

**Chemische und biologische Untersuchungen von
Inhaltsstoffen aus Pilzfruchtkörpern der Gattungen
Cortinarius und *Hygrophorus***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Dipl.-Pharm. Apotheker Axel Teichert
geboren am 21. September 1979 in Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ludger Wessjohann
2. Prof. Dr. Shu-Ming Li

Halle/Saale, 12. Juni 2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom 01.01.2005 bis 25.01.2008 im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann angefertigt.

An erster Stelle bin ich Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann zu großem Dank verpflichtet, da er es mir ermöglichte, dieses reizvolle und interessante Thema an diesem renommierten Institut zu bearbeiten. Er förderte selbständiges und zielgerichtetes Arbeiten. Seine Ideen und Diskussionen haben den Fortschritt meiner Arbeiten in hohem Maße beeinflusst.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem direkten Betreuer Herrn Dr. Norbert Arnold. Sein Vertrauen in mich und meine Arbeiten, sein Wissensdrang als auch seine exzellente Betreuung waren stets Motivation für mich. Vielen Dank für sehr lehrreiche Pilzexkursionen, befruchtende Gespräche und die Begeisterung für Naturstoffe.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei der gesamten Arbeitsgruppe Natur- und Wirkstoffchemie für die freundliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. Andrea Porzel für ihre Unterstützung und ihr Engagement bei Messungen und Auswertungen der NMR-Spektren. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Matthias Findeisen von der Universität Leipzig für die unkomplizierte Bereitschaft zur Messung einzelner NMR-Spektren bedanken.

Dem großen Erfahrungsschatz von Herr Dr. Jürgen Schmidt in der Massenspektrometrie, speziell bei ESI-CID-MS Fragmentierungen, verdanke ich viele erste Strukturhinweise.

Weiterhin möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Christine Kuhnt vor allem für ihr Engagement bei den Messungen der Massenspektren innerhalb des SRM-Screenings auf β -Carbolinalkaloide in *Hygrophorus* spp. bedanken. Auch auf Frau Martina Lerbs' Hilfe bei MS-Messungen war stets Verlass.

Ein großer Dank gebührt Herrn Tobias Dräger, der mir durch die Synthese eines 4-Oxo-2-alkensäurederivates aus der Not der geringen Substanzmenge half und somit viele Biotestergebnisse ermöglichte. Auch die Darstellung des zu Biosynthesestudien verwendeten perfluorierten 4-Oxo-2-alkensäurederivates ist ihm zu verdanken.

Herrn PD Dr. Wolfgang Brandt danke ich für die Durchführung der Dockingstudien, Frau Dr. Aleksandra Tramczynska für die AAS-Messungen und Herrn Dr. Hans-Herrmann Rüttinger für die Möglichkeit der Messung von Fluoreszenzspektren.

Ein weiterer Dank geht an die Herren Prof. Dr. Kurt Merzweiler und Dr. Christoph Wagner von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die Durchführung der Röntgenkristallstrukturanalyse.

Ich bedanke mich herzlichst bei der Arbeitsgruppe um Dr. Sabine Rosahl, speziell bei Herrn Lennart Eschen-Lippold, für die sehr gute interdisziplinäre Zusammenarbeit bei den

Durchführungen der Biotests mit *Phytophthora infestans*, *Colletotrichum coccodes* und *Arabidopsis thaliana*. Ohne die Unterstützung wären viele interessante Ergebnisse nicht zustande gekommen. Es war sehr lehrreich und hat viel Spaß gemacht.

Für die Umsetzung der Ideen zur Etablierung des Algentoxizitätsbiotests möchte ich mich bei Frau Karin Ketzer bedanken.

Mein Dank gilt auch der Fa. Probiodrug AG, speziell Herrn Dr. Stephan Schilling, für die Durchführung der A β -Peptid-Oligomersierungsassays.

Gemeinsam mit Herrn Dr. Nasser A. Awadh Ali hatte ich die Möglichkeit, biologische Screenings von Extrakten endemischer Pflanzen aus Socotra durchzuführen.

Ein Dank geht auch an Frau Jeanette Keim, die mich während ihres Praktikums tatkräftig unterstützte. Weiterhin bedanke ich mich bei den Herren Eric Steinert und Jürgen Duffner für die Bereitstellung der wunderschönen Fotos von *C. claricolor*, *C. subtortus* und *H. eburneus*.

Danken möchte ich natürlich dem Technikum-Team und den LaborkollegInnen: Frau Maritta Süße, Frau Monika Kummer, Frau Dr. Katrin Franke, Frau Claudia Bobach, Frau Katharina Michels, Herrn Dr. Tilo Lübken, Herrn Carlo Tiebe, Herrn Dr. Dang Ngoc Quang und Herrn Torsten Geißler für das nette Arbeitsklima, zahlreiche Ratschläge und wertvolle Gespräche.

Ganz zum Schluss gilt mein größter Dank meinen Eltern für jegliche Unterstützung während des gesamten Studiums und vor allem Jenny. Ohne ihr Entgegenkommen wäre vieles nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS..... | 7 |
| 1 ZUSAMMENFASSUNG..... | 9 |
| 2 SUMMARY..... | 12 |
| 3 EINLEITUNG..... | 15 |
| 3.1 Naturstoffe – Potential und Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung | 15 |
| 3.2 Inhaltsstoffe von Pilzen..... | 18 |
| 4 UNTERSUCHUNGEN AN PILZARTEN DER GATTUNG <i>CORTINARIUS</i> | 21 |
| 4.1 Die Gattung <i>Cortinarius</i> | 21 |
| 4.2 <i>Cortinarius brunneus</i> (Pers.) Fr..... | 24 |
| 4.2.1 β -Carbolinalkaloide aus <i>Cortinarius brunneus</i> | 24 |
| 4.2.2 <i>N</i> -Glukosylierte Indolverbindungen aus <i>Cortinarius brunneus</i> | 32 |
| 4.2.3 Weitere <i>N</i> -haltige Inhaltsstoffe aus <i>Cortinarius brunneus</i> | 38 |
| 4.3 (Iso-) Chinolinalkaloide aus <i>Cortinarius subtortus</i> (Pers.) Fr..... | 42 |
| 4.3.1 <i>Cortinarius subtortus</i> (Pers.) Fr..... | 42 |
| 4.3.2 Isolierung der Inhaltsstoffe | 43 |
| 4.3.3 6-Hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (63) | 44 |
| 4.3.4 4-Amino-6-hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (64) | 44 |
| 4.3.5 1,2-Dihydro-7-hydroxy-1-oxo-isochinolin-5-carbonsäure (65)..... | 45 |
| 4.3.6 Biologische Aktivitäten der (Iso-) Chinolinalkaloide | 47 |
| 4.3.7 Überblick strukturähnlicher Naturstoffe | 47 |
| 5 UNTERSUCHUNGEN AN PILZARTEN DER GATTUNG <i>HYGROPHORUS</i> | 49 |
| 5.1 Die Gattung <i>Hygrophorus</i> | 49 |
| 5.2 Bisherige Arbeiten zur Charakterisierung von Inhaltsstoffen | 50 |
| 5.3 <i>Hygrophorus eburneus</i> (Bull.) Fr..... | 53 |
| 5.3.1 Harman (117) und Norharman (118) aus <i>Hygrophorus eburneus</i> | 53 |
| 5.4 <i>Hygrophorus hyacinthinus</i> Quél..... | 55 |
| 5.4.1 Der Fluoreszenzfarbstoff aus <i>Hygrophorus hyacinthinus</i> | 56 |
| 5.5 Chemotaxonomische Relevanz der β -Carbolinalkaloide Brunnein A (27), Harman (117) und Norharman (118) innerhalb <i>Hygrophorus</i> | 57 |
| 5.5.1 LC-ESI/SRM Screening..... | 57 |
| 5.5.2 Beispiel chemotaxonomischer Markermetaboliten in Höheren Pilzen | 59 |
| 5.6 4-Oxo-2-alkensäuren aus <i>Hygrophorus eburneus</i> | 60 |
| 5.6.1 Darstellung von (<i>E</i>)-4-Oxohexadec-2-ensäure (104)..... | 61 |
| 5.6.2 Biologische Aktivitäten der 4-Oxo-2-alkensäuren (104–111) | 61 |
| 5.6.3 Biosynthetischer Zusammenhang zwischen 4-Oxo-2-alkensäuren und Hygrophoronen..... | 61 |
| 5.6.4 Vergleich der 4-Oxo-2-alkensäuren und Cyclopentenone aus <i>Hygrophorus</i> spp. mit Oxylipinen..... | 63 |
| 5.7 Zum Vorkommen von Eisen in <i>Hygrophorus discoxanthus</i> | 65 |
| 6 BIOLOGISCHE AKTIVITÄTEN VON REINSUBSTANZEN UND EXTRAKTEN | 66 |
| 6.1 Screening von Naturstoffen – von der natürlichen Quelle zum Wirkstoff..... | 66 |
| 6.2 Aufbau und Etablierung eines Bioassays auf algitoxische Wirkung | 67 |
| 6.2.1 Notwendigkeit neuer Algizide | 67 |
| 6.2.2 Etablierung und Durchführung des Biotests | 67 |
| 6.2.3 Screening von <i>Hygrophorus</i> Extrakten auf algitoxische Aktivität | 68 |
| 6.3 Screening von Reinsubstanzen und Extrakten auf Wirkungen an potentiellen Targets der Alzheimer-Therapie | 69 |
| 6.3.1 Pathogenese der Alzheimer-Krankheit..... | 69 |
| 6.3.2 Screening von Reinsubstanzen und Extrakten auf Inhibierung der Acetylcholinesterase .. | 70 |
| 6.3.3 Screening von Pilzinhaltsstoffen auf Inhibierung der Amyloid- β -Peptid Oligomerisierung .. | 80 |
| 6.4 Biologische Untersuchung von 49 auf Auxinwirkung..... | 84 |
| 6.5 Biologische Aktivitätsuntersuchungen der (Iso-) Chinolinalkaloide aus <i>C. subtortus</i> | 86 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 6.5.1 | Antifungische Aktivität..... | 86 |
| 6.5.2 | Antioxidative Aktivität..... | 87 |
| 6.6 | Biologische Aktivitätsuntersuchungen der 4-Oxo-2-alkensäuren (104–111) aus <i>H. eburneus</i> | 87 |
| 6.6.1 | Antifungische Aktivitäten..... | 87 |
| 6.6.2 | Antioomycetische Aktivität..... | 88 |
| 6.6.3 | Antibakterielle Aktivitäten..... | 91 |
| 7 | EXPERIMENTELLER TEIL..... | 95 |
| 7.1 | Geräte..... | 95 |
| 7.2 | Chemikalien..... | 97 |
| 7.3 | Pilzmaterial..... | 98 |
| 7.4 | Extraktion und Reinigung..... | 98 |
| 7.4.1 | <i>Cortinarius brunneus</i> | 98 |
| 7.4.2 | <i>Cortinarius subtortus</i> | 100 |
| 7.4.3 | <i>Hygrophorus eburneus</i> | 100 |
| 7.4.4 | <i>Hygrophorus hyacinthinus</i> | 100 |
| 7.4.5 | <i>Hygrophorus discoxanthus</i> | 101 |
| 7.4.6 | LC-ESI/SRM-Screening auf 27, 117 und 118 in <i>Hygrophorus</i> spp. | 101 |
| 7.5 | Verimpfungsexperimente..... | 102 |
| 7.6 | Biologische Aktivitätsbestimmungen..... | 102 |
| 7.6.1 | Bestimmung der antifungischen Aktivität gegen <i>Colletotrichum coccodes</i> | 102 |
| 7.6.2 | Bestimmung der antifungischen Aktivität gegen <i>Cladosporium cucumerinum</i> | 103 |
| 7.6.3 | Bestimmung der antioomycetischen Aktivität gegen <i>Phytophthora infestans</i> | 103 |
| 7.6.4 | Bestimmung der antibakteriellen Aktivität gegen <i>Vibrio fischeri</i> | 105 |
| 7.6.5 | Bestimmung der antibakteriellen Aktivität gegen <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i> | 106 |
| 7.6.6 | Bestimmung der algitoxischen Aktivität gegen <i>Spirulina laxissima</i> und <i>Scenedesmus rubescens</i> | 107 |
| 7.6.7 | Bestimmung der Radikalfängereigenschaften im DPPH Biotest..... | 108 |
| 7.6.8 | Bestimmung der AChE-inhibitorischen Aktivität..... | 109 |
| 7.6.9 | Bestimmung der A β -Peptid-aggregationshemmenden Aktivität..... | 109 |
| 7.6.10 | Bestimmung der Auxinwirkung..... | 110 |
| 8 | CHARAKTERISIERUNGEN..... | 111 |
| | LITERATURVERZEICHNIS..... | 123 |
| | A. ANHANG..... | 132 |
| A.1 | Einkristallröntgenstruktur-Analyse von 57..... | 132 |
| A.2 | Biologische Aktivitäten diverser <i>Hygrophorus</i> -Extrakte..... | 133 |
| | LEBENS LAUF..... | 135 |
| | VERZEICHNIS DER FÜR DIESE DISSERTATION RELEVANTEN EIGENEN PUBLIKATIONEN..... | 137 |
| | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... | 139 |

Abkürzungsverzeichnis

Allgemein

| | |
|----------------|------------------------------|
| AAS | Atomabsorptionsspektroskopie |
| Abb. | Abbildung |
| berechn. | berechn. |
| <i>n</i> -BuOH | <i>n</i> -Butanol |
| EtOH | Ethanol |
| EtOAc | Ethylacetat |
| HOAc | Essigsäure |
| Koll. | Kollektion |
| MeCN | Acetonitril |
| MeOH | Methanol |
| min | Minute(n) |
| h | Stunde(n) |
| RT | Raumtemperatur |
| Tab. | Tabelle |
| TFA | Trifluoressigsäure |

Isolierung und Charakterisierung

| | |
|------------|---|
| CC | Column Chromatography |
| CID | Collision Induced Dissociation |
| COSY | Correlated Spectroscopy |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| EI | Electron Impact Ionization |
| ESI | Electrospray Ionization |
| FTICR | Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance |
| GC | Gas Chromatography |
| HMBC | Heteronuclear Multiple Bond Correlation |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| HSQC | Heteronuclear Single Quantum Correlation |
| MS | Mass Spectrometry |
| <i>m/z</i> | Masse/Ladungszahl |
| NMR | Nuclear Magnetic Resonance |
| NOE | Nuclear Overhauser Effect |
| NOESY | Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| RDA | Retro-Diels-Alder (Fragmentation) |
| rel. Int. | relative Intensität |

| | |
|-------------|--|
| R_f | Retention factor |
| ROESY | Rotating Frame Overhauser Enhancement Spectroscopy |
| RP | Reversed Phase |
| R_t | Retention time |
| <i>TPSA</i> | Topological Polar Surface Area |
| SIM | Selected Ion Monitoring |
| S/N | Signal-to-Noise Ratio |
| SRM | Selected Reaction Monitoring |
| UV | Ultraviolett |

Biotests

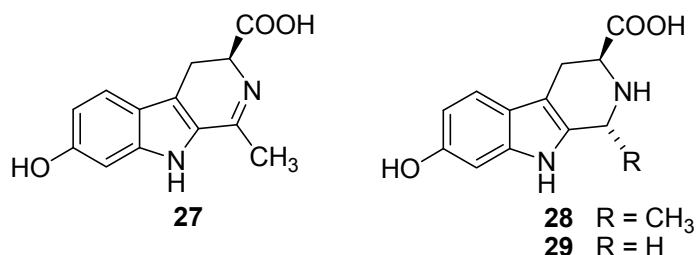
| | |
|-----------------|---|
| $A\beta_{1-40}$ | Amyloid- β -Peptid des Typs $A\beta$ -40 |
| AChE | Acetylcholinesterase |
| EC | Effective Concentration |
| dpi | days post inoculation |
| FU | Fluorescence Units |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| IC | Inhibitory Concentration |
| LU | Luminescence Unit |
| M | mol/l |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| MTP | Mikrotiterplatte |
| OD | Optical Density |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| <i>TcAChE</i> | Acetylcholinesterase von <i>Torpedo californica</i> |

1 Zusammenfassung

Das Reich der Pilze präsentiert mit geschätzten 1.500.000 Arten die größte Gruppe höherer Organismen auf unserer Erde, von denen zum jetzigen Zeitpunkt erst ca. 75.000 Arten (8 %) beschrieben sind (Hawksworth 2001). Davon wurden bisher nur sehr wenige auf ihre (bioaktiven) Inhaltsstoffe untersucht. Es kann somit von einem enormen Potential an neuen Naturstoffen in den bislang unerforschten Pilzarten ausgegangen werden, welche die Grundlage für die Entwicklung von Leitsubstanzen für neue Arzneistoffe, Kosmetika oder Pflanzenschutzmittel darstellen könnten. Auch für die systematische und taxonomische Einordnung können diese Sekundärstoffe bedeutungsvoll sein.

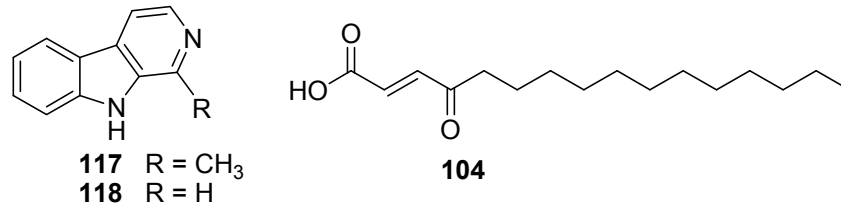
Ziel dieser Arbeit war es, aus Fruchtkörpern bisher unerforschter Pilzarten Inhaltsstoffe zu isolieren und zu charakterisieren sowie ihre potentiellen biologischen Aktivitäten und ihre Eignung als chemotaxonomische Markersubstanzen zu testen. Ein weiterer Bestandteil der Arbeit war die Etablierung biologischer Eingangstests für wirkungsorientierte Fraktionierungen aktiver Prinzipien aus komplex zusammengesetzten Extrakten.

Aus Fruchtkörpern von *Cortinarius brunneus* wurden insgesamt 18 stickstoffhaltige Inhaltsstoffe isoliert und strukturell charakterisiert. Unter ihnen konnte mit den neuen β -Carbolinalkaloiden, Brunneine A–C (**27–29**), die Ursache für die intensive gelbgrüne Fluoreszenz des Methanolextraktes aufgedeckt werden. Die absolute Konfiguration von Brunnein A (**27**) konnte über einen oxidativen Ringabbau und nachfolgende GC-MS Untersuchungen bestimmt werden. Über die Darstellung strukturähnlicher Enantiomere und den Vergleich spektroskopischer Daten konnte auch auf die Konfiguration der Brunneine B (**28**) und C (**29**) geschlossen werden. In einem virtuellen Docking von Brunnein A (**27**) in das aktive Zentrum der *TcAChE* wurde ein hoher Fittingwert berechnet. Allerdings bestätigten die *in vitro* Ergebnisse nicht die erhoffte starke acetylcholinesterase-inhibierende Aktivität. Durch eine partielle Derivatisierung von Brunnein A (**27**) zum *N*-Methylderivat konnte die Aktivität gesteigert werden.



Auch vier *N*-glukosylierte Indolderivate (**47–50**) wurden innerhalb der Untersuchungen aus *C. brunneus* isoliert und charakterisiert. **49** stellt ein Indol-3-yl-essigsäure-Konjugat dar. In einem Biotest wurde gezeigt, dass **49** das Pfahlwurzellängenwachstum von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen im Gegensatz zur freien Indolessigsäure nicht signifikant hemmt und somit keine Auxinwirkung besitzt. Des Weiteren wurden für **49** hemmende

stanzen zur Pflanzenschutzmittelentwicklung. Eine biosynthetische Verwandtschaft zu den ebenfalls antimikrobiellen Hygrophoronen aus *Hygrophorus* wurde durch Verimpfung von perfluorierter 4-Oxotetradec-2-ensäure an *Hygrophorus* Fruchtkörper untersucht. Neben unspezifischen Metabolisierungen konnte allerdings kein Einbau in ein Hygrophoron festgestellt werden, weshalb eine mögliche Interconversion unklar bleibt.



Ein zusätzlicher Teil beinhaltet die Etablierung eines Eingangsbiotests zur Bestimmung algitoxischer Eigenschaften von Extrakten und Reinsubstanzen. Dieses auf bioautographischen Methoden basierende Biotestsystem konnte bereits mit der Detektion von **117** und **118** im Ethylacetatextrakt von *H. eburneus* erfolgreich angewendet werden.

Des Weiteren wurden Biotestverfahren zur Bestimmung von Cholinesterase-inhibitorischen Aktivitäten und Radikalfängereigenschaften erfolgreich für Extrakt- und Reinsubstanzscreenings eingesetzt.

2 Summary

Fungi represent the largest group of Higher Organisms on our globe with an estimated amount of 1.500.000 species (Hawksworth 2001). Only approximately 8 % of them are described today (75.000 species). So far only very few of them were examined for their (bioactive) metabolites. It can be assumed that there will be an enormous potential of new natural products with high impact for the development of new drugs, cosmetics, or crop protectants. Furthermore, such metabolites can be of great value for chemotaxonomical classifications for, or within a species.

Following this idea, the goal of this thesis comprises the chemical investigation of unexplored Macromycetes as well as the screening of their identified metabolites for biocidal and other activities.

Eighteen *N*-containing metabolites were isolated from fruiting bodies of *Cortinarius brunneus*. Among them three new β -carboline alkaloids, brunneins A–C (**27–29**), could be observed which are responsible for the strong yellowish fluorescence of the methanol extract of this fungus. The absolute configurations of the brunneins A–C (**27–29**) were established either by an oxidative degradation method, or by comparison of their spectroscopic data with those of synthesized analogues. An *in silico* docking approach of **27** into the active site of the acetylcholinesterase *TcAChE* offered good fitting scores based on strong molecule interactions. *In vitro* experiments did not confirm the predicted AChE inhibitory activities of brunnein A (**27**). However, the activity could be enhanced by partial derivatization of the molecule.

Additionally, four new *N*-glucosylated indole derivatives (**47–50**) were isolated from the same fungus. Compound **49** is the *N*-glucoside of the plant growth regulator (1*H*-indol-3-yl) acetic acid (IAA), but in contrast it does not exhibit auxin like activity in an *Arabidopsis thaliana* germination and root elongation assay. Furthermore, **49** demonstrated inhibitory activity of amyloid- β -peptide aggregation of potential value for a new kind of therapy for Alzheimer's disease.

Mycocochemical investigations of *Cortinarius subtortus* resulted in the isolation of two quinolines (**63**, **64**) and one isoquinoline acid (**65**). The three new natural products displayed moderate antioxidative properties in a DPPH free radical scavenger assay. Compound **63** exhibited antifungal activity against the phytopathogenic fungus *Colletotrichum coccodes*.

In the course of investigations of bioactive secondary metabolites from *Hygrophorus* spp. the antialgal β -carboline alkaloids harmane (**117**) and norharmane (**118**) were isolated from *H. eburneus*. The reason of the remarkable yellowish fluorescence of the fruiting bodies of the rare species *Hygrophorus hyacinthinus* refers to the occurrence of **27**.

The distribution of **27**, **117**, and **118** among *Hygrophorus* spp. was investigated by using LC-ESI tandem mass spectroscopy methods, especially selected reaction monitoring (SRM). While **117** and **118** are widely distributed in *Hygrophorus*, **27** seems to be a specific marker for the section Olivaceoumbrini.

An extended study of the antimicrobial potential of the unusual 4-oxo-2-alkenoic acids from *Hygrophorus eburneus*, assumed to be part of the chemical defense of this fungus, revealed excellent antifungal, antibacterial, and antioomycetal properties.

A biosynthetic relationship to previously isolated cyclopentenone derivatives (hygrophorones A–G) was investigated by feeding experiments with a poly-fluor-labelled 4-oxo-2-alkenoic acid. While a direct incorporation was not observed, simple metabolism like hydroxylation or reduction of the applied substance was detected.

In order to identify the active principle(s) from natural sources, bioassays provide valuable chemical and bioactivity information prior to extensive isolation work. With the establishment of an antialgal bioassay based on bioautographic methods efforts for the rapid identification of algitoxic compounds from complex mixtures like crude extracts was made available. This has been confirmed by the detection of the antialgal β -carboline alkaloids harmane (**117**) and norharmane (**118**) in a crude extract of *Hygrophorus eburneus*.

Within this thesis, different bioassays have been used for several extract and single compound screens.

3 Einleitung

3.1 Naturstoffe – Potential und Bedeutung für die Wirkstoffentwicklung

Naturstoffe spielen eine wichtige Rolle in der Suche nach neuen Wirkstoffen zur Behandlung von Krankheiten, aber auch zur Herstellung von Kosmetika, Nahrungsergänzungs- und Pflanzenschutzmitteln.

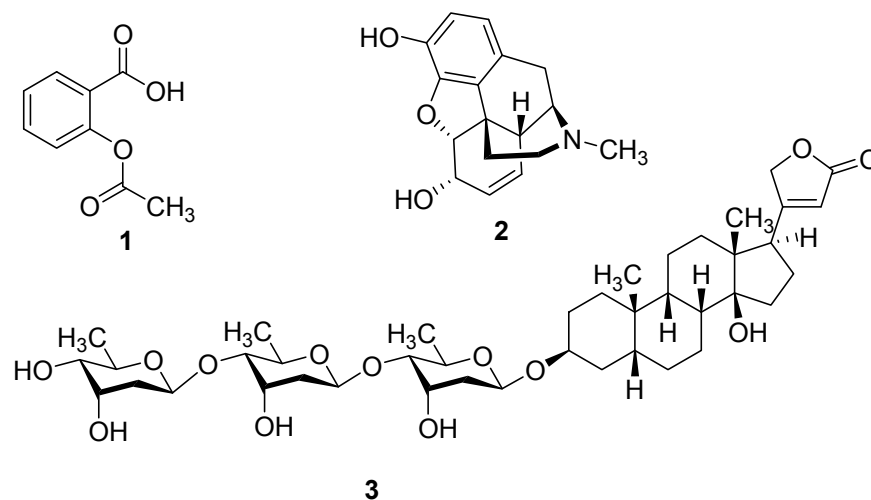
Die im Allgemeinen als Naturstoffchemie bezeichnete Suche befasst sich mit der Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese sowie biologischer Aktivitätsbestimmung und Biosynthese biogener Substanzen. Diese überwiegend aus dem Sekundärstoffwechsel von Tieren, Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen hervorgegangenen Substanzen besitzen eine sehr hohe strukturelle und bioaktive Diversität. Während die Primärstoffe wie Aminosäuren, Kohlenhydrate und Lipide ubiquitär in der Natur zu finden sind, ist das Vorkommen bestimmter Sekundärmetaboliten meist auf spezielle taxonomische Gruppen beschränkt. Dabei bildet der kleine Pool der Primärstoffe die Bausteine für Biosynthesen teilweiser hochkomplexer Sekundärstoffe. Diese Moleküle, die die Evolution über Millionen von Jahren entwickelt hat, dienen dem jeweiligen Organismus beispielsweise zur Verteidigung oder aber als Botenstoffe zwischen Zellen und Organen oder mit einem anderen Organismus. Häufig ist allerdings die genaue Funktion unbekannt.

Die intensiven Strukturuntersuchungen von Naturstoffen stimulierten seit jeher die Entwicklung von Trenntechniken, spektroskopischen Verfahren zur Strukturaufklärung sowie neuer Synthesemethoden. Gleichfalls entstand in den letzten Jahrzehnten eine Verschmelzung mit molekularbiologischen, pharmakologischen und toxikologischen Arbeitstechniken. Zum Beispiel dienen Naturstoffe mittlerweile als unverzichtbare Werkzeuge zur Aufklärung zellulärer Wirkmechanismen (Nuhn 2006).

Allerdings waren die Arbeiten mit Naturstoffen nicht nur von akademischem Interesse. Durch die vielfältigen Eigenschaften der Naturstoffe wurde schon früh ihr Nutzen als Färbemittel, Öle, Wachse Gewürze, Parfums und nicht zuletzt auch als Heilmittel diverser Krankheiten erkannt (Croteau *et al.* 2000).

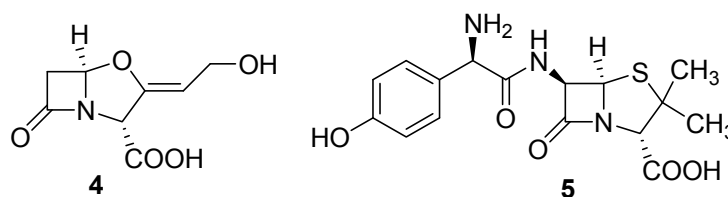
Seit jeher hat die Menschheit die Flora und Fauna um sich herum durchsucht und genutzt, um Krankheiten zu bekämpfen. Erste exakte Aufzeichnungen dokumentieren bereits im „Papyrus Ebers“ um 1500 v. Chr. über die Anwendung und Zubereitung von über 700 Drogen, Mineralien und tierischen Organen (Newman 2000). Diskurides' „De Materia Medica“ (1. Jh. n. Chr.) ist das erste wissenschaftlich anspruchsvolle Arzneibuch des europäischen Altertums mit Beschreibungen von über 600 Heilpflanzen. Dieses Buch galt bis in die Renaissance als wichtige Quelle. Der Arzt und Apotheker Paracelsus (1493–1541) machte die Inhaltsstoffe der Pflanzen für deren heilende Wirkung verantwortlich („Quinta essentia“). Der akkumulierte Wissensschatz bildete den Inhalt der Pharmakopöen mehrerer Jahrhunderte. Die enge Verbundenheit von Traditioneller Medizin und natürlichen Giften

stellte dann auch die Basis für die Entwicklung der ersten Arzneistoffe Aspirin (**1**), Morphin (**2**) und Digitoxin (**3**) dar (Butler 2004).



Nach der Entdeckung der Penicilline 1928 durch A. Fleming (Fleming 1929), ersten klinischen Studien in den 1940er Jahren und die sich anschließende Kommerzialisierung abgeleiteter synthetischer Derivate änderte sich die Strategie der Wirkstoffsuche. Zunächst ermöglichte die Entwicklung der organischen Synthese die Bereitstellung ausreichender Derivate für QSAR-Bestimmungen. Ständige Fortschritte auf dem Gebiet der Molekularbiologie gaben nun Einsichten in die molekularen Mechanismen einzelner Krankheiten. Dadurch konnten direkte Zielorte (Targets) für bestimmte Wirkstoffe ausfindig gemacht werden. Die Kombination der Informationen beider Gebiete ist höchst bedeutend für Design und Synthese rational designter Wirkstoffmoleküle, deren Entwicklung durch Fortschritte in der Computerchemie realisierbar wurde.

Ein erster Durchbruch in der Wirkstoffforschung gelang mit dem so genannten mechanismus-basierten Screening zur bioaktivitätsgesteuerten Isolierung. Ein Höhepunkt dieses Verfahrens stellt sicherlich die Entdeckung des β -Lactamase-Inhibitors Clavulansäure (**4**) (*Streptomyces clavuligerus*) dar, der heute noch in Kombination mit dem Penicillinantibiotikum Amoxicillin (**5**) verwendet wird, um Resistenzmechanismen der bakteriellen Krankheitserreger zu überlisten. Während in den 1950ern die Strategie der Arzneistoffsuche aus der Synthese von Wirkstoffen und der Isolierung von Naturstoffen gleichberechtigt zusammengesetzt war, hat sich innerhalb der letzten 20 Jahre die Situation mit dem Aufkommen des vollautomatisierten Hochdurchsatzscreenings (HTS) und der Kombinatorischen Chemie dramatisch zu Gunsten der Synthesestrategie gewandelt.



Mit der Geburt der Kombinatorischen Chemie durch Geysen *et al.* (1984) versprach man sich ein scheinbar unerschöpfbares Angebot von Substanzbibliotheken zur Wirkstoff

findung. Das sorgte für eine voreilige Abwendung von den Naturstoffen und viele pharmazeutische Unternehmen beendeten ihre Arbeiten auf diesem Gebiet. Die am häufigsten argumentierten Nachteile der Naturstoffe bestehen für die Unternehmen in einem hohen finanziellen Aufwand für eine hochqualitative Extraktsammlung, ein zu hoher Zeitfaktor von der Identifizierung eines aktiven Extraktes bis zur Isolierung und Aktivitätsprüfung des verantwortlichen Naturstoffes sowie in der Unvorhersehbarkeit der Neuheit einer aktiven Substanz. Des Weiteren spielen die schwierige Lenkbarkeit der Entwicklung - neue Pharmakophore erfordern stets neue Syntheseansätze - ebenso eine limitierende Rolle wie die Patentierbarkeit und Klärung des Geistigen Eigentums eines so genannten Wirkstoffkandidaten, die aufgrund fehlender rechtlicher Grundlagen der Länder, in dem das Habitat zu finden ist, häufig nicht geregelt sind (Ortholand 2004). Der Hauptnachteil ist jedoch, dass viele Naturstoffe, sofern sie nicht reichlich verfügbar sind, zu komplex für wirtschaftliche Synthesen sind.

Den angeführten Nachteilen stehen allerdings auch einzigartige Vorteile der Naturstoffe gegenüber. Einerseits haben sie den Vorteil, innerhalb eines Extraktscreenings einen großen so genannten Chemischen Raum (Henkel *et al.* 1999) zu präsentieren. Andererseits besitzen Naturstoffe eine sehr hohe stereochemische Komplexibilität, welche die Natur im Laufe der Evolution spezifisch entwickelte, damit diese Substanzen mit spezifischen Zielmolekülen eines biologischen Systems wechselwirken können. Dabei wirken viele Naturstoffe nicht nur ausschließlich auf ihre ursprünglichen Zielstrukturen, beispielsweise im pflanzlichen Organismus, sondern auch auf bestimmte Zielmoleküle des humanen Stoffwechsels. Proteinstrukturen wie Enzyme und Rezeptoren stellen häufig solche Zielmoleküle dar. Des Weiteren sind bioaktive Naturstoffe meist kleine Moleküle, erfüllen häufig die so genannten "*Lipinski's Rule of Five*" und besitzen somit im Allgemeinen arzneistoffähnliche Eigenschaften und eine orale Bioverfügbarkeit (Lipinski *et al.* 1997). Mittlerweile scheinen nach den zunächst ernüchternden Jahren der auf kombinatorischer Chemie basierten Wirkstoffsuche, die Naturstoffe aufgrund ihrer stärker varierenden und wirkstoffähnlicheren Strukturen, wieder eine größere Rolle zu spielen (Harvey 2007), und eine gleichberechtigte Koexistenz, wenn nicht gar eine Kombination beider Ansätze gewinnen an Bedeutung.

Naturstoffe sind eine signifikante Quelle neuer Wirkstoffe und Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer Medikamente. In einer umfassenden Analyse beziffern Newman & Cragg (2007) den Anteil an Substanzen rein synthetischen Ursprungs der weltweit auf den Markt gebrachten Pharmaka von 01/1981–06/2006 auf 30 %. Der Rest ist aufgeteilt in Naturstoff-abgeleitete Derivate (23 %) und synthetische Naturstoffmimetika (24 %), sowie Biologicals (14 %), reine Naturstoffe (5 %) und Impfstoffe (4 %).

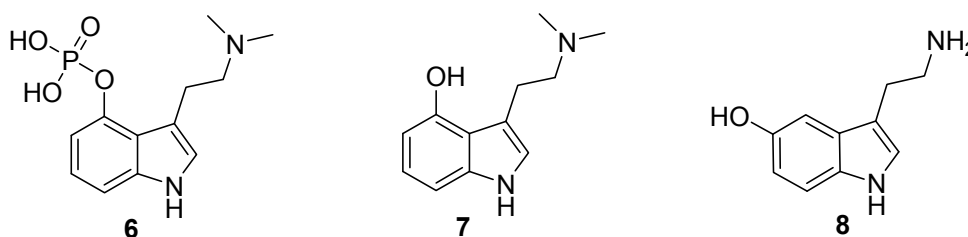
Die Erforschung der Natur nach neuen aktiven Substanzen ist noch längst nicht ausgeschöpft. Die Hinwendung zu chemisch bisher wenig erforschten natürlichen Quellen wie endophytischen Pilzen oder extremophilen Mikroben lässt auf eine Anzahl neuer Natur

stoffklassen hoffen (Clardy & Walsh 2004). Durch die Übertragung ihres genetischen Materials, welches die entsprechenden Biosynthesen codiert, in kultivierbare Mikroorganismen, erschließen sich Zugänge zu ihren Sekundärmetaboliten (Handelsman *et al.* 1998). Neben solchen metagenomischen Gen-Transfer-Methoden kann eine Produktion so genannter nicht-natürlicher Naturstoff-Homologe durch gezielte Manipulationen im entsprechenden Biosyntheseweg des Organismus (Kombinatorische Biosynthese) erreicht werden (Katz & McDaniel 1999). Durch die Modifizierung einzelner funktioneller Gruppen kann beispielsweise die Toxizität einer Substanz erniedrigt und somit eine größere therapeutische Breite erreicht werden oder die Wasserlöslichkeit einer Substanz kann erhöht und somit eine orale Anwendung in der Therapie ermöglicht werden (Frank & Müller 2007).

3.2 Inhaltsstoffe von Pilzen

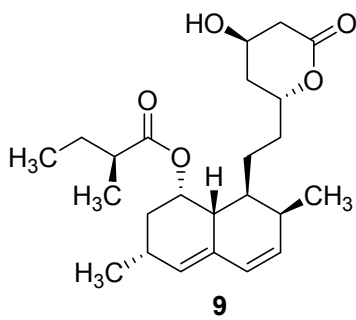
Pilze spielen für die Menschheit schon seit der Antike eine wichtige Rolle, etwa bei der Käse- und Hefeteigherstellung oder der alkoholischen Gärung. Einige Fruchtkörper der Ständerpilze erfreuen sich auch als Delikatessen seit jeher großer Beliebtheit.

Bei der 1991 entdeckten Gletschermumie „Ötzi“ fand man den zur Blutstillung genutzten Birkenporling (*Piptoporus betulinus*), sowie Reste des Zunderschwammes (*Fomes fomentarius*), der wegen seiner glimmenden Eigenschaft zum Feuerentfachen bzw. Glutergehalt genutzt wurde. Auch die halluzinogenen Eigenschaften, insbesondere von *Psilocybe* spp. wurden schon vor 1000 Jahren für rituelle Zwecke genutzt, wie der Fund prähistorischer Pilzstatuen vermuten lässt. Die Ursache der psychoaktiven Wirkung dieser Pilze konnte mit der Isolierung und Charakterisierung von Psilocybin (**6**) und Psilocin (**7**) aus *Psilocybe mexicana* geklärt werden (Hofmann *et al.* 1958; 1959). Ihre strukturellen Ähnlichkeiten mit dem Neurotransmitter Serotonin (**8**) scheinen die Ursache für ihre halluzinogenen Effekte zu sein (Vollenweider *et al.* 1998).



Die Bedeutung der Pilzfruchtkörper als Heilmittel war aufgrund ihres temporären Vorkommens, verglichen mit der Bedeutung von perennierenden Pflanzen, allerdings eher gering. Dies änderte sich mit einem der dramatischsten Fortschritte in der Medizin, der Entdeckung des Penicillins (Fleming 1929). Mit dem Auffinden dieses pilzlichen Sekundärmetaboliten begann die Ära der naturstoffbezogenen Antibiotikaforschung, die vor allem nach dem 2. Weltkrieg zur Entdeckung vielzähliger Antibiotika führte. Seit dieser Zeit ist die Bedeutung von Pilzen als Produzenten pharmakologisch interessanter Naturstoffe enorm gestiegen (Anke 1997).

Von medizinischer Bedeutung sind auch die Sklerotien des Mutterkornpilzes, *Claviceps purpurea*. Die enthaltenen Alkaloide mit einer Ergolin-Grundstruktur wurden Anfang des 20. Jahrhunderts strukturell charakterisiert. Sie finden in der heutigen Medizin vor allem noch zur Migränetherapie, bei Morbus Parkinson, zur Therapie des Restless-Legs-Syndroms und als Laktationshemmer Anwendung. Weitere Erfolge pilzlicher Inhaltsstoffe als Leitstrukturen aktueller Pharmaka sind die Entdeckung des immunsuppressiv wirkenden cyclischen Oligopeptides Cyclosporins A aus *Trichoderma polysporum*, welches in der Nachsorge von Organtransplantationen von entscheidender Bedeutung ist (Rüegger *et al.* 1976). Mit der Entdeckung von Mevilonin (**9**, Lovastatin) aus *Aspergillus terreus* und seiner HMG-CoA-Reduktase inhibierenden Wirkung (Alberts *et al.* 1980) begann die Ära der Cholesterollhemmer, welche das durch Hyperglykämien verursachte Herzinfarktisiko reduzieren. Das abgeleitete Derivat Atorvastatin (Pfizer) war 2006 das weltweit meistverkaufte Medikament mit einem Jahresumsatz von 12,9 Milliarden US-Dollar (Loftus 2007).



Die Vielfältigkeit im Aufbau und Fortpflanzungsverhalten der Pilze sowie die Besiedelung einer Vielzahl von Lebensräumen sind für die enorme Fülle ihrer häufig sehr komplexen sekundären Naturstoffe verantwortlich. Die Artenzahl wird auf 1.500.000 geschätzt (Hawksworth 2001), wovon bisher ca. 75.000 Arten beschrieben sind. Die Anzahl der Höheren Pflanzen wird dagegen auf nur 500.000 Arten geschätzt, wovon bereits die Hälfte beschrieben sein dürfte. Diese Tatsache lässt erwarten, dass das chemische Potential bisher unentdeckter Inhaltsstoffe aus Pilzen wesentlich größer ist als in Pflanzen.

Bis heute sind mehrere Tausend Sekundärmetaboliten vorwiegend aus fermentierbaren Vertretern der Eumycota isoliert wurden, aber nur vergleichsweise wenige aus Fruchtkörpern von Vertretern der Klasse Basidiomycetes (Basidiomycota). Dies lag vor allem am langsamen Wachstum und der schwierigen Handhabung ihrer Myzelkulturen gegenüber denen der wirkstoffreichen Streptomyceten, auf die sich die naturstoffchemischen Untersuchungen zunächst konzentrierten. Hier ist aber inzwischen die Wiederfindungsrate bereits bekannter Substanzen sehr hoch.

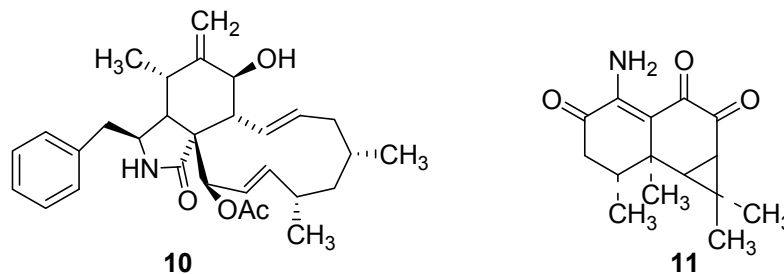
Es zeigt sich, dass durch die kurzzeitige Bildung von Fruchtkörpern, welche als Sporenträger die Vermehrung des Organismus sichern, höchst interessante Sekundärstoffe im Fruchtkörper der Pilze produziert werden können. Hervorzuheben sind naturstoffchemische Arbeiten zur Charakterisierung toxischer Fruchtkörperinhaltsstoffe, denen die Wirkung bekannter Giftpilze wie *Amanita phalloides* zugeschrieben werden kann. Einige hochaktive Substanzen wie die Strobilurine aus *Strobilurus tenacellus* haben als Pflanzenschutzmittel Eingang in die kommerzielle Verwendung gefunden (Sauter *et al.* 1999).

Auch die Arbeiten über Pigmente der Fruchtkörper verdeutlichen den teilweise originellen und vielfältigen Sekundärstoffwechsel dieser Organismen (Gill & Steglich 1987).

In den letzten Jahren gab es enorme Fortschritte in der Charakterisierung von Sekundärmetaboliten aus Pilzfruchtkörpern. Viele der sehr strukturdiversen Substanzen besitzen interessante biologische Eigenschaften.

Die Cytochalasine beispielsweise sind eine Gruppe strukturell komplexer und toxischer Pilzinhaltsstoffe, welche zunächst aus *Rosellinia necatrix* und *Engleromyces goetzei* isoliert und anschließend in einer Reihe anderer Basidiomyceten entdeckt wurden (Aldridge *et al.* 1967; Rothweiler & Tamm 1966). Der Vertreter L-696.474 (**10**) inhibiert kompetitiv die HIV-1 Protease mit einem IC_{50} -Wert von $3 \mu M$ (Lingham *et al.* 1992).

Mit Lepidamin (**11**) wurde das erste natürliche Aristolan-Sesquiterpen-Alkaloid aus Fruchtkörpern von *Russula lepida* von Tan *et al.* (2003) beschrieben.



Der pfeffrige Geschmack der Fruchtkörper von *Chalciporus piperatus* wird durch das 2*H*-Azepin-Derivat Chalciporon (**12**) verursacht (Sterner *et al.* 1987). Es konnte gezeigt werden, dass **11** wahrscheinlich aus sieben Acetateinheiten und einem L-Alanin biosynthetisch generiert wird (Spiteller *et al.* 2001).

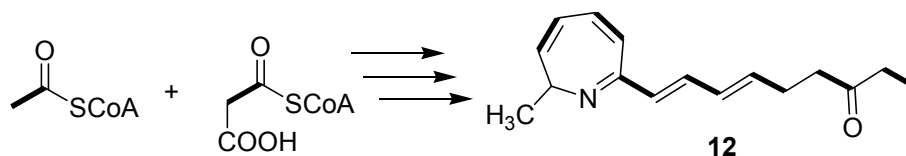


Abb. 3.1. Einbau von 7 Acetateinheiten in Chalciporon (**12**).

Die bislang chemisch untersuchten Vertreter stellen trotz allem nur eine geringe Anzahl im Hinblick auf die ca. 300.000 Arten umfassende Klasse der Basidiomycetes dar (Roth *et al.* 1990). Da allerdings der Ertrag an neuen strukturdiversen und bioaktiven Substanzen der bisherigen Untersuchungen enorm ist, kann von einem großen Potential an biologisch und auch strukturell interessanten Inhaltsstoffen aus den vielen unbearbeiteten Arten ausgegangen werden.

4 Untersuchungen an Pilzarten der Gattung *Cortinarius*

4.1 Die Gattung *Cortinarius*

Cortinarius ist die größte Gattung innerhalb der Ordnung Agaricales, den Blätterpilzen. Sie hat den Ruf, im botanischen Sinne eine der schwierigsten und unerforschtesten zu sein (Brandrud *et al.* 1990). Bis heute sind über 4400 Epitheta für *Cortinarius*-Arten beschrieben und jedes Jahr werden neue Namen veröffentlicht (<http://www.indexfungorum.org>). Allerdings wird die tatsächliche Artenzahl in ganz Europa auf ca. 400–500 geschätzt. Das heißt, dass aufgrund unterschiedlicher Gewichtung von makro- und mikromorphologischen Merkmalen, chemischen Charakteristika und molekularbiologischen Daten einige bereits beschriebene Arten unter einem neuen Namen veröffentlicht wurden.

Die Systematik der Gattung wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert. Neue Methoden, auf phylogenetischen Untersuchungen hauptsächlich der Sequenzen der rRNA ITS (Internal Transcribed Spacer) und rRNA LSU (Large Subunit) basierend, führten zu Vorschlägen von neuen Einordnungen (Garnica *et al.* 2005; Peintner *et al.* 2004). Die Einteilung der vorliegenden Arbeit folgt einem modifizierten Gliederungskonzept nach Moser in Singer (1986) (Abb.4.1.).

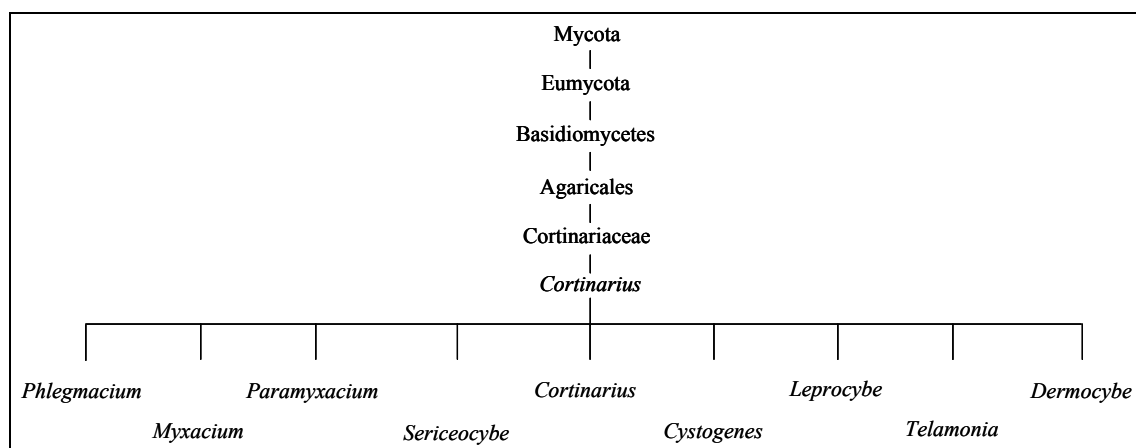


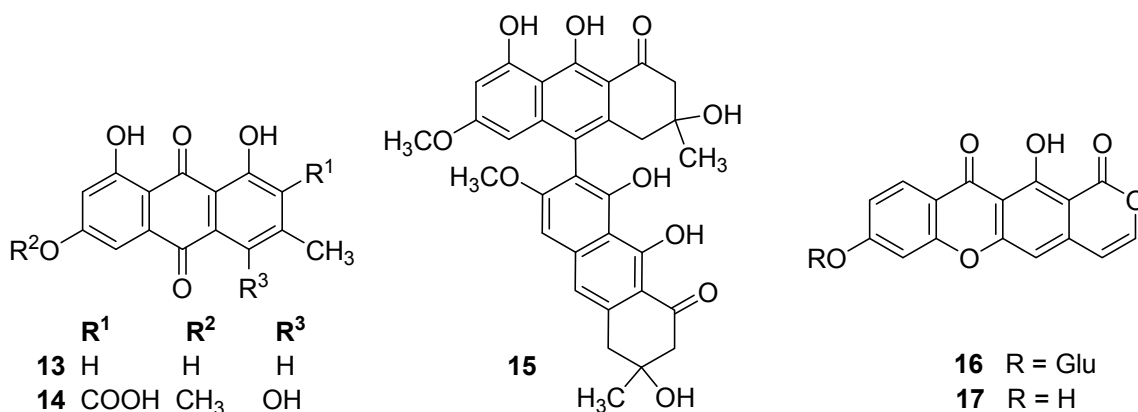
Abb. 4.1. Systematische Einordnung der Gattung *Cortinarius*.

Der wissenschaftliche Name der Gattung *Cortinarius*, dt. Schleierlinge, bezieht sich auf das charakteristische morphologische Merkmal aller Arten. Junge Fruchtkörper sind durch das spinnwebartige *Velum parziale*, der „Cortina“ (dt. Schleier), gekennzeichnet, das Hutrand und Stiel miteinander verbindet (Abb. 4.2.). Zusätzlich überzieht das faserige, äußere *Velum universale* den gesamten jungen Fruchtkörper. Alle Arten der Gattung sind Mykorrhiza-Bildner mit Laub- und Nadelbäumen. Die Fruchtkörper der Schleierlinge kommen in den unterschiedlichsten Größen und Farben vor.



Abb. 4.2. *Velum parziale* bei *Cortinarius claricolor*.
(<http://de.wikipedia.org>)

Die größte und wichtigste Gruppe chemotaxonomisch relevanter Metaboliten bei Cortinarien entstammen des Acetat-Malonat Biosyntheseweges. Vor allem Oktaketide, wie Anthrachinon- und Präanthrachinonpigmente, und Nonaketide, wie Leprocybin-Derivate, sind wertvolle infragenerische Marker für *Cortinarius*. Bereits Gabriel (1960a; 1960b; 1961) und Keller (1982) nutzten die charakteristische Verteilung von anthrachinoiden Pigmenten für chemotaxonomische Untersuchungen und infragenerische Einordnungen. Speziell in der Untergattung *Dermocybe* kommen neutrale Anthrachinone, wie Emodin (**13**), und Anthrachinoncarbonsäuren, wie Cinnarubin (**14**), als Pigmente vor. Aufgrund unterschiedlicher Farben der Anthrachinone sowohl im Tageslicht als auch unter UV₃₆₆ nm, verursacht durch unterschiedliche Substitutionsmuster, können sie eindeutig im Extrakt identifiziert werden und tragen somit signifikant zur systematischen Klassifikation in *Dermocybe* bei (Keller 1982). Dimere Präanthrachinone, wie das Phlegmacin (**15**), konnten vor allem aus Pilzen der Untergattung *Phlegmacium* isoliert werden. Sie werden biosynthetisch wahrscheinlich durch eine phenolische Kupplung zweier Dihydroanthracenon-Einheiten gebildet. Die verschiedenen Kupplungspositionen führten zur Einteilung dieser Substanzklasse in sieben Gruppen. Besonders auffällig ist die leuchtend gelbe bis hellgrüne Fluoreszenz bei Fruchtkörpern, die der Untergattung *Leprocybe* angehören. Die dafür verantwortlichen Substanzen konnten von Kopanski *et al.* (1982) als Leprocybin (**16**) und Leprocybosid (**17**), seinem Aglykon, in *Cortinarius cotoneus*, *C. melanotus* und *C. venetus* beschrieben werden. Das Vorkommen dieser Xanthon-Derivate innerhalb der Untergattung ist von großer Bedeutung für die systematische Taxonomie dieser Untergattung (Gill & Steglich 1987).



Pilze der Gattung *Cortinarius* sind selten als Speisepilze beschrieben. Aufgrund ihres häufig bitteren Geschmacks sind sie nicht genießbar. Allerdings sind einige Vertreter auch als akut giftig einzustufen. Der Verzehr von *C. orellanus* oder *C. speciosissimus* führt unbehandelt zum Tod aufgrund irreversiblen Verlustes der Nierenfunktion. Die hierfür verantwortliche Substanz Orellanin (**26**) ist ein Bipyridin-*N*-oxid und wurde zuerst von Antkowiak und Gessner (1979) in seiner Struktur beschrieben. Neuere Untersuchungen zur Biosynthese ergaben, dass Orellanin (**26**) hauptsächlich in seiner wasserlöslichen Form als Diglukosid (**24**) im Pilz vorliegt (Spiteller *et al.* 2003). Anthranilsäure (**62**) ist die biosynthetische Vorstufe von Orellanin (**26**). Es wird vermutet, dass diese zunächst über das Phenolderivat **18** zum Hydrochinon **19** oxidiert wird. Nach einer oxidativen Ringöffnung und nachfolgendem Ringschluss kann **20** gebildet werden. Daraus wird durch oxidative Decarboxylierung **21**, der Precursor von **22**. Nach 3-*O*-Glukosylierung (**23**) und einer radikalischen Kupplung zweier Moleküle zu **24**, entsteht letztendlich durch Oxygenierung Orellanin-4,4'-diglukopyranosid (**25**), aus dem dann durch Hydrolyse Orellanin (**26**) freigesetzt wird (Abb. 4.3.). Der Wirkmechanismus des Toxins ist noch nicht völlig geklärt. Gezeigt werden konnte, dass **26** die Proteinbiosynthese inhibiert und freie Sauerstoffradikale generiert (Oubrahim *et al.* 1998).

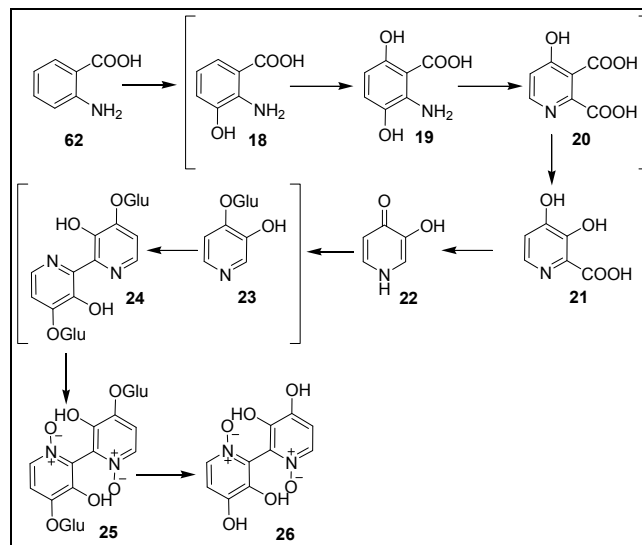
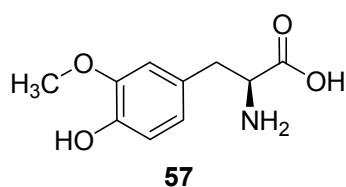


Abb. 4.3. Hypothetische Biosynthese von Orellanin (**26**) aus Anthranilsäure (**62**) nach Spiteller *et al.* (2003).

4.2 *Cortinarius brunneus* (Pers.) Fr.

Cortinarius brunneus, der Dunkelbraune Gürtelfuß, ist eine montan weit verbreitete und in ihrem Erscheinungsbild variable Art. Sie ist der Untergattung *Telamonia* zugeordnet, deren angehörige Arten durch meist braungefärbte Fruchtkörper mit hygrophanen Hutoberflächen gekennzeichnet sind. Sie fruktifiziert stets im Nadelwald in zum Teil großen aufgelockerten Hexenringen. *C. brunneus* bildet Ektomykorrhizen mit *Picea* spp. Dabei sind neben großen Exemplaren auch kleinere, schwächliche Fruchtkörper, braungefärbte ohne einen violetten Schimmer neben Pilzen, die ein blaviolett Basalmyzel und/oder violette Lamellen (jung) besitzen, auffindbar (Arnold 1993). Im jungen Zustand ist der Hut der Fruchtkörper kegelig-glockig, während er im Alter konvex bis flach ausgebreitet ist und einen rissigen Rand aufweist. Der stets vom Basalmyzel beschuhte Stiel kann bis zu 12 cm lang und 3 cm dick werden. Die Lamellen sind in aller Regel breit und ockerbraun (jung) bis rotbraun (alt) gefärbt. Die Fruchtkörper besitzen einen schwach erdigen Geruch. Ein wichtiges Merkmal ist die meist tiefschwarze Färbung der Exsikkate.



L-4-Hydroxy-3-methoxyphenylalanin (**57**) ist der bislang einzig beschriebene Inhaltsstoff aus *C. brunneus* (Dardenne *et al.* 1977). Im Verlauf morphologisch-anatomischer und chemischer Untersuchungen an *Telamonia*, nutzte Arnold (1993) zwei in ihrer Struktur nicht charakterisierte gelb-grün fluoreszierende Substanzen als chemotaxonomische Marker zur infragenerischen Abgrenzung von *C. brunneus*.

4.2.1 β -Carbolinalkaloide aus *Cortinarius brunneus*



Abb. 4.4. Frische Fruchtkörper von *C. brunneus*. **A:** im Tageslicht; **B:** unter UV_{366 nm}.

Verletzt man frische oder tief gefrorene Fruchtkörper von *C. brunneus* und betrachtet diese anschließend unter UV-Licht ($\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$), erkennt man die jeweiligen beschädigten Stellen durch eine auffallend gelbgrüne Fluoreszenz (Abb. 4.4.B). Werden die Fruchtkörper nun mechanisch zerkleinert und mit MeOH extrahiert, weist eine Lösung dieses Extraktes ebenfalls eine starke gelbgrüne Fluoreszenz auf. Ein Ziel dieser Arbeit war die Klärung der Strukturen der für die Fluoreszenz verantwortlichen Substanzen.

4.2.1.1 Isolierung der β -Carbolinalkaloide

Als eine sehr geeignete Methode zur Isolierung der fluoreszierenden Inhaltsstoffe stellte sich die erschöpfende Extraktion gefriergetrockneter Pilzfruchtkörper mit 80 % wässrigem MeOH heraus. Es konnten durch fluoreszenzgesteuerte Fraktionierung nach mehreren chromatographischen Reinigungsschritten des Rohextraktes an Diaion HP-20, Kieselgel RP-2 und Sephadex LH20 mittels Säulenchromatographie zwei gelbgrün fluoreszierende Fraktionen erhalten werden (Abb. 4.5.). Eine anschließende Reinigung mittels RP-18 HPLC ergab vier in methanolischer Lösung gelb- bis blaugrün fluoreszierende Substanzen. Es handelt sich dabei um die neuen β -Carbolinalkaloide (–)-(3*S*)-7-Hydroxy-1-methyl-4,9-dihydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**27**, Brunnein A), (–)-(1*R*,3*S*)-7-Hydroxy-1-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**28**, Brunnein B), (–)-(3*S*)-7-Hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**29**, Brunnein C) sowie ein bereits aus dem Moos *Fontinalis squamosa* Hedw. und den Wurzeln von *Eurycoma harmandiana* Pierre beschriebenes β -Carbolinalkaloid 3-(7-Hydroxy-9*H*- β -carbolinyl)-propionsäure (**30**) (Salm *et al.* 1998; Kanchanapoom *et al.* 2001). Die neuen Naturstoffe wurden nach der Art, aus der sie isoliert wurden Brunneine A–C genannt.

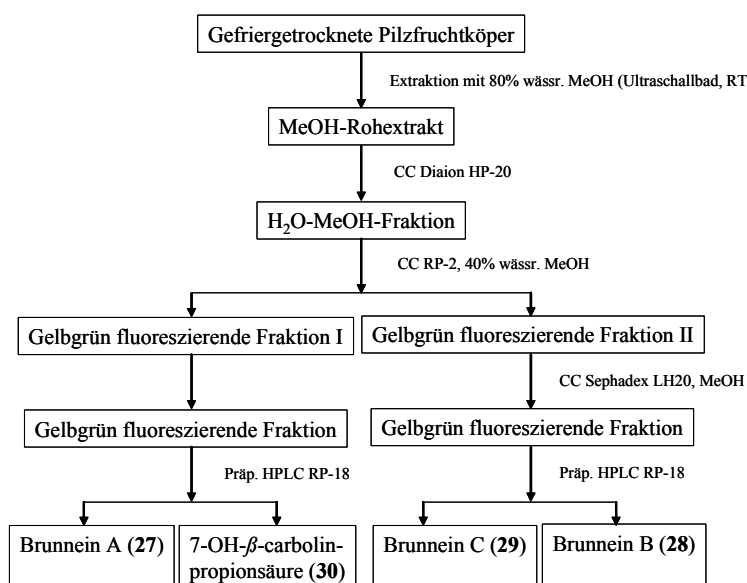


Abb. 4.5. Isolierung der β -Carbolinalkaloide aus Fruchtkörpern von *C. brunneus*.

4.2.1.2 Brunnein A (27)

Brunnein A (**27**) wurde als gelbes amorphes Pulver isoliert und weist eine intensive gelbgrüne Fluoreszenz in methanolischer Lösung unter UV-Licht ($\lambda_{\text{exc}} = 366 \text{ nm}$) auf. Die Summenformel $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{O}_3\text{N}_2$ konnte aus dem ESI-FTICR-Massenspektrum abgeleitet werden. Erste strukturelle Hinweise des isolierten β -Carbolinalkaloids konnten dem entsprechenden LC-ESI/CID Massenspektrum entnommen werden. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen im Positivionenmodus von Brunnein A (**27**) deuteten eine nicht aromatische Carbonsäurefunktion, gekennzeichnet durch das Hauptfragment m/z 199 ($[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{CO}_2]^+$),

eine phenolische Hydroxygruppe, m/z 171 ($[M+H-H_2CO_2-CO]^+$), sowie ein Hydroxyindolylion (m/z 131) an. Die Auswertung des 1H -NMR-Spektrum ergab ein Spinsystem von drei koppelnden aromatischen Protonen, welchem ein dreifach substituierter aromatischer Ring zugeordnet werden konnte. Die Dihydropyridinteilstruktur von Brunnein A (**27**) ist im 1H -NMR-Spektrum durch ein weiteres Spinsystem dreier koppelnder Protonen H-3 (*dd*, 4.08 ppm, $J = 11.8/8.6$ Hz), H-4A (*dd*, 3.14, 17.5/11.8) und H-4B (*dd*, 3.21, 17.5/8.6) charakterisiert. Des Weiteren konnte **27** eine C-1 ständige Methylgruppe aufgrund zweier HMBC-Korrelationen des Singulett ($\delta = 2.56$ ppm) mit C-1 ($\delta = 160.9$ ppm) und C-9a ($\delta = 126.2$ ppm) zugeordnet werden (Tab. 4.1.). Die Carboxygruppe befindet sich an Position C-3 und bewirkt eine Tieffeldverschiebung des C-3 Signals ($\delta = 58.0$ ppm).

Tab. 4.1. 1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Brunnein A (**27**) in DMSO- d_6 .

| Pos. | $\delta^{13}C$ | δ^1H [Mult. J (Hz)] | HMBC zu C |
|------|----------------|------------------------------|-----------|
| 1 | 160.9 | | |
| 3 | 58.0 | 4.08 <i>dd</i> (11.8/8.6) | |
| 4A | | 3.14 <i>dd</i> (17.5/11.8) | 3, 4a, 9a |
| 4B | 22.9 | 3.21 <i>dd</i> (17.5/8.6) | |
| 4a | 121.9 | | |
| 4b | 118.4 | | |
| 5 | 122.4 | 7.52 <i>d</i> (8.7) | 7, 8a |
| 6 | 113.1 | 6.69 <i>dd</i> (8.7/1.4) | 4b |
| 7 | 157.9 | | |
| 7-OH | | 8.53 <i>s</i> | |
| 8 | 96.3 | 6.77 <i>d</i> (1.4) | 4b, 6, 7 |
| 8a | 141.8 | | |
| 9a | 126.2 | | |
| 1' | 18.9 | 2.56 <i>s</i> | 1, 9a |
| 2' | 169.5 | 11.53 <i>s</i> (br) | |

Brunnein A (**27**) verfügt über ein stereogenes Zentrum an C-3. Die absolute Konfiguration konnte mit Hilfe einer gaschromatographischen Methode nach Bringmann *et al.* (1996) bestimmt werden. Diese basiert auf einem milden, durch Ruthenium vermittelten, oxidativen Abbau des Dihydropyridin-Heterozyklus zu D- oder L-Aminosäuren, welche nach anschließender Methylierung und Derivatisierung mit einem chiralen Reagenz (Mosher-Säurechlorid) durch nachfolgende GC-MS Untersuchung aufgrund ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten verglichen werden können (Abb. 4.7.A).

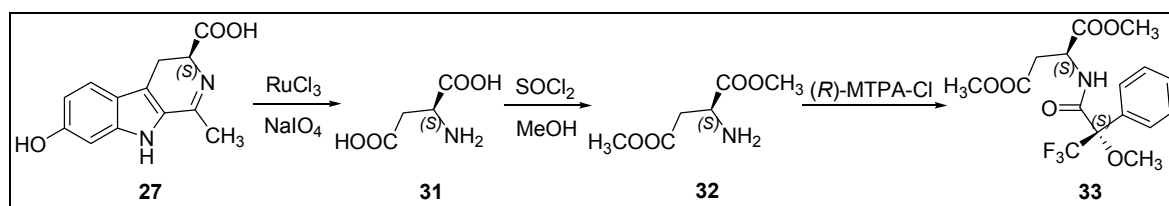


Abb. 4.6. Oxidativer Abbau von **27** und anschließende Derivatisierung zu **33**.

Die Abbildung 4.6. zeigt den Ablauf der Reaktionen ausgehend von Brunnein A (**27**), welches mit Natriumperiodat oxidativ zu L-Asparaginsäure (**31**) abgebaut wurde. Diese wurde mit $SOCl_2$ in trockenem $MeOH$ zum Dimethylester (**32**) methyliert und anschlie-

bend mit (*R*)-Mosher'säurechlorid zum Amid (**33**) umgesetzt. Durch sofortiges Einspritzen in ein GC-MS-System ließ sich **33** im GC-Spektrum mit Hilfe einer Selected-Ion-Monitoring-Methode (SIM) (m/z 128, 160, 188, 189, 318) nachweisen ($R_t = 31.06$ min; Abb. 4.7.B) und damit die *3S*-Konfiguration von Brunnein A (**27**) festlegen. Unterstützt wurde die Festlegung durch einen zusätzlichen Vergleich spektroskopischer Daten analoger Substanzen (Abschnitt 4.2.1.7). Auch das entsprechende D-Asp-Derivat ($R_t = 31.31$ min) wurde in kleineren Mengen detektiert, welches vermutlich aus einem oxidativen Abbau der unteren Molekülhälfte stammt, aber natürlich ist ein nichtracemisches Enantiomeren-Gemisch des Naturstoffes nicht ganz auszuschließen.

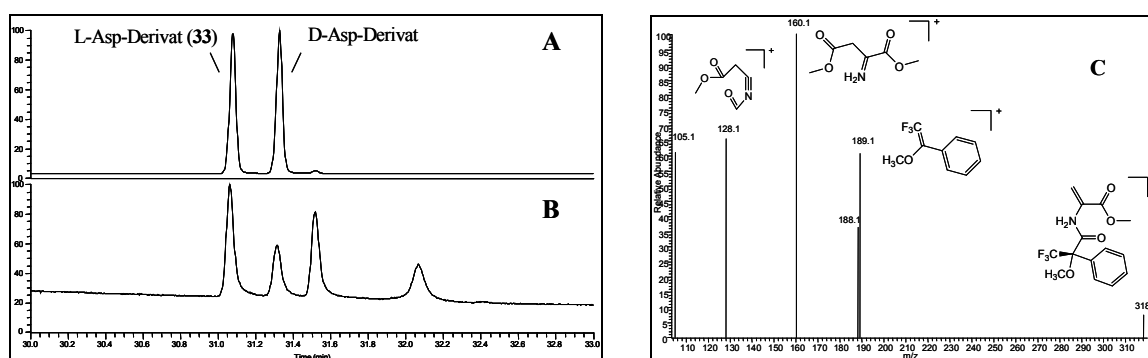
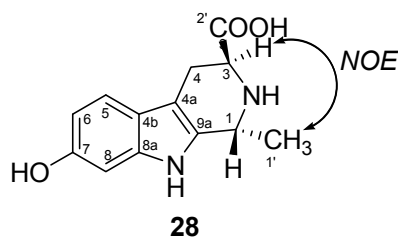


Abb. 4.7. GC-EI-MS Untersuchungen. **A:** L-Asp-Dimethylester-Mosheramid (**33**) (R_t 31.10 min) und D-Asp-Dimethylester-Mosheramid (R_t 31.34 min) als Standards im GC. **B:** Probe von **27** nach oxidativem Abbau und anschließenden Derivatisierungen im GC. **C:** EI-MS des SIM-detektierten Peaks bei R_t 31.06 min in Spektrum B. (Den Hauptpeaks sind die wahrscheinlichen Fragmentationen zugeordnet.)

4.2.1.3 Brunnein B (**28**)

Die Summenformel $C_{13}H_{14}O_3N_2$ der Substanz **28** unterscheidet sich von Brunnein A (**27**) nur in zwei zusätzlichen Protonen. Im LC-ESI/CID-Massenspektrum (Negativionenmodus) wurde neben einer CO_2 -Abspaltung ein zusätzliches Hauptfragment, resultierend aus einer Abspaltung von 73 amu, detektiert. Diese Abspaltung ($HN=CH-CO_2H$) ist typisch für Retro-Diels-Alder Fragmentierungsreaktionen (RDA) von Tetrahydro- β -carbolin- oder Tetrahydroisochinolinalkaloiden (Kühne & Hesse 1982; Gutsche *et al.* 1998). Die Vermutung, dass es sich bei Isolat **28** um das Tetrahydroderivat von **27** handelt, konnte durch anschließende 1H - und 2D-NMR Messungen bestätigt werden. So unterscheidet sich das 1H -NMR-Spektrum von **28** zu **27** in der Dublett-Signalaufspaltung der Methylgruppe bei $\delta = 1.52$ ppm ($J = 6.7$ Hz) durch Kopplung mit H-1 (4.53 ppm, q , 6.7 Hz). HMBC-Korrelationen zwischen dem Methylgruppendublett und C-1 stützt die Zuordnung (Tab. 4.2.). Die relative Konfiguration von **28** konnte durch ein 2D-ROESY-NMR Experiment ermittelt werden. Ein NOE zwischen den Protonen der Methylgruppe mit H-3, beweist deren 1,3-cis-diaxiale Stellung zueinander.



4.2.1.4 Brunnein C (29)

Anhand der Summenformel $C_{12}H_{12}O_3N_2$ von Brunnein C (29) war zu vermuten, dass 29 das Demethyl-Analogon von 28 darstellen könnte. Im LC-ESI/CID-Massenspektrum (Positivionenmodus) wurde auch eine typische RDA-Abspaltung von 73 amu als Hauptfragment detektiert (Abb. 4.8.). Das Signal einer Methylgruppe war im 1H -NMR-Spektrum nicht zu erkennen. Dafür wurden zwei Dubletts bei $\delta = 4.44$ ppm und 4.49 ppm gefunden, die H-1A sowie H-1B zugeordnet werden konnten. Durch Analyse der heteronuklearen 2D-NMR-Spektren konnten alle 1H - und ^{13}C -Signale eindeutig zugeordnet werden (Tab. 4.2.).

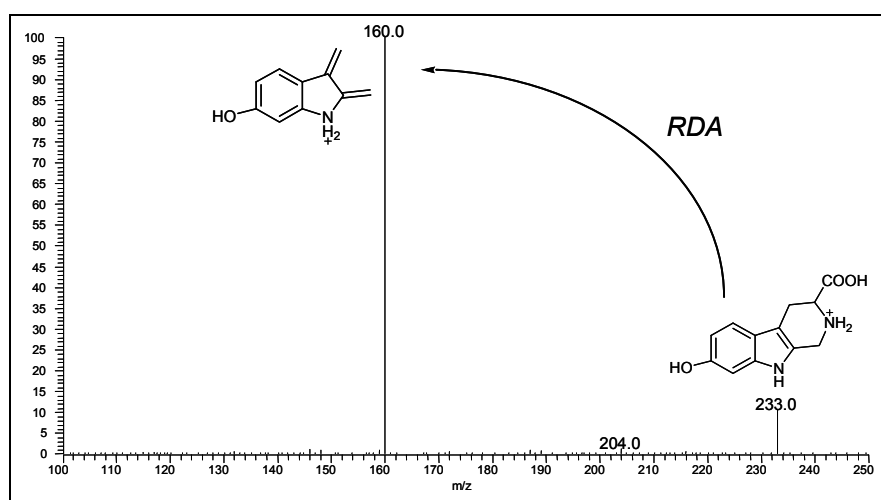
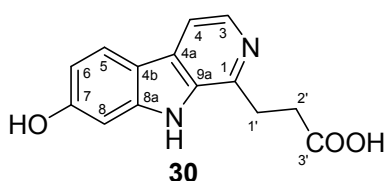


Abb. 4.8. (–15 eV) Positivionen-CID-Massenspektrum von Brunnein C (29). (Den Hauptpeaks sind die wahrscheinlichen Fragmentationen zugeordnet.)

Die absoluten Konfigurationen von 28 und 29 wurden über Vergleiche der Spektraldaten mit denen von 27 und hierfür synthetisierter (3*R*)- und (3*S*)-2,3,4,9-Tetrahydro- β -carbolincarbonsäure (Abschnitt 4.2.1.7) zugeordnet. Demnach besitzen beide Substanzen, wie 27 auch, eine 3*S*-Konfiguration und ihre Strukturen konnten als (–)-(1*R*,3*S*)-7-Hydroxy-1-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (28) und (–)-(3*S*)-7-Hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (29) festgelegt werden.

4.2.1.5 3-(7-Hydroxy-9*H*- β -carbolinyl)propionsäure (30)

Für die Substanz 30 wurde mittels ESI-FTICR-MS die Summenformel $C_{14}H_{12}O_3N_2$ ermittelt. 1H - und ^{13}C -NMR-Daten zeigten eine Übereinstimmung mit denen von Salm *et al.*



(1998) und Kanchanapoom *et al.* (2001), welche 30 bereits aus dem Wassermoos *Fontinalis squamosa* bzw. aus den Wurzeln von *Eurycoma harmandiana* isolieren konnten. Im LC-ESI/CID-Massenspektrum (Positivionenmodus)

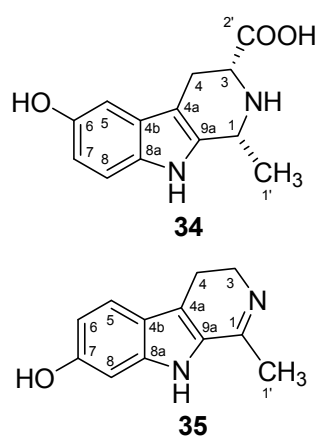
wurde m/z 239 als Hauptfragment detektiert. Es ist zu vermuten, dass dieses stabile Fragmentation durch eine intramolekulare Wasserabspaltung entsteht.

Tab. 4.2. ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten von Brunnein B (**28**) in $\text{DMSO-}d_6$ und Brunnein C (**29**) in D_2O .

| Pos. | 28 | | | 29 | | |
|------|-----------------------|-------------------------------------|---------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ [Mult. J (Hz)] | HMBC zu C | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ [Mult. J (Hz)] | HMBC zu C |
| 1A | 46.8 | 4.53 <i>q</i> (6.7) | 9a, 1' | 40.3 | 4.44 <i>d</i> (15.6) | |
| 1B | | | | | 4.49 <i>d</i> (15.6) | |
| 3 | 53.4 | 3.71 <i>dd</i> (7.9/5.4) | 4a, 2' | 57.0 | 4.08 <i>dd</i> (11.0/5.3) | |
| 4A | 23.4 | 2.87 <i>dd</i> (16.1/7.9) | 3, 4a, 9a, 2' | 22.2 | 3.03 <i>dd</i> (16.4/11.0) | 4a, 5 |
| 4B | | 3.00 <i>dd</i> (16.1/5.4) | | | 3.39 <i>dd</i> (16.4/5.3) | |
| 4a | 105.9 | | | 105.9 | | |
| 4b | 120.3 | | | 124.4 | | |
| 5 | 118.6 | 7.19 <i>d</i> (8.4) | 4a, 7, 8a | 119.0 | 7.48 <i>d</i> (8.5) | 7 |
| 6 | 109.5 | 6.52 <i>dd</i> (8.4/1.9) | 8 | 109.4 | 6.77 <i>dd</i> (8.5/2.2) | 5 |
| 7 | 153.7 | | | 151.8 | | |
| 7-OH | | 8.86 <i>s</i> (br) | | | n.d. | |
| 8 | 97.1 | 6.69 <i>d</i> (1.9) | 4b, 7 | 97.2 | 6.94 <i>d</i> (2.2) | 5, 7 |
| 8a | 137.9 | | | 137.5 | | |
| 9a | 131.1 | | | n.d. | | |
| 1' | 19.0 | 1.52 <i>d</i> (6.7) | 1, 9a | 173.9 | n.d. | |
| 2' | 170.2 | n.d. | | | | |

n.d. = nicht detektiert, wegen geringem S/N

Die Position der phenolischen OH-Gruppe an C-7 bei allen vier isolierten β -Carbolinalkaloiden (**27–30**) konnte durch die jeweilige ^{13}C -NMR-Hochfeldverschiebung des C-8-



Signals angenommen werden, welche durch den elektronenschiebenden Effekt der beiden *ortho*-ständigen Substituenten verursacht wird. Diese Annahme wurde durch den Vergleich von ^{13}C -NMR-Daten bekannter strukturähnlicher Verbindungen bestätigt. Tabelle 4.3. stellt beispielhaft die ^{13}C -NMR-Daten von Hyrtioerectine (**34**, Youssef 2005) und Harmalol (**35**, Coune *et al.* 1980) denen von Brunnein A (**27**) gegenüber. Demnach verursacht eine Hydroxygruppe an C-7 eine stärkere Hochfeldverschiebung von C-8, als eine C-6 Hydroxylierung für C-5.

Tab. 4.3. Vergleich der ^{13}C -NMR Verschiebungen (ppm, $\text{DMSO-}d_6$) von Brunnein A (**27**) mit literaturbeschriebenen Daten bekannter Verbindungen zur Bestimmung der Position der Hydroxygruppe.

| Pos. | 27 | 34 | 35 |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 1 | 160.9 | 49 | 160.1 |
| 3 | 58.0 | 57.6 | 41.6 |
| 4 | 22.9 | 23.2 | 18.6 |
| 4a | 121.9 | 105.8 | 114.2 |
| 4b | 118.4 | 126.7 | 125.0 |
| 5 | 122.4 | 102.0 | 122.8 |
| 6 | 113.1 | 150.7 | 112.9 |
| 7 | 157.9 | 111.4 | 151.1 |
| 8 | 96.3 | 111.5 | 94.6 |
| 8a | 141.8 | 130.7 | 139.5 |
| 9a | 126.2 | 132.3 | 125.1 |
| 1' | 18.9 | 16.7 | 19.1 |
| 2' | 169.5 | 169.4 | |

4.2.1.6 Biologische Aktivität der β -Carbolinalkaloide

In einem *in silico* Dockingexperiment wurden für Brunnein A (**27**) gute Fittingscores in das aktive Zentrum einer Acetylcholinesterase (AChE) berechnet. *In vitro* Untersuchungen konnten aber die hohen Erwartungen einer starken AChE-Inhibierung nicht erfüllen. Durch eine selektive *N*-Methylierung konnte die Inhibierungsaktivität jedoch gesteigert werden (Abschnitt 6.3.2.5).

4.2.1.7 Darstellung der Vergleichsubstanzen (3*R*)- und (3*S*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure zur Konfigurationsbestimmung von **27–29**

Ziel war es, über eine Synthese von zwei Enantiomeren eines Strukturanalogen der Brunneine A–C (**27–29**), spektrale Vergleichsdaten zu erlangen und somit die Bestimmungen der absoluten Konfigurationen von **27–29** zu unterstützen.

Hierfür wurden jeweils D- und L-Tryptophan mit Formaldehyd in einer Pictet-Spengler Kondensation enantioselectiv nach einer Methode von Tilstra *et al.* (1990) umgesetzt (Abb. 4.9.). Dabei entstanden aus L-Tryptophan (**36**) (–)-(3*S*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**37**) und aus D-Tryptophan (**38**) (+)-(3*R*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**39**) in jeweils 80 prozentiger Ausbeute.

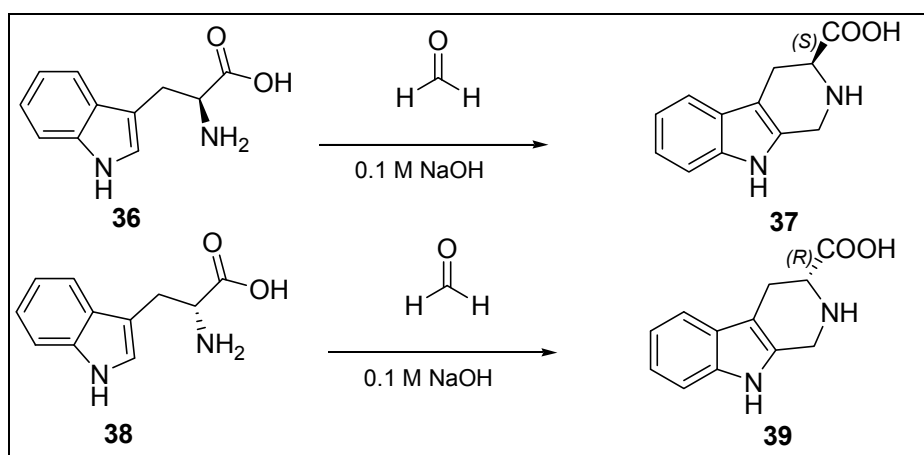
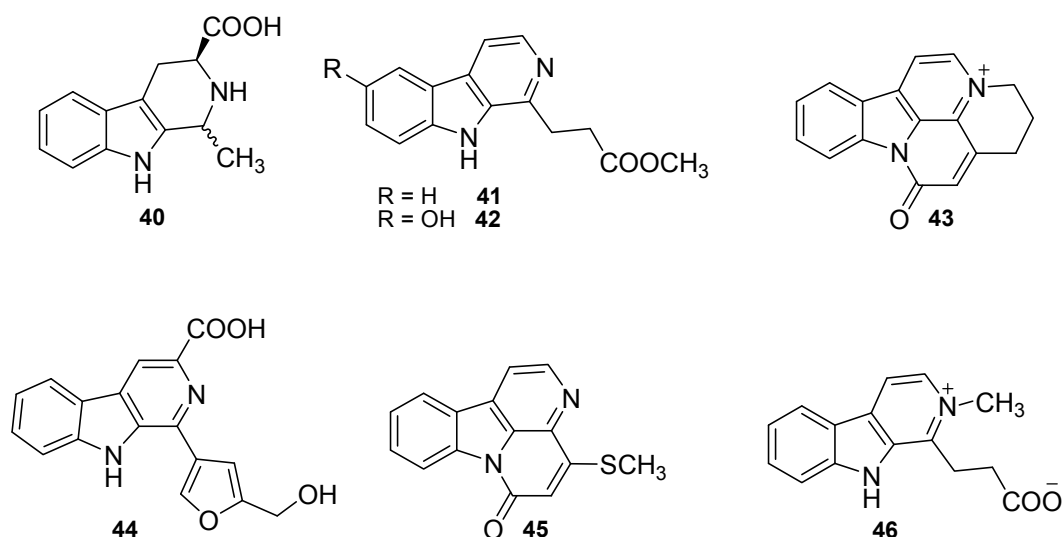


Abb. 4.9. Darstellung von **37** und **39**.

4.2.1.8 Überblick strukturähnlicher Naturstoffe

β -Carbolinalkaloide sind innerhalb des Pflanzenreiches weit verbreitete Sekundärstoffe (Allen & Holmstedt 1980). In Höheren Pilzen sind allerdings bislang nur sehr wenige Derivate beschrieben. Harman (**117**) konnte in Myzelkulturen von *Coriolus maximus* nachgewiesen werden (Takeuchi *et al.* 1973). Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte Harman (**117**) zusammen mit Norharman (**118**) aus Fruchtkörpern von *Hygrophorus eburneus* isoliert und in 28 weiteren *Hygrophorus*-Arten nachgewiesen werden (Abschnitt 5.3.1). Im Zusammenhang mit diesen Arbeiten wurde auch Brunnein A (**27**) als Ursache der Fluoreszenz der Fruchtkörper von *Hygrophorus hyacinthinus* erkannt (Abschnitt 5.4.1).

(-)-1-Methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**40**) ist aus *Amanita muscaria* beschrieben (Matsumoto *et al.* 1969). Die β -Carbolin-1-propionsäure-Derivate Infracin (**41**) und 6-Hydroxyinfracin (**42**) konnten von Steglich *et al.* (1984) ebenso wie das pentacyclische Derivat Infracopicrin (**43**), welches für den bitteren Geschmack des Pilzes verantwortlich ist, aus *Cortinarius infractus* isoliert werden. Flazin (**44**), ein Hydroxymethylfuran-substituiertes β -Carbolinalkaloid, wurde aus dem Pilz *Suillus granulatus* beschrieben, wobei durch Modifizierung der Carbonsäurefunktion zum Formamid die antiretroviralen Eigenschaften der Substanz enorm gesteigert werden konnten (Liu 2005; Wang *et al.* 2007). Aus *Boletus curtisii* konnten Bröckelmann *et al.* (2004) thiomethylierte Canthin-6-one, wie 4-Methylthiocanthin-6-on (**45**), Infracin (**40**) sowie *N*-Methyl- β -carbolin-1-propionat (**46**) isolieren.



In einem kürzlich erschienen Review von Cao *et al.* (2007) wird die interessante strukturelle Vielfalt dieser Substanzklasse verbunden mit hochdiversen Wirkprofilen zusammenfassend präsentiert.

4.2.2 *N*-Glukosylierte Indolverbindungen aus *Cortinarius brunneus*

Im Verlauf weiterführender Untersuchungen zum Metabolitenspektrum des Methanol-extraktes von *Cortinarius brunneus* Fruchtkörpern konnten bis dato neue *N*-glukosylierte Indolderivate erhalten werden.

4.2.2.1 Isolierung der *N*-glukosylierten Indolderivate

Der MeOH Rohextrakt von *C. brunneus* Fruchtkörpern wurde in einem ähnlichen Verfahren wie bei der Isolierung der Brunneine A–C (27–29) über Diaion HP-20 vorfraktioniert. Weitere Aufreinigungsschritte durch Säulenchromatographie an RP-2 gefolgt von Sephadex LH20 schlossen sich an. Eine abschließende Reinigung mittels präparativer HPLC ergab vier *N*-glukosylierte Indolderivate 47–50. Diese stellen Konjugate des Phytohormons Indol-3-yl-essigsäure (52, IAA, Auxin) dar, wie sie bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurden. Einzig *N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(carboxymethyl)-1*H*-indol (49) und *N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1*H*-indol (50) wurden nach der Isolierung auch von Schwarz & Hofmann (2007a; 2007b) aus *Ribes rubrum* beschrieben. Kai *et al.* (2007) beschrieben jüngst das Vorkommen von 49 in *Oryza sativa* mittels LC-ESI-MS Experimenten.

4.2.2.2 *N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(methoxymethyl)-1*H*-indol (47)

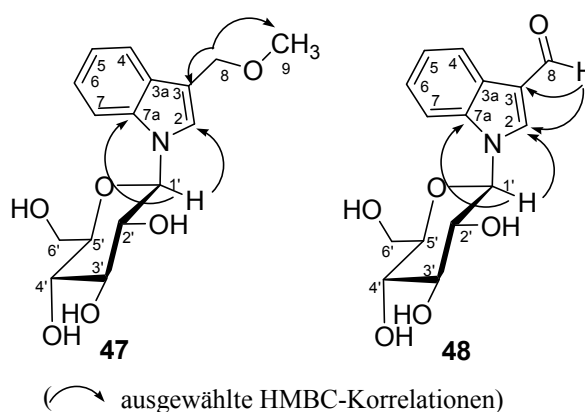
Die Summenformel C₁₆H₂₁NO₆ der Verbindung 47 wurde mittels ESI-FTICR-MS erhalten. Weiterführende LC-ESI-MS/MS Messungen im Negativionenmodus (*m/z* 322, [M–H][–]) wiesen als Hauptfragment *m/z* 160 ([M–H–162][–]) auf, welches das aus der Eliminierung einer intakten Anhydrohexose (C₆H₁₀O₅) entstandene Aglykon kennzeichnet.

Das ¹H-NMR-Spektrum der Verbindung 47 weist ein aromatisches Vier-Spin-System auf [δ = 7.61 ppm (*d*, *J* = 7.9 Hz, H-4), 7.09 (*ddd*, 7.9/7.2/1.0, H-5), 7.18 (*ddd*, 8.3/7.2/1.0, H-6), 7.53 (*d*, 8.3, H-7)]. Daraus konnte auf ein *ortho* disubstituiertes aromatisches Ringsystem geschlossen werden. Ein zusätzliches Protonensignal bei δ = 7.43 ppm (*s*, 1H, H-2) kennzeichnet das Vorkommen eines isolierten aromatischen Protons, welches auf eine Substitution der Indolverbindung hindeutet. Diesem Substituent wurde aufgrund der Protonensignale bei δ = 4.65 ppm (*s*, 2H, H-8) und δ = 3.36 ppm (*s*, 3H, H-9) eine Methoxymethylen-Gruppe zugeordnet. Diese Bestimmung wurde weiterhin durch heteronukleare Korrelationen zwischen H-8 und C-3 sowie C-9 im entsprechenden HMBC-Spektrum der Substanz gestützt. Die Zuordnung aller quartären Kohlenstoffe von 47 erfolgte anhand der HMBC-Korrelationen. Die restlichen Protonensignale bei δ = 5.44 ppm (H-1'), 3.91 (H-2'), 3.59 (H-3'), 3.50 (H-4'), 3.57 (H-5'), 3.87 (H-6'A) und 3.70 (H-6'B) zeigen alle vicinale Kopplungskonstanten, die charakteristisch für 1,2-*trans*-axial angeordnete Protonen sind. Aufgrund dieser Daten, konnten diese Protonen einer β -Glukopyranose zugeordnet werden. Das anomere Proton hat HMBC-Korrelationen mit C-2 und mit C-7a, was eine *N*-Verknüpfung des Zuckerrestes sowie die Position des Methoxymethylen-Substituenten an

C-3 beweist. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten sind in den Tabellen 4.4. und 4.5. zusammengefasst. Die Konfiguration der Glukose wurde, wie für alle Verbindungen **47–50**, über den Vergleich des Drehwertes mit literaturbeschriebenen Werten analoger Substanzen (Kai *et al.* 2007) ermittelt. Die Verbindung **47** ist somit (+)-*N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(methoxymethyl)-1*H*-indol.

4.2.2.3 *N*-1- β -D-Glukopyranosyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**48**)

Die Verbindung **48** stellt ein Strukturanalogon von **47** dar. Die Summenformel $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_6$ ließ wiederum aufgrund der hohen Sauerstoffanzahl im Molekül auf eine glykosylierte Substanz schließen. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen im Positivionenmodus ergaben ebenfalls eine Anhydrohexose-Abspaltung m/z 146 ($[\text{M}+\text{H}-162]^+$) als Hauptfragment im entsprechenden Spektrum. Die ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten entsprechen denen von Verbindung **47** bis auf die des Substituenten an C-3 (Tab. 4.4.; Tab. 4.5.). Ein Singulett mit der Verschiebung $\delta = 9.90$ ppm (*s*, 1H, H-8) im ^1H -NMR-Spektrum und dessen HMBC-Korrelationen mit C-3 und C-2 belegen die Substitution mit einer Aldehyd-Gruppe an C-3 des Moleküls. **48** ist daher (+)-*N*-1- β -D-Glukopyranosyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd.



4.2.2.4 *N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(carboxymethyl)-1*H*-indol (**49**)

Der Verbindung **49** konnte die Summenformel $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_7$ mittels ESI-FTICR-MS zugeordnet werden. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen ließen im Positivionenmodus wiederum das entsprechende Aglykon als Hauptfragment (m/z 176, $[\text{M}+\text{H}-162]^+$) erkennen. Allerdings konnte im Negativionenmodus das Hauptfragment m/z 292 ($[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2]^-$) detektiert werden, was charakteristisch für eine freie Carbonsäurefunktion im Molekül ist. ^1H - und 2D-NMR-Daten (Tab. 4.4.; Tab. 4.5.) offenbarten eine Essigsäuregruppe als Substituent an C-3. HMBC-Korrelationen des anomeren Protons H-1' zu C-7a und C-2 bestätigten den *N*-Glukosid-Strukturtyp (Abb. 4.10.). Der Verbindung **49** kommt somit die Struktur von (+)-*N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(carboxymethyl)-1*H*-indol zu.

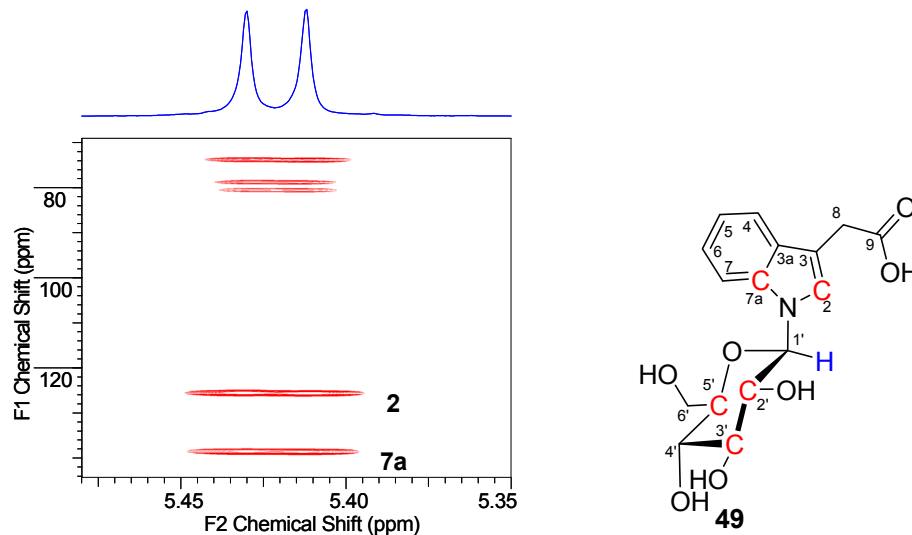


Abb. 4.10. Beweis der *N*-Zuckerverknüpfung. HMBC-Spektrum (Ausschnitt) von **49**: Korrelationen des anomeren Protons (H-1') mit den Kohlenstoffen C-2a und C-7.

4.2.2.5 *N*-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1*H*-indol (**50**)

Bei Verbindung **50** handelt es sich um den Methylester von **49**. Die Summenformel $C_{17}H_{21}NO_7$ ist um CH_2 gegenüber der von **49** erhöht. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen bestätigten auch hier die Eliminierung einer Anhydrohexose durch das Vorkommen des Hauptfragmentions m/z 190 ($[M+H-162]^+$) im entsprechenden ESI/CID-Massenspektrum (Abb. 4.11.). Die Interpretation der 1H - und 2D-NMR-Daten bestätigten den *N*-Glukosid-Strukturtyp (Tab. 4.4.; Tab. 4.5.).

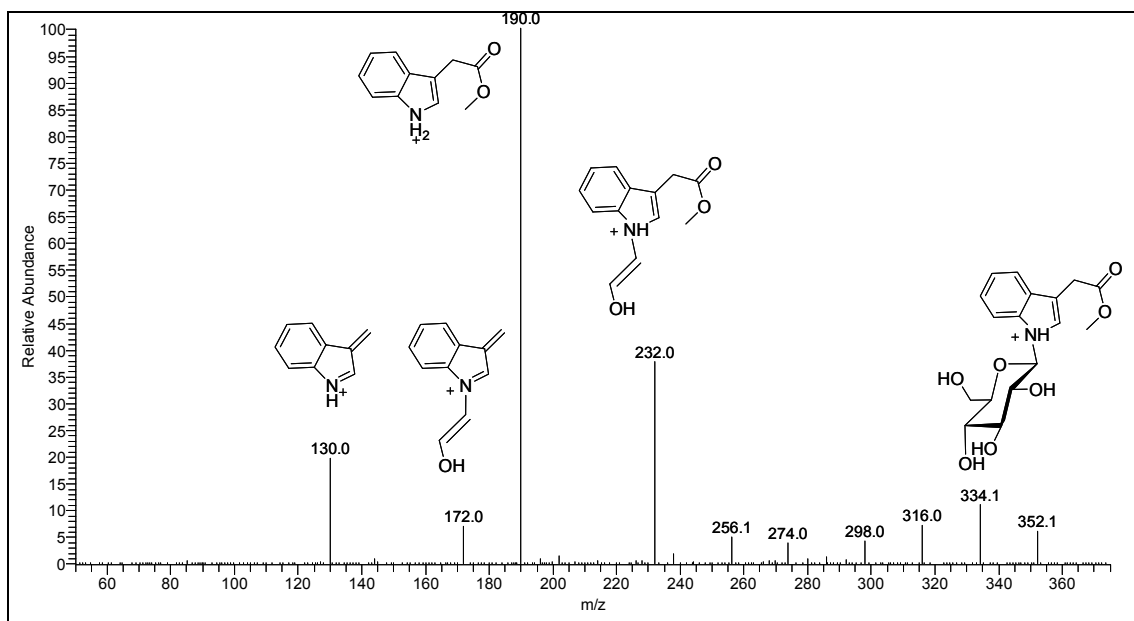
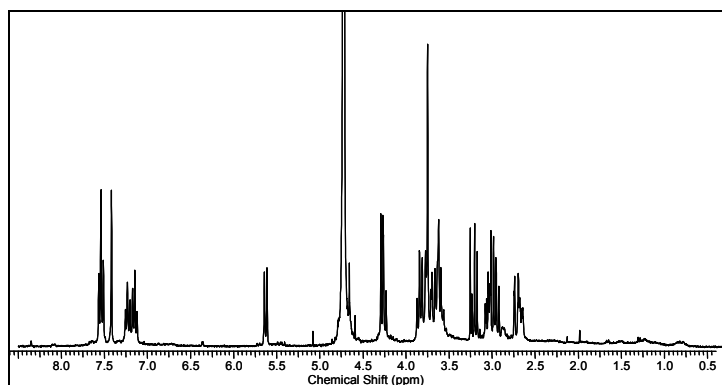
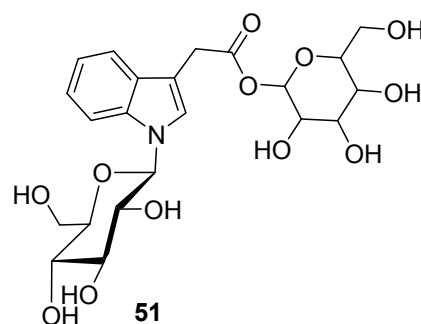


Abb. 4.11. (-12 eV) Positivionen-CID-Massenspektrum von **50**. (Den Hauptpeaks sind die wahrscheinlichen Fragmentionen zugeordnet.)

4.2.2.6 Struktur analogon **51**: das *N,O*-Diglukosid der Indol-3-ylessigsäure?

Ein weiteres Struktur analogon konnte mit Verbindung **51** isoliert werden. Die Summenformel $C_{22}H_{29}NO_{12}$, ermittelt aus der entsprechenden ESI-FTICR-MS Messung (m/z 522.1578, berechn. 522.1582 $[M+Na]^+$), ließ das Vorkommen einer zusätzlichen Hexose vermuten, was durch die im Positivionenmodus-CID-Massenspektrum ($[M+H]^+$, m/z 500) detektierten Hauptfragmentationen m/z 338 $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$ (Anhydrohexoseabspaltung) und m/z 176 $[M+H-C_{12}H_{20}O_{10}]^+$ (zweifache Anhydrohexoseabspaltung) bestätigt werden konnte. Eine diglykosidische Struktur am Stickstoff und damit eine freie Carbonsäurefunktion kann durch das Fehlen des $[M-H-CO_2]^-$ Fragmentations (m/z 454) im Negativionen-CID-Massenspektrum ausgeschlossen werden. Das Ion bei m/z 292, das formal einem $[M-H-C_6H_{10}O_5-CO_2]^-$ Fragment entspricht, kann durch Spaltung zwischen den C-Atomen C-8 und C-9 entstehen. Eine zusammenfassende Übersicht über die Fragmentierungen in den ESI/CID Massenspektren sind in Abbildung 4.13. und Tabelle 4.6. dargestellt. Aus dem 1H -NMR-Spektrum von **51** konnten zweifelsfrei die Signale der Indolessigsäure-Grundstruktur zugeordnet werden. Auch das Proton des anomeren Kohlenstoffes einer *N*-gebundenen Hexose konnte wie im 1H -NMR-Spektrum von **49** detektiert werden. Im Vergleich zum 1H -NMR-Spektrum von **49** wurde bei **51** ein zusätzliches Dublett bei einer Verschiebung von $\delta = 4.31$ ppm ermittelt, welches wahrscheinlich dem anomeren Proton einer zweiten Hexose zuzuordnen ist. Die Bestimmung beider Hexosen konnte aufgrund der Signalaufspaltung höherer Ordnung im 1H -NMR-Spektrum von **51** nicht erfolgen (Abb. 4.12.). Um die Konstitution und Verknüpfung beider Hexosen und somit die endgültige Struktur von **50** zu ermitteln, wurden 2D-NMR-Messungen durchgeführt. Leider zeigten die Spektren nicht mehr den gleichen Signalsatz wie im 1H -NMR-Spektrum. Viele zusätzliche Signale verwiesen auf ein Substanzgemisch, was die Instabilität von **51** widerspiegelt. Die Substanz **49**, welche als Reinsubstanz bei gleichen Lagerungsbedingungen stabil war, konnte im Substanzgemisch von **51** detektiert werden. Da *N*-glykosidische Verknüpfungen in aller Regel stabiler sind als *O*-glykosidische, kann die Instabilität der Substanz **51** ein weiterer Hinweis auf seine vermutete *N,O*-Diglykosidindolstruktur sein (Abb. 4.13.). Für eine exakte Konstitutionsermittlung reichen die vorliegenden Daten nicht aus.

Abb. 4.12. 1H -NMR-Spektrum (300 MHz, D_2O) von **51**.Abb. 4.13. Vermutete Struktur von **51**.

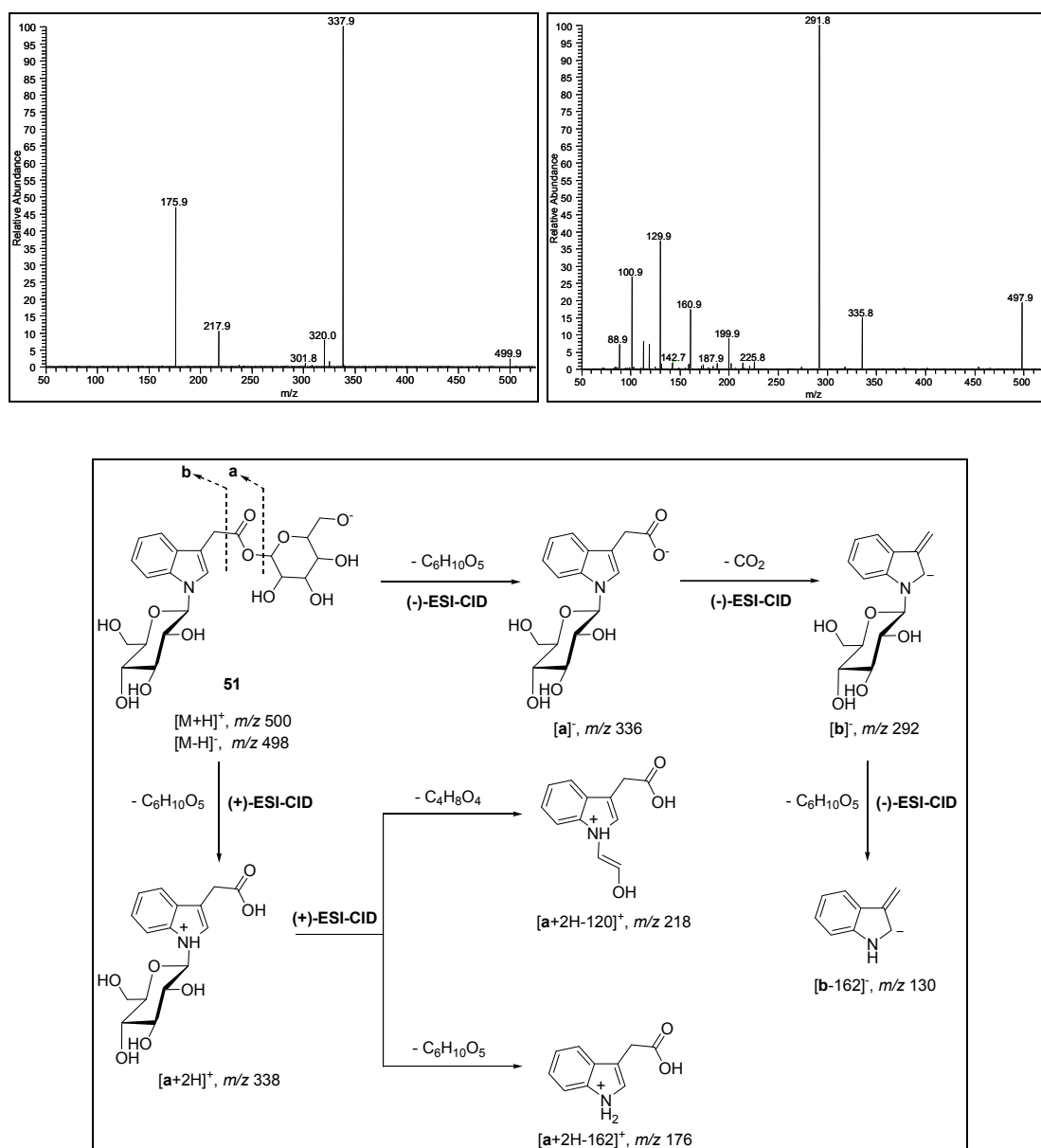


Abb. 4.14. (–10 eV) Positivionen-CID-Massenspektrum (oben links), (+30 eV) Negativionen-CID-Massenspektrum (oben rechts) und wahrscheinliche massenspektrometrische Fragmentierungen von Verbindung **51**.

Tab. 4.4. $^1\text{H-NMR}$ -Daten der *N*-glukosylierten Indolderivate **47–50** (in CD_3OD).

| | 47 | 48 | 49 | 50 |
|------|--|--|--|--|
| Pos. | $\delta^1\text{H}$ [Mult. <i>J</i> (Hz)] | $\delta^1\text{H}$ [Mult. <i>J</i> (Hz)] | $\delta^1\text{H}$ [Mult. <i>J</i> (Hz)] | $\delta^1\text{H}$ [Mult. <i>J</i> (Hz)] |
| 2 | 7.43 <i>s</i> | 8.30 <i>s</i> | 7.34 <i>s</i> | 7.36 <i>s</i> |
| 3 | | | | |
| 4 | 7.61 <i>br d</i> (7.9) | 8.17 <i>br d</i> (7.6) | 7.52 <i>dd</i> (8.0/1.1) | 7.50 <i>br d</i> (8.1) |
| 5 | 7.09 <i>ddd</i> (7.9/7.2/0.9) | 7.28 <i>ddd</i> (7.6/7.2/1.0) | 7.08 <i>ddd</i> (8.0/7.1/0.8) | 7.08 <i>ddd</i> (8.2/7.1/1.1) |
| 6 | 7.18 <i>ddd</i> (8.3/7.2/1.1) | 7.33 <i>ddd</i> (8.1/7.2/1.0) | 7.17 <i>ddd</i> (8.2/7.1/1.1) | 7.18 <i>ddd</i> (8.2/7.1/1.1) |
| 7 | 7.53 <i>br d</i> (8.3) | 7.68 <i>br d</i> (8.1) | 7.52 <i>dd</i> (8.2/0.8) | 7.52 <i>br d</i> (8.2) |
| 8 | 4,65 <i>s</i> | 9.90 <i>s</i> | 3.73 <i>d</i> (15.1) | 3,78 <i>s</i> |
| 9 | 3.36 <i>s</i> | | 3.72 <i>d</i> (15.1) | |
| 10 | | | | 3.69 <i>s</i> |
| 1' | 5.44 <i>d</i> (9.1) | 5.55 <i>d</i> (9.1) | 5.42 (<i>d</i> 9.0) | 5.43 <i>d</i> (9.1) |
| 2' | 3.91 <i>dd</i> (9.1) | 3.91 <i>dd</i> (9.1/8.9) | 3.90 <i>dd</i> (9.0/9.0) | 3.90 <i>dd</i> (9.1/8.8) |
| 3' | 3.59 <i>dd</i> (9.1/8.9) | 3.6 <i>dd</i> (9.1/8.9) | 3.60 <i>dd</i> (9.0/9.0) | 3.59 <i>dd</i> (9.1/8.8) |
| 4' | 3.50 <i>dd</i> (9.6/8.9) | 3.51 <i>dd</i> (9.6/8.9) | 3.50 <i>dd</i> (9.6/9.0) | 3.49 <i>dd</i> (9.5/8.8) |
| 5' | 3.57 <i>ddd</i> (9.6/5.6/2.1) | 3.57 <i>ddd</i> (9.6/5.6/2.1) | 3.57 <i>ddd</i> (9.6/5.7/2.2) | 3.57 <i>ddd</i> (9.5/5.6/2.2) |
| 6'A | 3.87 <i>dd</i> (12.1/2.1) | 3.87 <i>dd</i> (12.3/2.1) | 3.87 <i>dd</i> (12.1/2.2) | 3.87 <i>dd</i> (12.1/2.2) |
| 6'B | 3.70 <i>dd</i> (12.1/5.6) | 3.73 <i>dd</i> (12.3/5.6) | 3.70 <i>dd</i> (12.1/5.7) | 3.70 <i>dd</i> (12.1/5.6) |

Tab. 4.5. ^{13}C -NMR-Daten ^a der *N*-glukosylierten Indolderivate **47–50** (in CD_3OD).

| Pos. | 47 | 48 | 49 | 50 |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{13}\text{C}$ |
| 2 | 126.6 | 140.6 | 125.4 | 125.5 |
| 3 | 113.9 | 120.2 | 110.6 | 109.9 |
| 3a | 129.7 | 126.8 | 129.9 | 129.8 |
| 4 | 120.0 | 122.7 | 119.8 | 119.7 |
| 5 | 121.1 | 124.3 | 120.9 | 121.0 |
| 6 | 123.1 | 125.5 | 123.0 | 123.1 |
| 7 | 111.7 | 113.0 | 111.5 | 111.6 |
| 7a | 138.7 | 139.1 | 138.3 | 138.4 |
| 8 | 67.9 | 187.6 | 32.1 | 31.6 |
| 9 | 57.6 | | 176.8 | 174.7 |
| 10 | | | | 52.5 |
| 1' | 86.7 | 87.7 | 86.7 | 86.7 |
| 2' | 73.7 | 73.9 | 73.8 | 73.8 |
| 3' | 79.0 | 78.9 | 78.8 | 78.9 |
| 4' | 71.5 | 71.7 | 71.5 | 71.5 |
| 5' | 80.6 | 80.8 | 80.6 | 80.6 |
| 6' | 62.7 | 62.9 | 62.8 | 62.8 |

^a ermittelt aus den jeweiligen HSQC- und HMBC-Korrelationen**Tab. 4.6.** Schlüsselfragmentationen der CID-Massenspektren der *N*-glukosylierten Indolderivate **47–51**, erhalten von $[\text{M}-\text{H}]^-$ bzw. $[\text{M}+\text{H}]^+$ nach LC-ESI-MS.

| | $[\text{M}-\text{H}]^-$ | $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^-$ | $[\text{M}+\text{H}]^+$ | $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5]^+$ | $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_5]^+$ | $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{O}_{10}]^+$ |
|-----------|-------------------------|---|-------------------------|---|--|---|
| 47 | 322 (14) | 160 (100) | n.g. | n.g. | n.g. | n.g. |
| 48 | 306 (3) | 144 (100) | 308 (51) | 146 (100) | 188 (2) | n.d. |
| 49 | 336 (21) | 130 (4) | 338 (10) | 176 (100) | 218 (24) | n.d. |
| 50 | 350 (7) | 188 (100) | 352 (7) | 190 (100) | 232 (38) | n.d. |
| 51 | 498 (20) | 336 (16) | 500 (2) | 338 (100) | 218 (10) | 176 (48) |

Die relativen Intensitäten sind in Klammern angegeben.

n.g. = nicht gemessen; n.d. = nicht detektiert

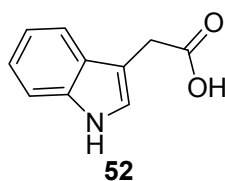
4.2.2.7 Biologische Aktivitäten der *N*-glukosylierten Indolverbindungen

Das isolierte Indolderivat **49** verkörpert ein Konjugat des Pflanzenhormons Indol-3-yl-essigsäure (**52**; IAA). **49** führt zu keiner signifikanten Hemmung des Wurzellängenwachstums von *Arabidopsis thaliana* im Gegensatz zur freien IAA (**52**) (Abschnitt 6.4).

In einem Screening auf Inhibierung der Amyloid- β -Peptid-Aggregation bewirkte **49** eine Hemmung von ca. 50 % bei einer Konzentration von 200 μM (Abschnitt 6.3.3).

4.2.2.8 Vergleich der *N*-glukosylierten Indolderivate mit ähnlichen Naturstoffen

IAA (**52**) ist als wachstumsregulatorisches Pflanzenhormon bereits sehr intensiv untersucht worden. Auch in Pilzen ist sie beschrieben (Gruen 1959, Horak 1964, Türker *et al.* 2005) sowie weitere Substanzen mit auxinähnlicher Wirkung (Sassa *et al.* 1989). Horak (1964) postulierte durch die Entdeckung der IAA-Eigenproduktion von verschiedenen Mykorrhizapilzen einen Eingriff in das „Getriebe des pflanzlichen Metabolismus“ seines mykotropen Partners.



Als IAA-Konjugate kommen in pflanzlichem Material vor allem IAA-*O*-Aspartat und IAA-*O*-Glukose vor (Andrae & Good 1955; Zenk 1961). Schliemann (1991) diskutiert Phytohormonkonjugate ebenfalls als reversible Entaktivierungs- und Speicherform. Es existiert nur ein Literaturhinweis auf eine *N*-gebundene Hexose der IAA, detektiert in Samen der Waldkiefer nach Inkubation mit ^{14}C markierter IAA (Ljung *et al.* 2001). Kürzlich wurden **49** und **50** als adstringierendes Prinzip von Johannisbeersamen (*Ribes rubrum*) beschrieben (Schwarz & Hofmann 2007a; 2007b). Kai *et al.* (2007) konnten jüngst **49** und dessen *O*-Aspartat- sowie *O*-Glutamat-Derivate mittels LC-ESI-MS Experimenten in Reispflanzen (*Oryza sativa*) detektieren sowie dessen Synthese ausgehend von Indol-3-yl-essigsäure (**52**) über eine Kondensation des Methyl-Indolinderivates (**53**) mit D-Glukose und anschließender Oxidation der acetylgeschützten *N*-Glukosylverbindung (**54**) beschreiben. Durch Entschützung der Carboxygruppe und der Glukosefunktion gelangt man schließlich zum Endprodukt (**49**; Abb. 4.14.). In einem weiteren Screening fanden die Autoren die Verbindung **49** auch in Extrakten von *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* und *Lotus japonicus*. Da *N*-Glc-IAA (**49**) größtenteils in den Samen der Reispflanzen gefunden wurde und in einem Bioassay das Wurzellängenwachstum von Reiskeimlingen im Gegensatz zur freien IAA (**52**) nicht signifikant gehemmt wurde, diskutieren die Autoren **49** ebenfalls als IAA-Speicherform.

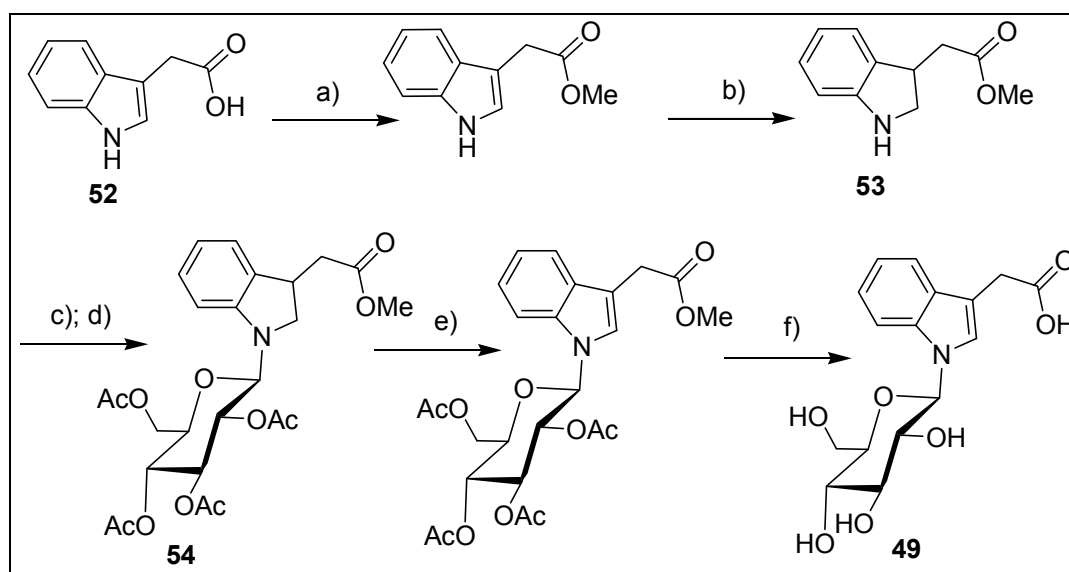


Abb. 4.14. Darstellung von **49** nach Kai *et al.* (2007). a) MeI, K_2CO_3 /*N,N*-Dimethylformamid; b) Triethylsilan/TFA, 60 °; c) D-Glukose/MeOH, Rückfluss; d) Acetanhydrid/Pyridin; e) 2,3-Dichlor-dicyano-1,4-benzochinon/1,4-Dioxan; f) 1 M KOH

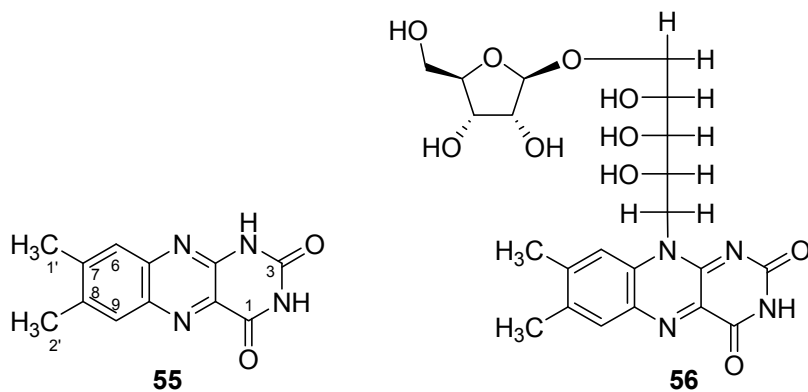
4.2.3 Weitere *N*-haltige Inhaltsstoffe aus *Cortinarius brunneus*

Pilzfruchtkörper von *C. brunneus* sind eine reichhaltige Quelle polarer stickstoffhaltiger Naturstoffe. Aus dem Methanolextrakt gefriergetrockneter Fruchtkörper konnten weitere strukturdiverse stickstoffhaltige Substanzen isoliert werden. Diese können teilweise als biosynthetische Vorläufer komplexerer Alkaloide betrachtet werden. Die Aufarbeitung des

Rohextraktes erfolgte analog der zuvor beschriebenen Methoden. Die in diesem Abschnitt vorgestellten Substanzen konnten auf dem Weg der Isolierung der Brunneine (27–29) und der N-glukosylierten Indole (47–50) isoliert und strukturell charakterisiert werden und sind größtenteils neu für *C. brunneus* bzw. für die Gattung *Cortinarius*.

4.2.3.1 7,8-Dimethylbenzo[g]pteridin-2,4-(1H,3H)-dion (55)

Eine auffallend blaugrüne Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 366\text{nm}$) zeigt das Alloxazin-Derivat 7,8-Di-methylbenzo[g]pteridin-2,4-(1H,3H)-dion (55). Mittels negativer ESI-FTICR-Massenspektrometrie konnte die Summenformel $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$ zugeordnet werden (m/z 241,0731 $[\text{M}-\text{H}]^-$). Im ESI/CID Massenspektrum wurden im positiven Modus $[\text{M}+\text{H}-45]^+$ und $[\text{M}+\text{H}-71]^+$ als Hauptfragmente beobachtet, welchen Formamid- bzw. Formylformamid-Abspaltungen zugrunde liegen dürften. Im ^1H -NMR-Spektrum der Substanz lassen sich zwei aromatische Protonensignale bei $\delta = 7.94\text{ ppm}$ (*s*, H-9) und $\delta = 7.78\text{ ppm}$ (*s*, H-6) erkennen sowie die Signale zweier Methylgruppen bei $\delta = 2.54\text{ ppm}$ (*s*, 3H, H-2') und $\delta = 2.52\text{ ppm}$ (*s*, 3H, H-1'). Das ^{13}C -NMR-Spektrum zeigt neben den Signalen der vier Kohlenstoffe, denen mittels HSQC-Korrelationen die beschriebenen Protonen zugeordnet werden konnten, zusätzlich acht quartäre Kohlenstoffe. Deren Positionen wurden anhand der HMBC-Korrelationen sowie durch Literaturvergleich mit beschriebenen NMR-Daten ermittelt. Diese auch als Lumichrom bekannte Substanz wurde kürzlich aus Kulturen des Schimmelpilzes *Paecilomyces* sp. J300 isoliert (Kwon *et al.* 2004).



Lumichrom (55) ist das Aglykon von Riboflavin. Unter Lichteinwirkung kann es als Photoprodukt aus Riboflavin erhalten werden (Viscontini *et al.* 1968). Riboflavin, auch als Vitamin B₂ bezeichnet, ist weit verbreitet in Pflanzen- und Tierzellen. Es ist wesentlicher Bestandteil der Flavocoenzyme FMN und FAD, die als prosthetische Gruppen verschiedenen Oxidoreduktasen zur Wasserstoffübertragung dienen (Koolman & Röhm 1998). Riboflavin und Pteridin-Derivate sind in Macromyceten häufig verbreitet (Liu 2005). Sie sind verantwortlich für die Pigmentierung und intensive Fluoreszenz unter UV_{366 nm} vieler Pilze, vor allem innerhalb *Russula* und *Lyophyllum* (Gill & Steglich 1987). Lampteroflavin (56, Riboflavinyl- α -Ribofuranosid), agiert als Lichtemitter in der Biolumineszenzreaktion des japanischen „Mondscheinpilzes“ *Lampteromyces japonicus* (Uyakul *et al.* 1990).

4.2.3.2 3-Methoxy-L-tyrosin (57)

Mit 3-Methoxy-L-tyrosin (**57**), auch 3-*O*-Methyldopa (3-OMD), konnte der einzige bisher in der Literatur beschriebene Naturstoff aus *C. brunneus* (Dardenne *et al.* 1977) isoliert und in seiner Struktur mittels Einkristallröntgenstrukturanalyse bestätigt werden (Abb. 4.15.). Dabei handelt es sich um das 3-Methoxyderivat der Aminosäure L-Tyrosin. **57** stellt einen aktiven Metabolit von Levodopa dar, einem Wirkstoff zur Behandlung von Morbus Parkinson. Demzufolge ist 3-OMD ein wichtiger Marker für Drugmonitoring und Pharmakokinetikuntersuchungen von Levodopa (Sarre *et al.* 1995). 3-OMD wird unter anderem auch zur Synthese von L-Dopa verwendet (Renth *et al.* 1973; Nagasaki *et al.* 1972).

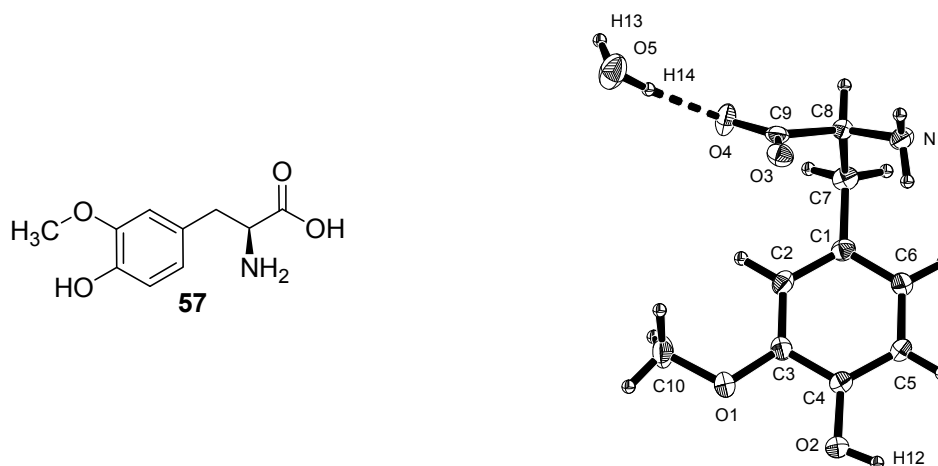
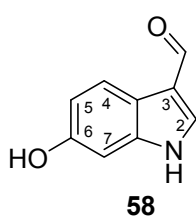


Abb. 4.15. Röntgenkristallstruktur von **57**.

4.2.3.3 6-Hydroxy-1*H*-indol-3-carbaldehyd (58)

Ein weiterer Metabolit aus dem MeOH-Extrakt von *C. brunneus* ist 6-Hydroxy-1*H*-indol-3-carbaldehyd. Die Summenformel $C_9H_7NO_2$ wurde mittels ESI-FTICR-MS bestimmt. Im 1H -NMR-Spektrum (DMSO- d_6) sind sieben Protonensignale erkennbar. Dabei konnten zwei breiten Singulets bei $\delta = 11.76$ ppm und $\delta = 9.29$ ppm eine NH- bzw. eine OH-Funktion zugeordnet werden. Weiterhin ist bei einer Verschiebung von $\delta = 9.82$ ppm ein Singulett erkennbar, dem das Proton einer Aldehydfunktion zugeordnet wurde. Die restlichen Signale beschreiben ein Spinkopplungssystem dreier aromatischer Protonen bei $\delta = 7.83$ ppm (*d*, $J = 8.5$ Hz), 6.84 (*d*, 2.1) und 6.71 (*dd*, 8.5/2.1) sowie ein isoliertes aromatisches Proton als Singulett bei $\delta = 8.06$ ppm. Die zugehörigen Kohlenstoffe wurden mittels eines HSQC-Experimentes ermittelt. Die Zuordnung der restlichen Kohlenstoffe von **58** erfolgte durch die Interpretation der entsprechenden HMBC-Korrelationen. Die Position der OH-Gruppe an C-6 konnte wiederum durch Vergleich mit Literaturdaten bekannter Substanzen mit einer Hydroxyindol-Struktur bestimmt sowie durch die ^{13}C -NMR Hochfeldverschiebung von C-7 ($\delta = 98.0$ ppm) erklärt werden (Abschnitt 4.2.1). Interessanterweise ist **58** wie die Brunneine A-C (**27–29**) und Verbindung **30** auch in *meta*-Position



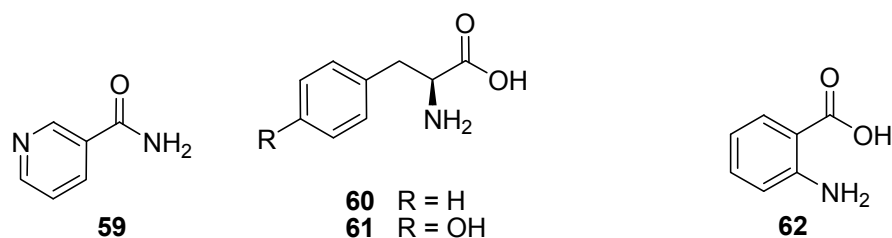
zum Indolstickstoff hydroxyliert. *C. brunneus* scheint durch eine spezifische Hydroxylase bevorzugt diese Kohlenstoffposition in Indolverbindungen zu substituieren.

6-Hydroxy-1*H*-indol-3-carbaldehyd (**58**) ist in der Literatur bisher nur einmal als Naturstoff beschrieben. Das Indolderivat wurde aus dem MeOH-Extrakt von *Agrocybe cylindracea* isoliert und hemmt die Lipidperoxidation in Rattenlebermikrosomen mit einem IC₅₀-Wert von 4,1 µg/ml (Kim *et al.* 1997).

4.2.3.4 Nicotinsäureamid (**59**), Phenylalanin (**60**), Tyrosin (**61**), Tryptophan (**36**), Anthranilsäure (**62**)

Mit Nicotinsäureamid (**59**) wurde ein weiterer N-haltiger Inhaltsstoff isoliert. Die spektroskopischen Daten stimmen mit den Literaturangaben überein (Van *et al.* 2005). Das Pyridinderivat kommt ubiquitär im Pflanzen-, Pilz- und Tierreich vor und ist Bestandteil von NAD⁺ und NADP⁺. Diese Coenzyme sind als Überträger von Hydridionen an zahlreichen biochemischen Redoxprozessen beteiligt (Koolman & Röhm 1998).

Weiterhin konnten in höheren Ausbeuten die drei Aminosäuren Phenylalanin (**60**), Tyrosin (**61**) und Tryptophan (**36**) aus den polaren Fraktionen des MeOH-Extraktes erhalten werden. Ihre Strukturaufklärung erfolgte mittels ¹H-NMR, ESI-MS und über den Vergleich mit authentischen Proben bzw. entsprechenden Literaturdaten.



Mit Anthranilsäure (**61**) konnte die Substanz isoliert werden, welche für eine blau fluoreszierende Bande (UV_{366nm}) auf dem Dünnschichtchromatogramm des MeOH-Rohextraktes von *C. brunneus* bei R_f = 0,7 (LM 1) verantwortlich ist.

Alle vier Substanzen stellen wichtige biosynthetische Precursor strukturdiverser Alkaloidklassen dar. **36** und **62** kommen sicherlich als biosynthetische Vorläufer der Brunneine (**27–29**) und der N-glukosylierten Indolderivate (**47–50**) in Frage.

Ferner wurden im Verlauf der Arbeit das Purinderivat Adenosin genauso wie das Pyrimidinderivat Uridin aus dem MeOH-Extrakt von *C. brunneus* isoliert. Die spektroskopischen Daten waren identisch mit Literaturangaben (Van *et al.* 2005).

4.3 (Iso-) Chinolinalkaloide aus *Cortinarius subtortus* (Pers.) Fr.

4.3.1 *Cortinarius subtortus* (Pers.) Fr.



Cortinarius subtortus (Pers.) Fr.

(<http://www.natur-um-triberg.de>)

Cortinarius subtortus, der Olivgelbe Schleimkopf, gehört innerhalb der Gattung *Cortinarius* zur Untergattung *Phlegmacium*. Pilze dieser Untergattung grenzen sich vor allem durch ihre schleimige Hutoberfläche sowie einen trockenen Stiel von Pilzen anderer Untergattungen ab. Der Name *Phlegmacium* leitet sich vom Griechischen Wort „φλέγμα“ ab, das die Bedeutung „Schleim“ hat. Pilzarten dieser Untergattung bilden Mykorrhiza-Assoziationen mit Laub- und Nadelbäumen und sind in Europa weit verbreitet. Die ockerbraunen Fruchtkörper von *C. subtortus* haben eine kugelige (jung) bis stark gewölbte Hutform, welche mit einer feucht schmierigen Schicht überzogen ist und bis zu 6 cm breit werden kann. Der Stiel ist gleichdick bis keulig und ca. 4-9 cm lang. Der Name *subtortus* leitet sich vom Lateinischen ab und bedeutet „etwas verdreht“. Allerdings findet man den Stiel recht selten verdreht vorliegend (Moser 1960). Die Fruchtkörper sind durch einen bitteren Geschmack sowie einen Duft nach Zedernholz gekennzeichnet. *C. subtortus* ist in subalpinen Fichtenwäldern und Mooren zu finden (Moser 1983). Bis jetzt sind keine Naturstoffe aus dieser Art in der Literatur beschrieben. Kürzlich wurde von einem HPLC-Vergleich der EtOH-Extrakte von *C. subtortus* und *C. infractus* berichtet, welcher die Autoren nach Unterscheidung ihrer Chromatogramme zu einer Einordnung beider Arten in jeweils zwei verschiedene Sektionen innerhalb *Phlegmacium* veranlasst (Bronz *et al.* 2006).

Fruchtkörper von *C. subtortus* zeigen auch das Phänomen einer bläulichgrünen Fluoreszenz unter UV_{366 nm} an verletzten Fruchtkörperstellen. Werden die Fruchtkörper mechanisch zerkleinert und mit MeOH extrahiert, weist eine Lösung dieses Extraktes eine starke

bläulichgrüne Fluoreszenz auf. Die Untersuchung hatte zum Ziel, die für die beobachtete Fluoreszenz verantwortlichen Inhaltsstoffe zu isolieren und zu charakterisieren, um eine eventuelle chemotaxonomische Abgrenzung zu Nachbararten bzw. -gattungen vornehmen zu können.

Metabolische Fingerprints mehrerer Individuen verschiedener Lokalität wären nützlich, um Markersubstanzen zu identifizieren. Es gibt Kontroversen zur Einteilung dieser Art innerhalb von *Cortinarius*. So postulieren Garnica *et al.* (2005) ausgehend von rDNA Untersuchungen zum Beispiel eine gemeinsame Einordnung von *C. subtortus* und *C. infractus* in die Sektion Infracti, während Brandrud *et al.* (1998) folgend, *C. subtortus* getrennt von *C. infractus* in die Sektion Subtorti innerhalb *Phlegmacium* einzuordnen ist.

4.3.2 Isolierung der Inhaltsstoffe

Die wässrig-methanolischen Fraktionen der säulenchromatographischen Trennung des MeOH Rohextraktes tiefgefrorener Pilzfruchtkörper an Diaion HP20 beinhalteten die fluoreszierenden Inhaltsstoffe. So konnten im Dünnschichtchromatogramm dieser Fraktionen zwei bläulichgrün fluoreszierende Banden bei R_f 0,5 und R_f 0,4 (LM 1) detektiert werden. Außerdem wurde bei einem R_f -Wert von ca. 0,6 eine intensiv orange fluoreszierende Bande detektiert. Die den entsprechenden Banden zugehörigen Substanzen wurden gemäß dem Aufarbeitungsschema isoliert (Abb. 4.16.). Durch strukturelle Charakterisierungen, basierend auf NMR und massenspektrometrischen Methoden, wurden die Konstitutionen zweier Chinolinderivate, 6-Hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (**63**) und 4-Amino-6-hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (**64**), sowie eines Isochinolinderivates, 1,2-Dihydro-7-hydroxy-1-oxo-isochinolin-5-carbonsäure (**65**), ermittelt.

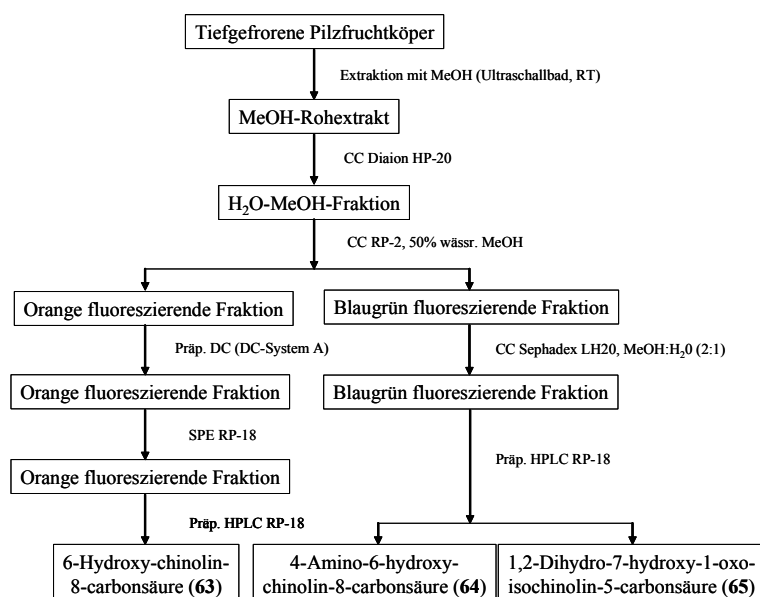
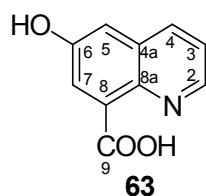


Abb. 4.16. Isolierung der (Iso)-Chinolinalkaloide aus Fruchtkörpern von *C. subtortus*.

4.3.3 6-Hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (63)

Die Summenformel $C_{10}H_7NO_3$ des gelben Feststoffes **63** wurde aus dem ESI-FTICR-Massenspektrum erhalten. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen des Moleküliions m/z 190 $[M+H]^+$ ergaben die drei Fragmentationen m/z 172 ($[M+H-H_2O]^+$), m/z 144 ($[M+H-H_2O-CO]^+$) und m/z 116 ($[M+H-H_2O-2CO]^+$). Daraus konnten erste Hinweise auf mögliche phenolische Hydroxygruppen gewonnen werden. Das 1H -NMR-Spektrum zeigt zwei separate Spinsysteme. Das erste, gekennzeichnet durch die Signale bei $\delta = 7.71$ ppm (*dd*, H-3), 8.54 (*dd*, H-4), und 8.87 (*dd*, H-2), deutet auf einen dreifach substituierten aromatischen Benzolring hin. Das zweite Spinsystem besteht aus den zwei *meta*-ständigen aromatischen Protonen H-5 (*d*, $\delta = 8.13$ ppm, $J = 2.8$ Hz) und H-7 (*d*, 7.54, 2.8). Die ^{13}C -NMR-Daten (Tab. 4.7.) favorisieren ein Chinolinsystem, welches an C-6 mit einer Hydroxy- und an C-8



mit einer Carboxygruppe substituiert ist. Obwohl nur ein für hohe Auflösungen unzureichender Datensatz gewonnen werden konnte ($wR2 \approx 0,45$), bestätigte die Einkristallröntgenstrukturanalyse von **63** zumindest die Anordnung der Substituenten. Somit ist die Verbindung als 6-Hydroxy-chinolin-8-carbonsäure anzugeben. Diese Substanz ist bisher nur

als Zwischenprodukt in der Synthese antiallergisch wirkender 8-(1*H*-Tetrazol-5-yl-carbamoyl)-chinoline beschrieben (Erickson 1979; Riker Lab. 1980).

4.3.4 4-Amino-6-hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (64)

Die Substanz **64** wurde als weißer Feststoff erhalten. Die Summenformel $C_{10}H_8N_2O_3$ wurde wiederum durch ESI-FTICR-MS ermittelt. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen des $[M+H]^+$ Ions (m/z 205) zeigten ein ähnliches Fragmentierungsverhalten wie **63**. So wurden gleichfalls H_2O - und CO -Abspaltungen bei m/z 187 ($[M+H-H_2O]^+$), m/z 159 ($[M+H-H_2O-CO]^+$), m/z 131 ($[M+H-H_2O-2CO]^+$) und m/z 132 ($[M+H-H_2O-CO-HCN]^+$) als Fragmentationen detektiert. Das 1H -NMR-Spektrum von **64** unterscheidet sich vom Spektrum der Substanz **63** nur durch die Abwesenheit eines aromatischen Protons (Tab. 4.7.). Stattdessen ist zusätzlich ein breites Singulettsignal bei $\delta = 8.00$ ppm zu erkennen. Diesem wurden aufgrund seiner Intensität zwei Protonen zugeordnet, welche das Vorkommen einer Aminofunktion andeuten. Die Interpretation des HMBC-Korrelationspektrums ergab wiederum ein Chinolinsystem, welches mit einer Hydroxy-, einer Carboxy- und einer Aminogruppe substituiert ist. Die Anordnung der Substituenten wurde durch HMBC-Korrelationen zwischen H-7 und C-9 sowie der Hochfeldverschiebung von C-5 ($\delta = 107.9$ ppm), verursacht durch den elektronenschiebenden Effekt der *ortho*-positionierten Hydroxygruppe, festgelegt. Des Weiteren unterstützten die Nuclear-Overhauser-Effekte der Aminogruppe zu H-3 und H-5 (Abb. 4.17.) diese strukturelle Zuordnung. Daraus schlussfolgernd, konnte **64** die Struktur der 4-Amino-6-hydroxy-chinolin-8-carbonsäure zugeordnet

werden. Literaturrecherchen ergaben, dass es sich bei **64** um einen bisher unbeschriebenen Naturstoff handelt.

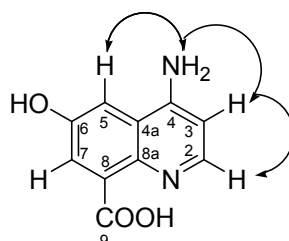


Abb. 4.18. ROESY-Korrelationen von **64**.

Tab. 4.7. ^1H und ^{13}C -NMR-Daten von **63** und **64** in $\text{DMSO-}d_6$.

| Pos. | 63 | | 64 | | HMBC zu C |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------|
| | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^1\text{H}$ [Mult. J (Hz)] | $\delta^{13}\text{C}$ ^a | $\delta^1\text{H}$ [Mult. J (Hz)] | |
| 1 | | | | | |
| 2 | 146.1 | 8.87, <i>dd</i> (4.4, 1.6) | 140.8 | 8.35, <i>d</i> (6.3) | 3, 4, 8a |
| 3 | 125.8 | 7.71, <i>dd</i> (8.5, 4.4) | 100.8 | 6.64, <i>d</i> (6.3) | 2, 4a |
| 4 | 137.5 | 8.54, <i>dd</i> (8.5, 1.6) | 155.1 | | |
| 4-NH ₂ | | | | 8.00, (br) <i>s</i> | 3, 4a |
| 4a | 125.4 | | 119.3 | | |
| 5 | 114.0 | 7.54, <i>d</i> (2.8) | 107.9 | 7.65, <i>d</i> (2.6) | 4, 6, 8a, 7 |
| 6 | 155.7 | | 156.2 | | |
| 6-OH | | 10.71 (br) <i>s</i> | | 10.25, (br) <i>s</i> | |
| 7 | 122.4 | 8.13, <i>d</i> (2.8) | 125.4 | 8.08, <i>d</i> (2.6) | 5, 6, 8, 8a, 9 |
| 8 | 129.9 | | 128.7 | | |
| 8a | 139.5 | | 136.9 | | |
| 9 | 166.2 | n.d. | 166.8 | n.d. | |

^a ermittelt aus den HSQC- und HMBC-Spektren

4.3.5 1,2-Dihydro-7-hydroxy-1-oxo-isochinolin-5-carbonsäure (**65**)

Die Substanz **65** wurde als hellbrauner Feststoff erhalten. Die Summenformel $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_4$ deutete hierbei einen ähnlichen Strukturtyp wie **63** und **64** an. Allerdings wurde **65** durch Interpretationen seiner ^1H - und 2D-NMR-Spektren eine dreifach substituierte Isochinolingrundstruktur zugeordnet. Das ^1H -NMR-Spektrum von **65** zeigt zwei verschiedene Spinsysteme (Abb. 4.18.). Der Benzolring der Isochinolingrundstruktur besitzt zwei *meta*-ständige aromatische Protonen, gekennzeichnet durch die Signale bei $\delta = 7.75$ ppm (*d*, $J = 3.0$ Hz, H-6) und $\delta = 7.38$ ppm (*d*, 3.0, H-8), während ein Dreispinsystem, bestehend aus zwei aromatischen Protonen bei $\delta = 7.85$ ppm (*dd*, H-3) und $\delta = 5.85$ ppm (*dd*, H-4) sowie dem Signal des Piperidinstickstoffprotons bei $\delta = 14.88$ ppm (br *d*), detektiert wurde. Es handelt sich somit bei **65** um ein Isocarbostyrylderivat. Basierend auf den HMBC-Korrelationen zwischen H-4 und C-5 ($^3J_{\text{CH}}$) und H-4 und C-8 ($^4J_{\text{CH}}$) sowie einer nicht existierenden ROESY-Korrelation zwischen H-4 und H-5, wurden die Positionen der Substituenten, Carboxygruppe an C-5 und Hydroxygruppe an C-7, zugeordnet. Weiterhin wurde eine Carbonylfunktion (C-1) als Teil einer Amidstruktur in **65** zugeordnet. Die Amidteilstruktur wurde außerdem durch die Abspaltung von 45 amu im LC-ESI-MS/MS (Negativionenmodus), m/z 159 ($[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{NCHO}]^-$), bestätigt. Auf Grundlage aller

spektroskopischen Daten kommt dem neuen Naturstoff **65** die Struktur 1,2-dihydro-7-hydroxy-1-oxo-isochinolin-5-carbonsäure zu.

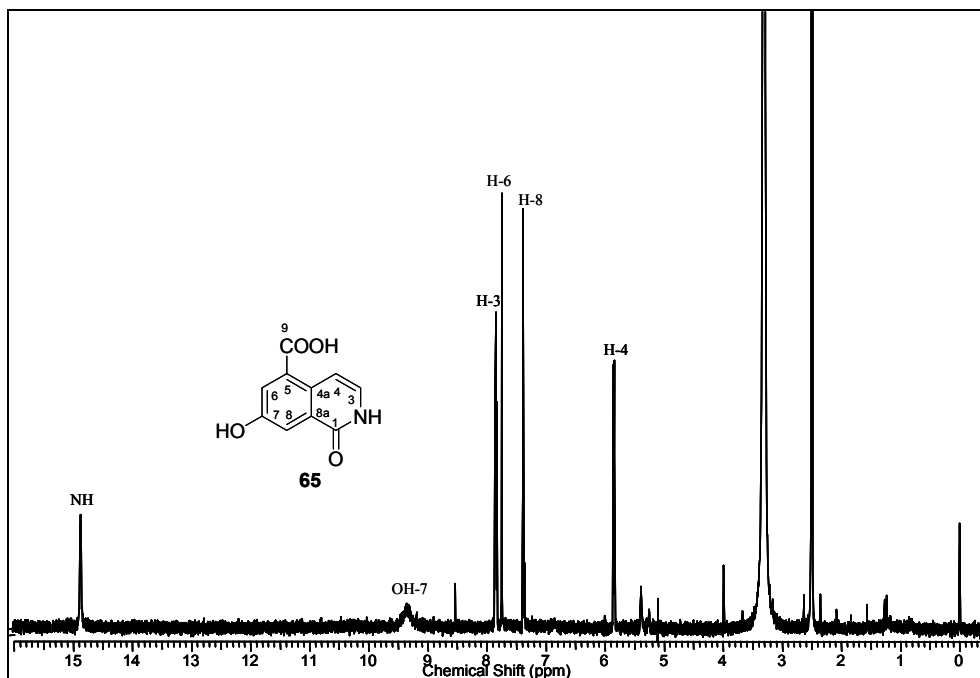


Abb. 4.18. ^1H -NMR-Spektrum von **65** in $\text{DMSO-}d_6$.

Tab. 4.8. Zusammenfassung der NMR-Daten von **65** in $\text{DMSO-}d_6$.

| Pos. | $\delta^{13}\text{C}^a$ | $\delta^1\text{H}$ [Mult. J (Hz)] | COSY zu H | HMBC zu C |
|------|-------------------------|-------------------------------------|-----------|-----------------|
| 1 | 177.2 | | | |
| 2-NH | | 14.88, <i>d</i> (5.6) | 3, 4 | 4, 8a |
| 3 | 138.1 | 7.85, <i>dd</i> (7.2, 5.6) | 2, 4 | 1, 4, 4a |
| 4 | 107.0 | 5.85, <i>d</i> (7.2) | 2, 3 | 3, 8, 8a |
| 4a | 135.7 | | | |
| 5 | 128.4 | | | |
| 6 | 123.2 | 7.75, <i>d</i> (3.0) | 8 | 4a, 5, 7, 8, 9 |
| 7 | 153.8 | | | |
| 7-OH | | 9.38, <i>br s</i> | | |
| 8 | 111.4 | 7.38, <i>d</i> (3.0) | 6 | 1, 4a, 6, 7, 8a |
| 8a | 127.2 | | | |
| 9 | 168.0 | | | |

^a ermittelt aus den HSQC- und HMBC-Spektren

Während **63** in methanolischer Lösung eine orangefarbene Fluoreszenz zeigt, weisen die Substanzen **64** und **65** eine bläulichgrüne Fluoreszenz auf (Abb. 4.19.). Da sie sich in ihrer Struktur von denen für die bläulichgrüne Fluoreszenz des MeOH-Extraktes von *C. infractus* Fruchtkörpern verantwortlichen β -Carbolinderivaten unterscheiden, könnten **64** und **65** als chemotaxonomische Marker zur Unterscheidung beider Arten wertvoll sein.

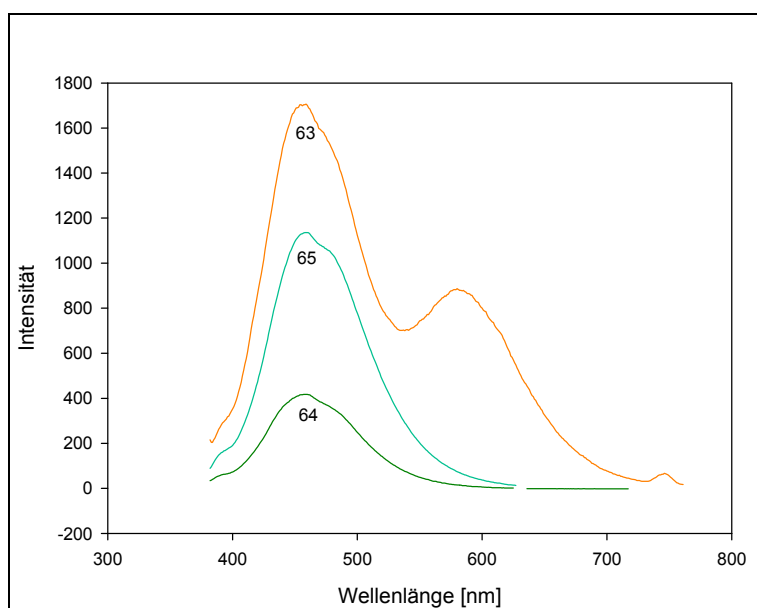


Abb. 4.19. Fluoreszenzemissionsspektren von **63–65** in MeOH ($\lambda_{\text{exc}} = 373$ nm).

4.3.6 Biologische Aktivitäten der (Iso-) Chinolinalkaloide

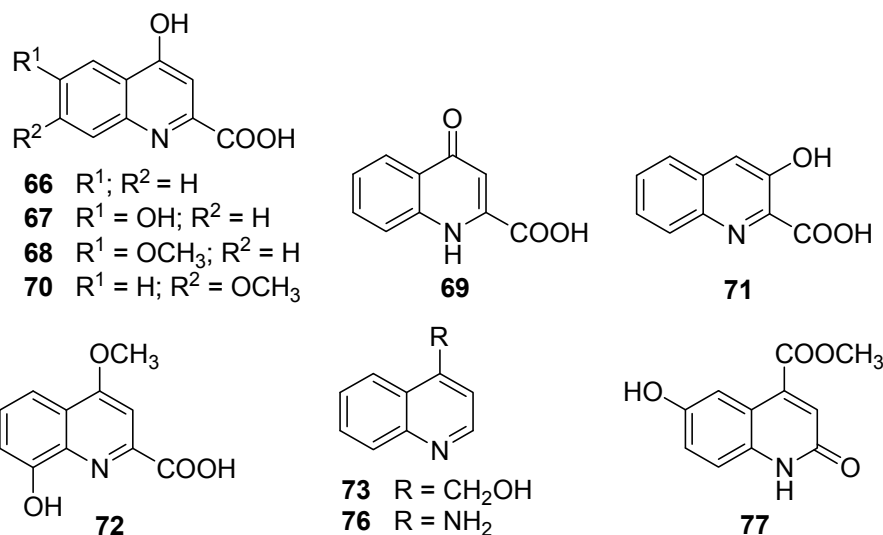
Die Substanz **63** besitzt ausgeprägte antifungische Aktivität gegen den phytopathogenen Pilz *Colletotrichum coccodes*. Sie hemmte das Myzelwachstum dieses Schadpilzes bereits ab einer Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ signifikant, während für **64** und **65** keine fungitoxischen Aktivitäten in diesem Assay detektiert wurden (Abschnitt 6.5.1).

Des Weiteren zeigten alle drei Substanzen (**63–65**) moderate Radikalfänger- und somit antioxidative Aktivitäten in einem DPPH Free Radical Scavenger Assay (Abschnitt 6.5.2).

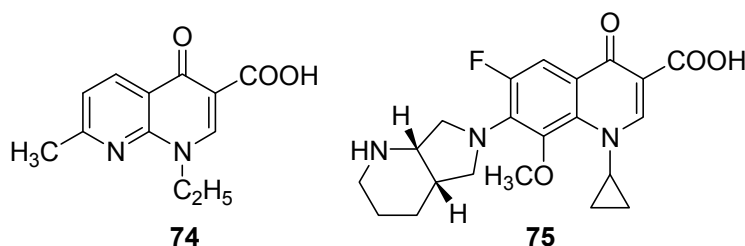
4.3.7 Überblick strukturähnlicher Naturstoffe

Die isolierten neuen Naturstoffe **63–65** sind strukturell sehr ähnlich zu einer Vielzahl bioaktiver Chinolin- und Isochinolincarbonsäuren, welche bereits aus Pflanzen, Bakterien und Tieren beschrieben wurden (Michael 2003). Der endogene Tryptophanmetabolit Kynurensäure (**66**) ist als neuroprotektive, antikonvulsive Substanz bekannt, welche die Transmission der glutamatergen und der cholinergen Aktivitäten so beeinflussen kann, dass die altersbezogene Herabsetzung der Merkfähigkeit mit der Zunahme der Konzentration an **66** im *Liquor cerebrospinalis* korreliert. Somit könnte die Hemmung der Kynurensäureproduktion ein neues Target in der Demenzbehandlung darstellen, bedarf aber noch der Validierung (Kepplinger 2005). 6-Hydroxykynurensäure (**67**) wurde aus *Nicotiana tabacum* und *Thapsia villosa* isoliert (Mendez & Masa 1975; Macnicol 1968). Innerhalb des Pflanzenreichs kommen Chinolincarbonsäurederivate wie 4-Hydroxy-6-methoxychinolin-2-carbonsäure (**68**) (*E. pachyclada*, Starrat 1996), das antibakterielle Transtorin (**69**) (*E. transitoria*; Al-Khalil 1998) und Ephedralon (**70**) (*E. alata*; Nawwar *et al.* 1985) vor allem in *Ephedra* spp. vor. Aus Mikroorganismen sind unter anderem 3-Hydroxychinolin-2-carbonsäure (**71**) (*Streptomyces griseoflavus*; Breiding-Mack & Zeeck 1987)

und Quinolobactin (**72**) (*Pseudomonas fluorescens*; Mossialos *et al.* 2000) beschrieben. Innerhalb der Höheren Pilze (Macromycetes) ist bisher als einfaches Chinolincarbonsäurederivat nur das potent antimalaria wirkende 4-Hydroxymethyl-chinolin (**73**) aus den Saprophyten *Trametes versicolor* und *Pycnoporus sanguineus* beschrieben (Liu 2005; Abraham & Spassov 1991).



Zur Gruppe der Chinoloncarbonsäuren gehören die zurzeit bekanntesten totalsynthetischen antibakteriellen Therapeutika, die sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine wichtige Stellung einnehmen (Petersen 2001). Sie inhibieren essentielle Enzyme der Bakterien, die DNA-Gyrase (Topoisomerase II) und die Topoisomerase IV, und verhindern dadurch eine Überspiralisierung bzw. die Dekatenierung der bakteriellen DNA und damit eine Replikation der Bakterien. Ausgehend von der von Lesher (1962) beschriebenen Nalidixinsäure (**74**) wurde die Substanzklasse in den letzten Jahren weiter optimiert. So präsentiert Moxifloxacin (**75**) als Vertreter der Chinoloncarbonsäuren der 3. Generation eine gut verträgliche Substanz mit einer deutlich verbesserten Pharmakokinetik und Wirkung auf β -Lactam- und Makrolid-resistente Keime.



Auch Aminochinoline besitzen interessante Bioaktivitäten. 4-Aminochinolin (**76**) besitzt beispielsweise antagonistische Eigenschaften am NMDA-Rezeptor (Pinard *et al.* 2002). Andere Derivate verfügen über potente Antimalaria-Aktivitäten (Mackenzie 1983).

(Iso)-Carbostyryl abgeleitete Naturstoffe sind bislang selten in der Literatur beschrieben. Kürzlich wurde 4-Carbomethoxy-6-hydroxy-2-chinolon (**77**) aus den Aleuronen von anthocyaninpigmentiertem Reis beschrieben, welches moderate antioxidative Eigenschaften besitzt (Chung *et al.* 2001).

5 Untersuchungen an Pilzarten der Gattung *Hygrophorus*

5.1 Die Gattung *Hygrophorus*

Die Gattung *Hygrophorus* Fr. (dt. Schnecklinge) gehört nach Bas (1990) zur Familie der Tricholomataceae (Ritterlingsartige) innerhalb der Ordnung Agaricales (Blätterpilze) und der Klasse Basidiomycetes. Die Gattung ist nach Bon (1992) in Europa mit etwa 60 Arten vertreten. Arnolds (1990) unterscheidet innerhalb der Gattung 23 Arten, welche in vier Sektionen und mehrere Subsektionen eingeordnet werden. Die Einteilung in Sektionen basiert hauptsächlich auf der Farbe der Fruchtkörper bzw. der Lamellen (Abb. 5.1.).

Die vorliegende Arbeit folgt in der Systematik und Taxonomie hauptsächlich Arnolds' Einordnungen in der Flora Agaricina Neerlandica (Arnolds 1990). Die Bezeichnung *Hygrophorus* leitet sich aus den griechischen Wörtern „hygros“ (= feucht) und „phorus“ (= tragend) ab. Bei fast allen Arten ist mindestens der Hut oder der gesamte Fruchtkörper mit einer klebrigen Schleimschicht überzogen. Dies verdeutlicht das deutsche Synonym Schnecklinge für die Pilze dieser Gattung. Die englische Bezeichnung „waxy caps“ beschreibt die wachsartigen Lamellen, die dicklich, breit angewachsen oder herablaufend sind und meist entfernt stehen. Die Sporenfarbe ist immer weiß und die Farbe der Fruchtkörper variiert von weiß über orange-rötlich bis zu dunkleren Brauntönen. Alle Arten in *Hygrophorus* sind streng spezialisierte Mykorrhizapilze von verschiedenen Laub- und Nadelbäumen. Auffällig ist die besonders hohe Beständigkeit dieser Pilzgattung im Freiland gegenüber Parasiten wie Insektenlarven und mykophilen Pilzen.

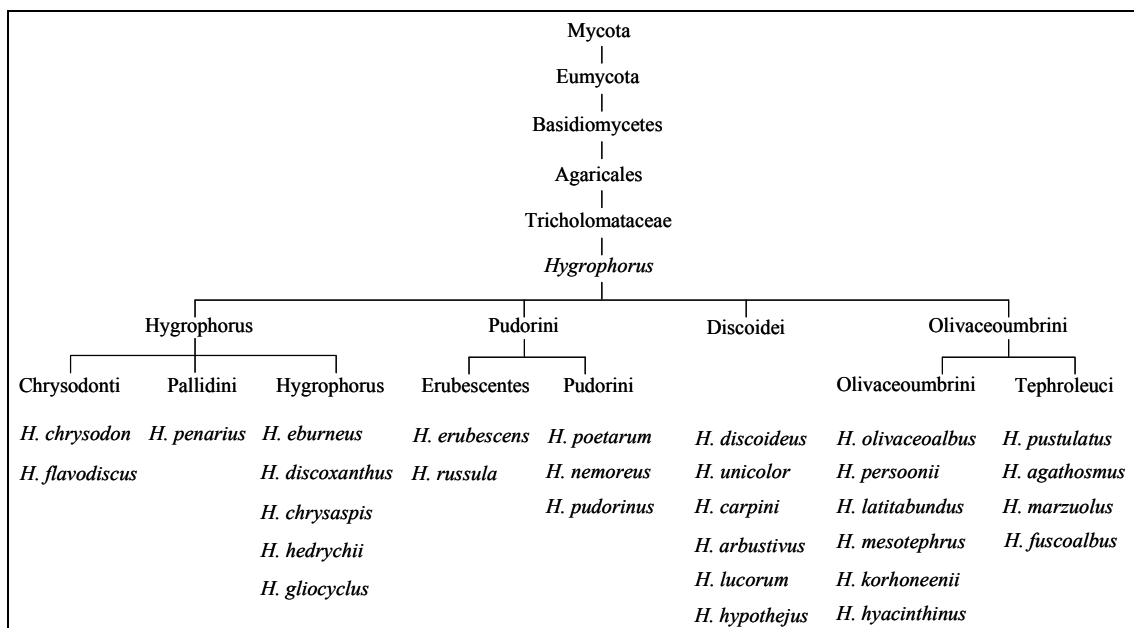
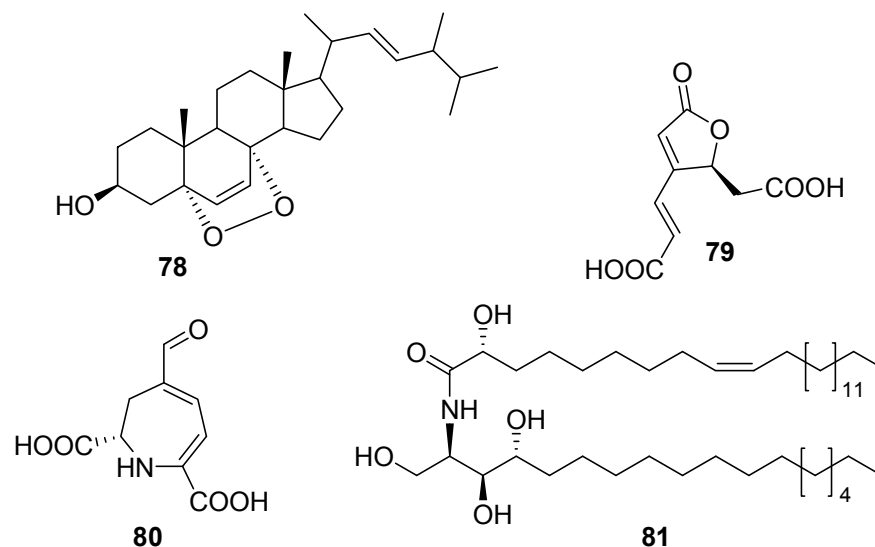


Abb. 5.1. Systematische Einordnung von *Hygrophorus*-Arten nach Arnolds (1990).

5.2 Bisherige Arbeiten zur Charakterisierung von Inhaltsstoffen

Bislang sind nur wenige mykochemische Untersuchungen von *Hygrophorus*-Arten beschrieben. Die meisten Analysen handeln von Nachweisen des in Pilzen ubiquitär vorkommenden Ergosterols und seiner Derivate (Wakita 1977; Cordella *et al.* 1982; Morrica *et al.* 1984). Penevaa *et al.* (2006) isolierten $5\alpha,8\alpha$ -Epidioxi-24(ζ)-methylcholesta-6,22-dien-3 β -ol (**78**) aus *H. agathosmus* und vermuten, dass dieses $5\alpha,8\alpha$ -Ergosterolperoxid für die Zytotoxizität des Chloroformextraktes gegen *Artemia salina* verantwortlich ist, ohne es in reiner Form getestet zu haben. Andere Arbeiten setzten sich mit den flüchtigen Substanzen in *Hygrophorus* auseinander. So führten Duftstoffanalysen in *H. agathosmus*, dem wohlriechenden Schneckling, zum Nachweis von Benzaldehyd (Breheret *et al.* 1997a; Rapior *et al.* 1997; Talou *et al.* 2000), Phenylacetaldehyd, Benzylalkohol, Phenylacetonitril, 2-Phenylethanol (Rapior *et al.* 1997) sowie α -Pinen und β -Phellundren (Breheret *et al.* 1997b). Im Wasserdampfdestillat von *H. cossus*, welcher nach Moser (1983) einen Geruch nach Weidenbohrreraupe besitzt, konnten Steglich und Li (Fugmann 1985) Aceton, 2-Butanon und Phoron nachweisen und als 2,4-Dinitrophenylhydrazone isolieren. Indol und 3-Chlorindol konnten als Ursache für den widerlichen Geruch der nordamerikanischen Art *Hygrophorus paupertinus* bestimmt werden (Wood *et al.* 2003).



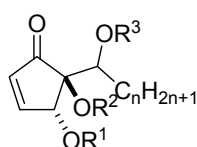
Untersuchungen an *Hygrophorus lucorum* (Fugmann 1985; Gill & Steglich 1987) führten zur Isolierung und Strukturaufklärung des neuen γ -Butyrolactons Hygrophorsäure (**79**). Dessen Biosynthese verläuft über die enzymatische *ortho*-Spaltung von Kaffeesäure und Recyclisierung zum Lacton. Dies konnte durch die Synthese und den Einbau von [α - 2 H]-Kaffeesäure in **79** in einem Feldversuch bewiesen werden. In einem Screening von 20 *Hygrophorus*-Arten konnte **79** zusätzlich in *H. hypothejus*, *H. speciosus* und *H. aureus* nachgewiesen werden. Parallel dazu wurde Muscaflavin (**80**) in drei Arten der Gattung *Hygrophorus* nachgewiesen (Fugmann 1985).

Aus Fruchtkörpern von *H. hypothejus* konnte durch Affinitätschromatographie an

Erythrozyten, eingebettet in ein Polyacrylamidgel, das Lektin HHL isoliert werden, welches spezifisch Erythrozyten des Blutgruppentyps A und B agglutiniert (Veau 1999).

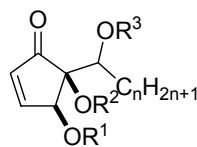
Qu *et al.* (2004) beschreiben die Isolierung des neuen Ceramides Hygrophamid (**81**) aus „*H. eburnesus*“ (vermutlich *H. eburneus*).

Lübken *et al.* (2004) isolierten aus den Arten *H. personii*, *H. olivaceoalbus*, *H. pustulatus* und *H. latitabundus* 18 neue Cyclopentenon-Derivate und zwei neue γ -Butyrolactone, die zusammen als Hygrophorone A–G bezeichnet wurden. Diese Verbindungen besitzen fungitoxische und antibakterielle Aktivitäten (Lübken 2006a). Durch LC-ESI tandem-massenspektrometrische Untersuchungen im SRM-Modus (Selected Reaction Monitoring) konnten die Hygrophorone zusätzlich in *H. agathosmus*, *H. nemoreus* und *H. poetarum* nachgewiesen werden (Lübken *et al.* 2006b).



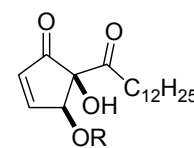
Hygrophorone A

- 82** R¹ = Ac, R² = H, R³ = Ac, n = 12
83 R¹ = Ac, R² = H, R³ = H, n = 12
84 R¹ = H, R² = H, R³ = Ac, n = 12
85 R¹ = Ac, R² = H, R³ = Ac, n = 14
86 R¹ = Ac, R² = H, R³ = H, n = 14
87 R¹ = H, R² = H, R³ = Ac, n = 14



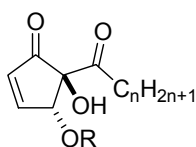
Hygrophorone B

- 88** R¹ = H, R² = H, R³ = H, n = 14
89 R¹ = H, R² = H, R³ = H, n = 16



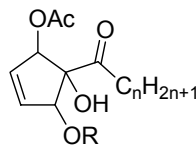
Hygrophorone C

- 90** R = Ac
91 R = H



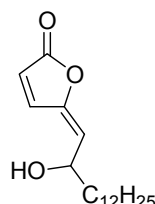
Hygrophorone D

- 92** R = Ac, n = 12
93 R = H, n = 12
94 R = Ac, n = 14

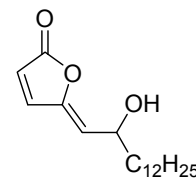


Hygrophorone E

- 95** R = Ac, n = 12
96 R = Ac, n = 10
97 R = Ac, n = 14
98 R = H, n = 12
99 R = H, n = 10

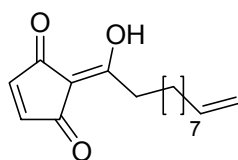
Hygrophoron F¹²

100

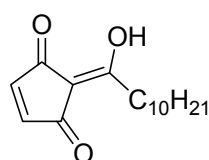
Hygrophoron G¹²

101

Interessanterweise konnten mit den Chrysotrionen A (**102**) und B (**103**) zwei neue Acylcyclopentendione aus *H. chrysodon* isoliert werden (Gilardoni *et al.* 2007). Diese beiden Substanzen können als Oxidationsprodukte der Hygrophorone betrachtet werden und besitzen ebenso fungizide Eigenschaften. Chrysotriion B (**103**) stellt aufgrund der Alkylkettenlänge die oxidierte Form der Hygrophorone E¹⁰ dar. Chrysotriion A (**102**) besitzt eine endständige Methylengruppe in der Alkylseitenkette, welche in den Hygrophoronen bisher nicht beschrieben ist. Basierend auf diesen Ergebnissen sollte mit weiteren bioaktiven Cyclopentenon-Derivaten in *Hygrophorus*-Arten gerechnet werden.



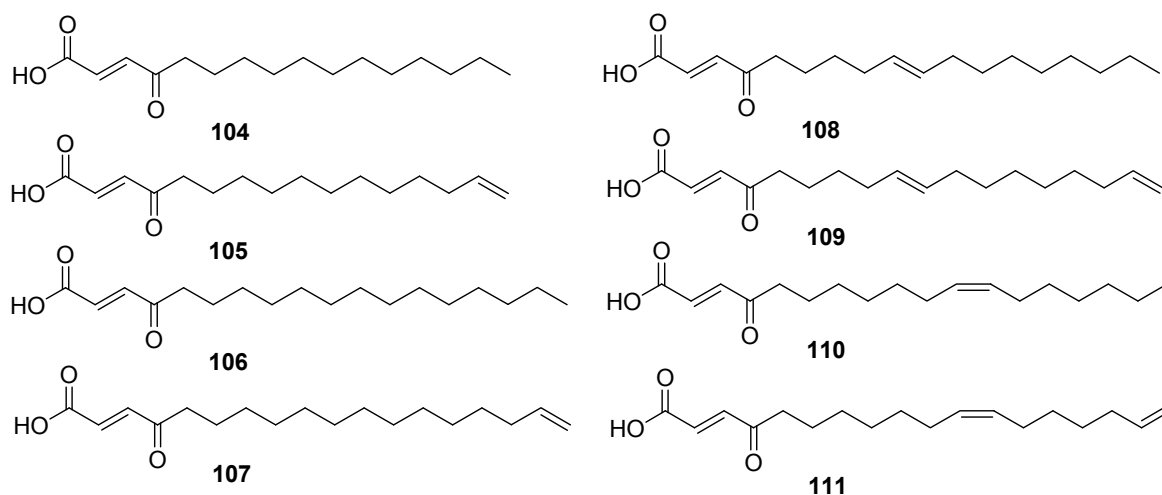
102



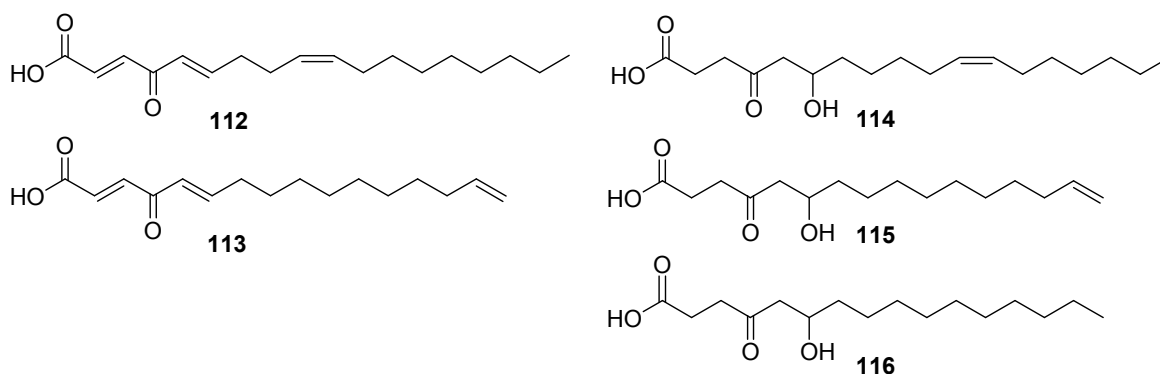
103

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte mit weiteren bioaktiven Cyclopentenon-Derivaten in *Hygrophorus*-Arten gerechnet werden.

Aus *Hygrophorus eburneus* wurden im Rahmen der Diplomarbeit (Teichert 2004) durch aktivitätsgesteuerte Isolierung acht neue, ungewöhnliche Fettsäuren isoliert (**104–111**), die alle durch eine 4-Oxocrotonat-Teilstruktur gekennzeichnet sind. Diese 4-Oxo-2-alkensäuren demonstrierten in einem ersten Biotest hohe fungizide Aktivitäten gegen den phytopathogenen Pilz *Cladosporium cucumerinum* (Teichert *et al.* 2005a; 2005b).



Kürzlich berichteten wiederum Gilardoni *et al.* (2006) von zwei neuen 4-Oxo-2-alkensäuren mit einer zusätzlichen konjugierten Doppelbindung (**112**, **113**) sowie drei oxidierten Derivaten (**114–116**) aus *H. discoxanthus*, einer benachbarten Art zu *H. eburneus*. Während **112** und **113** fungitoxische Aktivitäten gegen *Cladosporium cucumerinum* zeigten, konnten für die an Position 5 hydroxylierten Derivate ohne α/β -Doppelbindung (**114–116**) keine Aktivitäten nachgewiesen werden. Dies erhärtet die Vermutung, dass die 4-Oxocrotonat-Teilstruktur als Pharmakophor für die fungitoxische Wirkung der Fettsäuren verantwortlich ist.



Im Rahmen diverser pharmakologischer Screeningprojekte sind in der Literatur für die Extrakte mehrerer *Hygrophorus*-Arten verschiedene biologische Eigenschaften beschrieben. Eine Übersicht ist in der Tabelle A.4 dargestellt.

5.3 *Hygrophorus eburneus* (Bull.) Fr.



Hygrophorus eburneus (Bull.) Fr.
(<http://www.natur-um-triberg.de>)

Hygrophorus eburneus var. *eburneus* (Bull.) Fr., der Elfenbeinschneckling, ist nach Arnolds eine an *Fagus* spp. gebundene Art (Arnolds 1990). Als weitere Varietät ist *H. eburneus* var. *cossus* (Sowerby) Quél. bekannt, welche synonym auch als *H. eburneus* var. *quercetorum* in der Literatur zu finden, an *Quercus* spp. gebunden und durch einen intensiven Geruch nach der Weidenbohrraupe (*Cossus cossus* L.) gekennzeichnet ist. Charakteristisch ist die Braunfärbung der Herbarbelege dieser Varietät. Im Gegensatz dazu bleiben Herbarbelege von *H. eburneus* var. *eburneus* weiss. *H. eburneus* ist nach Bas *et al.* (1990) aufgrund der hellen Farbe seiner Fruchtkörper bzw. Lamellen der Sektion *Hygrophorus* innerhalb der Gattung zugeteilt (Abb. 5.1.). *Hygrophorus eburneus* var. *eburneus* findet man im Herbst bis Spätherbst in Laub- und Mischwäldern Europas und Nordamerikas. Der Pilz wächst einzeln bis gesellig oder sogar rasig. Sein deutlich schneeweißer Fruchtkörper besitzt wie fast alle Arten der Gattung *Hygrophorus* eine stark schleimige Oberfläche an Hut und Stiel. Der Stiel ist 4–12 cm lang und sein halbkugelig bis kegelförmiger, später abgeflachter Hut besitzt einen Durchmesser von 3–9 cm.

Die chemische Grundlage für die Abwehr von mykophilen Pilzen und Bakterien in dieser Art konnte bereits in vorangegangenen Untersuchungen aufgeklärt werden (Teichert *et al.* 2005a; 2005b). Durch die Etablierung eines auf bioautographischen Methoden beruhenden Biotestsystems zur Bestimmung algitoxischer Aktivität von Naturstoffextrakten innerhalb der vorliegenden Arbeit (Abschnitt 6.2), war es möglich, algitoxische Sekundärmetaboliten in *H. eburneus* zu bestimmen.

5.3.1 Harman (117) und Norharman (118) aus *Hygrophorus eburneus*

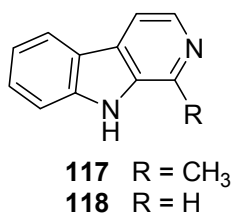
5.3.1.1 Isolierung der Inhaltsstoffe

Der MeOH-Extrakt der tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper wurde mittels eines modifizierten Stas-Otto-Trennungsganges zur Alkaloidanreicherung vorgereinigt. Dazu wurde der lösungsmittelfreie Extrakt zunächst in wässrig-saurer Lösung aufgenommen und anschlie-

ßend mit Dichlormethan extrahiert. Die wässrige Lösung wurde nach der Abtrennung der organische Phase auf pH 10 eingestellt und nachfolgend wiederum mit Dichlormethan extrahiert. In der organischen Phase lagen die Alkaloide nun als freie Basen vor. Aus diesem vorgereinigten Extrakt konnten im weiteren Verlauf mittels präparativer Dünnschichtchromatographie (LM 3) und nachfolgender Reinigung durch HPLC die β -Carbolinalkaloide Harman (**117**) und Norharman (**118**) isoliert werden.

5.3.1.2 Harman (**117**) und Norharman (**118**)

Beide Substanzen wurden als weiße Feststoffe erhalten. In methanolischer Lösung zeigten beide Substanzen eine auffallend blaue Fluoreszenz unter UV_{366 nm}. Die Summenformel C₁₂H₁₀N₂ für **117** und C₁₁H₁₀N₂ für **118** wurden aus dem jeweiligen ESI-FTICR-Massenspektrum abgeleitet. LC-ESI-MS/MS Untersuchungen der jeweiligen Molekülionen im Positivionenmodus ergaben bei beiden Substanzen die zwei Hauptfragmentionen m/z 142 ([M+H-CH₃CN]⁺ bzw. [M+H-HCN]⁺) und m/z 115 ([M+H-CH₃CN-HCN]⁺ bzw. [M+H-2HCN]⁺). Diese Abspaltungen wurden durch hochaufgelöste ESI-



Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung der jeweiligen Molekülionen [M+H]⁺ (HR-ESI-CID-QqTOF-MS) bestätigt. Resultierend aus den Auswertungen der jeweiligen ¹H-NMR-Daten konnte für **117** die Struktur 1-Methyl-9*H*- β -carbolin und für **118** 9*H*- β -Carbolin erhalten werden. Es handelte sich bei beiden Substanzen

um bereits bekannte Naturstoffe. Die NMR- und UV-Daten stimmen mit Literaturangaben überein (Yomosa *et al.* 1987).

5.3.1.3 Algitoxische Aktivitäten von **117** und **118**

Biologische Untersuchungen mittels eines innerhalb der vorliegenden Arbeit aufgebauten Biotestsystems ergaben für beide Alkaloide eine algitoxische Aktivität gegen die Blaualge *Spirulina laxissima* und die Grünalge *Scenedesmus rubescens* (Abschnitt 6.2).

5.3.1.4 Zur biologischen Aktivität und zum Vorkommen von **117** und **118**

Die algitoxischen Eigenschaften von **117** und **118** sind in der Literatur bereits berichtet worden. Volk (2005) beschreibt eine zytotoxische Aktivität von Norharman (**118**) gegen die Mikroalge *Arthrospira laxissima*. Untersuchungen von Kodani *et al.* (2002) ergaben für Harman (**117**) eine Wachstumsinhibierung gegen die Cyanobakterien *Microcystis aeruginosa* und *M. viridis*. Interessanterweise ergaben die Untersuchungen beider Studien keine algitoxischen Wirkungen der Substanzen **117** und **118** gegen Grünalgen. Volk (2005) testete **118** erfolglos gegen *Coelastrum astroideum* (Chlorophyceae) und Kodani *et al.* (2002) erfolglos gegen *Chlorella vulgaris* und *Chlamydomonas tetragama*.

In der vorliegenden Arbeit wurden demgegenüber eindeutige Wachstumsinhibierungen im DC-Plattentest von **117** und **118** gegen die Grünalge *Scenedesmus rubescens* detektiert

(Abschnitt 6.2). Blom *et al.* (2006) berichten über starke algizide Eigenschaften des strukturähnlichen β -Carbolin-Naturstoffes Nostocarbolin (**151**) gegen die Cyanobakterien *Microcystis aeruginosa* ($IC_{50} = 2,1 \mu M$) und *Synechococcus* sp. ($IC_{50} = 5,8 \mu M$) sowie die Grünalge *Kircheriella contorta* ($IC_{50} = 29,1 \mu M$), die wahrscheinlich durch Photosyntheseinhibierungen verursacht werden. Die Autoren diskutieren diese Substanz als Leitstruktur für neue Algizide zur Anwendung als Antifoulingmittel. Einem potentiellen Einsatz von Harman (**117**) und Norharman (**118**) als Algizid gegen Wasserblüte und als Antifouling-Anstrich, stehen allerdings vielfältige andere Aktivitäten entgegen. Bestätigte pharmakologische Effekte sind vor allem die Hemmung der Monoaminoxidase (Glover *et al.* 1982), der Indol-amine-2,3-dioxygenase (Chiarugi *et al.* 2000) und das Herabsetzen der Insulinsekretion von isolierten humanen Langerhans'schen Zellen (Cooper *et al.* 2003) sowie co-mutagene Eigenschaften (Sugimura *et al.* 1982). Harman und Norharman sind weit verbreitete Inhaltsstoffe im Pflanzenreich (Allen & Holmstedt 1980). Sie bilden beispielsweise die Hauptinhaltsstoffe der Medizinalpflanze *Peganum harmala* (Zygophyllaceae), die in der traditionellen ayurvedischen Medizin zur Behandlung von Asthma, Gelbsucht und anderen Beschwerden eingesetzt werden (Dymock *et al.* 1976; Nadikari *et al.* 1976). **117** und **118** wurden aber auch aus Mikroorganismen wie z. B. *Streptomyces* spp., *Mucor* spp., *Cunninghamella* spp., *Nocardia* ssp. und *Pseudomonas* ssp. (Herath *et al.* 2003; Kodani *et al.* 2002; Yomosa *et al.* 1987) sowie *Nodularia harveyana* (Volk *et al.* 2005) und dem Dinoflagellaten *Noctiluca miliaris* (Inoue *et al.* 1980) isoliert. Innerhalb der Höheren Pilze wurde **117** bisher nur in Myzelkulturen der saprophytischen Art *Coriolus maximus* beschrieben (Takeuchi *et al.* 1973), während **118** als Naturstoff zum ersten Mal im Pilzreich detektiert werden konnte. Eine Übersicht zum Vorkommen von β -Carbolinderivaten in Höheren Pilzen findet sich in Abschnitt 4.2.1.8.

5.4 *Hygrophorus hyacinthinus* Quél.

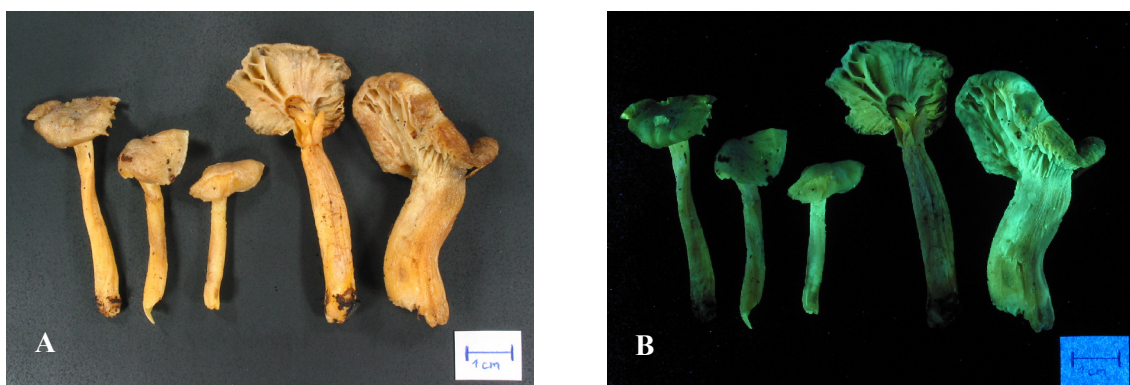


Abb. 5.2. Gefrorene Pilzfruchtkörper von *H. hyacinthinus* (A: bei Tageslicht; B: unter UV_{366 nm}).

Hygrophorus hyacinthinus Quél., der Hyazinth-Schneckling, ist ein Pilz, der auf kalkhaltigen montanen Böden wächst. Seine Mykorrhizapartner sind *Picea* spp. Der selten vorkommende Pilz besitzt einen Geruch nach Hyazinthen-Blüten. Arnolds (1990) ordnet

H. hyacinthinus aufgrund seiner gräulichen und schleimigen Hutoberfläche in die Sektion Olivaceoumbriini ein. Der Stiel seines Fruchtkörpers ist faserig-flaumig (Gröger 2006). Auffällig ist die deutlich grüne Fluoreszenz gefrorener Fruchtkörper unter UV_{366 nm}.

Ziel dieser Untersuchungen war die Auklärung der chemischen Ursache dieser Fluoreszenz.

5.4.1 Der Fluoreszenzfarbstoff aus *Hygrophorus hyacinthinus*

5.4.1.1 Isolierung des Inhaltsstoffes

In Vorversuchen wurde MeOH als geeignetes Extraktionsmittel für den fluoreszierenden Inhaltsstoff ermittelt. Der stark fluoreszierende MeOH-Rohextrakt von *H. hyacinthinus* wurde im weiteren Verlauf mittels Säulenchromatographie an Diaion HP-20 sowie Sephadex LH20 aufgetrennt. Ein abschließender Reinigungsschritt an RP-18 mittels HPLC (Säule 1, Gradient 1) ergab den Fluoreszenzfarbstoff, welcher in methanolischer Lösung bei einer Anregungswellenlänge von 378 nm ein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 498 nm hat.

Die Summenformel C₁₃H₁₂N₂O₃ m/z 245.0919 ([M+H]⁺) wurde durch ESI-FTICR-MS ermittelt. LC-MS/MS Messungen des Moleküliions m/z 245 zeigten die Abspaltung von 46 amu (m/z 199 ([M+H-H₂CO₂]⁺) sowie die Hauptfragmente m/z 171 ([M+H-H₂CO₂-CO]⁺) und m/z 131. Durch weitere spektroskopische Untersuchungen stellte sich heraus, dass dieser Naturstoff identisch mit Brunnein A (27) ist, welcher im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch aus *Cortinarius brunneus* isoliert wurde (Abb. 5.3.; Abschnitt 4.2.1).

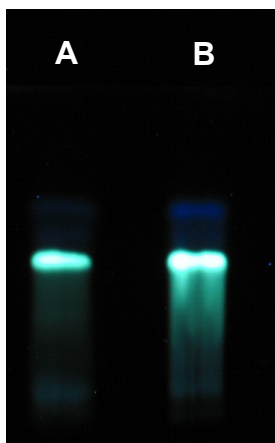


Abb. 5.3. DC-Vergleich des Fluoreszenzfarbstoffes 27 in *H. hyacinthinus* (A) und *C. brunneus* (B) unter UV_{366 nm} (LM 1).

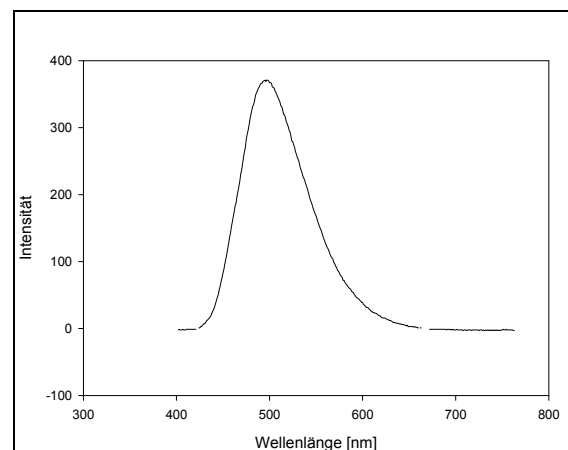


Abb. 5.4. Fluoreszenzemissionsspektrum von 27 in MeOH ($\lambda_{\text{exc}} = 378$ nm).

5.5 Chemotaxonomische Relevanz der β -Carbolinalkaloide Brunnein A (27), Harman (117) und Norharman (118) innerhalb *Hygrophorus*

5.5.1 LC-ESI/SRM Screening

Mittels LC-ESI/SRM (Selected Reaction Monitoring) wurden die Methanolextrakte verschiedener *Hygrophorus*-Arten auf das Vorkommen der β -Carbolinderivate **27**, **117** und **118** analysiert (Tab. 5.1. und Abb. 5.6.). Damit wurde untersucht, ob sich **117** und **118** als Unterscheidungsmerkmal von *H. eburneus* var. *eburneus* zu *H. eburneus* var. *coscus* eignen könnten. Die Differenzierung beider makroskopisch sehr ähnlichen Arten stellt immer noch eine Herausforderung für Mykologen dar. Des Weiteren war von Interesse, ob der Fluoreszenzfarbstoff **27** einzig in der seltenen Art *H. hyacinthinus* innerhalb der Gattung *Hygrophorus* vorliegt.

Hierfür wurde das Vorkommen der drei β -Carbolinalkaloide **27**, **117** und **118** innerhalb der Gattung *Hygrophorus* in 28 Arten und somit die chemotaxonomische Relevanz der Substanzen als infragenerische Marker mittels LC-ESI/SRM untersucht.

Aufgrund dieser speziellen MS/MS-Methode können durch die Beobachtung ausgewählter Fragmentierungsschritte sowie der LC-Retentionszeiten geringste Mengen einer Substanz innerhalb eines Gemisches detektiert werden. Weiterhin lässt diese Methode auch quantitative Analysen durch den Vergleich der jeweiligen Kurvenfläche im LC-ESI/SRM Ionenchromatogramm mit denen externer Standards zu.

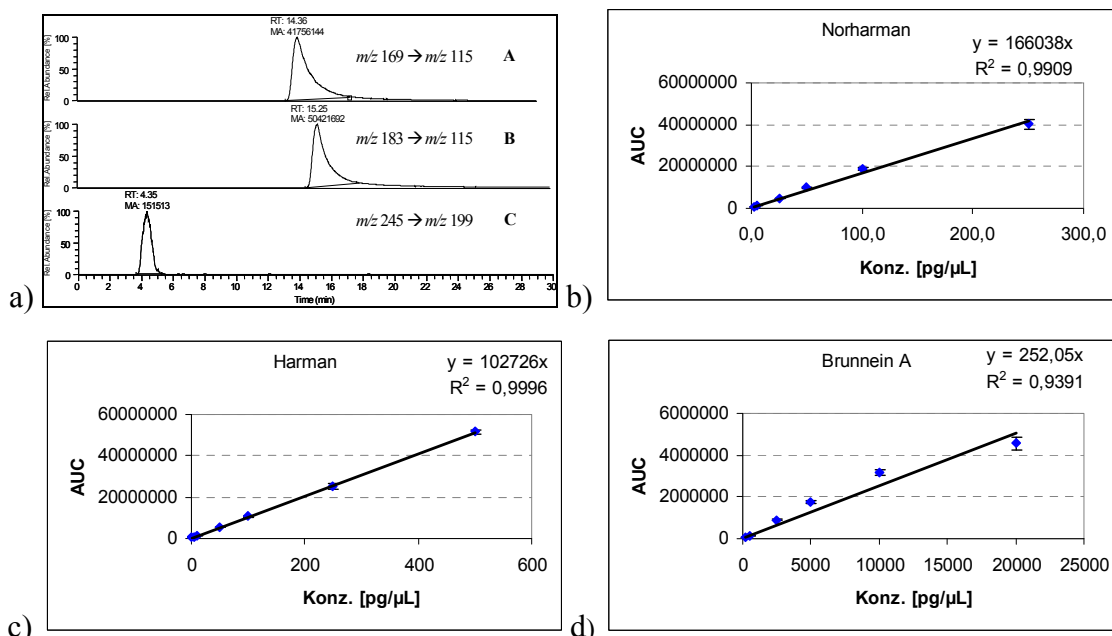


Abb. 5.5. a) LC-ESI/SRM Ionenchromatogramme von **27** (C), **117** (B) und **118** (A) bei einer eingespritzten Substanzmenge von jeweils 500 pg/ μ l. Angegeben sind jeweils die Retentionszeiten und die Peak-flächen. b), c), d) Kalibriergeraden und Regressionsgleichungen von **27**, **117** und **118** ermittelt aus den Peakflächen bei verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Chromatogrammes durch LC-ESI/SRM.

Für das LC-ESI/SRM-Screening wurden die Fragmentierungsreaktionen der Molekülonen $[M+H]^+$ bei Harman (**117**) und Norharman (**118**) zum Hauptfragmentation m/z 115 (Toribio *et al.* 2002) und bei Brunnein A (**27**) zum Hauptfragmentation m/z 199 $[M+H-COOH]^+$ verwendet. Zur quantitativen Analyse wurden zunächst LC-ESI/SRM Spektren der Reinsubstanzen in verschiedenen Verdünnungen aufgenommen. Anschließend wurde aus den erhaltenen Peakflächen im jeweiligen Chromatogramm in Abhängigkeit von der Konzentration der eingespritzten Substanz eine Regressionsgleichung ermittelt (Abb. 5.5.). Mittels der Regressionsgleichungen war es möglich, eine quantitative Auswertung der drei Substanzen im jeweiligen Methanolextrakt einer *Hygrophorus*-Art durchzuführen. Darauf folgend wurden jeweils 28 Methanolextrakte, welche nach definiertem Extraktionsschema gewonnen wurden, mit der MS/MS-Methode untersucht. Abb. 5.6. verdeutlicht beispielhaft das Vorkommen von **27**, **117** und **118** im MeOH-Extrakt von *H. latitabundus*.

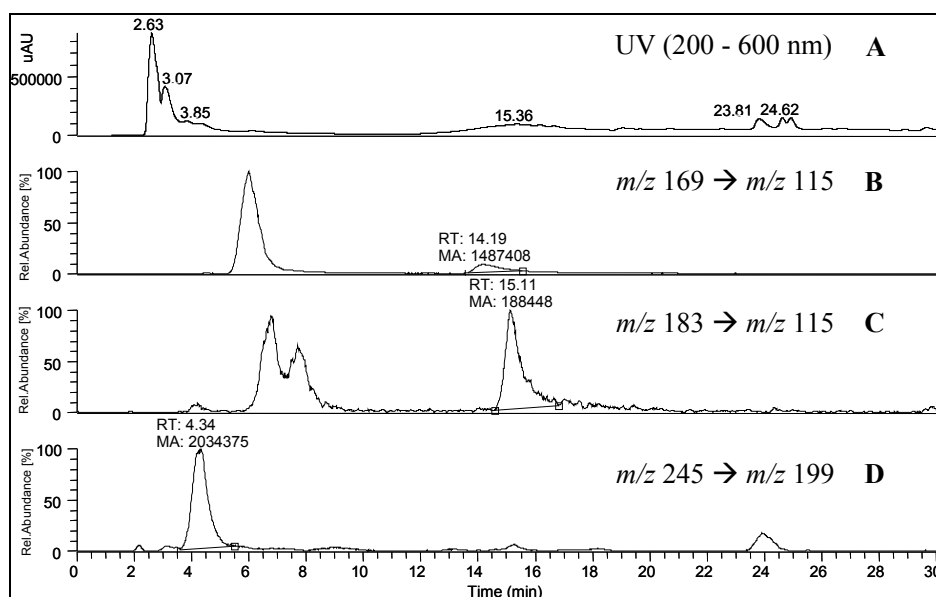


Abb. 5.6. Nachweis der β -Carbolinalkaloide im MeOH-Extrakt von *H. latitabundus* mittels Positivionen LC-ESI/SRM. [(A) Total Scan PDA; (B) Norharman (**118**); (C) Harman (**117**); (D) Brunnein A (**27**)] (RT = Retentionszeiten; MA = Peakfläche)

Die Ergebnisse der Studie zeigten, dass Vorkommen und Gehalt von Brunnein A (**27**), Harman (**117**) und Norharman (**118**) innerhalb der Gattung *Hygrophorus* variieren (Tab. 5.1.). Harman (**117**) und Norharman (**118**) kommen ubiquitär innerhalb *Hygrophorus* vor. Sie können daher nicht als Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden *H. eburneus* Varietäten fungieren. Brunnein A (**27**) allerdings konnte ausschließlich in den Arten *H. agathosmus*, *H. fuscoalbus*, *H. hyacinthinus*, *H. korhonenii*, *H. latitabundus*, *H. marzuolus*, *H. olivaceoalbus*, *H. persoonii* und *H. pustulatus* detektiert werden. Interessanterweise bilden diese Arten die Sektion Olivaceoumbrini innerhalb der Gattung *Hygrophorus* (Arnolds 1990; Bas 1990). Somit könnte Brunnein A (**27**) als spezifischer chemotaxonomischer Marker für die Sektion Olivaceoumbrini innerhalb der Gattung *Hygrophorus* interpretiert werden.

Tab. 5.1. Vorkommen der β -Carbolinalkaloide Brunnein A (27), Harman (117) und Norharman (118).

| Sektion | Pilzart | Harman [pg/ μ l] | Norharman [pg/ μ l] | Brunnein A [pg/ μ l] |
|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Hygrophorus | <i>H. chrysodon</i> | 0.94 | 15.84 | n.d. |
| | <i>H. penarius</i> | 5.63 | 8.50 | n.d. |
| | <i>H. chrysoaspis</i> | 4.85 | 3.06 | n.d. |
| | <i>H. cossus</i> | 1.25 | 6.98 | n.d. |
| | <i>H. discoxanthus</i> | 1.62 | 0.82 | n.d. |
| | <i>H. eburneus</i> | 8.62 | 95.62 | n.d. |
| | <i>H. gliocyclus</i> | 0.86 | 0.91 | n.d. |
| | <i>H. hedrychii</i> | 0.65 | 3.82 | n.d. |
| Pudorini | <i>H. erubescens</i> | 1.42 | 1.85 | n.d. |
| | <i>H. nemoreus</i> | 1.22 | 0.89 | n.d. |
| | <i>H. poetarum</i> | 0.83 | 4.13 | n.d. |
| | <i>H. pudorinus</i> | 0.85 | 0.54 | n.d. |
| | <i>H. russula</i> | 0.64 | 0.48 | n.d. |
| Discoidei | <i>H. carpini</i> | 2.71 | 5.81 | n.d. |
| | <i>H. discoideus</i> | 2.31 | 31.04 | n.d. |
| | <i>H. hypothejus</i> | 1.68 | 13.16 | n.d. |
| | <i>H. lindtneri</i> | 4.89 | 1.93 | n.d. |
| | <i>H. lucorum</i> | 1.92 | 2.61 | n.d. |
| | <i>H. unicolor</i> | 0.79 | 0.98 | n.d. |
| Olivaceoumbriini | <i>H. agathosmus</i> | 0.30 | 1.04 | 15.03 |
| | <i>H. fuscoalbus</i> | 0.23 | 0.60 | 1.12 |
| | <i>H. hyacinthinus</i> | 5.47 | 3.44 | 10.25 |
| | <i>H. korhoneenii</i> | n.d. | n.d. | 43.54 |
| | <i>H. latitabundus</i> | 1.83 | 8.96 | 8.07 |
| | <i>H. marzuolus</i> | 2.43 | 2.56 | 0.38 |
| | <i>H. olivaceoalbus</i> | 0.42 | 3.81 | 7.79 |
| | <i>H. persoonii</i> | 0.07 | 0.07 | 0.59 |
| | <i>H. pustulatus</i> | 3.91 | 2.39 | 6.60 |

n.d. = nicht detektiert

5.5.2 Beispiel chemotaxonomischer Markermetaboliten in Höheren Pilzen

Sekundärmetaboliten mit chemotaxonomischer Relevanz sind in Höheren Pilzen bereits beschrieben (Abschnitt 4.1). Weitere Beispiele sind die für die Ordnung Boletales (Röhrlinge) charakteristischen Pulvinsäurederivate (Gill & Steglich 1987; Besl & Bresinsky 1997). Wird der Schwamm der Fruchtkörper gedrückt oder verletzt, tritt eine rasche Blaufärbung an dieser Stelle ein. Verantwortlich hierfür sind die Hydroxypulvinsäuren Xero-comsäure (119) bzw. Variegatsäure (120), welche enzymatisch zu den entsprechenden Chinonmethidanionen (121) oxidiert werden (Abb. 5.7.).

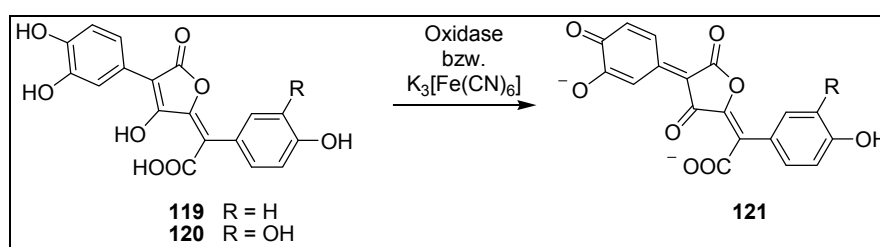


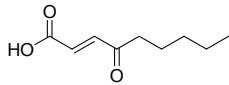
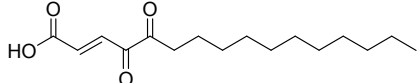
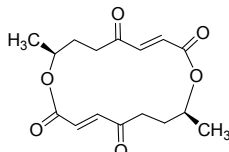
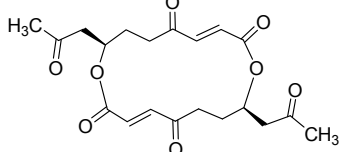
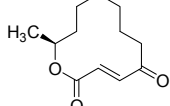
Abb. 5.6. Chemischer Hintergrund für die Blaufärbung der Fruchtkörper der Röhrlinge nach Druck oder Verletzung: Oxidation von **119** bzw. **120** zum entsprechenden Chinonmethidanion (**121**).

5.6 4-Oxo-2-alkensäuren aus *Hygrophorus eburneus*

Wie bereits erwähnt, gelang es im Rahmen der Diplomarbeit (Teichert 2004) mittels bioaktivitätsgesteuerter Isolierung der 4-Oxo-2-alkensäuren (104–111), das fungitoxische Prinzip des Ethylacetatextraktes von *H. eburneus* gegen den phytopathogenen Pilz *Cladosporium cucumerinum* zu klären.

Bioaktive Naturstoffe mit einer 4-Oxocrotonat-Teilstruktur sind mehrfach in der Literatur beschrieben worden. Tabelle 5.2. gibt einen Überblick zum Vorkommen von 4-Oxo-2-alkensäuren und abgeleiteten Derivaten. Es scheint, dass die 4-Oxocrotonat-Teilstruktur für die antimikrobiellen Eigenschaften dieser Naturstoffe verantwortlich ist und somit ein simples, aber hochaktives Pharmakophor zur Parasitenabwehr für ihre Produzenten darstellt. Ziel der weiterführenden Arbeiten war die Durchführung ausgedehnter Bioaktivitätsuntersuchungen der 4-Oxo-2-alkensäuren, um zunächst deren Bedeutung für den Pilz im ökologischen Kontext näher zu beschreiben. Hierbei stellte sich die Frage, ob die vom Pilz produzierten Fettsäuren möglicherweise als chemische Abwehr gegen ein breites Spektrum von Erregern agieren, um die Fruchtkörper, den Trägern der Sporen und damit der Fortpflanzungseinheiten, zu schützen und somit die Vermehrung des Pilzes zu sichern.

Tab. 5.2. Vorkommen von Fettsäuren und davon abgeleiteter Derivate mit einer 4-Oxocrotonat-Teilstruktur in der Natur.

| Naturstoff | Organismus | Bioaktivität | Literatur |
|---|---------------------------------|---|--|
|  (E)-4-Oxonon-2-ensäure (122) | <i>Streptomyces olivaceus</i> | antibakteriell | Pfefferle <i>et al.</i> 1996 |
|  Podoscyphasäure (123) | <i>Podoscypha petalodes</i> | AMV- und MmuLV-RT Inhibitor; antileishmanial antitrypanosomal | Erkel <i>et al.</i> 1991 Inchausti <i>et al.</i> 1997 |
|  Pyrenophorin (124) | <i>Pyrenophora avenae</i> | fungitoxisch; zytotoxisch | Nozoe <i>et al.</i> 1965 |
|  Vermiculin (125) | <i>Penicillium vermiculatum</i> | antibakteriell; antiprotozoisch | Fuska <i>et al.</i> 1972 |
|  Patulolid A (126) | <i>Penicillium urticae</i> | antibakteriell | Sekiguchi <i>et al.</i> 1985 |

5.6.1 Darstellung von (*E*)-4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**)

Da für weiterführende Bioaktivitätsuntersuchungen eine zu geringe Menge an isolierten Substanzen zur Verfügung stand, wurde sich zur Synthese der exemplarisch ausgewählten 4-Oxo-2-alkensäure **104** entschieden.

Im Rahmen einer zurzeit aktuellen Dissertationsarbeit (T. Dräger, Dissertation in Vorbereitung) wurde **104** ausgehend von Furan und Dodekanbromid dargestellt (Abb. 5.7.). Da einige biologische Untersuchungen ausschließlich wässrige Lösungen der Testsubstanz verlangten, wurde dafür **104** mittels NaOH in sein wasserlösliches Natriumsalz (**104a**) überführt.

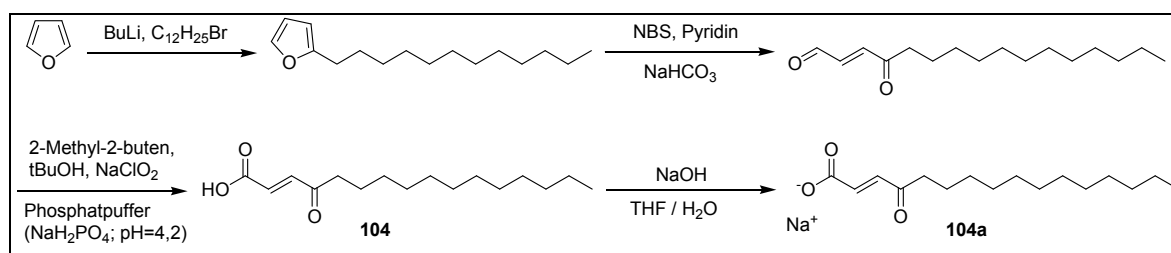


Abb. 5.7. Syntheseroute zur Darstellung von (*E*)-4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**).

5.6.2 Biologische Aktivitäten der 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**)

In verschiedenen *in vitro* Biotests konnten ausgeprägte fungizide, antibakterielle und antioomycetische Eigenschaften dieser Substanzklasse ermittelt werden. Ein Hauptaugenmerk wurde dabei auf die hohe Aktivität gegen den Phytopathogen *Phytophthora infestans* gelegt. Dabei konnte letztendlich in einem *in vivo* Pflanzensprühtest die Aktivität bestätigt sowie eine Verträglichkeit der Pflanzen gegen die Substanz **104a** gezeigt werden (Abschnitt 6.6). Die Ergebnisse weisen auf ein hohes Potential der Abwehrstoffe aus *Hygrophorus eburneus* für die Entwicklung einer Leitstruktur für Pflanzenschutzmittel hin.

5.6.3 Biosynthetischer Zusammenhang zwischen 4-Oxo-2-alkensäuren und Hygrophoronen

Die Cyclopentenonderivate Hygrophorone A–G (**82–101**) und die 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**) aus *Hygrophorus* lassen aufgrund ihrer Strukturen einen biosynthetischen Zusammenhang beider Substanzklassen vermuten. So könnten die 4-Oxo-2-alkensäuren biosynthetische Precursor für alle Hygrophorone, speziell für die Hygrophorone F¹² und G¹² darstellen. Eine mögliche Biosynthese von Hygrophoron G¹² (**101**) wäre über eine intramolekulare Kondensation zum Butyrolacton (**127**) nach erfolgter *E/Z*-Isomerisierung der Crotonatdoppelbindung von 4-Oxo-octadec-2-ensäure (**106**) denkbar (Abb. 5.8.).

Nach der Isolierung der 6-Hydroxy-4-oxo-hexadecansäure (**116**) aus *H. discoxanthus* von Gilardoni *et al.* (2007), schlagen die Autoren einen alternativen Biosyntheseweg, der

zu den Hygrophoronen und den ebenfalls in *Hygrophorus* vorkommenden Chrysotrionen A (**102**) und B (**103**) führt, vor. Ausgehend von **116**, welches bereits an C-6 hydroxyliert vorliegt, kann nach Einführung der Crotonatdoppelbindung und Ringkondensation wiederum ein Butyrolacton (**128**) gebildet werden. Letztendlich wäre eine Umwandlung des Butyrolactons zum entsprechenden Acylcyclopentenondion Chrysotriion B (**103**) denkbar (Abb. 5.8.). *In vitro* Transformationen von Buten-4-ylidenoliden zu den entsprechenden Cyclopentenonen sind in der Literatur bereits beschrieben, wenn auch unter stark basischen Bedingungen (Clema *et al.* 1981; Lee *et al.* 1985).

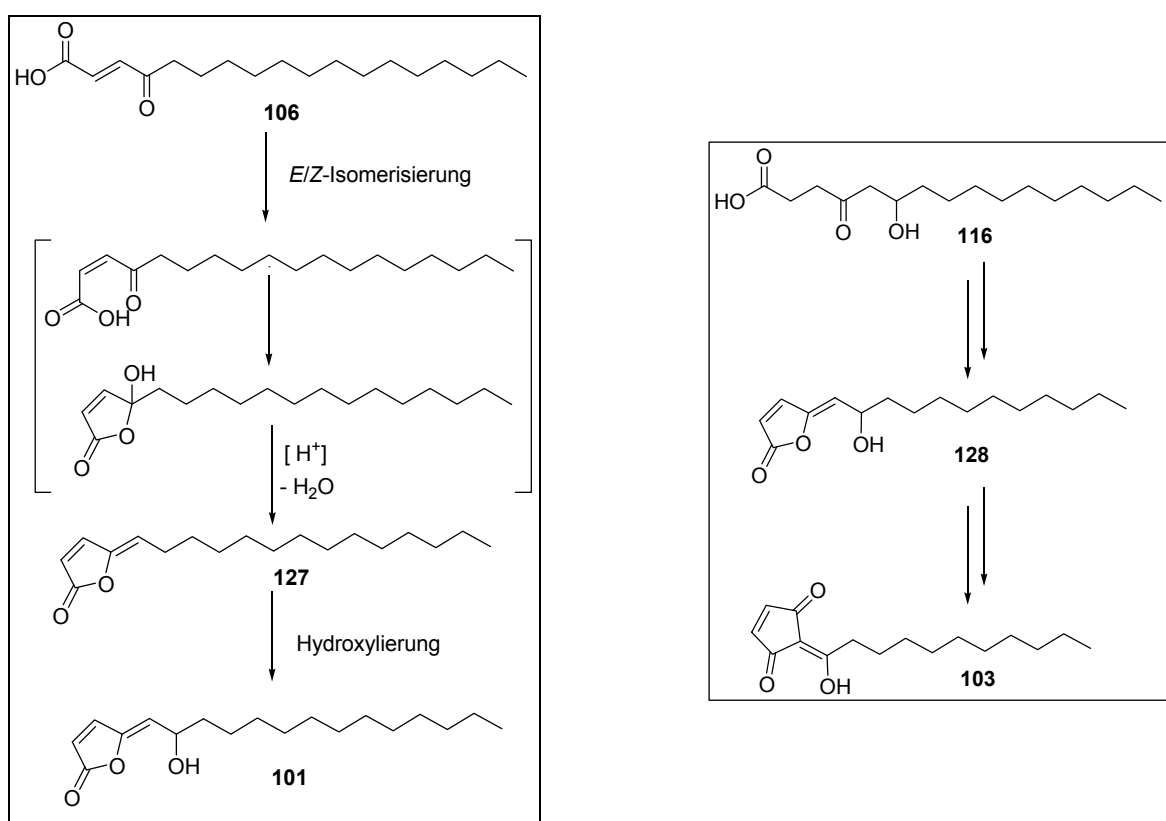


Abb. 5.8. Links: postulierte Biosynthese von Hygrophoron G¹² (**101**) nach Teichert (2004). Rechts: postulierte Biosynthese von Chrysotriion B (**103**) nach Gilardoni *et al.* (2007).

Um die Biosynthesehypothesen zu bestätigen bzw. einen biosynthetischen Zusammenhang zwischen 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**), Hygrophoronen (**82–101**) und Chrysotrionen (**102**, **103**) zu verifizieren, wurden Verimpfungsexperimente mit markierter 4-Oxo-hexadec-2-ensäure durchgeführt. In Zusammenarbeit mit T. Dräger (Dissertation in Vorbereitung) wurde hierfür ein perfluoriertes 4-Oxohexadec-2-ensäurederivat (**129**) synthetisiert, welches dann in einem Verimpfungsexperiment an Fruchtkörpern von *H. latitabundus* verwendet wurde.

Es konnte kein spezifischer Einbau in Hygrophorone mit massenspektrometrischen Methoden detektiert werden. Allerdings wurden mittels ESI-FTICR-MS neben der verimpften Substanz (**129**) [m/z 359.0329 ($[M-H]^-$, berechn. C₁₁H₈F₉O₃⁻, 359.0335)] zwei weitere fluorhaltige Verbindungen entdeckt. Eine Verbindung (**130**) besitzt zwei zusätzliche Wasser-

stoffe [m/z 361.0490 ($[M-H]^-$, berechn. $C_{11}H_{10}F_9O_3^-$, 361.0492)] während eine weitere (**131**) sich um 18 amu von **129** unterscheidet [m/z 377.0441 ($[M-H]^-$, berechn. $C_{11}H_{10}F_9O_4^-$, 377.0441)]. Außer den dominierenden HF-Abspaltungen waren keine weiteren Informationen zur Molekülstruktur aus dem jeweiligen CID-Massenspektrum erhältlich. Durch die Kenntnis der Summenformeln beider Verbindungen, lässt sich nur spekulieren, dass bei beiden Substanzen die 2,3-Doppelbindung eventuell enzymatisch reduziert vorlag und **131b** durch eine zusätzliche Hydroxylierung gebildet wurde. Eine zweite Variante wäre die Metabolisierung von **129** über eine Wasseranlagerung an C-2 oder C-3 zu **131a**. Vermutlich spricht das Vorkommen von **114–116** in *Hygrophorus* eher für die erste Metabolisierungsvariante von **129**. Diese Ergebnisse besagen daher nichts über den möglichen Zusammenhang von 4-Oxo-2-alkensäuren und Hygrophoronen.

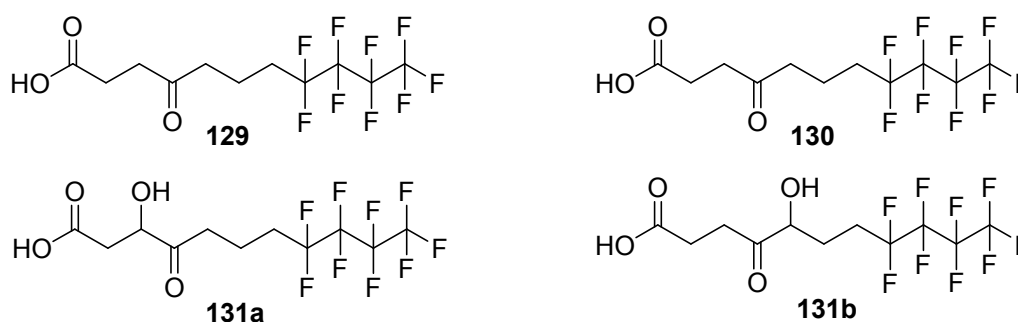


Abb.5.9. Verimpfte 1,1,1,2,2,3,3,3,4,4-Nonafluor-4-oxoundec-2-ensäure (**129**) und Strukturvorschläge der detektierten Metabolisierungsprodukte **130**, **131a** und **131b**.

5.6.4 Vergleich der 4-Oxo-2-alkensäuren und Cyclopentenone aus *Hygrophorus* spp. mit Oxylipinen

Hygrophorone und 4-Oxo-2-alkensäuren ähneln in ihren Strukturen aber auch in ihren biologischen Aktivitäten den Oxylipinen, welche zu einem hormonellen Abwehrsystem in Pflanzen gehören.

Die Oxylipine entstehen biosynthetisch hauptsächlich durch Lipoxygenasen (LOX) aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) innerhalb des Biosyntheseweges der Jasmonate, welche wichtige pflanzliche Signalstoffe sind (Feussner & Wasternack 2002, Rosahl & Feussner 2004). Ihre starken antimikrobiellen Aktivitäten, die Stimulierung der Genexpression pflanzlicher Verteidigung sowie die Regulierung des programmierten Zelltodes führten zur Etablierung einer Beteiligung des sogenannten Oxylipin-Biosyntheseweges an der Pflanzenverteidigung gegen Krankheitserreger und Schädlinge (Blée 2002). Für das den Hygrophoronen strukturähnliche Oxylipin 12-Oxophytodiensäure (**132**, 12-OPDA) konnten hohe fungitoxische und antioomycetische Aktivitäten detektiert werden, welche höchstwahrscheinlich durch eine nicht spezifische Wachstumshemmung aufgrund der reaktiven α/β -ungesättigten Carbonylgruppe im Molekül hervorgerufen werden (Prost *et al.* 2005). Jasmonate wurden bereits in Pilzen nachgewiesen. Ihre physiologische Funktion im Pilzorganismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt. Vermutlich spielen sie eine allelopathische Rolle in der Pilz-Pflanze-Interaktion (Miersch *et al.* 1993).

Es scheint, als ob die aus *Hygrophorus* spp. isolierten Hygrophorone und 4-Oxo-2-alkensäuren zu einem Abwehrsystem des Pilzes gehören, wie es im Pflanzenreich gefunden wurde. Ihre starken antimikrobiellen Eigenschaften korrelieren mit den Beobachtungen eines sehr geringen parasitären Befalls der Pilzfruchtkörper in der Natur. Der jeweilige Fruchtkörper schützt so während des Wachstums die Reifung der Basidiosporen an den Basidien und sichert damit seine Verbreitung. Diese universelle chemische Verteidigung wird durch die Einführung einer reaktiven α/β -ungesättigten Carbonylgruppe zu 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**) und Hygrophoronen (**82–101**) erreicht. *Hygrophorus* spp. produzieren somit biosynthetisch relativ einfache Moleküle mit einer sehr reaktiven Gruppe, welche den jeweiligen Pilz vor Parasitenbefall schützt.

Die 4-Oxo-2-alkensäuren und Hygrophorone sind ein Beispiel für die Vielseitigkeit und Genialität von Organismen, die im Laufe der Evolution rationelle Verteidigungsstrategien in Form der Produktion aktiver Metaboliten entwickelt haben. Ob die 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**) oder Hygrophorone (**82–101**) ein Anwendungspotential als Leitstrukturen für Antibiotika oder Fungizide besitzen, kann erst nach Kenntnis der toxikologischen Eigenschaften festgelegt werden. Eine in diesem Zusammenhang zu beantwortende Frage ist auch, wie sich der Produzent selbst vor dem Toxin schützt. Hierbei können Resistenzmechanismen am Wirkort eine Rolle spielen, die parallel im Laufe der Evolution beim Produzenten entstehen. Eine Kenntnis von Wirkort und Mechanismus ist daher sowohl für das Verständnis der ökologischen Bedeutung als auch für eine rationale Entwicklung in der Anwendung wünschenswert.

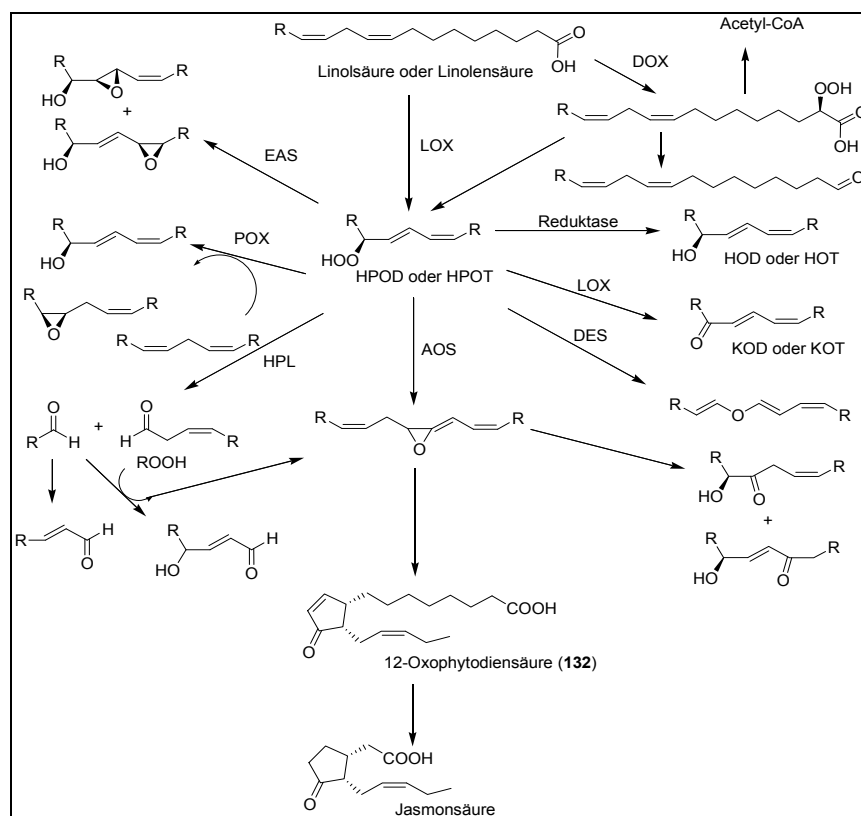


Abb. 5.10. Biosynthese der Oxylipine im LOX-Pathway nach Rosahl & Feussner (2004).

5.7 Zum Vorkommen von Eisen in *Hygrophorus discoxanthus*

Extrahiert man tiefgefrorene Fruchtkörper von *Hygrophorus discoxanthus* Rea, dem Verfärbenden Schneckling, vorsichtig mit Aceton, färbt sich die acetonische Lösung nach ca. 30 min blaugrün. Dabei ist zu beobachten, dass die Blaugrünfärbung sich in den nachfolgenden Minuten verstärkt und nach ca. 24 h nach dunkelbraun umschlägt (Abb. 5.11.). Der nach chromatographischer Reinigung angereicherte grüne Farbstoff, lieferte aufgrund hoher Linienbreite der Signale keine aussagekräftigen NMR-Spektren. Der Verdacht des Vorkommens eines paramagnetischen Ions wie Fe^{3+} wurde durch eine positive Rhodanidprobe bestätigt. Eine daraufhin durchgeführte quantitative Bestimmung mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ergab einen Eisengehalt von 94,4 mg/g Trockengewicht der gereinigten, in wässrig-methanolischer Lösung grünen Fraktion, während für den Rohextrakt ein Eisengehalt von 0,16 mg/g Trockengewicht bestimmt wurde. Da der Verdacht eines Eisenkomplexes bestand, wurde versucht, die Eisenionen des Komplexes mittels Zugabe einer KSCN -Lösung (1 mg/ml) bzw. eines Kationentauschers (MTO-Amberlite IRC-748) zu entfernen, um eventuell vorhandene Liganden bestimmen zu können. Allerdings wurden keine zufrieden stellenden Ergebnisse (MS; $^1\text{H-NMR}$) hinsichtlich des Vorkommens eines Liganden erzielt. Aufgrund fehlenden Pilzmaterials konnte keine Nachisolierung erfolgen.

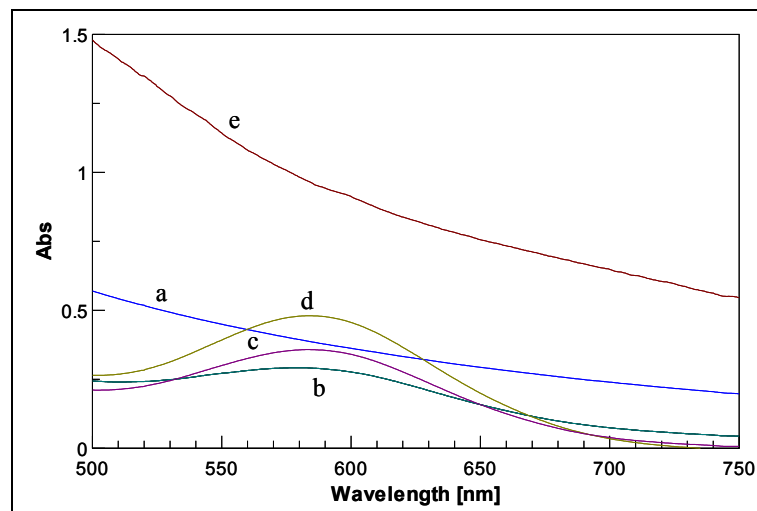


Abb. 5.11. Zeitliche Veränderung des UV/vis-Spektrums während der Extraktion von tiefgefrorenen *H. discoxanthus* Fruchtkörpern mit Aceton. [a: t = 15 min; b: t = 30 min ($\lambda_{\text{max}} \approx 585$ nm); c: t = 60 min ($\lambda_{\text{max}} \approx 585$ nm); d: t = 120 min ($\lambda_{\text{max}} \approx 585$ nm); e: t = 24 h]

In Basidiomyceten wurden bereits verschiedene Durchschnittseisengehalte beschrieben (Lupper 1988; Tyler 1980; 1982). Einen besonders hohen Gehalt an Eisen hat der Wasserextrakt von *Cortinarius violaceus* (18,9 mg/g Trockengewicht; Nussbaum 1998). Aus diesem Extrakt gelang Nussbaum *et al.* (1998) die Isolierung des Eisen-(R)- β -Dopa-(1:2)-Komplexes Cortiferrin, der für die unverwechselbare blaue Farbe der Fruchtkörper von *Cortinarius violaceus* verantwortlich ist.

6 Biologische Aktivitäten von Reinsubstanzen und Extrakten

6.1 Screening von Naturstoffen – von der natürlichen Quelle zum Wirkstoff

Um neue Wirkstoffe in natürlichen Quellen entdecken zu können, ist es häufig notwendig und sinnvoll, Extrakte auf das Vorkommen solcher Stoffe im Vorfeld der Isolierungsarbeiten zu screenen und ihre biologischen Aktivitäten festzustellen. Dabei können zur Vermeidung einer Isolierung bereits bekannter Substanzen so genannte Dereplikationsstrategien zum Einsatz gebracht werden. Durch intensive LC-Online-Messungen (LC/UV; LC/MSⁿ; LC/NMR) können für einzelne Substanzen in einem Extrakt oder einer Fraktion charakteristische Strukturdaten ermittelt, mit Datenbankeinträgen verglichen, und so bekannte Substanzen bereits im Gemisch schnell detektiert werden (Bitzer *et al.* 2007).

Ist eine neue aktive Substanz im Extrakt erkannt, wird sich im allgemeinen ihre Isolierung durch bioaktivitätsgesteuerte Fraktionierungen anschließen, um mit einer ausreichenden Menge Reinsubstanz weitere biologische und toxikologische Biotests durchzuführen und ihr Aktivitätsprofil zu erkennen (Abb. 6.1.).

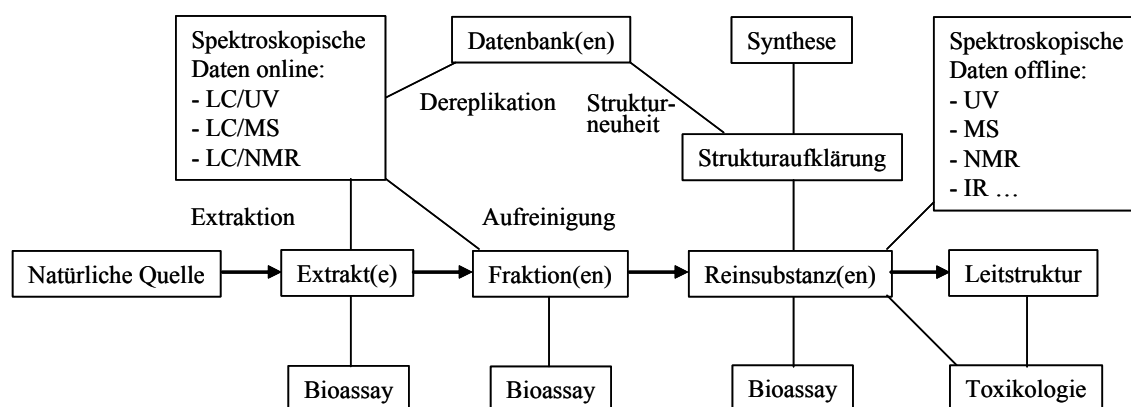


Abb. 6.1. Allgemeines Schema einer bioaktivitätsgesteuerten Isolierung [verändert nach Hostettmann & Marston (2007)].

Um den Faktor „Zeit“ zu minimieren, müssen während des Isolierungsvorganges schnelle und sichere biologische als auch chemische Daten generiert werden. Sogenannte „Benchtop-Assays“ sind hierbei für die weitere nun bioaktivitätsgesteuerte Fraktionierung und Isolierung der für diese Aktivität verantwortlichen Inhaltsstoffe von großem Nutzen. Derartige Assays zeichnen sich durch eine äußerst einfache Handhabung, Reproduzierbarkeit, Robustheit, geringen Zeitaufwand und geringe Kosten aus. Sie können typischerweise mit Niederen Organismen, Invertebraten und isolierten subzellularen Systemen durchgeführt werden (Hostettmann & Terreaux 2000).

Beispiele solcher Screeningsysteme, die Informationen über bestimmte Bioaktivitäten separierter Substanzen aus einer Matrix, z. B. eines Rohextraktes aufzeigen können, basieren vor allem auf bioautographischen Methoden. Diese wurden erstmals von Goodall &

Levi (1946) zur Penicillinreinheitsprüfung beschrieben. Zur Aktivitätsbestimmung gegen bestimmte Mikroorganismen wird zwischen Kontakt-, Immersions- und Direktbioautographie unterschieden. Die Direktbioautographie kombiniert die Dünnschichtchromatographie mit dem Biotest *in situ*. Diese Methode erlaubt die Charakterisierung der aktiven Substanzen aus einer komplexen Mischung anhand ihrer R_f -Werte und eventueller Farbreaktionen mit entsprechenden Sprühreagenzien.

Die Detektion der Bioaktivitäten von Extrakten oder Fraktionen durch diese einfachen „Benchtop-Assays“ ist von hohem Nutzen für den wirkorientierten Isolierungsweg von der natürlichen Quelle bis zur neuen Leitstruktur (Abb. 6.1.). Natürlich müssen den ersten Bioaktivitätsdaten aus solchen Tests weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen folgen, welche dann exakte EC_{50} -Bestimmungen erlauben.

6.2 Aufbau und Etablierung eines Bioassays auf algitoxische Wirkung

6.2.1 Notwendigkeit neuer Algizide

Die unspezifische Adsorption von Bakterien, Cyanobakterien und Algen an Unterwasserflächen (Fouling) ist ein großes Problem in Salz- und Süßgewässern. So genanntes Biofouling zum Beispiel kann an Schiffsrümpfen, Ölplattformen und Pipelines zu drastischen Schäden führen, verbunden mit hohen finanziellen Konsequenzen (Champ 2000; Fusetani 2004). Aufgrund der weltweiten Abwendung von Organozinn-haltigen Antifoulinganstrichen und einer steigenden Resistenz der Wassermikroorganismen gegenüber herkömmlichen Algiziden gibt es einen dringenden Bedarf an neuen Antifoulingmitteln. Naturstoffe haben das Potential, aufgrund ihres biogenetischen Ursprungs zur Entwicklung von Leitstrukturen für leichter zu vermarktende umweltfreundliche Schiffsanstriche und Algizide zu führen (Gross 2003; Bhadury & Wright 2004). Um solche Substanzen identifizieren zu können, sind einfache und kostengünstige Tests zum Screening von Rohextrakten diverser natürlicher Quellen zur schnellen Präselektion und weiteren Aufarbeitung unerlässlich.

Auf den Grundlagen des Biotests nach Gottstein *et al.* (1982) zur Initialtestung auf fungitoxische Eigenschaften, sollte ein direktbioautographischer Aktivitätstest aufgebaut werden, welcher algitoxische Bestimmungen von Extrakten und Reinsubstanzen schnell erkennen lässt.

6.2.2 Etablierung und Durchführung des Biotests

Für den Biotest wurden der prokaryontische Organismus *Spirulina laxissima* (Cyanobacteria) und der Eukaryont *Scenedesmus rubescens* (Chlorophyta) als Testorganismen ausgewählt. *Sc. rubescens* ist einfach zu kultivieren und *Sp. laxissima* ist in der Literatur bereits als Testorganismus für Agarplattendiffusions- und für einen bioautographischen Assay beschrieben (Volk 1996; 2005).

Entscheidend für das Gelingen eines bioautographischen Assays mit Algen als Testorganismen ist das homogene Wachstum der Algen. Dazu ist es erforderlich, eine möglichst

hohe „Algendichte“ auf der DC-Platte beim Besprühen zu erzeugen. Hierzu muss zunächst eine entsprechend hohe Algenbiomasse in der Kultur erzeugt werden. Da die Biomassendichte im Wesentlichen von der Photosynthese und somit von Licht und Kohlenstoffdioxid abhängig ist, wurde eine Batchkultivierungsapparatur zur erhöhten Biomassegewinnung aufgebaut. Hierzu wurden die Algen in optimierten Nährlösungen mit synthetischer Luft, angereichert mit 5 % CO₂, in einem Lichtraum begast. Somit konnten bereits nach drei Tagen die spezifischen Algensuspensionsdichten auf eine Zellzahl von jeweils ca. 1500 Zellen/ μ l gesteigert werden. Da ein zu hoher Nährlösungsanteil auf der DC-Platte später für unerwünschte Diffusionen wasserlöslicher Testsubstanzen geführt hätte, wurde die Algensuspension vor dem Sprühvorgang durch Zentrifugieren nochmals auf 6000 Zellen/ μ l konzentriert. Für optimale Wachstumsbedingungen auf der DC-Platte wurden analog zum Biotest nach Gottstein *et al.* (1982) handgezogene Kieselgelplatten (0,5 mm Schichtdicke) verwendet. Die Extrakte wurden vor dem Besprühen mit der Algensuspension entweder dünnschichtchromatographisch in einem geeigneten Fließmittelsystem aufgetrennt oder ohne Trennung als Spot auf die DC-Platte aufgetragen. Nach dem Aufsprühen der Algensuspension auf die DC-Platte, wobei eine gleichmäßig grün gefärbte Verteilung zu erzeugen war, wurde diese für 4 bis 5 Tage im Lichtraum inkubiert. Die DC-Platte wurde horizontal in einer Photoschale mit einer klaren Glasabdeckung aufbewahrt werden, um eine gleichmäßige Lichteinwirkung ohne gleichzeitigen Trocknungsverlust in dieser Zeit zu ermöglichen. Algitoxische Substanzen oder Gemische sind anhand weißer Hemmhöfe auf der durch das Algenwachstum verursachten grünen Oberfläche der DC-Platte detektierbar.

6.2.3 Screening von *Hygrophorus* Extrakten auf algitoxische Aktivität

In Zusammenarbeit mit Ketzer (2007) wurden jeweils die Petrolether-, Aceton-, Ethylacetat-, Methanol-, Wasser- und Aceton/HCl-Extrakte von 25 verschiedenen *Hygrophorus*-Arten auf ihre Algentoxizität untersucht. Die auffällige Aktivität gegen die Blaualge *Sp. laxissima* insbesondere in den Petrolether- und Ethylacetat-Extrakten von *H. pustulatus*, *H. latitabundus*, *H. agathosmus*, *H. carpinii* und *H. eburneus* konnte teilweise denen bereits aus *Hygrophorus* isolierten Hygrophoronen (**82–101**) und 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**) anhand des Vergleiches von R_f-Werten im DC zugeordnet werden. Interessanterweise war im dünnschichtchromatographisch getrennten Ethylacetatextrakt von *H. eburneus* ein deutlicher Hemmhof gegen *Sp. laxissima* bei einem R_f-Wert von ca. 0,4 (LM 3) zu erkennen, dem keine der bisher bekannten 4-Oxo-2-alkensäuren zugeordnet werden konnte (Abb. 6.2.).

Eine blau fluoreszierende Bande (UV_{245 nm}; UV_{366 nm}) vor dem Besprühen, war auf das Vorkommen der β -Carbolinalkaloide Harman (**117**) und Norharman (**118**) zurückzuführen, welche erstmals aus *H. eburneus* isoliert werden konnten (Abschnitt 5.3.1). Für beide Substanzen konnte eine algitoxische Wirkung gegen *Sp. laxissima* und *Sc. rubescens* (MHK = 10 μ g) festgestellt werden (Abb. 6.3.).

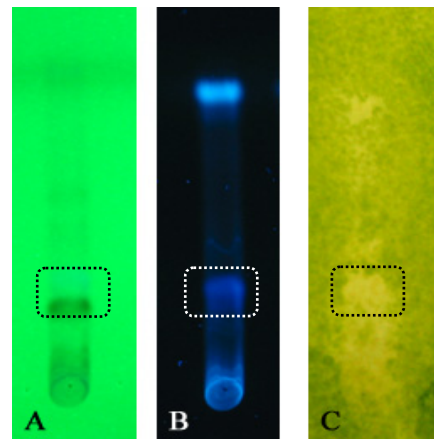


Abb. 6.2. Dünnschichtchromatographische Trennung des Ethylacetat-Extraktes von *H. eburneus*. Vor dem Besprühen mit *Sp. laxissima* Suspension: (A) $UV_{254\text{ nm}}$; (B) $UV_{366\text{ nm}}$. (C) nach 4 Tagen Inkubation mit *Sp. laxissima*. Der blau fluoreszierenden Bande und der korrelierenden Hemmzone bei $R_f = 0,4$ ließen sich Harman (117) und Norharman (118) zuordnen.

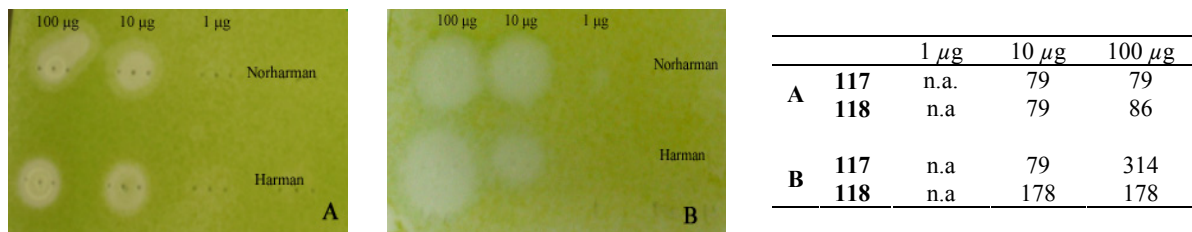


Abb. 6.3. Algitoxische Eigenschaften von Harman (117) und Norharman (118) gegen *Sp. laxissima* (A) und *Sc. rubescens* (B). Rechts: Hemmhoflächen (mm^2) in Abhängigkeit von der Auftragsmenge.

Damit steht nun ein Bioassay mit neuen Testorganismen zum Vorscreening und bioaktivitätsgesteuerter Fraktionierung von Extrakten zur Verfügung, welcher im Rahmen dieser Arbeit etabliert und erfolgreich durchgeführt wurde. Natürlich ist dieser Biotest auf DC-Platten in seiner quantitativen Aussage limitiert. Allerdings können mit ihm bereits Vorhersagen über algitoxische Aktivitäten komplexer Gemische oder Reinsubstanzen getroffen werden. Zur eindeutigen Konzentrations-Effekt-Bestimmung einer Reinsubstanz sind sich anschließende in Mikrotiterplattenformat übertragene Biotestverfahren unumgänglich. Eine Möglichkeit zur direkten Verfolgung des Algenwachstums, könnte hierfür die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenzintensität sein.

6.3 Screening von Reinsubstanzen und Extrakten auf Wirkungen an potentiellen Targets der Alzheimer-Therapie

6.3.1 Pathogenese der Alzheimer-Krankheit

Die Alzheimer-Erkrankung (Morbus Alzheimer; Alzheimer-Demenz) ist eine neurodegenerative Krankheit, die wesentliche Teile des Cortex und des limbischen Systems befallt. Charakteristisch ist die fortschreitende Einschränkung des Gedächtnisses sowie wei-

terer kognitiver Funktionen. Als Demenz (dementielles Syndrom) werden Krankheitsbilder bezeichnet, die durch eine meist erst im höheren Lebensalter auftretende qualitative und quantitative Abnahme der Hirnleistung sowie Beeinträchtigung des Sozialverhaltens charakterisiert sind, und bei denen im fortgeschrittenen Zustand keine selbständige Lebensführung mehr möglich ist (Mutschler 2001). Die Alzheimer-Krankheit zeichnet sich durch einen chronischen Verlauf über sieben bis zehn Jahre bis zum Tod aus. Derzeit kann man die Demenz nicht kausal behandeln. Der deutsche Psychiater Alois Alzheimer beschrieb 1906 erstmals die Symptome „der Krankheit des Vergessens“ (Stelzmann 1995). Sie ist heute eine der häufigsten Erkrankungen älterer Menschen. Nach Schätzungen der WHO (World Health Organization) werden im Jahr 2010 ca. 35 Millionen Menschen in den Industrieländern an Alzheimer-Demenz leiden (Heinrich 2005).

Post mortem fällt vor allem eine allgemeine Hirnatrophie auf. Dabei sind histologisch intrazelluläre Faserbündel (Tangles), die hyperphosphorylierte Tau-Proteine enthalten, sowie extrazelluläre Plaques, die aus aggregiertem β -Amyloid-Protein ($A\beta$) bestehen, elektronenmikroskopisch zu erkennen (Abschnitt 6.3.3).

Neben Antioxidantien (Ascorbinsäure), durchblutungsfördernden Wirkstoffen (Gingkolide) und Antidepressiva als Begleittherapien stehen zurzeit als medikamentöse Palliativtherapien nur der NMDA-(*N*-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptorantagonist Memantin sowie der Einsatz von Acetylcholinesterase-Inhibitoren zur Verfügung. Die Therapie mit AChE-Inhibitoren ist im allgemeinen auf den Verlust cholinergener Neuronen zurückzuführen, welcher höchstwahrscheinlich im Zusammenhang mit der Beeinflussung des cholinergen Transmittersystems während der Pathogenese steht. Es wird über verminderte Aktivitäten der Cholinacetyltransferase (ChAT), des Cholintransporters sowie eine verminderte Acetylcholinfreisetzung berichtet (Perry *et al.* 1977; Rylett *et al.* 1983; Nilsson *et al.* 1986). Da der cholinerge Neuronenverlust mit der kognitiven Beeinträchtigung der Erkrankten korreliert, wurde die cholinerge Hypothese von Morbus Alzheimer postuliert (Bartus 1982) und damit der Einsatz von Wirkstoffen zur Erhöhung des ACh-Spiegels im Gehirn, wie zum Beispiel AChE-Inhibitoren, verstärkt.

Derzeit gibt es eine Vielzahl von Bemühungen in der Erforschung neuer Behandlungsmöglichkeiten. Aktuelle potentielle Strategien sind zum Beispiel γ -Sekretase-Inhibitoren, $A\beta$ -Aggregationshemmer (Abschnitt 6.3.3) und Nicotinrezeptormodulatoren (Roberson & Mucke 2006).

6.3.2 Screening von Reinstoffen und Extrakten auf Inhibierung der Acetylcholinesterase

6.3.2.1 Funktion, Aufbau und Mechanismus der Acetylcholinesterase (AChE)

Die AChE, welche in der prä- als auch in der postsynaptischen Membran lokalisiert ist, sorgt für einen raschen Abbau des Neurotransmitters Acetylcholin (ACh) im synaptischen Spalt vegetativer und zentraler Neuronen. Dabei wird ACh zu den unwirksamen Substan-

zen Cholin und Essigsäure hydrolysiert. Cholin wird durch aktiven Transport wieder in das Axon aufgenommen und Essigsäure mit dem Blut abtransportiert (Mutschler 2001).

Die humane AChE (EC 3.1.1.7) besteht aus einem komplexen Protein des α/β -Hydrolasefaltungstyps, besitzt eine elliptische Oberfläche und eine ca. 20 Å große Vertiefung, die das aktive Zentrum des Enzyms darstellt (Abb. 6.4.). Die Hydrolyse des Acetylcholins (ACh) findet am Grund der Vertiefung durch einen komplexen Prozess statt (Houghton *et al.* 2006), welcher im Folgenden näher beschrieben werden soll. Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich in den Erläuterungen auf die Struktur der TcAChE, gewonnen aus dem Zitteraal (*Torpedo californica*), die in ihrer Struktur der humanen AChE sehr ähnlich ist (Bourne *et al.* 1995).

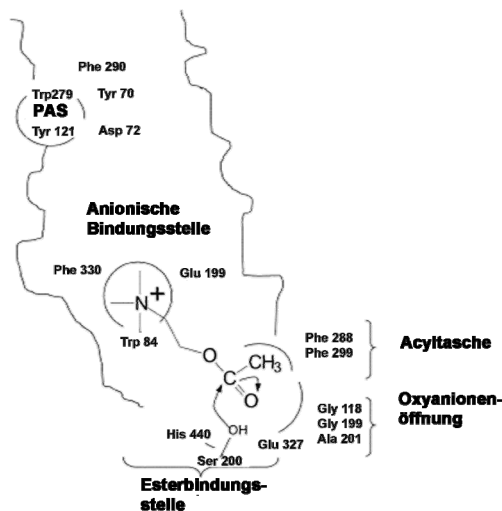


Abb. 6.4. Die Bindungsregionen innerhalb der AChE-Vertiefung.
(verändert nach Houghton *et al.* 2006)

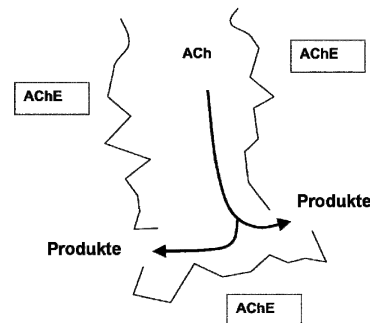


Abb. 6.5. Backdoor-Mechanismus der Spaltproduktfreisetzung.
(verändert nach Houghton *et al.* 2006)

Die initiale Bindung von ACh an die AChE findet bereits am äußeren Rand der Vertiefung statt, der sogenannten Peripheren Bindungsstelle (PAS). Diese wird aus den Aromaten und Carbonsäureresten der Aminosäuren Tyr70, Tyr121, Trp279, Phe290 und Asp72 aufgebaut (Eichler *et al.* 1994). In der Vertiefung befinden sich die vier Hauptbindungsstellen, welche für die Hydrolyse des Substrates sorgen. Die Esterbindungsstelle sorgt durch die so genannte katalytische Triade, bestehend aus den Aminosäuren Ser200-His440-Gly327, für eine letztendliche Erhöhung der Nukleophilie des Serins, und somit für einen nukleophilen Angriff auf das Substrat (Zhang *et al.* 2002; Abb. 6.6.). Die Oxyanionenöffnung, zusammengesetzt aus Gly118, Gly119 und Ala201, stabilisiert über Wasserstoffbrückenbindungen den tetrahedralen Übergangszustand des ACh, welcher während des katalytischen Prozesses gebildet wird (Ordentlich *et al.* 1998). Der Acylbindungstasche, bestehend aus Phe288 und Phe299, wird ein kontrollierender Charakter durch Limitierung der Substratdimensionen zugeschrieben (Zhang *et al.* 2002). Die anionische Bindungsstelle, auch Cholinbindungsstelle, bindet quartäre Ammoniumgruppen durch π -Kation Interaktionen mit den π -elektronenreichen Aminosäuren Phe330 und Trp84 (Abb.

6.7.). Letztere spielt eine entscheidende Rolle für die ACh-Bindung, da bei einem Austausch dieser aromatischen Aminosäure mit einer aliphatischen die Hydrolyseaktivität der AChE gegen ACh drastisch gesenkt wird (Sussman *et al.* 1991).

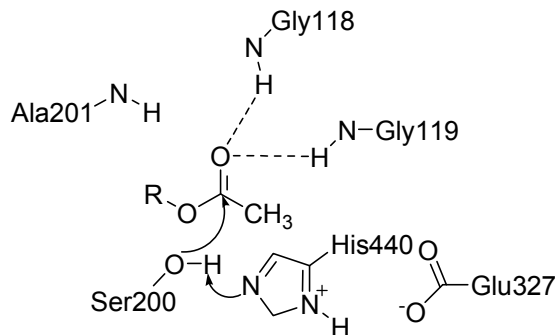


Abb. 6.6. Interaktion der katalytische Triade der AChE mit ACh im Esteratischen Zentrum. (nach Houghton *et al.* 2006)

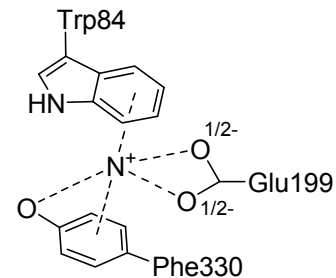


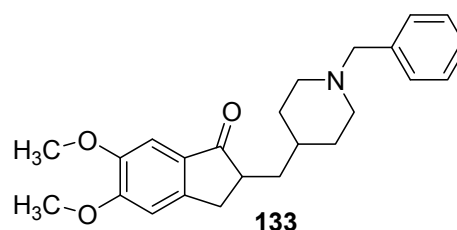
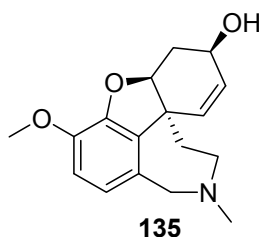
Abb. 6.7. Anionische Bindungsstelle der AChE. (nach Houghton *et al.* 2006)

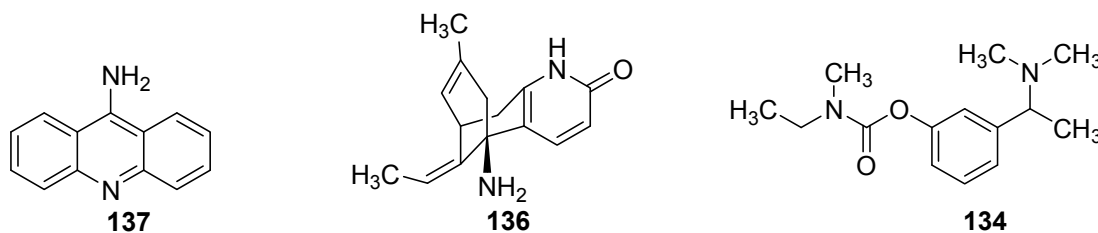
Aufgrund des hohen Umsatzes des Enzyms sowie der starken elektrostatischen Dipole durch die unterschiedlichen Ladungen im Enzym-Ligandkomplex wird ein sogenannter Backdoor-Mechanismus postuliert, bei dem das nach erfolgter Hydrolyse freigewordene Cholin das aktive Zentrum des Enzyms auf anderem Wege verlässt, als es in die Vertiefung gelangt ist (Gilson *et al.* 1994; Abb. 6.5.).

6.3.2.2 Inhibitoren der AChE

Da bei Morbus Alzheimer die cholinerge Erregungsübertragung beeinträchtigt ist, kommen verschiedene Therapiestrategien in Frage. Acetylcholinpräkursoren, wie Phosphatidylcholin und Dimethylaminoethanol, haben sich als unwirksam erwiesen und auch die Ergebnisse mit cholinergen Agonisten sind eher enttäuschend. Einzig für die in Deutschland zugelassenen Acetylcholinesterasehemmer Donezepil (**133**), Rivastigmin (**134**) und Galanthamin (**135**) wurde vom Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG) eine Verzögerung des Abbaus der kognitiven Fähigkeiten bei leichter bis mittelschwerer Alzheimer-Demenz bestätigt (DAZ 2007). Allerdings besitzen die genannten Wirkstoffe zum Teil erhebliche Nebenwirkungen, welche vorrangig auf der Erregung parasymphathischer Rezeptoren basieren.

Aufgrund dieser Feststellungen sowie dem Voranschreiten dieser Krankheit innerhalb unserer Gesellschaft existiert ein hoher Bedarf an neuen Wirkstoffen zur Symptomlinderung oder eventuellen Heilung der Krankheit.





Eine Strategie hierzu ist die Suche nach neuen Leitstrukturen, um das Wirkprofil der AChE-Hemmer zu verbessern. Von Bedeutung ist dazu das Screening von Naturstoffen auf potentielle inhibitorische Eigenschaften. Galanthamin (**135**), 1947 erstmalig aus dem kaukasischen Schneeglöckchen (*Galanthus woronowii*, Amaryllidaceae) isoliert, wurden bereits 1951 AChE-inhibierende Effekte und eine antagonistische Wirkung auf Curare (Tubocurarin)-Vergiftungen zugeschrieben (Mashkovsky & Kruglikova-Lvova 1951). **135** beeinflusst zusätzlich präsynaptische Nicotinrezeptoren, was eine erhöhte AChE-Freisetzung zur Folge hat. Galanthamin (**135**) ist seit 2001 in Deutschland als totalsynthetisches Derivat (Reminyl[®], Janssen-Cilag) zur Behandlung der Alzheimer-Demenz zugelassen. Mit Huperzin A (**136**) aus *Huperzia serrata* (Lycopodiaceae) befindet sich ein weiterer viel versprechender Naturstoff in Form seines 5-Chlor-vanillinderivatives (ZT-1) in klinischen Studien (Ma & Gang 2004; Tamchès *et al.* 2006). Es wurde gezeigt, dass **136** neben der reversiblen AChE-Inhibierung auch Neuronen gegen die Amyloid- β -Peptid-induzierte Apoptose schützt (Hostettmann & Marston 2007). Des Weiteren sind in den letzten Jahren einige neue strukturdiverse Naturstoffe verschiedenster biogenetischer Herkunft beschrieben worden (Houghton *et al.* 2006; Barbosa-Filho *et al.* 2006).

Der Herausforderung, dem Bedarf an neuen Wirkstoffen gegen die Alzheimerkrankheit entgegenzukommen, sollte durch die Nutzung zweier unterschiedlicher Testverfahren zur Bestimmung von „Antialzheimer-Wirkungen“ (AChE- und A β -Aggregationshemmtest) von Naturstoffextrakten sowie Reinsubstanzen innerhalb der vorliegenden Arbeit Rechnung getragen werden.

6.3.2.3 Bestimmung der AChE-Inhibierung *in vitro*

Um die inhibitorische Aktivität von Reinsubstanzen oder Gemischen wie Extrakten gegen das Enzym zu testen, sind in der Literatur zwei Bioassays, basierend auf kolorimetrischen Bestimmungsmethoden, beschrieben. Diese können sowohl als Direktbioautographie auf DC-Platten als auch in Mikrotiterplatten (MTP) durchgeführt werden. Beide Assayvarianten nutzen die durch die Spaltung des Substrates freigewordenen Produkte zur eigentlichen Farbreaktion mit einem zugegebenen Reagenz. In der von Ellman *et al.* (1961) beschriebenen Assaymethode wird Acetylthiocholiniodid (**138**) als Substrat verwendet. Aus diesem wird in Anwesenheit von AChE Thiocholin (**139**) freigesetzt, das aus 5,5'-Bisdithionitrobenzoesäure (**140**; DTNB) die gelbe 5-Thio-2-nitrobenzoesäure (**141**) freisetzt (Abb. 6.8.).

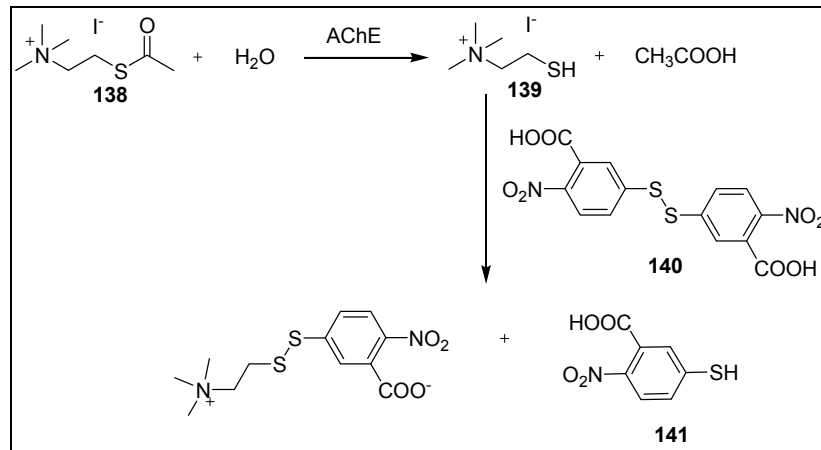


Abb. 6.8. Bildung des gelben Farbstoffes **141** im Ellman-Assay.

Dieser Farbstoff wird dann bei $\lambda_{405 \text{ nm}}$ in einer Absorptionsmessung im MTP-Assay bestimmt oder im Direktbioautographieassay als gelber Hintergrund visuell erkannt. Inkubiert man den beschriebenen MTP-Assayansatz mit AChE-Inhibitoren, so stehen durch die eingeschränkte Aktivität des Enzyms nur geringe Mengen des Produktes zur Bildung des gelben Farbstoffes zur Verfügung. Dies führt zu einer Abnahme der Absorption bei $\lambda_{405 \text{ nm}}$. Die Verhältnisse beider Absorptionswerte ergeben dann einen prozentualen Inhibierungswert für die zugefügte AChE-hemmende Substanz. Im Direktbioautographieassay kann ein AChE-Inhibitor als weißer Spot auf gelbem Hintergrund detektiert werden (Rhee *et al.* 2001).

Ebenfalls auf einer kolorimetrischen Bestimmungsmethode basiert der Biotest nach Mendoza (1973), welcher von Weins & Jork (1996) und Marston *et al.* (2002) in modifizierter Form beschrieben wurde. Bei diesem Biotest wird Naphthylacetat (**142**) als Substrat von der AChE neben Essigsäure zum α -Naphthol (**143**) umgesetzt und reagiert dann mit dem zugefügten Echtblausalz B (**144**) zum violetten Azofarbstoff (**145**) (Abb. 6.9.). Dieser wird dann wie im Ellman-Assay als Indikator einer AChE-Aktivität benutzt.

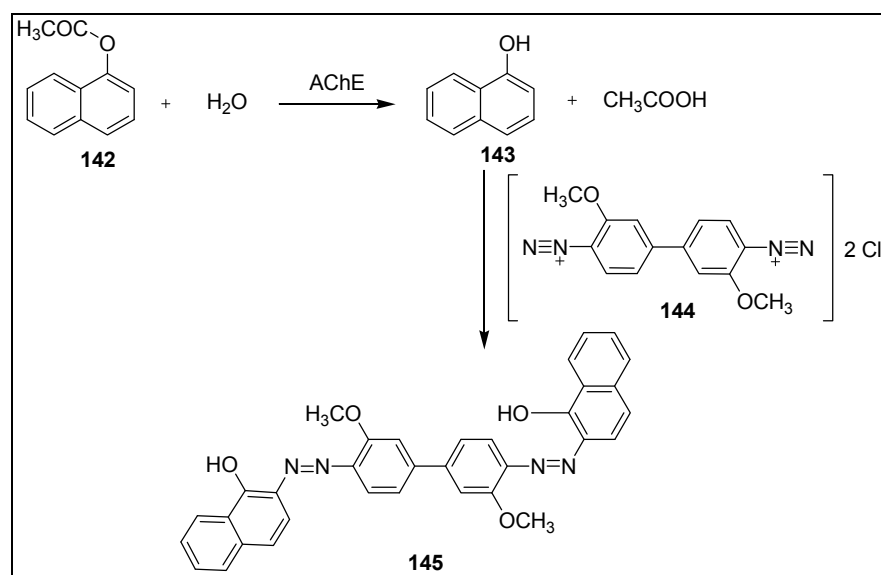


Abb. 6.9. Bildung des violetten Azofarbstoffes **145** im Hostettmann-Assay.

6.3.2.4 Screening von Reinsubstanzen und Extrakten

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde zur Bestimmung der AChE-inhibierenden Aktivitäten von Substanzen und Extrakten, zunächst ein Mikrotiterplattentest in modifizierter Durchführung nach Ellman *et al.* (1961) etabliert. Anschließend wurde der Bioassay erfolgreich in interdisziplinären Projekten angewendet.

Im Rahmen einer Dissertation in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie erfolgte die Totalsynthese von Galanthamin (Dick 2006). Intermediate aus dieser Synthese sowie Strukturanaloga von Galanthamin wurden im etablierten Ellman-Assay auf ihre AChE-inhibierenden Wirkungen getestet. Während ausgewählte Syntheseintermediate keine hemmenden Wirkungen aufwiesen, konnten für die Galanthaminderivate **146** und **147** höhere *in vitro* inhibitorische Aktivitäten mit einem IC_{50} -Wert von jeweils $0,007 \mu\text{M}$ gegenüber Galanthamin ($IC_{50} = 11,7 \mu\text{M}$) bestimmt werden (Abb. 6.10.). Demnach scheint eine Verengung des Stickstoffringes (**146**) als auch ein Austausch der *N*-Methylgruppe gegen einen Ringsauerstoff (**147**) zu Verbesserungen der AChE-inhibierenden Aktivität zu führen.

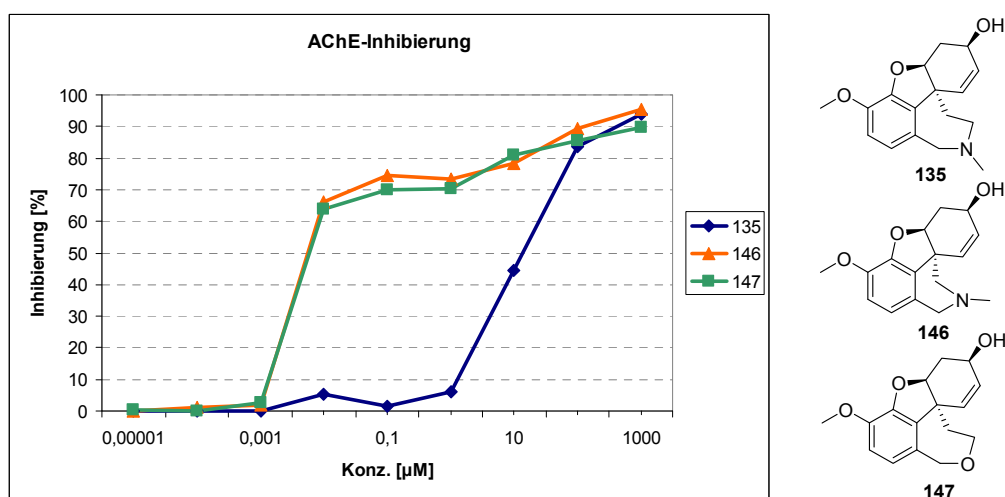


Abb. 6.10. AChE-inhibitorische Aktivität synthetischer Galanthaminderivate im Ellman Assay (Dick 2006).

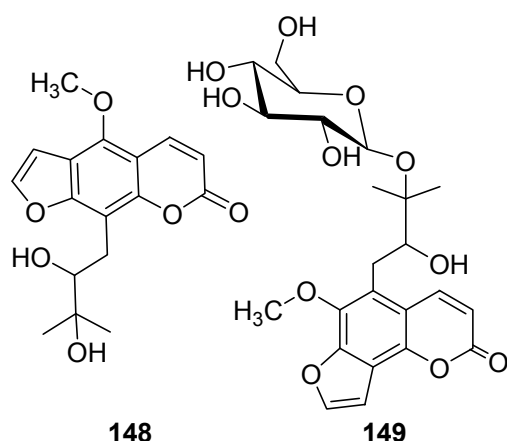
Ein weiterer Testansatz beinhaltete die Bestimmung der AChE-inhibitorischen Aktivität von Extrakten aus endemischen Pflanzen der Insel Socotra (Jemen) im MTP-Bioassay nach Ellman. Es wurden insgesamt 30 Extrakte von 14 Pflanzen im Screening eingesetzt. AChE-inhibitorische Aktivitäten von über 50 % bei einer Konzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ zeigten der Methanol-Extrakt der Knollen von *Eureiandra balfourii* und die Chloroform-Extrakte der Rinde von *Croton socotranus*, eines Harzes von *Boswellia socotrana* sowie der Blätter von *Dorstenia gigas* und *Pulicaria stephanocarpa* (Tab. 6.1.).

Tabelle 6.1. Screening der Pflanzenextrakte auf AChE-inhibitorische Aktivität.

| Pflanze | Pflanzenteil | Extraktionsmittel | AChE-Hemmung [%] | |
|---------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-----------|
| | | | 0,05 mg/ml | 0,2 mg/ml |
| <i>Acridocarpus socotranus</i> | Blatt | CHCl ₃ | 2 | 24 |
| | | MeOH | 13 | 43 |
| <i>Boswellia socotrana</i> | Harz | CHCl ₃ | 22 | 69 |
| | | MeOH | 0 | 35 |
| <i>Boswellia elongata</i> | Harz | CHCl ₃ | 11 | 46 |
| | | MeOH | 0 | 18 |
| <i>Caralluma socotrana</i> | Oberirdischer Teil | CHCl ₃ | 15 | 45 |
| | | MeOH | 0 | 15 |
| <i>Cephalocroton socotranus</i> | Rinde | CHCl ₃ | 14 | 51 |
| | | MeOH | 9 | 36 |
| <i>Croton socotranus</i> | Rinde | CHCl ₃ | 41 | 79 |
| | | MeOH | 0 | 13 |
| <i>Dendrosicycos socotrana</i> | Rinde | CHCl ₃ | 3 | 23 |
| | | MeOH | 5 | 32 |
| <i>Dendrosicycos socotrana</i> | Blatt | CHCl ₃ | 0 | 18 |
| | | MeOH | 5 | 32 |
| <i>Dorstenia gigas</i> | Blatt | CHCl ₃ | 19 | 65 |
| | | MeOH | 7 | 26 |
| <i>Eureiandra balfourii</i> | Knolle | CHCl ₃ | 23 | 33 |
| | | MeOH | 19 | 59 |
| <i>Kalanchoe farinaceae</i> | Blatt | CHCl ₃ | 17 | 45 |
| | | MeOH | 11 | 32 |
| <i>Limonium sokotranum</i> | Blatt | CHCl ₃ | 15 | 43 |
| | | MeOH | 13 | 29 |
| <i>Oldenlandia pulvinata</i> | Oberirischer Teil | CHCl ₃ | 17 | 45 |
| | | MeOH | 12 | 36 |
| <i>Pulicaria diversifolia</i> | Oberirischer Teil | CHCl ₃ | 10 | 41 |
| | | MeOH | 11 | 35 |
| <i>Pulicaria stephanocarpa</i> | Blatt | CHCl ₃ | 11 | 61 |
| | | MeOH | 6 | 23 |

Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde *Dorstenia gigas* bereits früher phytochemisch untersucht und vor allem Furanocumarin-Derivate isoliert (Franke *et al.* 2001). Interessanterweise sind für einige Furanocumarine in der Literatur AChE-inhibitorische Eigenschaften beschrieben (Kang *et al.* 2001). Geißler (2007) konnte für die Furanocumarine aus *Dorstenia gigas* Swietenocumarin F (**148**) eine geringe (10 % Hemmung bei 2,4 mM) und für

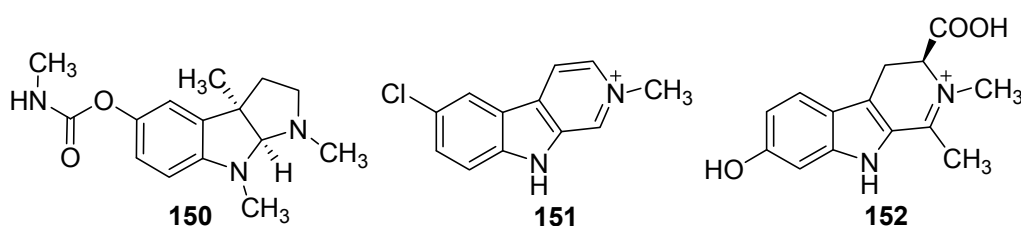
6-Methoxy-5-[3-(β -D-glukopyranosyloxy)-2-hydroxy-3-methyl-butyl]-angelicin (**149**) eine



mäßige Hemmung (73 % bei 10 mM) im Ellman-Assay ermitteln. Eventuell sind die Substanzen **148** und **149** demnach additiv verantwortlich für die beobachtete Aktivität des methanolischen Rohextraktes. Da der Chloroform-Extrakt allerdings eine fast dreifache Aktivität besitzt, und **149** als Glukosid zu polar ist, um mit Chloroform extrahiert zu werden, stellt sich die Frage, welche Inhaltsstoffe für die Aktivität des Chloroformextraktes verantwortlich sind.

6.3.2.5 Untersuchungen zur Cholinesterase-Inhibierung von Brunnein A (**27**)

Frühere Studien beschreiben β -Carbolinalkaloide als potentielle Cholinesteraseinhibitoren. Dabei wurde gezeigt, dass vor allem solche mit quartärem Stickstoff besonders starke Aktivität aufweisen, die teilweise sechsfach niedrigere IC_{50} -Werte als der bekannte Cholinesteraseinhibitor Physostigmin (**150**) *in vitro* und *in vivo* besitzen, während tertiäre aromatische β -Carboline eher über schwache Inhibierungen verfügen (Ghosal *et al.* 1972; Schott *et al.* 2006). Diese Resultate wurden kürzlich durch die Entdeckung des sehr potenten Cholinesteraseinhibitors Nostocarbolin (**151**) aus *Nostoc* 78-12A bestätigt (Becher *et al.* 2005). Auf diesen Untersuchungen aufbauend, sollte am Beispiel von Brunnein A (**27**) geprüft werden, ob dieses neue β -Carbolinderivat cholinesteraseinhibierende Eigenschaften besitzt.



Zunächst wurden in einem *in silico* Approach vergleichende Dockingstudien mit Brunnein A (**27**) und Nostocarbolin (**151**) in das aktive Zentrum der TcAChE (*Torpedo californica* AChE, PDB-Nr. 10DC) durchgeführt (GOLD[®]: Genetic Optimized Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre, 1998, Cambridge, UK). Dabei erreichte Brunnein A (**27**) mit 55 einen um 3 Einheiten besseren Fittingscore als das strukturell verwandte und *in vitro* stark hemmende Nostocarbolin (**151**). Abbildung 6.11. zeigt **27** in das aktive Zentrum der TcAChE gedockt. Brunnein A (**27**) ist über eine Wasserstoffbrücke zwischen seiner Carboxylgruppe und Ser200 an das Enzym gebunden (2,2 Å) und bildet eine Backbone-Donor-Wechselwirkung mit Gly118 des Enzyms. Außerdem bildet sich über π - π -Wechselwirkungen eine stabilisierte Sandwichform zwischen dem flachen Grundgerüst des β -Carbolins und Trp84 sowie Phe330.

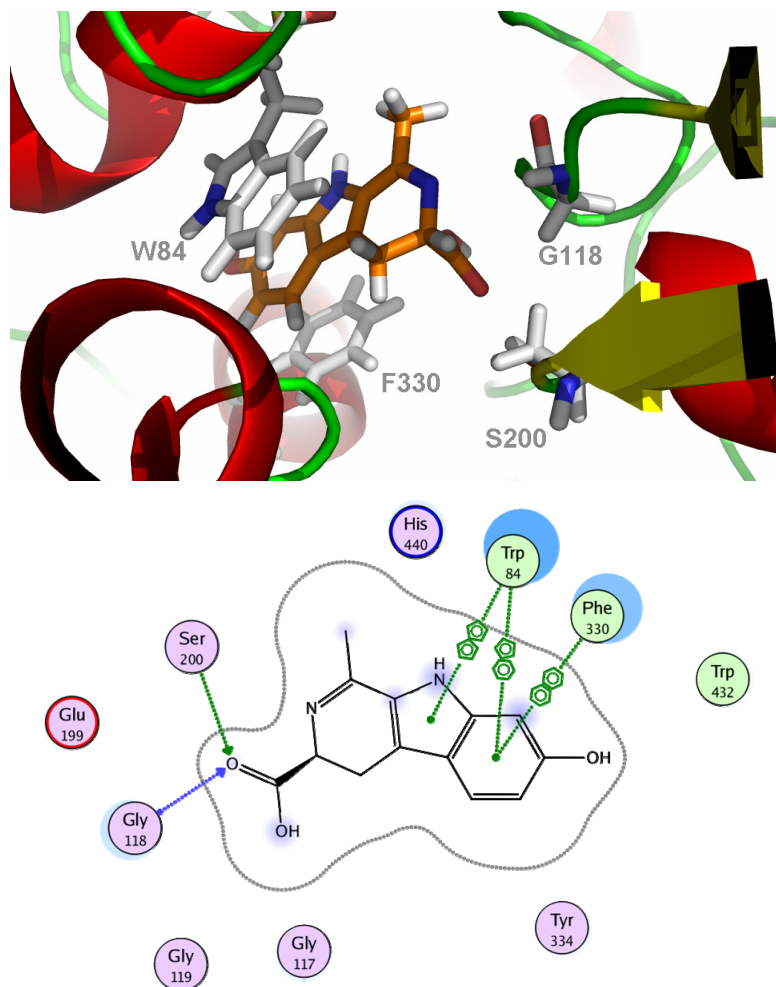


Abb. 6.11. *In silico* Docking von **27** in das aktive Zentrum der *TcAChE*. (W. Brandt) Oben: Dreidimensionale Darstellung (PyMOL, Molecular Graphics System). Unten: Zweidimensionale Darstellung (MOE, Molecular Operating Environment).

In einem *in vitro* Bioassay, basierend auf einer modifizierten Ellman Methode, wurde allerdings nur eine mäßige Inhibierung der Acetylcholinesterase von ca. 30 % durch **27** bei einer Konzentration von 10^{-4} M gefunden. Demgegenüber hemmten die Referenzsubstanzen Tacrin (**137**) und Galanthamin (**135**) in diesem Konzentrationsbereich die AChE-Aktivität fast vollständig (Abb. 6.12.).

Es ist bekannt, dass die AChE unter anderem über eine anionische Bindungseinheit, zusammengesetzt aus den Aminosäuren Trp84, Phe330 und Glu199, verfügt. Es wird angenommen, dass dabei die positive Ladung der quartären Ammoniumgruppe des nativen Liganden Acetylcholin stabile Interaktionen mit den elektronenreichen π -Systemen der aromatischen Aminosäuren bildet (Houghton *et al.* 2006). Daher wurde versucht, über eine selektive *N*-Methylierung von **27** zum *N*-Methylbrunnein A (**152**) eine Aktivitätssteigerung durch Erzeugung des quartären Stickstoffes zu erreichen. Hierzu wurden in einer modifizierten Methode nach Schott *et al.* (2006) 3 mg Brunnein A (**27**) mit 3,4 mg MeI zu **152** umgesetzt.

Aus dem Reaktionsgemisch konnten 0,3 mg **152** (ca. 50 % Reinheit, $^1\text{H-NMR}$) isoliert werden. Bereits mit der verunreinigten Probe von **152** konnte eine Inhibierungssteigerung um 40 % bei einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ erzielt werden (Abb. 6.12.). Der aktive Konzentrationsbereich ($\text{IC}_{50} > 100\ \mu\text{M}$) lag aber dennoch deutlich über den Werten wie sie von Schott *et al.* (2006) für *N*-Methyl- β -carbolinderivaten beschrieben sind (mittlere $\text{IC}_{50} \approx 2\ \mu\text{M}$). Weitere Struktur-Aktivitäts-Beziehungen durch Substanzderivatisierungen konnten aufgrund der limitierten Menge an Brunnein A (**27**) nicht vorgenommen werden.

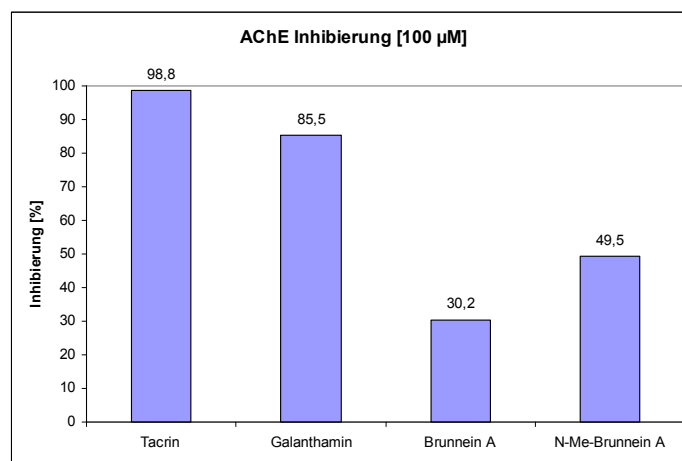


Abb. 6.12. Acetylcholinesterasehemmung von Brunnein A (**27**), *N*-Methylbrunnein A (**152**) sowie den Referenzsubstanzen Tacrin (**137**) und Galanthamin (**135**) im Ellman-Assay ($100\ \mu\text{M}$).

Eine interessante Hypothese stellten Schott *et al.* (2006) auf, indem sie die inaktiven tertiären β -Carboline als Target-spezifische Prodrugs diskutieren, welche aufgrund ihrer Lipophilie die Blut-Hirn-Schranke passieren können und anschließend durch eine kürzlich beschriebene β -Carbolin-2-*N*-methyltransferase (Gearhart *et al.* 2002) spezifisch methyliert werden können. Diese nun hochaktiven Derivate sind aufgrund ihrer hydrophileren Eigenschaften in den Zellen eingeschlossen. Solche Prodrug-Phänomene sind auch bei Naturstoffen schon länger bekannt (Hostettmann & Marston 2007). Ein Beispiel, bei dem erst durch metabolische Aktivierung aus dem Prodrug die biologisch aktive Substanz freigesetzt wird, ist Salicin (**153**) aus den Rinden von *Salix* Arten. Salicin (**153**) erfordert zunächst eine Deglukosylierung zum freien Alkohol Saligenin (**154**) sowie eine Oxidation im menschlichen Körper, um als freie Salicylsäure (**155**) analgetisch, antipyretisch und antiinflammatorisch wirken zu können (Abb. 6.13.).

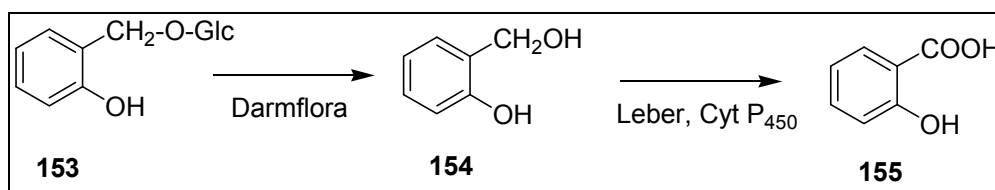


Abb. 6.13. Metabolisierung von Salicin (**153**) zu Salicylsäure (**155**).

Die erfolgreiche Nutzung des Bioassays nach Ellman innerhalb der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie konnte Geißler (2007) fortführen. Ihm gelang eine auf diesem Test beruhende wirkungsorientierte Fraktionierung und Isolierung der AChE-Inhibitoren Infracopicrin (**43**; $IC_{50} = 8,5 \mu M$) und 6-OH-Infracopicrin ($IC_{50} = 10,8 \mu M$) aus *Cortinarius infractus* Fruchtkörpern, dessen MeOH-Extrakt in einem vorherigen Screening auf AChE-inhibitorische Aktivität auffiel. Beide Canthinonderivate sind höchstwahrscheinlich biosynthetisch aus β -Carbolinderivaten hervorgegangen und zeichnen sich durch einen quartären Pyridinstickstoff aus, welcher maßgeblich zur AChE-inhibitorischen Aktivität beiträgt. *In silico* Docking Studien mit beiden Substanzen bestätigten die Bindung im aktiven Zentrum einer TcAChE durch stabilisierende π - π - und π -Kation-Wechselwirkungen mit Trp84 sowie Wasserstoffbrücken zwischen der Carbonylfunktion und Tyr121.

Berücksichtigt man die Prodrug-Hypothese für die β -Carboline und die Resultate der Diplomarbeit von Geißler, können Fruchtkörper der Gattung *Cortinarius* wertvolle Quellen neuer AChE-Inhibitoren darstellen.

6.3.3 Screening von Pilzinhaltsstoffen auf Inhibierung der Amyloid- β -Peptid Oligomerisierung

6.3.3.1 Die Amyloid- β -Peptid Hypothese

Morbus Alzheimer ist neuropathologisch durch das Vorkommen von Ablagerungen in Form von amyloiden Plaques und Fibrillen im menschlichen Gehirn sowie dem Verlust profunder Grauer Hirnmasse gekennzeichnet. Die Amyloid-Hypothese postuliert, dass die Amyloid- β -Peptide ($A\beta$) die eigentliche Ursache der neuronalen Funktionsstörungen und dem letztendlichen Absterben dieser Zellen im Gehirn von Alzheimer-Patienten sind. Die amyloiden Plaques bestehen im Wesentlichen aus aggregiertem $A\beta$. $A\beta$ selbst entsteht aus dem Transmembranprotein Amyloid-Precursor-Protein (APP), welches auf zwei unterschiedlichen Wegen durch Sekretasen gespalten wird (Abb. 6.14). Bei dem nichtamyloiden Weg spaltet eine α -Sekretase APP innerhalb des $A\beta$ enthaltenen Proteinteils. Dadurch wird die Bildung von $A\beta$ verhindert. Es kommt zur Freisetzung eines großen extrazellulären Anteils, dessen Funktion nicht endgültig geklärt ist. Auf dem amyloiden Weg wird APP zuerst von der β -Sekretase, auch BACE (β -site of APP cleaving enzyme) genannt, extrazellulär und nachfolgend innerhalb seiner Transmembrandomäne von der γ -Sekretase geschnitten. Dieser Schnitt führt zur Freisetzung von $A\beta$. Beide Vorgänge können parallel in den Nervenzellen stattfinden. Die durch β - und γ -Sekretase gebildeten $A\beta$ -Peptide variieren in ihrer Länge. Der hauptsächlich gebildete $A\beta$ -Typ ist 40 Aminosäuren lang ($A\beta_{1-40}$), während ein kleiner Anteil 42 Aminosäuren lang ist ($A\beta_{1-42}$). Die Länge des $A\beta$ ist von zentraler pathologischer Bedeutung, da das längere $A\beta_{1-42}$ eine wesentlich höhere Tendenz zur Aggregation aufweist, als das kleinere $A\beta_{1-40}$. Es wird angenommen, dass diese Aggregate eine Art physikalische Barriere zwischen den einzelnen hippocampalen und kortikalen Neuronen darstellen. (Caputo *et al.* 1989) Dabei ist es sehr wahrschein-

lich, dass während des Krankheitsprozesses das Gleichgewicht zwischen $A\beta$ -Produktion und $A\beta$ -Abbau gestört ist, was in einer langsamen Akkumulation von neurotoxischem $A\beta$, nachfolgender Bildung von Plaques und schließlich Neurodegeneration resultiert.

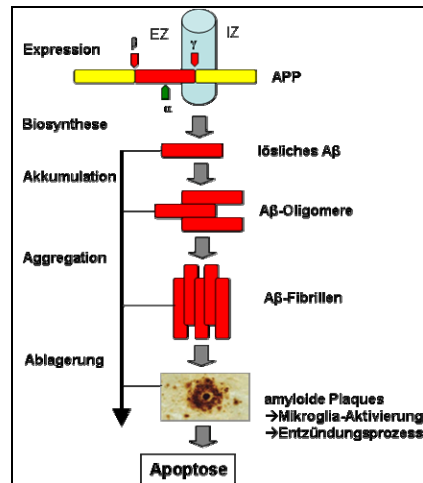


Abb. 6.14. Amyloid-Kaskade-Hypothese (Pangalos *et al.* 2005).

Die Amyloid-Peptide stellen in der Suche nach Behandlungsstrategien für Morbus Alzheimer neue Targets dar (Pangalos *et al.* 2005). So wird zum einen versucht, BACE-Inhibitoren zu finden, welche durch Inhibierung der β -Sekretase eine Abspaltung von unlöslichem $A\beta$ verhindern sollen (Walker *et al.* 2006). Einige BACE-Inhibitoren befinden sich zurzeit in Klinischen Studien. Eine viel verprechende Strategie ist die Suche nach spezifischen γ -Sekretase-Inhibitoren, als Modulatoren, um eine gezielte Produktion von kurz-kettigem $A\beta$ zu erreichen. Auch hier existieren bereits Substanzen, die zurzeit klinisch getestet werden.

In kürzlich beschriebenen Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem kleinere $A\beta$ -Aggregate, wie z. B. Dimere, Trimere und Tetramere, in Zellkulturassays neurotoxisch wirken (Walsh *et al.* 2002). Diese Ergebnisse offenbaren die frühe $A\beta$ -Oligomerisierung als neues Target in der Wirkstoffsuche für die Alzheimerkrankheit. So wurden bereits erste Aggregationshemmer auf Peptidbasis entwickelt (Chalifour *et al.* 2003). Außerdem zeigten Studien, dass $A\beta$ -Peptidspezies, die einen Pyroglutamylrest besitzen ($A\beta$ pGlu), den Hauptanteil der abgelagerten Amyloide bilden (Russo *et al.* 1997). Die Unterdrückung der Entstehung dieser Peptide durch eine Inhibierung der Glutaminyl-Cyclase ist ein weiterer potentieller Ansatz zur Wirkstoffentwicklung der Alzheimer-Krankheit (Demuth *et al.* 2004; Schilling 2004).

Andere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Acetylcholinesterase selbst an der $A\beta$ -Aggregation beteiligt ist, in dem sie, vermittelt über die periphere Region des Enzyms, stabile AChE- $A\beta$ -Komplexe bildet (Inestrosa *et al.* 1996). Muñoz-Ruiz *et al.* (2005) diskutieren daher sogenannte Dual-Binding-Site-Inhibitoren der AChE als neue Wirkstoffe zur AChE induzierten $A\beta$ -Aggregation. Bei diesen Substanzen handelt es sich um überaus po-

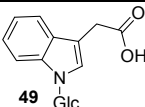
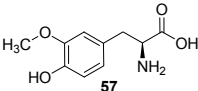
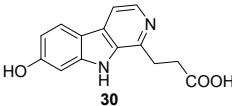
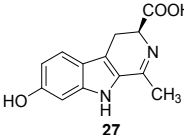
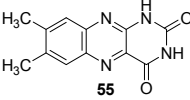
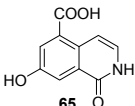
tente AChE- und $A\beta$ -Aggregationsinhibierende Tacrin-Derivate, welche über einen Linker mit einem Indolderivat verbunden sind. Während die Tacrin-Teilstruktur an der katalytischen ionischen Tasche des Enzyms bindet, stellt die Indolstruktur eine Bindungseinheit an der peripheren Seite am Eingang der ionischen Bindungstasche über π - π -Wechselwirkungen mit Trp279 des Enzyms dar.

Ziel dieses Screenings war es, die aus *C. brunneus* und *C. subtortus* isolierten Naturstoffe auf ihre $A\beta$ -Oligomerisierungsinhibierenden Eigenschaften in einem *in vitro* Testmodell zu untersuchen.

6.3.3.2 Screening einzelner Pilzinhaltsstoffe

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit isolierten Substanzen **27**, **30**, **49**, **55**, **57** und **65** wurden aufgrund der Abdeckung einer strukturellen Diversität und der vorhandenen Menge ausgewählt, um ihr Potential einer potentiellen $A\beta$ -Oligomerisierungshemmung einzuschätzen (Tab. 6.2.). Dabei wurde ein Biotest verwendet, der auf der Thioflavin-T-Fluoreszenzmethode basiert (LeVine, 1993). Thioflavine T (ThT) ist ein spezifisches Indikatorreagenz für amyloide Peptidablagerungen (Vassar & Culling 1957; Kelenyi 1967). Die Untersuchungen wurden durch die Fa. Probiobdrug AG durchgeführt.

Tab. 6.2. $A\beta$ -Oligomerisierungshemmung ausgewählter Pilzinhaltsstoffe nach 300 h Inkubation.

| Substanz (50 μ M) | $A\beta$ -Oligomerisierungshemmung [%] |
|---|--|
|  49 Glc | 35 |
|  57 | 23 |
|  30 | 15 |
|  27 | 9 |
|  55 | 7 |
|  65 | 0 |

Einzig **49** stellte sich als potentieller $A\beta$ -Aggregationshemmer heraus. Die Substanz zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung der ThT vermittelten Fluoreszenz, welche mit einer Aggregationshemmung korreliert ist (Abb. 6.15.). In einem erneuten Assay zur Überprüfung des Konzentrations-Wirkungseffektes führte **49** bei einer Konzentration von $200 \mu\text{M}$ zu einer Fluoreszenzhemmung von 42 % gegenüber der Negativkontrolle (DMSO) nach 90 h, dem Beginn der stationären Phase der Aggregation. Demgegenüber wurden die bekannten Aggregationshemmer Propidiumiodid und Peptid SM1224/1 (Probi-odrug AG) als Positivkontrollen verwendet. Diese führten bei einer Konzentration von jeweils $200 \mu\text{M}$ zu einer fast vollständigen Fluoreszenzhemmung. (Abb. 6.15.A.)

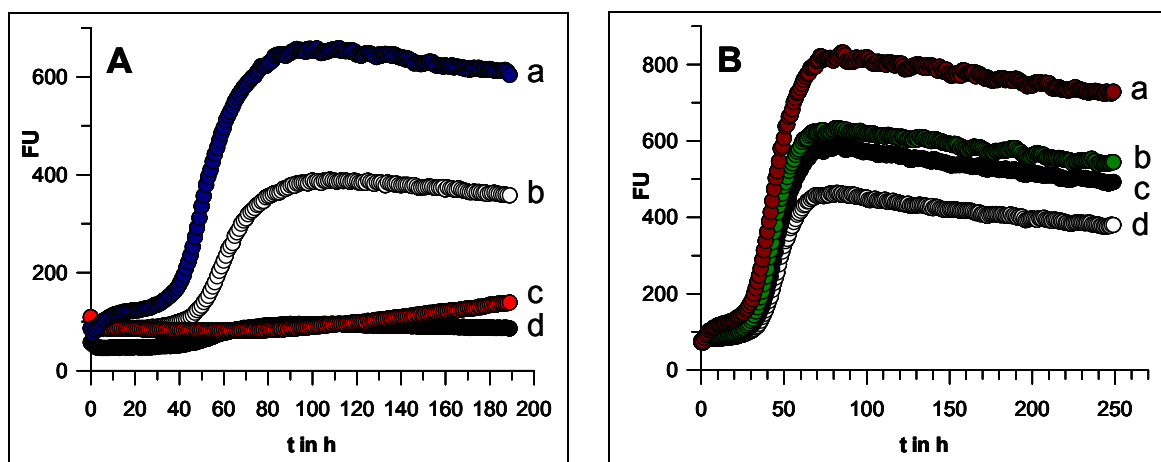


Abb. 6.15. $A\beta_{1-40}$ Oligomerisierungsassay. A: $A\beta_{1-40}$ (a); **49** ($200 \mu\text{M}$) (b); SM1224/1 ($200 \mu\text{M}$) (c); Propidiumiodid ($200 \mu\text{M}$) (d). B: $A\beta_{1-40}$ (a); **49** ($50 \mu\text{M}$) (b); **49** ($100 \mu\text{M}$) (c); **49** ($200 \mu\text{M}$) (d).

Mit dieser Aktivität gegen ein neues Target in der Alzheimertherapie, könnte die Substanz **49** Ausgangspunkt für neue Wirkstoffe gegen Morbus Alzheimer darstellen. Wichtig für die Aktivität des Inhibitors gegen diese Krankheit ist grundsätzlich eine Überwindung der Blut-Hirnschranke. Um diese Eigenschaft im Vorfeld einzuordnen, wurden für **49** der $\log P$ - sowie der $TPSA$ -Wert mithilfe des Programmes MOE (Molecular Operating Environment, Chem. Comp. Group. Inc., Montreal, Canada) berechnet. Der $\log P$ -Wert gibt den logarithmischen Verteilungsgrad einer Substanz in einem Octanol-Wassergemisch an und ist demnach ein Maß für die Polarität einer Verbindung. Nach Lipinski *et al.* (1997) muss eine Substanz einen positiven $\log P$ -Wert kleiner als 5 erreichen, damit eine ausreichende Membrangängigkeit gewährleistet ist. Für **49** wurde ein $\log P$ -Wert von $-0,7$ berechnet, welcher eine hohe Hydrophilie der Substanz kennzeichnet und **49** damit keine ausreichende *in vivo* Bioverfügbarkeit zusichert. Der $TPSA$ -Wert (Topological Polar Surface Area) gibt die Polarität der Moleküloberfläche einer Substanz an und wird nach Ertl *et al.* (2000) als Summe der Polarität aller Teilstrukturen berechnet. Zur Penetration der Blut-Hirnschranke sollte eine Substanz einen $TPSA$ -Wert kleiner 70 \AA^2 besitzen. Der berechnete Wert von 132 \AA^2 indiziert für **49** keine Penetration der Blut-Hirn-Schranke.

Zur Abschätzung der *in vivo* Bioverfügbarkeit von **49** müsste allerdings geklärt werden, ob die *N*-glykosidische Verknüpfung der Substanz **49** bei oraler Applikation stabil ist. Generell steigt die Säurestabilität der *N*-glukosidischen Bindung in Abhängigkeit der Struktur ihrer Aglykone: Aliphatische Amine ~ Aminosäuren < Aromatische Amine < Carbonsäureamide = Harnstoff (Winkler & Sandermann 1992). Außerdem sind mehr als 30 spezifische *N*-Glykosyl-Hydrolasen in der Literatur beschrieben. Bei ausreichender Stabilität der Substanz *in vivo* sollten Überlegungen zur Lipophilieerhöhung der Substanz folgen.

Mit den Informationen aus der Studie von Muñoz-Ruiz *et al.* (2005), welche die Indolgrundstruktur als starken Binder an der peripheren Bindungsstelle der AChE diskutieren, wurde in einem weiteren Biotest die Hemmwirkung auf die AChE von *N*-Gluc-IAA getestet. Es wurden allerdings keine inhibierenden Eigenschaften der Substanz auf das Enzym festgestellt. Zukünftig wären also Studien mit Derivaten, welche durch entsprechende Linker mit einem bekannten Binder der ionischen AChE-Bindungstasche verknüpft sind, interessant. Solche Derivate könnten, ausgehend von den jetzt bekannten aggregationshemmenden Eigenschaften des Naturstoffes **49**, auf ihre AChE-Dual-Binding-Site inhibitorischen Eigenschaften untersucht werden und somit eventuell neue Wirkstoffe für eine Doppelinhibierungsstrategie (AChE und A β -Aggregation) in der Behandlung von Morbus Alzheimer darstellen.

6.4 Biologische Untersuchung von **49** auf Auxinwirkung

Da es sich bei **49** letztendlich um das *N*-glukosylierte Derivat der Indol-3-ylessigsäure (**52**, IAA), dem bekanntesten Auxin handelt, stellte sich die Frage, ob **49** auch Auxin-ähnliche Eigenschaften besitzt. Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss der Substanz auf das Keimungsverhalten und Wurzellängenwachstum von *Arabidopsis thaliana* in einem entsprechenden Bioassay untersucht. Hierzu wurden oberflächensterile *A. thaliana* Samen auf einen Nähragar, welcher die Testsubstanz in entsprechender Endkonzentration enthielt, platziert und die Petrischalen anschließend in einen Lichtraum verwahrt. Indol-3-ylessigsäure (**52**) wurde als Vergleichssubstanz verwendet. Nach 10 Tagen Inkubation wurde das Längenwachstum der Pfahlwurzeln *A. thaliana* Keimlinge bestimmt. Wie in den Abbildungen 6.16. und 6.17. dargestellt, zeigt die Substanz keine signifikante Hemmung des Wurzellängenwachstums im Gegensatz zum Aglykon IAA (**52**). Dieses Resultat stützt die Hypothese, dass es sich bei **49** um eine inaktive Speicher- oder Transportform von IAA (**52**) handeln könnte, vorausgesetzt es existieren spezielle Esterasen im Pilz oder der mykotropen Partnerpflanze zur Abspaltung der *N*-verknüpften Glukose. Es ist auch möglich, dass es sich um ein Detoxifikationsprodukt von **52** handelt. Die Substanzen **47**, **48**, **50** und wahrscheinlich auch **51** können als biosynthetische Vorläufer bzw. Metaboliten von **49** betrachtet werden.

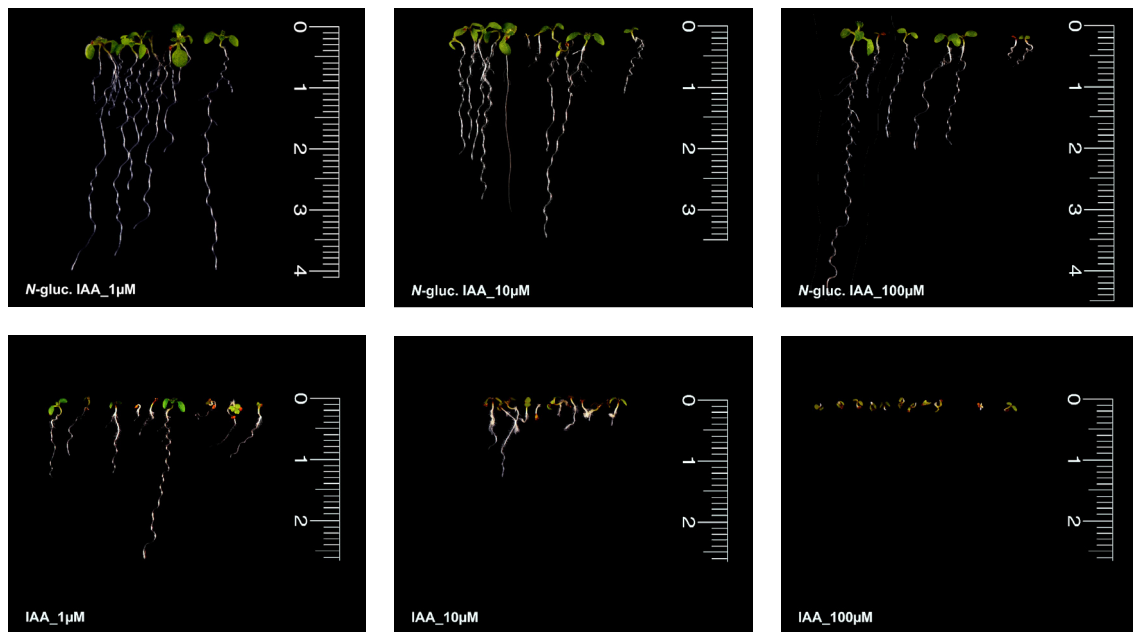


Abb. 6.16. Biotests auf Auxinwirkung: *A. thaliana* Wurzellängenwachstum nach 10 Tagen Inkubation mit *N*-Glc IAA (49; obere Bildreihe) und IAA (52; untere Bildreihe).

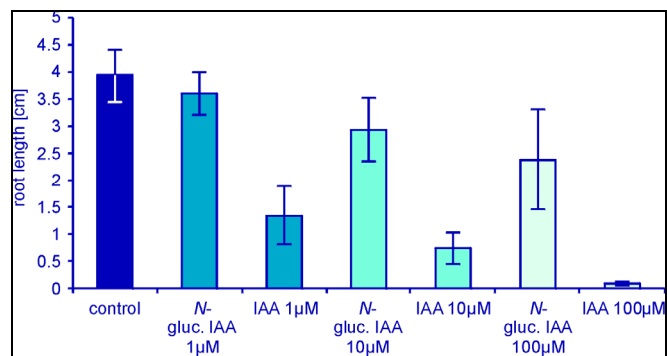


Abb. 6.17. Wurzellängenwachstumshemmung von *A. thaliana* in Gegenwart von *N*-Glc IAA (49) und IAA (52).

6.5 Biologische Aktivitätsuntersuchungen der (Iso-) Chinolinalkaloide aus *C. subtortus*

6.5.1 Antifungische Aktivität

Die isolierten neuen Naturstoffe wurden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zum kommerziellen Breitbandantiseptikum 8-Hydroxychinolinsulfat (**156**) auf ihre antifungischen Eigenschaften getestet. In einem Biotest wurde die antifungische Aktivität der Substanzen gegen den phytopathogenen Pilz *Colletotrichum coccodes*, dem Erreger der Welkekrankheit bei Kartoffel- und Tomatenpflanzen bestimmt. In dem in Mikrotiterplatten durchgeführten und auf Trübungsmessungen basierenden Bioassay zeigte **63** eine Inhibierung des Myzelwachstums nach sechs Tagen Inkubation (6 dpi) bereits ab einer Konzentration von 0,01 μM . Bei einer Konzentration von 100 μM zeigte **63** eine deutliche Hemmung des Myzelwachstums von ca. 70 %, während bei **64** und **65** keine signifikanten Hemmungen zu messen waren. Als Referenzsubstanz wurde 8-Hydroxychinolinsulfat (**156**) eingesetzt. Diese Substanz führte bereits ab einer Konzentration von 1 μM zur vollständigen Inhibierung des Myzelwachstums bei einer Inkubation von sechs Tagen (Abb. 6.18.). Hieraus können für die antifungische Aktivität bereits Struktur-Aktivitäts-Wechselwirkungsbeziehungen aufgestellt werden. So scheint eine zusätzliche Carboxygruppe am Chinolingerüst im Gegensatz zum einfach hydroxylierten **156** die antifungische Aktivität herabzusetzen. Eine weitere Substitution mit einer Aminogruppe in Position C-4 (**64**) zeigt schließlich keine antifungische Aktivität mehr. Immerhin scheint es, dass zumindest **63** zur Abwehr gegen mykoparasitische Pilze von *C. subtortus* gebildet wird. Solche Abwehrmechanismen werden im Allgemeinen als präformierte Verteidigungsstrategie eines Organismus gegen Fressfeinde, Parasiten oder Pathogene bezeichnet, bei der toxische Metaboliten „vorausschauend“ gebildet werden. Im Gegensatz dazu unterscheidet man die induzierte Verteidigung, bei der Abwehrstoffe erst bei Anwesenheit eines Erregers gebildet werden, die wachstumshemmend oder toxisch auf diesen wirken (Sauermost 2002).

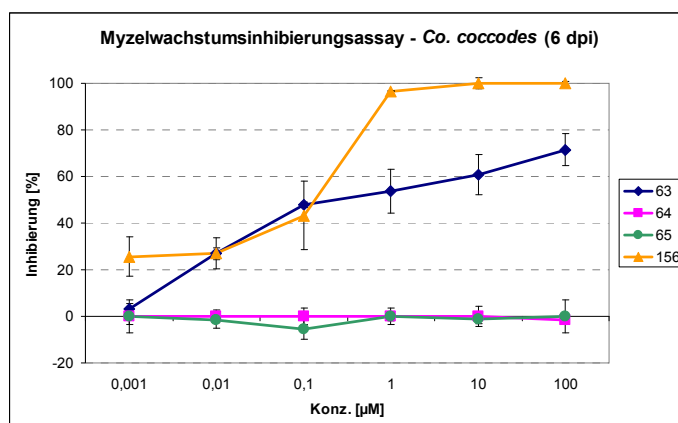
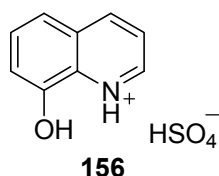


Abb. 6.18. Myzelwachstumshemmtest der (Iso-) Chinolinalkaloide gegen *Colletotrichum coccodes*.

6.5.2 Antioxidative Aktivität

Da in **63–65** phenolischen Hydroxygruppen vorhanden sind, wurden die Radikalfänger- und somit die antioxidativen Eigenschaften in einem DPPH Free Radical Scavenger Bioassay untersucht. Alle drei untersuchten Substanzen zeigten hier moderate Aktivitäten von bis zu 20 % bei einer Konzentration von 1 mM, während die Referenzsubstanz Ascorbinsäure 79 % Radikalfängeraktivität bei identischer Konzentration demonstrierte (Abb. 6.19.).

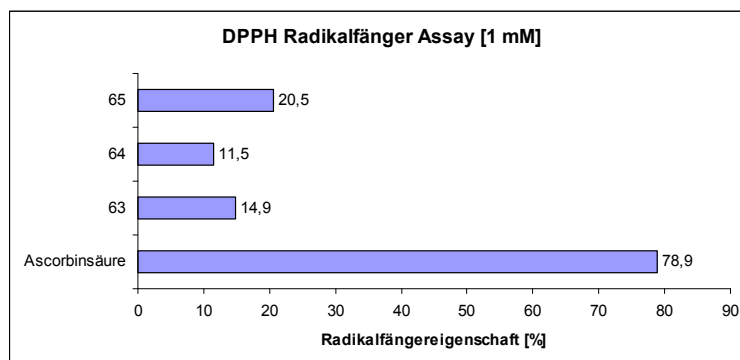


Abb. 6.19. Biotest auf antioxidative Aktivitäten von **63–65**

6.6 Biologische Aktivitätsuntersuchungen der 4-Oxo-2-alkensäuren (104–111) aus *H. eburneus*

6.6.1 Antifungische Aktivitäten

Nachdem, wie in Abschnitt 5.2. angeführt, alle isolierten 4-Oxo-2-alkensäuren in einem bioautographischen Testsystem eine bemerkenswerte inhibitorische Aktivität gegen das Myzelwachstum des phytopathogenen Pilzes *Cladosporium cucumerinum* zeigten, wurde zunächst im gleichen Bioassay die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse mit der synthetisierten 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**) verfolgt. Wie Abbildung 6.20. zeigt, konnten gleiche Konzentrations-Effekt-Abhängigkeiten beobachtet werden (Hemmhöhe bis 0,5 µg Auftragsmenge).

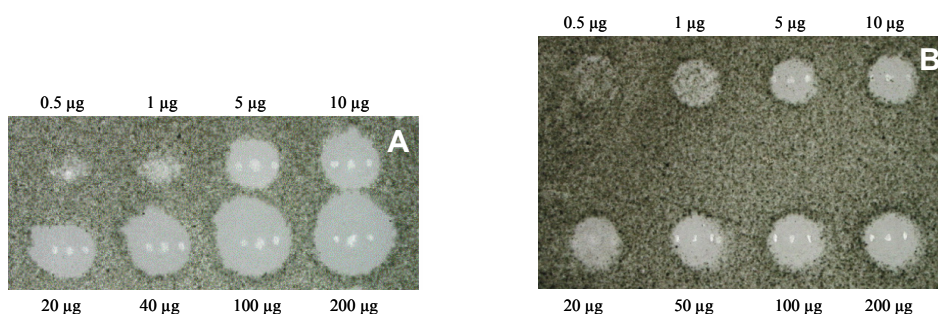


Abb. 6.20. Vergleich der antifungischen Aktivitäten gegen *Cl. cucumerinum*: (A) isolierte 4-Oxohexadec-2-ensäure und (B) synthetische 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**).

Ausgehend von der fungitoxischen Wirkung gegen *Cl. cucumerinum* wurde nun in einem weiteren Fungitoxizitätsassay gegen den bedeutsamen Erreger der Welkekrankheit

untersucht, ob die gegen *Cl. cucumerinum* festgestellte Wirkung auch gegen andere Schadpilze reproduzierbar ist.

Gegen das ökonomisch wichtige Schadbild der Welkekrankheit von Tomaten- und Kartoffelpflanzen, geprägt durch enorme Ernteverluste, ist bisher noch kein spezifisches Fungizid entwickelt worden und die bisherige chemische Kontrolle gilt als uneffektiv (Lees & Hilton 2003). Der Biotest zur Bestimmung der Myzelwachstumsinhibierung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden das kommerzielle Fungizid Benomyl sowie das Oxylipin 12-OPDA (**132**) verwendet. Das Diagramm Abbildung 6.21. verdeutlicht den Einfluss der Testsubstanzen auf das Myzelwachstum von *Co. coccodes* innerhalb von sechs Tagen Inkubation. Demnach wurde nach sechs Tagen Inkubation mit 100 μM 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**) eine Hemmung der Pilzbiomasseproduktion um 55 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erreicht. Benomyl zeigte bei gleicher Konzentration weitaus geringere Hemmungen (24 %). 12-OPDA (**132**) liegt etwa im gleichen Hemmbereich (61 % Hemmung).

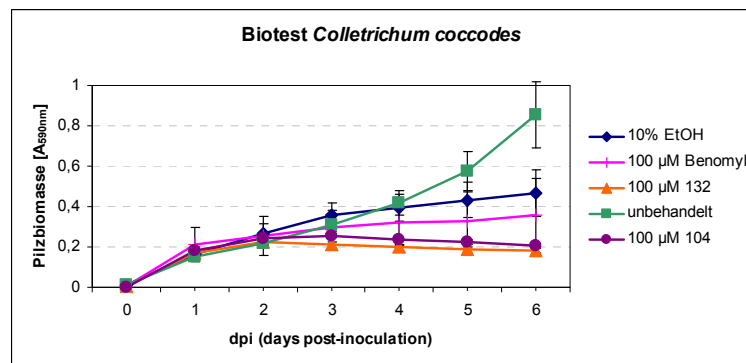


Abb. 6.21. Wachstumsinhibitorische Eigenschaften von 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**) sowie den Referenzsubstanzen 12-OPDA (**132**) und Benomyl gegen *Colletrichum coccodes*.

6.6.2 Antioomycetische Aktivität

Der Oomycet *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule von Kartoffeln stellt nach wie vor ein enormes ökologisches und ökonomisches Problem durch hohe Ernteverluste in der Landwirtschaft dar. Einige sehr aggressive Stämme zeigen bereits Resistenzen gegen die am häufigsten verwendeten Pflanzenschutzmittel. Strategien zur Verhinderung der Kraut- und Knollenfäule, hervorgerufen von *P. infestans*, sind zum einem das Verhindern der Zoosporenkeimung in der Erstinfektionsphase, zum anderen das Aufhalten des Myzelwachstums des Erregers nach Etablierung der Krankheit.

Es konnte gezeigt werden, dass 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**) in einem entsprechenden *in vitro* Bioassay bereits bei einer Konzentration von 1 nM die Sporenkeimung nach 12 Stunden Inkubation signifikant unterdrückt. Dies ist zum einem am erhöhten Anteil ungekeimter Zoosporen sowie einem verkürzten Keimschlauch gekeimter Zoosporen unter einem Lichtmikroskop erkennbar. Ab einer Konzentration von 100 μM konnten keine gekeimten Zoosporen mehr detektiert werden (Abb. 6.23.). Bei der Betrachtung der inkubierten Sporensuspensionen war eine auffällige Formveränderung der mit **104** behandelten

Zoosporen zu beobachten. So konnte eine hohe Anzahl geplatzter Zoosporen detektiert werden (Abb. 6.22.). Diese Beobachtung lässt eine Membranlyse als Wirkmechanismus von **104** vermuten.

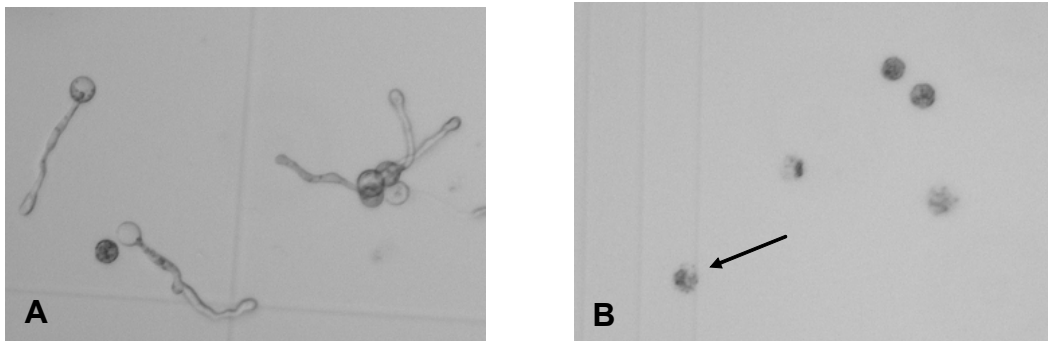


Abb. 6.22. Lichtmikroskopische Betrachtung (50fache Vergrößerung) von *P. infestans* Sporen nach 12 h Inkubation. **A:** Lösungsmittelkontrolle: deutliche Ausbildung eines Keimschlauches. **B:** Behandlung mit 100 μM **104**: keine Ausbildung eines Keimschlauches und Membranlyse der Sporen (Pfeil).

In einem zweiten Biotest wurde der Einfluss von **104** direkt auf das Myzelwachstum von *P. infestans* untersucht. Hierfür wurde ein GFP-exprimierender Stamm als Testorganismus auf Agar-Medium in Multiwellplatten benutzt. Die Zunahme an exprimiertem GFP korreliert hierbei mit dem Hyphen- und damit dem Myzelwachstum, welches durch Fluoreszenzintensitätsmessungen indirekt bestimmt werden kann. **104** zeigte bereits ab einer Konzentration von 1 μM signifikante Hemmungen des Myzelwachstums nach 8 Tagen Inkubation. Bei einer Konzentration von 1 mM wurde eine vollständige Unterdrückung des Hyphenwachstums beobachtet.

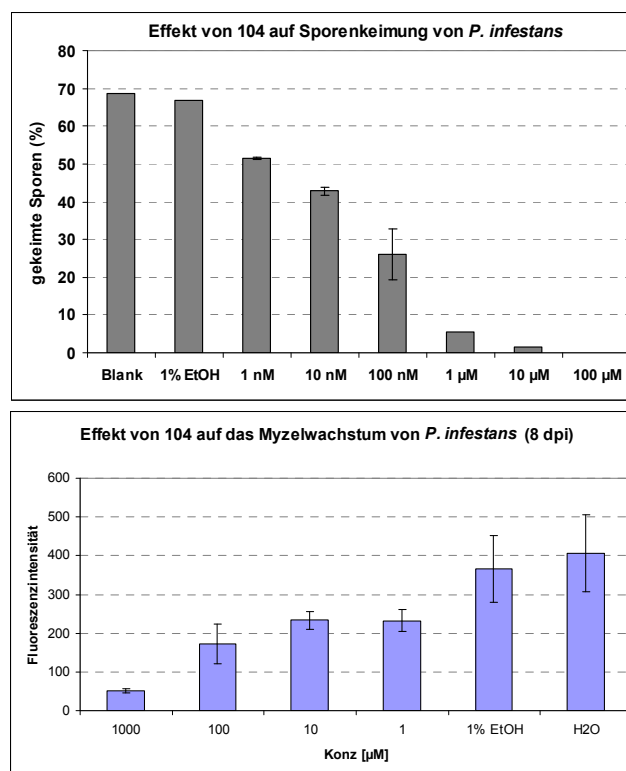


Abb. 6.23. Keimungshemmung der Zoosporen (oben) und Myzelwachstumshemmung (unten) von *Phytophthora infestans* durch **104**.

Die Ergebnisse beider Untersuchungen präsentieren sehr hohe inhibitorische Eigenschaften von **104** gegenüber dem Phytopathogen *P. infestans*. Da **104** zur starken Unterdrückung der Sporenkeimung als auch des Hyphenwachstums führt, ist eine ubiquitäre Hemmung der untersuchten Entwicklungsstadien des Lebenszyklus von *P. infestans* erkennbar. Eine mögliche Wirkung könnte in beiden Fällen in der Auflösung der Organismenmembran durch Einlagerung des Moleküls in die Zellmembran und damit erhöhter Permeabilität bestehen.

Lübken (2006) testete bereits vier aus *Hygrophorus* spp. isolierte Hygrophoron-Derivate auf ihre Aktivitäten gegen *P. infestans*. Es wurde kein Einfluss von 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**82**) und von 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹⁴ (**85**) auf das Hyphenwachstums von *P. infestans* sowie eine mäßige Hemmung des Hyphenwachstums durch 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹² (**92**) und 4-*O*-Acetylhygrophoron D¹⁴ (**94**) beschrieben. Allerdings unterdrückte 4,6-Di-*O*-acetylhygrophoron A¹² (**82**) bei einer Konzentration von 50 µM die Sporenkeimung von *P. infestans* um 80 %.

Die untersuchte 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**) besitzt ein erhebliches antioomycetisches Potential, das sie auch wirtschaftlich interessant erscheinen lässt. Allerdings nur dann, wenn bei ihrem Einsatz als Pflanzenschutzmittel keine Beeinträchtigung des Ganzpflanzenwachstums gegeben ist und keine Toxizitätsprobleme auftreten. Es wurde daher in einem dritten Experiment eine eventuelle Toxizität von **104** gegen Kartoffelpflanzen in einem *in vivo* Sprühtest in einem Ganzpflanzen-Infektionsmodell überprüft und reale Feldsituationen (Pathogen-Wirtspflanze) simuliert getestet. Gleichzeitig wurde das Vermögen von **104** untersucht, eine *P. infestans* Infektion auf diesen Pflanzen zu verhindern.

Dazu wurden in einer Phytokammer die Unterseiten der Blätter mehrerer Kartoffelpflanzen mit wässrigen Lösungen von Natrium-4-Oxohexadec-2-enoat (**104a**) besprüht und anschließend mit einer *P. infestans* Sporensuspension inokuliert. Die Pflanzenblätter zeigten nach vier Tagen Inkubation visuell keine vorhandenen Infektionen durch das Pathogen bis zu einer Auftragsmenge von 7,2 ng/cm² Blattoberfläche im Gegensatz zum vorher unbehandelten Blatt, bei welchem deutliche Läsionen infolge eines Eindringens des Pathogens in das Blattgewebe zu erkennen waren (Abb. 6.25.). Des Weiteren waren bis zu einer Auftragsmenge von 0,72 µg/cm² Blattoberfläche keine Schädigungen der Pflanzenblätter durch die Substanz **104a** erkennbar.

Um die Infektion und das tatsächliche Wachstum des Pathogens auf jedem Blatt exakt bestimmen zu können, wurden von einzelnen Proben jedes Blattes die DNA-Menge von *P. infestans* durch ein Realtime-PCR Experiment ermittelt. Die Ergebnisse zeigten eine sehr geringe Menge an *P. infestans* DNA bei den mit **104a** behandelten Blättern und damit eine komplette Wachstumshemmung im Gegensatz zur vorher unbehandelten Pflanze (Abb. 6.24.).

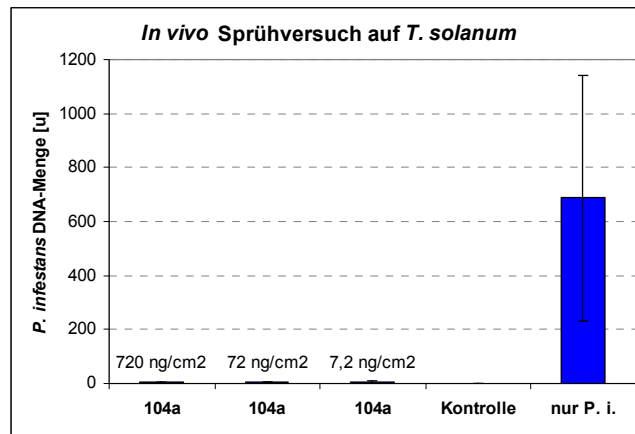


Abb. 6.24. Wachstum von *Phytophthora infestans* (= P. i.) auf/in Kartoffelpflanzenblättern ermittelt aus DNA-Bestimmungen mittels Realtime-PCR.



Abb. 6.25. Einzelne Kartoffelpflanzenblätter nach 4 Tagen Inkubation mit *P. infestans*: A: Auftragsmenge **104a**: 0,72 µg/cm²; B: Auftragsmenge **104a**: 7,2 ng/cm²; C: nicht mit **104a** behandelt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die applizierte Substanz **104** ein hohes antioomycetisches Potential gegen das Phytopathogen *P. infestans* besitzt. Es unterdrückt zum einen die Sporenkeimung ab einer Konzentration von 1 nM und hemmt zum anderen auch das Myzelwachstum des Oomyceten ab einer Konzentration von 1 µM signifikant. Ein Ganzpflanzensprühversuch offenbarte keine Toxizität von **104** gegen die Wirtspflanze des Pathogens.

6.6.3 Antibakterielle Aktivitäten

Um das Abwehrspektrum der 4-Oxo-2-alkensäuren für *H. eburneus* weiter zu erfassen, wurden ihre antibakteriellen Eigenschaften gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien untersucht. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Biotestsysteme verwendet.

6.6.3.1 Wachstumshemmtest

Zunächst wurde ein auf Absorptionsmessungen basierender Mikrotiterplattentest zur Bestimmung der Wachstumsinhibierung verwendet. Bei diesem Biotest wurden das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* sowie *Bacillus subtilis* als Gram-positiver Testorganismus eingesetzt. Als Testsubstanz wurde beispielhaft für die Substanzklasse die aus *H. eburneus* isolierte (2*E*,11*Z*)-4-Oxo-octadeca-2,11-diensäure (**110**) verwendet. Nach 20 Stunden Inkubation der Testsubstanz mit der jeweiligen auf eine definierte Zellzahl einge-

stellten Bakteriensuspension in einer 24er-Multiwellplatte konnte bereits eine visuelle Auswertung aufgrund der verschiedenen Trübungsgrade der Bakteriensuspension durchgeführt werden. Durch Messung der Absorption der Bakteriensuspension konnten genaue Werte und somit Konzentrations-Effekt-Beziehungen ermittelt werden. Es wurde eine signifikante Hemmung des Bakterienwachstums von *B. subtilis* und *E. coli* durch **110** erreicht. Abb. 6.26 zeigt die Konzentrations-Effekt-Kurven. Ihnen ist zu entnehmen, dass **110** eine ähnliche Wachstumsinhibierung gegen *E. coli* wie das kommerzielle Aminoglykosidantibiotikum Amikacinsulfat besitzt. Allerdings zeigt **110** nur eine mäßige wachstumshemmende Eigenschaft gegen *B. subtilis*.

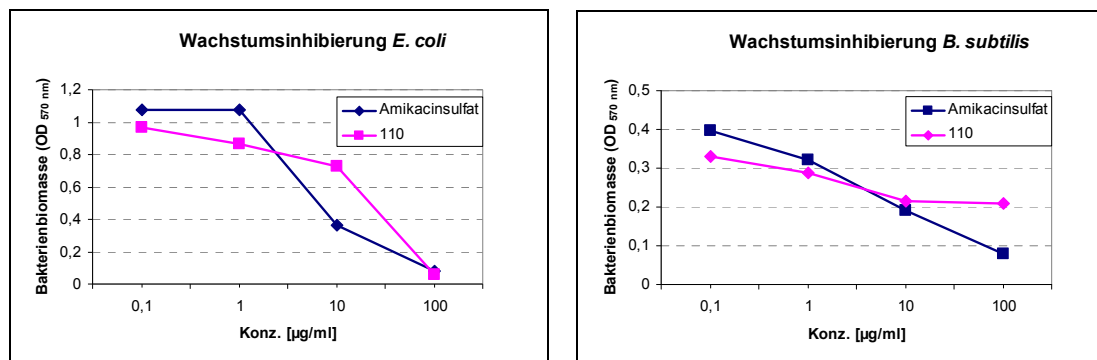


Abb. 6.26. Einfluss von (2*E*,11*Z*)-4-Oxooctadeca-2,11-diensäure (**110**) auf das Wachstum von Gram-neg. *E. coli* ($EC_{50} = 10,1 \mu\text{g/ml}$ bzw. $34,0 \mu\text{M}$) und Gram-pos. *B. subtilis* ($EC_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$ bzw. $340 \mu\text{M}$).

6.6.3.2 Toxizitätstests gegen Leuchtakterien

Der Leuchtbakterienhemmtest oder auch Biolumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri* (Vibrionaceae) als Testorganismus ist ein standardisierter und häufig angewandter Biotest zur Bestimmung der akuten Toxizität von Reinsubstanzen (Ghosh *et al.* 1996). *Vibrio fischeri* ist ein Gram-negatives stäbchenförmiges begeißeltes Bakterium. Der Leuchtvorgang ist ein chemisch-enzymatischer Oxidationsprozess. Als Nebenweg der Atmung kommt es dabei nicht zur Bildung von ATP, sondern zur Anregung von Intermediärverbindungen (sogenannter Luciferine), die blaugrünes Licht aussenden. Diese werden durch das Enzym Luciferase gebildet, was zur *in vitro* Lichtemission unbedingt O_2 , reduziertes FMN und einen langkettigen Aldehyd benötigt (Gunsalus-Miguel *et al.* 1972).

Das Prinzip dieses Kurzzeit-Biotests beruht auf der Bestimmung der akuten Toxizität auf Leuchtbakterien. Gemessen wird die natürliche Leuchtleistung (Biolumineszenz) als vitaler Marker von *Vibrio fischeri*. Innerhalb der Diplomarbeit (Teichert 2004) konnte der Schnelltest (30 min. Inkubation) etabliert und bereits eine erste Bioaktivitätsuntersuchung der 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**) durchgeführt werden.

Durch Messwiederholungen innerhalb der vorliegenden Arbeit konnten im Schnelltest für alle 4-Oxo-2-alkensäuren (**104–111**) sehr starke Biolumineszenzhemmungen beobachtet werden. Bereits ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ ($0,34 - 0,37 \mu\text{M}$) wurde von allen Substanzen eine signifikante Hemmung der Biolumineszenz verursacht. Eine Konzent-

ration von 100 $\mu\text{g/ml}$ (0,34 – 0,37 mM) führte zur vollständigen Erlöschung der Lumineszenz (Abb. 6.27.).

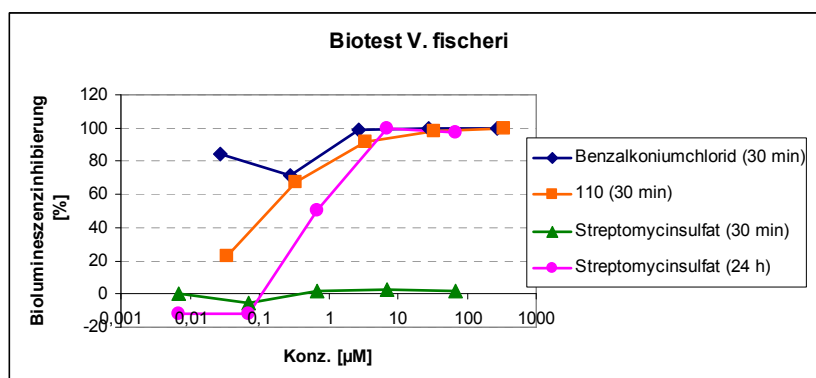
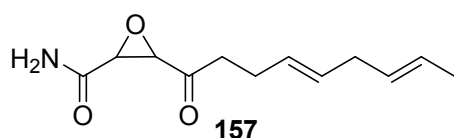


Abb. 6.27. Biolumineszenzhemmungen von Benzalkoniumchlorid ($EC_{50} < 0,01 \mu\text{g/ml}$), Streptomycinsulfat (EC_{50} Langzeittest = $0,97 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,67 \mu\text{M}$) und (2*E*,11*Z*)-4-Oxo-octadeca-2,11-diensäure (**110**, $EC_{50} = 0,03 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,10 \mu\text{M}$).

Das als Positivkontrolle eingesetzte Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycinsulfat zeigte im Schnelltest (30 min) keine Biolumineszenzhemmung bis zur höchsten eingesetzten Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ ($69 \mu\text{M}$). Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h wurde auch für die Referenzsubstanz Streptomycinsulfat, dessen Wirkung u. a. auf einem Eingriff in die Bakterienzellteilung infolge einer Translationshemmung beruht (Mutschler 2001), eine deutliche Biolumineszenzhemmung erreicht.

Von dem Fettsäurebiosynthese-Typ-II-Inhibitor Cerulenin (**157**), einem Antibiotikum aus *Cephalosporium caerulens* (Omura 1976) mit struktureller Ähnlichkeit zu den 4-Oxo-2-alkensäuren, ist bekannt, dass es beim Lumineszenzbakterium *Vibrio harveyi* durch spezi-



fische und kovalente Bindung an die Reduktaseeinheit der Aldehydbiosynthese zur Biolumineszenzhemmung führt. Diese Hemmung ist reversibel und

kann durch Zugabe von Dodekanal wieder rückgängig gemacht werden (Grogan 1983; Byers & Meighen 1989).

Von diesem o. g. Sachverhalt ausgehend wurde versucht, in einem Biolumineszenzinhibitionsassay den Einfluss von nachträglich zugesetztem Dodekanal zum Testansatz von **104** und *V. fischeri* zu untersuchen, um Hinweise auf eventuelle Wirkmechanismen für die intensive Lumineszenzhemmung der 4-Oxo-2-alkensäuren zu erlangen. Hierfür wurde zunächst die Biolumineszenz nach 15 min Inkubation mit jeweils 4-Oxohexadec-2-ensäure (**104**) und Cerulenin (**157**) in verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Beide Substanzen führen bereits ab einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zur vollständigen Biolumineszenzhemmung. Nach 15 min Inkubation mit 100 μM Dodekanal konnte eine komplette Aufhebung

der Hemmung im Cerulenin-Ansatz detektiert werden. Allerdings führte die Aldehydzugabe im 4-Oxohexadec-2-ensäure-Ansatz nicht zu einer signifikanten Lumineszenzwiederherstellung. Somit kann ein gleicher Wirkmechanismus wie bei Cerulenin (**157**) ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen auf dem Gebiet sind notwendig, um diese spezifisch hohe Aktivität der 4-Oxo-2-alkensäuren erklären zu können. Ulitzur & Hastings (1980) beobachteten, dass langkettige ungesättigte Fettsäuren wie Ölsäure, zu einer reversiblen Inhibierung der Biolumineszenz von verschiedenen Lumineszenzbakterien führen. Die Biolumineszenz konnte ebenfalls mit Dodekanal wiederhergestellt werden. Die Autoren postulierten demnach eine spezifische Inhibierung der Myristinsäure-Reduktase, welche verantwortlich für die Produktion von Tetradekanal ist.

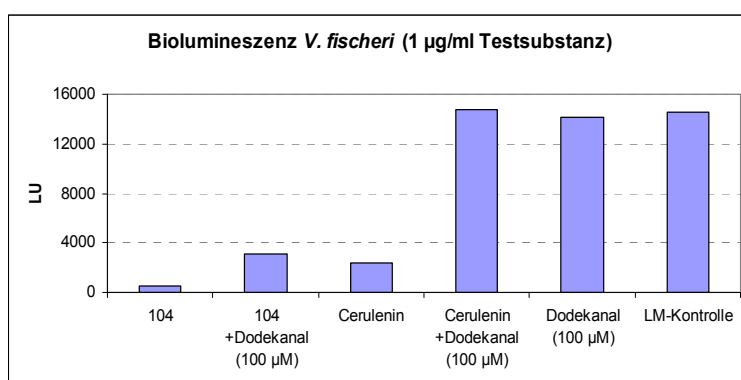


Abb. 6.28. Untersuchung zur Wiederherstellung der Biolumineszenz durch Zugabe von Dodekanal. (LM = Lösungsmittel)

7 Experimenteller Teil

7.1 Geräte

NMR

1D-NMR-Spektren (^1H , ^{13}C) wurden mit einem Varian Mercury 300, Varian Mercury 400 bzw. einem Varian Unity Inova 500 NMR-Spektrometer aufgenommen, 2D-NMR-(HSQC, HMBC, COSY, NOESY/ROESY) Spektren an einem Varian Inova 500 bzw. einem Bruker Avance 700 NMR-Spektrometer. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und wurden auf den internen Standard TMS ($\delta = 0,00$ ppm, ^1H) bzw. die Lösungsmittel DMSO ($\delta = 39,5$ ^{13}C) und CD_3OD ($\delta = 49,0$ ^{13}C) referenziert. Für D_2O wurde die indirekte Referenzierungsmethode des Herstellers benutzt. Die Kopplungskonstanten J sind in Hz angegeben. Die Multiplizitäten werden mit s (Singulett), d (Dublett), dd (Dublett von Dubletts), ddd (Dublett von Dublett von Dubletts), t (Triplet), q (Quartett) und m (Multiplett) abgekürzt.

HR-FTICR-MS

Die exakten Massenbestimmungen wurden an einem Bruker Apex III 70e Fourier Transformation Ionen Cyclotron Resonanz (FTICR) Massenspektrometer durchgeführt, welches mit einer InfinityTM-Zelle, einem 7.0 Tesla Tieftemperatursupraleitungsmagneten, einer Apollo-Ionenquelle und einem Agilent-Sprayer ausgestattet ist. Die Probelösungen wurden mittels Spritzenpumpe bei einem gleichbleibenden Fluss von $120 \mu\text{l/h}$ injiziert.

HPLC-ESI-MS und tandem-massenspektroskopische Untersuchungen

Die Elektrospray-Massenspektren (ESI-MS) positiver und negativer Ionen wurden mit einem Thermo Electron TSQ Quantum Ultra AM System aufgenommen (Elektrospray-Spannung 4.5 kV; Spraygas: Stickstoff). Die Temperatur der beheizten Kapillare betrug 275 °C. Das MS-System ist mit einer Surveyor Micro-HPLC gekoppelt. Für die HPLC wurde Säule 3 mit dem Gradienten 3 benutzt. Die CID-Massenspektren der entsprechenden $[\text{M}+\text{H}]^+$ bzw. $[\text{M}-\text{H}]^-$ -Ionen wurden während des HPLC-Laufes gemessen. Die Kollisionsenergie ist jeweils angegeben. Als Kollisionsgas diente Argon, der Kollisionsdruck betrug ca. $1,5 \times 10^{-3}$ Torr. Die SRM-Messungen zur Bestimmung von **27**, **117** und **118** wurden während des HPLC-Laufes durchgeführt, indem die Übergänge des korrespondierenden $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ions zum korrespondierenden Hauptfragmentation (m/z 115 bei **117** und **118**, m/z 199 bei **27**) gemessen wurden. Die Kollisionsenergien betragen -30 eV (**117** und **118**) und -20 eV (**27**). Alle Massenspektren sind gemittelt und untergrundkorrigiert. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Berechnung der Peakflächen aus den HPLC-ESI/SRM-

Daten bezogen auf die der einzelnen Substanzen (**27**, **117** und **118**), welche als externe Standards benutzt wurden.

HR-ESI-CID-QqTOF-Massenspektren

Hochaufgelöste Massenspektren nach kollisionsinduzierter Fragmentierung (CID) der durch Elektrospray-Ionisierung (ESI) erhaltenen Molekülionen wurden mit einem API QSTAR Pulsar Quadrupol Gerät mit orthogonal angeordnetem Flugzeit-Massenspektrometer (TOF-MS, Applied Biosystems/MDS Sciex) aufgenommen.

Gaschromatographie gekoppelt mit massenselektivem Detektor (GC-MS)

GC-Massenspektren wurden mit einem Voyager/Trace GC 2000-ThermoQuest GC-MS-System, welches eine 70 eV EI-Quelle mit 200 °C Temperatur, eine DB-5MS-Säule (J&W, 30 m×0,25 mm, 0,25 µm Filmdicke), eine Injektionstemperatur von 250 °C, eine Interface-temperatur von 300 °C, als Trägergas Helium und eine Flussrate von 1,0 ml/min besitzt, aufgenommen. Folgendes Säulentemperaturprogramm wurde verwendet: 1 min 60 °C, dann mit einer Rate von 5 °C/min auf 300 °C und schließlich 15 min bei 300 °C isotherm erhitzt. Zur Bestimmung von **33** wurden während des GC-Laufes die Ionen m/z 128, 160, 188, 189 und 318 gemessen (SIM).

IR, UV, CD, $[\alpha]$, Fluoreszenz, AAS

IR-Spektren wurden an einem Thermo Nicolet 5700 FT-IR Spektrometer auf einem ATR Kristall (Diamant), UV-Spektren an einem Jasco V-560 UV/vis Spektrometer und CD-Spektren an einem Jasco J-815 CD Spektrometer gemessen. Die spezifischen Drehwerte wurden an einem Jasco DIP-1000 Polarimeter gemessen und die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Perkin-Elmer MPF-44 Fluoreszenzspektrometer aufgenommen. Die quantitative Bestimmung des Eisengehaltes erfolgte mit einem AA800 Atomabsorptionsspektrometer.

Dünnschichtchromatographie

Analytische Dünnschichtchromatographie wurde auf Aluminiumfolien beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) und präperative Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigglasplatten beschichtet mit Kieselgel 60 F₂₅₄ (2 mm Schichtdicke, Merck) durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm und 366 nm. Angegeben werden die R_f -Werte und das entsprechende Laufmittelgemisch. Folgende Laufmittelsysteme wurden verwendet:

LM 1: n -BuOH / HOAc / H₂O : 4 / 1 / 1 (V / V)

LM 2: EtOAc / MeOH / H₂O : 6 / 1 / 1 (V / V)

LM 3: CHCl₃ / MeOH : 95 / 5 (V / V)

Säulenchromatographie

Säulenchromatographie wurde in zylindrischen Glassäulen mit Frittenboden an RP-2 modifiziertem Kieselgel (Merck), Sephadex LH20 (Pharmacia) und Diaion HP-20 (Suppelco) durchgeführt.

HPLC

Präparative HPLC-Trennungen wurden an einem Varian ProStar 218 System, ausgestattet mit einem PrepStar 330 Photodiodenarray-Detektor, durchgeführt. Zur analytischen Trennung innerhalb der LC-ESI-MS-Messungen wurde wie o. a. ein Surveyor Micro-HPLC System verwendet. Folgende Säulen:

Säule 1: Nucleosil 100-7 C-18 (7 μm , 250×21 mm ID, Macherey & Nagel)

Säule 2: ODS C-18 (5 μm , 150×20 mm ID, YMC)

Säule 3: Ultrasep ES RP18E (5 μm , 100×1 mm ID, SepServ)

wurden bei folgenden Gradienten verwendet:

Gradient 1: isokratischer Fluss: 0–30 min, A = H₂O + 0,2 % TFA, B = MeCN + 0,2 % TFA, Flussrate 27 ml/min

Gradient 2: linearer Gradient: 0–20 min, 3 %–25 % B, danach 20–30 min 25 %–100 % B, A = H₂O, B = MeCN, Flussrate 20 ml/min

Gradient 3: linearer Gradient: 0–10 min, 10 %–90 % B, A = H₂O + 0,2% HOAc, B = MeCN + 0,2 % HOAc gefolgt von 15 min isokratischem Fluss, Flussrate 50 $\mu\text{l}/\text{min}$

Mikrotiterplattenreader

Folgende Mikrotiterplattenreader wurden in den einzelnen Biotests verwendet:

Co. coccodes-Wachstumsassay:

MRX Plate Reader 1.12 (Dynatech Laboratories)

P. infestans-Wachstumsassay:

Cytofluor II MP Fluorescence Reader (Biosearch)

AChE-Inhibierungs-, *E. coli*-, *B. subtilis*-Wachstums-, *V. fischeri*-Biolumineszenz-, DPPH-Radikalfänger-Assay:

GeniosPro Plate Reader (Tecan)

A β -Oligomerisierungsassay:

Polar Star (BMG LABTECH)

7.2 Chemikalien

Alle benutzten Lösungsmittel wurden vor der Benutzung destilliert. Reinstwasser wurde mit einer Umkehrosmose-Anlage (Millipore) erhalten.

7.3 Pilzmaterial

Das Pilzmaterial für die Isolierung der innerhalb dieser Arbeit beschriebenen Pilzinhaltsstoffe (Tab. 7.1.) und das SRM-Screening auf **27**, **117** und **118** (Tab. 7.2.) lag entweder tiefgefroren (-20 °C), gefrier- oder luftgetrocknet vor. Herbarbelege sind im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) hinterlegt.

Tab. 7.1. Für die Isolierung der Inhaltsstoffe benutztes Pilzmaterial.

| Pilz | Fundort | Datum | Habitat | leg. / det. | Koll. |
|---------------------------------|------------------------------|------------|--------------|---------------------------|------------|
| <i>Cortinarius brunneus</i> | Kelheim, Bayern | 19.09.2000 | <i>Picea</i> | Arnold / Arnold | 10/00 (fd) |
| <i>Cortinarius brunneus</i> | Kelheim, Bayern | 19.09.2000 | <i>Picea</i> | Arnold / Arnold | 11/00 (fd) |
| <i>Cortinarius brunneus</i> | Teufelswinkel, Bayern | 23.09.2000 | <i>Picea</i> | Arnold / Arnold | 38/00 (fd) |
| <i>Cortinarius subtortus</i> | Freudenstadt, Bad.-Württemb. | 03.10.2006 | <i>Picea</i> | Arnold / Arnold | 37/06 (fr) |
| <i>Hygrophorus eburneus</i> | Freyburg, S.-Anhalt | 14.10.2003 | <i>Fagus</i> | Teichert, Lübken / Arnold | 18/03 (fr) |
| <i>Hygrophorus hyacinthinus</i> | Ingolstadt, Bayern | 06.10.2000 | <i>Picea</i> | Arnold / Arnold | 71/00 (fr) |
| <i>Hygrophorus discoxanthus</i> | Karlstadt, Bayern | 31.10.2000 | <i>Fagus</i> | Arnold / Arnold | 74/05 (fr) |

fr: tiefgefroren; fd: gefriergetrocknet

7.4 Extraktion und Reinigung

7.4.1 *Cortinarius brunneus*

7.4.1.1 Substanzen 27–30, 36, 55, 57, 58, und 62

125 g gefriergetrocknete Fruchtkörper (Koll. 10/00 und 11/00) wurden in einem Mixer pulverisiert und anschließend zweimal mit 2 l 80 % wässrigem MeOH ca. 1 h im Ultraschallbad bei Raumtemperatur extrahiert. Die gelbbraune Lösung wurde *in vacuo* bei max. 40 °C eingeengt. Der Rohextrakt (6,1 g) wurde zunächst an Diaion HP-20 adsorbiert und sequentiell mit H₂O und MeOH vorfraktioniert. Die fluoreszierenden methanolischen Fraktionen wurden anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel RP2 und Sephadex LH20-Material vorgereinigt. Anhand abschließender präparativer HPLC (Säule 2, Gradient 2) wurden 1,5 mg Brunnein A (**27**, $R_t = 11,0$ min), 0,5 mg Brunnein B (**28**, $R_t = 5,9$ min), 0,5 mg Brunnein C (**29**, $R_t = 4,9$ min), 0,6 mg 3-(7-Hydroxy-9H- β -carbolinyl)-propionsäure (**30**, $R_t = 14,9$ min), 3,1 mg Tryptophan (**36**, $R_t = 8,5$ min), 1,2 mg 7,8-Dimethylbenzo[g]pteridin-2,4(1H, 3H)-dion (**55**, $R_t = 23,0$ min), 8,2 mg 3-Methoxy-L-tyrosin (**57**, $R_t = 4,0$ min), 0,5 mg 6-Hydroxy-1H-indol-3-carbaldehyd (**58**, $R_t = 13,5$ min),

1,0 mg Anthranilsäure (**62**, $R_t = 12,5$ min), 5,2 mg Adenosin ($R_t = 7,3$ min) und 1,2 mg Uridin ($R_t = 3,8$ min) erhalten.

7.4.1.2 Substanzen 47–51, 59–61

77 g gefriergetrocknete Fruchtkörper (Koll. 38/00) wurden in einem Mixer pulverisiert und anschließend zweimal mit 3 l 80 % wässrigem MeOH ca. 1 h im Ultraschallbad und danach auf einem Schüttler ca. 15 h bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der dunkelbraune Rückstand (8,4 g) wie unter Abschnitt 7.4.1.1 beschrieben aufgereinigt, um letztlich 1,8 mg von **47** ($R_t = 18,0$ min), 1,4 mg von **48** ($R_t = 14,9$ min), 2,6 mg von **49** ($R_t = 14,0$ min), 1,2 mg von **50** ($R_t = 22,0$ min), 2,3 mg von **51** ($R_t = 12,9$ min), 2,0 mg von **59** ($R_t = 5,2$ min), 3,9 mg von **60** ($R_t = 4,9$ min) und 1,2 mg von **61** ($R_t = 8,1$ min) mittels präparativer HPLC (Säule 2, Gradient 2) zu erhalten.

7.4.1.3 (Semi-)synthetische Derivate

N-Methylbrunnein A (**152**): 3 mg Brunnein A **27** wurden in MeOH gelöst und mit 3,4 mg MeI 12 h unter Rückfluss erhitzt. Das erhaltene Gemisch wurde anschließend mittels präparativer HPLC (Säule 2, Gradient 2) getrennt, wobei 0,3 mg **152** ($R_t = 23,5$ min) erhalten wurden.

(-)-(3*S*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**37**): 10 g L-Tryptophan (**36**) wurden in 500 ml 0,1 M NaOH gelöst. Anschließend wurden 6 ml 37 % Formaldehyd-Lösung zugeben, auf 38 °C erwärmt und 15 h unter Rühren umgesetzt. Nach dem Abkühlen auf 25 °C und dem Einstellen des pH auf 6,5 wurde das ausgefallene Precipitat mit kaltem Wasser mehrmals gewaschen.

(+)-(3*R*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (**39**): Die Darstellung erfolgte in analoger Weise wie für **37** beschrieben. Als Ausgangsstoff diente allerdings D-Tryptophan (**38**).

7.4.1.4 Oxidativer Abbau zur Konfigurationsbestimmung

2,44 mg Brunnein A (**27**) wurden zusammen mit 0,1 mg $\text{RuCl}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ unter Rühren zu einem Zweiphasengemisch bestehend aus 100 μl MeCN, 100 μl CCl_4 und 200 μl Na-Pi-Puffer (1,38 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml H_2O ; pH 6) bei RT gegeben. Über einem Zeitraum von 60 min wurden insgesamt 25,7 mg NaIO_4 unter Rühren bei RT zugegeben. Nach 1,5 h Rühren wurde mit 700 μl H_2O ausgeschüttelt, die wässrige Phase zweimal mit 300 μl CHCl_3 gewaschen und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 2,5 ml MeOH suspendiert und durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen befreit. Für die Veresterung wurden 70 μl SOCl_2 tropfenweise zur methanolischen Lösung bei 0 °C unter Rühren gegeben. Nach 12 stündigem Ruhen der Lösung bei RT wurden abermals 70 μl SOCl_2 unter Rühren zugegeben. Nach 6 h wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand in einer Lösung aus 500 μl CH_2Cl_2 und 100 μl einer 0,2 M (*R*)-MTPA-Cl Lösung in CH_2Cl_2 aufgenommen. Anschließend wurden ca. 20 μl NEt_3 bis zur basischen Reaktion

der Lösung zugetropft. Nach nochmaligem Rühren bei RT (30 min) wurden 1 μ l der Lösung direkt in das GC-MS System injiziert und mit einem massenspezifischem Detektor durch eine Selected-Ion-Monitoring Methode (m/z 128, 160, 188, 189, 318) analysiert. Die Referenzsubstanzen D- und L-Asparaginsäure wurden unter gleichen Bedingungen derivatisiert. GC-EI-MS [m/z (rel. Int., %)]: D-Asp-Dimethylester-Mosheramid (R_t 31.3 min): 318 (15), 189 (74), 188 (79), 186 (15), 161 (15), 160 (100), 156 (60), 128 (84), 119 (28), 113 (68), 105 (65), 86 (76), 77 (39), 59 (36); L-Asp-Dimethylester-Mosheramid (**33**, R_t 31.1 min): 318 (9), 189 (61), 188 (64), 186 (10), 161 (10), 160 (100), 156 (43), 128 (82), 119 (20), 113 (51), 105 (50), 86 (69), 77 (29), 59 (27).

7.4.2 *Cortinarius subtortus*

560 g tiefgefrorene Fruchtkörper wurden mit 2 l MeOH in einem Mixer zerkleinert, anschließend 1 h im Ultraschallbad und 15 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur extrahiert. Die rotbraune Lösung wurde *in vacuo* eingeengt (12 g). Der braune Rohextrakt wurde mittels Diaion HP-20 vorfraktioniert (Lösungsmittel: H₂O, MeOH). Die fluoreszierenden wässrig-methanolischen Fraktionen wurden anschließend durch Säulenchromatographie an Kieselgel RP2 mit 50 % wässrigem MeOH und an Sephadex LH20-Material mit 70 % wässrigem MeOH bzw. mittels präparativer DC (LM 1) vorgereinigt. Durch präparative HPLC (Säule 2, Gradient 2) wurden schließlich **63** (2,0 mg, R_t = 9,0 min), **64** (0,8 mg, R_t = 5,8 min), und **65** (0,9 mg, R_t = 2,9 min) erhalten.

7.4.3 *Hygrophorus eburneus*

200 g tiefgefrorene Fruchtkörper wurden in einem Mixer zerkleinert, mit EtOAc entfettet und der Pilzrückstand anschließend erschöpfend mit 2 l MeOH bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Einengung des Lösungsmittels *in vacuo*, wurde der Rohextrakt in Wasser (pH = 2, mit 2 N HCl eingestellt) aufgenommen und mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die organische Phase wurde verworfen und die wässrige Phase mit Ammoniak auf pH = 10 eingestellt. Die basische Lösung wurde erneut mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die hellgelbe organische Phase wurde *in vacuo* eingeengt und mittels präparativer DC (LM 2) vorgereinigt. Durch präparative HPLC (Säule 1, Gradient 1) wurden 1,0 mg Harman (**117**, R_t = 9,9 min) und 1,2 mg Norharman (**118**, R_t = 7,7 min) erhalten.

7.4.4 *Hygrophorus hyacinthinus*

100 g tiefgefrorene Fruchtkörper wurden mit 2 l MeOH in einem Mixer zerkleinert und anschließend 15 h auf einem Schüttler bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rohextrakt durch Säulenchromatographie an Diaion HP-20 und Sephadex LH20 vorgereinigt. Durch Reinigung mittels präparativer HPLC (Säule 2, Gradient 2) wurden 1,0 mg Brunnein A (**27**, R_t = 10,8 min) erhalten.

7.4.5 *Hygrophorus discoxanthus*

280 g tiefgefrorene Fruchtkörper wurden mit 2 l Aceton ohne Zerkleinerung extrahiert. Nach Entfernung des Lösungsmittels *in vacuo* wurde der Rohextrakt in H₂O aufgenommen und mit EtOAc extrahiert. Die EtOAc-Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert, vom Lösungsmittel befreit und anschließend durch Flash-Säulenchromatographie an Kieselgel vorgereinigt. Dazu wurde zunächst das Fließmittelgemisch EtOAc / MeOH / H₂O : 6 / 1 / 1 (V / V) verwendet. Nachfolgend wurde durch Elution mit Aceton/HCl (1 l Aceton + 1 ml 2 N HCl) die grüne Fraktion erhalten, welche nach Verdampfen des Lösungsmittels an Sephadex LH20 (Fließmittelgemisch MeOH / H₂O . 1:1) gereinigt wurde.

7.4.6 LC-ESI/SRM-Screening auf 27, 117 und 118 in *Hygrophorus* spp.

10 g tiefgefrorenes oder 1 g gefriergetrocknetes oder 1g luftgetrocknetes Pilzmaterial (10 g tiefgefrorenes Pilzmaterial entsprechen ca. 1 g gefriergetrocknetem bzw. luftgetrocknetem Pilzmaterial) jeder Kollektion wurden mit 200 ml MeOH bei Raumtemperatur nach vorheriger Zerkleinerung in einem Mixer 1 h im Ultraschallbad extrahiert. Die erhaltenen Lösungen wurden *in vacuo* zur Trockne eingengt, in 1 ml MeOH aufgenommen und sofort ein Aliquot (2 µl) mittels LC-ESI/SRM-Messungen untersucht.

Tab. 7.2. Im LC-ESI/SRM-Screening verwendetes Pilzmaterial

| Pilz | Fundort | Datum | leg. / det. | Koll. |
|-------------------------|-----------------------|------------|---------------------------|-------------|
| <i>H. agathosmus</i> | Oberhof, Bayern | 30.09.2004 | Arnold / Arnold | 03/04 (fr) |
| <i>H. carpini</i> | Freyburg, S.-Anhalt | 14.10.2003 | Huth / Huth | 17/03 (fr) |
| <i>H. chrysoaspis</i> | Regensburg, Bayern | 19.09.1994 | Arnold / Arnold | 09/94 (fr) |
| <i>H. chrysodon</i> | Andechs, Bayern | 29.10.2004 | Arnold / Arnold | 86/04 (fr) |
| <i>H. cossus</i> | Karlstadt, Bayern | 21.10.2004 | Arnold / Arnold | 68/04 (fr) |
| <i>H. discoideus</i> | Andechs, Bayern | 29.10.2004 | Arnold / Arnold | 81/04 (fr) |
| <i>H. discoxanthus</i> | Karlstadt, Bayern | 26.10.2001 | Arnold / Arnold | 82/01 (fr) |
| <i>H. eburneus</i> | Freyburg, S.-Anhalt | 14.10.2003 | Teichert, Lübken / Arnold | 18/03 (fr) |
| <i>H. erubescens</i> | Ingolstadt, Bayern | 06.10.2000 | Arnold / Arnold | 51/00 (fr) |
| <i>H. fuscoalbus</i> | Karlstadt, Bayern | 04.10.1982 | Pilzausstellung | 04/82 (fd) |
| <i>H. gliocyclus</i> | Bad Bibra, S.-Anhalt | 04.11.2002 | Huth / Huth | 70/02 (fr) |
| <i>H. hedrychii</i> | Freyburg, S.-Anhalt | 23.10.2003 | Arnold, Lübken / Huth | 30/03 (fr) |
| <i>H. hyacinthinus</i> | Ingolstadt, Bayern | 06.10.2000 | Arnold / Arnold | 71/00 (fr) |
| <i>H. hypothejus</i> | Offenstetten, Bayern | 29.04.2004 | Arnold / Arnold | 76/04 (fr) |
| <i>H. korhonenii</i> | Trollhättan, Schweden | 17.09.2005 | Stridvall / Stridvall | 35/05 (ad) |
| <i>H. latitabundus</i> | Bad Bibra, S.-Anhalt | 08.11.2003 | Huth / Huth | 42/03 (fr) |
| <i>H. lindtneri</i> | Kallmünz, Bayern | 05.11.2002 | Arnold / Arnold | 96/02 (fr) |
| <i>H. lucorum</i> | Freyburg, S.-Anhalt | 02.11.2002 | Huth / Huth | 65/02 (fr) |
| <i>H. marzuolus</i> | Wien, Österreich | 03. 2003 | Valda / Valda | 01/03 (ad) |
| <i>H. nemoreus</i> | Kelheim, Bayern | 26.10.1994 | Arnold / Habler | 01/94 (fr) |
| <i>H. olivaceoalbus</i> | Neudorf, S.-Anhalt | 30.09.2003 | Lübken / Arnold | 07/03 (fr) |
| <i>H. penarius</i> | Hainichen, S.-Anhalt | 28.09.2004 | Huth / Huth | 04/04 (fr) |
| <i>H. persoonii</i> | Ingolstadt, Bayern | 13.10.1998 | Arnold / Arnold | 325/98 (ad) |
| <i>H. poetarum</i> | Oberalling, Bayern | 10.10.1994 | Besl / Habler | 06/94 (fr) |
| <i>H. pudorinus</i> | Karlstadt, Bayern | 24.10.2001 | Arnold / Arnold | 78/01 (fr) |
| <i>H. pustulatus</i> | Neudorf, S.-Anhalt | 25.11.2003 | Lübken / Arnold | 46/03 (fr) |
| <i>H. russula</i> | Markt Bibart, Bayern | 26.10.2001 | Arnold / Arnold | 77/01 (fr) |
| <i>H. unicolor</i> | Freyburg, S.-Anhalt | 02.11.2002 | Huth / Huth | 61/02 (fr) |

fr: tiefgefroren; fd: gefriergetrocknet; ad: luftgetrocknet

7.5 Verimpfungsexperimente

Es wurden junge Fruchtkörper von *H. latitabundus* in Bad Bibra (S.-Anhalt) unter *Pinus* im Herbst 2006 jeweils mit 5 mg Natrium-(*E*)-8,8,9,9,10,10,11,11,11-nonafluor-4-oxoundec-2-enoat (**129**, gelöst in 200 μ l Leitungswasser) beimpft, indem die Lösung mit einer Spritze von oben durch den Hut in den Stiel appliziert wurde. Die Ernte erfolgte nach 7 Tagen. Die Fruchtkörper wurden anschließend mit Petrolether extrahiert. Unmarkierte Fruchtkörper dienten als Kontrolle und wurden in analoger Weise aufgearbeitet.

7.6 Biologische Aktivitätsbestimmungen

7.6.1 Bestimmung der antifungischen Aktivität gegen *Colletotrichum coccodes*

Der Biotest wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Rosahl und Mitarbeitern innerhalb der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie durchgeführt.

Die Untersuchung der Hemmung des Myzelwachstums erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten und basierte auf einer Messung der Optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 590 nm ($OD_{590\text{ nm}}$), hervorgerufen durch das Wachstum. *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes wurde zwei Tage in einem Soja-Medium nach Yu *et al.* (1997) kultiviert. Dazu wurden 50 ml Soja-Medium in einem 200 ml Erlenmeyerkolben mit Pilzmyzel beimpft und auf einem Schwenker bei 18 °C für 5 Tage inkubiert. Um für den Biotest jeweils eine vergleichbare Ausgangsmenge an Pilzmaterial zu verwenden, wurde die Kultur in einem 50 ml Falcontube 5 min bei 2100 g zentrifugiert. 30 ml des Überstandes wurden in ein neues Falcontube pipettiert, mit sterilem H₂O auf 50 ml aufgefüllt und erneut 10 min bei 9600 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Sporenpellet in frisches Soja-Medium überführt und auf eine Sporendichte von 10⁵ Sporen/ml eingestellt. 200 μ l dieser Sporensuspension wurden pro Well (\approx 20000 Sporen) im Biotest eingesetzt. Nach 24 Stunden und einsetzender Sporulierung in der Mikrotiterplatte bei 17 °C wurden jeweils 20 μ l einer Lösung mit den zu testenden Substanzen (in EtOH) in einer Endkonzentration von 10⁻⁹ bis 10⁻³ M zur Pilzsuspension in das jeweilige Well gegeben. Die $OD_{590\text{ nm}}$ des jeweiligen Testansatzes wurde alle 24 Stunden bis zum Erreichen eines Wachstumsplateaus (Negativkontrolle) gemessen. Nach 6 Tagen Inkubation wurde die Hemmung des Myzelwachstums für die jeweilige Testsubstanz nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{OD_{590\text{ nm}}(\text{Testsubstanz})_{6\text{ d}} - OD_{590\text{ nm}}(\text{Testsubstanz})_{0\text{ d}}}{OD_{590\text{ nm}}(\text{LM-Kontrolle})_{6\text{ d}} - OD_{590\text{ nm}}(\text{LM-Kontrolle})_{0\text{ d}}} \times 100 \%$$

Soja-Medium

| | |
|--|-------------|
| Saccharose | 20 g |
| Soja-Protein | 5 g |
| KNO ₃ | 5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 5 g |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 2 g |
| CaCl ₂ × 2 H ₂ O | 0,5 g |
| CuSO ₄ × 5 H ₂ O | 0,05 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |
| pH-Wert vor dem Autoklavieren 5,0 | |

Die EC₃₅- bzw. EC₅₀-Werte der Testsubstanzen wurden nach dem sigmoidalen Dosis-Wirkungsmodell mit variablem Hill-Koeffizient mittels der Software Sigma Plot 10.0 berechnet. Die Substanzen wurden jeweils in Triplikaten in zwei unabhängigen Experimenten untersucht. Als Lösungsmittelkontrolle diente EtOH in einer Endkonzentration von 10 % im Testansatz. Benomyl und 8-Hydroxychinolinsulfat (**156**) wurden als Positivkontrolle benutzt.

7.6.2 Bestimmung der antifungischen Aktivität gegen *Cladosporium cucumerinum*

Die antifungische Aktivität gegen den pflanzenpathogenen Pilz *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth wurde nach der Methode von Gottstein *et al.* (1982) bestimmt. Handgezogene DC-Platten (Glasplatten, 20×20 cm, Kieselgel 60 HF₂₅₄ für DC, Fa. Merck, Schichtdicke 0,5 mm) wurden bei 120 °C 30 min im Trockenschrank aktiviert. Die Reinstoffen wurden in geeigneten Lösungsmittel gelöst und in einer Konzentrationsreihe als einzelne Punkte (Durchmesser 1 cm, entspricht einer Auftragsfläche von 78 mm²) auf die DC-Platte mit einer Mikroliterspritze aufgetragen. Anschließend wurde die Platte im Luftstrom getrocknet, um restliche Lösungsmittel abzdampfen. Die Platte wurde im liegenden Zustand gleichmäßig mit ca. 10 ml Sporensuspension von *Cl. cucumerinum* (Sporendichte ca. 2,5×10⁶ Sporen/ml) besprüht. Diese wurde aus 25 ml Hefelösung und einem Myzelrasen (ca. 25 cm²) der *Cl. cucumerinum* Oberflächenkultur unter Ablösen der Sporen durch Schütteln hergestellt. Danach wurde die Platte bei Raumtemperatur einige Minuten getrocknet. Anschließend wurde die Platte in eine mit wassergetränktem Filterpapier ausgekleidete DC-Kammer gestellt, diese mit einem Deckel verschlossen und bei 25 °C in einem Brutschrank aufbewahrt. Nach etwa zwei Tagen hatte sich ein grauer Myzelbelag über der DC-Platte gebildet. Stellen mit antifungisch wirkenden Substanzen waren als weiße Hemmhöfe detektierbar und konnten zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) herangezogen werden. Dabei ist zu beachten, dass nur Substanzen vergleichbarer Diffusion auf der Platte direkt in ihrer Bioaktivität verglichen werden dürfen. Benomyl diente als Positivkontrolle (MHK = 40 ng). Zur Kultivierung von *Cl. cucumerinum* wurde eine Hefelösung nebenstehender Zusammensetzung verwendet (für Oberflächenkulturen zstzl. 1 % Agar).

| Hefelösung | |
|--|-------------|
| Mannitol | 50 g |
| Saccharose | 50 g |
| Bernsteinsäure | 5,4 g |
| Hefe-Extrakt | 3,0 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,1 g |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,3 g |
| FeSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,01 g |
| ZnSO ₄ × 7 H ₂ O | 0,0044 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |
| pH-Wert vor dem Autoklavieren 5,4 | |

7.6.3 Bestimmung der antioomycetischen Aktivität gegen *Phytophthora infestans*

Der Biotest wurde in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Rosahl und Mitarbeitern innerhalb der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie durchgeführt. Für die Be-

stimmung antioomycetischer Aktivitäten wurde *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (Stamm CRA 208) verwendet, welcher freundlicherweise von Herrn Prof. F. Mauch, Université de Fribourg, zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Stamm war mit einem GFP (Green Fluorescent Protein)-Gen transformiert und exprimierte GFP in allen Entwicklungsstadien (Si-Ammour *et al.* 2003). Somit konnte die Intensität der GFP-Fluoreszenz als vitaler Marker zur *Phytophthora*-Biomassebestimmung genutzt werden. *P. infestans* wurde auf Hafer-Bohnen-Agar kultiviert.

Für die Gewinnung der Zoosporen, wurde eine 11 Tage alte Kultur mit 10 ml sterilem Wasser übergossen und kräftig geschüttelt, um die Sporangien abzulösen. Anschließend wurde die Lösung durch ein feinmaschiges Sehtuch gegossen und die Sporangiensuspension auf 1×10^5 Sporangien/ml eingestellt. 100 μ l dieser Suspension wurden auf festen Hafer-Bohne-Agar (1 ml pro Well) in eine 24er-Multiwellplatte pipettiert und die Platten anschließend bei 18 °C im Dunkeln inkubiert. Nach 24 h wurden 100 μ l einer Lösung der zu testenden Substanzen in jedes Well pipettiert. Die Zunahme an GFP wurde durch Messung der Fluoreszenzintensitäten (FU) ($\lambda_{\text{exc}} = 485 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$) sofort nach Zugabe der Testsubstanzen (t_0) und dann alle 24 h (t_n) bestimmt. Die Hemmung des Hyphenwachstums nach 8 Tagen Inkubation wurde wie folgt berechnet:

| Hafer-Bohne-Agar | |
|----------------------|-------------|
| Bohnenmehl | 34 g |
| Hafermehl | 17 g |
| Saccharose | 8,5 g |
| Agar | 15 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{FU}(\text{Testsubstanz})_{8\text{ d}} - \text{FU}(\text{Testsubstanz})_{0\text{ d}}}{\text{FU}(\text{LM-Kontrolle})_{8\text{ d}} - \text{FU}(\text{LM-Kontrolle})_{0\text{ d}}} \times 100 \%$$

Benomyl diente als Positivkontrolle ($\text{EC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) und EtOH (1 % Endkonzentration im Testansatz) als Lösungsmittelkontrolle.

Die Gewinnung der Zoosporen für den Keimungshemmtest erfolgte in gleicher Weise. Allerdings wurde die Sporangiensuspension zum Entlassen der Zoosporen für 3 h bei 4 °C aufbewahrt. Anschließendes Filtrieren durch ein Sehtuch erzeugte eine Sporensuspension, die daraufhin auf 1×10^5 Sporen/ml eingestellt wurde. Die Testsubstanzen wurden in EtOH gelöst und zur eingestellten Sporensuspension pipettiert, so dass die jeweiligen Endkonzentrationen an Testsubstanz und EtOH (1 %) erreicht wurden. Die Ansätze wurden 10 h bei 4 °C inkubiert. Nachfolgend wurden jeweils Proben der Ansätze mit einem Lichtmikroskop (Leitz DM IL, Leica) auf die Sporenkeimung untersucht. Dazu wurden von jeder Probe mindestens vier verschiedene Photos (Vergrößerung 50-100fach) mit einer CDD-Kamera (Nikon D1x) erstellt. Der Keimungszustand von mindestens 50 Zoosporen pro Photo wurde analysiert. Sporen mit einem Keimungsschlauch länger als die Spore selbst wurden als „gekeimt“ gezählt. Angegeben wurde der Anteil gekeimter Sporen zur Gesamtsporenanzahl.

Im *in vivo* Sprühtest wurden Kartoffelpflanzen der Sorte Désirée (Wildtyp) verwendet. Auf jeweils 2 Blätter (Unterseite) zweier Kartoffelpflanzen (21 Tage alt) wurden 30 μl einer wässrigen Lösung unterschiedlichen Gehaltes an Natrium-4-Oxohehexadec-2-enoat (**104a**) gesprüht. Nach dem Verdampfen des Wassers wurden die Blattunterseiten mit einer *P. infestans* Sporensuspension (1×10^5 Sporen/ml) inokuliert, indem pro Blatt jeweils 6 Tropfen (10 μl) auf unterschiedliche Stellen der Blattunterseite pipettiert wurden. Anschließend wurden um die Testblätter Folienbeutel gebunden, um ein optimales Wachstumsmilieu für *P. infestans* zu bilden. Nach 4 Tagen Inkubation in einer Phytokammer (16 h Licht, 8 h Dunkel; im Licht 22°C, im Dunkeln 18°C) wurden jeweils 4 Inokulationsstellen pro Testblatt mit einem Korkbohrer ausgestanzt (ca. 0,5 cm Durchmesser), in flüssigem Stickstoff verwahrt und gemörsert. Anschließend wurde die DNA mittels DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Zusätzlich wurden 5 μl eines 1:1000 verdünnten Plasmids (457 bp langes Fragment des *StrbohB*-Gens im pCR2.1-Vektor) als externer Standard zur jeweiligen Probe hinzugegeben.

Die Realtime-PCR Bestimmung des Wachstums von *P. infestans* wurde nach der Methode von Eschen-Lippold *et al.* (2007) bestimmt. Dazu wurde ein ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet und die Messdaten mit der zugehörigen Software (ABI Prism 7000 Sequence Detection-Software) ausgewertet. Als Enzym-Mastermix wurde der Taqman[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) und als *P. infestans*-spezifische Sonde eine Taqman[®]-MGB-NFQ-Sonde (Applied Biosystems, Darmstadt) mit einer Länge von 15 Basen (PIO8-3-3M1: 6-FAM-5'-CGTACGGCCAATGTA-3'-MGB-NFQ) verwendet. Das verwendete PCR-Programm begann mit 10 min bei 95 °C (Denaturierung) und wiederholte dann 40 Zyklen mit 15 s bei 95 °C (Denaturierung) und 1 min bei 60 °C (Anlagerung und Elongation). Die Produktmenge wurde nach jedem Elongationsschritt bestimmt, wobei die Fluoreszenz der Proben ($\lambda_{\text{exc}} = 494 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$) gemessen wurden. Eine mitgeführte Verdünnungsreihe des pPiO8-Plasmids, bzw. des Plasmidstandards ermöglichte dann die Bestimmung der relativen Quantität der Proben.

7.6.4 Bestimmung der antibakteriellen Aktivität gegen *Vibrio fischeri*

Für die Akut- und Verzögerungstoxizitätstests wurden tiefgefrorene Kulturen von *Vibrio fischeri* (Stamm NRRL-B-11177) des LUMISTox-Testkits (Lange) verwendet. Zur Reaktivierung der bei -20 °C gelagerten Bakterien wurden diese mit 100 ml Seewassermedium nach Froehner (2000) für 15 min bei Raumtemperatur revitalisiert.

Für den Schnelltest (Akuttoxizität) wurden jeweils 100 μl dieser Bakteriensuspension gemeinsam mit 100 μl Testsubstanzlösung in den jeweiligen Endkonzentrationen (1 % MeOH) in die Kavitäten einer weißen 96well-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend bei 25 °C inkubiert. Nach 30 min wurde die Lumineszenz der jeweiligen Testansätze gemessen.

Der Langzeittoxizitätstest fand unter den gleichen Bedingungen statt. Lediglich der Messzeitpunkt wurde von 30 min auf 24 Stunden verlängert, um eventuelle Eingriffe der zu testenden Substanzen in die Bakterienzellteilung zu berücksichtigen. Die Lumineszenzinhibierungen wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{LU}(\text{Testsubstanz})_n - \text{LU}(\text{Testsubstanz})_0}{\text{LU}(\text{LM-Kontrolle})_n - \text{LU}(\text{LM-Kontrolle})_0} \times 100 \%$$

(n = 30 min oder 24 h)

| SSWC-Medium (Nealson 1987) | |
|--|-------------|
| NaCl | 30,0 g |
| NaH ₂ PO ₄ | 5,3 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2,1 g |
| (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgSO ₄ | 0,1 g |
| Glycerol | 3 ml |
| Pepton | 5,0 g |
| Hefeextrakt | 0,5 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

| Salzwasserlösung (Ziesenis & Grabert 1995) | |
|---|-------------|
| Glucose | 0,5 g |
| NaCl | 20,0 g |
| MgCl ₂ × 7 H ₂ O | 1,0 g |
| KCl | 0,015 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

Seewassermedium nach Froehner *et al.* (2000) beinhaltet die getrennt zu autoklavierenden Lösungen SSWC-Medium + Salzlösung (1+1).

Als Positivkontrolle dienen Streptomycinsulfat (EC_{50} (30 min-Assay) > 100 µg/ml; EC_{50} (24 h-Assay) = 0,97 µg/ml bzw. 0,67 µM) und Benzalkoniumchlorid (EC_{50} (30 min-Assay) < 0,01 µg/ml). EtOH (10 % Endkonzentration) war die Lösungsmittelkontrolle.

7.6.5 Bestimmung der antibakteriellen Aktivität gegen *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

Es wurden Bakterien der Stämme *Escherichia coli* (DSM 8539) und *Bacillus subtilis* (DSM 1088) von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen verwendet. Die Stammhaltung erfolgte als Flüssigkulturen bei 8 °C. Für den Biotest wurde die jeweilige Bakterienkultur mit frischem Nährmedium, mit unten aufgeführter Zusammensetzung, versetzt und 24 h bei 25 °C zur Revitalisierung inkubiert. Die im Biotest benutzte Bakteriensuspension, wurde mit dem jeweiligen frischen Nährmedium zuvor auf 100 FTU (Formazin Trübungseinheiten) eingestellt. Dies entsprach einem OD_{570 nm}-Wert von 0,088 und einer Zelldichte für *E. coli* von 7×10⁷ CFU/ml und für *B. subtilis* von 4×10⁷ CFU/ml.

| Luria-Bertani-Medium (<i>E. coli</i>) | |
|--|-------------|
| Trypton | 10,0 g |
| Hefeextrakt | 5,0 g |
| NaCl | 10,0 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

| Nutrient-Medium (<i>B. subtilis</i>) | |
|---|-------------|
| Pepton | 5,0 g |
| Fleischextrakt | 3,0 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

Für den Biotest wurden jeweils 100 µl der eingestellten Bakteriensuspension, 100 µl Substanzlösung (10 % EtOH Endkonzentration im Testansatz) und 800 µl frisches Nähr-

medium in jeweils eine Kavität einer transparenten 24er Multiwell Platte pipettiert. Nach 14 h Inkubation bei 25 °C auf einem Schüttler wurden die OD_{570 nm}-Werte in jeder Kavität durch Mehrpunktmessungen mit einem Mikrotiterplattenreader bestimmt. Die Wachstumssinhibierung wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{OD}_{570\text{nm}}(\text{Testsubstanz})_{14\text{ h}} - \text{OD}_{570\text{nm}}(\text{Testsubstanz})_0}{\text{OD}_{570\text{nm}}(\text{LM-Kontrolle})_{14\text{ h}} - \text{OD}_{570\text{nm}}(\text{LM-Kontrolle})_0} \times 100 \%$$

Amikacin diente als Positivkontrolle ($\text{EC}_{50} (E. coli) = 0,43 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,63 \mu\text{M}$; $\text{EC}_{40} (B. subtilis) = 0,22 \mu\text{g/ml}$ bzw. $0,32 \mu\text{M}$) und EtOH (10 % Endkonzentration im Testansatz) als Lösungsmittelkontrolle.

7.6.6 Bestimmung der algitoxischen Aktivität gegen *Spirulina laxissima* und *Scenedesmus rubescens*

Spirulina laxissima G. S. West (SAG 256.80) und *Scenedesmus rubescens* (Dangeard) Kessler (SAG 5.95) wurden von der Algensammlung der Universität Göttingen bezogen.

Die Stammhaltung beider Algenarten erfolgte auf Agarplatten (1,5 % Agar-Agar pro Nährmedium in sterilen Petrischalen) bei Raumtemperatur unter Tageslichteinfluss und bei normalem Tag-Nacht-Rhythmus. Die weitere Kultivierung zur Biomassesteigerung erfolgte in Flüssignährmedien unter optimaler künstlicher Beleuchtung, Begasung und Bewegung (Temperatur: 22–24 °C; Lichtintensität: $70 \mu\text{mol/ m}^2 \times \text{s}$; Hell/Dunkelrhythmus: 15/9 h). Die Algensuspensionen wurden vor dem Besprühen durch Zentrifugation auf eine Zellzahl von ca. 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Handgezogene DC-Platten (Glasplatten, 20×20 cm, Kieselgel 60 HF₂₅₄ für DC, Fa. Merck, Schichtdicke 0,5 mm) wurden bei 120°C 30 min im Trockenschrank aktiviert. Die Rohextrakte bzw. Reinsubstanzen wurden in üblicher Weise auf die DC-Platte aufgetragen (Kapillare oder Mikroliterspritze). Entweder wurde eine Konzentrationsreihe angelegt und die zu testenden Substanzen als einzelne Punkte (Durchmesser 1 cm, entspricht einer Auftragsfläche von 78 mm^2) aufgetragen (Punktplatte) oder der zu testende Extrakt wurde chromatographisch aufgetrennt (LM 2; LM 3). Anschließend wurde die Platte jeweils getrocknet, um restliche Lösungsmittel abzdampfen. Jede Platte wurde im liegenden Zustand gleichmäßig mit ca. 15 ml Algensuspension von *Sp. laxissima* oder *Sc. rubescens* besprüht. Danach wurden die Platten bei Raumtemperatur einige Minuten getrocknet. Anschließend wurden die Platten erhöht in eine Photoschale gelegt, deren Boden zur Erhöhung der Luftfeuchtigkeit mit Wasser befüllt war (ca. 3 mm Wasserstand). Die Schale wurde mit einem klaren Glasdeckel verschlossen und bei 20 °C in einem Lichtraum aufbewahrt. Nach etwa vier bis fünf Tagen Inkubationszeit hatten sich die Platten durch Vergrößerung der Algenbiomasse jeweils kräftig grün gefärbt. Stellen mit algitoxisch wirkenden Substanzen waren als weiße Hemmhöfe detektierbar und konnten zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) herangezogen werden. Dabei ist zu beachten, dass nur Substanzen vergleichbarer

Diffusion auf der Platte direkt in ihrer Bioaktivität verglichen werden dürfen. Zur Kultivierung der Algen wurden folgende Nährmedium verwendet:

| OSM (<i>Sp. laxisima</i>) | |
|---|--------|
| Lösung A | |
| Künstliches Seewasser | 50 ml |
| KNO ₃ -Lösung (50g KNO ₃ in 1 l dest. Wasser) | 10 ml |
| Met.DS-A-Lösung | 20 ml |
| Lösung B | |
| Met.DS-B-Lösung | 20 ml |
| K ₂ HPO ₄ -Lösung (5g K ₂ HPO ₄ × 3H ₂ O / 1 l dest. Wasser) | 20 ml |
| Destilliertes Wasser | 40 ml |
| Lösung C | |
| NaHCO ₃ | 13,6 g |
| Na ₂ CO ₃ | 0,4 g |
| destilliertes Wasser | 840 ml |
| Lösungen A, B und C getrennt autoklavieren und nach dem Abkühlen zusammen geben. | |

| künstliches Seewasser | |
|--|-------------|
| NaCl | 28,13 g |
| KCl | 0,77 g |
| CaCl ₂ × 2 H ₂ O | 1,60 g |
| MgCl ₂ × 6 H ₂ O | 4,80 g |
| NaHCO ₃ | 0,11 g |
| MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 3,50 g |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

| Setlik (<i>Sc. rubescens</i>) | |
|--|-------------|
| KNO ₃ | 2020 mg |
| KH ₂ PO ₄ | 340 mg |
| MgSO ₄ × 7H ₂ O | 990 mg |
| Na-Fe-EDTA | 18,5 mg |
| Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O | 10,0 mg |
| H ₃ BO ₃ | 3,09 mg |
| MnSO ₄ × H ₂ O | 0,82 mg |
| CoSO ₄ × 7 H ₂ O | 2,54 mg |
| CuSO ₄ × 5 H ₂ O | 1,24 mg |
| ZnSO ₄ × 7 H ₂ O | 2,55 mg |
| (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ × 4 H ₂ O | 1,84 mg |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

| Met-DS-A-Lösung | |
|---|-------------|
| MnCl ₂ × 4 H ₂ O | 20 mg |
| ZnSO ₄ × 7 H ₂ O | 5 mg |
| CoSO ₄ × 7 H ₂ O | 5 mg |
| Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O | 5 mg |
| CuSO ₄ × 5 H ₂ O | 0,5 mg |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

| Met-DS-B-Lösung | |
|---|-------------|
| FeCl ₃ × 6 H ₂ O | 200 mg |
| Na ₂ EDTA × 2 H ₂ O | 275 mg |
| destilliertes Wasser | auf 1000 ml |

7.6.7 Bestimmung der Radikalfängereigenschaften im DPPH Biotest

Die Bestimmung der Radikalfängereigenschaften wurde in einem DPPH Free Radical Scavenger Bioassay in 96well Mikrotiterplatten in einer modifizierten Ausführung der Methoden nach Blois (1958) und Mohamad *et al.* (2004) durchgeführt. Zunächst wurden 20 µl methanolische Lösung der zu testenden Substanzen in die einzelnen Wells der Mikrotiterplatten pipettiert und die Absorption der Lösungen in jedem Well bei einer Wellenlänge von 520 nm bestimmt (A_T). Anschließend wurden jeweils 180 µl einer Lösung von 10,3 mg 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazylradikal in 50 ml MeOH dazugegeben und die Gemische unter Schütteln der Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Danach wurde die Absorption jeder Lösung (A_{DT}) bei gleicher Wellenlänge erneut gemessen. Die Radikalfängereigenschaften und somit die antioxidativen Eigenschaften der zu testenden Substanzen wurden nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{A_{DT\ 520nm} - A_{T\ 520nm}}{A_{K\ 520nm}} \times 100 \%$$

Ascorbinsäure ($EC_{40} = 45 \mu\text{M}$) diene als Positivkontrolle und MeOH als Lösungsmittelkontrolle (A_K).

7.6.8 Bestimmung der AChE-inhibitorischen Aktivität

Der AChE-Inhibierungsassay wurde nach einer modifizierten Ellman-Methode in 96well Mikrotiterplatten durchgeführt (Rhee *et al.* 2001). Folgende Reagenzlösungen wurden hierfür verwendet:

Puffer A: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1% (v/v) Kälberserum

Puffer B: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 0,1 M NaCl, 0,02 M $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

Acetylthiocholiniodid (ATCI): 15 mM in Millipore-Wasser

5,5'-Bisdithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB): 3 mM in Puffer B

Acetylcholinesterase (AChE): (0,22 U/mL in Puffer A)

Zunächst wurden 25 μl ACTI-Lösung, 125 μl DTNB-Lösung, 50 μl Puffer A und 25 μl Testsubstanzlösung (Konzentrationsreihe 1000 μM bis $10^{-4} \mu\text{M}$ in MeOH oder DMSO) in einer transparenten 96well-Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde die Absorption jeder Kavität bei $\lambda_{405 \text{ nm}}$ bestimmt, um eventuelle Eigenabsorptionen der zu testenden Substanzen bestimmen zu können. Nach Zugabe von 25 μl AChE-Lösung wurde erneut die Absorption jeder Kavität bei $\lambda_{405 \text{ nm}}$ bestimmt. Die Messung wurde mindestens achtmal aller 60 Sekunden bis zum Erreichen eines konstanten Absorptionswertes durchgeführt. Die Differenz der Absorptionswerte vor und nach der Enzymzugabe ergeben die Messpunkte zur Berechnung der AChE-Inhibierung, welche nach folgender Gleichung ermittelt wurde:

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{A_{\text{Testsubstanz}} \times 100}{A_{\text{LM-Kontrolle}}}$$

7.6.9 Bestimmung der $A\beta$ -Peptid-aggregationshemmenden Aktivität

Der Thioflavin T (ThT) Biotest wurde der Methode nach Chalifour *et al.* (2003) folgend in 96well Mikrotiterplatten in Kooperation mit der Fa. Probiobio AG (Halle/Saale) durchgeführt. Es wurde synthetisch hergestelltes $A\beta_{1-40}$ verwendet (Schilling *et al.* 2006). Vor der Analyse wurden die Amyloidpeptide einer Desaggregation nach einer Methode von Dahlgren *et al.* (2002) unterzogen. Dabei wurden die Peptide in HFIP (1 mM) gelöst und das Lösungsmittel anschließend unter Stickstoffstrom wieder verdampft. Die Stammlösung von $A\beta_{1-40}$ wurde in reinem DMSO hergestellt. Solche auf diesem Weg hergestellten $A\beta_{1-40}$ -Lösungen sind oligomerfrei. Die zu untersuchenden Substanzen wurden in 40 mM DMSO gelöst und anschließend 1:50 mit PBS verdünnt. 62,5 μl dieser Substanzlösung, 62,5 μl $A\beta$ -Lösung (50 μM , durch Verdünnung mit PBS aus der Stammlösung hergestellt) und 125 μl ThioflavinT-Lösung (20 μM ThT, 0,3 M NaCl, 0,01 % NaN_3) wurden in eine 96well Mikrotiterplatte pipettiert (250 μl Gesamtvolumen) und in Triplikaten untersucht. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie als Verdunstungsschutz bedeckt und im Mikrotiterplattenreader bei 37 °C insgesamt 300 h inkubiert. Die Fluoreszenz wurde alle 4 Stun

den ($\lambda_{\text{exc}} = 440 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 540 \text{ nm}$) mit einem Mikrotiterplattenreader gemessen. Die $A\beta$ -Oligomerisierungshemmungen wurden gemäß der Gleichung

$$\text{Hemmung [\%]} = 100 - \frac{\text{FU}_{\text{Testsubstanz}} \times 100}{\text{FU}_{\text{LM-Kontrolle}}}$$

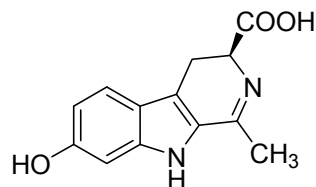
am jeweiligen Endpunkt der Messung berechnet.

7.6.10 Bestimmung der Auxinwirkung

Die pflanzenwachstumsregulatorische Aktivität wurde in einem *Arabidopsis thaliana* Keimlingspfahlwurzellängenwachstumstest nach Ditengou & Lapeyrie (2000) bestimmt. Oberflächensterilisierte *A. thaliana* Samen (Ökotyp „Columbia“) wurden auf Nähragar, welcher die zu testenden Substanzen in entsprechenden Endkonzentrationen enthielt, in eine Petrischale (9 cm Durchmesser) platziert. Nach 10 Tagen Inkubation in einem Lichtraum (16 h Licht pro Tag; Lichtintensität: $70 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{s}$; Temperatur: $22 \text{ }^\circ\text{C}$) wurden die jeweiligen Längen der Pfahlwurzeln der Keimlinge vermessen. 1 l Nähragar enthielt 1/10 Hoagland-Medium (Hoagland's No. 2 basal salt mixture, Sigma) und 10 g Agar (Typ A). IAA (52) wurde als Vergleichs- und Referenzsubstanz benutzt.

8 Charakterisierungen

Brunnein A (27)

[(-)-(3*S*)-7-Hydroxy-1-methyl-4,9-dihydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure]

gelber Feststoff

isoliert aus *C. brunneus* und *H. hyacinthinus*¹H-NMR(500 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 11.53 ppm *s*, (1H), 8.53 *s* (1H), 7.52 *d* (8.7, 1H), 6.69 *dd* (8.7/1.4, 1H), 6.77 *d* (1.4, 1H), 4.08 *dd* (11.8/8.6, 1H), 3.21 *dd* (17.5/11.8, 1H); 3.14 *dd* (17.5/8.6, 1H), 2.56 *s* (3H)¹³C-NMR(aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, DMSO-*d*₆): δ = 169.5 ppm, 160.9, 157.9, 141.8, 126.2, 122.4, 121.9, 118.4, 113.1, 96.3, 58.0, 22.9, 18.9

ESI-FTICR-MS

m/z 245.0919 ([M+H]⁺, berechn. C₁₃H₁₃O₃N₂⁺, 245.0921)

(+) -ESI/CID-MS

(–20 eV) *m/z* (rel. Int., %): 245 ([M+H]⁺, 40), 204 (5), 199 ([M+H–HCOOH]⁺, 100), 171 (3), 162 (5)

(–) -ESI/CID-MS

(+15 eV) *m/z* (rel. Int., %): 243 ([M–H][–], 2), 199 ([M–H–CO₂][–], 100)

IR

(ATR) ν_{\max} : 3235 (br), 2929, 1558, 1374, 1262, 1083, 1026, 806 cm^{–1}

UV/vis

(MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 260 (3.3), 375 (3.6) nm

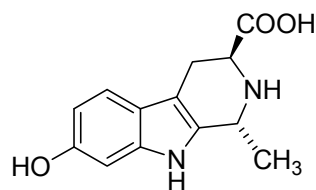
CD

(MeOH): [θ]₂₄₃ –1434, [θ]₃₀₇ +1836, [θ]₃₅₆ –3029, [θ]₄₀₇ +1256 °×cm²×dmol^{–1}[α]_D²⁶–22 ° (*c* = 0.02, MeOH)

DC

LM 1: R_f = 0.50; gelbgrüne Fluoreszenz (λ_{exc} = 366 nm)

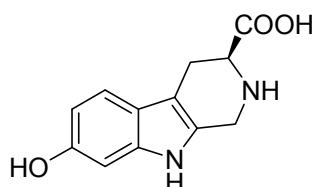
Brunnein B (28)

[(-)-(1*R*,3*S*)-7-Hydroxy-1-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1*H*- β -carbolin-3-carbonsäure]

gelber Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

| | |
|----------------------------|---|
| $^1\text{H-NMR}$ | (500 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 8.86$ ppm (br) <i>s</i> (1H), 7.19 <i>d</i> (8.4, 1H), 6.69 <i>d</i> (1.9, 1H), 6.52 <i>dd</i> (8.4/1.9, 1H), 4.53 <i>q</i> (6.7, 1H), 3.71 <i>dd</i> (7.9/5.4, 1H), 3.00 <i>dd</i> (16.1/5.4, 1H), 2.87 <i>dd</i> (16.1/7.9, 1H), 1.52 <i>d</i> (6.7, 1H) |
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, DMSO- d_6): $\delta = 170.2$ ppm, 153.7, 137.9, 131.1, 120.3, 118.6, 109.5, 105.9, 97.1, 53.4, 46.8, 23.4, 19.0 |
| ESI-FTICR-MS | m/z 247.1078 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechn. $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_2^+$, 247.1077) |
| (-)-ESI/CID-MS | (+20 eV) m/z (rel. Int., %): 245 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 6), 201 (100), 199 (15), 174 (6), 172 (35), 158 (14) |
| IR | (ATR) ν_{max} : 3329 (br), 2941, 2831, 1638, 1556, 1454, 1397, 1111, 1021 cm^{-1} |
| UV/vis | (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 219 (4.4), 299 (3.4) nm |
| CD | (MeOH): $[\theta]_{231} -9266$, $[\theta]_{266} -1053$, $[\theta]_{283} +215$, $[\theta]_{301} -557^\circ \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1}$ |
| $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ | -35° ($c = 0.03$, MeOH) |
| DC | LM 1: $R_f = 0.48$; gelbgrüne Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm) |

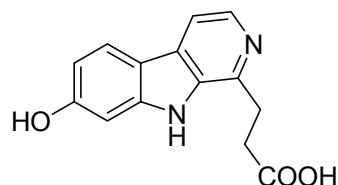
Brunnein C (29)**[(-)-(3S)-7-Hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H- β -carbolin-3-carbonsäure]**

gelber Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

| | |
|---------------------|--|
| $^1\text{H-NMR}$ | (500 MHz, D $_2$ O): $\delta = 7.48$ ppm <i>d</i> (8.5, 1H), 6.77 <i>dd</i> (8.5/2.2, 1H), 6.94 <i>d</i> (2.2, 1H), 4.49 <i>d</i> (15.6, 1H), 4.44 <i>d</i> (15.6, 1H), 4.08 <i>dd</i> (11.0/5.3, 1H), 3.39 <i>dd</i> (16.4/5.3, 1H), 3.03 <i>dd</i> (16.4/11.0, 1H) |
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, DMSO- d_6): $\delta = 173.9$ ppm, 151.8, 137.5, 124.4, 119.0, 109.4, 105.9, 97.2, 57.0, 40.3, 22.2 (C-9a nicht detektiert) |
| ESI-FTICR-MS | m/z 233.0925 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechn. $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_2^+$, 233.0921) |
| (+)-ESI/CID-MS | (-15 eV) m/z (rel. Int., %): 233 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 11), 204 (2), 160 (100) |
| IR | (ATR) ν_{max} : 3384 (br), 2921, 2852, 1602, 1405, 1155, 1042, 806 cm^{-1} |
| UV/vis | (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 222 (4.4), 267 (3.5), 296 (3.5) nm |

| | |
|----------------------------|--|
| CD | (MeOH): $[\theta]_{234} -585$, $[\theta]_{266} -2537$ $^{\circ}\times\text{cm}^2\times\text{dmol}^{-1}$ |
| $[\alpha]_{\text{D}}^{22}$ | -57° ($c = 0.03$, MeOH) |
| DC | LM 1: $R_f = 0.46$; gelbgrüne Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm) |

3-(7-Hydroxy-9H- β -carbolinyl)-propionsäure (30)

gelbbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

| | |
|------------------|---|
| $^1\text{H-NMR}$ | (500 MHz, D_2O): $\delta = 8.15$ ppm <i>d</i> (5.6, 1H), 8.03 <i>d</i> (8.7, 1H), 8.00 <i>d</i> (5.6, 1H), 6.96 <i>d</i> (2.2, 1H), 6.84 <i>dd</i> (8.7/2.0, 1H), 3.44 <i>t</i> (7.5, 2H), 2.73 <i>t</i> (7.5, 2H) |
|------------------|---|

| | |
|---------------------|---|
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, $\text{DMSO-}d_6$): $\delta = 179.8$ ppm, 161.8, 146.1, 143.2, 135.5, 127.2, 124.4, 115.5, 113.9, 112.6, 97.6, 36.7, 29.5 |
|---------------------|---|

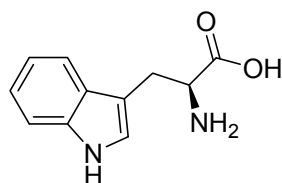
| | |
|--------------|--|
| ESI-FTICR-MS | m/z 257.0922 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechn. $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_3\text{N}_2^+$, 257.0921) |
|--------------|--|

| | |
|----------------|---|
| (+)-ESI/CID-MS | (-20 eV) m/z (rel. Int., %): 257 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 35), 239 (100), 211 (10), 197 (12), 174 (6) |
|----------------|---|

| | |
|----|---|
| IR | (ATR) ν_{max} : 3324 (br), 2917, 2847, 1581, 1405, 1221, 1123, 796 cm^{-1} cm^{-1} |
|----|---|

| | |
|--------|--|
| UV/vis | (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 245 (4.2), 304 (3.7), 327 (3.72) nm |
|--------|--|

| | |
|----|---|
| DC | LM 1: $R_f = 0.64$; blaugrüne Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm) |
|----|---|

L-Tryptophan (36)

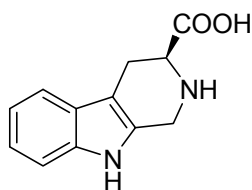
heller Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

| | |
|------------------|---|
| $^1\text{H-NMR}$ | (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.70$ ppm <i>ddd</i> (8.0/1.1/0.6, 1H), 7.36 <i>ddd</i> (8.2/1.0/0.6, 1H), 7.20 <i>s</i> (1H), 7.12 <i>ddd</i> (8.2/7.0/1.1, 1H), 7.04 <i>ddd</i> (8.0/7.0/1.0, 1H), 3.86 <i>dd</i> (9.5/ 4.0, 1H), 3.52 <i>ddd</i> (15.2/4.0/0.7, 1H), 3.14 <i>dd</i> (15.2/9.5, 1H) |
|------------------|---|

| | |
|--------------|---|
| ESI-FTICR-MS | m/z 409.1867 ($[\text{2M}+\text{H}]^+$, berechn. $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{N}_4^+$, 409.1870) |
|--------------|---|

(-)-(3*S*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (37)



hellgelber Feststoff

synthetisches Derivat

$^1\text{H-NMR}$

(300 MHz, D_2O): $\delta = 7.58$ ppm (br) *d* (7.9, 1H), 7.45 (br) *d* (7.9, 1H), 7.20 *ddd* (7.9/7.3/1.3, 1H), 7.15 *ddd* (7.9/7.3/1.2, 1H), 4.07 *d* (16.0, 1H), 3.98 *d* (16.0, 1H), 3.51 *dd* (10.3/4.5, 1H), 3.09 *dd* (15.0/4.5, 1H), 2.75 *dd* (15.0/10.3)

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

(75 MHz, D_2O): $\delta = 180.8$ ppm, 135.8, 131.8, 126.5, 121.3, 119.1, 117.6, 111.2, 106.7, 57.2, 41.0, 24.9

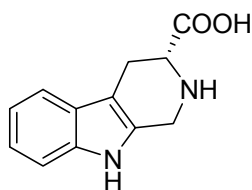
ESI-FTICR-MS

m/z 215.0826 ($[\text{M-H}]^-$, berechn. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_2^-$, 215.0826)

$[\alpha]_{\text{D}}^{26}$

-99.2° ($c = 0.2$, 0.1 M NaOH)

(+)-(3*R*)-2,3,4,9-Tetrahydro-3*H*- β -carbolin-3-carbonsäure (39)



hellgelber Feststoff

synthetisches Derivat

$^1\text{H-NMR}$

(300 MHz, D_2O): $\delta = 7.59$ ppm (br) *d* (7.9, 1H), 7.46 (br) *d* (7.9, 1H), 7.21 *ddd* (7.9/7.3/1.4, 1H), 7.15 *ddd* (7.9/7.3/1.1, 1H), 4.09 *d* (16.0, 1H), 4.01 *d* (16.0, 1H), 3.53 *dd* (10.5/4.8, 1H), 3.10 *dd* (15.0/4.8, 1H), 2.76 *dd* (15.0/10.5)

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

(75 MHz, D_2O): $\delta = 180.9$ ppm, 135.9, 133.0, 126.7, 121.9, 119.1, 117.7, 111.3, 106.9, 57.9, 41.2, 25.0

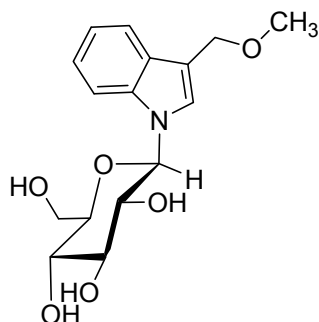
ESI-FTICR-MS

m/z 215.0826 ($[\text{M-H}]^-$, berechn. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}_2^-$, 215.0826)

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$

$+122.3^\circ$ ($c = 0.2$, 0.1 M NaOH)

(+)-*N*-1- β -*D*-Glukopyranosyl-3-(methoxymethyl)-1*H*-indol (47)

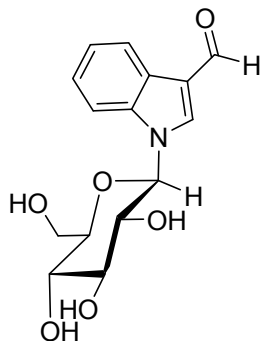


gelbbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

| | |
|----------------------------|---|
| $^1\text{H-NMR}$ | (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.61$ ppm (br) <i>d</i> (7.9, 1H), 7.53 (br) <i>d</i> (8.3, 1H), 7.43 <i>s</i> (1H), 7.18 <i>ddd</i> (8.3/7.2/1.1, 1H), 7.09 <i>ddd</i> (7.9/7.2/0.9, 1H), 5.44 <i>d</i> (9.1, 1H), 4.65 <i>s</i> (2H), 3.91 <i>dd</i> (9.1/8.8, 1H), 3.87 <i>dd</i> (12.1/2.1, 1H), 3.70 <i>dd</i> (12.1/5.6, 1H), 3.59 <i>dd</i> (9.1/8.9, 1H), 3.57 <i>ddd</i> (9.6/5.6/2.1, 1H), 3.50 <i>dd</i> (9.6/8.9, 1H), 3.36 <i>s</i> (1H) |
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, CD_3OD): $\delta = 138.7$ ppm, 129.7, 123.1, 126.6, 121.1, 120.0, 113.9, 111.7, 86.7, 80.6, 79.0, 73.7, 71.5, 67.9, 62.7, 57.6 |
| ESI-FTICR-MS | m/z 346.1265 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechn. $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_6\text{Na}^+$, 346.1261) |
| (-)-ESI/CID-MS | (+20 eV) m/z (rel. Int., %): 322 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 15), 160 (100) |
| IR | (ATR) ν_{max} : 3393, 2924, 2853, 1718, 1653, 1464, 1261, 1018 cm^{-1} |
| UV/vis | (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 220 (3.84), 267 (3.19) nm |
| $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ | +5.4 ° ($c = 0.09$, MeOH) |
| DC | LM 1: $R_f = 0.70$ |

(+)-*N*-1- β -D-Glukopyranosyl-1*H*-indol-3-carbaldehyd (48)



gelbbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

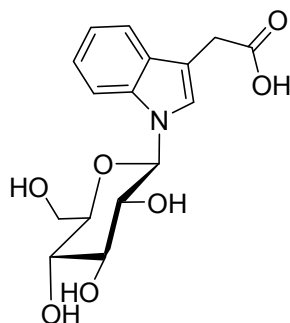
| | |
|---------------------|---|
| $^1\text{H-NMR}$ | (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 9.90$ ppm <i>s</i> (1H), 8.30 <i>s</i> (1H), 8.17 (br) <i>d</i> (7.6, 1H), 7.68 (br) <i>d</i> (8.1), 5.55 <i>d</i> (9.1, 1H), 3.91 <i>dd</i> (9.1/8.9, 1H), 3.87 <i>dd</i> (12.1/2.1, 1H), 3.73 <i>dd</i> (12.1/5.6, 1H), 3.61 <i>dd</i> (9.1/8.9, 1H), 3.57 <i>ddd</i> (9.6/5.6/2.1, 1H), 3.51 <i>dd</i> (9.6/8.9, 1H) |
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, CD_3OD): $\delta = 187.6$ ppm, 140.6, 139.1, 126.8, 125.5, 124.3, 122.7, 120.2, 113.0, 87.7, 80.8, 78.9, 73.9, 71.7, 62.9 |
| ESI-FTICR-MS | m/z 330.0955 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechn. $\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Na}^+$, 330.0948) |
| (+)-ESI/CID-MS | (-15 eV) m/z (rel. Int., %): 308 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 51), 146 (100), 118 (11) |
| (-)-ESI/CID-MS | (+12 eV) m/z (rel. Int., %): 306 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 2), 144 (100) |
| IR | (ATR) ν_{max} : 3354, 2933, 1711, 1638, 1536, 1074, 1029 cm^{-1} |

UV/vis (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 210 (4.12), 240 (3.65), 263 (3.53), 291 (3.57) nm

$[\alpha]_D^{25}$ +8.7° ($c = 0.07$, MeOH)

DC LM 1: $R_f = 0,61$

(+)-N-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(carboxymethyl)-1H-indol (49)



gelbbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD): $\delta = 7.52$ ppm *ddd* (8.0/1.1/0.8, 1H), 7.34 *s* (1H), 7.17 *ddd* (8.2/7.1/1.1, 1H), 7.08 *ddd* (8.0/7.1/1.1, 1H), 5.42 *d* (9.0, 1H), 3.90 *dd* (9.0/9.0, 1H), 3.87 *dd* (12.1/2.2, 1H), 3.73 *d* (15.1, 1H), 3.72 *d* (15.1, 1H), 3.70 *dd* (12.1/5.7, 1H), 3.60 *dd* (9.0/9.0, 1H), 3.57 *ddd* (9.6/5.7/2.2, 1H), 3.50 *dd* (9.6/9.0, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, CD_3OD): $\delta = 176.8$ ppm, 138.4, 129.9, 125.4, 123.0, 120.9, 119.8, 111.5, 110.6, 86.7, 80.6, 78.8, 73.8, 71.5, 62.8, 32.1

ESI-FTICR-MS m/z 360.1050 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechn. $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{NO}_7\text{Na}^+$, 360.1054)

(+)-ESI/CID-MS (−12 eV) m/z (rel. Int., %): 338 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 10), 218 (24), 176 (100), 130 (12)

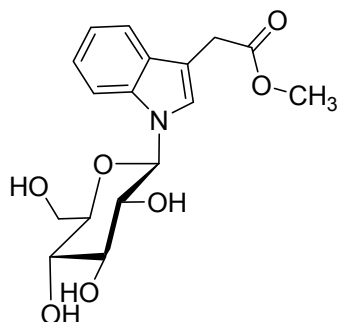
(−)-ESI/CID-MS (+15 eV) m/z (rel. Int., %): 336 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 21), 292 (100), 130 (5)

IR (ATR) ν_{\max} : 3352, 2941, 2835, 1701, 1463, 1363, 1225, 1076, 1018 cm^{-1}

UV/vis (MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 222 (4.35), 273 (3.72)

$[\alpha]_D^{25}$ +18.1° ($c = 0.23$, MeOH)

DC LM 1: $R_f = 0,60$

(+)-N-1- β -D-Glukopyranosyl-3-(2-methoxy-2-oxoethyl)-1H-indol (50)

gelbbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*¹H-NMR

(500 MHz, CD₃OD): δ = 7.52 ppm (br) *d* (8.2, 1H), 7.50 (br) *d* (8.1, 1H), 7.36 *s* (1H), 7.18 *ddd* (8.2/7.1/1.1, 1H), 7.08 *ddd* (8.2/7.1/0.9, 1H), 5.43 *d* (9.1, 1H), 3.90 *dd* (9.1/8.8, 1H), 3.87 *dd* (12.1/2.2, 1H), 3.78 *s* (2H), 3.70 *dd* (12.1/5.6, 1H), 3.69 *s* (3H), 3.59 *dd* (9.0/8.8, 1H), 3.57 *ddd* (9.5/5.6/2.2, 1H), 3.49 *dd* (9.5/9.0, 1H)

¹³C-NMR

(aus 2D-NMR-Messungen ermittelt, CD₃OD): δ = 174.7 ppm, 138.4, 129.8, 125.5, 123.1, 121.0, 119.7, 111.6, 109.9, 86.7, 80.6, 78.9, 73.8, 71.5, 62.8, 52.5, 31.6

ESI-FTICR-MS

m/z 374.1214 ([M+Na]⁺, berechn. C₁₇H₂₁NO₇Na⁺, 374.1210)

(+)ESI/CID-MS

(−12 eV) *m/z* (rel. Int., %): 352 ([M+H]⁺, 7), 232 (38), 190 (100), 130 (20)

(−)ESI/CID-MS

(+15 eV) *m/z* (rel. Int., %): 350 ([M−H][−], 8), 188 (100)

IR

(ATR) ν_{\max} : 3356, 2921, 2851, 1595, 1463, 1363, 1225, 1076, 1018 cm^{−1}

UV/vis

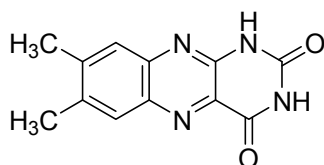
(MeOH) λ_{\max} (log ϵ): 221 (4.12), 273 (3.45) nm

[α]_D²⁵

+4.7 ° (*c* = 0.06, MeOH)

DC

LM 1: R_f = 0.67

7,8-Dimethylbenzo[*g*]pteridin-2,4(1*H*, 3*H*)-dion (55)

gelbbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*¹H-NMR

(300 MHz, CD₃OD): δ = 7.94 ppm *s* (1H), 7.78 *s* (1H), 2.54 *s* (3H), 2.52 *s* (3H)

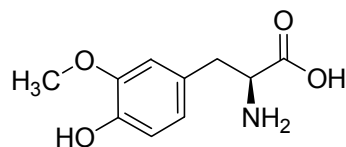
ESI-FTICR-MS

m/z 241.0731 ([M−H][−], berechn. C₁₂H₉O₂N₄[−], 241.0731)

(+)-ESI/CID-MS (-25 eV) m/z (rel. Int., %): 243 ($[M+H]^+$, 24), 216 (12), 200 (8), 198 (100), 172 (94), 170 (14), 157 (4), 11)

(-)-ESI/CID-MS (+25 eV) m/z (rel. Int., %): 241 ($[M-H]^-$, 18), 198 (100)

(-)-3-Methoxy-L-tyrosin (57)



weißer Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

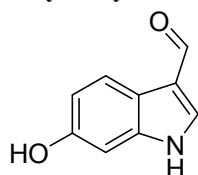
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD): δ = 6.91 ppm *d* (2.0, 1H), 6.81 *d* (8.1, 1H), 6.74 *dd* (8.1/2.0, 1H), 3.85 *s* (1H), 3.83 *dd* (8.1/4.5, 1H), 3.20 *dd* (14.6/4.5, 1H), 2.98 *dd* (14.6/8.1, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CD_3OD): δ = 174.1 ppm, 148.8, 145.7, 128.2, 122.9, 118.4, 113.8, 57.3, 56.6, 37.3

ESI-FTICR-MS m/z 210.0773 ($[M-H]^-$, berechn. $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_1^-$, 210.0772)

$[\alpha]_D^{28}$ -9.6° ($c = 0.11$, MeOH)

6-Hydroxy-1H-indol-3-carbaldehyd (58)



gelbbrauner Feststoff

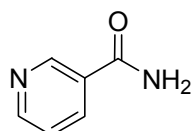
isoliert aus *C. brunneus*

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 11.76 ppm *br s* (1H), 9.82 *s* (1H), 9.29 *br s* (1H), 8.06 *s* (1H), 7.83 *d* (8.5, 1H), 6.84 *d* (2.1, 1H), 6.71 *dd* (8.5/2.1, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (aus 2D-NMR Experimenten ermittelt, $\text{DMSO-}d_6$): δ = 184.5 ppm, 156.0, 139.3, 138.0, 121.5, 118.2, 117.0, 112.5, 98.0

ESI-FTICR-MS m/z 160.0401 ($[M-H]^-$, berechn. $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2\text{N}_1^-$, 160.0404)

Nicotinsäureamid (59)

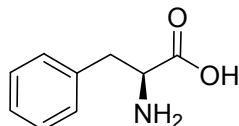


heller Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*

$^1\text{H-NMR}$; $^{13}\text{C-NMR}$ in Übereinstimmung mit Literaturdaten (Van *et al.* 2005)

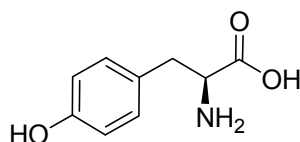
ESI-MS m/z 123.4 ($[M+H]^+$)

L-Phenylalanin (60)

heller Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*¹H-NMR(400 MHz, CD₃OD): δ = 7.322 ppm *m* (5H), 3.77 *dd* (9.0/4.2, 1H), 3.32 *dd* (14.4/4.2, 1H), 2.99 *dd* (14.4/9.0, 1H)¹³C-NMR(100 MHz, CD₃OD): δ = 173.8 ppm, 131.4, 130.4 (2C), 129.9 (2C), 128.4, 57.6, 38.4

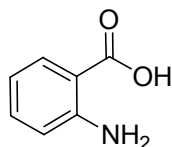
ESI-FTICR-MS

m/z 166.0859 ([M+H]⁺, berechn. C₉H₁₂O₂N₁⁺, 166.0863)**L-Tyrosin (61)**

heller Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*¹H-NMR(500 MHz, CD₃OD): δ = 7.01 ppm *d* (8.7, 2H), 6.71 *d* (8.7, 2H), 4.32 *dd* (9.3/4.3, 1H), 3.28 *dd* (14.4/4.3, 1H), 2.95 *dd* (14.4/9.3, 1H)

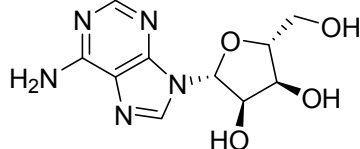
ESI-MS

m/z 182.0 ([M+H]⁺)**Anthranilsäure (62)**

hellbrauner Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*¹H-NMR(300 MHz, D₂O): δ = 8.91 ppm *br d* (7.11, 1H), 8.08 *br ddd* (8.6/7.11/1.7, 2H), 7.44 *dd* (8.6/1.7, 1H)

ESI-FTICR-MS

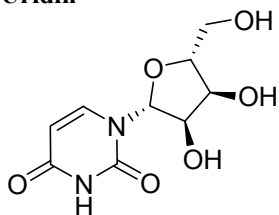
m/z 136.0403 ([M-H]⁻, berechn. C₇H₆O₂N₁⁻, 136.0404)**Adenosin**

weißer Feststoff

isoliert aus *C. brunneus*¹H-, ¹³C-NMRin Übereinstimmung mit Literaturdaten (Van *et al.* 2005)

ESI-MS

m/z 268.0 ([M+H]⁺)

Uridin

weißer Feststoff

isoliert aus *C. brunneus* ^1H -, ^{13}C -NMRin Übereinstimmung mit Literaturdaten (Van *et al.* 2005)

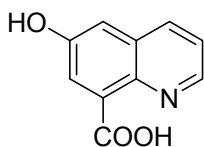
ESI-FTICR-MS

 m/z 243.0623 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, berechn. $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_6\text{N}_2^-$, 243.0623)

(+)ESI/CID-MS

(-12 eV) m/z (rel. Int., %) 245 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 8), 227 (100), 209 (18), 186 (4), 163 (7)

(-)ESI/CID-MS

(+20 eV) m/z (rel. Int., %) 243 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 7), 200 (22), 152 (26), 110 (100), 82 (18)**6-Hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (63)**

gelbe Nadeln

isoliert aus *C. subtortus* ^1H -NMR(500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 10.71 ppm (br) *s* (1H), 8.87 *dd* (4.4/1.6, 1H), 8.54 *dd* (8.5/1.6, 1H), 8.13 *d* (2.8, 1H), 7.71 *dd* (8.5/4.4, 1H), 7.54 *d* (2.8, 1H) ^{13}C -NMR(125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 166.2 ppm, 155.7, 146.1, 139.5, 137.5, 129.9, 125.8, 125.5, 122.4, 114.0

ESI-FTICR-MS

 m/z 212.0319 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechn. $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{NO}_3\text{Na}^+$, 212.0318)

(+)ESI/CID-MS

(-15 eV) m/z (rel. Int., %) 190 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 33), 172 (100), 144 (4), 116 (3)

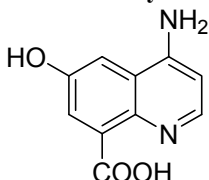
IR

(ATR) ν_{max} : 3282 (br), 2919, 2851, 1681, 1575, 1536, 1374, 1351, 1236, 1205, 787 cm^{-1}

UV/vis

(MeOH) λ_{max} (log ϵ): 214 (4.3), 233 (4.4), 298 (3.6), 347 (3.7) nm

DC

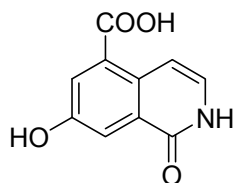
LM 1: R_f = 0,56; orangene Fluoreszenz (λ_{exc} = 366 nm)**4-Amino-6-hydroxy-chinolin-8-carbonsäure (64)**

weißer Feststoff

isoliert aus *C. subtortus*

| | |
|---------------------|---|
| $^1\text{H-NMR}$ | (700 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 10.25$ ppm (br) <i>s</i> (1H), 8.35 <i>d</i> (6.3, 1H), 8.08 <i>d</i> (2.6, 1H), 8.00 (br) <i>s</i> (2H), 7.65 <i>d</i> (2.6, 1H), 6.64 <i>d</i> (6.3, 1H) |
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-Experimenten ermittelt, DMSO- d_6): $\delta = 166.8$ ppm, 156.2, 155.1, 140.8, 136.9, 128.7, 125.4, 119.3, 107.9, 100.8 |
| ESI-FTICR-MS | m/z 227.0425 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$, berechn. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{Na}^+$, 227.0427) |
| (+)-ESI/CID-MS | (-20 eV) m/z (rel. Int., %) 205 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 7), 187 (100), 159 (10), 131 (4) |
| IR | (ATR) ν_{max} : 2924 (br), 2853, 2160, 2026, 1976, 1726, 1580, 1377, 1244 cm^{-1} |
| UV/vis | (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 214 (2.4), 248 (2.3), 297 (0.9), 309 (1.0), 357 (1.9), 371 (1.9) nm |
| DC | LM 1: $R_f = 0,44$; blaugrüne Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm) |

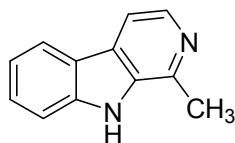
1,2-Dihydro-7-hydroxy-1-oxo-isochinolin-5-carbonsäure (65)



hellbrauner Feststoff

isoliert aus *C. subtortus*

| | |
|---------------------|--|
| $^1\text{H-NMR}$ | (700 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 14.88$ ppm <i>d</i> (5.6, 1H), 9.38 (br) <i>s</i> (1H), 7.85 <i>dd</i> (7.2/5.6, 1H), 7.75 <i>d</i> (3.0, 1H), 7.38 <i>d</i> (3.0, 1H), 5.85 <i>d</i> (7.2, 1H) |
| $^{13}\text{C-NMR}$ | (aus 2D-Experimenten ermittelt, DMSO- d_6): $\delta = 177.2$ ppm, 168.0, 153.8, 138.8, 135.7, 128.4, 127.2, 123.2, 111.4, 107.0 |
| ESI-FTICR-MS | m/z 204.0299 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, berechn. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{NO}_4^-$, 204.0302) |
| (-)-ESI/CID-MS | (+20 eV) m/z (rel. Int., %) 204 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 11), 160 (100), 159 (37), 132 (6), 131 (3) |
| IR | (ATR) ν_{max} : 3358 (br), 3219 (br), 2922, 2851, 1650, 1570, 1355, 1210, 814 cm^{-1} |
| UV/vis | (MeOH) λ_{max} (log ϵ): 212 (3.3), 246 (3.2), 300 (2.4), 354 (2.8), 365 (2.8) nm |
| DC | LM 1: $R_f = 0,40$; blaugrüne Fluoreszenz ($\lambda_{\text{exc}} = 366$ nm) |

Harman (117)**(1-Methyl-9H- β -carbolin)**

weißer Feststoff

isoliert aus *H. eburneus* ^1H -, ^{13}C -NMRin Übereinstimmung mit Literaturdaten (Yomosa *et al.* 1987)

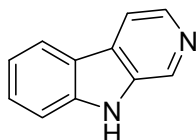
ESI-FTICR-MS

 m/z 183.0915 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechn. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2^+$ 183.0917)

(+)ESI-CID

(-30 eV) m/z (rel. Int., %) 183 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 31), 182 (8), 181 (4), 168 (13), 142 (5), 140 (4), 115 (100)

(+)ESI-QqTOF-MS

(+40 eV) m/z (rel. Int., %) 183.0901 (49, berechn. $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_2^+$ 183.0917), 168.0679 (23, berechn. $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{N}_2^+$ 168.0682), 142.0629 (15, berechn. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}^+$ 142.0651), 115.0521 (100, berechn. C_9H_7^+ 115.0542)**Norharman (118)****(9H- β -Carbolin)**

weißer Feststoff

isoliert aus *H. eburneus* ^1H -, ^{13}C -NMRin Übereinstimmung mit Literaturdaten (Yomosa *et al.* 1987)

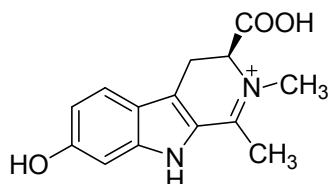
ESI-FTICR-MS

 m/z 169.0760 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, berechn. $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2^+$ 169.0760)

(+)ESI-CID

(-30 eV) m/z (rel. Int., %) 169 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, 48), 168 (30), 142 (5), 142 (10), 141 (4), 140 (5), 115 (100)

(+)ESI-QqTOF-MS

(+40 eV) m/z (rel. Int., %) 169.0760 (66, berechn. $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2^+$ 169.0760), 142.0663 (19, berechn. $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}^+$ 142.0652), 115.0552 (100, berechn. C_9H_7^+ 115.0542)**N-Methylbrunnein A (152)****[7-Hydroxy-1,2-dimethyl-4,9-dihydro-3H- β -carbolin-3-carbonsäure]**Reinheit ca. 50 % (^1H -NMR)semisynthetisches Derivat von **27** ^1H -NMR(500 MHz, D_2O): δ = 7.69 ppm *dd* (7.7/1.9, 1H), 7.59 *d* (7.7, 1H), 6.97 *d* (1.9, 1H), 4.30 *dd* (11.0/7.4, 1H), 3.99 *s* (3H); 3.97 *dd* (14.0/7.4, 1H), 3.64 *dd* (14.0/10.7, 1H), 2.14 *s* (3H)

ESI-FTICR-MS

 m/z 259.1078 ($[\text{M}]^+$, berechn. $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_3\text{N}_2^+$, 259.1077)

Literaturverzeichnis

- Abraham, W. R.; Spassov, G. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 371–372.
- Alberts, A. W.; Chien, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothstock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteent, K.; Liescht, J.; Springer, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 3957–3961.
- Aldridge, D. C.; Armstrong, J. J.; Speake, R. N.; Turner, W. B. *J. Chem. Soc. C* **1967**, 1667–1676.
- Al-Khalil, S. *J. Nat. Prod.* **1998**, *21*, 262–263.
- Allen, J. R. F.; Holmstedt, B. R. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 1573–1582.
- Anke, T. *Fungal Biotechnology*. Chapman & Hall, Weinheim, **1997**.
- Antkowiak, W. Z.; Gessner, W. P. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 1931–1934.
- Andrae, W. A.; Good, N. E. *Plant Physiol.* **1955**, *30*, 380–382.
- Arnold, N. *Morphologisch-anatomische und chemische Untersuchungen an der Untergattung Telamonia (Cortinarius, Agaricales)*. IHW-Verlag, Eching, **1993**.
- Arnolds, E. *Tribus Hygrophoreae (Kühner) Bas et Arnolds*. In: *Flora Agaricina Neerlandica*. Bas, C.; Kuyper, T. W.; Noordeloos, M. E.; Vellinga E. C. (Editoren), A. A. Balkema Rotterdam, Bd. 2, 65–70, **1990**.
- Barbosa-Filho, J. M.; Medeiros, K. C. P.; Diniz, M.; Batista, L. M.; Athayde-Filho, P. F.; Silva, M. S.; Cunha, E. V. L.; Almeida, J.; Quintans-Junior, L. J. *Braz J. Pharmacogn.* **2006**, *16*, 258–285.
- Bartus, R. T.; Dean 3rd, R. L.; Beer, B.; Lipka, A. S. *Science*, **1982**, *217*, 408–414.
- Bas, C. *Tricholomataceae R. Heim ex Pouz.* In: *Flora Agaricina Neerlandica*. Bas, C.; Kuyper, T. W.; Noordeloos, M. E.; Vellinga E. C. (Editoren), A. A. Balkema Rotterdam, Bd. 2, 65–70, **1990**.
- Becher, P. G.; Beuchat, J.; Gademann, K.; Jüttner, F. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1793–1795.
- Besl, H.; Bresinsky, A. *Pl. Syst. Evol.* **1997**, *203*, 223–242.
- Bitzer, J.; Köpcke, B.; Stadler, M.; Hellwig, V.; Ju, Y.-M.; Seip, S.; Henkel, T. *Chimia* **2007**, *61*, 332–338.
- Bhadury, P.; Wright, P.C. *Planta* **2004**, *219*, 561–578.
- Blée, E. *Trends Plant Sci.* **2002**, *7*, 315–322.
- Blom, J. F.; Brütsch, T.; Barbaras, D.; Bethuel, Y.; Locher, H. H.; Hubschwerlen, C.; Gademann, K. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 737–740.
- Blois, M. S. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200.
- Bon, M. *Die Großpilzflora von Europa*. Bd. 1: *Hygrophoraceae*. Eching: IHW Verlag, **1992**.
- Bourne, Y.; Talor, P.; Marchot, P. *Cell*, **1985**, *83*, 503–512.

- Brandrud, T. E.; Lindström, H.; Marklund, H.; Melot, J.; Muskos, S. *Cortinarius, Flora Photographica*; Vol. 1 (1990); 4 (1998). Cortinarius HB, Matfors.
- Breheret, S.; Talou, T.; Rapior, S.; Bessière, J. M. *Cryptogamie Mycol.* **1997a**, *18*, 111–114.
- Breheret, S.; Talou, T.; Rapior, S.; Bessière, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **1997b**, *45*, 831–836.
- Bringmann, G.; God, R.; Schäfer, M. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1393–1403.
- Bröckelmann, M. G.; Dasenbrock, J.; Steffan, B.; Steglich, W.; Wang, Y.; Raabe, G.; Fleischauer, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 4856–4863.
- Brondz, I.; Hoiland, K.; Bell, D. S.; Annino, A. R. *TheReporter.* **2006**, *24*, 6–7.
- Byers, D. M.; Meighen, E. A. *J. Bacteriol.* **1989**, *171*, 3866–3871.
- Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. *Curr. Med. Chem.* **2007**, *14*, 479–500.
- Caputo, C. B.; Salama, A. I. *Neurobiol. Aging* **1989**, *10*, 451–461.
- Chalifour, R. J.; McLaughlin, R. W.; Lavoie L.; Morissette, C.; Tremblay, N.; Boulé, M.; Sarazin, P.; Stéa, D.; Lacombe, D.; Tremblay, P.; Gervais, F. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 34874–34881.
- Champ, M. A. *Sci. Total Environ.* **2000**, *258*, 21–71.
- Chiarugi, A.; Dello Sbarba, P.; Paccagnini, A.; Donnini, S.; Filippi, S.; Moroni, F. *J. Leukoc. Biol.* **2000**, *68*, 260–266.
- Chung, H. S.; Woo, W. S. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 1579–1580.
- Clardy, J.; Walsh, C. *Nature* **2004**, *432*, 829–837.
- Clemo, N. G.; Gedge, D. R.; Pattenden, G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1981**, 1448–1453.
- Cooper, E. J.; Hudson, A. L.; Parker, C. A.; Morgan, N. G. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *482*, 189–196.
- Cordella, G.; Senatore, F.; Morrica, P.; Di Donato, S. *Studi Sassar.* **1982**, *60*, 277–278.
- Coune, C. A.; Angenot, L. J. G.; Denoël, J. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2009–2011.
- Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. *Natural Products (Secondary Metabolites)*. In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. (Editoren). Rockville, USA. American Society of Plant Physiologists. **2000**, 1250–1318.
- Dahlgren, K. N.; Manelli, A. M.; Stine, W. B.; Jr., Baker, L. K.; Krafft, G. A.; LaDu, M. J. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 32046–32053.
- Dardenne, G.; Marlier, M.; Welter, A. *Phytochemistry* **1977**, *16*, 1822–1824.
- Demuth, H.-U.; Heiser, U.; Buchholz, M.; Niestroj, A. J.; Schilling, S. Patent WO/2004/098591, **2004**.
- Deutsche Apothekerzeitung* **2007**, *16*, 8.
- Dick, V. Dissertation **2006**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ditengou, F. A.; Lapeyrie, F. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2000**, *13*, 151–158.
- Dräger, T. Dissertation (in Vorbereitung), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Dymock, W.; Warden, C. J. H.; Hooper, D. *Pharmacopia Indica*. Ausg. 1, Harmard National Foundation Pakistan **1976**, 252–253.
- Eichler, J.; Anselment, A.; Sussman, J. L.; Massoulie, J.; Silman, I. *Mol. Pharmacol.* **1994**, *45*, 335–340.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres Jr., V.; Featherstone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88–95.
- Erickson, E. U.S. Patent 4.147.694, **1979**.
- Erkel, G.; Anke, T.; Velten, R.; Steglich, W. *Z. Naturforsch.* **1991**, *46c*, 442–450.
- Ertl, P.; Rohde, B.; Selzer, P. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3714–3717.
- Eschen-Lippold, L.; Rothe, G.; Stumpe, M.; Göbel, C.; Feussner, I.; Rosahl, S. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 797–801.
- Feussner, I.; Wasternack, C. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 275–297.
- Fleming, A. *British J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226–236.
- Frank, B.; Müller, R. *Pharm. Z.* **2007**, *50*, 4716–4719.
- Franke, K.; Porzel, A.; Masaoud, M.; Adam, G.; Schmidt, J. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 611–621.
- Froehner, K.; Backhaus, T.; Grimme L. H. *Chemosphere* **2000**, *40*, 821–828
- Fugmann, B. Dissertation **1985**, Universität Bonn.
- Fusetani, N. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 94–104.
- Fuska, J.; Nemeč, P.; Kuhr, I. *J. Antibiotics* **1972**, *25*, 208–211.
- Gabriel, M. *Bull. Soc. Mycol. France* **1960a**, *78*, 208–215.
- Gabriel, M. *Ann. Univ. Sc. Nat. Lyon* **1960b**, *11-12*, 57–76.
- Gabriel, M. *Bull. Soc. Mycol. France* **1961**, *77*, 262–272.
- Garnica, S.; Weiß, M.; Oertel, B.; Oberwinkler, F. *Can. J. Bot.* **2005**, *83*, 1457–1477.
- Gearhart, D. A.; Neafsey, E. J.; Collins, M. C. *Neurochem. Int.* **2002**, *40*, 611–620.
- Geißler, T. Diplomarbeit **2007**, Hochschule Anhalt (FH).
- Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 3998–4002.
- Gilardoni, G.; Clericuzio, M.; Marchetti, A.; Finzi, P. V.; Zanoni, G.; Vidari, G. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *12*, 1079–1084.
- Gilardoni, G.; Clericuzio, M.; Tosi, S.; Zanoni, G.; Vidari, G. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 137–139.
- Gill, M.; Steglich, W. *Pigments of Fungi (Macromycetes)*. In: *Progress in the chemistry of organic natural products*. Herz, W.; Grisebach, H.; Kirby, G. W.; Tamm, C. (Editoren), Springer Verlag Wien, New York; **1987**, Ausg. 51, 1–317.
- Gilson, M. K.; Straatsma, T. P.; McCammon, J. A.; Ripoll, D. R.; Faerman, C. H.; Axelsen, P. H.; Silma, I.; Sussman, J. L. *Science* **1994**, *263*, 1276–1278.
- Ghosal, S.; Bhattacharya, S. K.; Mehta, R. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 808–810.

- Ghosh, S. K.; Doctor, P. B.; Kulkarni, P. K. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **1996**, *9*, 13–19.
- Glover, V.; Liebowitz, J.; Armando, I.; Sandler, M. *J. Neural. Transm.* **1982**, *54*, 209–218.
- Goodall, R. R.; Levi, A. A. *Nature* **1946**, *158*, 675–676.
- Gottstein, D.; Gross, D.; Lehmann, H. *Arch. Phytopathol. Pfl.* **1982**, *20*, 111–116.
- Gröger, F. *Bestimmungsschlüssel für Blätterpilze und Röhrlinge in Europa, Teil 1.*
In: *Regensburger Mykologische Schriften*. Bresinsky, A.; Besl, H. (Editoren) Regensburgische Botanische Gesellschaft, Regensburg, **2006**, Bd. 13, 1–638.
- Grogan, D. W. *Arch. Microbiol.* **1983**, *136*, 137–139.
- Gross, E. M. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2003**, *22*, 313–319.
- Gruen, H. E. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **1959**, *10*, 405–440.
- Gunsalus-Miguel, A.; Meighen, E. A.; Nicoli, M. Z.; Neelson, K. H.; Hastings, J. W. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*, 398–404.
- Gutsche, B.; Herderich, M. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, *360*, 836–839.
- Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M. *Chem. Biol.* **1998**, *5*, R245–R249.
- Harvey, A. L. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 480–484.
- Haslberger, H. Diplomarbeit **1986**, Universität Regensburg.
- Hawksworth, D. L. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 1422–1432.
- Heinrich, M. *Pharm. Z.* **2005**, *5*, 398–403.
- Henkel, T.; Brunne, R. M.; Müller, H.; Reichel, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 643–647.
- Herath, W.; Mikell, J. R.; Ferreira, D.; Khan, I. A. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 646–648.
- Horak, E. *Phytopathol. Z.* **1964**, *51*, 491–515.
- Hostettmann, K.; Marston, A. *Chimia* **2007**, *61*, 322–326.
- Hostettmann, K.; Terreaux, C. *Chimia* **2000**, *54*, 652–657.
- Houghton, P. J.; Ren, Y.; Howes, M.-J. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 181–199.
- Inchausti, A.; Anke, T.; Fournet, A. *Phytotherapy Res.* **1997**, *11*, 193–197.
- <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. (Zugriff: 06.01.2008)
- Inestrosa, N. C.; Alvarez, A.; Calderon, F. *Mol. Psych.* **1996**, *1*, 359–361.
- Inoue, S.; Okada, K.; Tanino, H.; Kakoi, H.; Goto, T. *Chem. Lett.* **1980**, *9*, 297–298.
- Kai, K.; Wakasa, K.; Miyagawa, H. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2512–2522.
- Kanchanapoom, T.; Kasai, R.; Chumsri, P.; Hiraga, Y.; Yamasaki, K. *Phytochemistry* **2001**, *56*, 383–386.
- Kang, S. Y.; Lee, K. Y.; Sung, S. H.; Park, M. J.; Kim Y. C. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 683–685.
- Katz, L.; McDaniel, R. *Med. Res. Rev.* **1999**, *19*, 543–558.

- Kelenyi, G. *J. Histochem. Cytochem.* **1967**, *15*, 172–180.
- Keller, G. *Sydowia* **1982**, *35*, 110–126.
- Keller, C.; Maillard, M.; Keller, J.; Hostettmann, K. *Pharm. Biol.* **2002**, *40*, 518–525.
- Kepplinger, B.; Baran, H.; Kainz, A.; Ferraz-Leite, H.; Newcombe, J.; Kalina, P. *Neurosignals*, **2005**, *14*, 126–135.
- Ketzer, K. Praxissemesterarbeit **2007**, Hochschule-Anhalt Köthen.
- Kim, W.-G.; Lee, I.-K.; Kim, J.-P.; Ryoo, I.-J.; Koshino, H.; Yoo, I.-D. *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 721–723.
- Kodani, S.; Imoto, A.; Mitsutani, A.; Muratami M. *J. Appl. Phycol.* **2002**, *14*, 109–114.
- Koolman, J.; Röhm, K.-H. *Taschenatlas der Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1998**.
- Kopanski, L.; Klaar M.; Steglich W. *Liebigs Ann. Chem.* **1982**, 1280–1296
- Kühne, H.; Hesse, M. *Mass Spectrom. Rev.* **1982**, *1*, 15–28.
- Kwon, H. C.; Kim, K. R.; Zee, S. D.; Cho, S. Y.; Lee, K. R. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 604–609.
- Lee, H. H.; Que, Y. T.; Song, N. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1985**, 453–455.
- Lees, A. K.; Hilton, A. J. *Plant Pathology* **2003**, *52*, 3–12.
- Leshner, G. Y.; Froelich, E. J.; Guett, M. D.; Bailey, J. H.; Brundage, R. P. *J. Med. Chem.* **1962**, *5*, 1063–1065.
- LeVine, H. *Protein Sci.* **1993**, *2*, 404–410.
- Lingham, R. B.; Hsu, A.; Silverman, K. C.; Bills, G. F.; Dombrowsky, A.; Goldman, M. E.; Darke, P. L.; Huang, L.; Koch, G. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 686–691.
- Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Del. Rev.* **1997**, *23*; 3–25.
- Liu, J.-K. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2723–2744.
- Ljung, A.; Östin, A.; Lioussanne, L.; Sandberg, G. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 464–475.
- Loftus, P. *The Wallstreet Journal Online* 16.08.2007
(<http://online.wsj.com/article/SB118730255664700229.html>) Zugriff: 26.11.2007.
- Lübken, T. Dissertation **2006a**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Lübken, T.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1061–1071.
- Lübken, T.; Arnold, N.; Wessjohann, L.; Böttcher, C.; Schmidt, J. *J. Mass Spectrom.* **2006b**, *41*, 361–371.
- Lupper, M. Dissertation **1988**, Universität Würzburg.
- Ma, X.; Gang, D. R. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 752–772.
- Mackenzie, A. H. *Am. J. Med.* **1983**, *75*, 5–10.
- Macnicol, P. K. *Biochem. J.* **1968**, *107*, 473–479.
- Marston, A.; Kissling, J.; Hostettmann, K. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 51–54.

- Mashkovsky, M. D.; Kruglikova-Lvova, R. P. *Farmakologia Toxicologia* **1951**, *14*, 27–30.
- Matsumoto, T.; Trüb, W.; Gwinner, R.; Eugster, C. H. *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 716–720.
- Mendez, J.; Masa, A. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1136–1137.
- Mendoza, C. E. *J. Chromatogr.* **1973**, *78*, 29–40.
- Michael, J. P. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 476–493.
- Mier, N.; Canete, S.; Kläbe, A.; Chavant, L.; Fournier, D. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1293–1296.
- Miersch, O.; Günther, T.; Fritsche, W.; Sembdner, G. *Nat. Prod. Lett.* **1993**, *2*, 293–299.
- Mohamad, H.; Abas, F.; Permana, D.; Lajis N. H.; Ali, A. M.; Sukari, M. A.; Hin, T. T. Y.; Kikuzaki, H.; Nakatani, N. *Z. Naturforsch.*, **2004**, *59c*, 811–815.
- Morrice, P.; Mustacchi, S.; Santagada, V.; Senatore, A.; Serra, D. *Boll. Soc. Nat. Napoli* **1984**, *91*, 156–156.
- Moser, M. *Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe)*. Verlag J. Klinkhardt, Bad Heilbrunn Obb., **1960**.
- Moser, M. *Kleine Kryptogamenflora*. Bd. IIb/2 Basidiomyceten: *Die Röhrlinge und Blätterpilze*. 5. bearb. Aufl., Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag, **1983**.
- Mossialos, D.; Meyer, J.-M.; Budzikiewicz, H.; Wolff, U.; Koedam, N.; Baysse, C.; Anjaiah, V.; Cornelis, P. *Appl. Envir. Microbiol.* **2000**, *66*, 487–497.
- Muñoz-Ruiz, P.; Rubio, L.; García-Palomero, E.; Dorransoro, I.; Monte-Millán, M.; Valenzuela, R.; Usán, P.; de Austria, C.; Bartolini, M.; Andrisano, V.; Bidon-Chanal, A.; Orozco, M.; Luque, F. J.; Medina, M.; Martínez, A. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7223–7233.
- Mutschler, E.; Geisslinger, G.; Kroemer, H. K.; Schäfer-Korting, M. *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. **2001**, 8. Aufl., Wiss. Verlag-Gesellschaft, Stuttgart.
- Nadikari, K. M. *Indian Materia Medica*, Ausg. 1, Popular Pakistan Limited, Bombay, **1976**, 927–929.
- Nagasaki, T.; Sugita, M.; Nakagawa, K.; Kawagoe, S.; Koyama, H. Patent DE 2148953, **1972**.
- Nawwar, M. A. M.; Barakat, H. H.; Buddrus, J.; Linscheid, M. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 818–819.
- Nealson, K. H. *Methods Enzymol.* **1987**, *57*, 153–166.
- Nozoe, S.; Hirai, K.; Tsuda, K.; Ishibashi, K.; Shirasaka, M.; Grove, J. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *51*, 4675–4677.
- Nuhn, P.; Wessjohann, L. A. *Naturstoffchemie*, 4. Aufl., S. Hirzel Verlag Stuttgart, **2006**.
- Nussbaum, F. v. Dissertation **1998**, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Nussbaum, F. v.; Spitteller, P.; Rütth, M.; Steglich, W.; Wanner, G.; Gamblin, B.; Stievano, L.; Wagner, F. E. *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3483–3485.
- Omura, S. *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 681–697.
- Ordentlich, A.; Barak, D.; Kronman, C.; Ariel, N.; Segall, Y.; Velan, B.; Shafferman, A. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19509–19517.

- Oubrahim, H.; Richard, J. M.; Cantin-Esnault, D. *Free Radical Res.* **1998**, *28*, 497–505.
- Pangalos, M. N.; Jacobsen, S. J.; Reinhart, P. H. *Biochem. Soc. Trans.* **2005**, *33*, 553–558.
- Peintner, U.; Moncalvo, J.-M.; Vilgalys, R. *Mycologia* **2004**, *96*, 1042–1058.
- Penevaa, E.; Trushevaa, B.; Gyoshevab, M.; Georgievab, P.; Popova, S.; Bankovaa, V. *PHCOG. MAG.* **2006**, *2*, 123–125.
- Perry, E. I. C.; Gibson, P. H.; Blessed, G.; Perry, R. H.; Tomlinson, B. E. *J. Neurol. Sciences* **1977**, *34*, 247–265.
- Petersen, U. *PharmuZ.* **2001**, *5*, 376–381.
- Pfefferle, C.; Kempter, C.; Metzger, J.; Fiedler, H. *J. Antibiotics*, **1996**, *49*, 826–828.
- Pinard, E.; Alanine, A.; Bourson, A.; Büttelmann, B.; Heitz, M.-P.; Mutel, V.; Gill, R.; Trube, G.; Wyler, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 2615–2619.
- Prost, I.; Dhondt, S.; Rothe, G.; Vicente, J.; Rodriguez, M. J.; Kift, N.; Carbonne, F.; Griffiths, G.; Esquerré-Tugayé, M. T.; Rosahl, S.; Castresana, C.; Hamberg, M.; Fournier, J. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1902–1913.
- Qu, Y.; Zhang, H. B.; Liu, J.-K. *Z. Naturforsch.* **2004**, *59b*, 241–244.
- Rapior, S.; Pelessier, Y.; Marion, C.; Hamitouche, C.; Milhau, M.; Bessiere, J. M. *Riv. Ital. EPPOS* **1997**, 607–610.
- Renth, E.-O.; Mentrup, A.; Schromm, K. Patent DE 2200041, **1973**.
- Rhee, I. K.; van de Meent, M.; Ingkanian, K.; Verpoorte, R. *J. Chromatogr. A* **2001**, *915*, 217–223.
- Riker Laboratories, Inc. AT Patent 359.497, **1980**.
- Rosahl, S.; Feussner, I. *Oxylipins*. In: *Plant Lipids: Biology, Utilisation and Manipulation*. Murphy, D. J. (Editor), Blackwell Publisher, Oxford, **2004**, 329–354.
- Roberson, E. D.; Mucke, L. *Science*, **2006**, *314*, 781–784.
- Roth, L.; Frank, H.; Kormann, K. *Giftpilze – Pilzgifte*. Ecomed-Verlag, Landsberg, **1990**.
- Rothweiler, W.; Tamm, C. *Experientia* **1966**, *22*, 750–752.
- Rüegger, A.; Kuhn, M.; Lichti, H.; Loosli, H.-R.; Huguenin, R.; Quiquerez, C.; von Wartburg, A. *Helv. Chim. Acta* **1976**, *59*, 1075–1090.
- Russo, C.; Saido, T. C.; DeBusk, L. M.; Tabaton, M.; Gambetti, P.; Teller, J. K. *FEBS Lett.* **1997**, *409*, 411–416.
- Rylett, R. J.; Ball, M. J.; Colhoun, E. H. *Brain Res.* **1983**, *289*, 169–175.
- Salm, R. F.; Zinsmeister, H. D.; Eicher, T. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 887–892.
- Sarre, S.; Deleu, D.; van Belle, K.; Ebinger, G.; Michotte, Y. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 746–750.
- Sassa, T.; Yoshida, N.; Haruki, E. *Agric. Biol. Chem.* **1989**, *53*, 3105–3107.
- Sauermost, R. *Lexikon der Biologie*, Bd.10. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2002**.
- Sauter, H.; Steglich, W.; Anke, T. *Angew. Chem.* **1999**; *111*, 1416–1438.
- Schilling, S. Dissertation **2004**, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Schilling, S.; Lauber, T.; Schaupp, M.; Manhart, S.; Scheel, E.; Bohm, G.; Demuth, H.-U. *Biochemistry* **2006**, *45*, 12393–12399.
- Schliemann, W. *Naturwissenschaften* **1991**, *78*, 392–401.
- Schott, Y.; Decker, M.; Rommelspacher, H.; Lehmann, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5840–5843.
- Schwarz, B.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007a**, *55*, 1394–1404.
- Schwarz, B.; Hofmann, T. *J. Agric. Food Chem.* **2007b**, *55*, 1405–1410.
- Sekiguchi, J.; Kuroda, H.; Yamada, Y. *Tetrahedron Lett.* **1985**, *26*, 2341–2342.
- Si-Ammour, A.; Mauch-Mani, B.; Mauch, F. *Mol. Plant Pathol.* **2003**, *4*, 237–248.
- Sievers, A. Dissertation **2004**, Universität Hamburg.
- Singer, R. *The Agaricales in modern taxonomy*. 4. Aufl., Koeltz, Königstein, **1986**.
- Spiteller, P.; Hamprecht, D.; Steglich, W. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4837–4838.
- Spiteller, P.; Spiteller, M.; Steglich, W. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 2864–2867.
- Stadler, M.; Sterner, O. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1013–1019.
- Starrat, A. N. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1477–1478.
- Steglich, W.; Kopanski, L.; Wolf, M.; Moser, M.; Tegtmeyer, G. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2341–2344.
- Stelzmann, R. A.; Schnitzlein, H. N.; Murtagh, F. R. *Clin. Anat.* **1995**, *8*, 429–431.
- Sterner, O.; Steffan, B.; Steglich, W. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 1075–1082.
- Sugimura, T.; Nagao, M.; Wakabayashi, K. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1982**, *136*, 1011–1025.
- Sussman, J. L.; Harel, M.; Frolow, F.; Oefner, C.; Goldman, A.; Toker, L.; Silman, I. *Science* **1991**, *252*, 872–879.
- Takeuchi, T.; Ogawa, K.; Hironobu, I.; Hiroyuki, S.; Katsuko, U.; Toshiharu, N.; Kato, M.; Hamao, U.; Osamu, T. *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 162–167.
- Talou, T.; Breheret/Hulin-Bertaud, S.; Gaset, A. *Identification of the major key flavour compounds in odorous wild mushrooms*. In: *Frontiers of Flavour Science [Proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium]*, Schieberle, P.; Engel, K.-H. (Editoren), Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie Garching, Bd. 9., 46–50, **2000**.
- Tamchès, E.; Orgogozo, J.-M.; Wilkinson, D.; Yancheva, S. T.; Gagliano, C.; Groscurin, P.; Porchet, H.; Scalfaro, P. *Alzheimer's and Dementia* **2006**, *2*, Supplement 1, 625.
- Tan, J. W.; Dong, Z. J.; Liu, J. K. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 307–309.
- Teichert, A. Diplomarbeit **2004**, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale und Universität Leipzig.
- Teichert, A.; Lübken, T.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. *Z. Naturforsch.* **2005a**, *60b*, 25–32.
- Teichert, A.; Lübken, T.; Kummer, M.; Besl, H.; Haslberger, H.; Arnold, N. *Z. Mykol.* **2005b**, *71*, 53–61.

- Tilstra, L.; Sattler, M. C.; Cherry, W. R.; Barkley, M. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 9176–9182.
- Toribio, F.; Moyano E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 812–828.
- Türker, M.; Demirel, K.; Uzun, Y.; Battal, P.; Tileklioglu, B. *Phyton-Annales Rei Botanicae* **2005**, *45*, 145–159.
- Tyler, G. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1980**, *74*, 41–49.
- Tyler, G. *Chemosphere* **1982**, *11*, 1141–1146.
- Ulitzur, S.; Hastings, J. W. *Curr. Microb.* **1980**, *3*, 295–300.
- Van, N. T. H.; Anh, N. T. H.; Sung, T. A.; Franke, K.; Wessjohann, L. *Tap Chi Hoa Hoc (Vietnamese Journal of Chemistry)* **2005**, *43*, 605–609.
- Vassar, P. S.; Culling, C. F. A. *Arch. Pathol.* **1959**, *68*, 487–498.
- Veau, B.; Guillot, J.; Damez, M.; Dusser, M.; Kanska, G.; Botton, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1428*, 39–44.
- Vetter, J. *Eur. Food Res. Technol.* **2000**, *211*, 346–348.
- Vollenweider, F. X.; Vollenweider-Scherpenhuyzen, M. F.; Babler, A.; Vogel, H.; Hell, D. *Neuroreport* **1998**, *9*, 3897–3902.
- Volk, R. B. Dissertation **1996**, Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Volk, R. B. *J. Appl. Phycol.* **2005**, *17*, 339–347.
- Walker, L. F.; Rosen, R. C. *Age and Ageing* **2006**, *35*, 332–335.
- Walsh, D. M.; Klyubin, I.; Fadeeva, J. V.; Cullen, W. K.; Anwyl, R.; Wolfe, M. S.; Rowan, M. J.; Selkoe, D. J. *Nature* **2002**, *416*, 535–539.
- Wakita S. *Sci. Rep. Yokohama Natl. Univ.* **1977**, *24*, 33–66.
- Wang, Y.-H.; Tang, J.-G.; Rui-Rui Wang, R.-R.; Yang, L.-M.; Dong, Z.-J.; Du, L.; Shen, X.; Liu, J.-K.; Zheng, Y.-T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2007**, *355*, 1091–1095.
- Weins, C.; Jork, H. *J. Chromatogr. A* **1996**, *750*, 403–407.
- Winkler, R.; Sandermann, H. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 2008–2012.
- Wood, W. F.; Smith, J.; Wayman, K.; Largent, D. L. *Mycologia* **2003**, *95*, 807–808.
- Yamac, M.; Bilgili, F. *Pharm. Biol.* **2006**, *44*, 660–667.
- Yomosa, K.; Hirota, A.; Sakai, H.; Isogai, A. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 921–922.
- Youssef, D. T. A. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1416–1419.
- Yu, X.; Hallett, S. G.; Sheppard, J.; Watson, A. K. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *47*, 301–305
- Zhang, Y.; Kua, J.; McCammon, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 10572–10577.
- Zenk, M. H. *Nature* **1961**, *191*, 493–494.
- Zieseniss, K.; Grabert, E. *Bioforum* **1995**, *18*, 455–457.

A. Anhang

A.1 Einkristallröntgenstruktur-Analyse von 57

Kristallstrukturdaten: Kenn-Nr.: ipds3196; Messtemperatur: 220(2) K; $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$; Kristallsystem: orthorhombisch; Kristallabmessungen: $0,40 \times 0,16 \times 0,08 \text{ mm}$; Raumgruppe: $a = 7,6105(9) \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$; $b = 8,0074(8) \text{ \AA}$, $\beta = 90^\circ$; $c = 19,009(3) \text{ \AA}$, $\gamma = 90^\circ$; Volumen: $1158,4(2) \text{ \AA}^3$; Z 4; $\rho_{\text{berechn.}} = 1,309 \text{ Mg/m}^3$; Absorptionskoeffizient: $0,106 \text{ mm}^{-1}$; $F(000)$ 484; gesammelte Reflexe: 8351; unabhängige Reflexe: 2137 [$R(\text{int}) = 0,0691$]; Goodness-of-fit on F^2 0,958; endverfeinerte Parameter [$I > 2\sigma(I)$]: $R1 = 0,0367$, $wR2 = 0,0711$; R indices (alle Daten): $R1 = 0,0631$, $wR2 = 0,0801$; absoluter Strukturparameter $0,2(14)$; Restelektronendichte: $0,312$ und $-0,183 \text{ e \AA}^{-3}$

Tab. A.1. Atomkoordinaten ($\times 10^4$) und äquivalente Auslenkungsparameter ($\text{\AA}^2 \times 10^3$). $U(\text{eq})$ ist ein Drittel der Spur des orthogonalen U_{ij} -Tensors.

| Atom | x | y | z | $U(\text{eq})$ |
|-------|----------|----------|----------|----------------|
| C(1) | -2516(3) | -1113(3) | -6669(1) | 22(1) |
| C(2) | -2710(3) | -2631(3) | -7021(1) | 22(1) |
| C(3) | -2335(3) | -2773(3) | -7734(1) | 21(1) |
| C(4) | -1737(3) | -1372(3) | -8106(1) | 22(1) |
| C(5) | -1533(3) | 133(3) | -7757(1) | 25(1) |
| C(6) | -1935(3) | 260(3) | -7042(1) | 24(1) |
| C(7) | -2934(3) | -950(4) | -5894(1) | 24(1) |
| C(8) | -1373(3) | -1394(3) | -5413(1) | 21(1) |
| C(9) | -829(3) | -3219(3) | -5495(1) | 21(1) |
| C(10) | -3110(4) | -5652(4) | -7767(2) | 37(1) |
| O(1) | -2497(2) | -4203(2) | -8125(1) | 29(1) |
| O(2) | -1384(2) | -1563(3) | -8809(1) | 29(1) |
| O(3) | 661(2) | -3504(2) | -5751(1) | 25(1) |
| O(4) | -1933(2) | -4289(2) | -5310(1) | 32(1) |
| O(5) | -973(3) | -7436(3) | -4839(1) | 45(1) |
| N | 130(3) | -226(3) | -5543(1) | 24(1) |

Tab. A.2 Bindungslängen [\AA].

| Atome | Abstand | Atome | Abstand |
|-----------|----------|-------------|----------|
| C(1)-C(6) | 1.381(3) | C(8)-N | 1.498(3) |
| C(1)-C(2) | 1.395(3) | C(8)-C(9) | 1.526(4) |
| C(1)-C(7) | 1.515(3) | C(8)-H(6) | 0.96(2) |
| C(2)-C(3) | 1.390(3) | C(9)-O(4) | 1.250(3) |
| C(2)-H(1) | 0.99(3) | C(9)-O(3) | 1.255(3) |
| C(3)-O(1) | 1.371(3) | C(10)-O(1) | 1.424(3) |
| C(3)-C(4) | 1.401(3) | C(10)-H(9) | 1.00(3) |
| C(4)-O(2) | 1.371(3) | C(10)-H(11) | 1.03(3) |
| C(4)-C(5) | 1.384(4) | C(10)-H(10) | 1.02(3) |
| C(5)-C(6) | 1.396(3) | O(2)-H(12) | 0.87(3) |
| C(5)-H(2) | 0.98(3) | O(5)-H(14) | 0.88(5) |
| C(6)-H(3) | 0.96(2) | O(5)-H(13) | 0.91(4) |
| C(7)-C(8) | 1.541(3) | N-H(7) | 0.91(3) |
| C(7)-H(4) | 1.00(2) | N-H(8) | 0.80(3) |
| C(7)-H(5) | 0.97(3) | | |

Tab. A.3. Bindungswinkel [$^\circ$].

| Atome | Winkel | Atome | Winkel |
|----------------|------------|-------------------|------------|
| C(6)-C(1)-C(2) | 118.8(2) | H(4)-C(7)-H(5) | 106(2) |
| C(6)-C(1)-C(7) | 119.9(2) | N-C(8)-C(9) | 111.92(19) |
| C(2)-C(1)-C(7) | 121.3(2) | N-C(8)-C(7) | 110.2(2) |
| C(3)-C(2)-C(1) | 121.1(2) | C(9)-C(8)-C(7) | 111.7(2) |
| C(3)-C(2)-H(1) | 119.9(14) | N-C(8)-H(6) | 108.1(14) |
| C(1)-C(2)-H(1) | 119.0(14) | C(9)-C(8)-H(6) | 107.2(15) |
| O(1)-C(3)-C(2) | 125.4(2) | C(7)-C(8)-H(6) | 107.4(14) |
| O(1)-C(3)-C(4) | 115.12(18) | O(4)-C(9)-O(3) | 126.2(2) |
| C(2)-C(3)-C(4) | 119.5(2) | O(4)-C(9)-C(8) | 116.42(19) |
| O(2)-C(4)-C(5) | 122.8(2) | O(3)-C(9)-C(8) | 117.3(2) |
| O(2)-C(4)-C(3) | 117.8(2) | O(1)-C(10)-H(9) | 104.0(16) |
| C(5)-C(4)-C(3) | 119.46(19) | O(1)-C(10)-H(11) | 110.6(17) |
| C(4)-C(5)-C(6) | 120.3(2) | H(9)-C(10)-H(11) | 115(2) |
| C(4)-C(5)-H(2) | 118.5(13) | O(1)-C(10)-H(10) | 115.8(18) |
| C(6)-C(5)-H(2) | 121.0(13) | H(9)-C(10)-H(10) | 105(2) |
| C(1)-C(6)-C(5) | 120.8(2) | H(11)-C(10)-H(10) | 106(2) |
| C(1)-C(6)-H(3) | 120.1(14) | C(3)-O(1)-C(10) | 116.82(18) |
| C(5)-C(6)-H(3) | 119.2(14) | C(4)-O(2)-H(12) | 109(2) |
| C(1)-C(7)-C(8) | 113.3(2) | H(14)-O(5)-H(13) | 104(3) |
| C(1)-C(7)-H(4) | 109.1(13) | C(8)-N-H(7) | 112.1(17) |
| C(8)-C(7)-H(4) | 110.3(13) | C(8)-N-H(8) | 111.7(19) |
| C(1)-C(7)-H(5) | 110.3(14) | H(7)-N-H(8) | 111(2) |
| C(8)-C(7)-H(5) | 108.1(14) | | |

A.2 Biologische Aktivitäten diverser *Hygrophorus*-Extrakte

Tab. A.4. Zusammenfassung der Ergebnisse beschriebener biologischer Aktivitätsuntersuchungen verschiedener *Hygrophorus* Extrakte

| Art | Extrakt | Bioaktivität | | | | | Referenz |
|---|--|---|---|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------|
| <i>H. poeтарum</i> | CH ₂ Cl ₂ MeOH | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Cladosp. cucum.</i> | Keller <i>et al.</i> (2002) | |
| | | + | - | + | + | | |
| <i>H. poeтарum</i> | CH ₂ Cl ₂ MeOH | <i>Aedes aegyptii</i> | <i>Biomphalaria glabrata</i> | Antiox.: β-Carotin | Antiox.: DPPH | Keller <i>et al.</i> (2002) | |
| | | + | + | - | - | | |
| <i>H. agathosmus</i> | CHCl ₃ CH ₂ Cl ₂ Aceton EtOH | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>Pseudom. aeruginosa</i> | Yamac & Bilgili (2006) |
| | | +++ | - | +++ | +++ | - | |
| | | - | - | - | + | - | |
| | | + | - | - | + | - | |
| <i>H. agathosmus</i> | CHCl ₃ CH ₂ Cl ₂ Aceton EtOH | <i>Staphyloc. aureus</i> | <i>Staphyloc. epidermis</i> | <i>Candida albicans</i> | <i>Saccharom. cerevisiae</i> | Yamac & Bilgili (2006) | |
| | | + | +++ | - | +++ | | |
| | | + | + | - | - | | |
| | | - | + | - | - | | |
| <i>H. mesotephrus</i> <i>H. piceae</i> <i>H. pustulatus</i> | EtOAc | <i>Bacillus brevis</i> | <i>Nematospora coryli</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> | Stadler & Sterner (1998) | | |
| | | - | ++ | (+) | | | |
| | | + | + | + | | | |
| <i>H. chrysodon</i> <i>H. niveus</i> | H ₂ O | <i>Drosophila melanogaster</i> LD ₁₀₀ | <i>Spodoptera littoralis</i> LD ₁₀₀ | Mier <i>et al.</i> (1996) | | | |
| | | 3 mg/ml | > 29 mg/ml | | | | |
| <i>H. cossus</i> <i>H. pudorinus</i> <i>H. olivaceoalbus</i> <i>H. poeтарum</i> <i>H. russula</i> <i>H. erubescens</i> | Aceton | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphyloc. aureus</i> | <i>Pseudom. acidovorans</i> | <i>Cladosp. herbarium</i> | Haslberger (1986) |
| | | ++ | + | ++ | + | ++ | |
| | | - | - | ++ | - | ++ | |
| | | + | + | ++ | ++ | ++ | |
| | | (+) | - | - | - | (+) | |
| | | (+) | - | - | - | - | |
| <i>H. dichrous</i> <i>H. pudorinus</i> <i>H. cossus</i> <i>H. nemoreus</i> | H ₂ O | Trypsin Inhibierung (TIU/mg) | | Vetter (2000) | | | |
| | | 2,10 | | | | | |
| | | 4,89 | | | | | |
| | | 2,25 | | | | | |
| <i>H. discoxanthus</i> | EtOAc | Cholinesterase Inhibierung | Antiox.: DPPH-Assay | <i>Bacillus subtilis</i> | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphyloc. aureus</i> | Sievers (2004) |
| | | ++ | + | - | - | - | |

+++ stark positiver Effekt; ++ deutlich positiver Effekt; + positiver Effekt; - kein Effekt

Lebenslauf

| | |
|-------------------------------|---|
| Name | Axel Teichert |
| Geburtsdatum | 21. September 1979 |
| Geburtsort | Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz |
| | |
| Schulbildung | |
| Sept. 1986 – Aug. 1992 | Polytechnische Oberschule, Karl-Marx-Stadt, jetzt Chemnitz |
| Sept. 1992 – Juli 1998 | Sportgymnasium Chemnitz |
| 03.07.1998 | Abitur |
| | |
| Zivildienst | |
| Aug. 1998 – Sept. 1999 | Tagespflege im Altenpflegeheim Harthau |
| | |
| Studium | |
| Okt. 1999 – Okt. 2003 | Studium der Pharmazie, Universität Leipzig |
| Okt. 2003 – Mai 2004 | Diplomstudium der Pharmazie, Universität Leipzig Diplomarbeit (extern am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale): „Fungitoxische Inhaltsstoffe aus Fruchtkörpern der Gattung <i>Hygrophorus</i> (Basidiomycetes)“ Betreuer: Prof. Dr. L. Wessjohann |
| Jan. 2005 – Jan. 2008 | Experimentelle Arbeiten zur Dissertation in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale |
| | |
| Berufliche Tätigkeiten | |
| Mai 2004 – Dez. 2004 | Praktikant innerhalb des 3. Ausbildungsabschnittes für Pharmazeuten, Römer-Apotheke Markkleeberg |
| Jan. 2005 – Jan. 2008 | Wissenschaftlicher Angestellter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle/Saale |
| Apr. 2005 – Dez. 2006 | Nebentätigkeit als Apotheker, Andreas-Apotheke Leipzig |
| Jan. 2007 – Jan. 2008 | Nebentätigkeit als Apotheker, Waldbaur-Apotheke Leipzig |
| | |
| Halle/Saale, 28. Januar 2008 | |

Verzeichnis der für diese Dissertation relevanten eigenen Publikationen

- Teichert, A.; Lübken, T.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. „Unusual Bioactive 4-Oxo-2-alkenoic Fatty Acids from *Hygrophorus eburneus*.“ *Z. Naturforsch.* **2005**, *60b*, 25–32.
- Teichert, A.; Lübken, T.; Kummer, M.; Besl, H.; Haslberger, H.; Arnold, N. „Bioaktive Sekundärmetaboliten aus der Gattung *Hygrophorus* (Basidiomycetes).“ *Z. Mykol.* **2005**, *71*, 53–61.
- Teichert, A.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. „Brunneins A–C, β -carboline alkaloids from *Cortinarius brunneus* (Basidiomycetes).“ *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1529–1531.
- Teichert, A.; Lübken, T.; Schmidt, J.; Kuhnt, C.; Huth, M.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. „Determination of β -Carboline Alkaloids in Fruiting Bodies of *Hygrophorus* spp. by Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry.“ *Phytochem. Anal.* **2008**, *19*, 335–341.
- Teichert, A.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. „*N*-Glucosyl Indole derivatives from *Cortinarius brunneus* (Basidiomycetes).“ *Chem. Biodiv.* **2008**, *5*, 664–669.
- Teichert, A.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. „(Iso)-Quinoline alkaloids from fungal fruiting bodies of *Cortinarius subtortus*.“ *J. Nat. Prod.*, **2008**, *71*, 1092–1094.
- Ali-Awadh, N. A.; Wurster, M.; Arnold, N.; Teichert, A.; Schmidt, J.; Lindequist, U.; Wessjohann, L. „Chemical Composition and Biological Activities of Essential Oils from the Oleogum Resins of three Endemic Soqotraen *Boswellia* Species.“ *Rec. Nat. Prod.* **2008**, *2:1*, 6–12.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Axel Teichert, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Axel Teichert