/Methanol-Rohxtrakten von *Agelas*-Schwämmen. Bis auf Conch und North Dry Rocks (Florida Keys, USA) befinden sich alle Sammelorte in den Bahamas. Die Eindeutigkeit der Versuche wird mit dem exakten Test nach Fisher bewertet (Zar, 1999). Für jeden Einzelversuch mit insgesamt zehn Wiederholungen gilt ein Rohextrakt als signifikant fraßabschreckend, wenn vier oder mehr Futterpellets von den Fischen abgelehnt werden ($p \leq 0.043$, einseitiger Test).

Schwammart	Probe	Sammelort	Datum	Tiefe	Futterpellets gefressen
<i>A. cerebrum</i>	MAB05	Sweetings Cay	16.09.98	15 m	0/10; 0/10
	MAB15	Sweetings Cay	17.09.98	19 m	0/10; 0/10
	MAB31	Chub Cay	19.09.98	21 m	0/10; 0/10
<i>A. cervicornis</i>	MAB33	Chub Cay	19.09.98	17 m	0/10; 0/10
	MAB37	Chub Cay	19.09.98	18 m	0/10; 0/10
	MAB58	Little San Salvador	24.09.98	25 m	0/10; 0/10
<i>A. clathrodes</i>	MAB12	Sweetings Cay	17.09.98	19 m	1/10; 0/10
	MAB21	Black Rock	18.09.98	5 m	0/10; 0/10
	MAB22	Black Rock	18.09.98	5 m	0/10; 0/10
<i>A. conifera</i>	MAB03	Sweetings Cay	16.09.98	18 m	0/10; 0/10
	MAB14	Sweetings Cay	17.09.98	19 m	0/10; 0/10
	MAB26	Chub Cay	19.09.98	21 m	1/10; 0/10
<i>A. dilatata</i>	MAB47	Little San Salvador	23.09.98	24 m	0/10; 0/10
	MAB55	Little San Salvador	24.09.98	18 m	0/10; 0/10
	MAB56	Little San Salvador	24.09.98	23 m	0/10; 0/10
<i>A. dispar</i>	MAB53	Little San Salvador	24.09.98	24 m	0/10; 0/10
	MAB63	San Salvador	26.09.98	18 m	0/10; 0/10
	MAB68	Samana Cay	27.09.98	21 m	0/10; 0/10
<i>A. sceptrum</i>	MAB69	Samana Cay	27.09.98	21 m	0/10; 0/10
	MAB70	Samana Cay	27.09.98	18 m	0/10; 1/10
	MAB71	Samana Cay	27.09.98	20 m	0/10; 0/10
<i>A. wiedenmayeri</i>	MAWIE2	Conch	29.05.98	16 m	0/10; 0/10
	MAWIE3	North Dry Rocks	23.05.98	6 m	0/10; 0/10
	MAB146	Cay Sal Bank	08.08.99	6 m	0/10; 0/10
<i>Agelas</i> sp.	MAB08	Sweetings Cay	16.09.98	18 m	0/10; 0/10
	MAB09	Sweetings Cay	16.09.98	15 m	0/10; 0/10
	MAB34	Chub Cay	19.09.98	5 m	1/10; 0/10

Zur Bestätigung der Aquarium-Ergebnisse für Sceptrin wurde ein Freilandversuch durchgeführt. Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 5.7.1 ausführlich beschrieben. Da die Isolierung der dimeren Pyrrol-Alkaloide sich schwierig gestaltete, und nicht zuletzt weil mögliche Fraßfeinde alle im Schwammgewebe vorkommenden Sceptrine und Ageliferine fressen müssen, wurde eine über Sephadex[®] LH-20 vorgereinigte Fraktion aus der *n*-Butanol-Phase von *Agelas conifera* für den Feldversuch eingesetzt. Das HPLC-Chromatogramm ist in Abbildung 3.11 gezeigt.

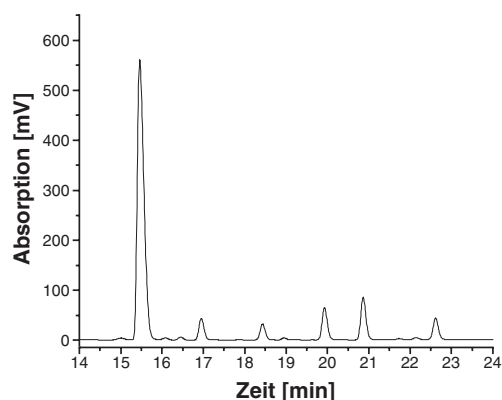
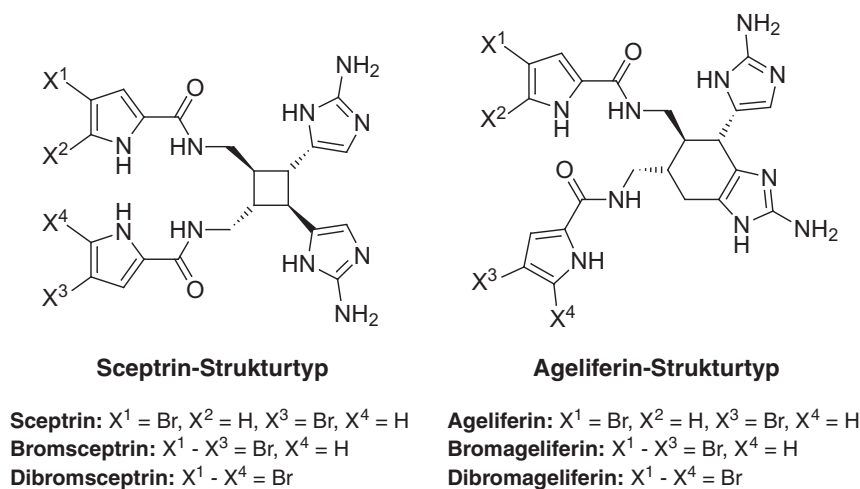


Abbildung 3.11: HPLC-Chromatogramm (Säule: Kromasil RP18, $4,6 \times 250$ mm, $5 \mu\text{m}$; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min) einer Fraktion der *n*-Butanol-Phase von *Agelas conifera* nach der Aufreinigung mittels Sephadex[®] LH-20. In der Fraktion sind nur noch die dimeren Pyrrol-Alkaloide aus der Reihe der Sceptrine und Ageliferine enthalten: Sceptrin $t_R = 15.46$ min, Ageliferin $t_R = 16.95$ min, Bromsceptrin $t_R = 18.43$ min, Bromageliferin $t_R = 19.93$ min, Dibromsceptrin, $t_R = 20.87$ min, Dibromageliferin $t_R = 22.62$ min.

Diese Fraktion enthielt nur die bromierten Pyrrol-Alkaloide Sceptrin (68%), Bromsceptrin (3.5%), Dibromsceptrin (8.6%), Ageliferin (4.7%), Bromageliferin (7.7%) und Dibromageliferin (6.1%) (siehe Abbildung 3.12). Die Konzentrationen der einzelnen Verbindungen in dieser Fraktion wurden mittels HPLC quantifiziert, so daß natürliche Konzentrationen im Feldversuch getestet werden konnten.

Abbildung 3.12: Dimere Brompyrrol-Alkaloide isoliert aus *Agelas conifera*.

Die Ergebnisse des Feldversuchs sind in Abbildung 3.13 gezeigt. Während vom Kontrollfutter 71% gefressen wurden, zeigten die Fische nur geringes Interesse für das präparierte Futter.

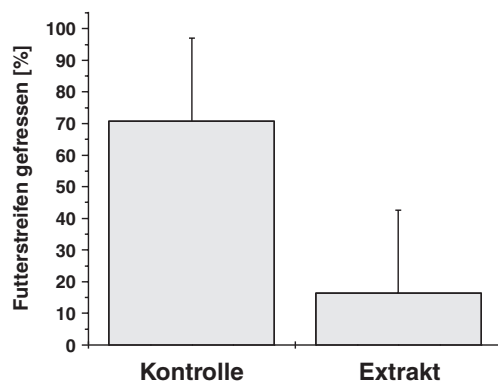


Abbildung 3.13: Feldversuch mit dimeren Brompyrrol-Alkaloiden aus *Agelas conifera*. Der Mittelwert + Standardabweichung sind angegeben. Der p -Wert wurde mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (zweiseitiger Test) berechnet: $N = 19(18)$, $p < 0.05$ (Zar, 1999). Die getestete Mischung ist signifikant fraßabschreckend.

Vom behandelten Futter wurden im Verlauf des Feldversuchs 16% gefressen. Die getestete Mischung dimerer Pyrrol-Alkaloide aus der Reihe der Sceptrine und Ageliferine erwies sich als signifikant fraßabschreckend im Feldversuch ($p < 0.05$) (siehe Publikation P2).

Um den Einfluß der Bromsubstitution am Pyrrol-Ring im Hinblick auf die fraßabschreckende Wirkung gegenüber *Thalassoma bifasciatum* zu untersuchen, wurden bromierte Derivate der Pyrrol-2-carbonsäure (siehe Abbildung 3.14) ausgehend vom Pyrrol nach literaturbekannten Vorschriften synthetisiert (Anderson & Lee, 1965; Bailey *et al.*, 1971). Die Synthesebeschreibungen sowie Charakterisierungen der Verbindungen sind dem Kapitel 5.8 zu entnehmen.

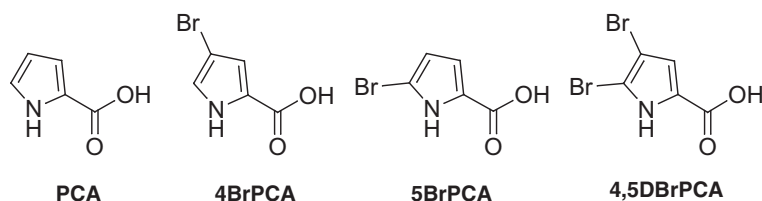


Abbildung 3.14: Bromierte Derivate der Pyrrol-2-carbonsäure (PCA): 4-Brompyrrol-2-carbonsäure (4BrPCA), 5-Brompyrrol-2-carbonsäure (5BrPCA), 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure (4,5DBrPCA).

Im Aquariumversuch wurden die bromierten Pyrrol-2-carbonsäure-Derivate bei einer Konzentration von 10 mg/mL getestet. In Abbildung 3.15 sind die Ergebnisse dargestellt.

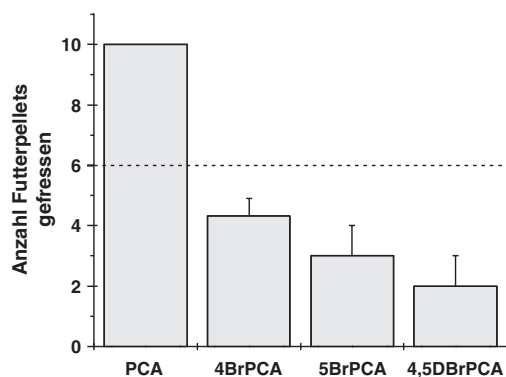


Abbildung 3.15: Einfluß der Brom-Substitution am Pyrrol-Ring auf die fraßabschreckende Wirkung im Aquariumversuch. Es wurde jeweils eine Konzentration von 10 mg/mL getestet: (PCA) Pyrrol-2-carbonsäure, (4BrPCA) 4-Brompyrrol-2-carbonsäure, (5BrPCA) 5-Brompyrrol-2-carbonsäure, (4,5DBrPCA) 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure.

Während Pyrrol-2-carbonsäure bei dieser Konzentration nicht aktiv ist, zeigt die auch in den *Agelas*-Schwämmen vorkommende 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure die

stärkste fraßabschreckende Wirkung. Die monobromierten Derivate 4-Brompyrrol-2-carbonsäure und 5-Brompyrrol-2-carbonsäure sind ebenfalls fraßabschreckend.

3.3.2 *bacterial attachment*-Assay

Alle im Meerwasser lebenden oder nicht-lebenden Oberflächen unterliegen einem ständigen Befall von Bakterien, die sich schnell ausbreiten können und durch die Bildung eines Biofilms die gesamte Oberfläche bedecken (Steinberg *et al.*, 1997). Die Biofilme ihrerseits fördern nachfolgend die Besiedlung von Epiphyten und Epifauna, die unterschiedliche Effekte auf den Wirtsorganismus haben können (Paul, 1992b). Pathogene Bakterien in den Biofilmen können zum Absterben des Wirts führen oder zumindest dem Gewebe signifikanten Schaden zufügen. Fäulnis kann sogar gefährlich werden, wenn Bakterien oder andere Epibionten um Nährstoffe mitkonkurieren, insbesondere für filtratfressende Organismen, wie Schwämme. Wenn Fäulnisgemeinschaften sehr dicht werden, können sie auch die Einströmöffnungen blockieren oder verstopfen und somit die Nahrungsaufnahme hemmen (Paul, 1992b). Deshalb kann ein wirksamer Schutz gegen Biofouling eine wichtige Rolle beim Überleben im Riff spielen.

Ob die bromierten Pyrrol-Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Agelas* neben der fraßabschreckenden Wirkung gegenüber Fischen noch weitere ökologische Funktionen haben, wie z. B. eine antibakterielle Schutzfunktion, wurde mit dem *bacterial attachment*-Assay untersucht (Kelly *et al.*, 2001). Hierzu wurden die Hauptsekundärmetaboliten Sceptrin, Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure bei natürlichen Konzentrationen gegen das Fäulnisbakterium *Vibrio haviryi* getestet. Alle drei getesteten Alkaloide zeigen eine starke Besiedlungshemmung (siehe Abbildung 3.16). Während Sceptrin die Besiedlung eines Agar-Blocks zu 97% hemmt, zeigen Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure 73% bzw. 65% Inhibierung. Darüber hinaus hemmt Sceptrin die Besiedlung zweier unbekanntener Fäulnisbakterien, die während der Pawlik-Expedition 2000 aus der Wassersäule isoliert wurden, zu 97% bzw. 98%.

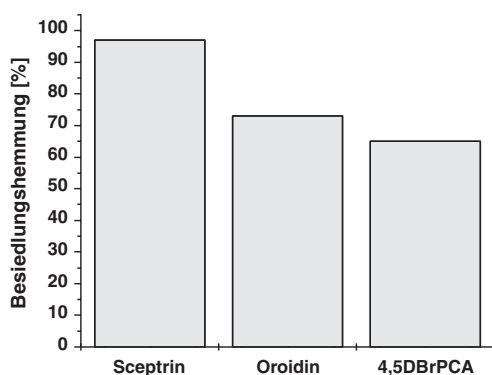


Abbildung 3.16: Besiedlungshemmung von *Vibrio haviryi* durch Sceptrin, Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure bei natürlichen Konzentrationen.

Da Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure stets als Mischung im Gewebe von *Agelas*-Schwämmen enthalten sind, wurde eine Mischung dieser beiden Verbindungen bei natürlichen Konzentrationen (NC) sowie in einer Verdünnungsreihe gegenüber *Vibrio haviryi* getestet (siehe Abbildung 3.17).

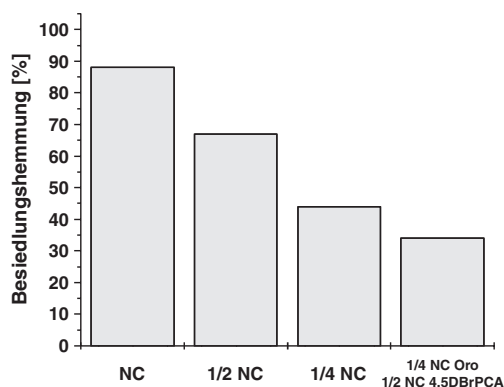


Abbildung 3.17: Besiedlungshemmung von *Vibrio haviryi* durch ein Substanzgemisch aus Oroidin (Oro) und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure (4,5DBrPCA).

Als natürliche Konzentration wurde der Mittelwert für Oroidin und für 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure (1.50 mg/mL) und für Oroidin (0.80 mg/mL) über alle *Agelas*-Schwämme mit dem HPLC-Profil vom *Agelas clathrodes*-Typ gewählt (vergleiche Kapitel 3.2.2, Tabelle 3.1). Die Mischung wirkt bei dieser Konzentration besiedlungshemmend. Wird die Konzentration verringert, geht auch die inhibierende Wirkung zurück.

3.3.3 *overgrowth*-Assay

Durch das begrenzte Raumangebot sind Organismen im Korallenriff einem starken intra- und interspezifischen Konkurrenzdruck ausgesetzt. Dies fördert einerseits Kolonienbildung und stationäres Verhalten, hat aber andererseits zur Ausbildung verschiedener Überlebensmechanismen geführt (Mebs, 1989). Verdrängen durch Überwachsen ist eine Strategie im Kampf um Besiedlungsraum. Wie ein Dichlormethan/Methanol-Rohextrakt von *Agelas conifera* sich auf das Wachstum von *Tedania ignis* auswirkt, wurde mit dem von Engel & Pawlik eingeführten *overgrowth*-Assay untersucht (Engel & Pawlik, 2000). Der Assay wurde in den Mangroven der Florida Bay, Key Largo, USA durchgeführt, die dem natürlichen Habitat des Schwamms *Tedania ignis*, Lagunen, Seegraswiesen und Mangrovegebiete (Humann, 1996), sehr ähnlich sind. Ausserdem erwies sich *Tedania ignis* als idealer *overgrowth*-Organismus, da er sich leicht transplantieren läßt und unter Assay-Bedingungen ein sehr gutes Wachstum zeigt.

Das Ergebnis dieser Untersuchung, die Sebastian Engel (Center for Marine Science Research, University of North Carolina at Wilmington, USA) freundlicherweise im Juli 2000 in der Florida Bay, Key Largo, USA durchführte, sind in Abbildung 3.18 gezeigt. Der Rohextrakt von *Agelas conifera* hemmt signifikant das Überwachsen von *Tedania ignis*. Ob dimere Pyrrol-Alkaloide für diese Beobachtung verantwortlich sind, müssen zukünftige Untersuchungen mit aufgereinigten Fraktionen oder Reinsubstanzen zeigen.

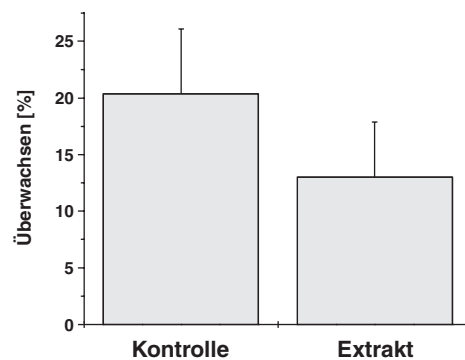


Abbildung 3.18: *overgrowth*-Assay-Ergebnis für den Dichlormethan/Methanol-Rohextrakt der *Agelas conifera*-Probe MAB93. Der Rohextrakt von *Agelas conifera* hemmt signifikant das Überwachsen von *Tedania ignis* ($N = 6$, $p < 0.05$).

3.4 Taxonomische Untersuchungen

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation in den Florida Keys, USA, und Bahamas gesammelten Schwammproben der Gattung *Agelas* wurden am Zoologischen Museum der Universität Amsterdam in Zusammenarbeit mit Dr. Rob W. M. van Soest (Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam, Nederland) einer detaillierten taxonomischen Untersuchung unterzogen. Neben den bereits in der Literatur beschriebenen Arten *Agelas clathrodes*, *Agelas conifera*, *Agelas dispar*, *Agelas sceptrum* und *Agelas wiedenmayeri* waren mehrere Proben in der Bahamas-Sammlung enthalten, die sich nicht den bereits bekannten Arten der Gattung zuordnen ließen. Ein Vergleich mit Literaturdaten und zahlreichen Referenzproben von karibischen *Agelas*-Schwämmen aus der Sammlung des Zoologischen Museums Amsterdam und anderer Museen (United States National Museum, Washington und British Museum of Natural History, London) ergab schließlich, daß einige Proben zu einer neuen Art, *Agelas cerebrum* n.sp., gehören. Für eine dieser Proben wurde auf der Basis makroskopischer und mikroskopischer Merkmale eine Neubeschreibung durchgeführt. Darüber hinaus zeigte eine weitere Art große Ähnlichkeit und Übereinstimmung mit einer alten Farbillustration (siehe Kapitel 6, Farbtafel 3A) und Beschreibung von *Agelas dilatata* (Duchassaing & Michelotti, 1864), so daß für diese Art aufgrund der vorliegenden Bahamas-Proben, eine Wiederbeschreibung unter Verwendung des alten Namens erfolgte, da keinerlei Referenzproben von Duchassaing & Michelotti mehr zugänglich sind (van Soest *et al.*, 1983). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind ausführlich im Manuskript **M1** dokumentiert.

4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden marine Schwämme der Gattungen *Agelas* und *Stylissa* von den Florida Keys und Bahamas untersucht. Dabei lag das Hauptinteresse neben der Isolierung und Strukturaufklärung der Schwamminhaltsstoffe vor allem auf der ökologischen Funktion der Sekundärstoffe.

Die Chemie dieser Schwämme ist sehr charakteristisch und wird von bromierten Derivaten der Pyrrol-2-carbonsäure bestimmt. Insgesamt wurden 17 bromierte Pyrrol-Alkaloide isoliert, von denen die Verbindungen *N* α -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)-*L*-homoarginin (isoliert aus *Agelas wiedenmayeri*), Bromsceptrin (*Agelas conifera*), *N*-Methyl-dibromisophakellin (*Stylissa caribica*), Monobromisophakellin (*Agelas* sp.) und Sventrin (*Agelas sventres*) erstmals beschrieben wurden. Die Strukturaufklärung erfolgte mit spektroskopischen Methoden (2D NMR, MS, IR, UV, CD) und durch Vergleich mit literaturbekannten Daten. Im Fall von *N* α -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)-*L*-homoarginin gelang die Bestimmung der absoluten Konfiguration erst nach Synthese der Verbindung und anschließendem Vergleich der CD-Spektren von Naturstoff und synthetischer Verbindung.

Insgesamt wurden die Dichlormethan/Methanol-Rohextrakte von 125 Schwämmen der Gattung *Agelas*, die an verschiedenen Standorten der Bahamas gesammelt wurden, mittels HPLC qualitativ untersucht und die Hauptsekundärmetaboliten quantitativ bestimmt. In sämtlichen Schwämmen konnten Brompyrrol-Alkaloide nachgewiesen werden, wobei sich drei charakteristische Inhaltsstoffmuster zeigten. Während die Rohextrakte von 71 Proben der Schwämme *Agelas cervicornis*, *Agelas clathrodes*,

Agelas dispar und *Agelas wiedenmayeri* durch die beiden Alkaloide Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure gekennzeichnet sind, bestimmen dimere Pyrrol-Imidazol-Alkaloide vom Sceptrin- und Ageliferin-Typ, wobei Sceptrin stets dominiert, das Inhaltsstoffmuster von 50 untersuchten Proben der Schwämme *Agelas cerebrum*, *Agelas conifera*, *Agelas dilatata* und *Agelas sceptrum*. Ein drittes Inhaltsstoffmuster wurde für vier Proben des Schwamms *Agelas* sp. gefunden, welches durch bromierte Pyrrol-Alkaloide vom Phakellin- und Isophakellin-Typ charakterisiert ist.

Zur Untersuchung der ökologischen Bedeutung von Brompyrrol-Alkaloiden wurde die fraßabschreckende Wirkung gegenüber Fischen getestet. In Aquarium- und Freilandversuchen konnte gezeigt werden, daß die fraßhemmende Wirkung der Rohextrakte gegenüber Fischen im Fall von *Agelas conifera* auf bromierte Pyrrol-Alkaloide vom Sceptrin- und Ageliferin-Typ bzw. Isophakellin-Typ für *Stylissa caribica* zurückzuführen ist. Erstmals wurden Reinsubstanzen vom Sceptrin-, Ageliferin- und Isophakellin-Typ getestet. Sceptrin und *N*-Methyl-dibromisophakellin sind bei natürlichen Konzentrationen fraßabschreckend.

In weiteren ökologischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die bromierten Pyrrol-Alkaloide Oroidin, 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure und Sceptrin neben einem fraßabschreckenden Potential gegenüber Fischen auch besiedlungshemmend auf Fäulnisbakterien wirken. Bromierte Pyrrol-Alkaloide erfüllen somit mindestens zwei ökologische Funktionen, die das Überleben von *Agelas*-Schwämmen sichern und sie zu einer der erfolgreichsten Arten in Lebensgemeinschaften karibischer Riffe machen.

5 Material und Methoden

5.1 Materialsammlung

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten Schwämme der Gattungen *Agelas* und *Stylissa* wurden während eines Forschungsaufenthaltes am National Undersea Research Center in Key Largo, Florida, USA (22.05. bis 31.05.1998) sowie drei Forschungsexpeditionen der *R/V Edwin Link* (14.09. bis 01.10.1998) und *R/V Seward Johnson* (26.07. bis 10.08.1999 und 24.07. bis 08.08.2000) in den Bahamas gesammelt. Der Forschungsaufenthalt sowie die Expeditionen standen jeweils unter der Leitung von Prof. Ph.D. Joseph R. Pawlik (Center for Marine Science Research, University of North Carolina at Wilmington, USA). In der Karte in Abbildung 5.1 sind die jeweiligen Sammelorte in den Bahamas gezeigt. Die mittels SCUBA (*self-contained underwater breathing apparatus*) gesammelten Schwämme wurden unmittelbar nach dem Ertauchen eingefroren, unter Trockeneis-Kühlung nach Frankfurt transportiert und bis zur Aufarbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

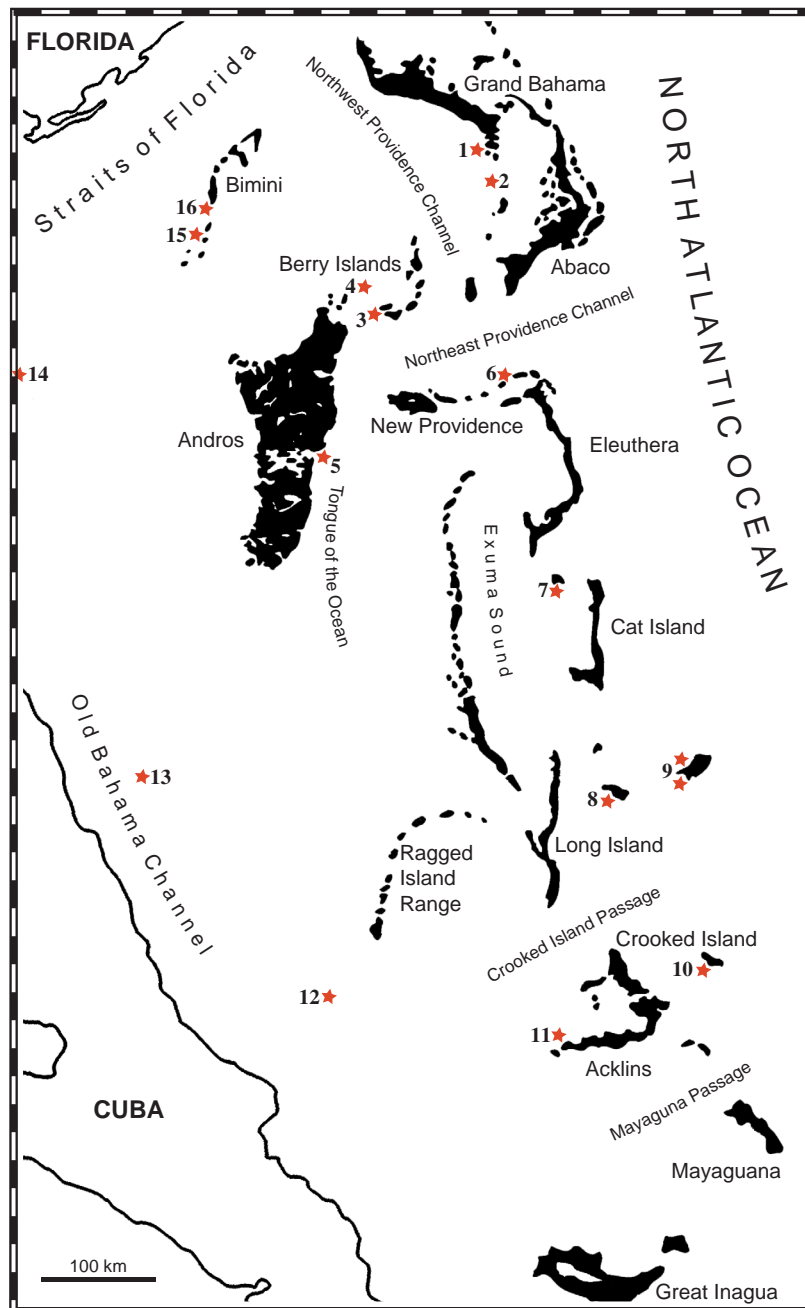


Abbildung 5.1: Sammelorte in den Bahamas: 1 Sweetings Cay, 2 Black Rock, 3 Chub Cay, 4 33 km westlich von Chub Cay, 5 Behring Point, 6 Egg Island, 7 Little San Salvador, 8 Rum Cay, 9 San Salvador, 10 Samana Cay, 11 Acklins, 12 Cay Santo Domingo, 13 Cay Lobos, 14 Cay Sal Bank, 15 North Cat Cay, 16 North Turtle Rock (in Anlehnung an Bahamas Tourist Office, 1998, verändert).

5.2 Taxonomische Bestimmungen

Die Klassifikation von Schwämmen gestaltet sich bisweilen schwierig und gründet sich hauptsächlich auf die Analyse der Skelett-Merkmale. Daneben berücksichtigt die Diagnose häufig auch die äußere und innere Pigmentierung, die Konsistenz (elastisch, brüchig), das Muster und die Größe der Ostia und Oscula, manchmal auch histologische Besonderheiten, ökologische Aspekte sowie den Modus der Fortpflanzung und Entwicklung (Kaestner, 1993). Morphologische Untersuchungen zur systematischen Klassifizierung der im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten Schwämme der Gattungen *Agelas* und *Stylissa* wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Rob W. M. van Soest (Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoölogisch Museum, Universiteit van Amsterdam, Nederland) am Zoologischen Museum der Universität Amsterdam durchgeführt. Stellvertretend sind von folgenden Schwämmen Referenzproben in der Sammlung des Zoologischen Museum, Amsterdam, hinterlegt:

- *Agelas cerebrum* (Assmann *et al.*, 2000)
Bezeichnung: MAB15
Sammeldatum: 17.09.1998
Sammelort und Tiefe: Sweetings Cay (Bahamas), 19 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 13371

- *Agelas cerebrum* (Assmann *et al.*, 2000)
Bezeichnung: MAB96
Sammeldatum: 30.07.1999
Sammelort und Tiefe: Chub Cay (Bahamas), 30 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 15603

- *Agelas cervicornis* (Schmidt, 1870)
Bezeichnung: MAB33
Sammeldatum: 19.09.1998
Sammelort und Tiefe: Chub Cay (Bahamas), 17 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 13373

- *Agelas clathrodes* (Schmidt, 1870)
Bezeichnung: MAB11
Sammeldatum: 17.09.1998
Sammelort und Tiefe: Sweetings Cay (Bahamas), 19 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 13370

- *Agelas clathrodes* (Schmidt, 1870)
 Bezeichnung: MAB65
 Sammeldatum: 26.09.1998
 Sammelort und Tiefe: San Salvador (Bahamas), 23 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13377

- *Agelas conifera* (Schmidt, 1870)
 Bezeichnung: MAB03
 Sammeldatum: 16.09.1998
 Sammelort und Tiefe: Sweetings Cay (Bahamas), 18 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13365

- *Agelas dilatata* (Duchassaing & Michelotti, 1864)
 Bezeichnung: MAB47
 Sammeldatum: 23.09.1998
 Sammelort und Tiefe: Little San Salvador (Bahamas), 24 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13375

- *Agelas dilatata* (Duchassaing & Michelotti, 1864)
 Bezeichnung: MAB118
 Sammeldatum: 03.08.1999
 Sammelort und Tiefe: Little San Salvador (Bahamas), 24 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 15604

- *Agelas dispar* (braune Farbvariante)
 Bezeichnung: MAB20
 Sammeldatum: 18.09.1998
 Sammelort und Tiefe: Black Rock (Bahamas), 5 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13372

- *Agelas dispar* (braune Farbvariante)
 Bezeichnung: MAB36
 Sammeldatum: 19.09.1998
 Sammelort und Tiefe: Chub Cay (Bahamas), 5 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13374

- *Agelas dispar* (braune Farbvariante)
 Bezeichnung: MAB50
 Sammeldatum: 24.09.1998
 Sammelort und Tiefe: Little San Salvador (Bahamas), 19 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13376

- *Agelas sceptrum* (Lamarck, 1814)
 Bezeichnung: MAB71
 Sammeldatum: 27.09.1998
 Sammelort und Tiefe: Samana Cay (Bahamas), 20 m
 Registrierungsnummer: ZMA POR. 13378

- *Agelas sceptrum* (Lamarck, 1814)
Bezeichnung: MAB70
Sammeldatum: 27.09.1998
Sammelort und Tiefe: Samana Cay (Bahamas), 18 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 13380

- *Agelas wiedenmayeri* (Alcolado, 1984)
Bezeichnung: MAWIE3
Sammeldatum: 23.05.1998
Sammelort und Tiefe: North Dry Rocks (Florida Keys, USA), 6 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 13505

- *Agelas* sp.
Bezeichnung: MAB09
Sammeldatum: 16.09.1998
Sammelort und Tiefe: Sweetings Cay (Bahamas), 15 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 13369

- *Stylissa caribica* (Lehnert & van Soest, 1998)
Bezeichnung: MAB02
Sammeldatum: 16.09.1998
Sammelort und Tiefe: Sweetings Cay (Bahamas), 15 m
Registrierungsnummer: ZMA POR. 15607

5.3 Extraktion

Zur Isolierung der bromierten Pyrrol-Alkaloide aus Schwämmen der Gattungen *Agelas* und *Stylissa* wurde generell folgendes Extraktionsschema durchgeführt: gefrorenes oder gefriergetrocknetes Schwammgewebe wird in kleine Stücke geschnitten und anschließend bei Raumtemperatur nacheinander für jeweils 24 h mit Dichlormethan, Dichlormethan/Methanol 1:1 und Methanol extrahiert. Die organischen Phasen werden filtriert, vereinigt und am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Der Dichlormethan/Methanol-Rohextrakt wird in Methanol aufgenommen und gegen *n*-Hexan ausgeschüttelt. Die *n*-Hexan-Phase wird anschließend am Rotavapor eingeeengt. Die verbleibende Methanol-Phase wird bis zur Trockene eingeeengt, in Wasser aufgenommen und gegen wassergesättigtes *n*-Butanol ausgeschüttelt. Aus der *n*-Butanol-Phase lassen sich durch chromatographische Methoden die bromierten Pyrrol-Alkaloide isolieren.

5.4 Chromatographische Methoden

5.4.1 Dünnschicht–Chromatographie

Die Dünnschicht–Chromatographie (DC) diente zur Optimierung der unterschiedlichen Elutionsgemische für die Säulenchromatographie sowie – bei der Isolierung der bromierten Pyrrol–Alkaloide – zur Überprüfung der Zusammensetzung säulenchromatographisch getrennter Fraktionen. Als DC–Material wurden Fertigplatten aus Aluminium (Kieselgel 60 F₂₅₄, Schichtdicke 0.2 mm, Merck) oder Glas (RP8 F_{254S}, Schichtdicke 0.25 mm, Merck; RP18 F_{254S}, Schichtdicke 0.25 mm, Merck) verwendet. Bei DC–Platten aus Kieselgel diente CHCl₃/MeOH/NH_{3aq} 40:20:1 als Fließmittel, während bei RP–DC–Platten Gemische aus MeCN/H₂O + 0.1% TFA zum Einsatz kamen. Die DC–Platten wurden in einer DC–Kammer (20 × 20 cm) bis zu einer Laufhöhe von ca. 9 cm entwickelt. Nach Verdunsten des Fließmittels erfolgte die Markierung der unter UV–Licht bei 254 und 366 nm beobachteten Banden mit einem Bleistift. Zur Intensivierung und Differenzierung der auftretenden Fluoreszenzen wurden die DC–Platten anschließend mit Anisaldehyd– oder Dragendorff–Reagenz besprüht und mit einem Heizluftföhn erwärmt. Durch Reaktion der untersuchten Substanzen mit dem Sprühreagenz entstanden gefärbte Zonen oder Flecke, die ebenfalls mit einem Bleistift gekennzeichnet wurden.

Dragendorffs–Reagenz Sprühlösung für die DC (Merck)

Nach dem Besprühen des Chromatogramms mit Dragendorffs–Reagenz und kurzzeitigem Erhitzen muß zur Erzielung einer optimalen Anfärbung noch mit 0.5 mL Schwefelsäure nachgesprüht werden (Hahn–Deinstrop, 1998).

Anisaldehyd–Sprühreagenz

Unter Eiskühlung werden 2.5 mL Anisaldehyd in 50 mL Eisessig gelöst. Anschließend gibt man zu dieser Mischung 425 mL Methanol und tropft vorsichtig unter Rühren 25 mL konzentrierte Schwefelsäure zu (Stahl & Schild, 1986).

5.4.2 Gelpermeations–Chromatographie

Die Gelpermeations– oder Ausschluß–Chromatographie wurde zur Auftrennung von *n*-Butanol–Phasen verwendet, wobei als Gel Sephadex® LH–20 (Pharmacia, Korngröße 25–100 μm) zum Einsatz kam. Sephadex® LH–20 bildet mit reinen, organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton, Dichlormethan, Chloroform als mobile Phasen einfache, universelle und leistungsstarke Trennsysteme, die sich bei der Isolierung von niedermolekularen Naturstoffen bewährt haben (Henke, 1994). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation diente stets Methanol als mobile Phase. Die Chromatographie erfolgte in einer Glassäule mit einem Innendurchmesser von 80 mm bei einer Gelbetthöhe von 1050 mm. Die Auftrennung der Substanzen erfolgt nach ihrer molekularen Größe und Gestalt unter Ausnutzung der unterschiedlichen Permeabilität des Gels für Moleküle verschiedener Größe.

Sephadex® LH–20 ist ein Polydextran–Gel, das industriell durch Vernetzung des Polysaccharids Dextran mit Epichlorhydrin hergestellt wird. Dextrane nennt man ganz allgemein lineare, hochpolymere Kohlenhydrate, die als Stoffwechselprodukte des Bakteriums *Leuconostoc mesenteroides* entstehen, wenn dieser Einzeller auf Rohrzucker–Substrat gedeiht (Henke, 1994).

5.4.3 Umkehrphasen–Chromatographie

Diese Art der Chromatographie diente der Aufreinigung vorgetrennter, polarer Fraktionen. Zur Durchführung der Umkehrphasen–Chromatographie wurden vorgepackte Kieselgel Lobar®–Fertigsäulen der Firma Merck verwendet:

- LiChroprep® RP8 Korngröße 40–63 μm , Größe B (310–25)
- LiChroprep® RP18 Korngröße 40–63 μm , Größe B (310–25)
- LiChroprep® RP18 Korngröße 40–63 μm , Größe C (440–37)

Die Trennung erfolgte mit Luft bei einem Druck von 2–4 bar. Als Gradienten dienten Mischungen aus MeCN/H₂O + 0.1% TFA. Durch Zusatz von Säuren, wie z. B. Trifluoressigsäure (TFA), wird bei der Umkehrphasen–Chromatographie unerwünschtes Peak–Tailing oder Peak–Fronting verhindert, die Auflösung erhöht und somit insgesamt eine bessere Auftrennung der Substanzen erreicht.

5.4.4 Hochleistungs–Flüssigchromatographie

Die Hochleistungs–Flüssigchromatographie (HPLC) ist eine Sonderform der Säulenchromatographie, bei der hohe Drücke angewandt werden. Durch Verwendung sehr feinkörniger und dichtgepackter Sorptionsmittel als stationäre Phase erreicht die HPLC eine wesentlich bessere Trennleistung als die zuvor beschriebenen Chromatographie–Methoden. Die HPLC diente zur präparativen Trennung von Substanzgemischen sowie deren qualitativen und quantitativen Analyse. Die Durchführung der Analysen erfolgte mit einem HPLC–System der Firma JASCO:

- Pumpe: JASCO PU–980 Intelligent HPLC Pump
- Degaser: JASCO DG–980–50 3–Line Degaser
- Detektor: JASCO MD–910 Multiwavelength Detector
- Probengeber: JASCO AS–950–10 Intelligent Sampler
- Gradientenmischer: JASCO LG–980–0 Ternary Gradient Unit
- Steuerung: BORWIN Version 1.02
- Fraktionssammler: Advantec SF–2120 Super Fraction Collector

Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Säulenmaterial, Gradienten sowie Flußraten sind den jeweiligen Kapiteln zu entnehmen.

5.5 Spektroskopische Methoden

NMR-Spektroskopie

^1H -NMR und ^{13}C -NMR Spektren wurden an Bruker AM250, AMX400 und DRX600 Spektrometern aufgenommen. Alle Messungen wurden bei 300 K und in $\text{DMSO-}d_6$ durchgeführt.

Massenspektrometrie

ESI-Massenspektren wurden an einer VG Platform II der Firma Fison aufgenommen. Die Messung von hochaufgelösten FAB-Massenspektren mit 3-Nitrobenzylalkohol als Matrix erfolgte mit einem JEOL JMS-700 Massenspektrometer bei 70 eV am Institut für Organische Chemie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

CD-Spektroskopie

CD-Messungen wurden mit einem JASCO Spektropolarimeter J-710 durchgeführt.

Polarimetrie

Die optische Rotation wurde mit einem Perkin-Elmer 241 MC Polarimeter bestimmt.

IR-Spektroskopie

IR-Spektren wurden als KBr-Preßlinge mit einem FT/IR-420 Spektrometer der Firma JASCO oder mit einem Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR Spektrometer erhalten.

UV/Vis-Spektroskopie

UV/Vis-Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer UV/Vis Spektrometer Lambda 16 aufgenommen.

5.6 Quantifizierung der Inhaltsstoffe in *Agelas* spp.

Die Herstellung der Rohextrakte zur Quantifizierung der bromierten Pyrrol-Alkaloide in verschiedenen Schwämmen der Gattung *Agelas* ist ausführlich in Publikation **P3** beschrieben. Vor jeder quantitativen HPLC-Analyse wurden die Proben folgendermaßen zubereitet: von einem definiertem Rohextraktvolumen werden 200 μL in ein Eppendorf-Cap überführt. Nach dem Verdunsten der organischen Solventien (Dichlormethan/Methanol) wird der Rückstand in 500 μL einer 1:1 Mischung aus MeCN/H₂O + 0.1% TFA aufgenommen und eine Minute bei 13000 rpm abzentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus SEPATECH). Anschließend werden vom Überstand 10 μL in das unter Kapitel 5.4.4 beschriebene HPLC-System mittels Probengeber eingespritzt und unter folgenden Trennbedingungen analysiert:

- Säule: Kromasil RP18, 4.6 \times 250 mm, 5 μm
- Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min
- Flußrate: 1 mL/min

Die quantitative Analyse der Hauptsekundärmetaboliten wurde auf der Basis der Signalfäche durchgeführt, wobei zuvor eine Kalibrierung mit einem externen Standard erfolgte. Die Kalibrierung wurde bei jeder quantitativen Bestimmung neu aufgenommen und für verschiedene Einwaagen durchgeführt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte mit Hilfe der Steigung der Kalibriergeraden. Als externe Standards wurden Sceptrin für *Agelas cerebrum*, *Agelas conifera*, *Agelas dilatata* und *Agelas sceptrum* sowie Oroidin und 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure für *Agelas cervicornis*, *Agelas clathrodes*, *Agelas dispar* und *Agelas wiedenmayeri* verwendet.

5.7 Chemoökologische Untersuchungen

5.7.1 Fischversuche

Versuche im Aquarium

Bei einem Aquariumversuch (siehe auch Kapitel 6, Tafel 8, A & B) wird der zu untersuchende Rohextrakt oder die entsprechende Reinsubstanz in wenig Methanol gelöst und mit einem definierten Volumen Alginat-Lösung (bestehend aus 5.0 g homogenisiertem und lyophilisiertem Tintenfischpulver, 3.0 g Alginsäure und 100 mL destilliertem Wasser) vermischt, bis man eine homogene Paste erhält. Um eine gleiche Farbgebung des Futters zu gewährleisten, werden bei Bedarf Lebensmittelfarben sowohl der mit Rohextrakt oder Reinsubstanz behandelten Futterpaste als auch der Kontrollfutterpaste zugesetzt. Anschließend wird diese mit Hilfe einer Spritze langsam in eine 0.25 M Calciumchlorid-Lösung gepreßt. Nach zwei Minuten wird die spaghettiartige Alginat-Faser aus der Lösung genommen, mit Meerwasser gespült und in Pellets von ca. 2 mm Länge geschnitten. Als Versuchsfisch wird der karibische Blaukopfflippfisch *Thalassoma bifasciatum* (Bloch) eingesetzt und in Gruppen von je drei Fischen (eine Blaukopffphase ♂; zwei Gelbphasen ♀) auf zehn separate Zellen in Aquarien verteilt. *Thalassoma bifasciatum* (Bloch) ist als fleischfressender Generalist einer der meist verbreitetsten Fische in den Riffe der Karibik, akklimatisiert sich leicht an kleine Aquarien und frißt bereitwillig unbehandelte Futterpellets ohne Übersättigung (Pawlik *et al.*, 1987). Nachdem die Fische gefangen wurden, muß man zwei bis drei Tage warten, bis die ersten Versuche durchgeführt werden können, weil sich die Fische an die Umgebung und das Futter gewöhnen müssen. Bei einem Aquariumversuch werden die Fischgruppen in den Aquarien zufällig ausgewählt. Zu Beginn eines Aquariumversuchs wird einer Gruppe von Fischen mit einer Pipette ein Kontrollfutterpellet angeboten. Wird dieses gefressen, so wird den Fischen ein behandeltes Futterpellet angeboten. Wird dieses Pellet von einem Fisch ausgespuckt, so wird erneut ein Kontrollfutterpellet angeboten, um zu überprüfen, ob der Fisch nicht überfüttert wurde. Fischgruppen, die Kontrollpellets nicht fressen, werden im Versuch nicht eingesetzt. Ein Versuch wird positiv bewertet, wenn ein oder mehrere Fische einer Zelle das behandelte Futterpellet

mindestens dreimal ausgespuckt haben, oder nach einem solchen Versuch das Pellet ignorieren. Die Eindeutigkeit der Versuche wird mit dem exakten Test nach Fisher (*Fisher exact test*) bewertet (Zar, 1999). Für jeden einzelnen Versuch mit insgesamt zehn Wiederholungen gilt ein Extrakt oder eine Reinsubstanz als signifikant fraßabschreckend, wenn vier oder mehr Futterpellets von den Fischen abgelehnt werden ($p \leq 0.043$, einseitiger Test). Demnach wird ein Extrakt oder eine Reinsubstanz als fraßabschreckend bezeichnet, wenn maximal sechs oder weniger von zehn angebotenen Futterpellets gefressen werden. Die Aquariumversuche wurden an Bord der *R/V Edwin Link* während der Pawlik-Expedition 1998 bzw. an Bord der *R/V Seward Johnson* während den Pawlik-Expeditionen 1999 und 2000 sowie an der University of North Carolina at Wilmington, USA, durchgeführt.

Versuche im Riff

Bei einem Feldversuch (siehe auch Kapitel 6, Tafel 8, C & D) werden Rohextrakte bzw. die entsprechenden Reinsubstanzen aus 60 mL Volumen Schwammgewebe in wenig Methanol gelöst und in 60 mL erwärmte Carrageenan-Lösung (bestehend aus 3.0 g homogenisiertem und lyophilisiertem Tintenfischpulver, 1.5 g Typ I Carrageenan und 60 mL destilliertem Wasser) gerührt. Lebensmittelfarben werden bei Bedarf sowohl der mit Rohextrakt oder Reinsubstanz behandelten Futterpaste als auch der Kontrollfutterpaste zugesetzt, um eine gleiche Farbgebung des Futters zu gewährleisten. Die noch warme Lösung wird anschließend in Kunststoffformen, die mit Baumwollfäden durchzogen sind, gegossen. Nach dem Aushärten der Mischung werden 20 Futterstreifen ($5 \times 1 \times 0.5$ cm) mit eingebetteten Baumwollfäden ($5 \times 1 \times 0.5$ cm) herausgeschnitten. Die Kontrollfutterstreifen werden analog hergestellt, jedoch ohne Zusatz von Rohextrakt oder der zu untersuchenden Reinsubstanz. Jeweils ein Kontrollfutterstreifen und ein behandelter Streifen werden an einem 50 cm langen dreisträngigen Nylonseil in einem Abstand von 10 cm ca. 5 cm vom Seilende befestigt. Für jedes Experiment (Dauer ca. 1 h) werden 20 auf diese Weise präparierte Nylonseile in Flachwasserriffen (8–12 m) an Korallen oder Felsen befestigt. Wenn ungefähr 50% eines angebotenen Futterstreifen gefressen ist, wird das entsprechende Nylonseil eingesammelt. Anschließend wird der

Prozentsatz des jeweils verbliebenen Futterstreifens bestimmt und mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (zweiseitiger Test) (*Wilcoxon paired-sample test, two-tailed*) statistisch ausgewertet (Zar, 1999). Paare, bei denen weder Kontrollfutterstreifen noch behandelte Futterstreifen komplett oder überhaupt nicht gefressen werden, sind von der Auswertung ausgeschlossen. Zunächst berechnet man die Differenzen zwischen den N Zahlenpaaren der Untersuchung. Die Beträge der Differenzen werden vom kleinsten zum größten Wert in einer Rangliste aufgeführt. Die Differenzen werden den Beträgen nach sortiert und jeweils die Summe der positiven (mit T_+ bezeichnet) und der negativen Werte (mit T_- bezeichnet) bestimmt. Zum Schluß überprüft man mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (zweiseitiger Test) (*Wilcoxon paired-sample test, two-tailed*), ob die Bedingung T_+ oder $T_- \leq$ dem kritischen Wert $T_{\alpha(2)N}$ (α = Fehlergrenze, sie beträgt für die Feldversuche 0.05; (2) = zweiseitiger Test; N = Anzahl der Zahlenpaare, 20 für die Feldversuche) erfüllt ist oder nicht (signifikantes Ergebnis $p \leq 0.05$).

5.7.2 *bacterial attachment*-Assay

Bei einem *bacterial attachment*-Assay wird Reinsubstanz aus 10 mL Schwammgewebe in wenig Methanol gelöst und in 10 mL autoklavierte Agar-Nährlösung (16 g Agar, 1 g Hefeextrakt, 1 g Pepton, 1 L Seewasser) gerührt. Die noch warme, homogene Mischung wird in sterile Petrischalen überführt und zum Abkühlen 14 h bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend werden 1 cm²-Blöcke aseptisch herausgeschnitten und jeweils in eine Zelle einer 6-Zellen-Mikrotiterplatte überführt. Kontrollblöcke werden identisch hergestellt, enthalten hingegen Methanol ohne die zu testende Reinsubstanz, um Lösungsmittel-Artefakte auszuschließen. Insgesamt werden für jede zu testende Reinsubstanz fünf Agar-Blöcke hergestellt. Jeder Zelle werden 3 mL steril filtriertes Seewasser hinzugegeben und mit 25 μ L Bakterienkultur als Flüssigmedium beimpft. Eine Stunde nach dem Beimpfen werden 30 μ L DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) hinzugegeben, um Bakterien-DNA anzufärben. Zehn Minuten später wird mit 300 μ L 37%ige Formaldehyd-Lösung versetzt, um die Bakterien zu fixieren. Die Agar-Blöcke werden anschließend separat in eine größere Petrischale überführt und mit ste-

ril filtriertem Seewasser gewaschen, um nicht-angewachsene Bakterien zu entfernen. Kontroll- und Reinsubstanz-Agar-Blöcke werden auf Objektträger überführt und mit Hilfe der *epifluorescent direct counting*-Methode ausgezählt (Kepner & Pratt, 1994). Die Agar-Blöcke werden mit einem Olympus BH-2 Epifluoreszenz-Mikroskop mittels UV-Anregung untersucht. Für jeden Agar-Block werden zehn Zählungen durchgeführt, wobei eine Fläche von 0.64 mm^2 erfasst wird. Der Mittelwert der Besiedlung von fünf Reinsubstanz-Agar-Platten wird mit dem Mittelwert der Besiedlung für die Kontroll-Agarplatten verglichen. Die Stärke der Inhibierung der Bakterienbesiedlung ist angegeben als Prozentsatz des Mittelwertes aller fünf Reinsubstanz-Agar-Blöcke im Vergleich zum Mittelwert der fünf Kontroll-Agar-Blöcke (Kelly *et al.*, 2001).

5.7.3 *overgrowth*-Assay

Bei einem *overgrowth*-Assay werden Rohextrakte aus 80 mL Volumen Schwammgewebe in 10 mL Methanol gelöst und in 80 mL erwärmte Gel-Lösung (bestehend aus 1.5 g PhytigelTM und 80 mL destilliertem Wasser) gerührt. Die noch warme homogene Gel-Lösung wird anschließend in zwei quadratische Vertiefungen ($5 \times 5 \times 0.8 \text{ cm}$) einer Plexiglas-Assay-Platte ($15 \times 15 \times 0.8 \text{ cm}$) gegossen, so daß sich die beiden Extrakt-Gele gegenüberliegen (siehe Abbildung 5.2).

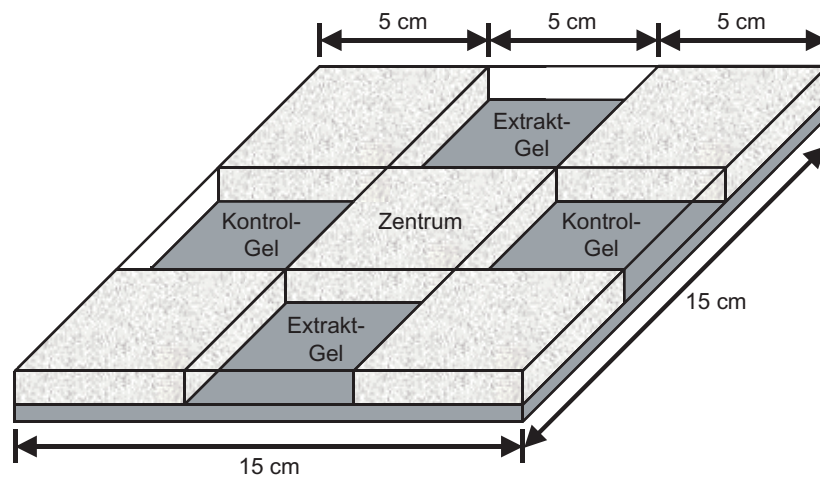
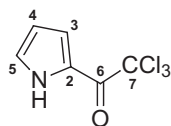


Abbildung 5.2: *overgrowth*-Assay-Platte modifiziert nach Engel & Pawlik, 2000.

Zur Herstellung von Kontroll-Gel werden 3 g Phytigel™ in 80 mL destilliertem Wasser gelöst und in einer Mikrowelle eine Minute erhitzt. Die noch warme Lösung wird mit 10 mL Methanol versetzt und in die beiden noch freien quadratischen Vertiefungen ($5 \times 5 \times 0.8$ cm) gegossen, so daß sich die Kontroll-Gele ebenso wie die Extrakt-Gele gegenüberliegen. Im Zentrum der Assay-Platte wird nun Schwammgewebe (maximal 5×5 cm), z. B. von *Tedania ignis*, mit einer Plastikschnur angebracht, so daß ein Überwachsen sowohl in Richtung der Extrakt- als auch der Kontroll-Gele möglich ist. Insgesamt werden sechs solcher Assay-Platten präpariert. Zur Durchführung des Experiments werden die Platten 50 cm unter dem Tieftiden-Pegel an einem Seil, welches horizontal zwischen zwei Mangroven-Wurzeln gespannt wird, in der Florida Bay, Key Largo, Florida, USA ausgebracht. Alle Assay-Platten verbleiben für 21 Tage im Wasser. Nach Ablauf dieses Zeitraumes wird das Überwachsen der vier Gele für jede Assay-Platte untersucht. Auf jedes Gel wird eine gerasterte Glasplatte (maximal 5×5 cm) gelegt und durch Auszählen der überwachsenen Quadrateinheiten (maximal 945 pro Gel möglich) das Überwachsen bestimmt. Der Prozentsatz des Überwachsens wird ermittelt durch Teilen der Anzahl überwachsener Quadrateinheiten durch die Gesamtzahl der Quadrateinheiten (945) multipliziert mit 100. Ein paariger T-Test auf der Basis der arcsin-transformierten Prozent-Daten wird durchgeführt, um einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte für das Überwachsen (Kontroll-Gele *versus* Extrakt-Gele) zu überprüfen (Zar, 1999).

5.8 Synthesen

5.8.1 Synthese von Pyrrol-2-yltrichlormethylketon



Die Synthese folgt der Vorschrift von Bailey *et al.*, 1971. 46.3 mL (0.41 mol) Trichloracetylchlorid werden in 70 mL wasserfreiem Diethylether gelöst. Anschließend tropft man unter Rühren innerhalb von 3 h eine Lösung von 27.8 mL (0.38 mol) Pyrrol in 210 mL wasserfreiem Diethylether zu. Durch die einsetzende Reaktion erhitzt sich das Lösungsmittel zum Sieden, wobei sich die zuvor farblose Lösung violett färbt. Nach beendeter Zugabe wird die Reaktionsmischung 1 h gerührt, anschließend gibt man langsam 33.3 g (0.24 mol) Kaliumcarbonat in 100 mL Wasser tropfenweise zu. Man trennt die organische Phase ab und trocknet über Magnesiumsulfat. Danach wird die organische Phase mit 2.00 g Aktivkohle behandelt, filtriert und das Lösungsmittel durch Destillation entfernt. Der schwarzgraue Rückstand wird in 75 mL *n*-Hexan aufgenommen und im Eisbad zur Kristallisation gebracht. Man filtriert die Lösung und wäscht die silbergrau glänzenden Kristalle zweimal mit je 25 mL kaltem *n*-Hexan.

Ausbeute: 64.3 g (79%)

Schmelzpunkt: 74–75 °C

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 32.33$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.33 (m, 1H, H-4), 7.31 (m, 2H, H-3 und H-5), 12.42 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 95.3 (C-7), 111.3 (C-4), 121.3 (C-3), 121.8 (C-2), 129.3 (C-5), 172.0 (C-6) ppm

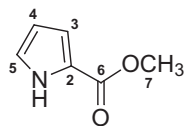
HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.33/111.3, 7.31/121.3, 7.31/129.3 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 210 (100), 212 (97), 214 (31), 216 (3)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3321 (s), 1654 (s), 1536 (w), 1424 (w), 1387 (m), 1136 (m), 1111 (m), 1063 (w), 1035 (m), 842 (s), 809 (s), 756 (s), 736 (s), 687 (m), 596 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 264 nm (4.05)

5.8.2 Synthese von Pyrrol-2-carbonsäuremethylester



Die Synthese folgt der Vorschrift von Bailey *et al.*, 1971. Zu einer Lösung von 0.30 g (13.05 mmol) Natrium in 85 mL Methanol werden innerhalb von 10 min 21.24 g (0.10 mol) Pyrrol-2-yltrichlormethylketon portionsweise gegeben. Nach erfolgter Zugabe wird die Reaktionsmischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Der ölige Rückstand wird in einer Lösung von 10 mL 3*N* Salzsäure in 60 mL Diethylether aufgenommen. Man trennt die organische Phase ab und wäscht die wäßrige Phase einmal mit 30 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der ölige Rückstand wird durch eine Feststoffdestillation fraktioniert und man erhält den Methyl ester als farblosen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 9.92 g (79%)

Schmelzpunkt: 72 °C

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 10.71$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.75$ (s, 3H, H-7), 6.16 (m, 1H, H-4), 6.81 (m, 1H, H-3), 7.01 (m, 1H, H-5), 11.89 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 50.9$ (C-7), 109.5 (C-4), 115.1 (C-3), 121.8 (C-2), 124.0 (C-5), 160.9 (C-6) ppm

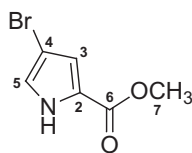
HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.16/109.5, 6.81/115.1, 7.01/124.0$ ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 110 (100)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3289 (m), 3122 (w), 2953 (w), 1682 (s), 1445 (s), 1405 (s), 1321 (s), 1264 (w), 1173 (s), 1128 (s), 1018 (w), 923 (m), 848 (w), 746 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 263 nm (4.04)

5.8.3 Synthese von 4-Brompyrrol-2-carbonsäuremethylester



Die Synthese folgt der Vorschrift von Anderson & Lee, 1965. 5.01 g (0.04 mol) Pyrrol-2-carbonsäuremethylester werden in 300 mL Tetrachlormethan gelöst. Nach Zugabe einer katalytischen Menge Jod wird die Lösung auf 0 bis $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt. Im Anschluß tropft man innerhalb von 30 min eine Lösung von 2.10 mL (0.04 mol) Brom in 100 mL Tetrachlormethan zu. Nach beendeter Zugabe läßt man weitere 90 min bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ rühren und neutralisiert anschließend die Reaktionsmischung mit 50 mL 20%iger Natriumcarbonat-Lösung. Man trennt die organische Phase ab und extrahiert die wäßrige Phase einmal mit 30 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene eingengt. 2.00 g des schwarzgrauen Rückstandes (7.95 g, 97%) werden anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt, wobei man neben dem Hauptprodukt ein dibromiertes Nebenprodukt erhält.

HPLC Bedingungen für präparative Trennung (Säule: Kromasil RP18, 20×250 mm, $7\text{ }\mu\text{m}$): Gradient: 0–50% B 40 min, A: 15% MeCN/ H_2O + 0.1% TFA, B: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flußrate: 10 mL/min

Ausbeute: 4-Brompyrrol-2-carbonsäuremethylester 1226 mg (61%)

Schmelzpunkt: $98\text{--}99\text{ }^{\circ}\text{C}$

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6×250 mm, $5\text{ }\mu\text{m}$; Gradient: 20–60% MeCN/ H_2O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 22.32$ min

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 3.75$ (s, 3H, H-7), 6.80 (m, 1H, H-3), 7.14 (m, 1H, H-5), 12.28 (br, 1H, NH-1) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 51.3$ (C-7), 95.9 (C-4), 116.1 (C-3), 122.5 (C-2), 123.9 (C-5), 160.0 (C-6) ppm

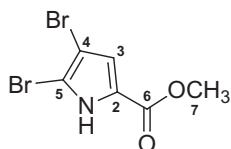
HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 3.75/51.3$, 6.80/116.1, 7.14/123.9 ppm

HMBC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): H-3/C-2, H-3/C-5, H-5/C-2, H-5/C-3, H-5/C-4, H-7/C-6

MS (ESI negativ): m/z (%) = 202 (94), 204 (95)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3285 (s), 3126 (w), 2951 (w), 1692 (s), 1552 (m), 1454 (s), 1389 (s), 1322 (s), 1244 (s), 1215 (s), 1140 (s), 1075 (m), 987 (m), 920 (s), 832 (m), 807 (w), 759 (s), 715 (w)

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 269 nm (4.03)



Ausbeute: 4,5-Dibromopyrrol-2-carbonsäuremethylester 98 mg (4.9%)

Schmelzpunkt: 158–159 °C

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm ; Gradient: 20–60% MeCN/ H_2O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): t_R = 28.39 min

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 3.76 (s, 3H, H-7), 6.89 (s, 1H, H-3), 13.17 (s, 1H, NH-1) ppm

$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 51.6 (C-7), 99.0 (C-4), 107.6 (C-5), 117.2 (C-3), 123.7 (C-2), 159.2 (C-6) ppm

HSQC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 3.76/51.6, 6.89/117.2 ppm

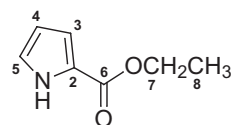
HMBC (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): H-3/C-2, H-3/C-4, H-3/C-5, H-3/C-6, H-7/C-6

MS (ESI negativ): m/z (%) = 280 (51), 282 (100), 284 (50)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) = 3438 (w), 3225 (m), 3125 (w), 2952 (w), 2917 (w), 2853 (w), 2360 (w), 2337 (w), 1693 (s), 1550 (w), 1443 (s), 1395 (s), 1316 (m), 1240 (s), 1210 (s), 1133 (m), 1000 (m), 930 (w), 844 (w), 761 (s)

UV (MeOH): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 276 nm (3.99)

5.8.4 Synthese von Pyrrol-2-carbonsäureethylester



Die Synthese folgt der Vorschrift von Bailey *et al.*, 1971. Zu einer Lösung von 0.30 g (13.05 mmol) Natrium in 85 mL Ethanol werden innerhalb von 10 min 21.24 g (0.10 mol) Pyrrol-2-yltrichlormethylketon portionsweise gegeben. Nach erfolgter Zugabe wird die Reaktionsmischung 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend im Vakuum eingengt. Die ölige Rückstand wird in einer Lösung von 10 mL 3*N* Salzsäure in 60 mL Diethylether aufgenommen. Man trennt die organische Phase ab und wäscht die wäßrige Phase einmal mit 30 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden einmal mit 25 mL gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und im Vakuum zur Trockene eingengt. Der ölige Rückstand wird durch eine Feststoffdestillation fraktioniert und man erhält den Ethylester als farblosen kristallinen Feststoff.

Ausbeute: 11.82 g (85%)

Schmelzpunkt: 39–41 °C

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 16.55$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.26 (t, 3H, H-8), 4.22 (q, 2H, H-7), 6.15 (m, 1H, H-4), 6.78 (m, 1H, H-3), 6.99 (m, 1H, H-5), 11.84 (s, 1H, NH-1) ppm

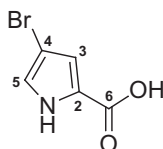
¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.3 (C-8), 59.4 (C-7), 109.4 (C-4), 114.9 (C-3), 122.1 (C-2), 123.9 (C-5), 160.4 (C-6) ppm

HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 4.22/59.4, 6.15/109.4, 6.78/114.9, 6.99/123.9 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 139 (100)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3254 (m), 3123 (w), 2983 (w), 1682 (s), 1556 (s), 1477 (m), 1455 (m), 1408 (m), 1308 (s), 1173 (s), 1137 (s), 1087 (m), 1042 (w), 1018 (m), 957 (s), 881 (w), 862 (w), 787 (s), 610 (m)

5.8.5 Synthese von 4-Brompyrrol-2-carbonsäure



Die Synthese folgt der Vorschrift von Anderson & Lee, 1965. 5.01 g (0.04 mol) Pyrrol-2-carbonsäureethylester werden in 300 mL Tetrachlormethan gelöst. Nach Zugabe einer katalytischen Menge Jod wird die Lösung auf 0 bis -5 °C gekühlt. Im Anschluß tropft man innerhalb von 30 min eine Lösung von 2.10 mL (0.04 mol) Brom in 100 mL Tetrachlormethan zu. Nach beendeter Zugabe läßt man weitere 90 min bei Raumtemperatur rühren und neutralisiert anschließend die Reaktionsmischung mit 50 mL 20%iger Natriumcarbonat-Lösung. Man trennt die organische Phase ab und extrahiert die wäßrige Phase einmal mit 30 mL Diethylether. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und im Vakuum zur Trockene eingengt. Das Rohprodukt (bromiertes Estergemisch) wird anschließend in die freien Carbonsäuren überführt. 8.60 g bromiertes Estergemisch (32 mmol bezogen auf 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure) werden mit einer Lösung von 20%iger wäßriger Kaliumhydroxid-Lösung und 80 mL Ethanol versetzt und 2 h unter Rückfluß erhitzt. Das Ethanol wird abgezogen und überschüssiges Estergemisch mit 100 mL Diethylether extrahiert. Die wäßrige Phase wird mit verdünnter Salzsäure angesäuert und mit 100 mL Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abgezogen. 3.60 g des grauweißen Rohproduktes (7.74 g, 90%) werden anschließend mittels präparativer HPLC aufgereinigt, wobei man neben dem Hauptprodukt drei Nebenprodukte erhält.

HPLC Bedingungen für präparative Trennung (Säule: Kromasil RP18, 20×250 mm, $7 \mu\text{m}$): Gradient: 5 min A, 0–40% B 45 min, A: 10% MeCN/ H_2O + 0.1% TFA, B: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flußrate: 10 mL/min

Ausbeute: 4-Brompyrrol-2-carbonsäure 1188 mg (33%)

Schmelzpunkt: 142 °C (Zersetzung)

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 12.73$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.75$ (m, 1H, H-3), 7.10 (m, 1H, H-5), 12.11 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 95.7$ (C-4), 115.8 (C-3), 123.3 (C-5), 123.8 (C-2), 161.0 (C-6) ppm

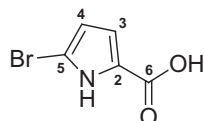
DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 115.8, 123.3 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 188 (100), 190 (99)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 188.9420 (berechnet für C₅H₄N₁O₂⁷⁹Br 188.9426, $\Delta -0.6$ mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3357 (s), 3133 (w), 2924 (w), 1685 (s), 1550 (m), 1432 (m), 1366 (m), 1326 (s), 1206 (s), 1121 (s), 923 (s), 838 (s), 763 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 264 nm (4.05)



Ausbeute: 5-Bromopyrrol-2-carbonsäure 832 mg (23%)

Schmelzpunkt: 113–114 °C

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 10.52$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.21$ (m, 1H, H-4), 6.73 (m, 1H, H-3), 12.51 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 104.6$ (C-5), 111.9 (C-4), 116.4 (C-3), 124.9 (C-2), 161.0 (C-6) ppm

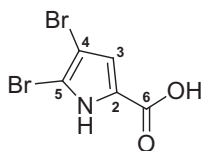
DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 111.9, 116.4 ppm

HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.21/111.9, 6.73/116.4$ ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 188 (100), 190 (99)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3427 (s), 3131 (w), 2923 (w), 2678 (w), 2577 (w), 1686 (s), 1668 (s), 1558 (s), 1448 (s), 1308 (s), 1205 (s), 1041 (s), 924 (s), 796 (s), 756 (s), 624 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 266 nm (4.16)



Ausbeute: 4,5-Dibromopyrrol-2-carbonsäure 208 mg (5.8%)

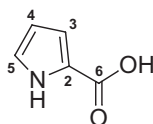
Schmelzpunkt: 134 °C (Zersetzung)

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 19.00$ min

MS (ESI negativ): m/z (%) = 266 (50), 268 (100), 270 (48)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3387 (s), 3127 (w), 2925 (w), 1670 (s), 1556 (m), 1448 (s), 1243 (m)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 272 nm (4.06)



Ausbeute: Pyrrol-2-carbonsäure 354 mg (9.8%)

Schmelzpunkt: 209–211 °C

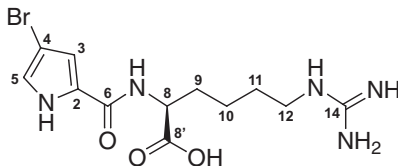
HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 4.96$ min

MS (ESI negativ): m/z (%) = 110 (100)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3357 (s), 3124 (m), 2987 (w), 2906 (w), 1667 (s), 1554 (s), 1389 (m), 1438 (s), 1326 (s), 1189 (s), 1122 (s), 947 (s), 891 (s), 754 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 261 nm (4.03)

5.8.6 Synthese von *N* α -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)-*L*-homoarginin



1.00 g 2-Chlortritylchlorid-Polystyrol-Harz (novabiochem[®]) werden in 10 mL Dichlormethan suspendiert und 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Um das Harz ausreichend quellen zu lassen, wiederholt man den Vorgang zweimal. Anschließend werden 500 mg (0.74 mmol) Fmoc-Homoarg(Pmc)-OH (BACHEM, $[\alpha]_D^{24} = -6.5^\circ$, $c = 1\%$ in Dimethylformamid) in 1 mL Dichlormethan gelöst und zu dem in 4 mL Dichlormethan suspendiertem Harz gegeben. Man gibt 380 μL (2.22 mmol) *N,N*-Diisopropylethylamin (DIEA) hinzu und schüttelt 3 h bei Raumtemperatur, wobei sich die gelbe Reaktionsmischung nach kurzer Zeit violett färbt. Man versetzt erneut mit einem dreifachen Überschuß DIEA, gibt 3 mL Methanol hinzu und läßt 15 min schütteln. Die Reaktionslösung wird mit Druckluft aus dem Reaktionsgefäß herausgepreßt und das mit der Aminosäure belegte Harz wird nacheinander zweimal 5 min mit jeweils 10 mL Dichlormethan, 2-Propanol und Diethylether gewaschen. Anschließend wird das Harz dreimal 20 min in jeweils 5 mL Dimethylformamid suspendiert und bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wird das Harz dreimal 20 min mit jeweils 5 mL 40% Piperidin in Dimethylformamid geschüttelt, wobei die violette Farbe verschwindet, und die Reaktionsmischung nun braungelb erscheint. Im Anschluß wird das Harz viermal 5 min mit jeweils 10 mL Dimethylformamid gewaschen. Danach werden 422 mg (2.22 mmol) 4-Brompyrrol-2-carbonsäure und 450 mg (3.33 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol in 5 mL Dimethylformamid gelöst, mit dem Harz versetzt und 2 min geschüttelt, wobei man erneut eine violette Färbung der Reaktionsmischung beobachtet. Anschließend gibt man 404 μL (2.59 mmol) *N,N*-Diisopropylcarbodiimid hinzu und läßt die Reaktionsmischung 5 h bei Raumtemperatur schütteln. Die Reaktionslösung wird mit Druckluft aus dem Reaktionsgefäß herausgepreßt und das Harz nacheinander zweimal 5 min mit jeweils 10 mL Dichlormethan, 2-Propanol und Di-

ethylether gewaschen. Dann versetzt man mit 5 mL 98% Trifluoressigsäure und läßt 30 min bei Raumtemperatur schütteln. Die Reaktionslösung wird abgelassen und das Harz zweimal 5 min mit jeweils 10 mL Wasser und 10 mL Acetonitril gewaschen. Die Reaktions- und Waschlösungen werden vereinigt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophilisiert. Anschließend wird mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.

HPLC Bedingungen für präparative Trennung (Säule: Kromasil RP18, 20 × 250 mm, 7 μm): Gradient: A-35% B 35 min, 55 min 60% MeCN + 0.1% TFA, A: A: 10% MeCN/H₂O + 0.1% TFA, B: 100% MeCN + 0.1% TFA; Flußrate: 10 mL/min

Ausbeute: 100 mg (72%)

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm ; Gradient: 20–45% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 25 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 7.85$ min; Gradient: 0–100% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 50 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 17.85$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.37$ (m, 2H, H-10), 1.47 (m, 2H, H-11), 1.73 (m, 2H, H-9), 3.05 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H, H-12), 4.25 (dt, $J = 4.9$ Hz, 1H, H-8), 6.91 (s, 1H, H-3), 6.96 (s, 1H, H-5), 7.41 (s, 1H, NH-13), 8.14 (s, 1H, NH-7), 11.87 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 22.9$ (C-10), 28.3 (C-11), 31.2 (C-9), 40.6 (C-12), 52.8 (C-8), 95.0 (C-4), 111.9 (C-3), 121.1 (C-5), 126.9 (C-2), 157.0 (C-14), 159.2 (C-6), 174.9 (C-8') ppm

DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 52.8, 111.9, 121.1 ppm; CH₂: 22.9, 28.3, 31.2, 40.6 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 358 (82), 360 (82)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 362.0663 (berechnet für C₁₂H₁₉N₅O₃Br 360.0672, $\Delta -0.9$ mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3379 (m), 3199 (m), 2943 (w), 2871 (w), 1670 (s), 1521 (s), 1387 (s), 1203 (s), 1137 (s), 923 (s), 722 (s)

UV (H₂O): λ_{max} (lg ϵ) = 271 nm (4.06)

CD (H₂O): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 216 nm (-1.61), ($c = 26$ $\mu\text{mol/L}$)

5.8.7 Sakaguchi–Test

Die Sakaguchi–Test ist eine Farbreaktion zum selektiven Nachweis von Guanidin–Derivaten (Auterhoff & Kovar, 1977). Bei der Oxidation mit Hypohalogeniten (z. B. Natriumhypobromit) in Gegenwart von Phenolen (z. B. 1–Naphthol) entstehen Chinonmonosemicarbazone, die im alkalischen Reaktionsmedium farbige Anionen bilden (Hessing & Hoppe, 1967) (siehe Abbildung 5.3).

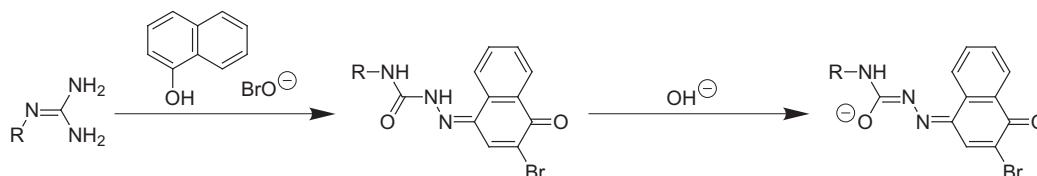


Abbildung 5.3: Sakaguchi–Test zum Nachweis von Guanidin–Derivaten.

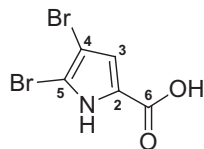
Zu 200 μL einer methanolischen Lösung von *N* α –(4–Brompyrrolyl–2–carbonyl)–*L*–homoarginin (0.5 mg/mL) gibt man fünf Tropfen 10%ige Natronlauge und fünf Tropfen 0.05%ige Lösung 1–Naphthol in Methanol. Man kühlt die Mischung auf 15 °C ab und gibt drei Tropfen Natriumhypobromit–Lösung hinzu. Es tritt eine rotviolette Färbung auf.

Herstellung von Natriumhypobromit–Lösung:

Unter Eiskühlung wird 2 g (50 mmol) Natriumhydroxid in 7.5 mL Wasser gelöst. Nach Zugabe von 0.5 mL Brom wird bis zur Lösung vorsichtig umgerührt und auf 10 mL mit Wasser aufgefüllt.

5.9 Isolierte Brompyrrol-Alkaloide

5.9.1 4,5-Dibrompyrrol-2-carbonsäure



Isoliert aus: *Agelas clathrodes*, *Agelas wiedenmayeri*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 19.01$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 6.83$ (t, 1H, H-3), 12.93 (br, 1H, NH-1) ppm

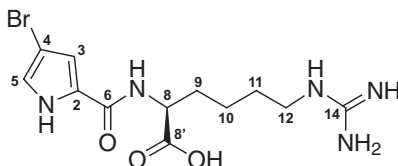
¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 98.7$ (C-4), 106.7 (C-5), 116.8 (C-3), 125.1 (C-2), 160.2 (C-6) ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 266 (53), 268 (100), 270 (51)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3387 (s), 3127 (m), 1646 (s), 1556 (m), 1455 (s), 1429 (s), 1246 (s), 914 (s), 760 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 271 nm (4.05)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.2 $N\alpha$ -(4-Brompyrrolyl-2-carbonyl)- L -homoarginin

Isoliert aus: *Agelas wiedenmayeri*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 7.19$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.36$ (2H, H-10), 1.48 (2H, H-11), 1.71 (2H, H-9), 3.09 (2H, H-12), 4.32 (1H, H-8), 6.99 (1H, H-3), 7.00 (1H, H-5), 7.55 (1H, NH-13), 8.20 (1H, NH-7), 11.84 (1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 22.9$ (C-10), 28.0 (C-11), 30.3 (C-9), 40.7 (C-12), 51.6 (C-8), 94.9 (C-4), 112.1 (C-3), 121.4 (C-5), 126.3 (C-2), 156.6 (C-14), 159.5 (C-6), 173.6 (C-8') ppm

COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): NH-1/H-5, H-5/NH-1, NH-7/H-8, H-8/NH-7, H-8/H-9, H-9/H-8, H-9/H-10, H-10/H-9, H-11/H-12, H-12/H-11, H-12/NH-13, NH-13/H-12

HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆): NH-1/C-3, H-3/C-2, H-3/C-5, H-5/C-3, H-5/C-4, NH-7/C-6, NH-7/C-8, NH-7/C-9, H-8/C-6, H-8/C-8', H-8/C-9, H-8/C-10, H-9/C-8, H-9/C-8', H-9/C-10, H-9/C-11, H-11/C-10, H-11/C-12, H-12/C-10, H-12/C-11, H-12/C-14, NH-13/C-11, NH-13/C-12

MS (ESI negativ): m/z (%) = 358 (82), 360 (82)

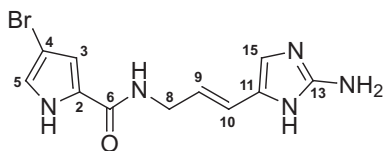
HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 362.0660 (berechnet für C₁₂H₁₉N₅O₃⁷⁹Br 362.0670, $\Delta +1.0$ mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3406 (m), 3194 (m), 1676 (s), 1637 (s), 1523 (s), 1385 (s), 1205 (s), 1136 (s)

UV (H₂O): λ_{max} (lg ϵ) = 271 nm (4.06)

CD (H₂O): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 214 nm (-1.605), ($c = 7.9$ μmol/L)

5.9.3 Hymenidin



Isoliert aus: *Agelas sventres*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 8.90$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.97$ (2H, H-8), 6.10 (1H, H-9), 6.22 (1H, H-10), 6.90 (2H, H-3 und H-15), 6.98 (1H, H-5), 7.74 (2H, NH₂), 8.41 (1H, NH-7), 11.83 (1H, NH-12 oder NH-14), 12.25 (1H, NH-12 oder NH-14), 12.90 (1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 39.8$ (C-8), 95.0 (C-4), 111.2 (C-15), 111.6 (C-3), 116.2 (C-9), 121.3 (C-5), 124.9 (C-11), 126.6 (C-10), 126.7 (C-2), 148.0 (C-13), 159.5 (C-6) ppm

DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 111.2, 111.6, 116.2, 121.3, 126.6 ppm; CH₂: 39.8 ppm

HSQC (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.97/39.8$, 6.90/111.2, 6.90/111.6, 6.22/116.2, 6.98/121.3, 6.10/126.6 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 308 (27), 310 (27)

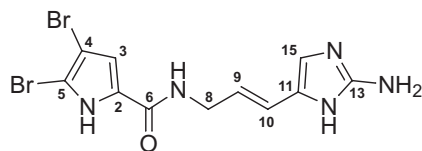
HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 310.0315 (berechnet für C₁₁H₁₃N₅O⁷⁹Br 310.0304, $\Delta +1.1$ mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3323 (s), 2360 (w), 1674 (s), 1617 (s), 1575 (m), 1531 (m), 1428 (s), 1389 (s), 1336 (m), 1199 (s), 1146 (s), 960 (s), 815 (m), 723 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 207 nm (4.01), 268 nm (4.25)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1986, 1990).

5.9.4 Oroidin



Isoliert aus: *Agelas clathrodes*, *Agelas sventres*, *Agelas wiedenmayeri*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 14.50$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.90$ (2H, H-8), 6.13 (1H, H-9), 6.22 (1H, H-10), 6.84 (1H, H-15), 6.92 (1H, H-3), 7.69 (2H, NH₂), 8.42 (1H, NH-7), 11.95 (1H, NH-12 oder NH-14), 12.63 (1H, NH-12 oder NH-14), 12.66 (1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 39.9$ (C-8), 97.9 (C-4), 104.7 (C-5), 111.2 (C-15), 112.7 (C-9), 116.3 (C-3), 125.0 (C-11), 126.4 (C-10), 128.0 (C-2), 148.0 (C-13), 158.7 (C-6) ppm

DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 111.2, 112.7, 116.3, 126.4 ppm; CH₂: 39.9 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 386 (49), 388 (100), 390 (48)

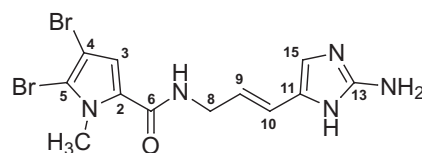
HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 387.9404 (berechnet für C₁₁H₁₂N₅O⁷⁹Br₂ 387.9408, $\Delta -0.4$ mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3310 (s), 1684 (s), 1568 (m), 1523 (m), 1431 (w), 1387 (w), 1330 (w), 1202 (s), 1137 (s), 922 (s), 838 (m), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 207 nm (4.17), 274 nm (4.35)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973; Kobayashi *et al.*, 1986, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.5 Sventrin



Isoliert aus: *Agelas sventres*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–45% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 25 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 7.85$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.89$ (s, 3H, NCH₃), 3.93 (t, 2H, H-8), 6.09 (dt, 1H, H-9), 6.22 (d, 1H, H-10), 6.90 (s, 1H, H-15), 7.06 (s, 1H, H-3), 7.71 (br, 2H, NH₂), 8.50 (t, 1H, NH-7), 12.19 (br, 1H, NH-12 oder NH-14), 12.86 (br, NH-12 oder NH-14) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 35.4$ (NCH₃), 39.9 (C-8), 97.0 (C-4), 110.7 (C-5), 110.8 (C-15), 114.1 (C-9), 116.4 (C-3), 124.9 (C-11), 126.3 (C-10), 127.6 (C-2), 147.9 (C-13), 159.6 (C-6) ppm

DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 111.2, 114.1, 116.4, 126.3 ppm; CH₂: 39.9 ppm; CH₃: 35.4 ppm

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3.89/35.4$, 3.93/39.9, 6.09/126.3, 6.23/116.4, 6.90/111.2, 7.06/114.1 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 400 (11), 402 (21), 404 (11)

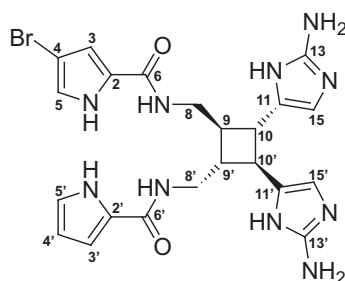
HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 401.9564 (berechnet für C₁₂H₁₄N₅O⁷⁹Br₂ 401.9565, $\Delta -0.1$ mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3334 (s), 2360 (w), 1696 (s), 1541 (s), 1506 (w), 1417 (m), 1332 (w), 1264 (m), 1202 (s), 1138 (s), 956 (s), 800 (s), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 207 nm (4.20), 274 nm (4.27)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Forenza *et al.*, 1971; Garcia *et al.*, 1973; Kobayashi *et al.*, 1986, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.6 Monobromsceptrin



Isoliert aus: *Agelas dilatata*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 10.26$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.27 (m, 2H), 2.98 (m, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.45 (m, 2H), 6.07 (m, 1H), 6.61 (s, 1H), 6.63 (s, 1H), 6.77 (m, 1H), 6.85 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 7.79 (br, 4H, 2 × NH₂), 8.11 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 8.24 (t, NH-7 oder NH-7'), 11.40 (br, 1H, NH), 11.79 (t, 1H, NH), 12.05 (s, 2H, 2 × NH), 12.46 (s, 1H, NH-1 oder NH-1'), 12.49 (s, 1H, NH-1 oder NH-1') ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 38.1 (C-9 und C-9'), 41.8 (C-8'), 42.0 (C-8), 43.1 (C-10'), 43.5 (C-10), 95.1 (C-4), 108.7 (C-15 und C-15'), 109.8 (C-4'), 110.2 (C-3'), 111.6 (C-3), 121.3 (C-5), 121.5 (C-5'), 124.1 (C-2'), 126.1 (C-2), 126.8 (C-11'), 127.2 (C-11), 147.4 (C-13 und C-13'), 160.1 (C-6 oder C-6'), 161.3 (C-6 oder C-6') ppm

DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 38.1, 43.1, 43.5, 108.7, 109.8, 110.2, 111.6, 121.3, 121.5 ppm; CH₂: 41.8, 42.0 ppm

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 541.1492 (berechnet für C₂₂H₂₆N₁₀O₂⁷⁹Br 541.1424, Δ -6.8 mmu)

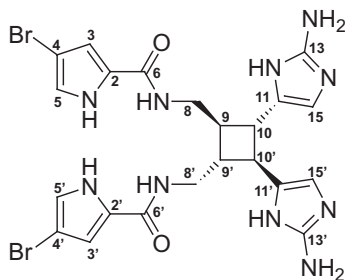
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3421 (s), 1684 (s), 1526 (m), 1430 (m), 1204 (s), 1137 (s), 1020 (s), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 217 nm (4.17), 266 (4.15)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 232 nm (-0.64), ($c = 55$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.7 Sceptrin



Isoliert aus: *Agelas conifera*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 15.46$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.26 (br, 2H, H-9 und H-9'), 2.96 (d, 2H, H-10 und H-10'), 3.53 (br, 4H, H-8 und H-8'), 6.61 (s, 2H, H-15 und H-15'), 6.82 (s, 2H, H-3 und H-3'), 6.97 (s, 2H, H-5 und H-5'), 7.50 (br, 4H, 2 × NH₂), 8.22 (s, 2H, NH-7 und NH-7'), 12.00 (s, 2H, NH-12 und NH-12'), 12.46 (s, 2H, NH-1 und NH-1') ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 37.4 (C-10 und C-10'), 41.1 (C-8 und C-8'), 42.3 (C-9 und C-9'), 95.0 (C-4 und C-4'), 108.9 (C-15 und C-15'), 111.5 (C-3 und C-3'), 121.3 (C-5 und C-5'), 126.7 (C-10 und C-10'), 127.1 (C-2 und C-2'), 147.3 (C-13 und C-13'), 160.0 (C-6 und C-6') ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 617 (49), 619 (100), 621 (51)

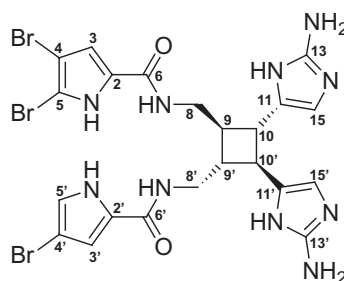
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3273 (s), 2360 (m), 1684 (s), 1631 (m), 1567 (s), 1528 (s), 1404 (s), 1332 (s), 1130 (s), 921 (s), 777 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 219 nm (4.27), 268 nm (4.19)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 233 nm (-0.64), ($c = 48$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.8 Bromsceptrin



Isoliert aus: *Agelas conifera*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 18.43$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.27 (m, 2H, H-9 und H-9'), 2.94 (d, 2H, H-10 oder H-10'), 3.35–3.43 (m, 4H, H-8 oder H-8'), 6.60 (m, 1H, H-15 oder H-15'), 6.61 (m, 1H, H-15 oder H-15'), 6.80 (m, 1H, H-3 oder H-3'), 6.87 (m, 1H, H-3 oder H-3'), 6.97 (m, 1H, H-5'), 7.37 (br, 4H, 2 × NH₂), 8.15 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 8.18 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 11.74 (br, 2H, NH-14 und NH-14'), 11.76 (s, 1H, NH-1'), 12.22 (br, 2H, NH-12 und NH-12'), 12.64 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 37.1 (C-10 oder C-10'), 40.7 (C-8 oder C-8'), 41.8 (C-9 oder C-9'), 95.2 (C-4), 104.6 (C-4'), 108.6 (C-15 oder C-15'), 111.0 (C-3), 112.2 (C-3'), 120.9 (C-5'), 126.5 (C-11 oder C-11'), 126.9 (C-2'), 127.9 (C-2), 146.9 (C-13 oder C-13'), 159.2 (C-6), 160.1 (C-6') ppm

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.35–3.43/40.7, 2.27/41.8, 2.94/37.1, 6.60/108.6, 6.61/108.6, 6.80/111.0, 6.87/112.2, 6.97/120.9 ppm

MS (FAB positiv, NBA): $m/z = 697$ (36), 699 (100), 701 (99), 703 (33)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 696.9675 (berechnet für C₂₂H₂₄N₁₀O₂⁷⁹Br₃ 696.9634, Δ +4.1 mmu)

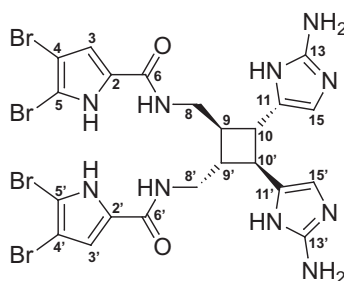
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3407 (s), 2925 (m), 1683 (s), 1204 (s), 1138 (s), 800 (s), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 208 nm (4.06), 271 nm (3.91)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 232 nm (−0.40), ($c = 43$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.9 Dibromsceptrin



Isoliert aus: *Agelas conifera*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 20.87$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.26 (s, 2H, H-9 und H-9'), 2.95 (d, 2H, H-10 und H-10'), 3.26–3.58 (m, 4H, H-8 und H-8'), 6.60 (s, 2H, H-15 und H-15'), 6.87 (s, 2H, H-3 und H-3'), 7.45 (s, 4H, 2 × NH₂), 8.21 (t, 2H, NH-7 und NH-7'), 11.90 (br, 2H, NH-14 und NH-14'), 12.40 (br, 2H, NH-12 und NH-12'), 12.64 (s, 2H, NH-1 und NH-1') ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 37.5 (C-10 und C-10'), 41.0 (C-8 und C-8'), 42.1 (C-9 und C-9'), 97.8 (C-4 und C-4'), 104.6 (C-5 und C-5'), 109.0 (C-15 und C-15'), 112.8 (C-3 und C-3'), 127.1 (C-11 und C-11'), 128.0 (C-2 und C-2'), 147.1 (C-13 und C-13'), 159.2 (C-6 und C-6') ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 773 (13), 775 (51), 777 (80), 779 (53), 780 (14)

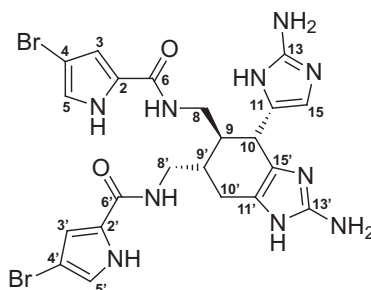
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3178 (s), 1685 (s), 1567 (m), 1526 (m), 1427 (m), 1327 (m), 1202 (s), 1136 (s), 836 (s), 721 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 210 nm (4.36), 274 nm (4.29)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 232 nm (-0.53), ($c = 38$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.10 Ageliferin



Isoliert aus: *Agelas conifera*, *Stylissa caribica*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 16.95$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 1.99$ –2.12 (m, 1H, H-9), 2.30–2.33 (dd, 1H, H-9'), 2.55–2.58 (m, 2H, H-10'), 3.46–3.62 (m, 4H, H-8 und H-8'), 3.85 (m, 1H, H-10), 6.78 (s, 1H, H-15), 6.89 (dd, 1H, H-3), 6.96 (dd, 1H, H-3'), 6.99 (dd, 1H, H-5), 7.01 (dd, 1H, H-5'), 7.44 (s, 4H, 2 × NH₂), 7.92 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 8.12 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 11.79 (s, 1H, NH-14 oder NH-14'), 11.85 (s, 1H, NH-14 oder NH-14'), 12.02 (s, 1H, NH-12 oder NH-12'), 12.04 (s, 1H, NH-12 oder NH-12'), 12.22 (s, 2H, NH-1 und NH-1')

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 22.4$ (C-10'), 33.1 (C-10), 35.3 (C-9'), 38.1 (C-8), 40.4 (C-8'), 41.6 (C-9), 94.9 (C-4 oder C-4'), 95.0 (C-4 oder C-4'), 111.7 (C-15), 111.9 (C-3 oder C-3'), 112.1 (C-3 oder C-3'), 117.8 (C-11'), 121.0 (C-15'), 121.3 (C-5 oder C-5'), 121.4 (C-5 oder C-5'), 125.5 (C-11), 126.5 (C-2 oder C-2'), 126.7 (C-2 oder C-2'), 147.3 (C-13 oder C-13'), 147.4 (C-13 oder C-13'), 160.0 (C-6 oder C-6'), 160.3 (C-6 oder C-6')

MS (ESI negativ): m/z (%) = 617 (52), 619 (100), 621 (52)

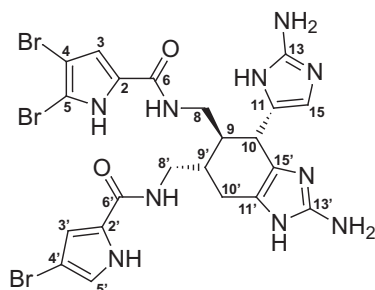
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3330 (s), 1682 (s), 1526 (m), 1435 (m), 1387 (s), 1331 (s), 1203 (s), 1136 (s), 922 (s), 840 (s), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 209 nm (4.22), 269 nm (4.10)

CD (MeOH): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 232 nm (−0.25), ($c = 58$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.11 Bromageliferin



Isoliert aus: *Agelas conifera*, *Agelas wiedenmayeri*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 19.93$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.99–2.13 (m, 1H, H-9), 2.32–2.34 (m, 1H, H-9'), 2.55–2.58 (m, H-10'), 3.26–3.64 (m, 4H, H-8 oder H-8'), 3.86 (m, 1H, H-10), 6.79 (s, 1H, H-15), 6.89 (dd, 1H, H-4'), 6.98 (dd, 1H, H-5'), 7.01 (dd, 1H, H-3), 7.52 (s, 4H, 2 × NH₂), 7.97 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 8.15 (t, 1H, NH-7 oder NH-7'), 11.82 (s, 1H, NH-14 oder NH-14'), 12.19 (s, 1H, NH-14 oder NH-14'), 12.25 (s, 1H, NH-12 oder NH-12'), 12.27 (s, 1H, NH-12 oder NH-12'), 12.39 (br, 1H, NH-1 oder NH-1'), 12.73 (br, 1H, NH-1 oder NH-1') ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.4 (C-10'), 31.4 (C-10), 35.3 (C-9'), 38.0 (C-8), 40.7 (C-8'), 41.5 (C-9), 94.9 (C-4'), 97.8 (C-4), 104.7 (C-5), 111.6 (C-15), 111.9 (C-3'), 113.2 (C-3), 117.8 (C-15'), 120.9 (C-11'), 121.2 (C-5'), 125.4 (C-11), 126.7 (C-2 oder C-2'), 127.8 (C-2 oder C-2'), 147.3 (C-13 oder C-13'), 147.4 (C-13 oder C-13'), 159.5 (C-6 oder C-6'), 159.9 (C-6 oder C-6') ppm

MS (FAB positiv): m/z (%) = 697 (33), 699 (99), 701 (100), 703 (36)

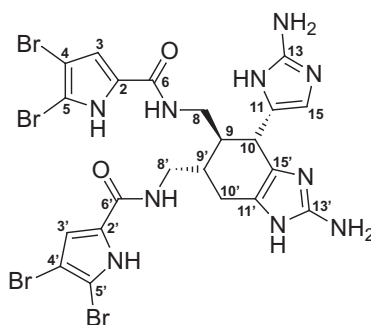
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3429 (s), 1670 (s), 1631 (s), 1570 (m), 1532 (m), 1393 (m), 1328 (s), 1202 (s), 1138 (s), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 203 nm (4.36), 272 nm (4.08)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 231 nm (-0.37), ($c = 43$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.12 Dibromageliferin



Isoliert aus: *Agelas conifera*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 22.62$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.99–2.12 (m, 1H, H-9), 2.30 (dd, 1H, H-9'), 2.55 (dd, 2H, H-10'), 3.28–3.65 (m, 4H, H-8 oder H-8'), 3.86 (d, 1H, H-10), 6.78 (s, 1H, H-15), 6.96 (d, 1H, H-3'), 7.03 (d, 1H, H-3), 7.46 (br, 4H, 2 × NH₂), 7.94 (t, 1H, NH-7), 8.13 (t, 1H, NH-7'), 12.06 (br, 2H, NH-14 und NH-14'), 12.08 (s, 1H, NH-12'), 12.25 (s, 1H, NH-12), 12.68 (br, 1H, NH-1'), 12.73 (br, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 22.5 (C-10'), 31.2 (C-10), 35.0 (C-9'), 37.8 (C-8), 40.6 (C-8'), 41.4 (C-9), 97.8 (C-4 und C-4'), 104.7 (C-5 und C-5'), 111.7 (C-15), 112.7 (C-3'), 113.0 (C-3), 117.8 (C-15'), 120.7 (C-11'), 125.3 (C-11), 127.9 (C-2 und C-2'), 147.2 (C-13'), 147.3 (C-13), 159.2 (C-6'), 159.5 (C-6) ppm

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.99–2.12/41.4, 2.55/22.5, 3.86/31.2, 3.28–3.65/37.8, 3.28–3.65/40.6, 6.78/111.7, 6.96/112.7, 7.03/113.0 ppm

HMBC (600 MHz, DMSO-*d*₆): NH-1/C-3, NH-1'/C-3', H-3/C-5, H-3'/C-5', NH-7/C-6, NH-7'/C-6', H-9/C-11, H-9/C-15', H-9'/C-11', H-10/C-9, H-10/C-15, H-10/C-15', H-10/C-11, H-10/C-11', H-10'/C-9', H-10'/C-11', H-10'/C-15', H-15/C-11, H-15/C-13, NH-12/C-13, NH-12'/C-13'

MS (ESI negativ): m/z (%) = 773 (17), 775 (68), 777 (100), 779 (66), 781 (19)

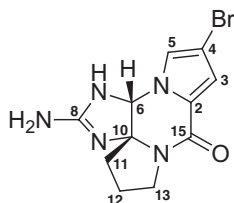
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3419 (s), 1681 (s), 1422 (m), 1202 (s), 1138 (s), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 203 nm (4.49), 275 nm (4.20)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 229 nm (-0.38), ($c = 38$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Kobayashi *et al.*, 1990; Keifer *et al.*, 1991; Walker *et al.*, 1981; Olofson *et al.*, 1998).

5.9.13 Monobromphakellin



Isoliert aus: *Agelas* sp.

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–50% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 30 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 4.23$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2.06$ (m, 2H, H-12), 2.24–2.35 (m, 2H, H-11), 3.50–3.64 (m, 2H, H-13), 6.10 (s, 1H, H-6), 6.81 (d, 1H, C-5), 7.29 (d, 1H, H-3), 8.65 (br, 2H, NH₂), 10.06 (br, 1H, NH-9), 10.24 (br, 1H, NH-7) ppm

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 19.3$ (C-12), 38.1 (C-11), 45.0 (C-13), 68.1 (C-6), 82.0 (C-10), 98.1 (C-2), 113.3 (C-5), 121.7 (C-4), 123.9 (C-3), 154.2 (C-8), 156.6 (C-15)

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2.06/19.3$, 2.24–2.35/38.1, 3.50–3.64/45.0, 6.10/68.1, 6.81/113.3, 7.29/123.9 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 308 (100), 310 (99)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 310.0292 (berechnet für C₁₁H₁₃N₅O⁷⁹Br 310.0303, $\Delta -1.1$ mmu)

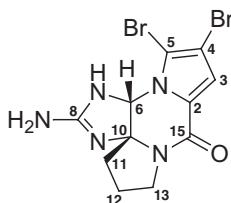
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3128 (m), 1705 (s), 1670 (s), 1551 (m), 1477 (m), 1431 (s), 1292 (m), 1202 (s), 1135 (s), 927 (s), 801 (w), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 202 nm (4.10), 277 nm (3.36)

CD (MeOH): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 232 nm (-0.13), ($c = 75$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977; De Nanteuil *et al.*, 1985; Fedoreyev *et al.*, 1986).

5.9.14 Dibromphakellin



Isoliert aus: *Agelas* sp.

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–50% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 30 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 6.50$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2.07$ (m, 2H, H-12), 2.29–2.40 (m, 2H, H-11), 3.49–3.66 (m, 2H, H-13), 6.32 (s, 1H, H-6), 7.02 (s, 1H, H-5), 8.46 (br, 1H, NH₂), 8.74 (br, 1H, NH₂), 10.04 (br, 1H, NH-9), 10.55 (br, 1H, NH-7) ppm

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 19.0$ (C-12), 38.5 (C-11), 44.6 (C-13), 68.3 (C-6), 82.4 (C-10), 102.0 (C-2), 106.1 (C-5), 114.8 (C-3), 125.0 (C-4), 153.72 (C-8), 156.7 (C-15) ppm

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2.07/19.0$, 2.29–2.40/38.5, 3.49–3.66/44.6, 6.32/68.3, 7.02/114.8 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 386 (50), 388 (100), 390 (51)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 387.9417 (berechnet für C₁₁H₁₂N₅O⁷⁹Br₂ 387.9408, $\Delta +0.9$ mmu)

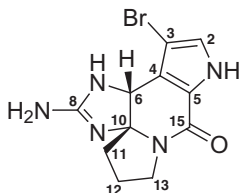
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3381 (s), 1705 (s), 1667 (s), 1558 (m), 1438 (s), 1284 (m), 1202 (s), 1136 (s), 970 (s), 802 (w), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 202 nm (4.21), 285 nm (3.66)

CD (MeOH): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 210 nm (−0.59), ($c = 60$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977; De Nanteuil *et al.*, 1985; Fedoreyev *et al.*, 1986).

5.9.15 Monobromisophakellin



Isoliert aus: *Agelas* sp.

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–50% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 30 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 3.52$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2.04$ (m, 2H, H-11), 2.22 (m, 2H, H-12), 3.47–3.57 (m, 2H, H-13), 5.23 (s, 1H, H-6), 7.22 (d, 1H, H-2), 8.07 (br, 2H, NH₂), 8.88 (s, 1H, NH-9), 9.97 (s, 1H, NH-7), 12.44 (br, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 19.2$ (C-12), 39.1 (C-11), 43.9 (C-13), 54.1 (C-6), 84.2 (C-10), 93.3 (C-5), 121.4 (C-3), 121.6 (C-4), 124.4 (C-2), 155.5 (C-8), 157.0 (C-15) ppm

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 2.04/19.2$, 2.22/39.1, 3.47–3.57/43.9, 5.23/54.1, 7.22/124.4 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 308 (27), 310 (28)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 310.0290 (berechnet für C₁₁H₁₃N₅O⁷⁹Br 310.0303, $\Delta -1.3$ mmu)

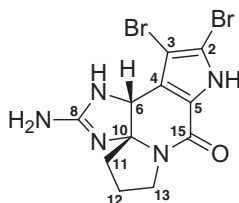
IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3180 (m), 1697 (s), 1670 (s), 1559 (m), 1447 (m), 1346 (w), 1202 (s), 1134 (s), 838 (w), 801 (w), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 202 nm (4.12), 276 nm (3.84)

CD (MeOH): λ_{max} ($\Delta\epsilon$) = 210 nm (-0.37), ($c = 82$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977; De Nanteuil *et al.*, 1985; Fedoreyev *et al.*, 1986).

5.9.16 Dibromisophakellin



Isoliert aus: *Agelas* sp., *Stylissa caribica*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–50% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 30 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 5.15$ min

¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.02 (m, 2H, H-11), 2.22 (m, 2H, H-12), 3.46–3.57 (m, 2H, H-13), 5.23 (s, 1H, H-6), 8.05 (br, 2H, NH₂), 8.93 (s, 1H, NH-9), 9.91 (s, 1H, NH-7), 13.35 (s, 1H, NH-1) ppm

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.1 (C-12), 39.1 (C-11), 44.1 (C-13), 54.0 (C-6), 84.1 (C-10), 96.3 (C-5), 108.4 (C-3), 122.4 (C-4), 122.8 (C-2), 154.7 (C-8), 156.9 (C-15) ppm

HSQC (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.02/19.1, 2.22/39.1, 3.46–3.57/44.1, 5.23/54.0 ppm

MS (ESI negativ): m/z (%) = 386 (17), 388 (35), 390 (17)

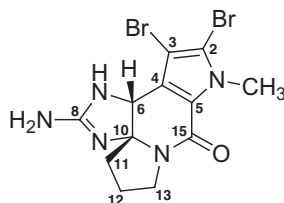
HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 387.9399 (berechnet für C₁₁H₁₂N₅O⁷⁹Br₂ 387.9408, Δ -0.9 mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3406 (m), 1697 (s), 1658 (s), 1557 (m), 1437 (m), 1202 (s), 1136 (s), 800 (m), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 202 nm (4.17), 282 nm (3.91)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 211 nm (-0.68), ($c = 76$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977; De Nanteuil *et al.*, 1985; Fedoreyev *et al.*, 1986).

5.9.17 *N*-Methyl-dibromisophakellin

Isoliert aus: *Stylissa caribica*

HPLC analytisch (Säule: Kromasil RP18, 4.6 × 250 mm, 5 μm; Gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; Flußrate: 1 mL/min): $t_R = 10.44$ min

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.02/2.23 (2H, H-11), 2.02/2.23 (2H, H-12), 3.52 (2H, H-13), 3.92 (3H, NCH₃), 5.23 (1H, H-6), 8.17 (2H, NH₂), 9.01 (1H, NH-7 oder NH-9), 10.08 (1H, NH-7 oder NH-9) ppm

¹³C-NMR (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 19.1 (C-12), 35.0 (NCH₃), 39.3 (C-11), 44.4 (C-13), 53.8 (C-6), 83.4 (C-10), 95.9 (C-5), 114.0 (C-3), 121.1 (C-4), 123.3 (C-2), 155.0 (C-8), 157.1 (C-15) ppm

DEPT-135 (62.5 MHz, DMSO-*d*₆): CH: 53.8 ppm; CH₂: 44.4, 39.3, 19.1 ppm; CH₃: 35.0 ppm

COSY (400 MHz, DMSO-*d*₆): H-11/H-12, H-12/H-11, H-12/H-13, H-13/H-12

HMBC (400 MHz, DMSO-*d*₆): NCH₃/C-3, NCH₃/C-4, H-6/C-2, H-6/C-3, H-6/C-4, H-6/C-5, H-6/C-8, H-6/C-10, NH-7/C-6, NH-7/C-8, NH-7/C-10, NH-9/C-6, NH-9/C-8, NH-9/C-10

MS (ESI negativ): m/z (%) = 400 (28), 402 (55), 406 (29)

HRMS (FAB positiv, NBA): m/z 405.9526 (berechnet für C₁₂H₁₄N₅O⁸¹Br₂ 405.9524, Δ +0.2 mmu)

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) = 3383 (m), 1697 (s), 1661 (s), 1560 (w), 1425 (m), 1347 (m), 1202 (s), 1134 (m), 801 (m), 722 (s)

UV (MeOH): λ_{max} (lg ε) = 207 nm (3.62), 288 nm (3.92)

CD (MeOH): λ_{max} (Δε) = 207 nm (-1.56), ($c = 74$ μmol/L)

Die Struktur wurde durch Vergleich der spektroskopischen Daten mit den entsprechenden Literaturdaten bestätigt (Sharma & Burkholder, 1971; Sharma & Magdoff-Fairchild, 1977; De Nanteuil *et al.*, 1985; Fedoreyev *et al.*, 1986).

6 Farbtafeln

Tafel 1

A *Agelas conifera* [Photo: H. Hofmann, Pawlik-Expedition 1998]

B *Agelas conifera* [Photo: H. Hofmann, Pawlik-Expedition 1998]

C *Agelas conifera* [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]

D *Agelas conifera* [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]



A



B



C



D

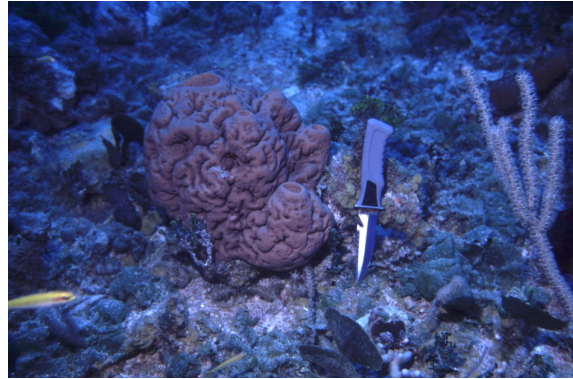
Tafel 2

A *Agelas cerebrum* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]

B *Agelas cerebrum* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]

C *Agelas cerebrum* [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]

D *Agelas cerebrum* [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]



A



B



C



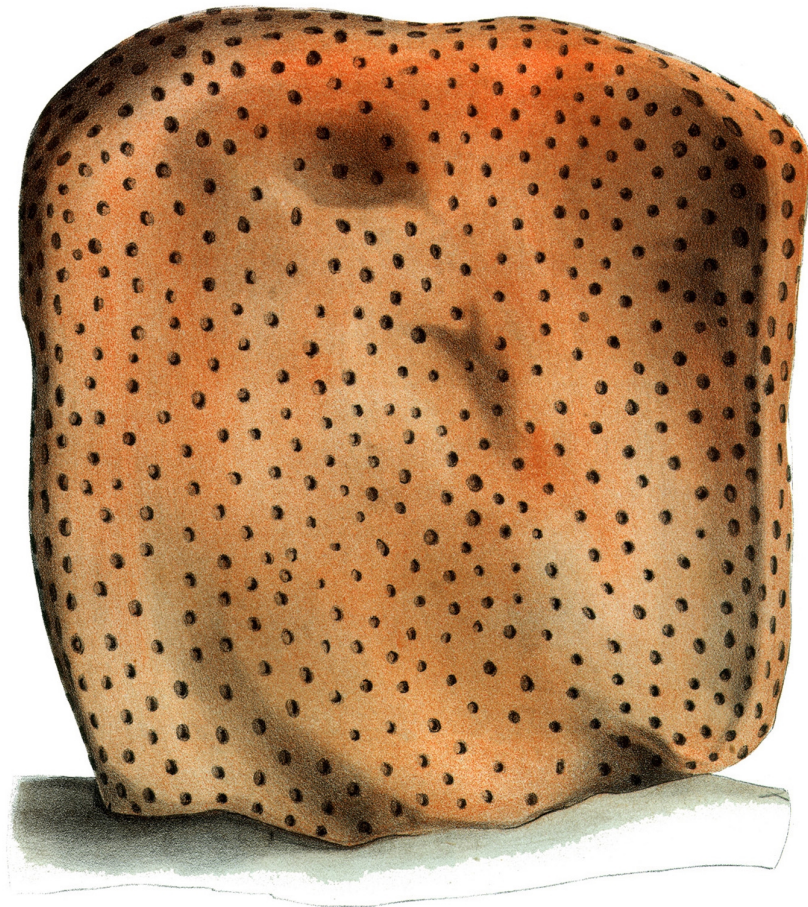
D

Tafel 3

A *Agelas dilatata* (Duchassaing & Michelotti, 1864)

B *Agelas dilatata* [Photo: H. Hoffmann, Pawlik-Expedition 1998]

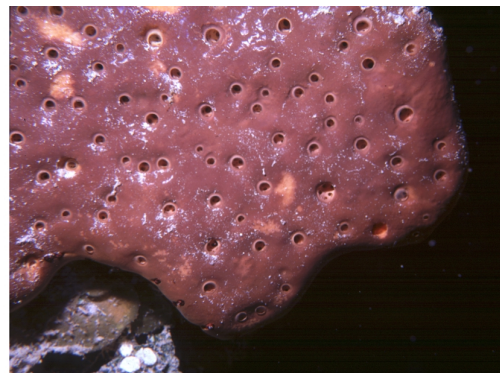
C *Agelas dilatata* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]



A



B



C

Tafel 4

A *Agelas sceptrum* (Topsent, 1933)

B *Agelas cervicornis* [Photo: M. Assmann, Pawlik-Expedition 1999]

C *Agelas cervicornis* [Photo: M. Assmann, Pawlik-Expedition 1999]

D *Agelas cervicornis* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]

E *Agelas cervicornis* (Topsent, 1932)



B



C



A



E



D

Tafel 5

A *Agelas wiedenmayeri* [Photo: M. Assmann, Pawlik-Expedition 1999]

B *Agelas clathrodes* [Photo: H. Hofmann, Pawlik-Expedition 1998]

C *Agelas clathrodes* [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]

D *Agelas clathrodes* [Photo: J. Junker, Pawlik-Expedition 1999]

E *Agelas clathrodes* [Photo: J. Junker, Pawlik-Expedition 1999]



A



C



B



D



E

Tafel 6

A *Agelas dispar* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]

B *Agelas dispar* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]

C *Agelas dispar* [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]

D *Agelas dispar* [Photo: M. Assmann, Pawlik-Expedition 1999]



A



B



C



D

Tafel 7

A *Stylissa caribica* [Photo: M. Assmann, Pawlik-Expedition 2000]

B *Stylissa caribica* [Photo: H. Hofmann, Pawlik-Expedition 1998]

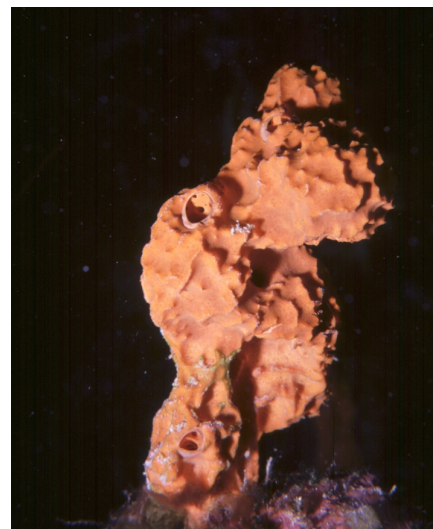
C *Stylissa caribica* [Unterwasserphoto: S. Zea, Pawlik-Expedition 2000]



A



B



C

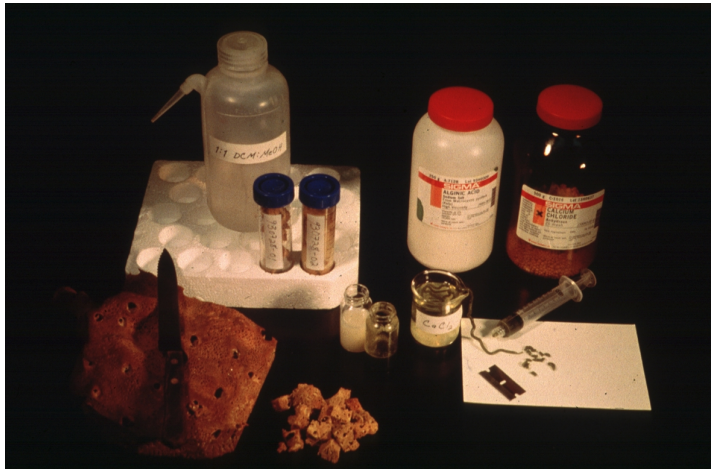
Tafel 8

A Futterzubereitung für Aquariumversuche [Photo: J. R. Pawlik]

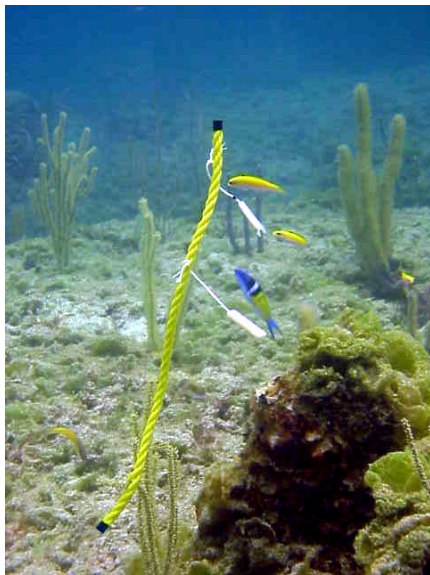
B Aquariumversuch [Photo: J. R. Pawlik]

C Feldversuch [Unterwasserphoto: J. R. Pawlik, Pawlik-Expedition 1999]

D Futterzubereitung für Feldversuche [Photo: J. R. Pawlik]



A



B

C



D

7 Literatur

Alcolado, P. M. (1984). Nuevas especies de esponjas encontradas en Cuba. *Poeyana* **171**, 409–414.

Albizati, K. F. & Faulkner, D. J. (1985). Stevensine, a novel alkaloid of an unidentified marine sponge. *J. Org. Chem.* **50**, 4163–4164.

Altmann, K.-H. & Mutter, M. (1993). Die chemische Synthese von Peptiden und Proteinen. *Chem. Unserer Z.* **27**, 274–286.

Alvarez, B., van Soest, R. W. M. & Rützler, K. (1998). A revision of Axinellidae (Porifera: Demospongiae) of the Central West Atlantic region. *Smithson. Contrib. Zool.* **598**, 1–47.

Anderson, H. J. & Lee, S.-F. (1965). Pyrrole chemistry IV. The preparation and some reactions of brominated pyrrole derivatives. *Can. J. Chem.* **43**, 409–414.

Assmann, M., Lichte, E., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (1999). New bromopyrrole alkaloid from the marine sponge *Agelas wiedenmayeri*. *Org. Lett.* **1**, 455–457.

Assmann, M., Lichte, E., Pawlik, J. R. & Köck, M. (2000a). Chemical defense of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**, 255–262.

Assmann, M., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (2000b). Description of *Agelas cerebrum* new species and re-description of *Agelas dilatata*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* eingereicht.

Assmann, M., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (2000c). New antifeedant bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Stylissa caribica*. *J. Nat. Prod.* eingereicht.

Auterhoff, H. & Kovar, K.-A. (1977). *Identifizierung von Arzneistoffen*. 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart, S. 28.

Bahamas Tourist Office (1998). *Bahamas-Magazin – Islands of the Bahamas*. Frankfurt, S. 18.

Bailey, D. M., Johnson, R. E. & Albertson, N. F. (1971). Ethyl pyrrole-2-carboxylate. *Org. Syn.* **51**, 100–102.

Bakus, G. J., Targett, N. M. & Schulte, B. (1986). Chemical ecology of marine organisms: an overview. *J. Chem. Ecol.* **12**, 951–987.

- Becerro, M. A., Lopez, N. I., Turon, X. & Uriz, M. J. (1994). Antimicrobial activity and surface bacterial film in marine sponges. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **179**, 195–205.
- Boury-Esnault, N. & Rützler, K. (1997). Thesaurus of sponge morphology. *Smithson. Contrib. Zool.* **596**, 1–55.
- Braekman, J. C. & Daloz, D. (1986). Chemical defense in sponges. *Pure & Appl. Chem.* **58**, 357–364.
- Braekman, J. C., Daloz, D., Stoller, C. & van Soest, R. W. M. (1992). Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). *Biochem. Syst. Ecol.* **20**, 417–431.
- Brusca, R. C. & Brusca, G. J. (1990). *Invertebrates*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- Carter, H. J. (1881). Contributions to our knowledge of the Spongida. *Ann. Mag. Nat. Hist.* **12**, 308–329.
- Chanas, B. & Pawlik, J. R. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **127**, 195–211.
- Chanas, B. & Pawlik, J. R. (1996). Does the skeleton of a sponge provide a defense against predatory reef fish? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **107**, 225–231.
- Chanas, B., Pawlik, J. R., Lindel, T. & Fenical, W. (1996). Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **208**, 185–196.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A., Debitus, C., Ribes, O., Pusset, J., Leroy, S. & Pietra, F. (1986). Agelastatin A, a new skeleton cytotoxic alkaloid of the oroidin family. Isolation from the Axinellid sponge *Agelas dendromorpha* of the Coral Sea. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1305–1306.
- Davis, A. R., Butler, A. J. & van Altna, I. (1991). Settlement behavior of ascidian larvae: preliminary evidence for inhibition by sponge allelochemicals. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **72**, 117–123.
- De Nanteuil, G., Ahond, A., Guilhem, J., Poupat, C., Tran Huu Dau, E., Potier, P., Pusset, M., Pusset, J. & Laboute, P. (1985). Invertebrates marins du lagon Neo-Caledonien. V. Isolement et identification des metabolites d'une nouvelle espece de spongiaire, *Pseudaxinyssa cantharella*. *Tetrahedron* **41**, 6019–6033.
- DeLoach, N. (1999). *Reef Fish Behavior: Florida, Caribbean, Bahamas*. New World Publications. Jacksonville, Florida.
- Duchassaing de Fonbressin, P. & Michelotti, G. (1864). Spongiaires de la mer Caraïbe. *Nat. Verh. Holl. Maatsch. Wetensch. Haarlem*, (2) **21**, 1–124.
- Engel, S. & Pawlik, J. R. (2000). Allelopathic activities of sponge extracts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**, 273–281.
- Faulkner, D. J. (2000a). Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Nat. Prod. Rep.* **17**, 1–6.

- Faulkner, D. J.** (2000b). Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* **17**, 7–55, sowie frühere Veröffentlichungen dieser Reihe.
- Fedoreyev, S. A., Utkina, N. K., Ilyin, S. G., Reshetnyak, M. V. & Maximov, O. B.** (1986). The structure of dibromoisophakellin from the marine sponge *Acanthella carteri*. *Tetrahedron Lett.* **27**, 3177–3180.
- Forenza, S., Minale, L., Riccio, R. & Fattorusso, E.** (1971). New bromo-pyrrole derivatives from the sponge *Agelas oroides*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1129–1130.
- Fosså, S. A. & Nilsen, A. J.** (1996). *Korallenriff – Aquarium Band 5*. Birgit Schmettkamp Verlag. Bornheim, 35–65.
- Friebolin, H.** (1999). *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*. 3. Auflage. WILEY-VCH-Verlag. Weinheim, New York, Chichester.
- Frost, T. M.** (1991). Porifera. In: J. H. Thorp, A. P. Covich (Hrsg.). *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. Academic Press. San Diego, 95–124.
- Garcia, E. E., Benjamin, L. E. & Fryer, R. I.** (1973). Reinvestigation into the structure of oroidin, a bromopyrrole derivative from marine sponge. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 78–79.
- Hahn-Deinstrop, E.** (1998). *Dünnschicht-Chromatographie*. WILEY-VCH-Verlag. Weinheim, Berlin, New York.
- Hay, M. E.** (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **200**, 103–134.
- Henke, H.** (1994). *Präparative Gelchromatographie an Sephadex LH-20*. Obernburg.
- Hesse, M., Meier, H. & Zeeh, B.** (1997). *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, New York.
- Hessing, A. & Hoppe, K.** (1967). Sakaguchi- und Fearon-Reaktion: Die Struktur der Farbstoffe, ihr Bildungsmechanismus und die Spezifität der Reaktion. *Chem. Ber.* **100**, 3649–3654.
- Hendrikson, A. A. & Pawlik, J. R.** (1995). A new antifouling assay method: results from field experiments using extracts of four marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **194**, 157–165.
- Hendrikson, A. A. & Pawlik, J. R.** (1998). Seasonal variation in biofouling gels containing extracts of marine organisms. *Biofouling* **12**, 245–255.
- Hooper, J. N. A. & Lévi, C.** (1994). Biogeography of Indo-West Pacific sponges: Microcionidae, Raspailiidae, Axinellidae. In: R. W. M. van Soest, T. M. G. van Kempen & J. C. Braekman (Hrsg.). *Sponges in Time and Space. Biology, Chemistry, Paleontology*. Balkema. Rotterdam, 191–212.
- Hostettmann, K., Marston, A. & Hostettmann, M.** (1998). *Preparative Chromatography Techniques – Applications in Natural Product Isolation*. 2nd Edition. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Humann, P.** (1996). *Reef Creature Identification: Florida, Caribbean, Bahamas*. 4th Printing. New World Publications. Jacksonville, Florida.

- Joule, J. A., Mills, K. & Smith, G. F.** (1996). *Heterocyclic Chemistry*. 3rd Edition. Chapman & Hall. London, Glasgow, Weinheim.
- Kaestner, A.** (1993). *Lehrbuch der Speziellen Zoologie*. 5. Auflage. Gustav Fischer Verlag. Jena, Stuttgart, New York, 251–297.
- Keifer, P. A., Schwartz, R. E., Koker, M. E. S., Hughes, R. G., Jr., Rittschof, D. & Rinehart, K. L.** (1991). Bioactive bromopyrrole metabolites from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *J. Org. Chem.* **56**, 2965–2975, errata 5736, 6728.
- Kelly–Borges, M.** (1997). Porifera – Sponges. In: M. D. Richmond (Hrsg.). *A guide to THE SEASHORES OF EASTERN AFRICA and the Western Indian Ocean islands*. Sida/Department for Research Cooperation, SAREC. Stockholm, 106–117.
- Kelly, S. R., Jensen, P. R., Henkel, T. P. & Pawlik, J. R.** (2001). Effects of Caribbean sponge extracts and compounds on bacterial attachment. in Vorbereitung.
- Kepner, R. L. & Pratt, J. R.** (1994). Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Micro. Rev.* **58**, 603–615.
- Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H. & Hirata, Y.** (1986). A novel antagonist of serotonergic receptors, hymenidin, isolated from the Okinawan marine sponge *Hymeniacidon* sp. *Experientia* **42**, 1176–1177.
- Kobayashi, J., Tsuda, M., Murayama, T., Nakamura, H., Ohizumi, Y., Ishibashi, M., Iwamura, M., Ohta, T. & Nozoe, S.** (1990). Ageliferins, potent actomyosin ATPase activator from the Okinawan marine sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron* **46**, 5579–5586.
- Kopka, H.** (2000). *L^AT_EX–Einführung Band 1*. 3. Auflage. Addison–Wesley. München, Boston, San Francisco.
- Kunzmann, K.** (1996). Die mit ausgewählten Schwämmen (Hexactinellida und Demospongiae) aus dem Weddellmeer, Antarktis, vergesellschaftete Fauna. *Ber. Polarforsch.* **210**, 1–93.
- Lamarck, J. B. P. A. de.** (1814). Sur les polypiers empâtés. *Ann. Mus. Nat. Hist. Paris* **20**, 294–312, 370–386, 432–458.
- Lehnert, H. & van Soest, R. W. M.** (1996). North Jamaican deep fore–reef sponges. *Beaufortia* **46**, 53–81.
- Lehnert, H. & van Soest, R. W. M.** (1998). Shallow water sponges of Jamaica. *Beaufortia* **48**, 71–103.
- Lehnert, H. & van Soest, R. W. M.** (1999). More North Jamaican deep fore–reef sponges. *Beaufortia* **49**, 141–169.
- Lindel, T., Hoffmann, H., Hochgürtel, M. & Pawlik, J. R.** (2000a). Structure–activity relationship of inhibition of fish feeding by sponge–derived and synthetic pyrrole–imidazole alkaloids. *J. Chem. Ecol.* **26**, 1477–1496.
- Lindel, T., Hochgürtel, M., Assmann, M. & Köck, M.** (2000b). Synthesis of the marine natural product *N*α–(4–bromopyrrolyl–2–carbonyl)–*L*–homoarginine, a putative biogenetic precursor of the pyrrole–imidazole alkaloids. *J. Nat. Prod.* im Druck.

- McClintock, J. B., Baker, B. J., Slattery, M., Hamann, M., Kopitzke, R. & Heine, J. (1994). Chemotactic tube-foot responses of a spongivorous sea star *Perknaster fuscus* to organic extracts from Antarctic sponges. *J. Chem. Ecol.* **20**, 859–870.
- Mebs, D. (1989). *Gifte im Riff – Toxikologie und Biochemie eines Lebensraumes*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH. Stuttgart.
- Meyer, V. R. (1999). *Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie*. 8. Auflage. Salle + Sauerländer. Frankfurt, Aarau, Salzburg.
- Nakanishi, K., Berova, N. & Woody, R. W. (1994). *Circular Dichroism – Principles and Applications*. VCH Publishers, Inc. New York, Weinheim, Cambridge.
- Olofson, A. S., Yakushijin, K. & Horne, D. A. (1998). Unusually large ^{13}C NMR chemical shift differences between neutral and protonated glycoyamidines. New insights on previously reported chemical shift assignments and chemical properties. *J. Org. Chem.* **63**, 5787–5790.
- Ott, J. (1998). *Meereskunde – Eine Einführung in die Geographie und Biologie der Ozeane*. Verlag Eugen Ulmer. Stuttgart.
- Paul, V. J. (1992a). *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Comstock Publishing. Ithaca, New York.
- Paul, V. J. (1992b). Chemical defense of benthic marine invertebrates. In: V. J. Paul (Hrsg.). *Ecological Roles of Marine Natural Products*. Comstock Publishing. Ithaca, New York, 164–188.
- Pawlik, J. R. (1992). Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* **30**, 273–335.
- Pawlik, J. R. (1993). Marine invertebrate chemical defenses. *Chem. Rev.* **93**, 1911–1922.
- Pawlik, J. R., Burch, M. B. & Fenical, W. (1987). Chemical defense among Caribbean gorgonian corals: a preliminary survey. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **108**, 55–66.
- Pawlik, J. R., Chanas, B., Toonen, R. J. & Fenical, W. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **127**, 183–194.
- Pennings, S. C., Pablo, S. R., Paul, V. J. & Duffy, E. (1994). Effects of sponge secondary metabolites in different diets on feeding by three groups of consumers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **180**, 137–149.
- Porter, J. W. & Targett, T. N. (1988). Allelochemical interactions between sponges and corals. *Biol. Bull.* **175**, 230–239.
- Pulitzer-Finali, G. (1986). A collection of West Indian Demospongiae (Porifera). In appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the West Indies. *Ann. Mus. Civ. Storia Nat. Genova* **86**, 65–216.
- Randall, J. E. & Hartman, W. D. (1968). Sponge-feeding fishes of the West Indies. *Mar. Biol.* **1**, 216–225.

- Schmidt, O.** (1870). *Grundzüge einer Spongien-Fauna des Atlantischen Gebietes*. Engelmann. Leipzig, 1–88.
- Schumacher, H.** (1991). *Korallenriffe – Verbreitung, Tierwelt, Ökologie*. 4. Auflage. BLV Verlagsgesellschaft mbH. München.
- Sharma, G. M. & Burkholder, P. R.** (1971). Structure of dibromophakellin, a new bromine-containing alkaloid from the marine sponge *Phakellia flabellata*. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 151–152.
- Sharma, G. M. & Magdoff-Fairchild, B.** (1977). Natural products of marine sponges. 7. The constitution of weakly basic guanidine compounds, dibromophakellin and monobromophakellin. *J. Org. Chem.* **42**, 4118–4124.
- Silverstein, R. M. & Webster, F. X.** (1998). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 6th Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Weinheim.
- Sommer, U.** (1998). *Biologische Meereskunde*. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg.
- Stahl, E. & Schild, W.** (1986). *Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, New York.
- Steinberg, P. D., Schneider, R. & Kjelleberg, S.** (1997). Chemical defense of seaweeds against microbial colonization. *Biodegradation* **8**, 211–220.
- Sullivan, B., Faulkner, D. J. & Webb, L.** (1983). Siphonodictidine, a metabolite of the burrowing sponge *Siphonodictyon* sp. that inhibits coral growth. *Science* **221**, 1175–1176.
- Topsent, E.** (1932). Éponges de Lamarck conservées au Muséum de Paris. II. *Arch. Mus. Natl. Hist. Nat. (Paris)* **8**, 61–124.
- Topsent, E.** (1933). Éponges de Lamarck conservées au Muséum de Paris. III. *Arch. Mus. Natl. Hist. Nat. (Paris)* **10**, 1–60.
- Tsukamoto, S., Kato, H., Hirota, H. & Fusetani, N.** (1996). Mauritiamine, a new antifouling oroidin dimer from the marine sponge *Agelas mauritiana*. *J. Nat. Prod.* **59**, 501–503.
- van Soest, R. W. M., Stone, S. M., Boury-Esnault, N. & Rützler, K.** (1983). Catalogue of the Duchassaing & Michelotti (1864) collection of West Indian sponges (Porifera). *Bull. Zool. Mus. Univ. Amsterdam* **9**, 189–205.
- van Soest, R. W. M.** (1994). Demosponge distribution pattern. In: R. W. M. van Soest, T. M. G. van Kempen & J. C. Braekman (Hrsg.). *Sponges in Time and Space. Biology, Chemistry, Paleontology*. Balkema. Rotterdam, 213–223.
- van Soest, R. W. M.** (1996). Porifera, Schwämme. In: W. Westheide & R. Rieger (Hrsg.). *Spezielle Zoologie*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart, Jena, New York, 98–119.
- Walker, R. P., Faulkner, D. J., van Engen, D. & Clardy, J.** (1981). Sceptrin, an antimicrobial agent from the sponge *Agelas sceptrum*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 6772–6773.
- Wiedenmayer, F.** (1977). Shallow-water sponges of the western Bahamas. *Experientia Suppl.* **28**, 1–287.

Wilson, D. M., Puyana, M., Fenical, W. & Pawlik, J. R. (1999). Chemical defense of the Caribbean reef sponge *Axinella corrugata* against predatory fishes. *J. Chem. Ecol.* **25**, 2811–2823.

Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. 4th Edition. Prentice–Hall. Upper Saddle River, New Jersey.

8 Anhang

Im Folgenden sind Informationen zu den Forschungsschiffen sowie die Publikationen und eingereichten Manuskripte aufgeführt.

A R/V Edwin Link

HARBOR BRANCH OCEANOGRAPHIC INSTITUTION

R/V Edwin Link



R/V EDWIN LINK is a 168-foot former offshore supply vessel that was converted to support marine science research, ocean engineering research, and submersible operations. Her namesake is famed inventor Edwin A. Link. With a 7,000 nautical mile range and cruising speed of 11 knots, the vessel is capable of traveling to any of the world's oceans while accommodating 30 people. An 18-ton A-frame handling system located on the aft deck allows safe submersible launch and recovery up to sea state five.

R/V EDWIN LINK is one of three Harbor Branch owned research vessels that are operated by experienced personnel, expert at launch and recovery procedures, and supported by in-house ocean engineers. With a 360 degree bow thruster and state-of-the-art electronic navigation systems, R/V EDWIN LINK is able to maneuver and position itself with ease and speed, allowing for precision station-keeping. The R/V EDWIN LINK is part of the University National Oceanographic Laboratory System (UNOLS) fleet.

Typical applications include submersible/ROV support, large towed systems support, deployment and retrieval of moored devices, surface oceanography and hydrographic applications, and diving support with optional recompression chamber facilities.

Length Overall	168 feet	Fuel Consumption	85 gal/hour, normal cruise
Length between perpendiculars	156 feet	Potable Water	39,000 Gal.
Beam, overall	38 feet	with Reverse Osmosis Unit (50 gal. hr.)	
Draft	11 feet	Galley Messing	15
Displacement (weight)	781 Short Tons	Speed	11 knots
Gross Tonnage	288.19 Registered Tons	Range	7000 nautical miles
Fuel Capacity	62,000 Gal.	Year Converted	1988

HARBOR BRANCH HAS A SPECIAL FLEET TO MEET YOUR NEEDS
Owned and Operated by Harbor Branch Oceanographic Institution, Inc.
Contact Director, Marine Operations - 561-465-2400 ext. 262/271
FAX - 561-465-2116

Classification:

American Bureau of Shipping: Hull and Machinery

Normal Compliment

10 ship's crew
20 other (including sub crew, if required)

Berthing Accommodations:

30 air conditioned berths

Propulsion:

(2) 16V 149 Detroit Diesels (1800 rpm) 900 shp each

Bow Thruster

360° Rotatable, high volume, axial pump thruster
Powered by Cat 3406-T, 465 hp 10,000 lbs. thrust

Generators:

(2) GM 6V 92 Diesel Generators, 175 kw. each
(1) GM 871 Diesel Generators, 190 kw.
All paralleling 440, 208 & 110 VAC 3-phase

Navigation Equipment:

(1) Integrated mission profiler/navigation system. IBM-PC based; provides differential GPS track for ship, submersibles and ROVs

Compasses:

Sperry Magnetic Compass
Sperry Mark 37 Gyrocompass with 2 repeaters
Sperry Auto-Pilot

Radars:

(2) Furuno 1411

Lorans:

Northstar 7000

Satellite Navigation:

(2) Magnavox MX200 GPS
Data Marine Speed Log

Acoustical Systems:

Straza ATM 504-14 Underwater Telephone
Straza Model 9010 Passive Tracker
ORE Track Point Model 4410C Acoustic Position System

Communication Equipment:

JRC 45A SATCOM
VHFs - Drake (1)
ICOM IC-M120 hand held VHFs (3)
Furuno/Skanti- TRP 8258S SSB Transceiver
Harris -RF 230M SSB
NECODE-Encoder/Decoder Model 321 AR

Sounding Equipment:

Data Marine Digital 1000'
SIMRAD EQ50 video echo sounder 38/50 kHz
Furuno FE-D 814 AF 6000'
Furuno FM 220 1000'

Miscellaneous:

Alden Marinefax TR-IV with NAVTEX
Simrad L 1520 VHF auto-digital direction finder

Deck Equipment:

A-frame for submersible/towed systems launch and recovery, 18 ton capacity (ABS Certified)
Deck hydraulic cargo crane - 5-ton capacity
Aft Quarter Capstans (2)
Anchor windlass, 2 wildcats
Sea Mac 88 electro/hydraulic hydrowinch w/3000' 3/16 hydrowire
Side 'J' Frame - 3500-lb. capability
Avon Rigid Hull Inflatable - 17 ft.; 50 h.p. outboard
Willard rigid hull inflatable - 22 ft.; 2 x 70 h.p.

Laboratories:

Submersible maintenance lab (264 sq. ft.)
Complete electronics test equipment and electronics spare parts inventory
Submersible Spares, Parts and Supplies/Machine Shop (156 sq. ft.)
Drill press, lathe, sanders, bench grinder
Compressor room with dive locker
(2) Mako high-pressure air compressors (5000 psi)
(2) Haskell gas-transfer pumps (O₂ and HeO₂)
(2) Delmonox air filters
(5) T-cylinders (scuba air banks) and 15,000 cu. ft. stored gas, high pressure air (O₂ and HeO₂)
Wet Lab (220 sq. ft.)
Fresh and salt water
Dry Lab (270 sq. ft.)
Fresh and uncontaminated salt water, refrigerator and freezer
Scientific Storage Room (192 sq. ft.)
Environmental Labs (2)(36 sq. ft. and 30 sq. ft.)
Fresh and uncontaminated salt water
Fume Hood Room with work bench (38.5 sq. ft.)

Lounges:

Briefing Room with technical and science library, conference table, 1/2", 3/4" & Hi-8 video recorders, video monitor, and video/photo lab

Optional Equipment:**Winches:**

SEA•MAC Model 3540 EHCLWR
Towing, trawling, coring with optional 14 conductor slipring; drum capacity up to 5,000 feet of .625 wire.
SMATCO Model HCSR-2-100 Hydraulic Storage Reel/
Tow Winch; capacity up to 5,300 feet of 2" wire.

Recompression Chambers:

48" double lock; weight-7000 lbs; steel;
working pressure-190 psi
60" double lock; weight-5600 lbs; aluminum;
working pressure-100 psi

NOTE: These recompression chambers can be installed when necessary to support scuba operations.

B *R/V Seward Johnson*

HARBOR BRANCH OCEANOGRAPHIC INSTITUTION

R/V Seward Johnson



R/V SEWARD JOHNSON, namesake of Harbor Branch founder J. Seward Johnson, Sr., is a 204 foot Oceanographic and Submersible-Support research vessel that was built in 1984, commissioned in 1985 and extensively rebuilt and stretched in 1994. With an 8000 nautical mile range and a cruising speed of 12 knots, the vessel is capable of traveling and working in any of the world's oceans, while accommodating up to 40 people.

R/V SEWARD JOHNSON is one of three Harbor Branch-owned research vessels that are operated by experienced personnel, expert in surface oceanographic procedures and submersible vehicle launch and recovery, supported by in-house ocean engineers. With 360 degree bow and stern thrusters, twin propellers and rudders, dynamic positioning and state-of-the-art precision navigation, this vessel has the capability to maneuver and position easily and efficiently and station-keep with the accuracy required by today's undersea and oceanographic research missions. R/V SEWARD JOHNSON is part of the University-National Oceanographic Laboratory System (UNOLS) fleet.

Typical applications include submersible/ROV support, large towed systems support, deployment and retrieval of moored devices, surface oceanographic/hydrographic applications, and diving support with optional recompression chamber facilities.

Length Overall	204 feet	Fuel Consumption	70 gal./hr., normal cruise
Length between Perpendiculars	183 feet	Potable Water	15,000 gal. with RO Unit (120 gal. hr.)
Beam Overall	36 feet	Galley Messing	14
Draft	12 feet	Max. Speed	13 knots
Displacement (Weight)		Cruising Speed	12 knots
Nominal Full Load	1282 Tons	Range	8000 nautical miles
Gross Tonnage	285 GRT	Year Built/Converted	1984/1994
Fuel Capacity	60,000 Gal.		

HARBOR BRANCH HAS A SPECIAL FLEET TO MEET YOUR NEEDS

Owned and Operated by Harbor Branch Oceanographic Institution, Inc.

Contact Director, Marine Operations - 561-465-2400 ext. 262/271

FAX - 561-465-2116

Classification:

American Bureau of Shipping: Hull and Machinery

Normal Complement:

11 ship's crew
29 other (including scientific crew, technicians & submersible crew — if required)

Berthing Accommodations:

40 air-conditioned berths

Propulsion:

(2) Caterpillar 3512 T1 engines, 850 hp @ 1200 rpm each driving fixed-pitch props through Lufkin reverse-reduction gearboxes.

Bow and Stern Thrusters and Dynamic Positioning:

(2) 360 degree rotatable Elliot White-Gill 32 T3 Thrusters, 7000 lbs. thrust each, powered by General Electric 325 hp DC/SCR-drive motors
Simrad/Robertson Dynamic Positioning System/
Autopilot with position and attitude hold on submersible vehicle or pinger, wind direction or Differential GPS fix.

Generators:

(3) 295 kw. Generators driven by Cat. 3406 engines
(1) 113 kw. Emergency set driven by Cat. 3204 engine (with auto-starting)

Flume anti-roll tank, capacity 15,000 gallons

Navigation Equipment:

Integrated Mission Profiler/Navigation System on stand-alone IBM PC or in conjunction with mainframe/server system; provides differential GPS track for ship and any submersible vehicles deployed.
Sperry Mark 37 Gyro Compass (stepper output)-on bridge
Sperry Mark 37 Gyro Compass (synchro output)-in Data Acquisition/ROV Lab.
Magnetic Compass with sensor pick-up
Raytheon pathfinder ST A.R.P.A. S-band (10 cm) Radar
Furuno 1221 X-band (3 cm) Radar
(2) Magnavox MX 200 (differential) GPS sets
Sperry SRD 331 Doppler Speed/Distance Log

Communications Equipment:

JRC Satellite Communications System (with Inmarsat "A" public access "seaphone" voice and fax available adjacent to science labs)
Inmarsat "C" (data only)
MSAT (voice, fax and data)
Harris RF-230M SSB HF transceiver
Furuno/Skanti TRP 8258S SSB HF transceiver
Harris RF-104, one kilowatt linear amplifier
Necode model 321AR selcall system
(2) bridge-to-bridge VHF radiotelephones
(4) hand-held VHF radiotelephones
Intra-ship PBX type telephone and intercorn system
Sound-powered telephone system
NAVTEX receiver
Weatherfax
Simrad model 1550 VHF - ADF

Acoustical and Sounding Systems:

ORE-Trackpoint Mod 4410 C Acoustic Positioning System
Straza UQC Model ATM 504-15/TIP or
EDO Model 5400 underwater telephone/transponder
Simrad EQ50 video echosounder,
dual frequency 38/50 kHz
Furuno FE 502 depth recorder
DataMarine 1000 digital depthfinder
12 kHz transducer (for PDR)
3.5 kHz transducer (for sub-bottom profiler)
RDI 150 kHz ADCP
RDI 600 kHz ADCP

Computer and Data Processing:

Network server computers with multiple remote terminals
Mission-required PC computers at various points throughout ship Ethernet LAN
Fibre-optic LAN Video/coax inter-lab distribution

Deck Equipment:

A-frame on stern, 18 ton capacity (ABS-classed) for towed systems or submersible vehicles
A-frame on side, with forward (1.5 tons), center (10 tons), and after (5 tons) lift points
Appleton crane, 10 ton capacity @ 38 foot outreach
Appleton lightweight crane, 5 ton capacity with 20 ft. outreach, installed if required
(2) capstans at stern
New England Trawler anchor windlass (2) anchors and (2) rope heads at bow
Various trawl, hydrographic, conductor, CTD and constant tension tow winches available
Various small boats available; Willard 22 ff. RIB, Whaler 23 ft. Impact, Avons and Whalers

Laboratories and Mission Support facilities:

Dry Lab (468 sq. ft.)
Wet Lab (288 sq. ft.)
Environmental Lab (85 sq. ft.)
Mechanical Maintenance, with mill drill, lathe, sanders, band saw, vise, etc. (272 sq. ft.)
Electronics Lab, with test equipment, spares, etc. (224 sq. ft.)
Video & Computer Lab (136 sq. ft.)
Data Acquisition & R.O.V. Lab (152 sq. ft.)
Briefing room with 1/2 inch and 3/4 inch VCRs, large screen monitor, stereo (192 sq. ft.)
Compressor Room with two Mako 5000 PSI compressors, Haskell Oxygen and Helium pumps
Mako air filters, four T-cylinders (scuba air bank) and 12000 cu. ft. air and oxygen storage.
Recompression Chambers (portable) 1- 48 inch double lock steel 190 PSI and 1 - 60 inch double lock aluminum 100 PSI (installed as required to support scuba operations.)
Real-time, continuous flow uncontaminated seawater sampling system with fluorometry, salinity and temperature measurements with supply of product to the laboratories.
Complete meteorological sensor and data logging system; wet & dry bulb temps., rel. humidity, heat index, true and relative wind, position, wind chill, and solar radiation.

C Publikationen

P1

Assmann, M., Lichte, E., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (1999). New bromopyrrole alkaloid from the marine sponge *Agelas wiedenmayeri*. *Org. Lett.* **1**, 455–457.

P2

Assmann, M., Lichte, E., Pawlik, J. R. & Köck, M. (2000). Chemical defense of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**, 255–262.

P3

Lindel, T., Hochgürtel, M., Assmann, M. & Köck, M. (2000). Synthesis of the marine natural product $N\alpha$ -(4-bromopyrrolyl-2-carbonyl)-*L*-homoarginine, a putative biogenetic precursor of the pyrrole-imidazole alkaloids. *J. Nat. Prod.* **63**, 1566–1569.

New Bromopyrrole Alkaloid from the Marine Sponge *Agelas wiedenmayeri*

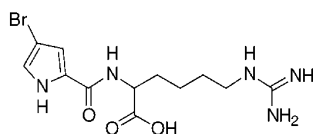
Michael Assmann,[†] Ellen Lichte,[†] Rob W. M. van Soest,[‡] and Matthias Köck*[†]

Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Marie-Curie-Strasse 11, D-60439 Frankfurt, Germany, and Instituut voor Systematiek
en Ecologie, Zoölogisch Museum, P.O. Box 94766, Universiteit van Amsterdam,
1090 GT Amsterdam, The Netherlands

km@org.chemie.uni-frankfurt.de

Received May 13, 1999

ABSTRACT



A detailed analysis of the chemical constituents of a specimen of *Agelas wiedenmayeri* (Alcolado, 1984) was performed. Four brominated alkaloids (1–4) were isolated and one was identified as a new bromopyrrole metabolite. The structure of the new compound, 1, was assigned using spectroscopic methods. Compounds 2 and 3, which are the major brominated metabolites, have been previously described from other *Agelas* sponges. The new compound, 1, may be a biosynthetic precursor for oroidin-like derivatives.

Bromopyrrole-derived alkaloids are well-known in marine sponges of the genus *Agelas*.¹ In our search for bioactive substances from marine organisms, a series of brominated pyrrole alkaloids have been isolated from a specimen of the sponge *Agelas wiedenmayeri* (Alcolado, 1984) collected off the coast of the Florida Keys, FL. Examination of the methanol/dichloromethane extract of this sponge resulted in isolation of the known alkaloids 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid 2, oroidin 3, and bromoageliferin 4 as well as of the new bromopyrrole-derived alkaloid, 4-bromopyrrole-2-carboxyhomoarginine 1 (5 mg, 0.005% of dry weight) (Figure 1). In this communication we describe the isolation and structural elucidation of the new bromopyrrole alkaloid 1. To the best of our knowledge, this is the first report on the chemistry of *Agelas wiedenmayeri*.

[†] Johann Wolfgang Goethe-Universität.
[‡] Universiteit van Amsterdam.

(1) (a) Braekman, J. C.; Daloz, D.; Stoller, C.; van Soest, R. W. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 417–431 and references therein. (b) Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Carnuccio, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 799–804. (c) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13713–13720. (d) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatela-Scafati, O. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3587–3590. (e) Cafieri, F.; Carnuccio, R.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O.; Vallefucio, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2283–2288. (f) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatela-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 122–125.

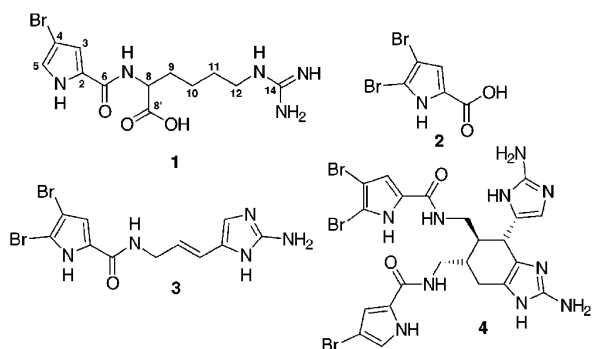


Figure 1. Secondary metabolites of *Agelas wiedenmayeri*.

The marine sponge *Agelas wiedenmayeri* (Alcolado, 1984) investigated in this study was collected in May 1998 by SCUBA diving (19 ft depth) at North Dry Rocks in the Florida Keys, FL. The specimen is composed of short, reddish, thick-walled tubes of up to 3 cm diameter with characteristic keyhole terminations. A voucher specimen is deposited under registration no. ZMA POR. 13505 in the

Zoologisch Museum, Amsterdam, The Netherlands.² Samples of *Agelas wiedenmayeri* were immediately frozen after collection and kept at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until extraction. For bulk extraction followed by isolation of brominated secondary compounds, lyophilized tissue (94.68 g) of *Agelas wiedenmayeri* was ground and extracted at room temperature in methanol/dichloromethane. The orange/brown-colored wet crude extract was partitioned between *n*-hexane (3×500 mL) and methanol (150 mL). The methanol extract was partitioned again between ethyl acetate (3×500 mL) and water (300 mL) and finally the aqueous layer was subsequently extracted with 1-butanol (3×500 mL). The resulting ethyl acetate (2.7 g) and 1-butanol (3.2 g) phases were purified by gel permeation chromatography on Sephadex LH-20 using methanol as eluent. Fractions containing brominated metabolites were collected and monitored by TLC³ and detected by their UV absorbance at 254 or 366 nm. Final purification of the isolated compounds was usually achieved by silica flash column chromatography with a mixture of chloroform/methanol/ammonia (40:20:1 v/v) as eluents. Alternatively, compounds were purified either by preparative HPLC⁴ or by preparative LPLC⁵ using 0.1% trifluoroacetic acid with acetonitrile/water gradients.⁶

Four compounds (**1**–**4**) could be isolated by the described method. The brominated alkaloids 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid **2**, oroidin **3**, and bromoageliferin **4** were identified by comparison of their spectroscopic data with those previously reported.⁷ The FAB mass spectrum (positive ion mode) of **1** showed prominent pseudomolecular ion peaks at m/z 360 and 362 $[\text{M} + \text{H}]^+$ in the ratio 1:1, suggesting the presence of one bromine atom.⁸ The molecular formula

of **1** was established as $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{BrN}_5\text{O}_3$ by HR-FABMS (m/z 362.0660, $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\Delta + 1.0$ mmu) which is in accordance with the ^1H and ^{13}C NMR data. Table 1 summarizes the 1D

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR Spectral Data of **1** in DMSO- d_6 ⁹

position	$\delta(^{13}\text{C})^a$	$\delta(^1\text{H})^b$	COSY ^c	HMBC ^d
N-1	–	11.84 (1H)	5	3
C-2	126.3	–	–	–
C-3	112.1	6.99 (1H)	–	2, 5
C-4	94.9	–	–	–
C-5	121.4	7.00 (1H)	1	3, 4
C-6	159.5	–	–	–
N-7	–	8.20 (1H)	8	6, 8, 9
C-8	51.6	4.32 (1H)	7, 9	6, 8', 9, 10
C-8'	173.6	–	–	–
C-9	30.3	1.71 (2H)	8, 10	8, 8', 10, 11
C-10	22.9	1.36 (2H)	9	–
C-11	28.0	1.48 (2H)	12	10, 12
C-12	40.7	3.09 (2H)	11, 13	10, 11, 14
N-13	–	7.55 (1H)	12	11, 12
C-14	156.6	–	–	–

^a ^1H chemical shifts are referenced to the DMSO- d_6 signal (2.50 ppm).

^b ^{13}C chemical shifts are referenced to the DMSO- d_6 signal (39.5 ppm).

^c The COSY correlations are given for both sides of the diagonal. ^d The HMBC correlations are given from protons to carbons. Further correlations were observed but not used because of a low signal-to-noise ratio or unambiguous assignment. These correlations are not given in the table and were not used in the COCON calculations (H-1 to C-4, H-10 to C-11, and H-11 to C-9).

and 2D NMR data of **1**. The 4-bromopyrrole-2-carboxamide moiety was strongly indicated by the signals at δ 6.99 (H-3) and δ 7.00 (H-5) in the ^1H NMR spectrum (DMSO- d_6) and by the ^{13}C NMR pattern of resonances (δ_{C} 126.3, C-2; δ_{C} 112.1, C-3; δ_{C} 94.9, C-4; δ_{C} 121.4, C-5; δ_{C} 159.5, C-6), which appeared very similar to the values reported in the literature for other *Agelas* bromopyrrole alkaloids.^{1c,7d} The presence of the pyrrole part was also supported by the UV absorption (H_2O) at λ_{max} 271 nm (ϵ 11 500), which is typical for 2-carboxamide-substituted pyrrole chromophores.¹⁰ Furthermore, the ^{13}C NMR data showed characteristic resonances due to four sp^3 methylenes at δ_{C} 40.7, 30.3, 28.0, and 22.9 and two sp^2 quaternary carbons at δ_{C} 156.6 and 173.6. The sp^2 carbon chemical shift (C-14) at δ_{C} 156.6 ppm implied the presence of a guanidino group. This was

(8) Mass spectral analysis (HRFAB-MS) was performed on a JEOL JMS-700 sector-field mass spectrometer with 3-nitrobenzyl alcohol (NBA) as matrix.

(9) ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra were recorded on Bruker AM 250, AMX400 and DRX600 NMR spectrometers. A 5-mg sample of **1** in 0.5 mL DMSO- d_6 was used for the NMR measurements. All NMR experiments were measured at 300 K. The DQF- ^1H , ^1H -COSY and the ^1H , ^{13}C -HSQC experiment were carried out with standard parameters. The ^1H , ^{13}C -HMBC experiment was acquired with 4096 data points in F_2 (acquisition time 228 ms), 256 increments, and 128 acquisitions. The delay for evolution of the heteronuclear long-range couplings was set to 80 ms and the relaxation delay to 1.8 s. The pulse programs were used from the Bruker library.

(10) Jaffe, H. H.; Orchin, M. *Theory and Application of UV Spectroscopy*; Wiley: New York, 1962; pp 350–351. UV/vis spectra were obtained in H_2O using a Perkin-Elmer UV/vis spectrometer Lambda 16.

(2) The consistency of the specimen is firm, and the skeleton offers a well-developed rectangular reticulation of spongin fibers. Primary fibers follow a straight course over large distances, they are about 40–60 μm in diameter and are cored throughout the skeleton by 2–7 spicules in cross section. Secondary fibers connect the primaries at right angles; their diameter is on the average slightly less than that of the primaries, up to about 50 μm , and they are usually uncored. Both primary and secondary fibers are irregularly echinated, in some places frequently with distances of less than 50 μm between the spicules, in other places echinating spicules are rare. Meshes elongate; sizes vary 150–350 \times 50–250 μm ; spicule sizes, 95–140 \times 4–8 μm , with 9–13 whorls of spines. These data conform closely to the description of Alcolado's type.

(3) This was performed on precoated TLC plates with silica gel 60 F₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, Germany) using the same solvent system.

(4) LiChrosorb RP-select B (7 μm), 25 \times 250 mm; E. Merck, Darmstadt, Germany.

(5) Silica Reversed Phase Lobar ready-filled column, LiChroprep RP-8 (40–63 μm), B-size (310–25), E. Merck, Darmstadt, Germany.

(6) For HPLC analysis, samples were injected into a HPLC system equipped with a photodiode-array detector (JASCO, Germany). Routine detection was at 280 nm. The separation column (4.6 \times 250 mm, 5 μm) was prefiltered with Kromasil RP-18 (Knauer GmbH, Germany). Separation was achieved by applying a linear gradient from 20% H_2O (containing 0.1% trifluoroacetic acid) to 60% acetonitrile in 40 min. For extraction, solvents were distilled prior to use, and gradient-grade solvents were used for chromatographic applications.

(7) (a) Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R.; E., F. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1129–1130. (b) Garcia, E. E.; Benjamin, L. E.; Fryer, R. I. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 78–79. (c) Kobayashi, J.; Tsuda, M.; Murayama, T.; Nakamura, H.; Y., O.; Ishibashi, M.; Iwamura, M.; Ohta, T.; Nozoe, S. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5579–5586. (d) Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G., Jr.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2965–2975, errata 5736, 6728. (e) Walker, R. P.; Faulkner, D. J.; van Engen, D.; Clardy, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 6772–6773. (f) Olofson, A.; Yakushijin, K.; Horne, D. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5787–5790.

confirmed by a positive coloration in the Sakaguchi test.¹¹ The signal at δ_{C} 173.6 ppm was attributed to a carboxylate group, further supported by the IR (KBr) absorption band at ν_{max} 1676 cm^{-1} .¹²

In order to evaluate the correctness of the proposed structure **1**, a COCON calculation¹³ with the experimental data (12 COSY¹⁴ and 23 HMBC¹⁵ correlations) was carried out. The bonds of the guanidino group were set fixed due to the positive Sakaguchi test. COCON generated 20 possible structures, containing the homoarginine substructure. For all structural proposals a ¹³C chemical shift calculation was carried out using SpecEdit.¹⁶ The best proposal had a 2,3-substitution pattern of the pyrrole which is not in accordance with the COSY data because no correlation was obtained between H-3 and H-5. One COSY correlation in the homoarginine part was not obtained experimentally (H-10 to H-11). Since this part is fixed due to the HMBC correlations it was predefined and the COCON calculations were repeated with the option that all bonds between two protonated carbons were forbidden if no COSY correlation was observed. With this restriction COCON generated four possible structures (Figure 2).

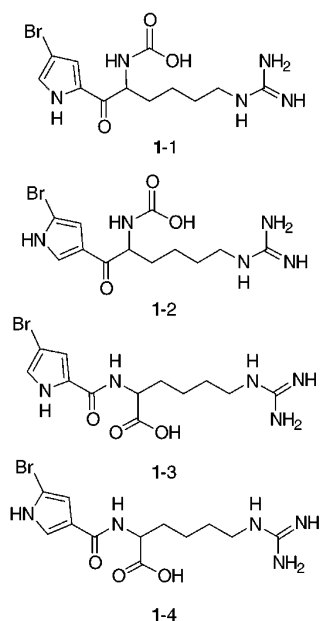


Figure 2. Structural proposals of **1** generated by COCON.

In structures **1-1** (averaged ¹³C chemical shift deviation over all carbon atoms calculated with SpecEdit $\langle\Delta\delta(^{13}\text{C})\rangle = 4.0$ ppm) and **1-2** (7.9 ppm) the NH and the C α of the homoarginine part are exchanged in contrast to structures **1-3** (3.7 ppm) and **1-4** (6.2 ppm). In structures **1-1** and **1-3** the pyrrole substituents are exchanged in comparison to structures **1-2** and **1-4**. This has a more dramatic effect on the averaged ¹³C chemical shift deviations than the exchange of NH and C α . The structures **1-1** and **1-2** can be excluded because these are carbamic acids which are not stable under laboratory conditions. The structural proposal **1-3** is favored by its chemical deviations obtained by SpecEdit calculations and thus supposed to be the correct constitution.

Compound **1** is a condensation product of 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid and homoarginine. This compound is of interest because it does not correspond to the proposed biosynthesis of the oroidin-like alkaloids. The hypothetical biosynthetic pathway is based on the formation of an amide bond between a pyrrole-2-carboxylic acid precursor and an aminopropylimidazole moiety which are both derived from ornithine.^{1a} Therefore, compound **1** may be alternatively a biosynthetic precursor of hymenidin/oroidin-related alkaloids in sponges of the genus *Agelas*. Further investigations of the biosynthesis must validate this hypothesis.

Acknowledgment. Financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ko 1314/3-1 to 3-4) is gratefully acknowledged. Furthermore, we thank Professor Joseph R. Pawlik (Department of Biological Sciences, University of North Carolina Wilmington, NC) for giving M.A. the opportunity to participate in a scientific sojourns to the Florida Keys in May 1998, during which the sponge *Agelas wiedenmayeri* was collected. We thank the staff of the National Undersea Research Center (NURC) at Key Largo, FL, for their cooperation. Finally, we acknowledge the support of Professor Dr. Christian Griesinger.

OL990664H

(11) (a) Hessian, A.; Hoppe, K. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3649–3654. (b) Auterhoff, H.; Kovar, K.-A. *Identifizierung von Arzneistoffen*, 3th ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH: Stuttgart, 1977.

(12) (a) IR (KBr) spectra were recorded on a Perkin-Elmer 1600 Series FT-IR spectrometer. IR (KBr) of **1**: ν_{max} 3406, 3194, 1676, 1637, 1523, 1385, 1205, 1136 cm^{-1} . (b) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1997.

(13) (a) Lindel, T.; Junker, J.; Köck, M. *J. Mol. Model.* **1997**, *3*, 364–368. (b) Lindel, T.; Junker, J.; Köck, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 573–577. (c) Köck, M.; Junker, J.; Maier, W.; Will, M.; Lindel, T. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 579–586.

(14) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229–2246.

(15) Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093–2094.

(16) Maier, W. In *Computer – Enhanced Analytical Spectroscopy*; Wilkens, C. L., Ed.; Plenum Press: New York, 1993; Vol. 4, pp 37–55.

Chemical defenses of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*

Michael Assmann¹, Ellen Lichte¹, Joseph R. Pawlik², Matthias Köck^{1,*}

¹Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt am Main, Germany

²Biological Sciences and Center for Marine Science, University of North Carolina at Wilmington, Wilmington, North Carolina 28403-3297, USA

ABSTRACT: Previous studies have determined that Caribbean reef sponges of the genus *Agelas* are chemically defended from fish predation by brominated pyrrole alkaloids, and that the compounds responsible for this defense have been elucidated for 1 species, *A. clathrodes*. In this study, we expand our understanding of chemical defense in this common sponge genus to include the characterization of defensive metabolites in the tissues of *A. wiedenmayeri* and *A. conifera*. Bioassay-directed isolation of defensive metabolites was undertaken using fish feeding assays carried out in laboratory aquaria and in the field. *A. wiedenmayeri* contained the same 2 major metabolites as *A. clathrodes*, 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**), and oroidin (**2**), in addition to a small amount of bromoageliferin (**7**). The 2 major metabolites were present at higher concentrations in samples of *A. wiedenmayeri* than in *A. clathrodes*, and their relative concentrations were reversed, with *A. wiedenmayeri* on average containing more 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) (2.0 mg ml⁻¹) than oroidin (**2**) (0.8 mg ml⁻¹). *A. conifera* contained a mixture of dimeric bromopyrrole alkaloids dominated by scep-trin (**3**), with <10% each of dibroscep-trin (**5**), bromoageliferin (**7**), dibromoageliferin (**8**), ageliferin (**6**), and brosmocep-trin (**4**). Mean concentration of scep-trin (**3**) in sponge tissue was 5.3 mg ml⁻¹; this compound deterred feeding of reef fish in aquarium assays at 1.0 mg ml⁻¹, the lowest concentration assayed. Scep-trin (**3**) concentrations were higher in sponges collected in the southern Bahama Islands than in those collected in the middle Bahamas, but the reasons for this variation remain unclear. The structure-activity relationship of the pyrrole group was investigated by assaying derivatives of the active metabolites. Feeding deterrent activity of the molecule was enhanced by the addition of bromine to the pyrrole group, but not affected by exchange of the heteroatom from N to O or S. Combining an understanding of the structure-activity relationship of *Agelas* metabolites with an understanding of the variation in these metabolites across the genus may provide insight into the evolution of defensive chemistry in this highly successful taxa of pan-tropical sponges.

KEY WORDS: Chemical defense · Sponge · *Agelas* · Caribbean · Alkaloids · Structure-activity relationship

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Sponges of the genus *Agelas* (Family Agelasidae) are important components of Caribbean coral-reef communities because they are abundant in a variety of habi-

tats from shallow back-reef to deep-reef slope. Chemically, *Agelas* spp. are distinct because they contain primarily brominated pyrrole alkaloids as secondary metabolites, although other classes of compounds have been isolated from this genus (Braekman et al. 1992). The ecological roles of these compounds have only recently been examined. The antipredatory effects of crude organic extracts of 6 species of Caribbean *Agelas* sponges (*A. clathrodes*, *A. conifera*, *A. dispar*, *A. inaequalis*, *A. scep-trum*, *A. wiedenmayeri*) were sur-

*Corresponding author. Present address: Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, 27570 Bremerhaven, Germany.
E-mail: mkoeck@awi-bremerhaven.de

veyed using a common generalist fish, the bluehead wrasse *Thalassoma bifasciatum*, as an assay organism (Pawlik et al. 1995). For *A. clathrodes*, 2 previously described major metabolites, 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**), and oroidin (**2**; Fig. 1), were successfully identified as the deterrent metabolites (Chanas et al. 1996). Besides these 2 brominated alkaloids, a series

of dimeric bromopyrrole alkaloids, the sceptrins and ageliferins, have been isolated from *A. conifera*, *A. sceptrum* and *A. sp.* (Walker et al. 1981, Kobayashi et al. 1990, Keifer et al. 1991). Although it was surmised that the dimeric brominated alkaloids found in other species of *Agelas* from the Caribbean deterred feeding (Pawlik et al. 1995, Chanas et al. 1996), purified compounds were never tested.

We identified the brominated alkaloid metabolites in the feeding deterrent fraction of crude extracts of *Agelas wiedenmayeri* and *A. conifera*. Inter- and intra-specific variation in the concentrations of these metabolites in 5 specimens of *A. wiedenmayeri* and in 24 specimens of *A. conifera* were quantified by HPLC. Purified samples of dimeric bromopyrrole alkaloids isolated from *A. conifera* were tested at a range of concentrations in aquarium and field assays. Building on a recent study of the structure-activity relationship of synthetic oroidin-related alkaloids as feeding deterrents that focused on the 2-amino-imidazole-moiety (Lindel et al. 2000), the present study further investigated the importance of modification of the pyrrole part in altering compound activity.

MATERIALS AND METHODS

Sponge collection and identification. This study was performed over the course of 3 research expeditions: one at the National Undersea Research Center in Key Largo, Florida, USA, in May 1998, one on board the RV 'Edwin Link' in the Bahama Islands in September and October 1998, and one on-board the RV 'Seward Johnson' in the Bahama Islands in July and August 1999. Collection sites in the Bahamas are shown in Fig. 2.

Agelas wiedenmayeri (Alcolado) and *A. conifera* (Schmidt) were collected by SCUBA diving at all sites. Portions of sponges were collected by cutting tissue with a sharp knife, leaving the remaining sponge intact for re-growth. For each species, replicate collections were taken from distant sites (>10 km) to avoid collecting asexually produced clones. Tissue samples were immediately frozen and stored at -20°C until used for extractions. Sponges were identified on the basis of spicule and tissue preparations at the Zoologisch Museum, Universiteit van Amsterdam, The Netherlands (Assmann & van Soest unpubl. results).

Isolation of deterrent metabolites. A freeze-dried sample of *Agelas conifera* (473 g \approx 2400 ml sponge tissue), collected in May 1998 at Elbow Reef, Key Largo, Florida, USA, was extracted 3 times in methanol, twice in 1:1 methanol:dichloromethane, and once in dichloromethane. The organic extracts were combined and evaporated to dryness. The obtained crude extract was partitioned between *n*-hexane and methanol.

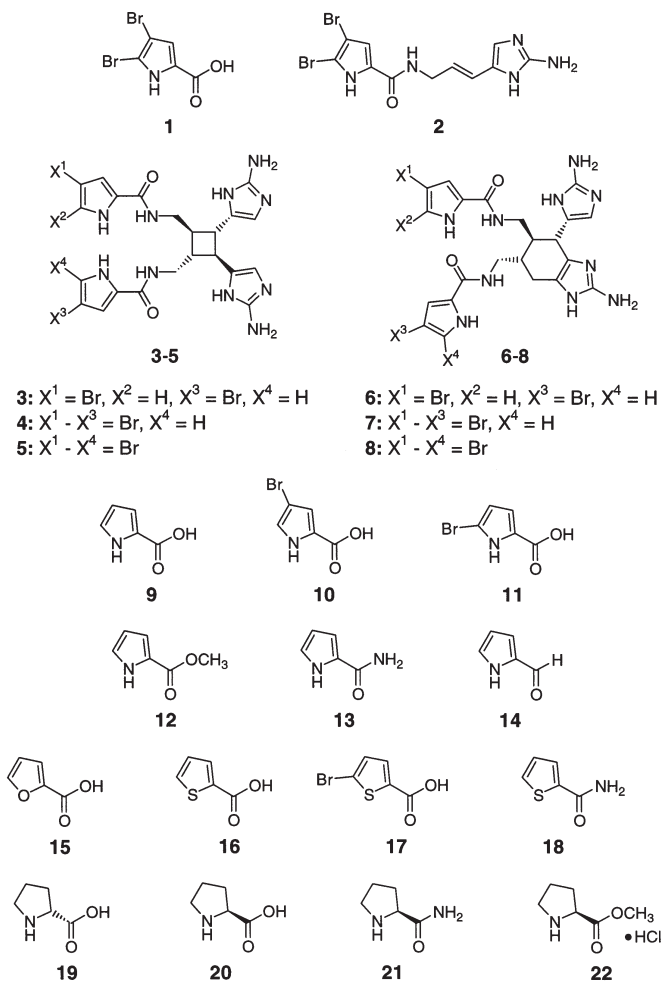


Fig. 1. Secondary metabolites isolated from *Agelas wiedenmayeri* (**1**, **2**, **7**) and *A. conifera* (**3–5**, **6–8**): 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**), oroidin (**2**), sceptrin (**3**), bromosceptrin (**4**), dibromosceptrin (**5**), ageliferin (**6**), bromoageliferin (**7**), dibromoageliferin (**8**). The remaining compounds were used to test structure-activity relationships, and were synthesized (**10–13**, **18**), or purchased (**9**, **14–17**, **19–22**): pyrrole-2-carboxylic acid (**9**), 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid (**10**), 5-bromopyrrole-2-carboxylic acid (**11**), pyrrole-2-carboxylic acid methyl ester (**12**), pyrrole-2-carboxamide (**13**), pyrrole-2-carboxaldehyde (**14**), 2-furancarboxylic acid (**15**), thiophene-2-carboxylic acid (**16**), 5-bromothiophene-2-carboxylic acid (**17**), thiophene-2-carboxamide (**18**), D-proline (**19**), L-proline (**20**), L-prolinamide (**21**), L-proline methyl ester hydrochloride (**22**)

The methanol extract (18.9 g) was partitioned again between *n*-butanol and water. The *n*-butanol phase was concentrated and the residue (10.7 g) was purified by gel chromatography (Sephadex LH-20, methanol). A part of the fraction containing sceptrings and ageliferrins (2.03 g) was further purified by preparative RP-HPLC to yield sufficient amounts of sceptring (3), bromosceptring (4), dibromosceptring (5), ageliferrin (6), bromoageliferrin (7), and dibromoageliferrin (8) for subsequent feeding assays. Isolation of brominated alkaloids from a specimen of *Agelas wiedenmayeri*, which had been collected in May 1998 at North Dry Rocks, Key Largo, was performed using a previously described procedure (Assmann et al. 1999). The isolated bromopyrrole alkaloids of both *A. conifera* and *A. wiedenmayeri* were identified by comparison of mass spectrometry and NMR data with those previously reported (Forenza et al. 1971, Garcia et al. 1973, Walker et al. 1981, Kobayashi et al. 1990, Keifer et al. 1991) as well as on the basis of 2D NMR data (COSY, HSQC, HMBC).

Extraction of crude extracts for quantification of metabolites. Sponge volume was determined by displacement of water or solvent with frozen material. Frozen tissue (*Agelas conifera*), or freeze-dried tissue (approximately 1.9 g freeze-dried material corresponds to 10 ml frozen sponge tissue of *A. wiedenmayeri*), from individual sponge specimens was chopped into small pieces and added to 40 ml of a 1:1 mixture of dichloromethane:methanol in a graduated centrifuge tube to a final volume of 50 ml. Capped tubes were inverted, agitated repeatedly, and shaken at room temperature during 24 h extraction time. After extraction, both phases were filtered and the solvent mixture was evaporated to dryness on a rotary evaporator using low heat (40°C). The remaining tissue was extracted by shaking a second time with methanol for 24 h at room temperature, and the resulting extract was filtered. The organic extracts (methanol extract and dichloromethane:methanol extract) were combined and evaporated. The obtained residue was dissolved in a mixture of 15 ml methanol and 15 ml methanol:dichloromethane and transferred into 50 ml graduated centrifuge tubes. From this mixture a volume of 1.5 ml was kept for subsequent HPLC quantification. The remaining solvent (28.5 ml) was removed by Speed-Vac vacuum concentration and finally dried under vacuum. Three replicate crude extracts of each specimen were prepared in the same way and quantified by HPLC.

Quantification of secondary metabolites by HPLC. From the 1.5 ml volume of each crude extract saved for HPLC quantification, 200 µl were transferred to a vial and the solvent removed by Speed-Vac vacuum concentration. The obtained residue was dissolved in 500 µl acetonitrile:water 1:1 + 0.5% trifluoroacetic acid and 10 µl injected by auto-sampling into a HPLC

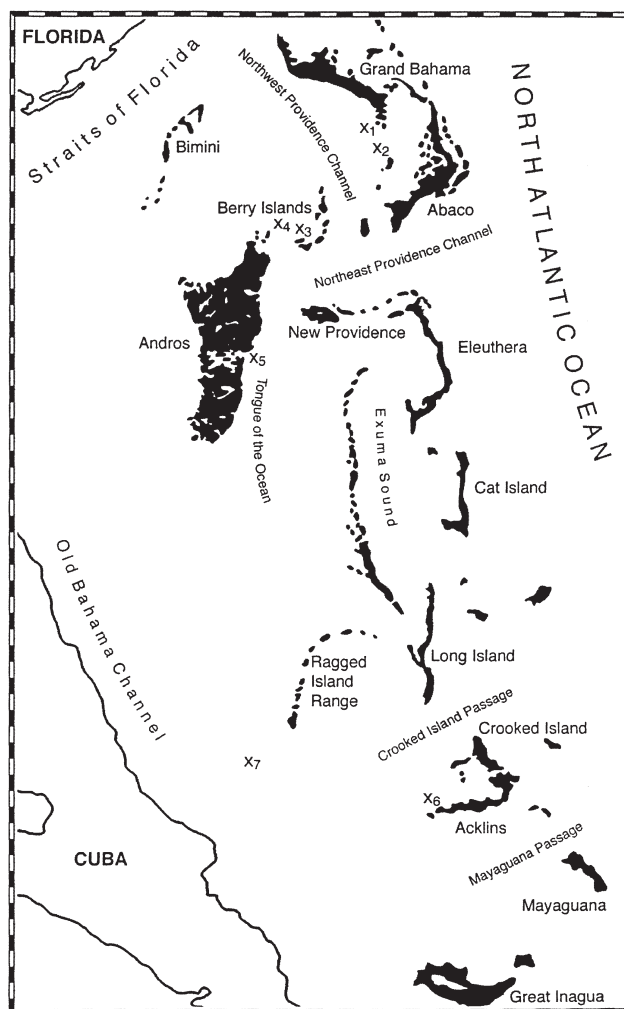


Fig. 2. Map of the Bahama Islands indicating collection sites of *Agelas conifera*. x₁: Sweetings Cay; x₂: Black Rock; x₃: Chub Cay; x₄: 33 km west of Chub Cay; x₅: Behring Point; x₆: Acklins; x₇: Cay Santo Domingo

system equipped with a photodiode-array detector (JASCO). Routine UV detection was at 280 nm. The separation column (analytical: 4.6 × 250 mm, 5 µm) was pre-filled with Kromasil RP-18 (Knauer GmbH) (gradient: 20 to 60% acetonitrile:water + 0.1% trifluoroacetic acid in 40 min; flow rate: 1 ml min⁻¹). Each quantitative analysis based on peak area calibration was achieved using purified sceptring (3) (*Agelas conifera*) or oroidin (2) and 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (1) (*A. wiedenmayeri*) as an external standard.

Synthesis of pyrrole-2-carboxylic acid derivatives. For studying the structure-activity relationship of the pyrrole part of bromopyrrole alkaloids, brominated pyrrole-2-carboxylic acid derivatives were either purchased commercially (9, 14–17, 19–22) or synthesized

(10–13, 18) following procedures previously described by Bailey et al. (1971) and Anderson & Lee (1965). Structures of the compounds were determined by mass spectrometry and NMR spectroscopy.

Aquarium feeding assays. Purified natural or synthetic compounds were dissolved in a minimal volume of methanol and mixed with 1 ml of alginate-based food matrix (Pawlik et al. 1987, 1995) until all organic and water-soluble components were distributed uniformly throughout the paste. The alginate food matrix was then dispensed with a 1 ml syringe into a 0.25 M calcium chloride solution forming a strand that was allowed to harden for 2 min. The hardened strand was rinsed with filtered seawater and cut into 3 mm pellets with a scalpel. Control pellets were prepared identically but without the addition of natural or synthetic compounds. Feeding assays were performed with fish (1 terminal phase and 2 females in each of 10 compartments) in aquaria on board the RV 'Seward Johnson' or at the University of North Carolina at Wilmington using a common predatory reef fish, the bluehead wrasse *Thalassoma bifasciatum*. Rationale for the choice of this assay fish, and an explanation of the methods for scoring the assay and the statistical analysis, is well described in Pawlik et al. (1995). Each replicate assay was performed on a separate group of fish.

Field feeding assay. For field assays, a purified mixture containing sceptrings (3–5) and ageliferingins (6–8) of *Agelas conifera* from a 60 ml volume sponge tissue was dissolved in a minimal volume of methanol and combined with 60 ml of preheated carrageenan-based food (Chanas & Pawlik 1995). Food dyes were added to both treated and control foods to make them the same color. The mixture was then poured into molds crossed by lengths of cotton string and allowed to harden. After hardening, 20 string-embedded strips were cut from the molds. Control strips were prepared identically, but without the addition of bromopyrrole alkaloids. Field assays were conducted on shallow water reefs (<15 m) off the Bahamas (South Bimini, North Turtle Rock) using previously described methods regarding

deployment, retrieval and statistical analyses (Chanas & Pawlik 1995).

RESULTS

It had previously been established that the feeding deterrent activity of crude organic extracts of Caribbean *Agelas* spp. was localized in the brominated pyrrole alkaloid fraction of the extract (Pawlik et al. 1995, Chanas et al. 1996). For *A. wiedenmayeri*, the alkaloid fraction contained 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (1), oroidin (2), and bromoageliferin (7), in the approximate mixture of 63, 28 and 9%, respectively. For *A. conifera*, the fraction contained dimeric alkaloids in the approximate proportion of 68% sceptring (3), 9% dibromosceptring (5), 8% bromoageliferin (7), 6% dibromoageliferin (8), 5% ageliferin (6), and 4% bromosceptring (4).

The major metabolites in the alkaloid mixtures for both sponges were quantified by HPLC for 5 specimens of *Agelas wiedenmayeri* and for 24 specimens of *A. conifera* (Tables 1 & 2). Mean concentrations of 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (1) and oroidin (2) in the 2 samples of *A. wiedenmayeri* were 2.00 and 0.82 mg ml⁻¹, respectively. Concentrations of oroidin in the 2 sponge samples from Cay Sal Bank (Bahamas) were much higher than those from Key Largo, Florida, but the low sample number precluded statistical analysis.

The mean concentration of sceptring (3) in all samples of *A. conifera* was 5.3 mg ml⁻¹ (Table 2). When the data were subdivided into 3 sets of samples collected in the northern Bahamas, middle Bahamas, and southern Bahamas, a significant difference in mean sceptring content was found between the middle and southern collections, but not between the northern and southern collections or the northern and middle collections (ANOVA, $F_{2,21} = 4.03$, $p < 0.05$; Tukey multiple comparison, $\alpha = 0.05$; Zar 1999).

The 4 major bromopyrrole alkaloids present in the feeding deterrent fraction from the crude organic ex-

Table 1. Concentration of 4,5-dibromopyrrole-2 carboxylic acid (1) and oroidin (2) in samples of *Agelas wiedenmayeri* from the Florida Keys* and the Bahamas**

Sample	Location	Date (d.mo.yr)	Depth (m)	4,5-dibromo-pyrrole-2-carboxylic acid (mg ml ⁻¹) mean ± SD	Oroidin (mg ml ⁻¹) mean ± SD
MAWIE1	North Dry Rocks*	26.05.1998	9	2.51 ± 0.14	0.10 ± 0.03
MAWIE2	Conch*	29.05.1998	16	1.65 ± 0.16	0.72 ± 0.01
MAWIE3	North Dry Rocks*	23.05.1998	6	2.42 ± 0.15	0.20 ± 0.06
MAB146	Cay Sal Bank**	08.08.1999	6	1.83 ± 0.20	1.86 ± 0.36
MAB147	Cay Sal Bank**	08.08.1999	6	1.61 ± 0.76	1.23 ± 0.95
Mean				2.00 ± 0.43	0.82 ± 0.75

Table 2. Concentration of scep trin (3) in samples of *Agelas conifera* from the Bahamas

Sample	Location	Date (d.mo.yr)	Depth (m)	Scep trin (mg ml ⁻¹) mean ± SD
Northern Bahamas				
MAB23	Black Rock	18.09.1998	5	7.0 ± 4.6
MAB03	Sweetings Cay	16.09.1998	18	4.1 ± 2.0
MAB76	Sweetings Cay	29.07.1999	18	3.7 ± 3.4
MAB14	Sweetings Cay	17.09.1998	19	5.8 ± 0.2
Mean				5.15 ± 1.53
Middle Bahamas				
MAB35	Chub Cay	19.09.1998	4	3.3 ± 1.7
MAB38	Chub Cay	19.09.1998	11	5.2 ± 0.4
MAB85	Chub Cay	30.07.1999	16	3.3 ± 0.3
MAB87	Chub Cay	30.07.1999	17	7.7 ± 1.4
MAB32	Chub Cay	19.09.1998	18	3.3 ± 1.6
MAB86	Chub Cay	30.07.1999	18	5.1 ± 0.2
MAB29	Chub Cay	19.09.1998	20	2.9 ± 1.4
MAB84	Chub Cay	30.07.1999	20	3.5 ± 0.9
MAB26	Chub Cay	19.09.1998	21	3.1 ± 3.6
MAB28	Chub Cay	19.09.1998	21	5.2 ± 1.4
MAB25	Chub Cay	19.09.1998	22	4.0 ± 0.9
MAB93	Chub Cay	30.07.1999	24	8.9 ± 1.8
MAB43	33 km west of CC	21.09.1998	18	3.3 ± 1.0
MAB100	Behring Point	31.07.1999	18	6.6 ± 2.1
MAB102	Behring Point	31.07.1999	19	5.4 ± 0.2
MAB101	Behring Point	31.07.1999	22	4.8 ± 0.3
Mean				4.73 ± 1.77
Southern Bahamas				
MAB144	Cay Santo Domingo	07.08.1999	20	8.7 ± 0.7
MAB130	Acklins Island	05.08.1999	21	4.3 ± 0.5
MAB129	Acklins Island	05.08.1999	23	11.0 ± 0.1
MAB131	Acklins Island	05.08.1999	30	7.1 ± 1.1
Mean				7.78 ± 2.82
Grand mean				5.30 ± 2.16

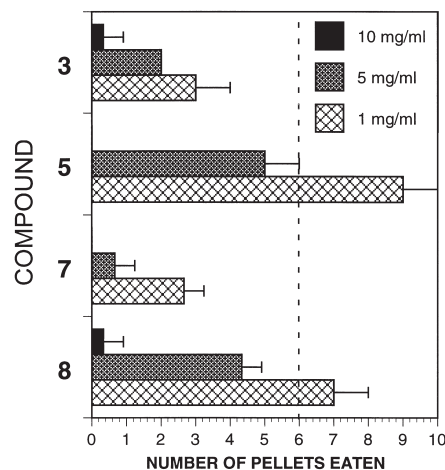


Fig. 3. Aquarium assay results of feeding by *Thalassoma bifasciatum* on pellets treated with scep trin (3), dibromoscep trin (5), bromoageliferin (7), and dibromoageliferin (8) isolated from *Agelas conifera* at concentrations of 1, 5, and 10 mg ml⁻¹. All control pellets were eaten in all assays. Three replicate assays were performed at each concentration. One SD above the mean number of food pellets eaten is indicated. For any individual assay, a treatment was considered deterrent if the number of pellets eaten was less than or equal to 6 ($p < 0.043$, Fisher exact test, 1-tailed) as indicated by the dashed line

tract of *Agelas conifera* were isolated, purified, and subjected to feeding assays at concentrations of 1, 5 and 10 mg ml⁻¹ (Fig. 3). Scep trin (3) and bromoageliferin (8) were deterrent at all 3 concentrations, while dibromoscep trin (5) and dibromoageliferin (8) deterred feeding in aquarium assays at 5 and 10 mg ml⁻¹, but not at 1 mg ml⁻¹ (Fig. 3). Only the major metabolite scep trin (3) deterred fish feeding within the range of natural concentrations (Table 2). Scep trin (3) was subsequently tested at lower concentrations and was not significantly deterrent: 8 of 10 pellets eaten at 0.8 mg ml⁻¹ and 10 of 10 pellets eaten at 0.5 mg ml⁻¹.

A reconstituted mixture of purified dimeric bromopyrrole alkaloids from *Agelas conifera* deterred feeding of a natural assemblage of reef fish in a field assay (Fig. 4). This assay was performed at a total natural compound concentration of 1.5 mg ml⁻¹, with the following compound proportions approximating those found in sponge tissue by HPLC quantification: scep trin (3) (1.02 mg ml⁻¹), dibromoscep trin (8) (0.13 mg ml⁻¹), bromoageliferin (7) (0.12 mg ml⁻¹), dibromo-

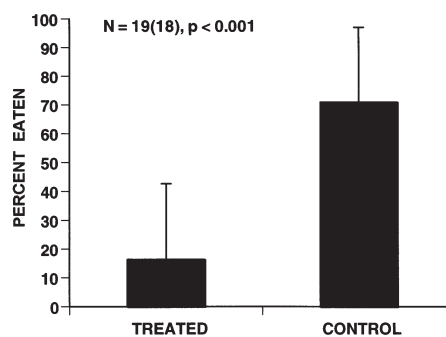


Fig. 4. Consumption by reef fishes of food strips treated with a purified mixture isolated from *Agelas conifera* containing only dimeric bromopyrrole alkaloids at natural concentrations and control food strips in a field assay. The tested mixture contained 68.3% scep trin (3), 8.6% dibromoscep trin (5), 7.7% bromoageliferin (7), 6.1% dibromoageliferin (8), 4.7% ageliferin (6), and 3.5% bromoscep trin (4). Mean + 1 SD indicated. p-value computed using Wilcoxon paired-sample test (2-tailed); N = number of ropes retrieved out of 20 ropes deployed (number of ropes used in statistical analysis)

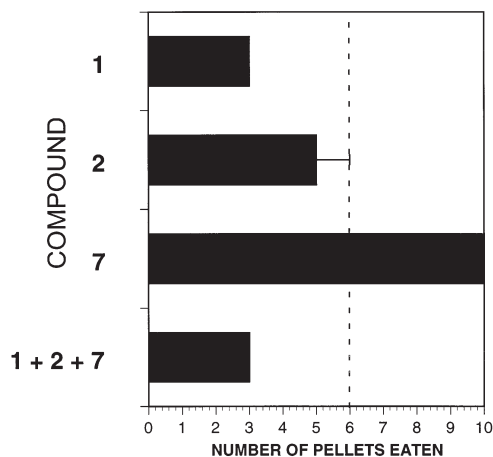


Fig. 5. Aquarium assay results of feeding by *Thalassoma bifasciatum* on pellets treated with purified bromopyrrole alkaloids isolated from *Agelas wiedenmayeri* at natural concentrations: 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) at 1.6 mg ml⁻¹, oroidin (**2**) at 0.7 mg ml⁻¹, and bromoageliferin (**7**) at 0.24 mg ml⁻¹. All control pellets were eaten in all assays. Three replicate assays were performed at each concentration. Mean + 1 SD indicated. For any individual assay, a treatment was considered deterrent if the number of pellets eaten was less than or equal to 6 ($p < 0.043$, Fisher exact test, 1-tailed) as indicated by the dashed line

ageliferin (**8**) (0.09 mg ml⁻¹), ageliferin (**6**) (0.07 mg ml⁻¹), bromosceptrin (**4**) (0.05 mg ml⁻¹).

The purified bromopyrrole alkaloids from *Agelas wiedenmayeri* were subjected to aquarium assays separately and in combination (Fig. 5). At natural concentrations of 1.6 and 0.7 mg ml⁻¹, 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) and oroidin (**2**) were deterrent when assayed separately, but bromoageliferin (**7**) was not deterrent at 0.24 mg ml⁻¹ when assayed separately. The activity of all 3 metabolites combined was about the same as that for 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) alone (Fig. 5).

Initial results of the structure-activity relationship of pyrrole-2-carboxylic acid derivatives were obtained. Activity of the molecule was enhanced with addition of bromine to the pyrrole group (compare **9**, **10**, **11**, **1**; Fig. 6). Compound activity was not affected by the exchange of the heteroatom from N to O or S (compare **9**, **15**, **16**, **11**, **17**; Fig. 6), whereas none of the proline derivatives were active at 100 mg ml⁻¹ (**9** compared to **19**, **20**; Fig. 6). Modification of the carboxy group did not lead to an unambiguous change in activity (**9** compared to **12–14**).

DISCUSSION

Sponges of the genus *Agelas* appear to protect themselves from fish predators using chemical defenses,

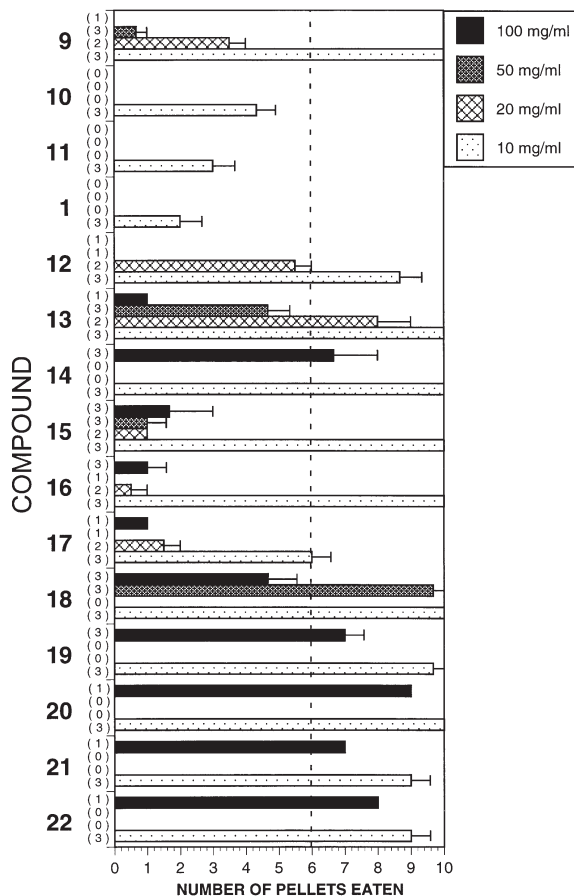


Fig. 6. Aquarium assay results of feeding by *Thalassoma bifasciatum* on pellets treated with 1 purified compound from *Agelas wiedenmayeri*, and synthetic and purchased compounds used to assess structure-activity relationships (see Fig. 1) at concentrations of 10, 20, 50, and 100 mg ml⁻¹. All control pellets were eaten in all assays. The number of replicate assays is shown in parentheses to the right of each compound number. Mean + SE indicated. For any individual assay, a treatment was considered deterrent if the number of pellets eaten was less than or equal to 6 ($p < 0.043$, Fisher exact test, 1-tailed) as indicated by the dashed line

because structural defenses alone, in the form of spongin fibers and glass spicules, were ineffective feeding deterrents in aquarium and field assays (Chanas & Pawlik 1995, 1996). The present study expands on a previous report (Chanas et al. 1996) that identified 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) and oroidin (**2**) as the defensive metabolites of *A. clathrodes* to demonstrate that the same metabolites protect *A. wiedenmayeri*, and that related, dimeric metabolites protect *A. conifera*.

Similarities in the secondary metabolites found in *Agelas clathrodes* and *A. wiedenmayeri* versus *A. conifera* parallel differences in the silicious spicules found

in the tissues of the 3 species of sponges (Wiedenmayer 1977, Assmann et al. 1999). Although shape, size, and color of all 3 *Agelas* species are distinctly different, *A. clathrodes* and *A. wiedenmayeri* appear more closely related based on similar spicule sizes: 95 to 140 × 4 to 8 μm, with 9 to 13 whorls of spines for *A. wiedenmayeri*, and 70 to 155 × 2.5 to 7.5 μm with 7 to 15 whorls of spines for *A. clathrodes*. For *A. conifera*, spicules are clearly longer and thicker (117 to 192 × 10 to 16 μm) and the whorls are more numerous (11 to 19) than in *A. clathrodes* and *A. wiedenmayeri*.

Although the same metabolites are found in *Agelas wiedenmayeri* as in *A. clathrodes*, the relative concentrations are different. Mean oroidin (**2**) concentrations in *A. clathrodes* were 1.4 mg ml⁻¹, with concentrations of 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) that were estimated at 25% of those of oroidin (**2**) (Chanas et al. 1996). In contrast, for 4 of 5 samples of *A. wiedenmayeri*, concentrations of 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) exceeded those of oroidin (**2**), and in the remaining sample, the concentrations were about the same (Table 1). The combined mean concentration of both of these metabolites was greater in samples of *A. wiedenmayeri* (~2.82 mg ml⁻¹) than in *A. clathrodes* (~1.75 mg ml⁻¹). Considering that 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) and oroidin (**2**) were deterrent at 1.6 and 0.7 mg ml⁻¹, respectively (Fig. 5), the former compound was present in sufficient quantity in all samples of *A. wiedenmayeri* to inhibit feeding (Table 1); in combination with the latter compound, the effect is most likely additive, as a synergistic response to the mixture was not evident (Fig. 5). There was no evidence of synergy when combinations of brominated pyrrole alkaloids were tested in a previous study (Lindell et al. 2000). Although bromoageliferin (**7**) was present in samples of *A. wiedenmayeri*, its concentration was very low (<10% of the bromopyrrole alkaloid fraction), and its impact of the feeding deterrent effect of the mixture was negligible (Fig. 5).

Unlike *Agelas clathrodes* and *A. wiedenmayeri*, *A. conifera* is chemically defended by dimeric bromopyrrole alkaloids (Fig. 1). This suite of compounds (**3–8**) appear to be more potent feeding deterrents than either 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) or oroidin (**2**) (compare Figs. 3, 5 & 6), perhaps because each dimeric molecule contains 2 brominated pyrrole groups rather than just one. With more potent chemical defenses on a per molecule basis, it might be expected that *A. conifera* would have lower concentrations of these compounds than *A. clathrodes* or *A. wiedenmayeri*; on the contrary, scep trin (**3**) concentrations alone in *A. conifera* are about twice those of 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**) and oroidin (**2**) in *A. wiedenmayeri* (Tables 1 & 2). Moreover, there were higher levels of scep trin (**3**) in samples of *A. conifera* taken from the

southern Bahamas than those taken from sites around the 'Tongue of the Ocean', a deep body of water that is mostly enclosed by land and the Great Bahama Bank in the middle Bahamas. Fluctuations in scep trin (**3**) concentrations were not compensated by changes in the concentrations of the other dimeric compounds identified from this species to yield equivalent total concentrations; HPLC analysis revealed that the proportion of the minor compounds fluctuated proportionally to scep trin (**3**). It is unclear whether differences in scep trin (**3**) concentration reflect differences in predation pressure, or perhaps differences in water quality or flow associated with geography.

The first systematic investigation of the structure-activity relationship between marine natural products and fish feeding deterrents was performed for brominated pyrrole alkaloids from *Agelas* spp. (Lindell et al. 2000). The present study expands on the importance of the pyrrole moiety for fish feeding inhibition by demonstrating the importance of the unsaturated 5-membered ring (pyrrole). Substitution of the heteroatom in the ring did not greatly affect compound activity, but the loss of unsaturation resulted in the loss of activity (Fig. 6). The importance of bromination was clearly demonstrated, as compound palatability increased with each loss of a bromine atom from the pyrrole (Fig. 6). Dimerization of oroidin (**2**) does not appear to alter compound activity; in fact, the brominated pyrrole groups appear to retain their independent activity to increase the potency of the dimerized compounds (**3–8**). Comparing the relative feeding deterrent activities of the major naturally occurring metabolites at 1 mg ml⁻¹ concentrations, but expressed as mol ml⁻¹, a hierarchy of activity can be determined: bromoageliferin (**7**) = scep trin (**3**) > dibromoageliferin (**8**) = dibromoscep trin (**5**) > oroidin (**2**) > 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid (**1**). Although dibromoageliferin (**8**), dibromoscep trin (**5**) and bromoageliferin (**7**) are potent feeding deterrents, they are present in only trace amounts in sponge tissue, at concentrations lower than would be required to deter feeding. Scep trin (**3**) is the only dimeric compound present in sponge tissue at concentrations sufficient to defend *A. conifera*. The minor dimeric compounds may represent metabolic byproducts.

These results extend our understanding of the chemical basis of the ecological functions of bromopyrrole alkaloids in marine sponges and confirm the importance of the presence and arrangement of functional groups to compound activity.

Acknowledgements. Financial support for this research was provided by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ko 1314/3-1 to 3-4) and from the US National Science Foundation (OCE-9711255 to J.R.P.). The latter included University-National Oceanographic Laboratory System support for the use of the RVs 'Edwin Link' and 'Seward Johnson'. We

are grateful to Rob W. M. van Soest (Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoölogisch Museum, Universiteit van Amsterdam, The Netherlands) for his expert help with sponge identification. Greg McFall, Dan Pisut and Tim Henkel at the University of North Carolina at Wilmington assisted with feeding assays. We thank the captain and the crew of the RV 'Edwin Link', the RV 'Seward Johnson', and the staff of the National Undersea Research Center at Key Largo, Florida, USA, for their cooperation. We thank the government of the Bahamas for permission to perform research in their territorial waters.

LITERATURE CITED

- Anderson HJ, Lee SF (1965) Pyrrole chemistry. IV. The preparation and some reactions of brominated pyrrole derivatives. *Can J Chem* 43:409–414
- Assmann M, Lichte E, van Soest RWM, Köck M (1999) New bromopyrrole alkaloid from the marine sponge *Agelas wiedenmayeri*. *Org Lett* 1:455–457
- Bailey DM, Johnson RE, Albertson NF (1971) Ethyl pyrrole-2-carboxylate. *Org Syn* 51:100–102
- Braekman JC, Dalozze D, Stoller C, van Soest RWM (1992) Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). *Biochem Syst Ecol* 20:417–431
- Chanas B, Pawlik JR (1995) Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. II. Spicules, tissue toughness, and nutritional quality. *Mar Ecol Prog Ser* 127:195–211
- Chanas B, Pawlik JR (1996) Does the skeleton of a sponge provide a defense against predatory reef fish? *Oecologia* 107:225–231
- Chanas B, Pawlik JR, Lindel T, Fenical W (1996) Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J Exp Mar Biol Ecol* 208:185–196
- Forenza S, Minale L, Riccio R, Fattorusso E (1971) New bromo-pyrrole derivatives from the sponge *Agelas oroides*. *J Chem Soc Chem Comm* 1129–1130
- Garcia EE, Benjamin LE, Fryer RI (1973) Reinvestigation into the structure of oroidin, a bromopyrrole derivative from marine sponge. *J Chem Soc Chem Comm* 78–79
- Keifer PA, Schwartz RE, Koker MES, Hughes RG Jr, Rittschof D, Rinehart KL (1991) Bioactive bromopyrrole metabolites from the Caribbean sponge *Agelas conifera*. *J Org Chem* 56:2965–2975, errata 5736, 6728
- Kobayashi J, Tsuda M, Murayama T, Nakamura H, Ohizumi Y, Ishibashi M, Iwamura M, Ohta T, Nozoe S (1990) Ageliferins, potent actomyosin ATPase activator from the Okinawan marine sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron* 46:5579–5586
- Lindel T, Hoffmann H, Hochgürtel M, Pawlik JR (2000) Structure-activity relationship of the inhibition of fish feeding by sponge-derived and synthetic pyrrole-imidazole alkaloids. *J Chem Ecol* 26:1477–1496
- Pawlik JR, Burch MT, Fenical W (1987) Patterns of chemical defense among Caribbean gorgonian corals: a preliminary survey. *J Exp Mar Biol Ecol* 108:55–66
- Pawlik JR, Chanas B, Toonen RJ, Fenical W (1995) Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar Ecol Prog Ser* 127:183–194
- Walker RP, Faulkner DJ, van Engen D, Clardy J (1981) Scepterin, an antimicrobial agent from the sponge *Agelas scepterum*. *J Am Chem Soc* 103:6772–6773
- Wiedenmayer F (1977) Shallow-water sponges of the western Bahamas. *Experientia Suppl* 28. Birkhäuser Verlag, Stuttgart
- Zar JH (1999) *Biostatistical analysis*, 4th edn. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ

Editorial responsibility: Otto Kinne (Editor), Oldendorf/Luhe, Germany

Submitted: March 12, 2000; Accepted: August 15, 2000
Proofs received from author(s): September 21, 2000

Synthesis of the Marine Natural Product $N\alpha$ -(4-Bromopyrrolyl-2-carbonyl)-L-homoarginine, a Putative Biogenetic Precursor of the Pyrrole–Imidazole Alkaloids

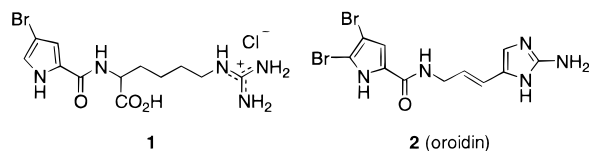
Thomas Lindel,^{*,†} Matthias Hochgürtel,[†] Michael Assmann,[‡] and Matthias Köck^{*,‡,⊥}

Pharmazeutisch-chemisches Institut der Universität, INF 364, D-69120 Heidelberg, Germany, and Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Marie-Curie-Strasse 11, D-60439 Frankfurt, Germany

Received April 12, 2000

Lysine is proposed as an alternative biosynthetic precursor of the pyrrole–imidazole alkaloids frequently found in marine sponges. As a putative key intermediate, the natural product $N\alpha$ -(4-bromopyrrolyl-2-carbonyl)-L-homoarginine (**1**) from the sponge *Agelas wiedenmayeri* was synthesized in the solid phase starting from Fmoc/Pmc-protected L-homoarginine and in solution starting from readily available L-lysine methyl ester.

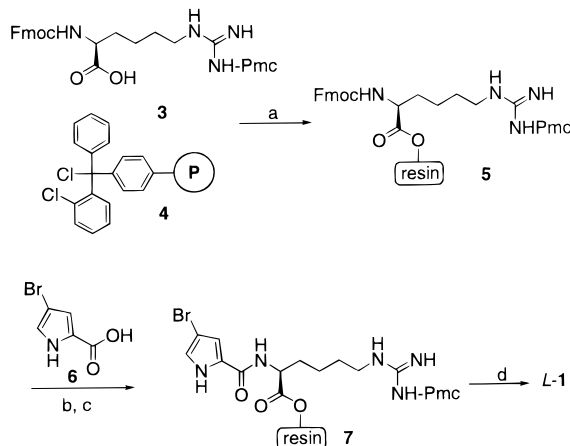
Pyrrole–imidazole alkaloids continue to be isolated from marine sponges and represent one of the most prominent groups of natural products exclusive to the marine environment.¹ The underlying C₁₁N₅ building block consists of a pyrrolyl-2-carbonyl unit being connected via an amide linkage to a 2-amino-5-(3-amino)propylimidazole partial structure. Recently, $N\alpha$ -(4-bromopyrrolyl-2-carbonyl)-homoarginine (**1**) was isolated from the marine sponge *Agelas wiedenmayeri*,^{2a} together with known pyrrole–imidazole alkaloids such as oroidin (**2**).³ In this paper, we describe solid-^{2b} and solution-phase syntheses of **1** and the determination of its absolute configuration. After the discovery of the aplysinamisinines I and II from *Aplysina cauliformis*,⁴ **1** and **2** constitute a new pair of natural products pointing at a biogenetic relationship between lysine and 2-amino-5-(3-amino)propenylimidazoles in marine sponges. Oroidin (**2**) contributes to the survival of the genus *Agelas* by protecting the sponge against predation by the reef fish *Thalassoma bifasciatum*.⁵



The solid-phase synthesis of **1** (Scheme 1) was achieved starting from (Fmoc/Pmc)-protected L-homoarginine (**3**), which was coupled to 2-chlorotrityl chloride polystyrene resin (**4**), forming compound **5**. After removal of the Fmoc-protecting group with 40% piperidine in DMF, 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid (**6**) was attached using DIC/HOBt as coupling reagents. Finally, treatment of the product **7** with 98% TFA led to the removal of the Pmc group and to the cleavage of $N\alpha$ -(4-bromopyrrolyl-2-carbonyl)-L-homoarginine (**L-1**) from the resin. The overall yield was 72%.

Alternatively, reaction of L-lysine methyl ester (**8**, Scheme 2) with the bis-Boc-protected pyrazole-1*H*-carboxamide

Scheme 1. Solid-Phase Synthesis of **L-1**^a



^a (a) **4**, CH₂Cl₂, *i*-Pr₂NEt, room temperature, 3 h; (b) piperidine/DMF, room temperature, 3 × 20 min; (c) **6**, DIC, HOBt, DMF, room temperature, 5 h; (d) TFA, room temperature, 30 min, 72% from **3**.

11⁶ regioselectively gave the protected homoarginine **12**, which was further converted to the methyl ester **14** via reaction with the pyrrolyltrichloromethyl ketone **13**.⁷ Treatment of **14** with HCl(g)/Et₂O led to the selective removal of the Boc groups. Hydrolysis with 8 N HCl provided the natural product **L-1** as the hydrochloride in 60% overall yield. Reaction of **8** with **9** in acetonitrile/*N,N*-diisopropylethylamine⁸ led to the selective acylation of the ϵ -amino group to **10**.

The UV maxima of **1** in aqueous phosphate buffer, pH 7, were observed at 272 (ϵ 3.99) and 202 (ϵ 3.89) nm, while the CD spectrum (Figure 1) exhibited only one significant minimum. The still undetermined absolute configuration of the natural product **1** was established as **L** on the basis of negative Cotton effects at 216 nm ($\Delta\epsilon$ -1.6) for the synthetic **L-1** and at 214 nm ($\Delta\epsilon$ -1.6) for the natural product **1**. At 270 nm, the CD is not intense enough to be useful for the assignment of the absolute stereochemistry of the $N\alpha$ -pyrrolylcarbonyl amino acid **1**; **L-1** shows a negative optical rotation.

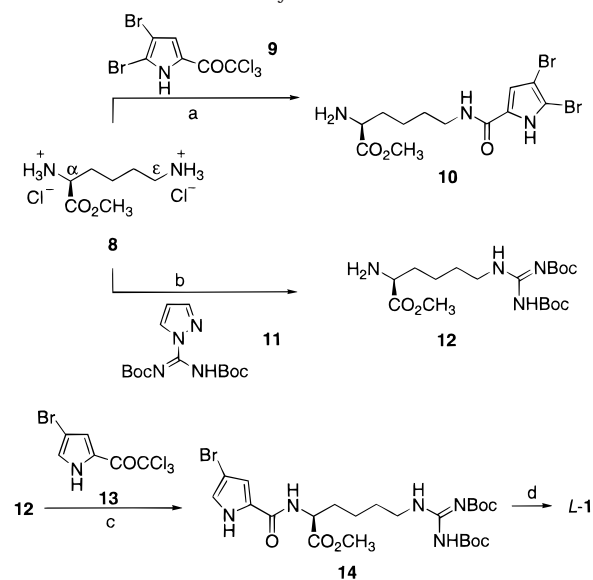
Several alternatives have been discussed with regard to the biosynthesis of the pyrrole–imidazole alkaloids. While the pyrrole part is generally expected to derive from

* To whom correspondence should be addressed. (T.L.) Tel.: + 49(0)-6221/54-4857. Fax: + 49(0)6221/54-6430. E-mail: thomas.lindel@urz.uni-heidelberg.de. (M.K.) Tel.: + 49(0)69/798-29143. Fax: + 49(0)69/798-29128. km@org.chemie.uni-frankfurt.de.

[†] Pharmazeutisch-chemisches Institut der Universität.

[‡] Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität.

[⊥] Present address: Alfred-Wegener-Institut, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven. E-mail: mkoeck@awi-bremerhaven.de.

Scheme 2. Solution-Phase Synthesis of L-1^a

^a (a) **9**, *i*-Pr₂NEt, CH₃CN, room temperature, 3 h, 75%; (b) **11**, *i*-Pr₂NEt, CH₃CN, room temperature, 24 h, 80%; (c) **13**, *i*-Pr₂NEt, CH₃CN, 24 h, 89%; (d) 8 N HCl, room temperature, 4 h, 85%.

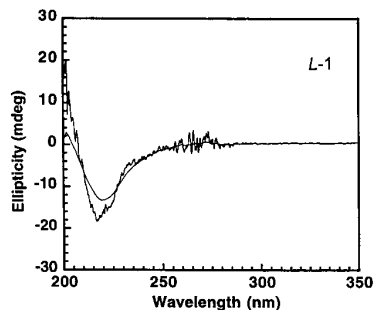


Figure 1. CD spectrum of synthesized natural product L-1 (2,2,2-trifluoroethanol, *c* = 1.5 mM).

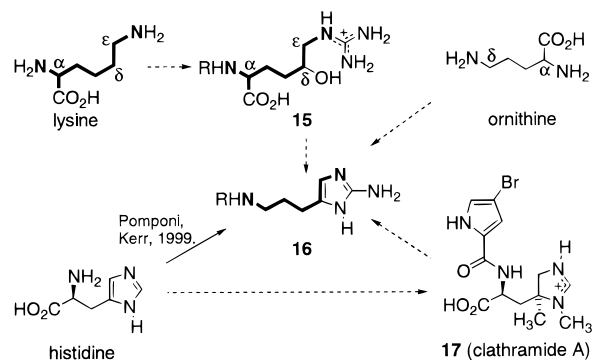


Figure 2. Proposal of the lysine-derived δ -hydroxyhomoarginine (**15**) as an alternative biogenetic precursor of the 2-amino-5-(3-amino)propylimidazole.

proline/ornithine, different proposals have been put forward for the 2-amino-5-(3-amino)propylimidazole part. Recently, the first experimental study on the biosynthesis of the pyrrole-imidazole alkaloid stevensine was performed by Pomponi, Kerr, and co-workers.⁹ The incorporation of histidine might proceed via an analogue of clathramide A¹⁰ (**17**, Figure 2) isolated from the oroidin source *Agelas clathrodes*. The *C*-methylation of the imidazoline

ring of **17** could provide the carbon atom required for chain elongation, for example, via a cyclopropanoid intermediate. Kitagawa et al.¹¹ and Braekman et al.¹² proposed ornithine as a biogenetic precursor, with the carboxyl carbon atom being incorporated into the imidazole ring and the α - and δ -amino groups incorporated into the imidazole ring and the side chain, respectively.

The discovery of the aplysinamisines and of the homoarginine derivative **1**, together with the co-occurrence of lysine and bromopyrroles in marine sponges,¹³ points to the existence of an alternative biosynthesis (Figure 2). In analogy to the role of 4-hydroxyarginine as a biosynthetic precursor of the 2-aminoimidazoline anatoxin-a(s),¹⁴ δ -hydroxyhomoarginine (**15**) is postulated as an intermediate in the biosynthesis of 5-(3-aminopropyl)-2-aminoimidazoles. Intramolecular cyclization of **15** would lead to a 2-aminoimidazoline, which would be further oxidized and undergo decarboxylation. The aminohomohistamine **16** with its saturated side chain is a partial structure of the marine natural product aerophobin-2 from *Aplysina aerophoba*.¹⁵ Horne et al. have shown that by oxidation of **16** (*R* = dibromopyrrolyl-2-carbonyl) the vinyl double bond of oroidin (**2**) can be introduced.¹⁶ The formation of the putative intermediate **15** could occur via the guanidinylation of lysine to an analogue of the natural product **1**, followed by δ -hydroxylation.

Experimental Section

General Experimental Procedures. The melting points are uncorrected. NMR chemical shifts refer to those of residual solvent signals based on $\delta_{\text{TMS}} = 0$. FABMS were obtained with nitrobenzyl alcohol as matrix. Solvents were purified and dried according to standard procedures.¹⁷ Column chromatography was carried out on Si gel 60 (60–200 mesh, Merck) and on Sephadex LH-20 (Pharmacia). HPLC separation columns (analytical: 4.6 \times 250 mm, 5 μm ; preparative: 20 \times 250 mm, 7 μm) were pre-filled with Kromasil RP₁₈ (Knauer GmbH). CD spectra were obtained using the JASCO spectropolarimeter J-710. Thin-layer chromatography (TLC) was performed on Si gel (precoated Si gel plate F₂₅₄ Merck).

4-Bromopyrrole-2-carboxylic Acid (6). Ethyl pyrrole-2-carboxylate¹⁸ was brominated and then hydrolyzed according to Anderson and Lee.¹⁹ After purification by preparative reversed-phase HPLC (gradient: 5 min A, 0–40% B in 45 min; A: 10% MeCN/H₂O + 0.1% TFA, B: 100% MeCN + 0.1% TFA; flow rate 10 mL/min) **6** was frozen in liquid nitrogen and freeze-dried to afford 1.19 g (33%) of a white-gray powder; mp 142 °C (dec); *t*_R 12.73 min (gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; flow rate 1 mL/min); UV (MeOH) λ_{max} (log ϵ) 264 (4.05) nm; IR (KBr) ν_{max} 3357, 3133, 2924, 1685, 1550, 1432, 1366, 1326, 1206, 1121 cm⁻¹; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 12.11 (1H, NH), 7.10 (1H, CH), 6.75 (1H, CH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 63 MHz) δ 161.0 (1C, COOH), 123.8 (1C, NHCCO), 123.3 (1C, NHCHCBr), 115.8 (1C, CBrCHC), 95.7 (1C, CBr); ESIMS (neg) *m/z* 188 (100) 190 (99); HRFABMS *m/z* 188.9420 [M + H]⁺ (calcd for C₅H₄N₁O₂⁷⁹Br, 188.9426).

(2S)-2-[[1-(4-Bromo-1H-pyrrol-2-yl)methanoyl]amino]-6-guanidinohexanoic Acid (L-1). To a suspension of 2-chlorotriethyl chloride resin (**4**, 1.00 g, copoly(styrene-2% DVB), 200–400 mesh, Novabiochem) in CH₂Cl₂ (4 mL) Fmoc-Homoarg-(Pmc)-OH (**3**, 500 mg, 0.74 mmol, BACHEM), dissolved in CH₂Cl₂ (1 mL), was added. During the addition of *N,N*-diisopropylethylamine (380 μL , 2.22 mmol), the yellow reaction mixture turned immediately violet. After shaking for 3 h at room temperature a 3-fold excess of *N,N*-diisopropylethylamine and MeOH (3 mL) was added, and the mixture was shaken for 15 min. After filtering off the liquid phase, the resin was washed (2 \times 5 min each time) with CH₂Cl₂ (10 mL), *i*-PrOH (10 mL), and Et₂O (10 mL). The resin was then suspended for 3 \times 20 min in DMF (5 mL) and shaken at room temperature. For removal of the Fmoc-protecting group, the resin was

shaken 3 × 20 min each time with a solution of piperidine in DMF (40%, 5 mL). Afterward the resin was washed 4 × 5 min with DMF (10 mL). Then a solution of 4-bromopyrrole-2-carboxylic acid (**6**, 422 mg, 2.22 mmol) and 1-hydroxybenzotriazol (450 mg, 3.33 mmol) in DMF (5 mL) was added, and the mixture was shaken for 2 min at room temperature. After the addition of *N,N*-diisopropylcarbodiimide (404 μL, 2.59 mmol), the mixture was allowed to shake for 5 h at room temperature. The reaction mixture was then removed using air pressure, and the remaining resin was washed twice for 5 min with CH₂Cl₂ (10 mL), *i*-PrOH (10 mL), and Et₂O (10 mL). Finally, the resin was treated with 98% TFA (5 mL) and shaken for 30 min at room temperature. The liquid phase was collected, and the resin was washed (2 × 5 min each) with H₂O (2 × 10 mL) and MeCN (2 × 10 mL). Both the acid reaction solution and washings were combined, frozen with liquid nitrogen, and freeze-dried. The obtained crude white powder was purified by preparative reversed-phase HPLC (gradient: 5 min A, 0–40% B in 45 min; A: 10% MeCN/H₂O + 0.1% TFA, B: 100% MeCN + 0.1% TFA; flow rate 10 mL/min). The purified HPLC fraction was frozen and freeze-dried yielding 100 mg (72%) of **L-1** as white powder; *t*_R 7.85 min (gradient: 20–60% MeCN/H₂O + 0.1% TFA in 40 min; flow rate 1 mL/min); UV (H₂O) λ_{max} (log ε) 271 (4.06) nm; CD (H₂O) λ (Δε) 216 (−1.6) nm; IR (KBr) ν_{max} 3379, 3199, 2943, 2871, 1670, 1520, 1386, 1203, 1136 cm^{−1}; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 250 MHz) δ 11.87 (1H, NH), 8.14 (1H, NH), 7.41 (1H, NH), 6.96 (1H, CH), 6.91 (1H, CH), 4.25 (dt, *J* = 4.9 Hz, 1H, CH), 3.05 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, CH₂NH), 1.73 (m, 2H, CHCH₂), 1.47 (m, 2H, CH₂CH₂NH), 1.37 (m, 2H, CHCH₂CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 63 MHz) δ 174.9 (1C, COOH), 159.2 (1C, CONH), 157.0 (1C, NCNHNH₂), 126.9 (1C, NHCCO), 121.1 (1C, NHCHCBr), 111.9 (1C, CBrCHC), 95.0 (1C, CBr), 52.8 (1C, CH), 40.6 (1C, CH₂NH), 31.2 (1C, CHCH₂), 28.3 (1C, CH₂CH₂NH), 22.9 (1C, CHCH₂CH₂); ESIMS (neg) *m/z* 358 (82), 360 (82); HRFABMS *m/z* 360.0663 [M + H]⁺ (calcd for C₁₂H₁₉N₅O₃⁷⁹Br, 360.0672).

(2S)-2-Amino-6-[1-(4,5-dibromo-1H-pyrrol-2-yl)methanoyl]amino]hexanoic Acid Methyl Ester (10). To a solution of L-lysine methyl ester hydrochloride (**8**, 200 mg, 0.86 mmol) in acetonitrile (3 mL) was added 2,2,2-trichloro-1-(4,5-dibromo-1H-pyrrol-2-yl)ethanone (**9**, 318 mg, 0.86 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.3 mL, 1.81 mmol). After 3 h at room temperature, the solvent was evaporated, and the crude residue was purified by column chromatography (Si gel, CHCl₃/MeOH/NH₃aq 40:10:1) to yield **10** as colorless oil (265 mg, 75%); *R*_f 0.5 (CHCl₃/MeOH/NH₃aq 40:10:1); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 204 (3.92), 218 (3.84, sh), 236 (3.79, sh), 274 (4.15) nm; IR (KBr) ν_{max} 3369, 3300, 3116, 2939, 2857, 1734, 1628, 1560, 1525 cm^{−1}; ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 360 MHz) δ 8.05 (1H, t, *J* = 5.3 Hz, NHCOC), 6.88 (1H, s, CBrCHC), 3.60 (3H, s, CO₂CH₃), 3.30 (1H, m, CHCH₂), 3.18 (2H, m, CH₂NH), 1.60–1.25 (6H, m, CHCH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 90.6 MHz) δ 176.1 (1C, CO₂CH₃), 158.9 (1C, NHCO), 128.5 (1C, NHCCO), 112.3 (1C, CBrCHC), 104.4 (1C, CBr), 97.6 (1C, CBr), 53.8 (1C, CH), 51.4 (1C, OCH₃), 38.4 (1C, CH₂NH), 34.1 (1C, CHCH₂), 29.0 (1C, CH₂CH₂NH), 22.6 (1C, CHCH₂CH₂); FABMS *m/z* 410/412/414 (10/19/10) [M + H]⁺, 251/252/253 (4/10/4), 154 (20), 136 (22), 84 (100); HRFABMS *m/z* 409.9707 (calcd for C₁₂H₁₈N₅O₃⁷⁹Br₂, 409.9715); *anal.* C 35.76%, H 4.47%, N 10.28%, calcd for C₁₂H₁₇N₅O₃Br₂, C 35.46%, H 4.17%, N 10.22%.

(2S)-2-Amino-6-[N,N-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidino]hexanoic Acid Methyl Ester (12). To a solution of L-lysine methyl ester hydrochloride (**8**, 1.16 g, 5.00 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (1.85 mL, 10.5 mmol) in MeCN (25 mL) was added 1H-pyrazole-1-[N,N-bis(tert-butoxycarbonyl)]-carboxamide (**11**, 1.55 g, 5.00 mmol). After 24 h at room temperature, the reaction mixture was filtered, and the solvent was evaporated. The crude residue was purified by column chromatography (Si gel, CHCl₃/MeOH 20:1) to yield **12** as colorless oil (1.61 g, 80%); *R*_f = 0.4 (CHCl₃/MeOH 10:1); [α]_D²⁰ +11° (*c* 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 216 (3.98), 236 (4.09) nm; IR (KBr) ν_{max} 3333, 3140, 2979, 2865, 1728, 1644 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 11.49 (1H, br s, NH), 8.31 (1H, br s, NH), 3.72 (3H, s, OCH₃), 3.43 (3H, m, CH, CH₂NH), 2.17 (2H, br s, NH₂), 1.50 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.49 (9H, s,

C(CH₃)₃), 1.80–1.41 (6H, m, CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 63 MHz) δ 176.4 (1C, CO₂CH₃), 163.6 (1C, CO), 156.1 (1C, NHCNNH), 153.3 (1C, CO), 83.0 (1C, C(CH₃)₃), 79.2 (1C, C(CH₃)₃), 54.2 (1C, CH), 51.9 (1C, OCH₃), 40.6 (1C, CH₂NH), 34.5 (1C, CHCH₂), 28.8 (1C, CH₂CH₂NH), 28.3 (3C, C(CH₃)₃), 28.0 (3C, C(CH₃)₃), 23.0 (1C, CHCH₂CH₂); FABMS *m/z* 403 (4) [M + H]⁺, 203 (75), 126 (12), 84 (40), 60 (12), 57 (100); HRFABMS *m/z* 403.2570 (calcd for C₁₈H₃₅N₄O₆, 403.2557); *anal.* C 53.42%, H 8.43%, N 13.62%, calcd for C₁₈H₃₄N₄O₆, C 53.72%, H 8.51%, N 13.92%.

(2S)-2-[1-(4-bromo-1H-pyrrol-2-yl)methanoyl]amino]-6-[N,N-bis(tert-butoxycarbonyl)guanidino]hexanoic Methyl Ester (14). To a solution of **12** (400 mg, 1.00 mmol) in MeCN (3 mL) was added 2,2,2-trichloro-1-(4-bromo-1H-pyrrol-2-yl)ethanone (**13**, 270 mg, 1.00 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.20 mL, 1.10 mmol). After 24 h at room temperature, the solvent was evaporated, and the crude residue was purified by column chromatography (Si gel, CHCl₃/MeOH 50:1) to yield **14** as colorless foam (511 mg, 89%); *R*_f 0.6 (CHCl₃/MeOH 10:1); [α]_D²⁰ −10° (*c* 0.02, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 208 (4.26), 234 (4.37), 270 (4.01) nm; IR (KBr) ν_{max} 3331, 2979, 1721, 1647 cm^{−1}; ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ 11.48 (1H, br s, NH), 10.64 (1H, br s, NH), 8.33 (1H, br s, NH), 6.89 (1H, m, CBrCHC), 6.84 (1H, m, NH), 6.74 (1H, m, NHCCHCBr), 4.72 (1H, m, NHCCHCO₂CH₃), 3.76 (3H, s, OCH₃), 3.38 (2H, m, CH₂NH), 1.56 (18H, s, C(CH₃)₃), 2.00–1.30 (6H, m, CH₂CH₂CH₂); ¹³C NMR (CDCl₃, 63 MHz) δ 172.8 (1C, CO₂CH₃), 163.4 (1C, CO), 160.1 (1C, CONHCH), 156.1 (1C, NHCNNH), 153.2 (1C, CO), 125.4 (1C, CHCCO), 122.0 (1C, CBrCHNH), 112.2 (1C, CBrCHC), 96.8 (1C, CBr), 83.0 (1C, C(CH₃)₃), 79.2 (1C, C(CH₃)₃), 52.3 (1C, CH), 52.0 (1C, OCH₃), 40.3 (1C, CH₂NH), 31.8 (1C, CHCH₂), 28.4 (1C, CH₂CH₂NH), 28.2 (3C, C(CH₃)₃), 27.9 (3C, C(CH₃)₃), 22.6 (1C, CHCH₂CH₂); FABMS *m/z* 574/576 (0.6/0.5) [M + H]⁺, 374/376 (6/7), 84 (16), 57 (100); HRFABMS *m/z* 574.1914 (calcd for C₂₃H₃₇N₅O₇⁷⁹Br, 574.1876).

(2S)-2-[1-(4-Bromo-1H-pyrrol-2-yl)methanoyl]amino]-6-guanidino]hexanoic Acid Methyl Ester. A solution of **14** (100 mg, 0.17 mmol) in MeOH (20 mL) was saturated with HCl gas at 0 °C and stirred for 30 min at room temperature. The solvent was evaporated, and the residue was purified by column chromatography (Si gel, *n*-BuOH/HOAc/H₂O 3:1:1) to yield **L-1** methyl ester as pale yellow solid (64 mg, 90%); *R*_f = 0.5 (Si gel, *n*-BuOH/HOAc/H₂O 3:1:1); [α]_D²⁰ −9° (*c* 0.01, MeOH); UV (MeOH) λ_{max} (log ε) 204 (4.05), 234 (3.98, sh), 276 (4.34) nm; IR (KBr) ν_{max} 3416, 3266, 3177, 2950, 2863, 1734, 1653 cm^{−1}; ¹H NMR (MeOH-*d*₄, 250 MHz) δ 6.94 (1H, s, CH), 6.93 (1H, s, CH), 4.54 (1H, m, CH), 3.73 (3H, s, OCH₃), 3.18 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂NH), 1.92 (2H, m, CHCH₂), 1.63 (2H, m, CH₂CH₂NH), 1.50 (2H, m, CHCH₂CH₂); ¹³C NMR (MeOH-*d*₄, 63 MHz) δ 174.2 (1C, CO₂H), 162.5 (1C, CONHCH), 158.6 (1C, NHCNNH), 127.0 (1C, CHCCO), 123.2 (1C, CBrCHNH), 114.2 (1C, CBrCHC), 97.6 (1C, CBr), 53.5 (1C, CH), 52.8 (1C, OCH₃), 42.3 (1C, CH₂NH), 32.0 (1C, CHCH₂), 29.3 (1C, CH₂CH₂NH), 24.2 (1C, CHCH₂CH₂); FABMS *m/z* 374/376 (99/100) [M + H]⁺; HRFABMS *m/z* 376.0793 (calcd for C₁₃H₂₁N₅O₃⁷⁹Br, 376.0807).

(2S)-2-[1-(4-Bromo-1H-pyrrol-2-yl)methanoyl]amino]-6-guanidino]hexanoic Acid (L-1). Compound **14** (200 mg, 0.35 mmol) was suspended in aqueous HCl (8 N, 8 mL) and stirred 4 h at room temperature. The solution was concentrated in vacuo to dryness and purified by column chromatography (Si gel, *n*-BuOH/HOAc/H₂O 3:1:1) to afford **L-1** as pale orange solid (118 mg, 85%); *R*_f 0.6 (*n*-BuOH/HOAc/H₂O 3:1:1); [α]_D²⁰ −11° (*c* 0.03, MeOH); UV (aqueous phosphate buffer, pH 7) λ_{max} (log ε) 202 (3.89), 272 (3.99) nm; CD (CF₃CH₂OH) λ (Δε) 217 (−1.8) nm; IR (KBr) ν_{max} 3330, 3277, 3199, 2940, 2863, 1718, 1633 cm^{−1}; ¹H NMR (MeOH-*d*₄, 250 MHz) δ 6.94 (1H, s, CH), 6.93 (1H, s, CH), 4.54 (1H, m, CH), 3.18 (2H, t, *J* = 6.5 Hz, CH₂NH), 2.05–1.93 (1H, m, CHCH₂), 1.89–1.75 (1H, m, CHCH₂), 1.71–1.56 (2H, m, CH₂CH₂NH), 1.55–1.41 (2H, m, CHCH₂CH₂); ¹³C NMR (MeOH-*d*₄, 63 MHz) δ 175.5 (1C, COOH), 162.5 (1C, NCNHNH₂), 158.6 (1C, CONH), 127.1 (1C, NHCCO), 123.1 (1C, NHCHCBr), 114.2 (1C, CBrCHC), 97.6 (1C, CBr), 53.4 (1C, CH), 42.3 (1C, CH₂NH), 32.2 (1C, CHCH₂),

29.3 (1C, CH₂CH₂NH), 24.3 (1C, CHCH₂CH₂); FABMS *m/z* 382/384 (84/86) [M + Na]⁺, 360/362 (80/80) [M]⁺; HRFABMS *m/z* 382.0486 (calcd for C₁₂H₁₈N₅O₃⁷⁹BrNa, 382.0491).

Acknowledgment. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Li 597/2-2 and Ko 1314/3-1 to 3-4). T.L. and M.H. thank Professor Dr. Richard Neidlein for generous support. Damian Kokot is thanked for technical assistance. M.A. and M.K. are grateful to Ellen Lichte for performing HPLC analyses and acknowledge the support of Professor Dr. Christian Griesinger.

References and Notes

- (1) (a) For a summary, see: Gribble, G. W. *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* **1996**, *68*, 137–141. (b) Gribble, G. W. *Chem. Soc. Rev.* **1999**, *28*, 335–346. (c) Urban, S.; de Almeida Leone, P.; Carroll, A. R.; Fechner, G. A.; Smith, J.; Hooper, J. N. A.; Quinn, R. J. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 731–735, and references therein.
- (2) (a) Assmann, M.; Lichte, E.; van Soest, R. W. M.; Köck, M. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 455–457. (b) First presented at the 2nd Euroconference on Marine Natural Products, Assmann, M.; Lichte, E.; van Soest, R. W. M.; Köck, M. Presentations OP-10 and PD-2, Santiago de Compostela, Spain, 1999.
- (3) (a) Forenza, S.; Minale, L.; Riccio, R.; Fattorusso, E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1971**, 1129–1130. (b) Garcia, E. E.; Benjamin, L. E.; Fryer, R. I. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 78–79.
- (4) Rodriguez, A. D.; Piña, I. C. *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 907–914.
- (5) (a) Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1996**, *208*, 185–196. (b) Lindel, T.; Hoffmann, H.; Hochgürtel, M.; Pawlik, J. R. *J. Chem. Ecol.* **2000**, *26*, 1477–1496. (c) Assmann, M.; Lichte, E.; Pawlik, J. R.; Köck, M. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, in press.
- (6) Bernatowicz, M. S.; Wu, Y.; Matsueda, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3389–3392.
- (7) Bailey, D. M.; Johnson, R. E. *J. Med. Chem.* **1973**, *16*, 1300–1302.
- (8) Drake, B.; Patek, M.; Lebl, M. *Synthesis* **1994**, 579–582.
- (9) Andrade, P.; Willoughby, R.; Pomponi, S. A.; Kerr, R. G. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 4775–4778.
- (10) (a) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Mangoni, A.; Tagliatalata-Scafati, O. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 13713–13720. (b) Cafieri, F.; Fattorusso, E.; Tagliatalata-Scafati, O. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 122–125.
- (11) Kitagawa, I.; Kobayashi, M.; Kitanaka, I.; Kido, M.; Kyogoku, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2321–2328.
- (12) Braekman, J.-C.; Daloz, D.; Stoller, C.; van Soest, R. W. M. *Biochem. Syst. Ecol.* **1992**, *20*, 417–431.
- (13) Li, C. J.; Schmitz, F. J.; Kelly-Borges, M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 387–389.
- (14) Hemscheidt, T.; Burgoyne, D. L.; Moore, R. E. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 205–206.
- (15) Cimino, G.; De Rosa, S.; De Stefano, S.; Self, R.; Sodano, G. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 3029–3032.
- (16) Olofson, A.; Yakushijin, K.; Horne, D. A. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 1248–1253.
- (17) Perrin, D. D.; Armarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, 3rd ed., Pergamon: Oxford, 1988.
- (18) Bailey, D. M.; Johnson, R. E.; Albertson, N. F. *Org. Synth.* **1971**, *51*, 100–102.
- (19) Anderson, H. J.; Lee, S.-F. *Can. J. Chem.* **1965**, *43*, 409–414.

NP0001600

D Eingereichte Manuskripte

M1

Assmann, M., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (2000). Description of *Agelas cerebrum* new species and re-description of *Agelas dilatata*. *Proc. Biol. Soc. Wash.* eingereicht.

M2

Assmann, M., van Soest, R. W. M. & Köck, M. (2000). New antifeedant bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Stylissa caribica*. *J. Nat. Prod.* eingereicht.

Description of *Agelas cerebrum* new species and re-description of *Agelas dilatata*

Michael Assmann, Rob W. M. van Soest, and Matthias Köck

(MA, MK) Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Marie-Curie-Str. 11, D-60439 Frankfurt, Germany, (MK) Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, and (RWMVS) Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoölogisch Museum, P.O. Box 94766, Universiteit van Amsterdam, 1090 GT Amsterdam, The Netherlands

Abstract. Recent collections of sponges made in the Bahamas revealed the occurrence of two species of *Agelas*, which we could not assign to any of the currently recognized *Agelas* of the Western Atlantic. A comparison with literature records and extensive collections of *Agelas* incorporated in several major musea led us to conclude that several specimens belong to a species new to science, *Agelas cerebrum* n.sp., while we assign one specimen to *Agelas dilatata* Duchassaing & Michelotti, a species so far considered incertae sedis, because of compelling similarities with its original description.

INTRODUCTION

Sponges of the genus *Agelas* are common and dominant species in Caribbean reef communities. To date 21 nominal species have been described (Table 1), of which at least 13 appear to be valid. Compared to other areas of the world, the diversity of *Agelas* in the Caribbean is unusually high: elsewhere only 12 nominal species from the whole of the Indo-Pacific (probably about 8 valid species), and 1 species from the Mediterranean (*Agelas oroides*), have been described. Although the genus is easily recognized, the systematics of *Agelas* at the species level appears problematic because of observed in-congruence of macroscopic features (shape, surface appearance and color) and microscopic characters (arrangement of fibres and spicules, size and ornamentation of spicules) (Lehnert & van Soest, 1999). A revision of the genus is becoming urgent because of growing interest in the impact of *Agelas* on the reef community (e.g. Reiswig, 1976, Hoppe, 1988, Pawlik et al., 1995, Chanas et al., 1996, Assmann et al., 1999, Assmann et al., 2000) as well as for its promising bioactive properties. The chemistry described for *Agelas* is characteristic, with monomeric or dimeric molecules of brominated pyrrole-2-carboxylic acid derivatives uniformly present in all investigated species (Braekman et al., 1992). In addition, several species possess unusual diterpenic compounds. Investigations of *Agelas* species collected in the Bahamas, revealed the occurrence of many previously described forms (*A. cervicornis*, *A. clathrodes*, *A. dispar*, *A. sceptrum*, *A. wiedenmayeri*) as well as specimens which did not belong to those commonly recorded representatives of the genus. A comparison with literature records and extensive collections of Caribbean *Agelas* sponges

incorporated in the collections of the Zoological Museum of Amsterdam and other musea, led us to conclude that the Bahamas material contained specimens of a species new to science, *Agelas cerebrum* n.sp. (Figure 1). In addition, one specimen appeared to be so similar to old literature images and descriptions of *Agelas dilatata* Duchassaing & Michelotti (Duchassaing & Michelotti, 1864) that we propose to revive this (Figure 2).

MATERIAL AND METHODS

Specimens of the new and the revived species were collected by the first author, during a cruise of the research vessel *Seward Johnson* to the Bahamas in July/August 1999. Large fragments were incorporated in the collections of the Zoological Museum of Amsterdam (numbers and locality data are provided below in conjunction with the descriptions) remaining parts of the specimens were used for extraction and chemical analysis. Specimens examined for comparison were obtained from the collections of the Zoological Museum of Amsterdam, the United States National Museum, Washington, and the Natural History Museum, London (BMNH). For identification of sponges small fragments were cut off and stored in 70% ethanol. Spicule slides were studied using a JEOL JSM-35C scanning microscope.

SYSTEMATICS

Genus *Agelas*
Agelas cerebrum n.sp.

MATERIAL

Holotype ZMA POR. 15603, deep reef slope of Chub Cay, Bahamas, #MAB96, 30.07.1999, 97 ft.

DESCRIPTION

Macroscopic Features (Figure 1, B-D). Habit and surface characteristics: The specimen consists of two fused tubes. The height of the specimen is up to 33 cm and 16 (single tube) to 22 cm (fused tubes) in diameter. Two vents, one 4.5 cm, the other 4 to 5 cm in diameter, leading to lumina of the same diameter penetrating deep into the sponge. The lumina come together at about 15 cm depth and continue to the base of the sponge as one hole. The inner wall contains numerous oscules flush with the smooth surface. The outer surface of the sponge is rough to the touch and is characteristically convoluted. About 20 convolutions appear over the whole length. Individual convolutions are 2.5 to 6 cm long and 1 – 3 cm wide. In the central part of the convolutions scattered smaller oscules are present. Separating convolutions on the surface are meandering grooves, which are at least 2 – 3 cm in depth and a few mm in width. The color of the sponge is light brown to grayish brown in life. The consistency is tough, spongy, firm, and almost incompressible.

Microscopic Features (Figure 1, E-G). Spicules are verticillated acanthostyles as usual for the genus; they are quite variable in length and number of whorls; spicule sizes: $99 - 165 \times 5 - 10 \mu\text{m}$; number of whorls: 13 – 24, with 6 spines per whorl. Skeleton: mesh sizes vary 100 – 700 μm . Primary fibres are well developed, and easily recognised over long distances (200 – 600 μm). They are about 80 – 170 μm in diameter and are cored throughout the skeleton by 3 – 10 echinating spicules per 500 μm length of fibre. Both secondary and tertiary fibres are 60 – 120 μm in diameter, uncored, and echinated by 12 spicules per 500 μm length of fibre.

REMARKS

Comparison with *Agelas conifera*: Schmidt (1870) described *Chalinopsis conifera* as branch-like individuals with 8 mm wide oscula (Schmidt, 1870). Our material does not agree with this description. No type material could be examined, so we chose comparisons with four ZMA specimens of similar growth form as the type:

(1) *Agelas conifera*, a) ZMA POR. 14197, Curaçao, "octopus-type", repent-ramose with volcano-shaped oscules: skeleton is a well-developed system of primary and secondary fibres, easy to detect, penetrating deep into interior; primary fibres lie at distances of 400 – 700 μm and are cored with 5 to 9 spicules in cross section; thickness of primary fibres 60 – 100 μm ; they are echinated by 6 – 7 spicules per 500 μm fibre length; secondary fibres are uncored, 30 – 60 μm in thickness; the echination of secondary fibres is about 8 – 12 per 500 μm fibre length. Meshes are 250 – 600 μm . Spicule sizes vary from $126 - 192 \times 10 - 13 \mu\text{m}$, with 11 – 15 whorls. b) ZMA POR. 14170, Curaçao: similar to above, spicule sizes: 117

– $156 \times 10 - 13 \mu\text{m}$, with 11 – 16 whorls. c) ZMA POR. 12778, Jamaica: similar to above, spicule sizes: $138 - 180 \times 10 - 13 \mu\text{m}$, with 11 – 14 whorls. d) ZMA POR. 7783, Bahamas: similar to above, spicule sizes: $126 - 186 \times 9 - 13 \mu\text{m}$, 11 – 15 whorls.

There appears to be a consistent difference in spicule thickness and number of whorls, and they appear less variably, compared to *Agelas cerebrum* n.sp.

(2) We also compared our sample with two specimens identified as *Agelas conifera* from Belize and Colombia displaying a tube form in growth. These tubes assigned to *Agelas conifera* are not grooved or convoluted:

a) Belize, P110, Carrie-Bow Cay, Belize, IMSWE Project, fore reef slope, 15 – 30 m, Rützler, col., id. 4th May 1973, on loan from Smithsonian Collection: in total four tube individuals, up to 46 cm high, 8 cm in diameter, lumen 4 cm, surface is undulating but smooth, covered with zoanths. Spicule sizes: $140 - 180 \times 15 - 16 \mu\text{m}$, with 11 – 16 whorls. b) ZMA POR. 6148, Colombia: 25 cm high, diameter of 6 cm, lumen of 3 cm in diameter, surface is undulating but smooth. Spicule sizes: $148 - 177 \times 12 - 17 \mu\text{m}$, 14 – 17 whorls.

In both samples the spicule sizes appear shorter and fatter, with a lower number of whorls. The thickness overlaps only marginally with that of the *Agelas cerebrum* n.sp. spicules.

(3) Comparison with *Agelas tubulata* Lehnert & van Soest, 1996: specimens from Jamaica are long, brown, branching tubes (ZMA POR. 11323, ZMA POR.13560), with individual tubes approximate 20 – 37 cm long, 3.5 – 5 cm in diameter, central aperture 2 – 2.5 cm in diameter. Numerous small (< 1 mm) pores scattered over the smooth surface. A few larger (2 – 4 mm) apertures are visible. Choanosomal skeleton a reticulation of primary fibres, 40 – 70 μm in diameter, cored by 1 – 4 spicules, diverging to the surface, lying at distances of 300 – 400 μm apart, and interconnecting secondary fibres 20 – 50 μm diameter, forming almost square meshes. Spicule sizes: $78 - 210 \times 5 - 12 \mu\text{m}$, with 10 – 32 whorls. The major differences with *Agelas cerebrum* n.sp. are shape, surface characters and the greater length of the spicules.

Genus *Agelas*

Agelas dilatata Duchassaing & Michelotti, 1864
Agelas dilatata Duchassaing & Michelotti, 1864: 77, pl. II fig. F, XIV fig. 1; van Soest et al., 1983: 197.

MATERIAL

ZMA POR. 15604, Little San Salvador, Bahamas, #MAB118, 03.08.1999, 78 ft.

DESCRIPTION

Macroscopic Features (Figure 2, B-D). Habit and surface characteristics: flabellate; wedge-shaped; pedunculate. The height of the specimen is up to 35 cm and 41 cm in diameter. One side (upper side) with 15 oscules per 25 square cm. Width of the oscules is 4 – 5 mm in diameter and they are flush with the smooth surface. Stalk with few oscules, width of oscules 7 – 9 mm in diameter. The other side with scattered fields of small apertures, slightly rough, uneven, with shallow depressions. The color of the upper side is orange brown, whereas the underside is bright orange in color. The consistency is slightly compressible, tough, spongy, firm, almost incompressible.

Microscopic Features (Figure 2, E-G). Skeleton: special ectosomal skeleton is absent, choanosomal fibres protrude at the surface, causing the slightly rough feel of the surface. Skeleton consists of a reticulation of spongin fibres. General aspect of the skeleton is irregular without prominent primary fibres, only in the periphery they are easily recognizable, the reason of their in-distinctness is their frequent anastomosing and subdividing, individual fibres only detectable over a short stretch, in other places the skeleton is dense and irregular. Primary fibres are not well developed. They contain a core of 0 – 6 spicules in a cross section. In the periphery the primary fibres lie at distances of 250 to 800 μm ; thickness of the fibres 60 – 115 μm , they are echinated by 4 – 6 spicules over a distance of 500 μm fibre length. Although most primary fibres are only recognizable over short distance, occasionally they show a greater length. Interconnecting/secondary and tertiary fibres: they are arranged very irregularly and densely, they are mostly uncored but occasionally are cored by a single spicule; they are echinated by 6 – 12 spicules over a distance of 500 μm fibre length; sizes are largely similar to primaries: 25 – 100 μm , but quite variable. Meshes 50 – 400 μm . Spicules: verticillated acanthostyles as usual for the genus; they are quite variable in length and number of whorls; spicules sizes: 78 – 195 \times 5 – 9 μm ; number of whorls: 11 – 21, with 6 spines per whorl.

REMARKS

We assign our specimen to *Agelas dilatata* because of the overall similarity with the Duchassaing & Michelotti's plate XIV fig. 1 (Duchassaing & Michelotti, 1864). Also, their crude line drawings of the skeleton and the spicule (pl. II fig. F) are more or less similar to microscopic details of our specimen. The one line description does not allow further confirmation, and unfortunately type material is no longer extant (van Soest et al., 1983). No matching description so far appeared in the literature and we are confident that this is a valid species with characteristic morphology.

Comparison with similar species:

(1) *Agelas clathrodes* Schmidt, 1870 (described as *Chalinopsis*) is not likely to be our species. Schmidt's description refers to a bumpy surface and cavernous interior (Schmidt, 1870). This description allows many interpretations, however, our specimen differs from it by the thin-bladed growth form, smooth surface, regularly and densely scattered oscules concentrated on one side only. The skeleton could be compared with a slide of a fragment of one of the types of *Agelas clathrodes* from the Copenhagen Museum. It shows a less dense and much more regular reticulation, with clearly developed fibres: coring of primary fibres 6 – 12 spicules; primary fibres lie at distances further away from each other, 800 – 1100 μm ; thickness of primary fibres about 100 μm ; echination of fibres 6 – 7 spicules per 500 μm fibre length; secondary fibres are uncored; echination of secondary fibres: 7 – 10 spicules per 500 μm fibre length; thickness of secondary fibres: 40 – 70 μm ; meshes: 100 – 500 μm .

(2) Our specimen is not likely to belong to *Agelas inaequalis* Pulitzer-Finali, 1986, because this is cup-shaped. The convex side is entirely perforated by apertures of 0.5 – 1 mm and 1 – 1.5 mm apart; on the inner side there are numerous oscules, sparse multiple oscules 5 – 10 mm wide, rather irregular. The fibres are only 45 – 90 μm thick, are abundantly echinated; coring spicules are observed only occasionally. Spicule sizes: 65 – 149 \times 3.5 – 7 μm , with only 10 – 12 whorls with 3 – 4 spines each (Pulitzer-Finali, 1986).

(3) The present material is probably close to Carter's *Ectyon flabelliformis* (Carter, 1883). The type specimen only (not Carter's pictured specimen, which is probably *Agelas clathrodes*), BMNH 1884.4.14.9, was examined. It is likewise a thin-bladed species with scattered oscules on one side. However, the type specimen is three-lobed and the blade thickness is only 5 mm. We compared the skeleton of this species using a slide made from the type: it is similar in having a dense and irregular reticulation of spongin fibres; low spicular density, coring of main fibres is sparse, 0 – 3 spicules in a cross section; main fibres 50 – 90 μm in diameter; secondary fibres: 40 – 80 μm ; echinating spicules about 12 over a distance of 500 μm fibre length. A distinct difference are the spicules. They appear to be much shorter and thinner: 50 – 120 μm in length and by 3 – 6 μm width; sparsely developed whorls, spines irregularly distributed, here and there, 6 – 15 whorls.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ko 1314/3-1 to 3-4) is gratefully acknowledged. Jan J. Vermeulen assisted in making thick sections and spicule slides. Furthermore, we thank Professor Joseph R. Pawlik (Department of Biological Sciences and Center for Marine Science

Research, University of North Carolina Wilmington, NC) for giving MA the opportunity to participate in a scientific sojourns to the Bahamas 1999, during which the sponges *Agelas cerebrum* n.sp. and *Agelas dilatata* were collected. Use of *R/V Seward Johnson* was made possible through funding from the U.S. National Science Foundation (OCE-9711255 to Joseph R. Pawlik). We thank the government of the Bahamas for permission to perform research in their territorial waters. RWMVS acknowledges receipt of the EC-Bioresource LSF project grant hosted by Ms Clare Valentine and Ms Vanessa Pike for a visit to the collections of the Natural History Museum, March 1999.

LITERATURE CITED

- Alcolado, P. M. (1984). Nuevas especies de esponjas encontradas en Cuba. *Poeyana* **171**: 1-20
- Assmann, M., Lichte, E., van Soest, R. W. M., Köck, M. (1999). New bromopyrrole alkaloid from the marine sponge *Agelas wiedenmayeri*. *Org. Lett.* **1**: 455-457
- Assmann, M., Lichte, E., Pawlik, J. R., Köck, M. (2000). Chemical defense of the Caribbean sponges *Agelas wiedenmayeri* and *Agelas conifera*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **207**: 255-262
- Brackman, J.-C., Daloz, D., Stoller, C., van Soest, R. W. M. (1992). Chemotaxonomy of *Agelas* (Porifera: Demospongiae). *Biochem. Syst. Ecol.* **20**: 417-431, and references cited therein.
- Carter, H. J. (1883). Contributions to our knowledge of the Spongida. *Ann. Mag. Nat. Hist.* **12**: 308-329
- Chanas, B., Pawlik, J. R., Lindel, T., Fenical, W. (1996). Chemical defense of the Caribbean sponge *Agelas clathrodes* (Schmidt). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **208**: 185-196
- Duchassaing, P. de F., Michelotti, G. (1864). Spongiaires de la mer Caraïbe. *Nat. Verh. Holl. Maatsch. Wetensch. Haarlem*, (2) **21**: 1-124
- Hoppe, W. F. (1988). Growth, regeneration and predation in three species of large coral reef sponges. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **50**: 117-125
- Hoppe, W. F. (1988). Reproductive patterns in three species of large coral reef sponges. *Coral Reefs* **7**: 45-50
- Lehnert, H., van Soest, R. W. M. (1996). North Jamaican deep fore-reef sponges. *Beaufortia* **46**: 53-81
- Lehnert, H., van Soest, R. W. M. (1998). Shallow water sponges of Jamaica. *Beaufortia* **48**: 71-103, and references cited therein.
- Lehnert, H., van Soest, R. W. M. (1999). More North Jamaican deep fore-reef sponges. *Beaufortia* **49**: 141-169
- Pawlik, J. R., Chanas, B., Toonen, R. J., Fenical, W. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory reef fish. I. Chemical deterrence. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **127**: 183-194
- Pulitzer-Finali, G. (1986). A collection of West Indian Demospongiae (Porifera). In appendix, a list of the Demospongiae hitherto recorded from the West Indies. *Ann. Mus. Civ. Storia Nat. Genova* **86**: 65-216
- Reiswig, H. M. (1976). Natural gamete release and oviparity in Caribbean Demospongiae. In: Harrison, F. W. & R. R. Cowden (eds). *Aspects of Sponge Biology*. Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 99-112
- Schmidt, O. (1870). Grundzüge einer Spongien-Fauna des Atlantischen Gebietes. Engelmann, Leipzig: 1-88
- van Soest, R. W. M., Stone, S. M., Boury-Esnault, N., Rützler, K. (1983). Catalogue of the Duchassaing & Michelotti (1864) collection of West Indian sponges (Porifera). *Bull. Zool. Mus. Univ. Amsterdam* **9**: 189-205
- Wiedenmayer, F. (1977). Shallow water sponges of the western Bahamas. *Experientia Suppl.* **28**: 1-287, and references cited therein.

Table 1: Nominal *Agelas* species recorded from the Caribbean.

<i>Agelas arborescens</i>	Lamarck, 1813 as <i>Spongia</i>
<i>Agelas cervicornis</i>	Schmidt, 1870 as <i>Chalinopsis</i>
<i>Agelas citrina</i>	Alcolado, 1984
<i>Agelas clathrodes</i>	Schmidt, 1870 as <i>Chalinopsis</i> ; Carter, 1883 as <i>Ectyon sparsus</i> ; Topsent, 1920 as <i>Agelas oroides</i> ; de Laubenfels, 1949 as <i>Agelas sparsus</i> ; de Laubenfels, 1953 as <i>Agelas oroides</i> ; Collette & Rützler, 1977; Gomez & Green, 1984; Wintermann-Kilian & Kilian, 1984; Pulitzer-Finali, 1986; Zea, 1987; Gomez, 1992; Lehnert, 1993; Lehnert & van Soest, 1996; Lehnert & van Soest, 1998
<i>Agelas clavaeformis</i>	Carter, 1883 as <i>Ectyon sparsus</i> var.
<i>Agelas conifera</i>	Schmidt, 1870 as <i>Chalinopsis</i> ; Wintermann-Kilian & Kilian, 1984; Pulitzer-Finali, 1986; Zea, 1987; Lehnert, 1993; Lehnert & van Soest, 1996; Lehnert & van Soest, 1998
<i>Agelas cylindricus</i>	Carter, 1883 as <i>Ectyon</i>
<i>Agelas dilatata</i>	Duchassaing & Michelotti, 1864
<i>Agelas dispar</i> (1)	Duchassaing & Michelotti, 1864 (orange); sensu van Soest, 1981; Pulitzer-Finali, 1986; Lehnert, 1993; Lehnert & van Soest, 1998 (= ? <i>Agelas clathrodes</i>)
<i>Agelas dispar</i> (2)	Duchassaing & Michelotti, 1864 (brown); (Solé-Cava et al. 1981; Boury-Esnault, 1973; Wiedenmayer, 1977; Wintermann-Kilian & Kilian, 1984; Zea, 1987)
<i>Agelas flabelliformis</i>	Carter, 1883 as <i>Ectyon</i>
<i>Agelas inaequalis</i>	Pulitzer-Finali, 1986
<i>Agelas longissima</i>	Pulitzer-Finali, 1986
<i>Agelas marmarica</i>	sensu Wintermann-Kilian & Kilian, 1984 (not: Lévi, 1958)
<i>Agelas repens</i>	Lehnert & van Soest, 1998
<i>Agelas rudis</i>	Duchassaing & Michelotti, 1864
<i>Agelas sceptrum</i>	Lamarck, 1813 as <i>Alcyonium</i> ; Topsent, 1933 as <i>Ectyon</i> ; Lamarck, 1813 as <i>Spongia arborescens</i> ; Topsent, 1931 as <i>Ectyon cervicornis</i> ; Schmidt, 1870 as <i>Chalinopsis cervicornis</i> ; Carter, 1883 as <i>Ectyon cylindricus</i> ; Pulitzer-Finali, 1986 as <i>Agelas longissima</i> ; Zea, 1987; Lehnert, 1993; Lehnert & van Soest, 1998
<i>Agelas schmidtii</i>	Wilson, 1902; Wintermann-Kilian & Kilian, 1984; Zea, 1987; Lehnert & van Soest, 1998
<i>Agelas sparsus</i>	Gray, 1867; Hechtel, 1976
<i>Agelas sventres</i>	Lehnert & van Soest, 1996; Lehnert & van Soest, 1998
<i>Agelas tubulata</i>	Lehnert & van Soest, 1996
<i>Agelas wiedenmayeri</i>	Alcolado, 1984

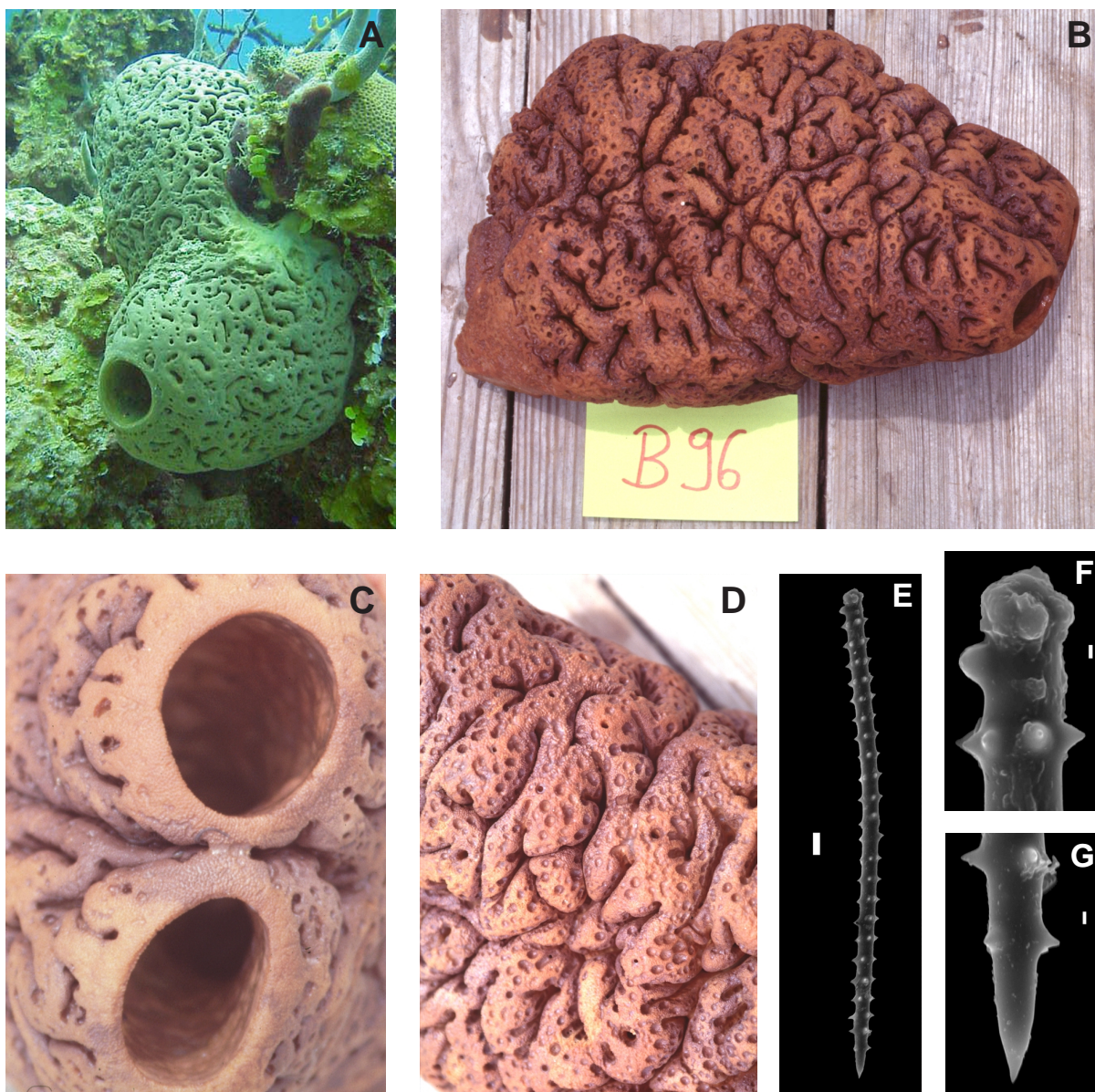


Figure 1. *Agelas cerebrum* n.sp.: A, habit photographed in situ; B, C, D, holotype ZMA POR. 15603; E (scale = 10 μm), F (scale = 1 μm), G (scale = 1 μm), scanning electronic microscope (SEM) photos of acanthostyle from the holotype.

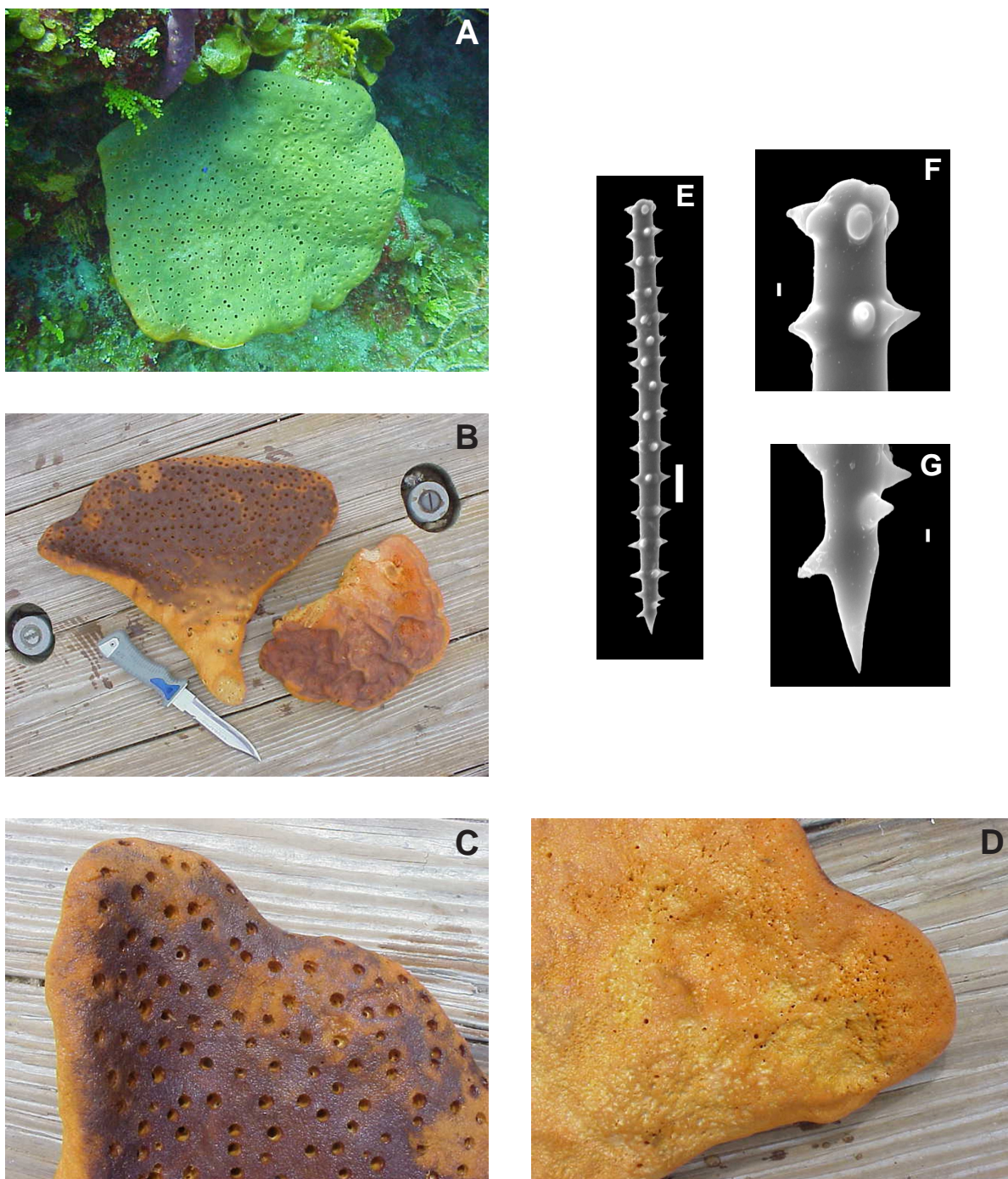


Figure 2. *Agelas dilatata*: A, habit photographed in situ; B, C, D, ZMA POR. 15604; E (scale = 10 μm), F (scale = 1 μm), G (scale = 1 μm), scanning electronic microscope (SEM) photos of acanthostyle.

Submitted to *Journal of Natural Products*

New Antifeedant Bromopyrrole Alkaloid from the Caribbean Sponge *Stylissa caribica*

Michael Assmann[†], Rob W. M. van Soest[‡], and Matthias Köck^{*,†,§}

Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Marie-Curie-Str. 11, D-60439 Frankfurt, Germany, Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung, Am Handelshafen 12, D-27570 Bremerhaven, and Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoologisch Museum, P.O. Box 94766, Universiteit van Amsterdam, 1090 GT Amsterdam, The Netherlands

A detailed analysis of the chemical constituents of a specimen of *Stylissa caribica* was performed. This is the first report on the chemistry of this sponge. Beside two known bromopyrrole metabolites, a new compound *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**) was isolated. The structure of **1** was systematically investigated using spectroscopic methods and the program COCON. *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**) was shown to be feeding deterrent at natural concentration against a common predatory reef fish and is therefore responsible for the chemical defense of *Stylissa caribica*.

In a recent survey of the chemical anti-predatory defenses of 71 species of Caribbean sponges, it was discovered that all of the five species within the family Axinellidae yielded crude organic extracts that deterred the feeding of predatory reef fish in aquarium assays.¹ More recently it has been shown, that one species, *Axinella corrugata* (previously *Teichaxinella morchella*) yielded high concentrations of stevensine as single compound responsible for feeding deterrence.² The purpose of the study reported herein was to isolate and identify the metabolite(s) responsible for the chemical defense of *Stylissa caribica*, a closely related sponge to *Axinella corrugata*, which has been described for the first time by Lehnert and van Soest 1998 from Jamaica.³ To the best of our knowledge, this is the first report on the chemistry of *Stylissa caribica*.

A series of brominated pyrrole alkaloids have been isolated from a specimen of the sponge *Stylissa caribica* collected off the coast of Sweetings Cay, Bahamas. Bioassay-guided fractionation of the methanol extract of this sponge resulted in isolation of the known alkaloids dibromoisophakellin (**2**, 13 mg), and ageliferin (**3**, 3 mg) as well as of the new bromopyrrole-derived alkaloid, *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**, 140 mg) (Figure 1). In this communication we describe the isolation, structural elucidation and anti-feeding

properties of the new bromopyrrole alkaloid **1** against the common predatory reef fish *Thalassoma bifasciatum*.

Three compounds (**1-3**) could be isolated by the described method. The brominated alkaloids dibromoisophakellin (**2**), and ageliferin (**3**) were identified by comparison of their spectroscopic data with those previously reported.⁴ The FAB mass spectrum (positive ion mode) of the new compound *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**) showed an isotopic cluster at m/z 402, 404 and 406 $[M+H]^+$ in the ratio 1:2:1, suggesting the presence of two bromine atoms. The molecular formula of **1** was established as $C_{12}H_{14}N_5OBr_2$ by HRFABMS (m/z 405.9526, $[M+H]^+$, $\Delta +0.2$ mmu), which is in accordance with the 1H and ^{13}C NMR data. Table 1 summarizes the 1D and 2D NMR data of **1**. The presence of a pyrrole ring conjugated with a carbonyl group part was also supported by the UV absorption (MeOH) at λ_{max} 288 nm ($lg \epsilon$ 3.92), in addition a negative Cotton effect at 207 nm ($\Delta\epsilon = -1.56$) was observed in the CD spectrum (MeOH).⁵ The sp^2 carbon chemical shift (C-8) at δ_C 155.0 ppm implied the presence of a cyclic guanidine moiety, which was further supported by a negative coloration in the Sakaguchi test.⁶ Signals at δ_H 2.23–2.02 ppm (4H) and 3.52 ppm (2H) observed in the 1H -NMR spectrum of **1** (DMSO- d_6) are assigned to methylene groups of the pyrrolidine ring and that at δ_H 5.23 ppm to the methine proton. The signal at δ_C 157.1 ppm was attributed to a carbonyl group, further supported by the IR (KBr) absorption band at ν_{max} 1661 cm^{-1} .⁷ Only two bonds of **1** are defined by $^1H, ^1H$ -COSY correlations (C-11–C-12 and C-12–C-13). The fact that 6 HMBC correlations are observed from H-8 and 4 HMBC correlations to C-7 implies that **1** is a polycyclic system. By comparison of δ_C of **1** with all known intramole-

* To whom correspondence should be addressed: Phone: + 49-69-798-29143. Fax: + 49-69-798-29128.

E-mail: km@org.chemie.uni-frankfurt.de or mkoeck@awi-bremerhaven.de

[†] Institut für Organische Chemie, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt.

[§] Alfred-Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung Bremerhaven.

[‡] Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Universiteit van Amsterdam.

cular cyclized oroidin-derivatives, the isophakellin skeleton was obtained.⁸ Therefore, **1** was identified as *N*-methyl derivative of dibromo-isophakellin (**2**).

In order to verify the proposed structure of **1** COCON calculations were carried out.⁹ For calculation A only the experimental NMR correlation data (4 ¹H,¹H-COSY¹⁰ and 15 ¹H,¹³C-HMBC¹¹) were used, in calculation B also further information such as the presence of the pyrrole and the cyclic guanidine were considered and used as fixed bonds. COCON generated 6823 possible structures for calculation A and 8 for calculation B. In case of calculation A δ_C were calculated for all structural proposals using the program *Analyse*. The best 30 structures are discussed, only 4 of them do not violate Bredt's rule or are not strained (Figure 2). The 2,5-dibromopyrrole moiety of proposal **1**-5910 can be neglected due to δ_C of the pyrrole part. 3 of the 4 structural proposals have an aminopyrazole moiety which is not very probable from a biosynthetic point of view. Also a closer inspection of δ_C of this part of the molecule favors the correct structure.

Deterrent metabolites appear to be the principal defensive strategy of Caribbean sponges against predatory reef fishes because no evidence has been found for structural or nutritional defenses in a recent study.¹² To investigate the ecological role of the major metabolite of *Stylissa caribica* aquarium assays have been performed.¹³ When incorporated into artificial foods at the same volumetric concentration as found in sponge tissue (0.9 mg/mL), *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**) deterred feeding of the Caribbean reef fish *Thalassoma bifasciatum* in laboratory aquarium assays (Figure 3). **1** is the only compound in the sponge tissue of *Stylissa caribica* at sufficient concentration most likely to be responsible for the chemical defense, since **2** (0.084 mg/mL) and **3** (0.02 mg/mL) were found only in low sponge tissue concentrations. Comparing the relative feeding deterrent activity with the major naturally occurring metabolites of *Agelas* sponges at 1 mg/mL concentrations, but expressed as moles/mL, a hierarchy of activity can be determined: sceptrin > *N*-methyl-dibromoisophakellin > oroidin > 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid.^{13b} *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**) represents another in the oroidin class of brominated pyrrole derivatives that function as chemical defenses of sponges in the families Axinellidae and Agelasidae.

Experimental Section

General Procedures. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker AM 250, AMX400 and DRX600 NMR spectrometers. A 50 mg sample of **1** in 0.5 mL DMSO-*d*₆ was used for the NMR measurements. All NMR experiments were measured at 300 K. The DQF-¹H,¹H-COSY and the ¹H,¹³C-HSQC experiment were carried out with standard parameters. The ¹H,¹³C-HMBC

experiment was acquired with 4096 data points in F₂ (acquisition time to 228 ms), 256 increments and 128 acquisitions. The delay for evolution of the heteronuclear long range couplings was set to 80 ms and the relaxation delay to 1.8 s. The pulse programs were used from the Bruker library. Mass spectral analysis (HRFABMS) was performed on a JEOL JMS-700 sector-field mass spectrometer with 3-nitrobenzyl alcohol (NBA) as matrix or using a Fison VG Platform II for ESIMS. For HPLC analysis, samples were injected into a JASCO HPLC system equipped with a MD-910 photodiode-array detector. Routine detection was at 280 nm. HPLC separation columns (analytical: 4.6 × 250 mm, 5 μm; preparative: 16 × 250 mm, 7 μm) were pre-filled with Kromasil RP₁₈ (Knauer GmbH). Thin-layer chromatography (TLC) was performed on pre-coated Si gel plates (Merck). IR (KBr) spectra were recorded on a Perkin Elmer 1600 Series FT-IR spectrometer. UV/VIS spectra were obtained using a Perkin Elmer UV/VIS spectrometer Lambda 16. The CD spectrum was obtained using the JASCO spectropolarimeter J-710. For extraction solvents were distilled prior to use, and gradient grade solvents were used for chromatographic applications.

Animal Material. The marine sponge *Stylissa caribica* investigated in this study was collected in September 1998 by SCUBA diving (50 ft depth) at Sweetings Cay in the Bahamas. The sponge forms erect wedged-shaped, thick-bladed columns with irregularly corrugated lengthwise grooves and ridges, subdivided in places to form honeycomb-like depressions. The size of the specimen was 8 × 18 cm with color orange-brown or dark reddish orange in life, turning rather dark red-brown in alcohol. The surface in the depressions is shiny smooth, looking fleshy. The skeleton is composed of an irregular plumoreticulate arrangement of spongin enforced spicule tracts, predominantly oriented longitudinally, with irregular interconnecting tracts. Peripherally, spicules are detached and in confusion. The ectosome is a thick organic layer, which comes off easily as flakes, and is devoid of spicules. The spicules are styles with occasional strongylote modifications, of rather uniform dimensions, 240–350 × 6–10 μm. The specimen was compared with the type species of *Stylissa caribica* (Lehnert & van Soest, 1998) from Jamaica, and was found to match closely. There is a superficial resemblance with *Axinella corrugata* (George & Wilson, 1919), but in that species the surface is not fleshy-flaky; there is more definitely an axial and extra-axial arrangement of the skeleton, and the styles are significantly longer.¹⁴ In addition, in contrast to *Stylissa caribica* the spicule complement includes oxeas. A voucher fragment of *Stylissa caribica* has been deposited in the collections of the Zoological Museum of Amsterdam under reg. no. ZMA POR. 15607.

Feeding assays. Purified **1** was dissolved in a minimal volume of MeOH and mixed with 1 mL of alginate-based food matrix¹⁵ until all organic and water-soluble components were distributed uniformly throughout the paste. The alginate food matrix was then dispensed with a 1 mL syringe into a 0.25 M calcium chloride solution forming a strand that was allowed to harden for 2 min. The hardened strand was rinsed with filtered seawater and cut into 3 mm pellets with a scalpel. Control pellets were prepared identically but without the addition of natural compounds. Feeding assays were performed with fish (1 terminal phase and 2 females in each of 10 compartments) in aquaria at the University of North Carolina at Wilmington using a common predatory reef fish, the bluehead wrasse *Thalassoma bifasciatum*. Rationale for the choice of this assay fish, and an explanation of the methods for scoring the assay and the statistical analysis, is well described in ref 1. Each replicate assay was performed on a separate group of fish.

Extraction and Isolation. The sample of *Stylissa caribica* was immediately frozen after collection and kept at -20°C until extraction. For bulk extraction followed by isolation of brominated secondary compounds, frozen sponge tissue (155 mL) of *Stylissa caribica* was chopped into small pieces and extracted at room temperature exhaustively in MeOH. The orange/brown-colored crude extract (10 g) was partitioned between *n*-hexane (4×300 mL) and MeOH (150 mL). The methanol extract was then partitioned between *n*-butanol (5×300 mL) and water (300 mL). The resulting *n*-BuOH (2.8 g) phase was initially purified by gel permeation chromatography on LH-20 Sephadex (Pharmacia) using MeOH as mobile phase. Fractions containing brominated metabolites were collected and monitored by TLC on pre-coated silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck) using a mixture of $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_{3\text{aq}}$ (40:20:1) as solvent system and detected by their UV absorbance at 254 or 366 nm. Final purification of the isolated compounds was achieved by preparative RP₁₈ HPLC using the following gradient: 5 min A, 35 min 30% B; A: 5% MeCN/H₂O + 0.1% TFA, B: MeCN + 0.1% TFA. Analytical HPLC was achieved by applying a linear gradient from 20% H₂O (containing 0.1% TFA) to 60% MeCN in 40 min. Fractions containing purified bromopyrrole alkaloids were combined on the basis of analytical HPLC, frozen in liquid nitrogen and freeze dried to afford **1** (140 mg), **2** (13 mg), and **3** (3 mg).

N-Methyl-dibromoisophakellin (1). light yellow powder; UV (H₂O) λ_{max} (lg ϵ) 288 (3.92) nm; CD (MeOH) λ ($\Delta \epsilon$) 207 (-1.56) nm; IR (KBr) ν_{max} 3383, 1697, 1661, 1560, 1425, 1347, 1202, 1134, 801, 722 cm^{-1} ; ¹H and ¹³C NMR data are shown in Table 1; HRFABMS m/z 405.9526 [M+H]⁺, calcd for C₁₂H₁₄N₅O⁸¹Br₂, 405.9524.

Dibromoisophakellin (2). light yellow powder; CD (MeOH) λ ($\Delta \epsilon$) 211 (-0.68) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR data same as reported in ref 4a; HRFABMS m/z 387.9399 [M+H]⁺, calcd for C₁₁H₁₂N₅O⁷⁹Br₂, 387.9408.

Ageliferin (3). light yellow powder; CD (MeOH) λ ($\Delta \epsilon$) 232 (-0.25) nm; ¹H NMR and ¹³C NMR data same as reported in ref 4b and 4c; ESIMS (neg) m/z 617 (52), 619 (100), 621 (52).

Acknowledgment. Financial support from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ko 1314/3-1 to 3-4) is gratefully acknowledged. Furthermore, we are grateful to Professor Joseph R. Pawlik (Department of Biological Sciences, University of North Carolina Wilmington, USA) for giving M.A. the opportunity to participate in a scientific sojourns to the Bahamas onboard the *R/V Edwin Link* in September 1998, during which the sponge *Stylissa caribica* was collected. The use of the research vessel *Edwin Link* was made possible through financial support from the U.S. National Science Foundation (OCE-9711255 to Joseph R. Pawlik). We thank the captain and the crew of the *Edwin Link* for their cooperation. We thank the government of the Bahamas for permission to perform research in their territorial waters. We thank Ellen Lichte for performing HPLC analyses and acknowledge the support of Professor Dr. Christian Griesinger.

References and Notes

- (1) Pawlik, J. R.; Chanas, B.; Toonen, R. T.; Fenical, F. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1995**, *127*, 183-194.
- (2) Wilson, D. M.; Puyana, M.; Fenical, W.; Pawlik, J. R. *J. Chem. Ecol.* **1999**, *25*, 2811-2823.
- (3) Lehnert, H.; van Soest, R. W. M. *Beaufortia* **1998**, *48*, 71-103.
- (4) (a) Fedoreyev, S. A.; Utkina, N. K.; Ilyin, S. G.; Reshetnyak, M. V.; Maximov, O. B. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 3177-3180. (b) Kobayashi, J.; Tsuda, M.; Murayama, T.; Nakamura, H.; Y., O.; Ishibashi, M.; Iwamura, M.; Ohta, T.; Nozoe, S. *Tetrahedron* **1990**, *46*, 5579-5586. (c) Keifer, P. A.; Schwartz, R. E.; Koker, M. E. S.; Hughes, R. G., Jr.; Rittschof, D.; Rinehart, K. L. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2965-2975.
- (5) Jaffe, H. H.; Orchin, M. *Theory and Application of UV Spectroscopy*; Wiley: New York, 1962, p. 350-351.
- (6) (a) Hessing, A.; Hoppe, K. *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 3649-3654. (b) Auterhoff, H.; Kovar, K.-A. *Identifizierung von Arzneistoffen*, 3rd ed.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 1977. (c) Assmann, M.; Lichte, E.; van Soest, R. W. M.; Köck, M. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 455-457.
- (7) Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B. *Spectroscopic Methods in Organic Chemistry*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, New York, 1997.
- (8) (a) Sharma, G. M.; Burkholder, P. R. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1971**, 151-152. (b) Sharma, G. M.; Magdoff-Fairchild, B. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 4118-4124. (c) Sharma, G. M.; Buyer, J. S.; Pomerantz, M. W. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1980**, 78-79. (e) Foley, L. H.; Büchi, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1776-1777. (f) De Nanteuil, G.; Ahond, A.; Guilhem, J.; Poupat, C.; Tran Huu Dau, T.; Potier, P.; Pusset, M.; Pusset, J.; Laboute *Tetrahedron* **1985**, *41*, 6019-6033. (g) Fedoreyev, S. A.; Ilyin, S.; Utkina, N. K.; G.; Maximov, O. B.; Reshetnyak, M. V.; Antipin, M. Y.; Struchkov, Y. T. *Tetrahedron* **1986**, *27*, 3177-3180.
- (9) (a) Lindel, T.; Junker, J.; Köck, M. *J. Mol. Model.* **1997**, *3*, 364-368. (b) Lindel, T.; Junker, J.; Köck, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 573-577. (c) Köck, M.; Junker, J.; Maier, W.; Will, M.; Lindel, T. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 579-586.

- (10) Aue, W. P.; Bartholdi, E.; Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2229-2246.
- (11) Bax, A.; Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2093-2094.
- (12) (a) Chanas, B.; Pawlik, J. R. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **1995**, *127*, 195-211. (b) Chanas, B.; Pawlik, J. R. *Oecologia* **1996**, *107*, 225-231.
- (13) (a) Chanas, B.; Pawlik, J. R.; Lindel, T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1996**, *208*, 185-196. (b) Assmann, M.; Lichte, E.; Pawlik, J. R.; Köck, M. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2000**, *207*, 255-262.
- (14) Alvarez, B.; van Soest, R. W. M.; Rützler, K. *Smithson. Contrib. Zool.* **1998**, *598*, 1-47.
- (15) Pawlik, J. R.; Burch, M. T.; Fenical, W. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1987**, *108*, 55-66.
- (16) Zar, J. H. *Biostatistical Analysis*, 4th ed.; Prentice-Hall: Upper Saddle River, New Jersey, 1999.

Table 1. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of **1** in $\text{DMSO-}d_6$.

Position	$\delta(^{13}\text{C})^a$	$\delta(^1\text{H})^b$	COSY ^c	HMBC ^d
N-CH ₃	35.0	3.92 (3H)	---	3,4
C-2	123.3	---	---	---
C-3	114.0	---	---	---
C-4	121.1	---	---	---
C-5	95.9	---	---	---
C-6	53.8	5.23 (1H)	---	2, 3 (vw), 4, 5, 8, 10
N-7 ^e	---	9.01 (1H)	---	6, 8, 10
C-8	155.0	---	---	---
N-9 ^e	---	10.08 (1H)	---	6, 8, 10
C-10	83.4	---	---	---
C-11	39.3	2.23/2.02 (2H)	12	---
C-12	19.1	2.23/2.02 (2H)	11, 13	---
C-13	44.4	3.52 (2H)	12	10, 12
C-15	157.1	---	---	---
N-16	---	8.17 (2H)	---	---

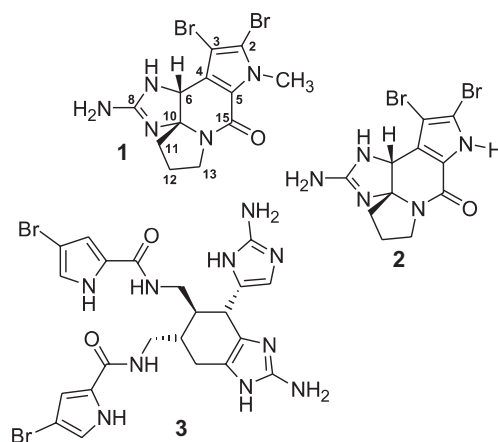
^a ^1H chemical shifts are referenced to the $\text{DMSO-}d_6$ signal (2.50 ppm).

^b ^{13}C chemical shifts are referenced to the $\text{DMSO-}d_6$ signal (39.5 ppm).

^c The COSY correlations are given for both sides of the diagonal.

^d The HMBC correlations are given from protons to carbons.

^e The assignment may be interchanged.

**Figure 1.** Secondary metabolites of *Stylissa caribica*: *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**), dibromoisophakellin (**2**), and ageliferin (**3**).

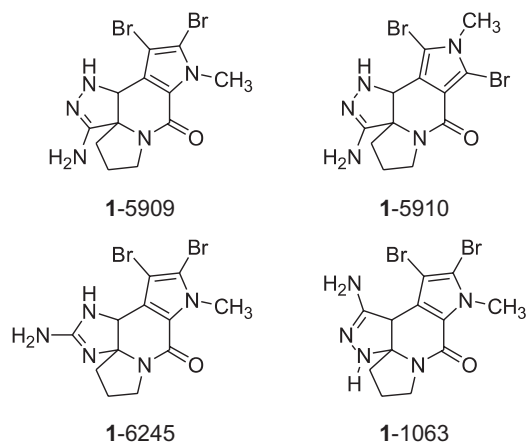


Figure 2. Structural proposals of **1** generated by Cocon (calculation A). The averaged $\delta(^{13}\text{C})$ deviations are: **1-5909** 5.21 ppm, **1-5910** 5.80 ppm, **1-6245** 6.87 ppm and **1-1063** 7.05 ppm.

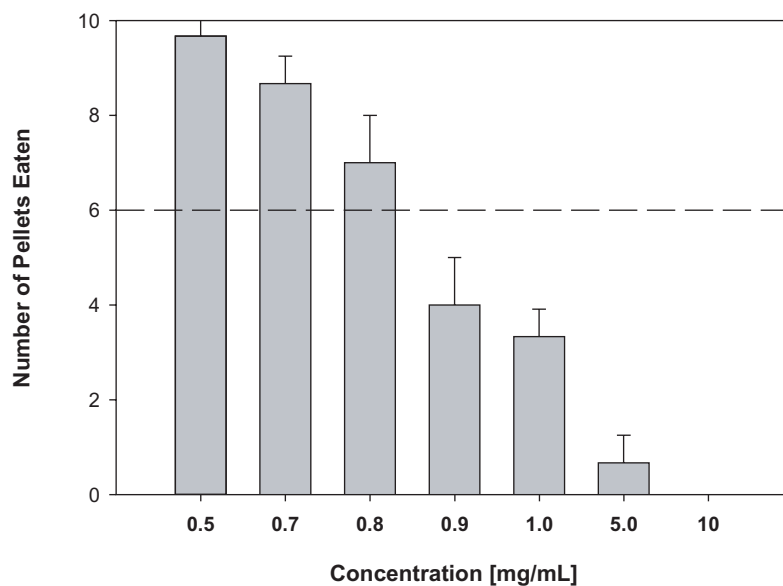


Figure 3. Aquarium assay results of feeding by *Thalassoma bifasciatum* on pellets treated with *N*-methyl-dibromoisophakellin (**1**). All control pellets were eaten in all assays. Three replicate assays have been performed at each concentration. One SD above the mean number of food pellets eaten is indicated. For any individual assay, a treatment was considered deterrent if the number of pellets eaten was less than or equal to 6 ($p < 0.043$ Fisher exact test, one-tailed) as indicated by the dotted line.¹⁶

Meine akademischen Lehrer:

Universität Dortmund

Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt, Prof. Dr. J. Broekaert, StD Dr. G. Brunner, Prof. Dr. A. Geiger, Prof. Dr. C. Gößling, Prof. Dr. H. Jacobs, Prof. Dr. R. K. H. Kinne, Prof. Dr. R. P. Kreher, PD Dr. M. Lehnig, Prof. Dr. H.–G. Schecker, Prof. Dr. R. W. Schmutzler

Bayerische Julius Maximilians–Universität Würzburg

Prof. Ph.D. W. Adam, Prof. Dr. G. Bringmann, Prof. Dr. M. Christl, Prof. Dr. W. Dekant, Prof. K.–H. Drauz, Prof. Dr. V. Engel, Prof. Dr. H. J. Gross, Prof. Dr. J. Grotemeyer, Prof. Dr. D. Hentschler, Prof. Dr. W. Kiefer, Prof. Dr. W. Malisch, Prof. Dr. P. Proksch, Prof. Dr. H. Quast, Prof. Dr. W. D. Schenk, Prof. Dr. M. Schmittel, Prof. Ph.D. F. W. Schneider, Prof. Dr. H. Werner, Prof. Dr. M. Wieber

University College Dublin

Prof. D. A. Brown, DSc

Johann Wolfgang Goethe–Universität Frankfurt

Prof. Dr. T. Dingermann, Prof. Dr. C. Griesinger, Prof. Dr. C. Jochum, PD Dr. M. Köck, Prof. Dr. D. Mebs, Prof. Dr. D. Oesterheld, Prof. Dr. D. Rehm, Prof. Dr. G. Schmalzing

CURRICULUM VITAE

Michael Assmann

Ginnheimer Stadtweg 100
60431 Frankfurt am Main
Telefon: 069 / 539702
E-Mail: ma@org.chemie.uni-frankfurt.de

Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 27.08.1970

Geburtsort: Trier

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung

07/1977 – 06/1981 Katholische St.-Matthias-Grundschule, Bitburg

07/1981 – 07/1983 Katholische St.-Matthias-Realschule, Bitburg

08/1983 – 05/1990 Staatliches St.-Willibrord-Gymnasium, Bitburg

23.05.1990 Allgemeine Hochschulreife

Bundeswehr

07/1990 – 06/1991 Grundwehrdienst, Gerolstein

Studium

10/1991 – 09/1993 Chemie-Studium Universität Dortmund

10/1993 Fortsetzung des Chemie-Studiums an der Bayerischen Julius Maximilians-Universität Würzburg

10.01.1994 Diplom-Vorprüfung (Universität Dortmund)

10/1994 – 03/1995 ERASMUS ICP-Programm University College Dublin/Irland

28.06.1996 Diplom-Hauptprüfung (Universität Würzburg)

08/1996 – 03/1997 Diplomarbeit bei Prof. Dr. P. Proksch (Julius von Sachs-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie) unter Betreuung von Prof. Dr. H.-G. Gross (Institut für Biochemie).
Thema: „Bromierte Isoxazolin-Alkaloide des Schwammes *Aioloichroia crassa*“

19.03.1997 Diplom (Universität Würzburg)

Wissenschaftliche Mitarbeit

01.04. – 31.12.1997 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Julius von Sachs-Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg:
Planung, Organisation und Durchführung einer Tauchexpedition nach Indonesien

im Rahmen dieser Anstellung

- wissenschaftliches Praktikum bei Dr. K. Schaumann am Alfred Wegener-Institut für Polar- und Meeresforschung in der Sektion Biologische Meereskunde (Biologie-II), Arbeitsgruppe Marine Mykologie, (02.04. – 14.04. und 17.11. – 22.11.1997)
- Forschungsaufenthalt an der Hasanuddin University, Ujung Pandang/Indonesien und am Research Centre for Traditional Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta/Indonesien (16.07. – 16.09.1997)

Promotion

seit 01.01.1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Organische Chemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. C. Griesinger/PD Dr. M. Köck. Thema:
„Bromierte Pyrrol-Alkaloide aus karibischen Schwämmen der Gattung *Agelas*: Isolierung, Strukturaufklärung und chemische Ökologie“

im Rahmen der Promotion

- Forschungsaufenthalt bei Prof. J. R. Pawlik am National Undersea Research Center (NURC) in Key Largo, Florida, USA (22.05. – 31.05.1998)
- Teilnahme an der Bahamas-Forschungsexpedition von Prof. J. R. Pawlik an Bord der *RV Edwin Link* (Harbor Branch Oceanographic Institution) (14.09. – 01.10.1998)
- Forschungsaufenthalt bei Dr. R. W. M. van Soest, Instituut voor Biodiversiteit en Ecosysteemdynamica, Zoölogisch Museum, Universiteit van Amsterdam, The Netherlands (16.11. – 20.11.1998)
- Teilnahme an der Bahamas-Forschungsexpedition von Prof. J. R. Pawlik an Bord der *RV Seward Johnson* (Harbor Branch Oceanographic Institution) (26.07. – 10.08.1999)
- Teilnahme an der Bahamas-Forschungsexpedition von Prof. J. R. Pawlik an Bord der *RV Seward Johnson* (Harbor Branch Oceanographic Institution) (24.07. – 08.08.2000)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main, den 24. Dezember 2000

.....
(Michael Assmann)