

**Entwicklung einer LC-MS basierten Methode
zur Identifizierung von aktivitätsrelevanten Metaboliten
in komplexen Mischungen**

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Chemie, Physik und Mathematik
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Frau Dipl.-Ing. (FH) Katharina Michels
geboren am 05.11.1980 in Minden (Westfalen)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ludger Wessjohann
2. Prof. Dr. Ulrike Lindequist

Halle (Saale), 16. Juni 2011

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2007 bis Juli 2010 am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle (Saale) angefertigt. Die Durchführung der Arbeit erfolgte unter der Leitung von Herrn Professor Wessjohann in der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie (NWC) und wurde vorwiegend mit Mitteln aus dem Paktantrag für Forschung und Innovation (Senatsausschuss, Wettbewerb) der Leibniz-Gemeinschaft „Identifizierung eigenschafts-relevanter Metabolitencluster“ (Teilprojekt Prof. Wessjohann) gefördert.

*Der Fortgang einer wissenschaftlichen Entwicklung ist im Endeffekt
eine ständige Flucht vor dem Staunen.*

(Albert Einstein)

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1. Zusammenfassung	1
2. Summary	4
3. Allgemeiner Teil	7
3.1 Einleitung und Zielstellung	7
3.2 Naturstoffe als biologisch aktive Verbindungen	10
3.2.1 Antibiotika	10
3.2.2 Biotest-Verfahren in der Naturstoffforschung	15
3.3 Ausgewählte Methoden zur Identifizierung von bioaktiven Metaboliten	19
3.3.1 non-targeted methods (Nicht-gerichtete Methoden)	19
3.3.1.1 Klassische Methode der Naturstoffisolierung	19
3.3.1.2 High Throughput Screening (HTS)	19
3.3.2 targeted methods (Gerichtete Methoden)	21
3.3.2.1 Bioassay-guided Isolation	22
3.3.2.2 LC-MS basierte Methoden	24
3.3.3 Metabolomics	26
3.4 Die Gattung <i>Hygrophorus</i>	28
3.4.1 Sekundärmetaboliten der Gattung <i>Hygrophorus</i>	28
3.5 Oxylipine und Fettsäuren als biologisch aktive Sekundärmetaboliten	32
4. Spezieller Teil	35
4.1 Extraktion der Pilzfruchtkörper	35
4.1.1 Optimierung hinsichtlich Ausbeute	35
4.1.2 Optimierung hinsichtlich Reproduzierbarkeit	38
4.2 Biologische Aktivität	43
4.2.1 Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten Biotests (<i>Bacillus subtilis</i>)	43
4.2.2 Biologische Aktivität von <i>Hygrophorus</i> -Extrakten	49

4.2.2.1	Antibakterielle Wirkung in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel	49
4.2.2.2	Antibakterielle Wirkung von lyophilisierten bzw. tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern.....	51
4.2.2.3	Antibakterielle Aktivität ausgewählter <i>Hygrophorus</i> -Arten.....	53
4.2.3	Biologische Aktivität von Hygrophoronen.....	54
4.3	Massenspektrometrie	56
4.3.1	Entwicklung einer automatisierten LC-MS ⁿ Methode zur Analyse von komplexen Mischungen.....	56
4.4	„Reverse Metabolomics“ – Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA).....	57
4.4.1	Prinzip	57
4.4.2	„Proof of concept“ mit artifiziellen Extrakten.....	59
4.4.3	„Proof of concept“ mit nativen Extrakten	62
4.4.3.1	Variationssimulation mittels zugesetzter Antibiotika.....	62
4.4.3.2	Variationserzeugung mittels verschiedener Modifikationsmethoden ...	64
4.4.4	Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten in biologisch aktiven Extrakten	70
4.4.4.1	Anwendung der AcorA – Methode auf einen Methanol-Extrakt aus <i>Hygrophorus latitabundus</i>	70
4.4.4.2	Anwendung der AcorA – Methode auf Methanol-Extrakte verschiedener <i>Hygrophorus</i> -Spezies	75
4.5	Isolierung und Strukturaufklärung der aktivitätsrelevanten Verbindung.....	78
4.5.1	Metabolit <i>m/z</i> 313	79
4.5.1.1	Isolierung.....	79
4.5.1.2	Strukturaufklärung	81
4.5.2	Metabolit <i>m/z</i> 311	86
4.5.2.1	Isolierung.....	87
4.5.2.2	Strukturaufklärung	89
4.5.3	Metabolit <i>m/z</i> 341	95
4.5.3.1	Isolierung.....	95
4.5.3.2	Strukturaufklärung	96
4.5.4	Vergleich der isolierten Metaboliten mit den Metabolitenprofilen von <i>H. latitabundus</i> und <i>H. poetarum</i>	100

5. Experimenteller Teil	102
5.1 Pilzmaterial	102
5.2 Extraktion	105
5.2.1 Extraktionsoptimierung	105
5.2.1.1 Mittels Ultraschall	105
5.2.1.2 Mittels Extraktor	106
5.2.2 Sonstige Extraktionsmethoden	108
5.3 Biotest.....	110
5.3.1 Medium	110
5.3.2 Testsystem	111
5.4 Entwicklung von Modifikationsmethoden	112
5.5 Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten	115
5.5.1 „Proof of concept“ mit artifiziellen Extrakten.....	115
5.5.2 „Proof of concept“ mit nativen Extrakten	117
5.5.3 AcorA mit biologisch aktiven Extrakten	119
5.6 Datenanalyse	120
5.6.1 Peakpicking und Alignment	121
5.6.2 Korrelationsanalyse	121
5.7 Massenspektrometrie	121
5.7.1 LC-ESI-Ion trap-MS ⁿ	122
5.7.2 LC-ESI-QqQ-MS ²	123
5.7.3 UPLC-ESI-Q-TOF-MS	124
5.7.4 ESI-FTICR-MS	124
5.7.5 ESI-MS.....	124
5.7.6 GC-MS	125
5.8 Derivatisierungen.....	125
5.9 Isolierung und Aufreinigung.....	127
5.9.1 Dünnschichtchromatographie (DC).....	127
5.9.2 Säulenchromatographie (SC)	127
5.9.3 Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC).....	128

5.9.4 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	129
5.9.5 Isolierung aktivitätsrelevanter Metaboliten	130
5.10 NMR-Spektroskopie	132
5.11 Geräte und Chemikalien	132
6. Charakterisierung	133
7. Literaturverzeichnis	137
a. Anhang	143

Danksagung

Lebenslauf

Publikationsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung

Abkürzungen

AB	Antibiotikum
AcorA	Aktivitäts-Korrelations-Analyse (<u>A</u> ctivity <u>c</u> orrelation <u>a</u> nalysis)
A. dest	Aqua destillatum
AE	Artifizieller Extrakt
a.i.	arbitrary intensities
Amo	Amoxicillin
anal.	analytisch
ber.	berechnet
CID	kollisionsinduzierte Dissoziation (collisional induced dissociation)
COSY	Correlation Spectroscopy – ^1H - ^1H -Korrelation über skalare Kopplungen
CV	Variationskoeffizient (coefficient of variation)
DBE	Doppelbindungsäquivalente (double bond equivalents)
DC	Dünnschichtchromatographie
DDIT	data dependent ion tree
DMS	Dimethylsulfid
det.	determinavit
<i>dd</i>	doppeltes Dublett
<i>dt</i>	doppeltes Triplett
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMAP	4-Dimethylamino-pyridin
E	Extrakt
EI	Elektronenstoß Ionsisation
EIC	extrahiertes Ionenchromatogramm
Ery	Erythromycin
ESI	Elektrospray Ionisierung
FTICR	Fouriertransformation Ionenzyklotronresonanz
GC	Gaschromatographie
gem.	gemessen
getrockn.	getrocknet
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
HR	Hochauflösung (high resolution)
HTS	Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening)
I	Inhibierung

IC ₅₀	Konzentration bei der 50 % Inhibierung erreicht wurde (inhibition concentration)
IYFP	verbesserte Variante des gelb-fluoreszierenden Proteins (improved variant of yellow fluorescent protein)
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
leg.	legit
lyophil.	lyophilisiert
<i>m</i>	Multipllett
MIC	minimale Inhibierungskonzentration (minimal inhibition concentration)
MOA	Methoxylamin
MPLC	medium performance liquid chromatography
MRSA	multiresistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoracetamid
<i>m/z</i>	Masse/Ladung Verhältnis
NCE	normalisierte Kollisionsenergie (normalised collisional energy)
NMR	Kernmagnetische Resonanz (nuclear magnetic resonance)
OD	Optische Dichte
PDA	Photodiodenarray-Detektor
präp.	präparativ
QqQ	Triple Quadrupol
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units)
Rif	Rifampicin
RP	Umkehrphase (reversed phase)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
SAX	starker Anionenaustauscher (strong anion exchange)
SCX	starker Kationenaustauscher (strong cation exchange)
Sek.	Sektion
SiOH	Kieselgel
SPE	Festphasenextraktion (solid phase extraction)
SV	Säulenvolumen
tiefgefr./tfg.	tiefgefroren
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TOF	Time of flight
uHTS	ultra Hochdurchsatz-Screening (ultra high-throughput screening)
UPLC	Ultra Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

1. Zusammenfassung

Bioaktive Metaboliten sind Naturstoffe, die im Laufe der Evolution von Organismen entwickelt wurden um bestimmte intra- und interorganismische Aufgaben zu erfüllen. Diese weisen daher eine einzigartige strukturelle Diversität und biologische Aktivität auf. Sie dienen vor allem in der Pharmazeutischen Industrie als Leitsubstanzen für neue Therapeutika. In Zeiten zunehmender bakterieller Resistenzentwicklung besteht darüber hinaus ein großer Bedarf an neuartigen Natur- und Wirkstoffen. Das weitgehend unerforschte Reich der Pilze stellt dabei eine reichhaltige Quelle für neue bioaktive Metaboliten dar.

Naturstoffextrakte repräsentieren eine komplexe Mischung aus einer Vielzahl von Substanzen mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Die traditionelle Naturstoffisolierung ist daher ein langwieriger und vor allem zeitaufwendiger Prozess. Erst in Kombination mit modernen Techniken wie zum Beispiel LC-MS und bioinformatischen Methoden, ist es möglich, das umfangreiche Potential komplexer Mischungen wie Extrakte effizienter auszunutzen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine LC-MS basierte Methode entwickelt, welche die Identifizierung von aktivitätsrelevanten Metaboliten in komplexen Mischungen, bereits vor deren Isolierung ermöglicht. Dies wird durch eine direkte Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA – activity correlation analysis) der Metabolitenprofile mit den (Bio-)Aktivitätsprofilen ermöglicht. Dabei wird ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Peakintensität und einer biologischen Aktivität angenommen. Durch eine Veränderung der relativen Konzentration der enthaltenen Substanzen und der damit verbundenen erhöhten oder erniedrigten Peakintensität (Metabolitenprofil) und biologischen Aktivität (Bioaktivitätsprofil), kann das Maß der Korrelation anhand des Verlaufs der Aktivität und der Peakintensität bestimmt werden. Dadurch können diejenigen Peaks identifiziert werden, die im direkten Zusammenhang zu den aktivitätsrelevanten Metaboliten stehen.

Als biologische Aktivität wurde die antibakterielle Wirkung gegen das gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* ausgewählt. Da die Gattung *Hygrophorus* (Basidiomyceten) in Hinblick auf antibakteriell wirksame Metaboliten ein vielversprechendes Potential aufweist, wurden verschiedene Spezies dieser Gattung mittels AcorA untersucht. Hierfür wurde zunächst eine „data dependent“ LC-MS³-Methode, sowie ein geeignetes Extraktionsverfahren entwickelt und in Hinblick auf Reproduzierbarkeit optimiert. Dabei wiesen sowohl die Extraktions- als auch die Messreplikate mit Korrelationskoeffizienten $R^2 \geq 0,92$ eine hohe Reproduzierbarkeit auf (negative Elektrospray Ionisierung).

Zur Erfassung der biologischen Aktivität der Extrakte wurde ein Fluoreszenz-basierter antibakterieller Biotest gegen *Bacillus subtilis* entwickelt. Dafür kam ein genetisch modifizierter Stamm zum Einsatz, der eine verbesserte Variante des Gelb-fluoreszierenden Proteins während der exponentiellen Phase exprimiert. Die Fluoreszenzintensität ist dabei direkt proportional zu der bakteriellen Vitalität und ermöglicht die Bestimmung der relativen Wachstumsinhibierung. Bei einem Screening von verschiedenen *Hygrophorus* spp. zeigten insbesondere unpolare Extrakte der untersuchten Arten eine stärkere antibakterielle Wirkung, als deren polare Extrakte. Zudem konnte eine bemerkenswerte Aktivität vor allem bei den Extrakten aus *H. latitabundus* und *H. poecharum* beobachtet werden.

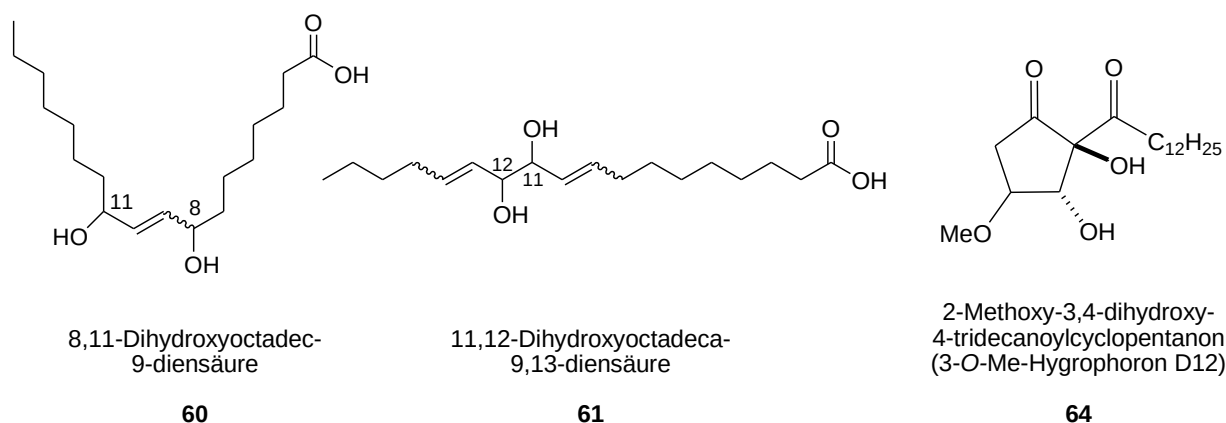
Zum Nachweis, dass AcorA zur Identifizierung von bioaktiven Metaboliten in komplexen Mischungen angewendet werden kann, wurde zunächst ein „Proof of concept“ Experiment mit künstlichen Extrakten, bestehend aus inaktiven Reinsubstanzen, durchgeführt. Zur Simulation einer biologischen Aktivität und einer natürlichen Variation, wurden Mischungen der Antibiotika Erythromycin, Rifampicin und Amoxicillin zugesetzt. Nach der Erfassung der Metabolitenprofile mittels LC-MS und Ermittlung des Aktivitätsprofils im antibakteriellen Biotest, wurde mittels AcorA eine Hitliste aus signifikant positiv korrelierenden Peaks erstellt, welche von den Antibiotika-Peaks dominiert wurde. Ohne die jeweiligen Retentionszeiten, sowie das MS-Verhalten der Antibiotika zu kennen, war es mittels AcorA möglich, die aktivitätsrelevanten Rifampicin- und Erythromycin-Peaks zu identifizieren. Da Amoxicillin in den eingesetzten Konzentrationen keine wachstumsinhibierende Wirkung gegen *B. subtilis* aufwies, wurde dies mittels AcorA nicht identifiziert. Es zeigten vor allem Peakcluster, bestehend aus Molekülion, Isotopenpeaks und Addukten, eine signifikante Korrelation zu der biologischen Aktivität und bestätigten so richtig korrelierende Peaks.

Zur Steigerung der Komplexität der Matrix kamen weiterhin inaktive Rohextrakte verschiedener *Hygrophorus* spp. zum Einsatz, welche ebenfalls mit verschiedenen Antibiotikamischungen unterschiedlicher Konzentration versetzt wurden. Auch in diesem Fall war es möglich die Antibiotika-Peaks mittels AcorA zu identifizieren. Da Peakcluster ausschließlich bei richtig korrelierenden Peaks auftraten, können diese bei unbekannten Metaboliten zur Differenzierung von richtig und zufällig korrelierenden Peaks herangezogen werden.

Um das Potential der Methode in „real case“ Experimenten zu demonstrieren, wurden außerdem native biologisch aktive Rohextrakte mittels AcorA untersucht und die aktivitätsrelevanten Verbindungen identifiziert. So zeigte vor allem der Methanol-Extrakt aus *H. latitabundus* eine starke native antibakterielle Aktivität gegen *B. subtilis*. Daher wurde AcorA zur *ab initio* Identifizierung der bioaktiven Verbindungen eingesetzt. Dafür wurden einzelne Extrakt-Aliquote verschiedenen physikalischen und chemischen Modifikationsmethoden unterzogen. Nach der Korrelationsanalyse zeigten die Metaboliten

m/z 311 (**61**) und m/z 313 (**60**), jeweils als Peakcluster, eine signifikante Korrelation zu der biologischen Aktivität. Zur Verifizierung der antibakteriellen Wirkung wurden diese nach einer m/z -geleiteten Strategie isoliert und mittels verschiedener massenspektrometrischer Methoden strukturell charakterisiert. Bei beiden Verbindungen handelt es sich vermutlich um zweifach hydroxylierte, ungesättigte Fettsäuren, die eine wachstumsinhibierende Wirkung gegen *B. subtilis* aufweisen.

In einem weiteren Experiment mit Extrakten aus insgesamt neun verschiedenen *Hygrophorus* spp. wurde AcorA ebenfalls zur Identifizierung der aktiven Metaboliten eingesetzt. Dabei zeigte Verbindung **61** auch in diesem Fall eine signifikante Korrelation zu der biologischen Aktivität. Des Weiteren wurde ein Peakcluster identifiziert, welches auf den Metaboliten m/z 341 (**64**) zurückzuführen ist. Es handelt sich hierbei vermutlich um das Artefakt 3-O-Methyl-2,3-dihydrohygrophoron (**64**) mit einem Cyclopentanon-Grundgerüst, welches durch Addition von Methanol entstanden ist. Dies konnte durch Addition von CD_3OD bestätigt werden. Nach der m/z -geleiteten Isolierung war es auch in diesem Fall möglich, die antibakterielle Wirkung gegen *B. subtilis* zu verifizieren.



Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine LC-MS basierte Methode entwickelt werden, die eine direkte Identifizierung von bioaktiven Metaboliten in komplexen Mischungen ohne vorherige Aufreinigung ermöglicht. Dies erlaubt eine zielgerichtete und somit weniger zeitintensive Isolierung von ausschließlich aktivitätsrelevanten Verbindungen. Darüber hinaus können die Metabolitenprofile mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Aktivitätsprofilen korreliert werden. Dadurch wird eine umfassende und effiziente Charakterisierung nicht nur von Naturstoffextrakten, sondern auch von komplexen Mischungen wie zum Beispiel in der kombinatorischen Chemie ermöglicht.

2. Summary

Bioactive metabolites are natural products, which were developed during evolution and provide a unique structural diversity. Because of their promising biological activities, natural products often serve as lead compounds for pharmaceuticals. During the last decades a strong increase of resistant bacteria against various therapeutic agents has been recognized. Due to this, there is a big demand of new natural products e.g. with antibiotic potential and thereof derived drugs. The large and mostly unexplored fungal kingdom provides a rich source of new bioactive metabolites.

Natural product extracts represent a complex mixture of hundreds or thousands of compounds with different chemical properties. Thus, the traditional process of lead compound isolation from extracts is time-consuming and tedious. A more comprehensive exploitation of complex mixtures and extracts is only possible in combination with modern techniques e.g. LC-MS and bioinformatics.

Within this thesis, a LC-MS based method was developed, which enables the identification of activity relevant metabolites in complex mixtures prior to isolation. Therefore, a direct Activity-correlation-Analysis (AcorA) has been developed and adapted to metabolite profiles and the corresponding (bio-)activity profiles. Therefore, a proportional relation between the peak intensity and biological activity is assumed. By modification of the relative concentrations of the contained compounds, resulting in an enhanced or decreased peak intensity in the metabolite profile and accordingly of the biological activity (bioactivity profile), the degree of correlation can be determined based on the trend of the activity and peak intensity over all samples. This leads to the identification of those peaks, which correlate to the activity and thus ideally to the relevant metabolites.

As biological activity, the antibacterial inhibition of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* was chosen. Secondary metabolites from the fungal genus *Hygrophorus* (basidiomycetes) are promising candidates for antibacterial compounds. Thus, several species of this genus were analysed using AcorA.

In the beginning, a data dependent LC-MS³ analysis and a suitable extraction method for fungal fruiting bodies were developed and optimized with regard to a high reproducibility. As result, the extraction replicates as well as the measurement replicates were highly reproducible ($R^2 \geq 0,92$, negative electrospray ionisation).

To assess the biological activity of the extracts, a fluorescence-based antibacterial bioassay against *Bacillus subtilis* was developed. Therefore, a genetically modified strain of *B. subtilis* was used, which produces an improved variant of the yellow-fluorescent protein during the exponential growth phase. The fluorescence intensity is directly proportional to the bacterial

viability and enables the determination of the relative growth inhibition. It could be shown, that among the screened samples, the extracts of *H. latitabundus* and *H. poetarum* exhibited a remarkable biological activity. Additionally, the non-polar extracts of the investigated species exhibit higher activities than the corresponding polar extracts.

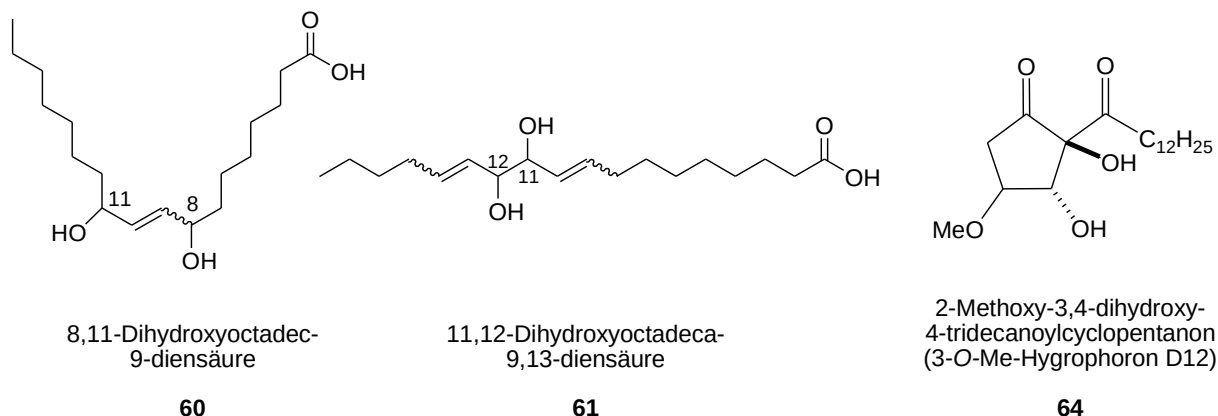
In a proof of concept experiment AcorA was applied for the identification of antibiotics in artificial extracts containing antibacterial inactive compounds. To simulate a biological activity and natural variation, the antibiotics erythromycin, rifampicin, and amoxicillin were added to different mixtures. After determination of the metabolite profile of the created extracts by LC-MS and the corresponding activity profile using the antibacterial bioassay, a hit list of significant positive correlating peaks was generated which was dominated by the antibiotic peaks. Without the knowledge of their retention time and MS behavior, it was possible to identify the activity relevant rifampicin and erythromycin peaks using AcorA. Because amoxicillin had no inhibitory effect to *B. subtilis* in the concentrations used, it could not be identified by AcorA. Peak clusters consisting of the molecular ion, isotopic peaks and adducts exhibit a significant correlation to the biological activity and indicate true correlating peaks.

To enhance the complexity of the matrix, inactive crude extracts of different *Hygrophorus* spp. were spiked as described above in the proof of concept experiment. Also, it was possible to identify the antibiotic peaks using AcorA. Because peak clusters only appeared in case of true correlating peaks, they can be used to differentiate correct and random correlating peaks.

To demonstrate the potential of this method also in real case experiments, native bioactive crude extracts were analysed and the activity relevant metabolites identified using AcorA. Especially, the methanolic extract of *H. latitabundus* exhibited a very strong antibacterial activity. Thus, AcorA was applied to identify the responsible bioactive compounds. To generate the required variation, different extract aliquots were modified by several physical and chemical modification methods. After the correlation analysis, the metabolites *m/z* 311 (**61**) and *m/z* 313 (**60**), each as a peak cluster, exhibited a significant correlation to the biological activity. To verify the antibacterial activity, the metabolites were isolated by a *m/z*-guided strategy and structurally characterized by different mass spectrometry methods. In both cases, dihydroxylated, unsaturated fatty acids were identified, which show an antibacterial activity against *B. subtilis*.

Furthermore, crude extracts from nine different *Hygrophorus* species were investigated in one step. Compound **61** exhibited again a significant correlation to the bioactivity. Moreover, another peak cluster could be identified, which correspond to the metabolite *m/z* 341 (**64**). This compound appears to be a hygrophorone derivative with a cyclopentanone structure, which was formed by addition of methanol to the native cyclopentenone. This could be

confirmed by an addition of CD₃OD. After the *m/z*-guided isolation it was also in this case possible to verify the antibacterial activity.



Within this dissertation, a LC-MS based method could be developed, which enables the direct identification of bioactive metabolites in complex mixture prior to purification. Thus, a directed isolation of only the activity relevant compounds is necessary, which is less time-consuming. Moreover, it is possible to correlate the once detected metabolite profiles with a multitude of activity profiles from different bioassays. This enables a comprehensive and efficient characterization not only of crude extracts from natural sources, but also of other complex mixtures like in combinatorial chemistry.

3. Allgemeiner Teil

3.1 Einleitung und Zielstellung

Die Natur bietet aufgrund der umfangreichen Artenvielfalt der Flora und Fauna ein riesiges Reservoir an chemischen Verbindungen. Bereits seit hunderten oder tausenden von Jahren nutzen die Menschen dieses Potential um Krankheiten zu heilen oder sich vor ihnen zu schützen. Naturstoffe sind niedermolekulare chemische Verbindungen, die aus natürlichen Quellen gewonnen werden. Hierbei handelt es sich oftmals um Sekundärmetaboliten, die von den Organismen gebildet werden um sich einen Vorteil gegenüber Artgenossen, Fraßfeinden, Nahrungskonkurrenten oder ähnlichem zu verschaffen und bilden somit die Grundlage spezifischer Verteidigungsstrategien. Die Naturstoffe wurden dabei über tausende von Jahren evolutiv entwickelt und für ihre jeweiligen Zwecke optimiert.

Durch die Vielfalt der Organismen weisen Naturstoffe eine einzigartige strukturelle Diversität und biologische Aktivität auf. Sie finden daher nicht nur in der Kosmetik- oder Nahrungsmittelindustrie Anwendung, sondern bieten auch für die Pharmazeutische Industrie ein enormes Potential. Sie dienen insbesondere in der Wirkstoffforschung als Leitsubstanzen. In den letzten 75 Jahren haben Naturstoffe oder Naturstoff-abgeleitete Verbindungen zu der Entdeckung bzw. Entwicklung von unzähligen Therapeutika geführt. ⁽¹⁾ So sind insgesamt 75 % der in einem Zeitraum von 25 Jahren – Januar 1981 bis Juni 2006 – auf den Markt gebrachten Antiinfektiva¹ auf Naturstoffe (26,6 %), Naturstoffmimetika (16,6 %) oder Naturstoff-abgeleitete Verbindungen (32,3 %) zurückzuführen und lediglich 24,5 % sind rein synthetischen Ursprungs. ⁽²⁾

Insbesondere im Bereich der Antibiotika wurde in den letzten Jahrzehnten eine zunehmende Resistenzentwicklung gegen etablierte Therapeutika beobachtet. Es besteht daher ein stetig wachsender Bedarf an Wirkstoffen mit geeigneten pharmakologischen Profilen. Die Erschließung von neuen Quellen für die Entdeckung von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten ist daher unerlässlich. Das weitestgehend unerforschte Reich der Pilze bietet mit seinen geschätzten 1,5 Millionen Arten eine reichhaltige und vielversprechende Quelle für neuartige Naturstoffe. ⁽³⁾ Das in dieser Hinsicht erfolgversprechende Potential der Pilze konnte bereits in der Vergangenheit mehrfach gezeigt werden. So wurde beispielsweise in den 80iger Jahren in der Gattung *Strobilurus* (Basidiomyceten) die Naturstoffgruppe der Strobilurine entdeckt. Davon abgeleitete synthetische Derivate werden bereits seit zwei Jahrzehnten kommerziell als fungizide Pflanzenschutzmittel eingesetzt. ⁽⁴⁾

¹ Antibakterielle, -fungale, -parasitische und -virale Arzneistoffe (n = 230)

Als Medikamente für die humane Therapie finden z.B. die semisynthetisch erzeugten Echinocandine Capsifungin und Micafungin Anwendung.⁽⁵⁾ Dies verdeutlicht, dass Pilze ein enormes Spektrum an bioaktiven Naturstoffen produzieren können.

Die Entdeckung neuer Naturstoffe aus natürlichen Quellen ist jedoch aufgrund geringer Mengen oder hochkomplexer Extraktgemische sehr aufwendig und zeitintensiv. Zusätzlich ist die erneute Isolierung von bereits bekannten Sekundärmetaboliten (Replikation) trotz großen Aufwandes zur Dereplikation nicht zu vermeiden. Es werden daher leistungsstarke Methoden benötigt, die es ermöglichen die biologisch aktiven Metaboliten gezielt zu identifizieren und somit eine Dereplikation zu minimieren oder zu vermeiden.

In den 90er Jahren kam es trotz des vielversprechenden Potentials der Naturstoffe als Leitsubstanzen zum Rückgang der Naturstoffforschung. Diese Entwicklung ist hauptsächlich auf die Einführung der Kombinatorischen Chemie und des damit verbundenen Hochdurchsatz-Screenings (HTS) zurückzuführen. Derartige Technologien galten als sehr erfolgversprechend, da die Nachteile der klassischen Naturstoffisolierung umgangen werden konnten.⁽⁵⁾ Trotz umfangreicher HTS-Programme und *small-molecule* Bibliotheken konnte die Kombinatorische Chemie nicht den gewünschten Erfolg bringen.⁽²⁾

In den letzten Jahren hat die Naturstoffforschung einen neuen Aufschwung erfahren, der im direkten Zusammenhang mit technologischen Fortschritten in der Analytischen Chemie steht.⁽⁶⁾ Dabei haben insbesondere innovative Techniken wie LC-MS und LC-NMR für die Wiederbelebung der Naturstoffisolierung aus natürlichen Quellen geführt. Diese erlauben teilweise eine Charakterisierung der Metaboliten bereits vor der Isolierung und bieten darüber hinaus vielversprechende Möglichkeiten in kürzester Zeit verschiedene Quellen speziesübergreifend zu analysieren und deren Potential in Hinblick auf die gewünschte Verwendung vorab abzuschätzen. Die sich daraus ergebenden Möglichkeiten der umfassenden Metabolom-Analyse führten zu einer raschen (Weiter-)Entwicklung verschiedener „omics“ Techniken. So wurde neben der Analyse des Genoms – Genomics und des Proteoms – Proteomics, die Analyse des Metaboloms – Metabolomics eingeführt. Dabei wird auf die qualitative und möglichst quantitative Analyse aller Metaboliten eines Organismus bzw. Organs oder Gewebes abgezielt. In Kombination mit verschiedenen bioinformatischen Methoden eröffnet dies zahlreiche neue Wege hinsichtlich Qualitätskontrolle z.B. von Pflanzenextrakten für medizinische Anwendungen oder Biomarkerentdeckung auf dem Gebiet der Humanmedizin. LC-MS oder LC-NMR basierte Metabolomics Techniken bieten insbesondere in Kombination mit der Naturstoffchemie vielfältige Möglichkeiten zur Entdeckung und Charakterisierung neuer Naturstoffe.⁽⁷⁾ Darüber hinaus konnte bereits in der Vergangenheit erfolgreich gezeigt werden, dass die Kopplung zwischen chromatographischen Verfahren wie z.B. der Dünnschichtchromatographie (DC) und Biotests sehr vielversprechend ist, da die aktiven Metaboliten direkt lokalisiert werden

können und somit die Isolierung gezielt erfolgen kann. ⁽⁶⁾ In den letzten Jahren wurde außerdem die online-Kopplung von HPLC und biologischen Testsystemen eingeführt. ⁽⁸⁾ Die simultane Analyse der Metaboliten und einer korrespondierenden biologischen Aktivität ermöglicht somit die direkte Identifizierung der aktiven Metaboliten in komplexen Gemischen. Nachteil derartiger Systeme ist allerdings, dass die eingesetzten Biotests sehr spezifisch sind und das Target bekannt sein muss. Als Testsysteme kommen daher nur solche in Frage, die auf einem gut charakterisierten molekularen Target wie zum Beispiel Enzym-Inhibitor oder Rezeptor-Ligand Bindungsassay beruhen. In der Naturstoffforschung werden jedoch hauptsächlich Testsysteme verwendet, die vor allem einfach und schnell in Screening Programme eingebunden werden können. Es wird somit vor allem die antibakterielle, antifungale etc. Wirkung von Naturstoffextrakten in die bioaktivitäts-geleitete Isolierung einbezogen. ⁽⁶⁾ Bisher gibt es jedoch keine analytischen Methoden, die diese Art von Biotest direkt einbeziehen.

Zielstellung dieser Arbeit ist die Entwicklung und Etablierung einer LC-MS basierten Methode, die eine direkte Identifizierung der aktivitätsrelevanten Metaboliten und/oder Metabolitenclustern in komplexen Mischungen bereits vor der Isolierung und Aufreinigung ermöglicht. Als biologische Aktivität wurde dafür die antibakterielle Wirkung gewählt, welche direkt mit den Metabolitenprofilen pilzlicher Naturstoffextrakte korreliert werden soll.

3.2 Naturstoffe als biologisch aktive Verbindungen

3.2.1 Antibiotika

Bereits in den 1870er Jahren entdeckten Louis Pasteur, John Tyndall und William Roberts getrennt voneinander den antagonistischen Effekt, den Mikroorganismen gegenüber Konkurrenten aufweisen.⁽⁹⁾ Daraufhin postulierte der französische Naturforscher und Mediziner Louis Pasteur den therapeutischen Nutzen dieser Entdeckung.

In den nachfolgenden Jahren befassten sich etliche Wissenschaftler mit dieser Theorie. Doch erst 50 Jahre später machte sich Alexander Fleming seine Beobachtung zu Nutze, dass eine Schimmelpilzkontamination das Wachstum seiner Bakterienkultur hemmte.⁽¹⁰⁾ Er identifizierte den Schimmelpilz als *Penicillium notatum*, kultivierte den Pilz separat und konnte zeigen, dass die Pilz-freie Nährlösung das Wachstum zahlreicher Bakterien inhibierte. Er nannte die biologisch aktive Substanz Penicillin (**1**).⁽⁹⁾ Trotz zahlreicher Bemühungen war es jedoch nicht möglich die antibakterielle Verbindung aufzureinigen. Erst im Jahre 1939 gelang es den britischen Wissenschaftlern Howard Walter Florey und Ernst Boris Chain die Substanz Penicillin (**1**) zu isolieren und diese erfolgreich bei Mensch und Tier anzuwenden.⁽⁹⁾ Für diese revolutionäre Entdeckung erhielten Fleming, Florey und Chain 1945 den Nobelpreis für Medizin.

Etwa zeitgleich befasste sich Gerhard Domagk mit der antibakteriellen Therapie. Er studierte den Effekt, den Farbstoffe auf Bakterien auslösten und entdeckte so die antibakterielle Wirkung der Sulfonamide. Bereits 1936 wurde der erste synthetisch hergestellte Farbstoff als Medikament mit dem Namen Prontalbin vermarktet.⁽¹¹⁾

Die Entdeckung der Penicilline (β -Lactam Antibiotika) und der Sulfonamide führten zum Durchbruch der Antibiotikaforschung und läuteten das „Goldene Zeitalter“ (1940-1962) der Antibiotika ein.⁽¹²⁾ Kurze Zeit später isolierte Selman Waksman das Antibiotikum Actinomycin A aus einem Bodenbakterium und verwendete dieses aufgrund seiner zytostatischen Eigenschaft erfolgreich in der Tumorthherapie. 1945 entdeckte Waksman das Aminoglykosid Streptomycin, das erste Antibiotikum das gegen den Tuberkuloseerreger aktiv war.⁽⁹⁾ In den darauf folgenden Jahren wurden 25 weitere Antibiotika aus verschiedenen *Streptomyces* Spezies von der Waksman Gruppe entdeckt und isoliert. Dazu gehörten unter anderem Neomycin (Aminoglykosid) und Candicidin (Polyen).⁽⁹⁾

Neben den β -Lactam Antibiotika und den Sulfonamiden, wurden während des „Goldenen Zeitalters“ eine ganze Reihe von neuen Antibiotika Klassen entdeckt und auf den Markt gebracht. Dazu zählen unter anderem die Phenylpropanoide (z.B. Chloramphenicol **2**), Polyketide (z.B. Tetrazykline **3**), Aminoglykoside (z.B. Streptomycin **4**), Makrolide (z.B. Erythromycin A **5**), Glycopeptide (z.B. Vancomycin **6**), Cephalosporine **7** (2. Generation der

β -Lactam Antibiotika), Streptogramine (Synercid®: Quinpristin **8** und Dalfopristin **9**), Carbapeneme (**10**) (3. Generation der β -Lactam Antibiotika) und das Lipopeptid Daptomycin (**11**) (Abb. 1).⁽¹²⁾ Die meisten der natürlich gewonnenen Antibiotikaklassen wurden erstmalig in verschiedenen Vertretern der Actinomyceten (45 %) entdeckt. Aber auch Pilze spielten eine große Rolle, so sind insgesamt 38 % der bis 2002 bekannten bioaktiven, mikrobiellen Metaboliten aus Pilzen isoliert worden.⁽¹³⁾

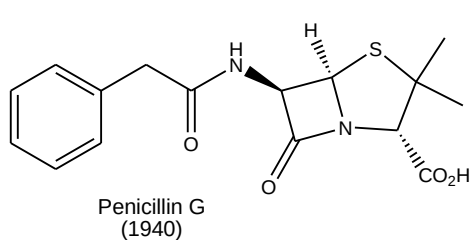
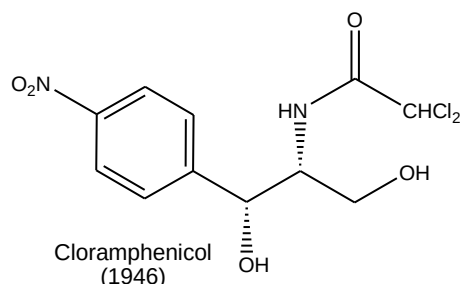
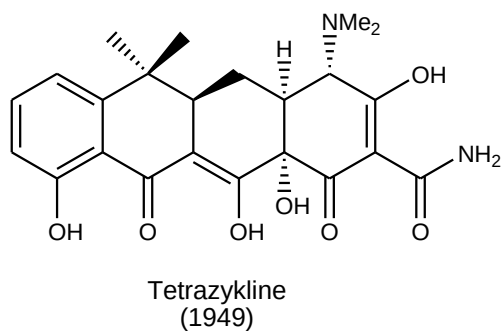
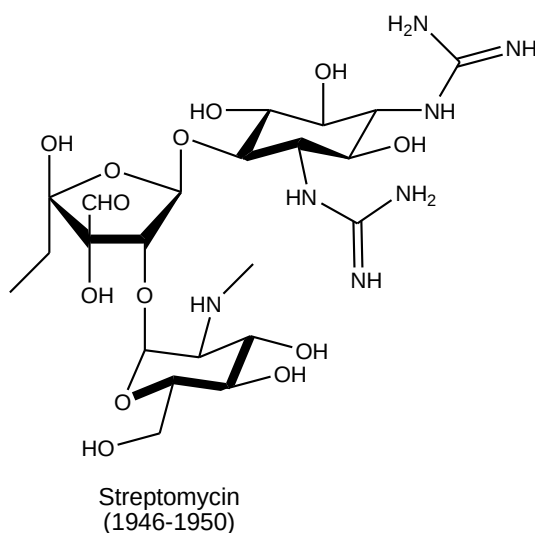
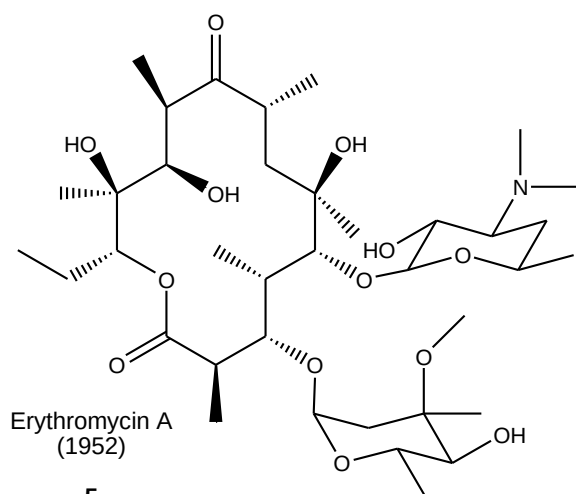
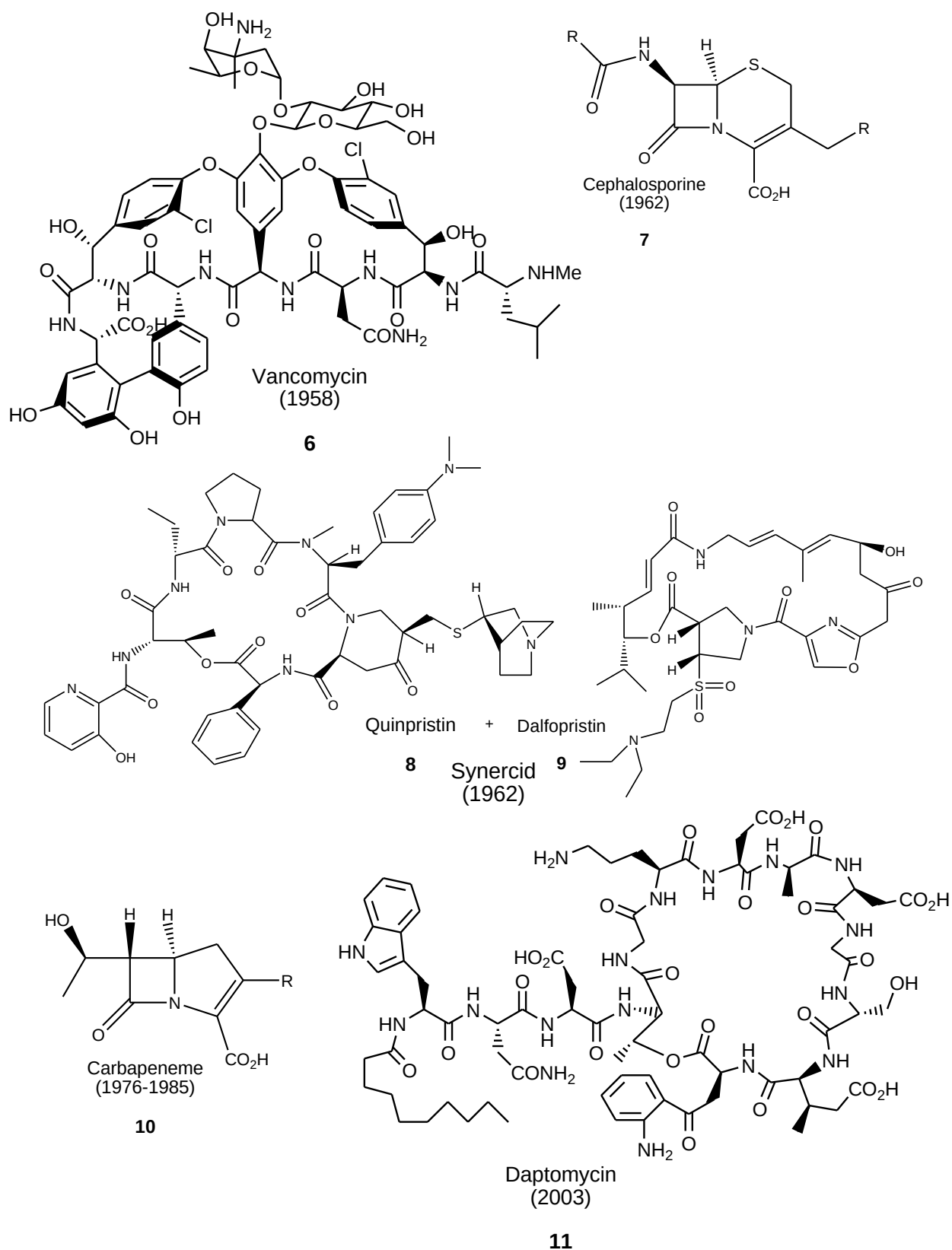
**1****2****3****4****5**

Abb. 1 Darstellung der Strukturformeln ausgewählter Vertreter der wichtigsten Antibiotikaklassen. β -Lactam Antibiotika: Penicillin G (**1**), Phenylpropanoide: Chloramphenicol (**2**), Polyketide: Tetrazykline (**3**), Aminoglykoside: Streptomycin (**4**) und Makrolide: Erythromycin A (**5**). Die Zahl gibt das Jahr der Markteinführung an. (modifiziert nach (11) und (12)).



Fortsetzung Abb. 1 Fortsetzung der Darstellung der Strukturformeln ausgewählter Vertreter der wichtigsten Antibiotikaklassen. Glycopeptide: Vancomycin (**6**), 2. Generation der β -Lactam Antibiotika: Cephalosporine (**7**), Streptogramine: Quinpristin (**8**) und Dalfopristin (**9**) (Synercid®), 3. Generation der β -Lactam Antibiotika: Carbapeneme (**10**) und das Lipopeptid: Daptomycin (**11**). Die Zahl gibt das Jahr der Markteinführung an. (modifiziert nach (11) und (12)).

Die rein synthetisch erzeugten Antibiotika spielten eine eher untergeordnete Rolle. Seit Anbeginn der Antibiotikaforschung gibt es nur drei nennenswerte Antibiotikaklassen, die rein synthetischen Ursprungs sind. Zu diesen gehören die Sulfonamide (z.B. Prontosil **12**), die Chinolone (z.B. Ciprofloxacin **13**), die als Nebenprodukt aus der Chinin-Synthese hervorgegangen sind und zuletzt die Gruppe der Oxazolidinone (z.B. Linezolid **14**) (Abb. 2).

(12)

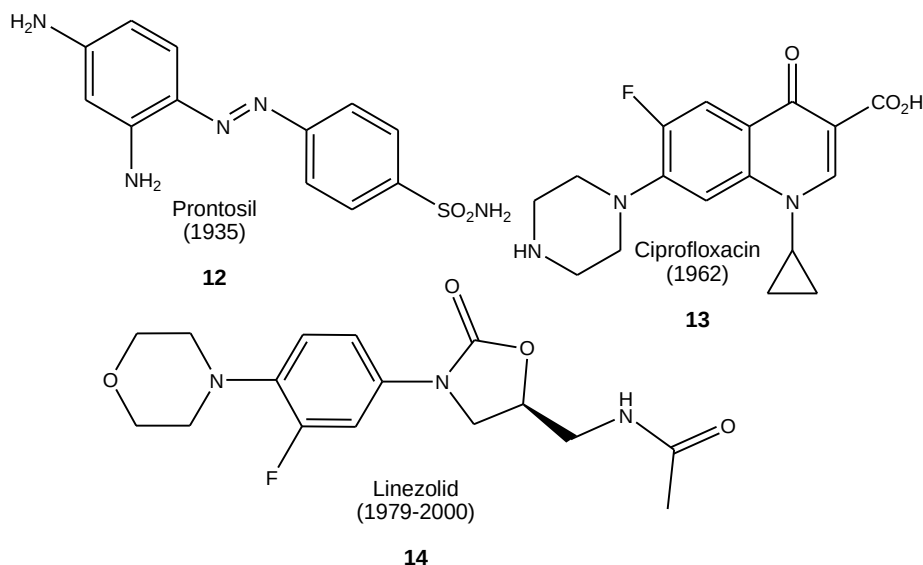


Abb. 2 Darstellung der Strukturformeln einzelner Vertreter der rein synthetisch erzeugten Antibiotikaklassen. Sulfonamide: Prontosil (**12**), Chinolone: Ciprofloxacin (**13**) und Oxazolidinone: Linezolid (**14**). Die Jahreszahl gibt das Jahr der Markteinführung an. (modifiziert nach (11) und (12)).

Die Wirkmechanismen der meisten Antibiotika beschränken sich auf die Inhibierung der Zellwandsynthese (β -Lactam Antibiotika, Glycopeptide), Zellmembran (Lipopeptide) oder auf die Inhibierung der Proteinbiosynthese an den Ribosomen. Antibiotika, die die 30S ribosomale Untereinheit blockieren, gehören vor allem zu den Aminoglykosiden und Tetrazyklinen. Die Makrolid-Antibiotika, Streptogramine, Phenylpropanoide und Oxazolidinone inhibieren hingegen die 50S ribosomale Untereinheit. Ausnahmen bilden hierbei die Chinolone, welche die DNA Synthese inhibieren bzw. die Ansamycine (RNA-Synthese-Hemmer) und die Sulfonamide, die bereits in die Nukleotidbiosynthese eingreifen (Tabelle 1).⁽¹⁴⁾

Aufgrund der sehr spezifischen Wirkung der antibakteriellen Substanzen kam es relativ schnell zur Ausbildung von Resistenzen, wobei die Mechanismen der Resistenzbildung genauso einfach wie effektiv sind (Tabelle 2). Es ist anzunehmen, dass es zu einer Co-Evolution zwischen Antibiotika(-therapie) und Resistenzentstehung kam. Diese Tatsache stellt ein großes Problem dar, da Infektionen mit multiresistenten Bakterienstämmen z.B. *Staphylococcus aureus* (MRSA) nur sehr schwer therapierbar sind.

Tabelle 1 Übersicht über die Targets der jeweiligen Antibiotikaklassen.

Target		Antibiotikaklasse
Zellwand		β -Lactam Antibiotika (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme)
		Glycopeptide
Zellmembran		Lipopeptide
Proteinbiosynthese	30S Ribosomen Untereinheit	Aminoglykoside
		Tetrazykline
	50S Ribosomen Untereinheit	Makrolide
		Streptogramine
		Phenylpropanoide
		Oxazolidinone
DNA-Synthese		Chinolone
Metabolismus		Sulfonamide
RNA-Synthese		Ansamycine

Eine wirkungsvolle Strategie gegen diese Entwicklung ist die Unterdrückung der Resistenz, wodurch das jeweilige Antibiotikum seine volle Wirkung wieder erzielt. Bei dieser Vorgehensweise werden vor allem additive und synergistische Effekte ausgenutzt. So wurde bereits im Jahre 1962 eine Synergie zwischen β -Lactam Antibiotika und Aminoglykosiden beobachtet. Dieser Effekt ist auf eine erhöhte Aufnahme der Aminoglykosid Antibiotika durch die Zerstörung der Zellwand (β -Lactam Antibiotika) zurückzuführen.⁽¹⁵⁾ Eine andere Möglichkeit der „Resistenzumgehung“ wurde durch die Entwicklung von β -Lactamase-Inhibitoren z.B. Clavulinsäure geschaffen. Clavulinsäure ist heute zusammen mit den β -Lactam Antibiotikum Amoxicillin als Kombinationspräparat Augmentin® auf dem Markt erhältlich. In ähnlicher Weise wird auch der Efflux bestimmter Antibiotika unterdrückt.⁽¹²⁾ Gleichzeitig werden immer neue Antibiotika Targets erforscht. Ein vielversprechender Ansatz liegt hier z.B. in der Inhibierung der Fettsäurebiosynthese (FabI).⁽¹⁶⁾ Dies ist allerdings nicht die Lösung des Problems sondern nur eine zeitliche Verzögerung, da es früher oder später erneut zu der Ausbildung von Resistenzen kommen wird. Damit alle Targets gleichzeitig erfasst werden können, sollte ein empirisches Screening mit Hilfe von Ganz-Zell-Assays erfolgen.⁽¹²⁾ Weiterhin kann die Selektivität des Screenings erhöht werden, indem bereits resistente Bakterienstämme als Testorganismen eingesetzt werden. So wurde zum Beispiel von der Firma Cubist Pharmaceuticals ein multiresistenter gram-negativer Bakterienstamm entwickelt.⁽¹⁾

Tabelle 2 Übersicht über die wichtigsten Resistenzmechanismen. (modifiziert nach (12)).

Resistenz – Mechanismus	Beispiel
Inaktivierung des Antibiotikums durch eine enzymatische Reaktion z.B. β -Lactamase	β -Lactam Antibiotika
Erhöhung des Efflux z.B. <i>tetM</i> Effluxpumpe	Tetrazykline
Target Mutation z.B. in der Zellwand D-Ala-D-Ala zu D-Ala-D-Lac	Glycopeptide (speziell Vancomycin)
Überproduktion des Targets z.B. Dihydrofolatreduktase (DHFR)	Sulfonamide
Umgehung des Biosyntheseweges z.B. Peptiddeformylase (Ribosomen)	Streptogramine Tetrazykline
Reduzierung der Aufnahme des Antibiotikums z.B. bei <i>Pseudomonas</i> Verlust des D2 Transmembranproteins	Aminoglykoside

Eine endgültige Lösung des Problems wird es jedoch aufgrund der evolutiven Weiterentwicklung und Anpassung nicht geben. Es ist daher unbedingt erforderlich, eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Antibiotika zu entdecken und entsprechend der klinischen Erfordernisse zu entwickeln. Da sich in der Vergangenheit mehrfach gezeigt hat, dass Naturstoffe in dieser Hinsicht über ein enormes Potential verfügen, liegt eine vielversprechende Möglichkeit hierfür in der Nutzbarmachung der natürlichen Biodiversität.

3.2.2 Biotest-Verfahren in der Naturstoffforschung

Für die Entdeckung von biologisch aktiven Naturstoffen ist es erforderlich, geeignete Biotest-Verfahren in die Screening-Programme im Rahmen der Naturstoffforschung einzubinden. Das bekannteste und weitverbreitetste Biotest-Verfahren ist der **Agardiffusionstest**.⁽¹⁷⁾ Bei dieser Methode werden zwei verschiedene Techniken angewendet, zum Einen die sogenannte Filterplättchentechnik⁽¹⁸⁾ und zum Anderen die Well-Technik.⁽¹⁹⁾ Beide Verfahren beruhen auf dem Prinzip der Diffusion der zu testenden Substanz in einem festen Nährmedium.⁽²⁰⁾ Bei der Filterplättchenmethode wird die Probe z.B. Extrakt oder Fraktion auf ein Filterplättchen aufgetragen, welches anschließend auf das mit dem zu testenden Organismus versehene Nährmedium aufgebracht wird. Bei der Well-Technik wird die Probe in ein zylinderförmiges Well im Agar geträufelt und diffundiert in den Agar hinein. Als Testorganismen können hier sowohl Bakterien als auch Pilze eingesetzt werden. Sofern antibiotische Verbindungen enthalten sind, wird das Wachstum des Testorganismus

gehemmt. Dies wird nach einer entsprechenden Inkubationszeit durch einen kreisförmigen Hemmhof um das Filterplättchen bzw. Well herum sichtbar. Je größer der Durchmesser des Hemmhofes ist, desto größer ist demzufolge die antibakterielle bzw. antifungale Aktivität. Bei beiden Methoden wird eine gleichmäßige Diffusion aller Substanzen angenommen, unabhängig von der Konzentration und den physikalischen Eigenschaften z.B. Diffusionskoeffizient der jeweiligen Substanz. Zusätzlich sind die Ergebnisse stark abhängig von dem Agartyp, Dicke und Agarkonzentration.⁽²¹⁾ Es sind daher nur bedingt quantitative Aussagen möglich. Besonders problematisch ist dies bei hydrophoben oder amphiphilen Substanzen. Inzwischen gibt es jedoch verschiedene mathematische Ansätze um dieses Problem zu minimieren.⁽²²⁾ Trotz der aufgeführten Nachteile bietet der Agardiffusionstest eine schnelle und vor allem einfache Möglichkeit die biologische Aktivität von Naturstoffen oder Extrakten zu ermitteln.

Neben dem Agardiffusionstest wird die **Bioautographie** in der Naturstoffforschung oft als Methode der Wahl verwendet. Dieses Biotestverfahren beruht auf einer dünnschicht-chromatographischen Trennung der Probe vor dem Beimpfen mit dem Testorganismus.⁽²³⁾ Dadurch wird eine direkte Lokalisierung der aktiven Metaboliten ermöglicht. Das entwickelte Chromatogramm wird entweder direkt mit einer Suspension des Testorganismus beimpft oder es wird ein Abdruck auf einer Agarschale genommen. Eine Abwandlung dieser Methoden bildet die sogenannte „Agar Overlay“ Technik, bei welcher das DC-Chromatogramm direkt mit einer dünnen Lage Agar überschichtet wird. Als Testorganismen können ebenfalls sowohl Pilze als auch Bakterien eingesetzt werden. Für die Ermittlung der antifungalen Aktivität kann zum Beispiel die Bioautographie-Methode nach Gottstein und Mitarbeiter verwendet, bei welcher der phytopathogen Pilz *Cladosporium cucumerinum* Ell. & Arth als Testorganismus eingesetzt wird.⁽²⁴⁾ Dabei wird eine Sporensuspension direkt auf das Chromatogramm aufgetragen. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit ist die DC-Platte mit einem dunklen Pilzrasen bedeckt. An den Stellen wo das Wachstum des Pilzes inhibiert wurde, sind helle Hemmhöfe erkennbar. Bei der Verwendung von Bakterien als Testorganismen ist die Unterscheidung zwischen bewachsenen Flächen und Hemmhöfen schwieriger, da die meisten Bakterien im Gegensatz zu Pilzen einen hellen Rasen bilden. Für die Detektion ist es daher erforderlich, zusätzliche Redox-sensitive Farbstoffe wie z.B. Tetrazoliumsalze einzusetzen, welche zum Nachweis der Vitalität dienen. Die Grundannahme bei der Bioautographie ist ebenfalls, dass die Größe des Hemmhofes mit steigender Konzentration der aktiven Substanz zunimmt. Quantitative Aussagen sind jedoch auch hier nur bedingt möglich, da die Diffusion der Metaboliten ein unerwünschter Nebeneffekt ist und zur Verfälschung der Ergebnisse führen kann.

Eine weitere Möglichkeit die biologische Aktivität von Reinsubstanzen oder Extrakten zu bestimmen, bietet der **Reihenverdünnungstest**. Bei diesem Biotestverfahren werden die Proben direkt in das flüssige Nährmedium hineingegeben. Dies hat den Vorteil, dass sowohl die Konzentration der Proben definiert ist, als auch die Konzentration des Testorganismus und somit eine quantitative Bestimmung ermöglicht wird. Es kann allerdings wie auch bei den anderen Verfahren zu Löslichkeitsproblemen der zu testenden Substanzen kommen, da es sich bei den Nährmedien um ein wässriges Milieu handelt. Häufig werden daher geringe Volumenprozent verschiedener Lösungsmittel z.B. DMSO, MeOH, EtOH hinzugegeben. Um das Maß der biologischen Aktivität abschätzen zu können, erfolgt die Messung der Vitalität des Testorganismus. Auch in diesem Fall können sowohl Bakterien als auch Pilze (Sporensuspension) eingesetzt werden. Die Messung der Vitalität erfolgt meist mittels verschiedener direkter oder indirekter Verfahren. Bei den direkten Methoden wird die Vitalität nach einer entsprechenden Inkubationszeit durch Messung der Optischen Dichte (OD), Bestimmung der Zellzahl (Bakterien) oder Gewichtsbestimmung der Biomasse (Pilze) ermittelt. Bei diesen Verfahren ist es jedoch nicht möglich zwischen vitalen und toten Zellen zu unterscheiden, was zur Verfälschung der Ergebnisse führen kann. Bei den indirekten Verfahren wie zum Beispiel Methoden, bei denen Redox-sensitive Farbstoffe wie Tetrazoliumsalze oder Fluoreszenzfarbstoffe z.B. Resazurin verwendet werden, erfolgt selektiv nur die Bestimmung der vitalen Zellen. ⁽²⁵⁾ Nach der Zugabe der Detektionsreagenzien erfolgt nach entsprechender Reaktionszeit die Messung der Absorption (Tetrazoliumsalze) bzw. der Fluoreszenzintensität (Fluoreszenzfarbstoffe). In den meisten Fällen können so wesentlich empfindlichere und genauere Ergebnisse erhalten werden. Problematisch bei diesen Methoden ist allerdings die starke pH-Wert Abhängigkeit der Tetrazoliumsalze und deren mögliche Redox-Reaktion mit Bestandteilen des Nährmediums. Sowohl bei den Tetrazoliumsalzen als auch bei den Fluoreszenzfarbstoffen spielt die Membranintegrität eine entscheidende Rolle. Bei der Messung der Optischen Dichte oder auch der Absorptionsmessung (Tetrazoliumsalze) kann es zu einer Verfälschung der Messwerte kommen, wenn stark gefärbte Substanzen oder Extrakte getestet werden. Im Gegensatz dazu spielt die Eigenfluoreszenz von Extrakten bei Fluoreszenzmessungen eine eher untergeordnete Rolle, allerdings kann es hier zu Fluoreszenzquenchingeffekten kommen (Tabelle 3). Bei den Fluoreszenz-basierten Biotestverfahren wird bei den neueren Methoden vermehrt auf Reportergene wie zum Beispiel Luciferase oder Grün-fluoreszierendes Protein (GFP) zurückgegriffen. ⁽²⁶⁾ Dies hat den Vorteil, dass eine Bestimmung der nativen Fluoreszenz (Biolumineszenz) direkt erfolgen kann ohne Zugabe von weiteren Reagenzien (bei GFP). So wird eine sehr sensitive Messung der Vitalität ermöglicht, die zugleich auch sehr robust gegenüber Schwankungen ist.

Tabelle 3 Übersicht über die Detektionsmöglichkeiten zur Bestimmung der Vitalität, sowie deren Vor- und Nachteile.

Detektionsmethode	Vorteil	Nachteil
Bestimmung der Zellzahl durch Auszählen	- sehr genau	- zeitaufwendig - keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen
Optische Dichte	- unkompliziert	- Verfälschung durch gefärbte Proben oder Medium - geringe Empfindlichkeit - keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen
Gewichtsbestimmung	- universal	- aufwendig - keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen
Tetrazoliumsalze (Absorptionsmessung)	- selektive Bestimmung der vitalen Zellen	- Verfälschung durch gefärbte Proben oder Medium - stark pH-Wert abhängig - oxidationsempfindlich - schlechte Wasserlöslichkeit
Fluoreszenzfarbstoffe	- selektive Bestimmung der vitalen Zellen - hohe Empfindlichkeit - geringe Schwankungen	- Membranintegrität hat großen Einfluss - Fluoreszenzquenching
GFP/Biolumineszenz	- selektive Bestimmung der vitalen Zellen - hohe Empfindlichkeit - geringe Schwankungen - unkompliziert	- Fluoreszenzquenching

Ein weiterer Vorteil des Reihenverdünnungstests ist, dass dieser ohne weiteres in Mikrotiterplatten (96-, 384-Well Format) durchgeführt werden kann und somit viele Proben gleichzeitig analysiert werden können. Darüber hinaus werden so konstante und vor allem reproduzierbare Bedingungen geschaffen, wodurch die Ergebnisse besser vergleichbar sind. Des Weiteren sind nur sehr geringe Substanzmengen erforderlich. Der Reihenverdünnungstest ist daher die am besten geeignete Methode für die quantitative Bestimmung der biologischen Aktivität in der Naturstoffforschung.

3.3 Ausgewählte Methoden zur Identifizierung von bioaktiven Metaboliten

Bei den Methoden zur Identifizierung von bioaktiven Metaboliten wird zwischen den nicht-gerichteten (non-targeted) und gerichteten (targeted) Methoden unterschieden. Wobei sich diese Unterteilung auf die zielgerichtete Identifizierung und Isolierung von bioaktiven Metaboliten bezieht.

3.3.1 non-targeted methods (Nicht-gerichtete Methoden)

Bei den nicht-gerichteten Methoden werden die Naturstoffe oder die Syntheseprodukte ungerichtet isoliert bzw. synthetisiert und erst im Nachhinein verschiedenen Biotests unterzogen, um eine mögliche biologische Aktivität zu ermitteln.

3.3.1.1 Klassische Methode der Naturstoffisolierung

Bei der klassischen Methode der Naturstoffisolierung erfolgt eine ungerichtete Aufreinigung von Naturstoffen. Die Extrakte und Fraktionen werden unter Verwendung von verschiedenen chromatographischen Trenntechniken zum Beispiel nach Polarität oder Molekülgröße repetitiven Reinigungsschritten unterzogen. Durch diese schrittweise Reinigung nimmt die Komplexität ab und resultiert am Ende im Idealfall in Reinsubstanzen. Nach der Strukturaufklärung und Identifizierung wird eine biologische Aktivität ermittelt, indem die reine Verbindung verschiedenen Biotests unterzogen wird. Da die Identifizierung erst nach der Isolierung erfolgt, ist das Maß der Replikation bei dieser Vorgehensweise vergleichsweise hoch. Darüber hinaus werden bioaktive Metaboliten nur durch Zufall identifiziert.

3.3.1.2 High Throughput Screening (HTS)

High-throughput Screening (HTS) ist eine weitestgehend automatisierte Screening-Methode, die vor allem in der Pharmazeutischen Industrie zur Identifizierung von neuen Leitstrukturen Anwendung findet. Dabei werden hauptsächlich riesige Bibliotheken chemischer Verbindungen auf ihre Wirksamkeit gegen verschiedene molekulare Targets getestet, die eine hohe Relevanz bei Krankheiten aufweisen. Die Entwicklung des High-throughput Screenings (HTS) ist auf die frühen 1990er Jahre zurückzuführen und ging einher mit der Einführung der Kombinatorischen Chemie. ⁽²⁷⁾ Die wichtigsten Elemente eines HTS Programms sind Automatisierung, Miniaturisierung der Biotestverfahren und „large-scale“ Datenanalyse. Basierend auf der Anzahl der getesteten Proben wird zwischen HTS und uHTS (ultra High-throughput Screening) unterschieden. Während HTS einen Durchsatz von 10.000 – 100.000 getesteten Proben pro Tag erzielt, werden bei uHTS weit über 100.000

Proben pro Tag analysiert. Als Biotestverfahren kommen hierbei nur Testsysteme in Frage, die auf einem gut charakterisierten molekularen Target beruhen wie zum Beispiel verschiedene Enzyme, Hormon-Rezeptoren, Ionenkanäle und Signalkaskaden.⁽²⁷⁾ Es werden daher hauptsächlich zellfreie Einkomponenten- oder Multikomponenten-Testsysteme verwendet. In der HTS-Antibiotikaforschung werden vor allem synthetische Substanzen gesucht, die verschiedene bakterielle Enzyme inhibieren. Da die eingesetzten Biotestverfahren auf zellfreien Testsystemen beruhen, ist der Erfolg neue Leitstrukturen zu finden in dieser Hinsicht bisher nur mäßig.⁽²⁸⁾ Die Gründe hierfür liegen oftmals in der Tatsache, dass die Kandidaten-Substanzen in Ganz-Zell Testsystemen, aufgrund schwacher Zellpenetration und/oder erhöhtem Efflux ihr Ziel nicht erreichen können.⁽²⁹⁾ Darüber hinaus können keine neuen Targets entdeckt werden. Seit der Einführung des HTS wurde in den ersten Jahren hauptsächlich die Quantität optimiert, wohingegen erst seit den letzten Jahren damit begonnen wurde die Qualität und somit die Hitrate zu erhöhen.⁽²⁷⁾ Eine wesentliche Verbesserung der Qualität wird durch die Kombination von HTS mit verschiedenen computergestützten Methoden erzielt. So können beispielsweise kleinere Sub-Bibliotheken (focused libraries) ausgewählt werden, indem verschiedene *in silico* Modeling oder Docking Studien durchgeführt werden.⁽²⁷⁾ So können deutlich höhere Erfolgsquoten erzielt werden.

Ein vielversprechender Ansatz in Hinblick auf die Daten Dekonvolution bietet das Konzept des Rekursiven Partitionieren, welches von Chen, Rusinko und Young entwickelt wurde.⁽³⁰⁾⁽³¹⁾ Es handelt sich hierbei um ein statistisches Verfahren, bei welchem der Datensatz mittels sogenannter Entscheidungsbäume aufgeteilt wird. Dabei werden verschiedene Deskriptoren wie z.B. Strukturelemente zu Grunde gelegt, wodurch der Datensatz in mehrere Molekülsätze aufgeteilt wird, die einen oder mehrere Deskriptoren teilen. Dieses Verfahren führt schließlich zu einer Anreicherung von aktiven Verbindungen. Durch Anwendung des Rekursiven Partitionieren kann die Hitrate um ein vielfaches gesteigert werden (Abb. 3). So konnten van Rhee und Mitarbeiter die Hitrate in einem HTS Experiment um das 4-5fache steigern.⁽³²⁾ Gleichzeitig mussten weniger als 20 % der Substanzbibliothek getestet werden um 75 % der Hits zu identifizieren. Bei dem Rekursiven Partitionieren kann es allerdings zu Problemen kommen, wenn die strukturelle Diversität der aktiven Verbindungen zu hoch ist, da diese in unterschiedliche Sätze aufgeteilt werden würden. Eine Lösung für dieses Problem bietet die Weiterentwicklung dieses Verfahrens, welche auf der Anwendung von „Phylogenetischen Bäumen“ basiert. Diese Methode wurde erstmalig von Nicolaou und Mitarbeitern eingeführt und basiert auf dem Prinzip, dass die aktiven Verbindungen in einem oder mehreren Clustern vorkommen können, wodurch eine gewisse Überlappung erzielt wird.⁽³³⁾

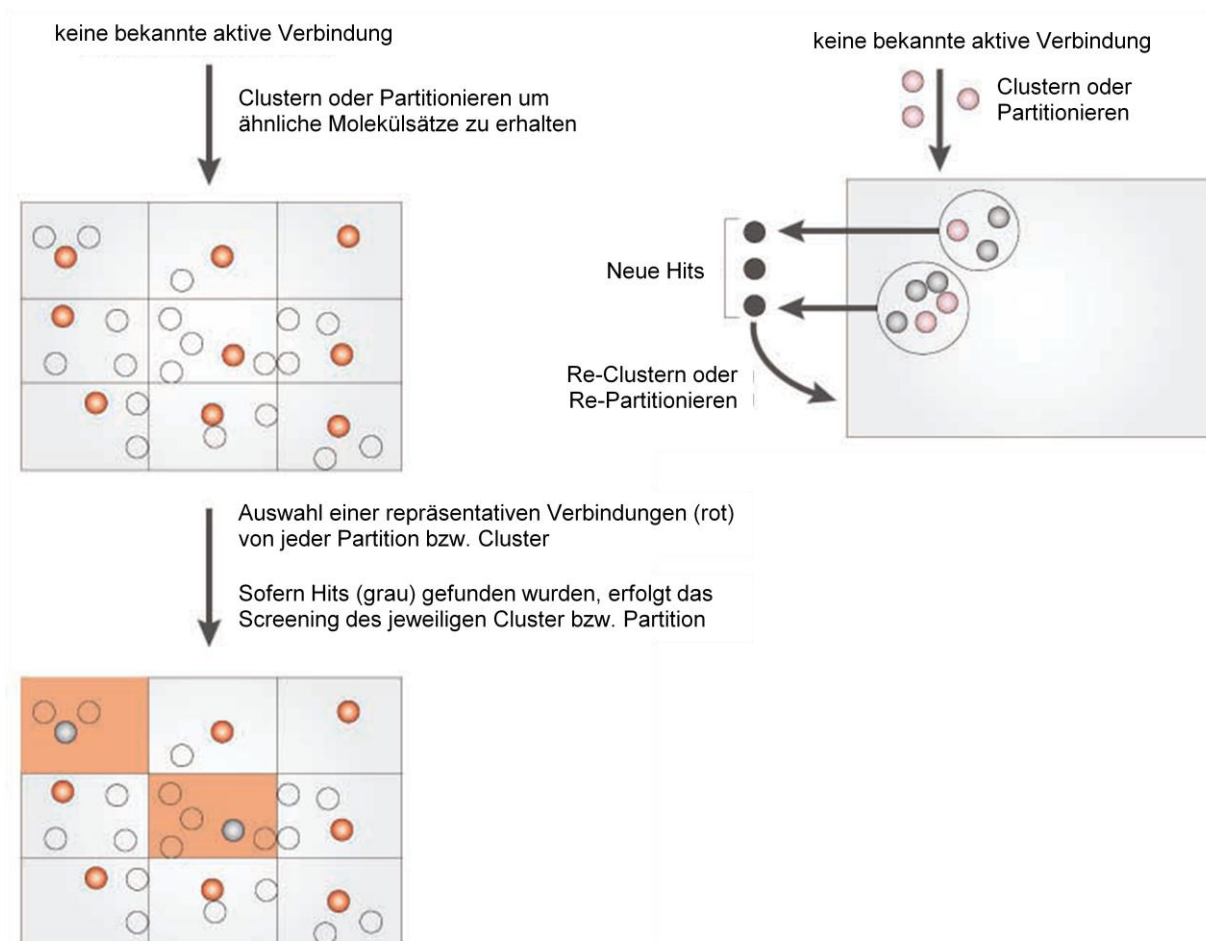


Abb. 3 Darstellung des Prinzips des Rekursiven Partitionieren bzw. Clustern als Strategie zur Steigerung der Qualität des HTS in Hinblick auf die Hitrate. (modifiziert nach (34)).

Andere Möglichkeiten zur Steigerung der Hitrate basieren hauptsächlich auf der Erhöhung der Diversität. So wird zum Beispiel die diversitäts-orientierte Synthese gezielt genutzt, um die chemische Diversität einer Substanzbibliothek zu erhöhen. Ein interessanter Ansatz ist auch das sogenannte „plate-cherry-picking“, bei welchem gezielt Testplatten mit Substanzen zusammengestellt werden, die die größtmögliche strukturelle Diversität aufweisen. ⁽³⁵⁾

Naturstoff-Bibliotheken weisen dabei eine größere strukturelle Diversität und biologische Aktivität auf als rein synthetisch erzeugte Bibliotheken. Hochkomplexe Naturstoffextrakte beinhalten oft ein riesiges Reservoir an chemischen Verbindungen und stellen somit eine weitaus größere Sammlung an biologisch aktiven Verbindungen dar.

3.3.2 targeted methods (Gerichtete Methoden)

Bei den gerichteten Methoden erfolgt die Identifizierung bzw. Isolierung von bioaktiven Metaboliten zielgerichtet hinsichtlich einer gewünschten biologischen Aktivität.

3.3.2.1 Bioassay-guided Isolation

Die einfachste Methode zur Isolierung und Identifizierung von bioaktiven Verbindungen ist die sogenannte bioassay-guided Isolation (bioaktivitäts-geleitete Isolierung) Strategie. Bei dieser Vorgehensweise wird der gesamte Aufreinigungsprozess von der gewünschten Bioaktivität gelenkt (Abb. 4).

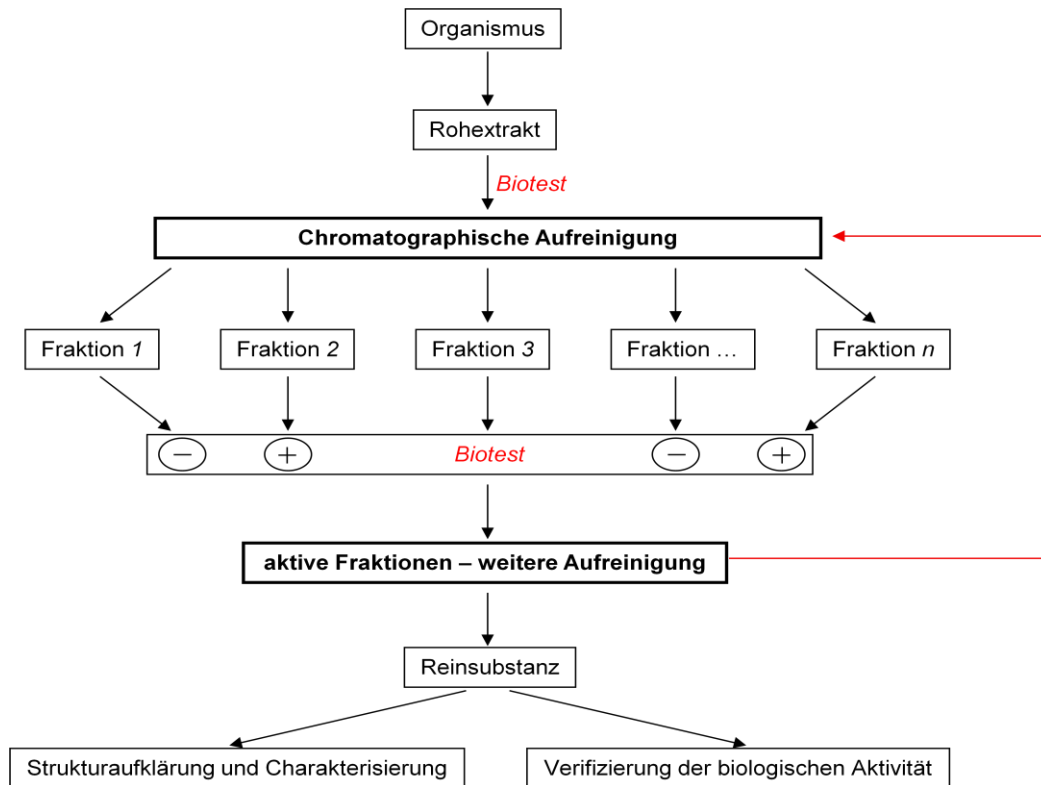


Abb. 4 Die Abbildung zeigt die prinzipielle Vorgehensweise zur bioaktivitäts-geleiteten Isolierung.

Zu Beginn wird ein Rohextrakt auf seine biologische Aktivität in dem gewünschten Bioassay getestet. Im Anschluss daran erfolgt eine chromatographische Fraktionierung zur Verminderung der Komplexität. Die daraus hervorgehenden Fraktionen werden anschließend erneut in demselben Biotest auf ihre Wirksamkeit getestet. Basierend auf den Ergebnissen werden nur die aktiven Fraktionen weiteren Aufreinigungsschritten unterzogen. Dieser Prozess wird so lange wiederholt bis eine reine Substanz vorliegt, welche schließlich z.B. mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert werden kann. Vorteil der Methode ist, dass die Isolierung gezielt nach einer biologischen Aktivität erfolgt. Es gibt aber auch einige Nachteile. Ähnlich wie bei der klassischen Methode der Naturstoffisolierung ist bei dieser Vorgehensweise das Maß der Replikation sehr hoch und es wird außerdem eine große Menge an Material benötigt, die oftmals nicht vorhanden ist, z.B. bei marinen Organismen. Darüber hinaus ist der Prozess sehr arbeits- und vor allem zeitaufwendig, da die biologische Aktivität von etlichen Fraktionen nach jedem Trennungsschritt ermittelt werden muß. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass das

biologische Testsystem permanent verfügbar sein muß. Außerdem besteht die Gefahr, dass die biologische Aktivität während der Isolierung verloren wird. Dies kann zum Beispiel auf Verdünnungseffekte, Artefaktbildung während der Aufreinigung, additive Effekte vieler schwach aktiver Verbindungen zurückgeführt werden, oder auf synergistische Effekte von zwei oder mehr Metaboliten, die im Laufe des Isolierungsprozesses „auseinandergereinigt“ werden. Aufgrund der genannten Nachteile ist die „bioassay-guided isolation Strategie“ allenfalls zu den Low-throughput Screening Methoden zu zählen. Um den Vorgang effizienter zu gestalten, geht der Trend in den letzten Jahren verstärkt in Richtung automatisches Fraktionieren und Isolieren.⁽⁸⁾ Die so erhaltenen vorgereinigten Fraktionsbibliotheken können aufgrund geringerer Komplexität mittels state-of-the-art Screening Methoden schneller analysiert werden. So wurde kürzlich ein Automatisches High-throughput System zur Fraktionierung von Naturstoffextrakten vorgestellt, dass einen Durchsatz von 2600 Naturstoffproben pro Tag ermöglicht.⁽³⁶⁾ Insbesondere in Kombination mit modernen analytischen Methoden wie z.B. LC-MS und LC-NMR wird eine vorab Charakterisierung der Fraktionen ermöglicht und somit die Dereplikation verbessert (Abb. 5). Die Einbindung von analytischen Methoden in den Prozess der Identifizierung bioaktiver Metaboliten ist daher äußerst vielversprechend.

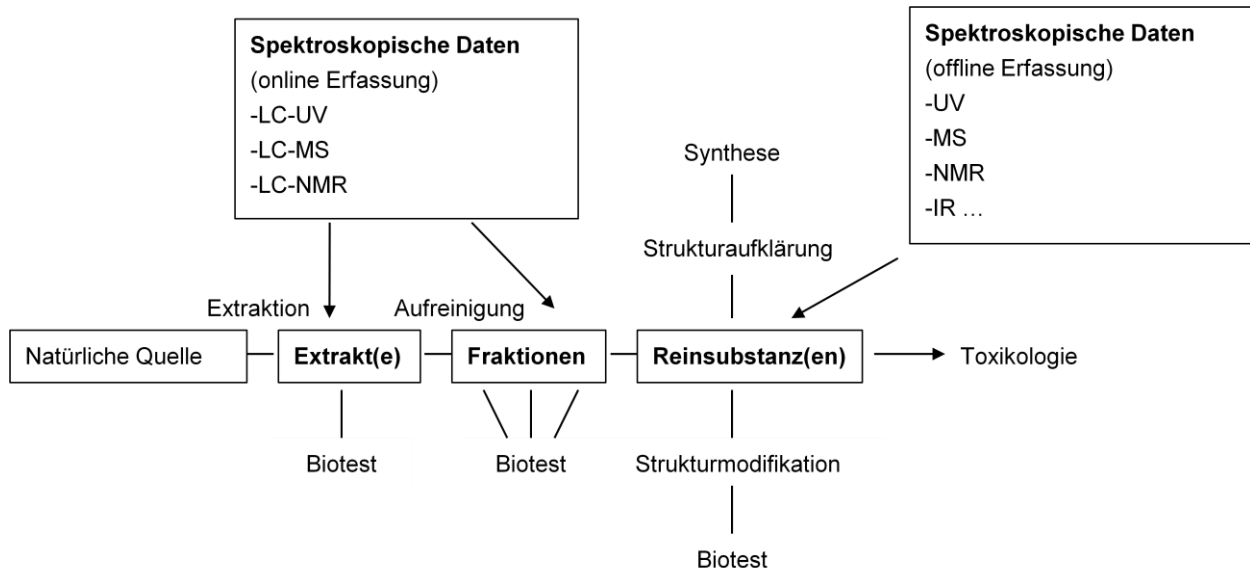


Abb. 5 Vorgehensweise zur Identifizierung von bioaktiven Metaboliten in Kombination mit modernen analytischen Methoden. (modifiziert nach (37))

3.3.2.2 LC-MS basierte Methoden

Seit der Einführung der Elektrospray Ionisierung (ESI) ⁽³⁸⁾ ⁽³⁹⁾ und der damit verbundenen neuen Möglichkeit die Flüssigkeitschromatographie (LC) mit ESI-Massenspektrometrie (ESI-MS) zu koppeln, ⁽⁴⁰⁾ ist die LC-ESI-MS Technik in nur wenigen Jahren eine der bedeutungsvollsten Methoden in der Naturstoffchemie geworden. ⁽⁴¹⁾ Komplexe Mischungen wie zum Beispiel Naturstoffextrakte können so in kürzester Zeit nicht nur chromatographisch getrennt, sondern zum Teil auch chemisch charakterisiert werden. Des Weiteren können die bioaktiven Metaboliten durch die online-Kopplung von verschiedenen Bioassays mit LC-MS Systemen direkt im Gemisch identifiziert werden. Bereits Ende der 1990er Jahre wurden die ersten LC-MS gekoppelten Bioassay-Methoden vorgestellt. ⁽⁴²⁾ Diese Verfahren beruhen auf einer online Kopplung des Biotests und des LC-MS Systems in Parallelschaltung. Als molekulare Targets wurden vor allem verschiedene Rezeptoren und Enzyme eingesetzt, die zum Teil bereits über die mobile Phase eingeleitet wurden. Zur Trennung der gebundenen Metaboliten (bioaktiv) und freien Metaboliten (inaktiv) ist bei den meisten Systemen dieser Art allerdings eine zusätzliche Affinitäts-Chromatographie im Anschluss an den Biotest erforderlich. Die erste echte online Kopplung wurde im Jahre 2004 von Irth und Mitarbeitern eingeführt. ⁽⁴³⁾ Dieses Verfahren beruht auf einer Reihenschaltung eines enzymbasierten Biotests und anschließender Detektion mittels ESI-MS (Abb. 6). Bei diesem System wird im Anschluss an die chromatographische Trennung kontinuierlich eine Lösung des Enzyms zugeführt. Sofern Inhibitoren enthalten sind, interagieren diese mit dem Enzym (Durchflussszelle 1). Weiterhin wird ebenfalls Substrat eingeleitet, welches durch Reaktion mit dem Enzym zu dem entsprechenden Produkt umgesetzt wird (Durchflussszelle 2). Die Detektion des Produktes erfolgt schließlich kontinuierlich mittels ESI-MS. Sofern Inhibitoren im Analysat enthalten sind, wird die Produktbildung vermindert. Für die Entwicklung und Etablierung des Systems wurde als molekulares Target das Enzym Cathepsin A (Protease) ausgewählt, sowie verschiedene Pflanzen- und Pilzextrakte als Quelle.

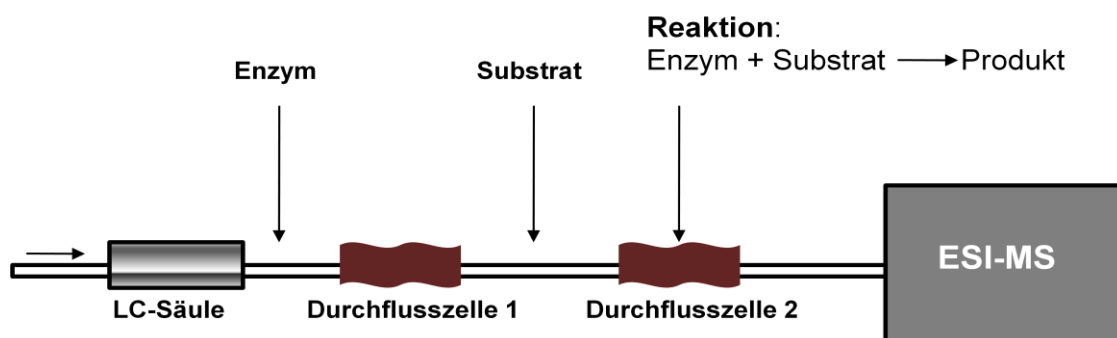


Abb. 6 Die Abbildung zeigt das Prinzip des online gekoppelten enzymbasierten Biotests, der 2004 von Irth eingeführt wurde (entworfen nach ⁽⁴³⁾).

Methoden wie diese ermöglichen die direkte Identifizierung bioaktiver Metaboliten im Gemisch. Voraussetzung ist allerdings, dass ein gut charakterisiertes, stabiles und lösliches Target wie zum Beispiel bestimmte Enzyme, Rezeptoren, Proteine usw. in dem Biotest verwendet werden. Weiterhin kann es zu Problemen mit der Enzymaktivität kommen, da für die chromatographische Trennung ein organisches Eluenten-System eingesetzt wird und die prozentuale Zusammensetzung aufgrund der Gradienten-Elution nicht konstant ist. ⁽⁴¹⁾ Da außerdem spezielle apparative Voraussetzungen notwendig sind, sind derartige Methoden nicht ohne weiteres einsetzbar.

Ein anderer interessanter Ansatz wurde parallel zu dieser Arbeit 2009 von Chau und Kvalheim vorgestellt. ⁽⁴⁴⁾ Diese Methode basiert auf der Analyse von chromatographischen Profilen von Pflanzenextrakten und deren antioxidative Aktivität. Durch eine sogenannte „quantitative pattern-activity relationship“ (QPAR) Datenanalyse werden die charakteristischen Merkmale in den chromatographischen Profilen identifiziert, die im Zusammenhang mit der antioxidativen Aktivität stehen. Dies wird ermöglicht indem die „uninteressanten“ Bereiche aus den Rohdaten mittels verschiedenen multivariaten Methoden entfernt werden. Als Grundannahme wird dabei ein linearer Zusammenhang zwischen Aktivität und Konzentration der relevanten Verbindungen vorausgesetzt. Ähnlich wie bei den anderen Methoden basiert der eingesetzte Test zur Ermittlung der antioxidativen Wirkung durch Reduktion eines Eisenkomplexes auf einem klar definierten Prinzip. Im Gegensatz zu den zuvor vorgestellten Verfahren beruht die Methode nicht auf einer online Kopplung des Testsystems und der analytischen Methode (hier LC-UV). Daher sind keine speziellen apparativen Voraussetzungen erforderlich und kann somit universell angewendet werden. Eine Anwendung der QPAR-Methode auf Ganz-Zell Biotests ist allerdings problematisch, da bei dieser Art von Testsystem kein linearer Zusammenhang zwischen Bioaktivität und Konzentration besteht. Es handelt sich vielmehr um einen sigmoidalen Verlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung, der sich sowohl in der Steilheit des Anstieges, sowie in der minimal erforderlichen Konzentration und der maximalen Wirkung von Substanz zu Substanz unterscheidet.

Die vorgestellten Methoden demonstrieren das umfangreiche Potential, dass aus der Kombination zwischen modernen analytischen Verfahren und traditionellen Methoden entsteht. Insbesondere durch die Kopplung von verschiedenen (Bio-)Testverfahren und LC-MS-Systemen ergeben sich vielfältige Möglichkeit die biologisch aktiven Metaboliten gezielt zu identifizieren.

3.3.3 Metabolomics

Eine weitaus umfangreichere Möglichkeit biologisch aktive Metaboliten in komplexen Mischungen zu identifizieren bietet der Metabolomics Ansatz, bei welchem eine umfassende Analyse aller Metaboliten in einer biologischen Probe angestrebt wird. Aufgrund der hohen Komplexität einer biologischen Probe ist es jedoch eine Herausforderung für die analytischen Methoden. Die ideale Methode ist demnach eine, die einen hohen Probendurchsatz möglichst ohne Probenvorbereitung und zugleich die sowohl quantitative als auch qualitative Identifizierung aller Metaboliten ermöglicht.⁽⁴⁵⁾ Aufgrund stark unterschiedlicher Konzentration und Polaritäten der enthaltenen Metaboliten wird daher eine robuste Methode benötigt, die einen großen dynamischen Bereich abdeckt, dabei aber sensitiv genug ist, um auch Verbindungen zu identifizieren, die nur in Spuren enthalten sind. Als analytische Methoden für Metabolomics-Projekte werden hauptsächlich verschiedene MS-Techniken wie GC-MS, LC-MS (UPLC-MS) oder FTICR-MS genutzt. In den letzten Jahren wurden jedoch auch verstärkt NMR-spektroskopische Verfahren in verschiedenen Metabolomics-Projekten eingesetzt. Dabei hat jede Technik ihre Vor- und Nachteile bzw. Limitierungen. So bietet zum Beispiel die GC-MS absolut reproduzierbare Bedingungen mit einer hohen Peak-Auflösung und daher einer sehr guten Quantifizierbarkeit. Nachteil dieser Technik ist allerdings, dass nur flüchtige Verbindungen analysiert werden können und daher meist eine Derivatisierung vor der Analyse erforderlich ist. LC-MS bietet in Kombination mit negativer und positiver Elektrospray-Ionisierung (ESI) eine alternative Möglichkeit sowohl polare als auch unpolare Metaboliten gleichzeitig zu analysieren. Die enthaltenen Metaboliten können ohne vorherige Derivatisierung sehr sensitiv detektiert werden, wobei gleichzeitig ein großer dynamischer Bereich abgedeckt wird. Zudem werden zusätzlich strukturelle Informationen erhalten (MS/MS und MSⁿ). Nachteil ist allerdings die unterschiedliche Ionisierbarkeit verschiedener Metaboliten, die stark von deren funktionellen Gruppen abhängt. Als Folge kann mittels MS nur bedingt eine Quantifizierung erfolgen. Im Gegensatz zu GC-MS ist die LC-MS anfälliger gegenüber Schwankungen, was sich oftmals in der Reproduzierbarkeit der chromatographischen Trennung, speziell Retentionszeitverschiebungen, äußert. Um absolut stabile analytische Bedingungen zu schaffen ist es unbedingt erforderlich, alle Einflußgrößen wie Lösungsmittel-zusammensetzung, Temperatur usw. konstant zu halten. Neben den Faktoren, die die analytische Trennung direkt beeinflussen, ist es außerdem erforderlich bereits bei der Extraktion und Probenvorbereitung konstante und reproduzierbare Bedingungen zu schaffen, da die Probenmatrix einen großen Einfluss auf die Peak-Auflösung und auf die Ionisierung hat (Ionensuppressionseffekte).⁽⁴⁶⁾ Daher ist auch bei LC-MS Anwendungen eine Probenvorbereitung bzw. -aufbereitung erforderlich. Um Schwankungen der Probenzusammensetzung, Peakintensität und Retentionszeit zu minimieren, ist es unerlässlich, sowohl biologische Replikate als auch technische Replikate

anzufertigen. Außerdem muss sichergestellt werden, dass eine gegenseitige Beeinflussung z.B. durch aufeinanderfolgende Messungen ausgeschlossen werden kann. Da oftmals sehr große Datensätze verarbeitet werden müssen, können Metabolomics-Anwendungen nur in Kombination mit verschiedenen computergestützten, multivariaten Analyseverfahren ihren vollen Nutzen entfalten. Dafür ist jedoch eine gewisse Datenvorverarbeitung wie z.B. Peakpicking, Denoising zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnis, Alignment und gegebenenfalls eine Retentionszeitkorrektur erforderlich.

Anwendung findet Metabolomics hauptsächlich auf dem Gebiet der Biomarker-Identifizierung z.B. zur Diagnose bzw. Therapie bei verschiedenen Erkrankungen, Chemotaxonomie, Charakterisierung von verschiedenen Phänotypen (Mutante-Wildtyp), Qualitätskontrolle in der Lebensmittelchemie und von Pflanzenextrakten für medizinische Zwecke, aber auch auf dem Gebiet der Naturstoffforschung zur Identifizierung von bioaktiven Metaboliten.^{(45) (47) (48)}

3.4 Die Gattung *Hygrophorus*

Die Gattung *Hygrophorus* Fr. (Schnecklinge) gehört zu der Familie der Tricholomataceae (Ritterlingsartige), welche der Ordnung Agaricales (Blätterpilze) angehört.⁽⁴⁹⁾ Basierend auf der taxonomischen Einordnung gehören Vertreter der Gattung *Hygrophorus* zu den Basidiomyceten (Ständerpilzen). Der Name *Hygrophorus* leitet sich von den griechischen Wörtern *hygro* (= feucht) und *phorus* (= tragend) ab und bedeutet so viel wie „Feuchtigkeitsträger“. Diese Bezeichnung steht im direkten Zusammenhang mit der klebrigen Schleimschicht, welche die Fruchtkörper vieler *Hygrophorus*-Arten überzieht. Die deutsche Bezeichnung Schnecklinge (engl. waxy caps) leitet sich ebenfalls von diesem auffälligen Merkmal ab. Weitere gattungsspezifische Charakteristika sind die dicken, wachsartigen Lamellen, die meist entfernt stehen und die ausnahmslos weißen Sporen. Die Hutfarbe reicht von weiß über gelb-ockerfarben, bräunlich bis hin zu rötlichen Tönen. Die Gattung *Hygrophorus* umfasst nach Arnolds 23 Arten, die entsprechend ihrer morphologischen Merkmale in vier verschiedene Sektionen mit jeweils mehreren Subsektionen eingeordnet werden.⁽⁵⁰⁾ Vertreter der Gattung sind Ektomykorrhizabildner und gehen daher eine Symbiose mit verschiedenen Nadel- und Laubbäumen ein. Besonders interessant ist jedoch die Tatsache, dass *Hygrophorus*-Arten nur selten von Parasiten wie mykophilen Pilzen, Bakterien usw. befallen werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass Arten der Gattung *Hygrophorus* antibiotische Sekundärmetaboliten bilden, welche die chemische Grundlage für die konstitutive und induzierte Pathogenabwehr bilden.

3.4.1 Sekundärmetaboliten der Gattung *Hygrophorus*

In den vergangenen Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Gattung *Hygrophorus* eine reichhaltige Quelle für neue biologisch aktive Naturstoffe ist (Abb. 7). So wurde bereits Mitte der 1980er Jahre das γ -Butyrolacton Hygrophorsäure (**15**) aus *Hygrophorus lucorum* Kalchbr. isoliert und außerdem in *H. hypothejus* (Fr.) Fr., *H. speciosus* Peck, *H. aureus* Arrh. nachgewiesen.⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾ Im Rahmen dieser Untersuchung konnte außerdem Muscaflavin (**16**) nachgewiesen werden. Aus „*H. eburneus*“ (vermutlich *H. eberneus*) wurde 2004 das Ceramid Hygrophoramid (**17**) isoliert.⁽⁵³⁾ Eine ganze Reihe neuer, unterschiedlich substituierter Cyclopentenonderivate – Hygrophorone – wurden ebenfalls 2004 in verschiedenen *Hygrophorus*-Arten entdeckt (Abb. 7). Die Hygrophorone A (**18 – 23**) konnten erstmalig aus *H. personii* Arnolds isoliert werden, Hygrophorone vom Typ B (**24 – 25**) aus *H. olivaceoalbus* (Fr.) Fr., Hygrophorone C (**26 – 27**) aus *H. pustulatus* (Pers.) Fr. und die Hygrophorone D (**28 – 30**) und E (**31 – 35**) aus *H. latitabundus* Britz. Außerdem wurden zwei neue γ -Butyrolactonderivate Hygrophoron F¹² (**36**) und G¹² (**37**) aus *H. personii* isoliert.⁽⁵⁴⁾

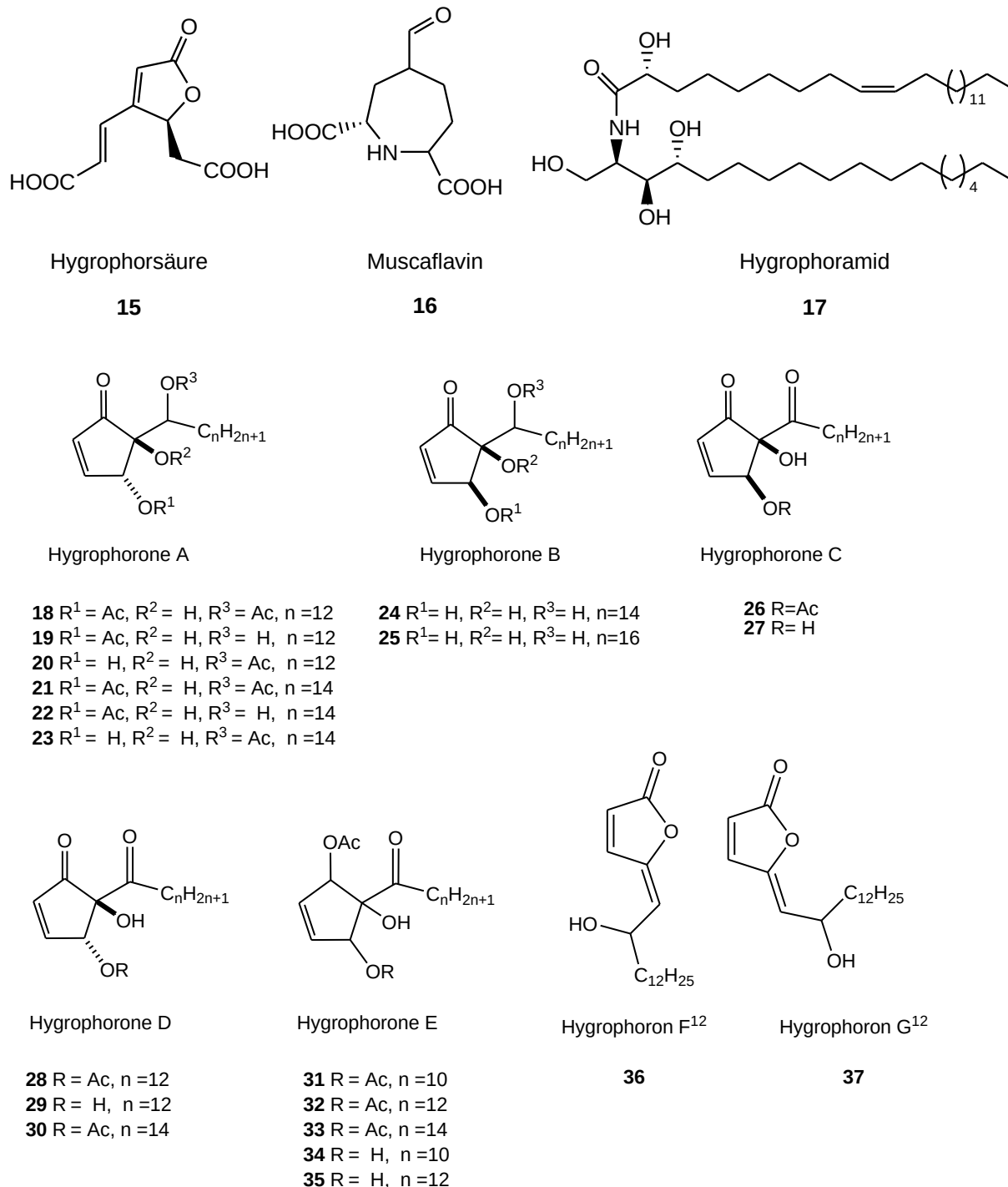


Abb. 7 Darstellung der Strukturformeln von der Hygrophorsäure (**15**), Muscaflavin (**16**), Hygrophoramid (**17**) und der Hygrophorone A – G¹² (**18 – 37**).

Die Hygrophorone sind stark fungizid und antibakteriell gegen gram-positive Bakterien wirksam.⁽⁵⁵⁾ Die Wirkung ist wahrscheinlich auf die Zerstörung der Zellmembran zurückzuführen. Die Minimale Hemmkonzentration (MIC) der Hygrophorone gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme ist vergleichbar mit den MIC der Antibiotika Vancomycin (**6**), Ciprofloxacin (**13**) und Linezolid (**14**) (Abb. 2). Zudem weisen die Hygrophorone strukturelle Ähnlichkeiten mit den Oxylipinen und pflanzlichen

Jasmonaten auf, die neben einer hormonellen Aktivität auch eine entscheidende Rolle in der Pathogenabwehr spielen. Weiterhin konnten einige C-16 und C-18 Fettsäuren mit einer γ -Oxo-crotonat-Teilstruktur (**38** – **45**) aus *H. eburneus* (Bull.) Fr. isoliert werden (Abb. 8).⁽⁵⁶⁾⁽⁵⁷⁾ Aufgrund der Struktur könnte es sich um Precursor-Verbindungen für die Hygrophoron-Biosynthese handeln.

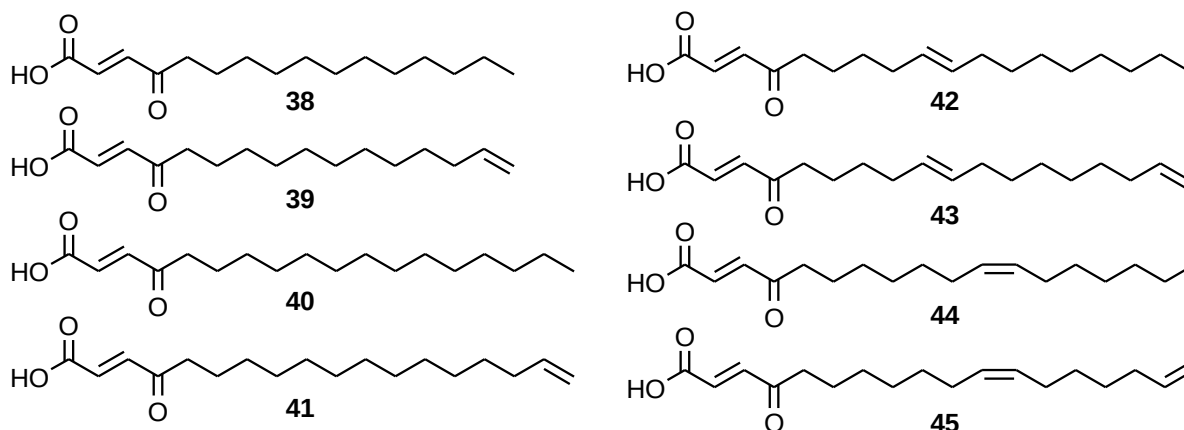


Abb. 8 Strukturformeln, der aus *H. eburneus* (Bull.) Fr. isolierten γ -Oxo-crotonat-Fettsäuren (**38** – **45**).

Diese ungewöhnlichen Fettsäuren sind stark fungizid wirksam und weisen darüber hinaus eine antioomyceten Aktivität gegen *Phytophthora* spp. auf.⁽⁵⁸⁾ *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln und Tomaten und ist Jahr für Jahr verantwortlich für enorme Ernteaussfälle. Die wachstumsinhibierende Aktivität der γ -Oxo-crotonat-Fettsäuren gegen *Phytophthora* spp. konnte sowohl *in vitro* als auch *in planta* sehr erfolgreich gezeigt werden.⁽⁵⁹⁾

Ähnliche Verbindungen **46** – **47**, die ebenfalls die γ -Oxo-crotonat-Teilstruktur aufweisen und fungizide Aktivität haben, wurden auch aus *H. discoxanthus* Rea. isoliert.⁽⁶⁰⁾ Im Rahmen derselben Studien wurden vier weitere oxygenierte Fettsäuren **48** - **50** entdeckt und ihre Struktur aufgeklärt (Abb. 9). Kurze Zeit später konnte dieselbe Arbeitsgruppe zwei neue Acyl-cyclopentendione Chrysotrion A (**51**) und Chrysotrion B (**52**) aus *H. chrysodon* (Batsch.) Fr. isolieren (Abb. 9).⁽⁶¹⁾ In ähnlicher Weise wie bei den Hygrophoronen vermuten die Autoren einen biosynthetischen Zusammenhang zwischen den Fettsäuren und Chrysotrion B (**52**) bzw. dem entsprechenden γ -Butenolid, was bisher jedoch noch nicht nachgewiesen werden konnte.

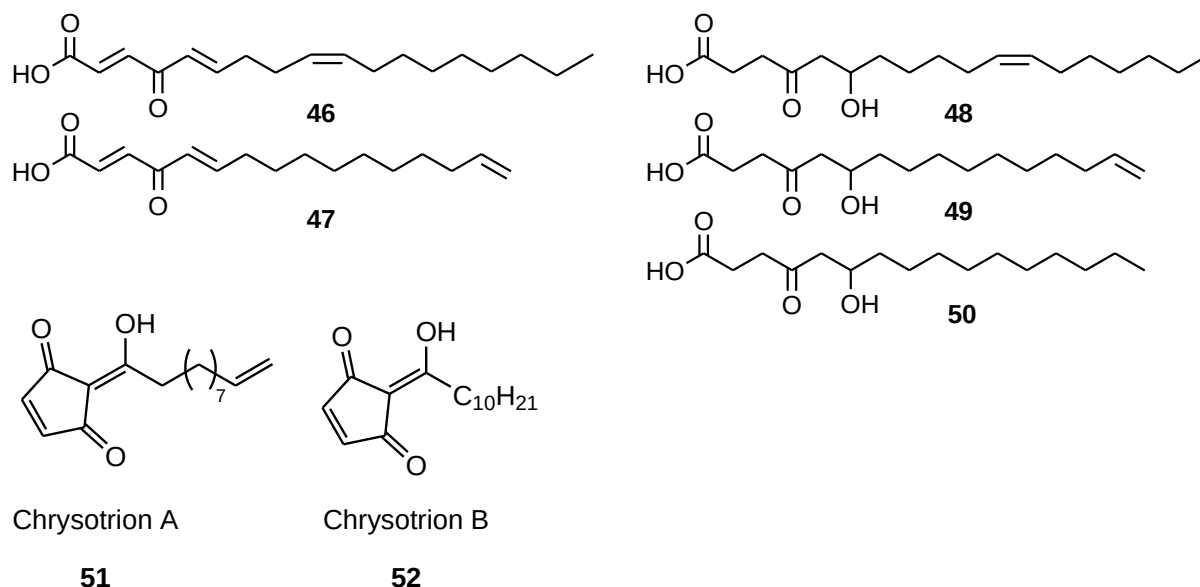


Abb. 9 Die Abbildung zeigt die Strukturformeln, der weiteren γ -Oxo-crotonat-Fettsäuren mit einer zusätzlichen konjugierten Doppelbindung in δ -Position **46** – **47** und der oxygenierten Fettsäuren **48** - **50** bzw. die Strukturformeln der Chrysotrione A (**51**) und B (**52**).

Neben den aufgeführten biologisch aktiven Verbindungen, wurden außerdem β -Carbolinderivate in verschiedenen *Hygrophorus* spp. identifiziert und die chemotaxonomische Relevanz analysiert.⁽⁵⁸⁾⁽⁶²⁾ So konnten aus *H. eburneus* (Bull.) Fr. die Alkaloide Harman (**53**) und Norharman (**54**) isoliert werden und aus *H. hyacinthinus* Quél. Brunnein A (**55**) (Abb. 10). Harman (**53**) und Norharman (**54**) scheinen ubiquitär in der Gattung verbreitet zu sein, wohingegen Brunnein A (**55**) nur in Vertretern der Sektion Olivaceoumbrini nachgewiesen werden konnte und somit als chemotaxonomischer Marker für diese Sektion genutzt werden könnte.

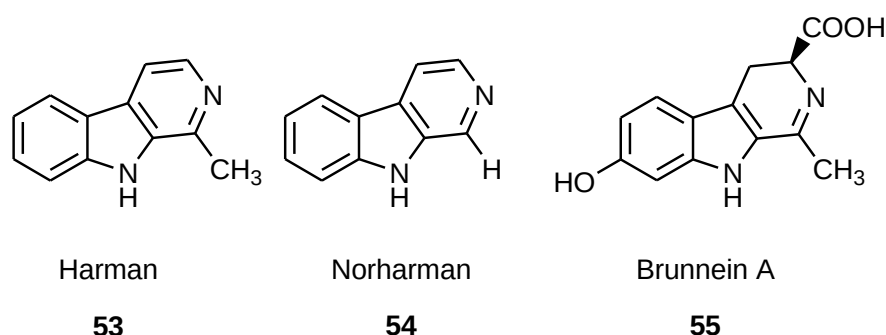
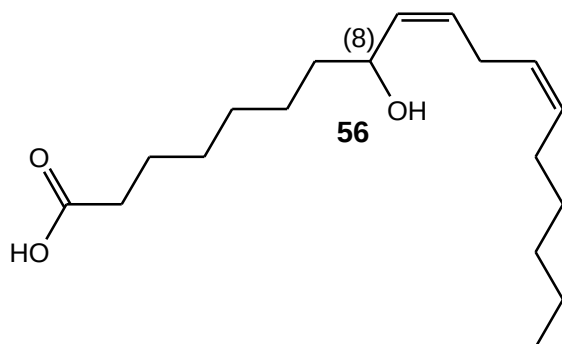


Abb. 10 Darstellung der Strukturformeln der β -Carbolinderivate Harman (**53**), Norharman (**54**) und Brunnein A (**55**).

Die Gattung *Hygrophorus* ist eine reichhaltige Quelle für neue biologisch aktive Naturstoffe. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass auch in Zukunft vielversprechende neue Sekundärmetaboliten in *Hygrophorus* spp. entdeckt werden.

3.5 Oxylipine und Fettsäuren als biologisch aktive Sekundärmetaboliten

Die Oxylipine repräsentieren eine sehr große und vielfältige Gruppe an Sekundärmetaboliten, die durch Oxidation und weitere Umsetzung von ungesättigten Fettsäuren gebildet werden.⁽⁶³⁾ Zu den Oxylipinen gehören vor allem die Jasmonate (bei Pflanzen), aber auch Aldehyde, hydroxylierte, oxygenierte Fettsäuren wie z.B. solche, die eine Divinylether Struktur oder eine Ketogruppe enthalten.⁽⁶⁴⁾ Zu den Funktionen der pilzlichen Oxylipine gehört unter Anderem die Regulation des Entwicklungsprozesses, so zum Beispiel Regulation des Wachstums, Differenzierung und sexuelle und asexuelle Sporenbildung.⁽⁶⁵⁾ Den Oxylipinen kommt aber auch eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Sekundärmetabolismus z.B. Produktion von Antibiotika oder Mykotoxinen zu.⁽⁶⁶⁾ Des Weiteren fungieren Oxylipine als inter- und intraorganismische Signalstoffe zum Beispiel bei der Pilz – Wirt Kommunikation und werden somit zu den Quorum Sensing Molekülen gezählt.⁽⁶⁵⁾ Erst kürzlich konnte auf genetischer Ebene nachgewiesen werden, dass Pflanzen und Pilze (in diesem Fall *Aspergillus nidulans* – Mais) über Oxylipine miteinander kommunizieren.⁽⁶⁷⁾ Neben den bisher genannten Funktionen spielen Oxylipine aber auch bei der Pathogenabwehr eine entscheidende Rolle.⁽⁶³⁾⁽⁶⁵⁾ Das antimikrobielle Potential der Oxylipine konnte in einer umfassenden Analyse der biologischen Aktivität (Wachstumshemmung) von insgesamt 43 pflanzlichen Oxylipinen gegen verschiedene phytopathogene Bakterien, Oomyceten und Pilze demonstriert werden.⁽⁶⁸⁾ Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der pflanzlichen und pilzlichen Oxylipine ist daher anzunehmen, dass auch den pilzlichen Oxylipinen eben diese Rolle zukommt. Bei Pilzen sind hauptsächlich die Oxylipine aus Ascomyceten gut charakterisiert, es gibt aber auch einige Arbeiten zu Oxylipinen aus Basidiomyceten. So wurde bereits Mitte der 1980er Jahre eine allelopathische Verbindung (Oxylipin) – Laetisarinsäure (**56**) – aus dem Basidiomyceten *Laetisaria arvalis* isoliert, welche eine rasche Lyse der Hyphen von phytopathogenen Oomyceten induziert.⁽⁶⁹⁾ Bei der Verbindung handelt es sich um eine zweifach ungesättigte



(9(Z), 12(Z)) C-18 Fettsäure, die an Position C-8 einfach hydroxyliert ist (Abb. 11). Joh und Mitarbeiter untersuchten erstmalig acht verschiedene Basidiomyceten auf ihre Lipxygenase-Aktivität, welche eine Schlüsselrolle bei der Oxylin – Biosynthese spielt und konnten bei allen eine Aktivität nachweisen.⁽⁷⁰⁾

Abb. 11 Strukturformel des bioaktiven Oxylipins Laetisarinsäure (**56**).

Kurze Zeit später konnte die Umsetzung von Ölsäure (18:1 n-9), α -Linolensäure (18:3 n-3) und γ -Linolensäure (18:3 n-9) in die entsprechenden einfach hydroxylierten (8-OH) und die zweifach hydroxylierten (8-OH,11-OH) Produkte mit Hilfe eines Lamellenextraktes aus dem Basidiomyceten *Agaricus bisporus* nachgewiesen werden.⁽⁷¹⁾ Erst vor kurzem wurden mittels bioassay-guided Isolation, basierend auf der Bioautographie-Technik, drei stark fungizide Oxylipine aus dem Basidiomyceten *Gomphus floccosus* isoliert (Abb. 12).⁽⁷²⁾ Die isolierten Verbindungen zeigten eine starke biologische Aktivität gegen eine ganze Reihe von phytopathogenen Pilzen z.B. *Colletotrichum* spp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* und *Phomopsis* spp. Dies lässt darauf schließen, dass Oxylipine auch bei Pilzen eine wichtige Rolle bei der Pathogenabwehr übernehmen.

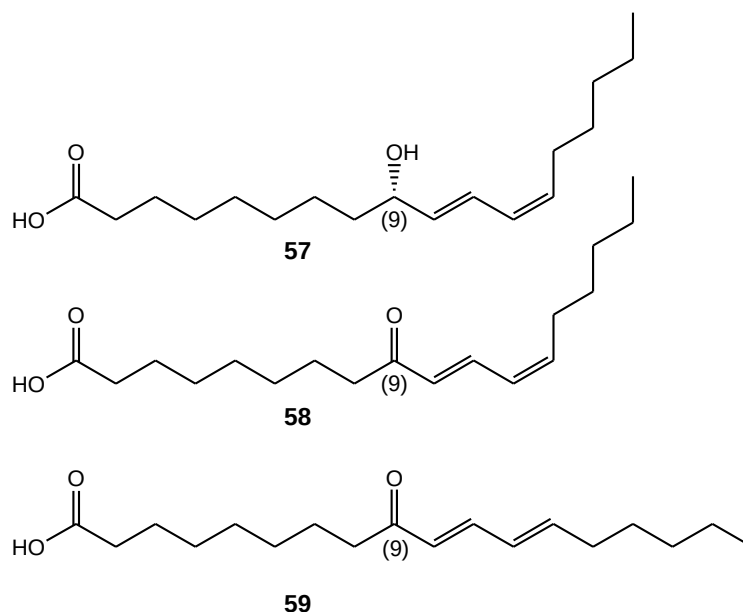


Abb. 12 Die Abbildung zeigt die Strukturformeln der aus *Gomphus floccosus* isolierten fungiziden Oxylipine 57 – 59.

Im Allgemeinen ist bekannt, dass Fettsäuren eine biologische Aktivität wie zum Beispiel fungizide oder antibakterielle Wirkung, aufweisen und vermutlich zur Verteidigung gegen pathogene Parasiten, Bakterien und Pilze eingesetzt werden.⁽⁷³⁾ Dabei gibt es einen direkten Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Anzahl der C-Atome bzw. Anzahl und Konformation der Doppelbindungen. So nimmt die Aktivität bei einer Kettenlänge kleiner C₆ und größer C₂₀ ab und mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen zu.⁽⁷⁴⁾ Die natürlich vorkommenden *cis*-Doppelbindungen weisen im Vergleich zu denen mit *trans*-Doppelbindungen meist eine höhere Aktivität auf.^{(73) (74)} Dieser Unterschied zwischen *cis* und *trans* Konfiguration ist eher auf die räumliche Struktur zurückzuführen, da *cis*-Doppelbindungen zu einem „Knick“ in der Kette führen, wohingegen *trans*-ständige Doppelbindungen eine lineare Geometrie bevorzugen. Ob die Lage der Doppelbindungen einen Einfluss auf die Aktivität hat wurde bisher wenig untersucht. Es konnte jedoch gezeigt

werden, dass insbesondere die Δ^9 -Doppelbindung in *cis*-Konformation einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität hat.⁽⁷⁴⁾ Durch die Einführung von funktionellen Gruppen erfolgt eine Steigerung der Aktivität.⁽⁷⁵⁾ Hydroxylierte Fettsäuren weisen so zum Beispiel eine erhöhte Aktivität gegen gram-positive Bakterien auf. Durch die Veresterung der Carboxylgruppe sinkt die Aktivität, was darauf schließen lässt, dass diese einen entscheidenden Einfluss hat. Der genaue Wirkmechanismus der antibakteriellen Aktivität ist jedoch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass das primäre Target die Zellmembran ist. Aufgrund des lipophilen Charakters können sich Fettsäuren in die Membran einlagern und die Fluidität stark beeinflussen.⁽⁷³⁾ Da „geknickte“ Fettsäuren (*cis*-Doppelbindung) nicht so dicht gepackt werden können, ist die Fluidität stark erhöht und führt vermutlich zu einer stärkeren bakteriellen Hemmung. Andere Angriffspunkte in der Zellmembran könnten zum Beispiel die Atmungskette oder oxidative Phosphorylierung sein.⁽⁷³⁾ Die Wachstumsinhibierung kann aber auch auf die Lyse der Zellen, einen veränderten pH-Wert oder Enzyminhibierung zurückzuführen sein. Der Enzym-inhibierende Effekt konnte auch von Zheng und Mitarbeitern bestätigt werden, die in einer umfassenden Studie die antibakterielle Wirkung von gesättigten und ungesättigten C-16 und C-18 Fettsäuren bzw. deren Methylester gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme, *Streptomyces pyrogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Escherichia coli* analysiert haben.⁽⁷⁶⁾ Die ungesättigten Fettsäuren wiesen dabei eine bemerkenswerte Aktivität gegen *S. aureus* auf. Die Autoren konnten außerdem zeigen, dass ungesättigte Fettsäuren selektiv in die bakterielle Fettsäure-Biosynthese eingreifen, indem die Acyl-Carrier-Protein (ACP) Reduktase (FabI) inhibiert wird.⁽⁷⁶⁾ Aufgrund der zunehmenden Resistenzbildung von Bakterien gegen etablierte Antibiotika besteht ein großer Bedarf neue Targets zu erschließen. Die bakterielle Fettsäure-Biosynthese scheint in dieser Hinsicht sehr vielversprechend zu sein.⁽¹⁶⁾ Fettsäuren stellen aufgrund ihres breiten Aktivitätsprofils und ihrer breitgefächerten Wirkung vielversprechende Naturstoffe für die Anwendung in der Medizin und in der Agrarwirtschaft dar.⁽⁷³⁾

4. Spezieller Teil

Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist die Entwicklung einer LC-MS basierten Methode zur Identifizierung von biologisch aktiven Metaboliten in komplexen Mischungen. Als Quelle für bioaktive Naturstoffe wurde die Gattung *Hygrophorus* (Basidiomyceten) ausgewählt, da ihr vielversprechendes Potential bereits mehrfach in Hinblick auf biologisch aktive Verbindungen demonstriert wurde. Für die Analyse der Metabolitenprofile stand ein LC-PDA-ESI-MS (Ionenfalle) System zur Verfügung. Als biologische Aktivität der *Hygrophorus*-Extrakte wurde die antibakterielle Wirkung ausgewählt. Für die Entwicklung einer Methode zur Identifizierung der bioaktiven Metaboliten war es daher notwendig, sowohl die analytischen Bedingungen für die LC-MS und Extraktionsmethode zu optimieren, als auch einen antibakteriellen Biotest zu entwickeln.

4.1 Extraktion der Pilzfruchtkörper

Die Extraktion ist der erste Schritt der Isolierung bzw. Aufreinigung von biologisch aktiven Verbindungen aus Naturstoffextrakten. Da sowohl die Qualität der LC-MS Messung als auch die Qualität des Biotests von den Extrakten beeinflusst wird, war es zu Beginn erforderlich eine möglichst reproduzierbare Extraktionsmethode für Pilzfruchtkörper zu etablieren, die gleichzeitig ohne zu großen Zeitaufwand eine hohe Ausbeute erzielt. Außerdem mussten die Extrakte für eine Applikation im Biotest (wässriges Milieu) und LC-MS Analyse geeignet sein.

4.1.1 Optimierung hinsichtlich Ausbeute

Für die Optimierung der Extraktionsmethode hinsichtlich der Ausbeute wurden sowohl tiefgefrorene Pilzfruchtkörper als auch lyophilisiertes Pilzmaterial von *Hygrophorus pustulatus* (Kollektionsnummer 46/03) verwendet. Außerdem kamen verschiedene Extraktionsmittel und verschiedene Methoden zum Einsatz.

Zu Beginn wurde die bis *dato* verwendete Standardextraktionsmethode A eingesetzt (siehe hierzu Experimenteller Teil 5.2.1.1 S. 105). Bei dieser Vorgehensweise werden die Pilzfruchtkörper gemäß der eluotropen Reihe mit Petrolether, Ethylacetat, Aceton und MeOH jeweils eine Stunde unter Schütteln extrahiert. Da diese Methode jedoch aufgrund des großen Zeitaufwands nicht geeignet ist, wurden die tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper mit der Extraktionsmethode B extrahiert (Abb. 13). Hierbei wurde zu Beginn eine Fest-Flüssig Extraktion mit Methanol durchgeführt und anschließend eine Flüssig-Flüssig Extraktion mit EtOAc und Wasser. Um die Extraktionseffizienz zu steigern, wurde die Fest-Flüssig Extraktion zusätzlich unter Einwirkung von Ultraschall durchgeführt.

4. Spezieller Teil – Extraktion der Pilzfruchtkörper

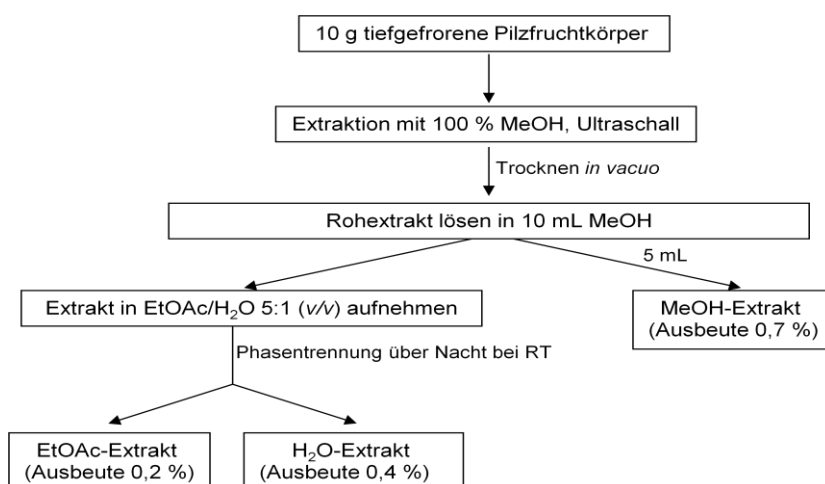


Abb. 13 Die Abbildung zeigt das Prinzip der Extraktionsmethode B und die Ausbeute der Extrakte aus ca. 10 g tiefgefrorenen Fruchtkörpern von *H. pustulatus*.

Die Gesamtausbeute dieser Methode belief sich hierbei auf 1,3 % der tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper und die der Einzelextrakte auf 0,7 % bei dem MeOH-Extrakt, 0,4 % H₂O-Extrakt und 0,2 % im Falle des EtOAc-Extraktes (Tabelle 4). Diese Extraktionsmethode B hat gegenüber Methode A zwar den Vorteil weniger zeitaufwendig zu sein, allerdings ist die Gesamtausbeute nicht zufriedenstellend. Zur Steigerung der Ausbeute und zur Minimierung des Zeitaufwands wurden zusätzlich verschiedene Extraktionsmethoden unter Verwendung eines automatischen Extraktors durchgeführt. Dieses Gerät bietet den Vorteil, dass viele Proben gleichzeitig unter Standardbedingungen extrahiert werden können. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Extraktion bei hohen Temperaturen durchzuführen, da Überdruckbedingungen bestehen und somit ein Verdampfen des Extraktionsmittels vermieden wird. Die Extraktion der Pilzfruchtkörper wurde bei 40°C (70 bar) durchgeführt, um ein Zersetzen von thermolabilen Metaboliten zu vermeiden. Um annähernd vergleichbare Bedingungen zu der Extraktion B zu schaffen, wurde jeweils 1 g lyophilisiertes Pilzmaterial eingesetzt, welches dreimal für 10 min statisch extrahiert wurde (siehe hierzu Experimenteller Teil Kapitel 5.2.1.2 S. 106 Tabelle 23). Als Extraktionsmittel kamen 80 % MeOH/H₂O (einstufige Extraktionsmethode C), *n*-Hexan und 100 % MeOH (zweistufige Extraktionsmethode D2) und *n*-Hexan (einstufige Extraktionsmethode D3) zum Einsatz (Tabelle 4). Zusätzlich wurden verschiedene Nachbehandlungen getestet (Abb. 14). Bei Verwendung von lyophilisiertem Material in Kombination mit dem Extraktor konnten insgesamt wesentlich höhere Ausbeuten erhalten werden. So lieferte die Extraktionsmethode C (80 % MeOH/H₂O) mit 14,4 % die höchste Ausbeute (bezogen auf 1 g lyophil. Trockengewicht). Bei der zweistufigen Extraktionsmethode D2 (1. 100 % *n*-Hexan und 2. 100 % MeOH) konnten ebenfalls hohe Ausbeuten von 12,1 % bei MeOH und 3,3 % bei *n*-Hexan als Extraktionsmittel erhalten werden. Sofern die Extraktion ausschließlich mit 100 % *n*-Hexan (Extraktionsmethode D3) durchgeführt wurde, wurden vergleichbare Ausbeuten von 3,2 % erhalten.

4. Spezieller Teil – Extraktion der Pilzfruchtkörper

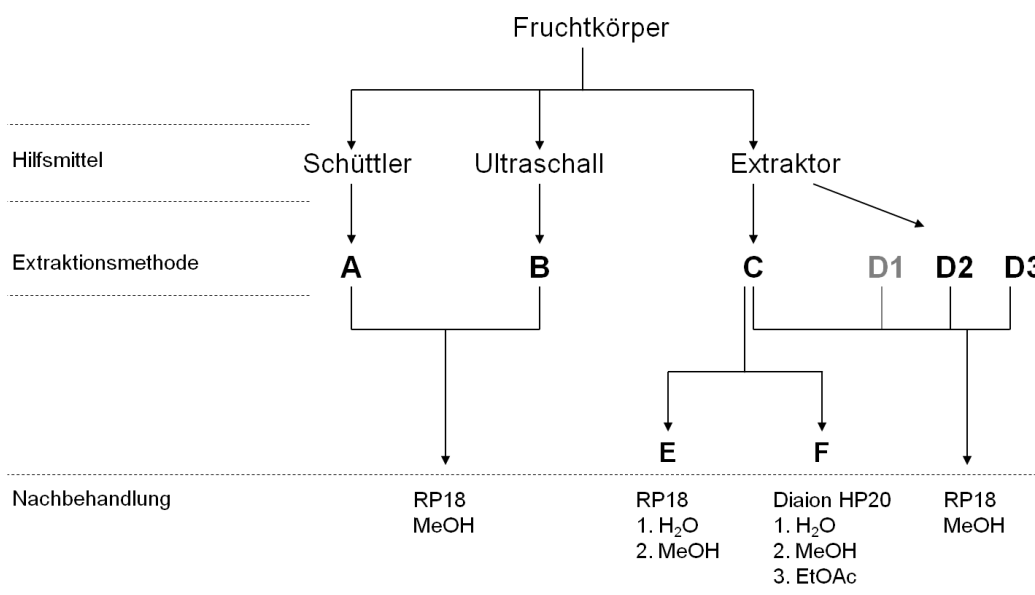


Abb. 14 Übersicht über die verwendeten Extraktionsmethoden A, B, C und D1 – D3, sowie die jeweiligen Nachbehandlungen (D1 ist in grau dargestellt, da diese Methode zwar verwendet, jedoch in diesem Kapitel nicht diskutiert wird).

Da die höchsten Ausbeuten bei Extraktion mit 80 % MeOH/H₂O (Methode C) erhalten werden konnten, wurden die so gewonnenen Extrakte zusätzlich verschiedenen Nachbehandlungen unterzogen (Abb. 14 Extraktionsmethode E und F). So wurde bei Methode E eine Auftrennung in polare und unpolare Metaboliten durch Fraktionierung mit H₂O und MeOH an RP18 Material erreicht. Bei Extraktionsmethode F erfolgte die Fraktionierung unter Zuhilfenahme von einer polymeren Matrix. In beiden Fällen konnten bei H₂O als Lösungsmittel sehr hohe Ausbeuten erhalten werden (Tabelle 5). In Abb. 15 sind die erhaltenen Ergebnisse noch einmal zusammenfassend dargestellt. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Ausbeuten der Extraktionsmethode B (tiefgefrorene Pilzfruchtkörpern) in Abb. 15 auf die Trockengewichte normiert. Dafür wurde von tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern (6 x ca. 10 g) von *H. pustulatus* (111/08) das Trockengewicht nach dem Gefriertrocknen bestimmt und so ein Umrechnungsfaktor von 7,74 +/- 0,79 ermittelt (Tabelle a - 4).

Tabelle 4 Übersicht über die Ausbeuten bei verschiedenen Extraktionsmethoden.

Extraktionsmethode		Extraktionsmittel	Ausbeute (%)
tiefgefroren	B	100 % MeOH	0,7
		EtOAc	0,2
		H ₂ O	0,4
lyophilisiert	C	80 % MeOH/H ₂ O	14,4
	D2	100 % MeOH	12,1
		<i>n</i> -Hexan	3,3
	D3	<i>n</i> -Hexan	3,2

Tabelle 5 Übersicht über die Ausbeuten bei verschiedenen Nachbehandlungen.

Extraktionsmethode (80 % MeOH)	Nachbehandlung		Ausbeute (%)
C	-		14,4
E	RP18	H ₂ O	34,7
		100 % MeOH	7,0
F	Diaion HP20	H ₂ O	35,7
		100 % MeOH	3,1
		EtOAc	0,3

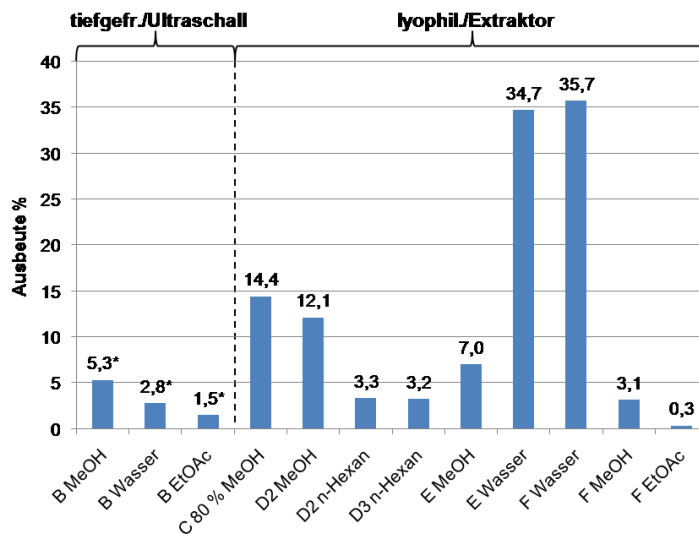


Abb. 15 Die Abbildung zeigt die erhaltenen Ausbeuten (%) bei verschiedenen Extraktionsmethoden und Nachbehandlungen.
*normiert auf Trockengewicht Faktor 7,74.

Der Zeitaufwand für die Extraktionsmethoden C und D2 ist im Vergleich zu Methode B gering, da die Extraktion automatisch erfolgt und zudem viele Proben gleichzeitig extrahiert werden können. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen kann somit geschlussfolgert werden, dass polare Extraktionsmittel hinsichtlich der Ausbeute besser geeignet sind als unpolare. Weiterhin können höhere und reproduzierbarere Ausbeuten erzielt werden, indem lyophilisiertes Pilzmaterial eingesetzt wird und die Extraktion mit Hilfe des Extraktors erfolgt. Aufgrund der genannten Vorteile erfolgte eine weitere Auswertung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit auf der Basis der Extraktionsmethoden C und D2.

4.1.2 Optimierung hinsichtlich Reproduzierbarkeit

Für LC-MS basierte Metabolomics-Experimente ist eine hohe Reproduzierbarkeit der Extraktion unbedingt erforderlich, damit keine „künstliche Veränderung“ durch die Extraktion herein gebracht werden und somit die natürliche Varianz nicht verändert wird. Darüber

hinaus ist eine hohe Extraktionsreproduzierbarkeit Grundvoraussetzung für weitere Experimente. Für die Bewertung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit wurden pro Extraktionsmethode drei Extrakte hergestellt (Extraktionsreplikate), welche wiederum jeweils mittels LC-(+/-)ESI-MS mit drei technischen Replikaten gemessen wurden (Messreplikate). Somit bilden jeweils neun Messungen pro Extraktionsmethode/-mittel die Grundlage für die weitere Auswertung. Da die chromatographische Trennung aufgrund von verschiedenen Faktoren (Matrixeffekte) eine gewisse Varianz beinhaltet und es somit zu Retentionszeitverschiebungen kommt, ist es erforderlich, ein Alignment und eine Retentionszeitkorrektur durchzuführen. Für diese Zwecke wird das Programm XCMS verwendet.⁽⁷⁷⁾ Von den zu alignierenden Daten wird zu Beginn ein einfaches Peakpicking durchgeführt. Auf dieser Basis werden Peaks herausgefiltert, die in allen Messungen vorhanden sind – Ankerpeaks. Die Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Ähnlichkeit der Daten. Mit Hilfe dieser Ankerpeaks wird dann ein iteratives Alignment und eine Retentionszeitkorrektur durchgeführt. Die Ausgabe der enthaltenen Peaks erfolgt im Anschluss daran in Form einer Datenmatrix, in welcher jeder Peak neben dem m/z – Wert und der Retentionszeit eine zugehörige Intensität in den jeweiligen Messungen erhält (siehe auch Kapitel 5.6.1 S. 121, Tabelle 34).

Für die Bewertung der Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethoden, wurden jeweils die Replikate ($n = 9$) einer Methode mit XCMS prozessiert. Dabei wurden nur Peaks berücksichtigt, die in allen neun Messungen enthalten sind ($\text{minfrac} = 1$). Die Anzahl der Peaks wird als ein Kriterium zur Bewertung herangezogen. Ein weiteres sehr wichtiges Kriterium ist die Schwankungsbreite der Retentionszeiten (Retentionszeitabweichung bei Replikaten). Bei den Extraktionsmethoden C (80 % MeOH) und D2 (100 % MeOH) lagen die maximalen Retentionszeitabweichungen im Bereich von ± 5 s. Nur bei Methode D2 *n*-Hexan waren die Schwankung mit -5 bis $+30$ s wesentlich größer. Die Extrakte C und D2 MeOH wiesen im Gegensatz zu D2 *n*-Hexan aufgrund geringerer Retentionszeitabweichungen eine hohe Reproduzierbarkeit auf. Als Grundlage für eine weitere statistische Auswertung wurde die Häufigkeitsverteilung der Retentionszeitdifferenzen und die relativen Standardabweichungen, bezogen auf die Intensitäten, herangezogen. Die Verteilung der Retentionszeitdifferenzen diente dabei als Maß für die Güte der Trennung in Bezug auf die Reproduzierbarkeit/Homogenität der technischen Replikate. Hierzu wurde von den ermittelten Peaks jeweils die Differenz zwischen der maximalen t_{Rmax} und der minimalen t_{Rmin} eines Peaks (über $n = 9$ Messungen) gebildet. Der Übersicht halber wurde eine Einteilung in Klassen mit einheitlicher Breite vorgenommen. Die so erhaltene Retentionszeitverteilung kann als Maß für die Güte der Trennung bzw. Alignment herangezogen werden. In Abb. 16 sind die Verteilungen der verschiedenen Extraktionen C, D2 MeOH und D2 *n*-Hexan im direkten Vergleich zueinander dargestellt. Bei C und D2 (100 % MeOH) befinden sich ~ 48 %

bzw. ~ 52 % aller Metaboliten in einem Abweichungsbereich von 0 – 10 s, was als sehr gut zu bewerten ist. Bei D2 (*n*-Hexan) sind es dagegen nur ~ 40 %. Das bedeutet, dass die Trennung bzw. das Alignment trotz einer sehr hohen Probenkomplexität sehr gut ist.

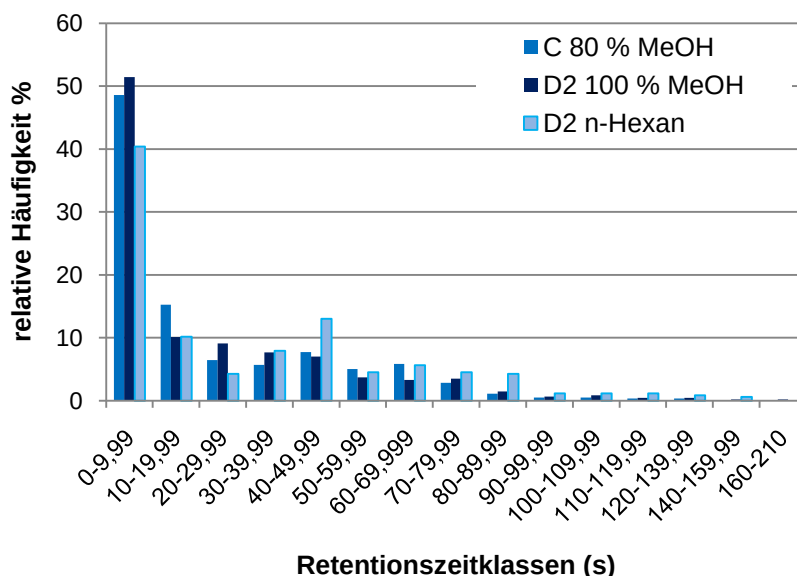


Abb. 16 Übersicht über die Retentionszeitdifferenzen und deren relative Häufigkeit bei den Extraktionsmethoden C und D2. Die Daten beziehen sich auf LC-(+)-ESI-MS Messungen (n = 9).

Zur weiteren Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurde die Häufigkeitsverteilung der relativen Standardabweichung bezogen auf die Intensitäten herangezogen. Als Grundlage dienen auch hier jeweils die neun Messungen pro Extraktionsmethode. Eine geringe Schwankungsbreite und eine geringe Varianz in den Intensitäten ist Grundvoraussetzung für reproduzierbare Messergebnisse. Für diese Zwecke ist das von großer Bedeutung, damit die aktivitätsrelevanten Metaboliten sicher identifiziert werden können. Jedoch ist keine absolute Quantifizierung erforderlich, so dass eine relative Quantifizierung ausreichend ist. Massenspektrometrische Experimente sind jedoch aufgrund einer sehr uneinheitlichen Ionisierbarkeit der Metaboliten untereinander nur schwer zu quantifizieren. Zudem kommt eine hohe Probenkomplexität hinzu. Um dies zu Überprüfen wurde die relative Standardabweichung für jeden ermittelten Peak bestimmt. Es wurde hier ebenfalls der Übersicht halber eine Einteilung in Klassen vorgenommen. In Abb. 17 ist ein Häufigkeitsdiagramm dargestellt, welches die Verteilung der Abweichungen der relativen Standardabweichung zeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei D2 *n*-Hexan (hellblaue Balken) verhältnismäßig viele Peaks eine große Standardabweichung aufweisen. Es kann jedoch keine Aussage darüber getroffen werden, ob die hohe Varianz an der schlechten Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethode oder an der chromatographischen Trennung liegt, da hier nur die Gesamtvarianz bestimmt wurde. Im Gegensatz zu den *n*-Hexan-Extrakten führen die Extrakte C (blaue Balken) und D2 100 % MeOH (dunkelblaue Balken)

zu besseren Ergebnissen. Bei C weisen etwa 92 % aller Peaks eine maximale Abweichung von 40 % auf. Bei D2 100 % MeOH sieht es ähnlich gut aus. Es zeigen hier ca. 82 % aller Peaks eine maximale Abweichung von 40 %.

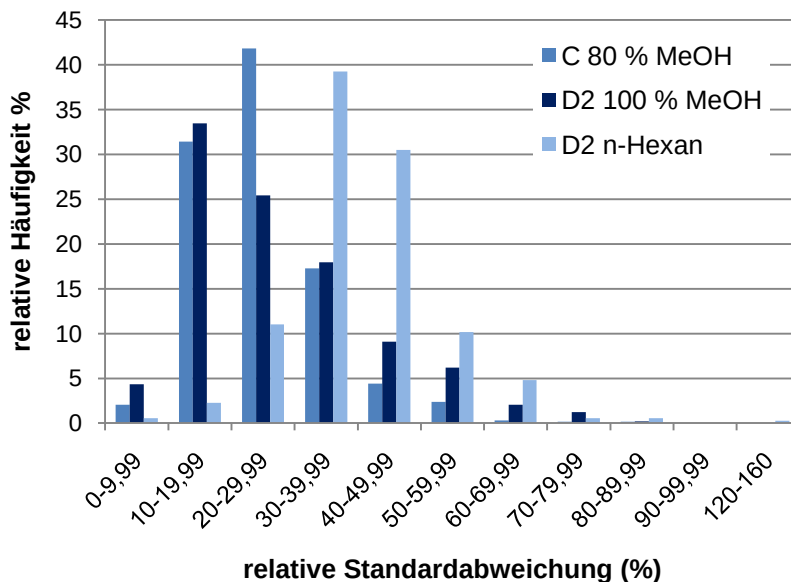


Abb. 17 Die Abbildung zeigt die Häufigkeitsverteilung der relativen Standardabweichung der Peakintensitäten bei positiver Ionisierung (n = 9).

Des Weiteren wurde die Reproduzierbarkeit anhand der linearen Pearson Korrelationskoeffizienten R^2 der technischen Replikate (Messreplikate) und der Extraktionsreplikate bewertet (Tabelle 6). Extraktionsmethode C und D2 MeOH sind sehr gut reproduzierbar. Dies wird sowohl bei den Messwiederholungen (C 80 % MeOH $R^2 \sim 0,94$ und D2 MeOH $R^2 \sim 0,92$) als auch bei den Extraktionsreplikaten (C 80 % MeOH $R^2 \sim 0,94$ und D2 MeOH $R^2 \sim 0,93$) deutlich. Wohingegen bei D2 *n*-Hexan zwar eine gute Reproduzierbarkeit der technischen Replikate erhalten werden konnte ($R^2 \sim 0,96$), jedoch nicht für die Extraktionsreplikate ($R^2 \sim 0,71$). Zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse wurde die gesamte Messreihe wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.

Zusätzlich wurde die Reproduzierbarkeit der Extraktionsmethoden bei negativer Ionisierung überprüft (Tabelle 6). Insgesamt sind die erhaltenen Ergebnisse bei negativer Ionisierung schlechter als bei positiver. Obwohl die Retentionszeitschwankungen nur im Bereich von - 6 s bis + 8 s bei C (80 % MeOH) liegen, konnten bei D2 Schwankungen von - 5 s bis + 60 s detektiert werden. Beim genaueren Betrachten fällt auf, dass nur eine Messung diese Auffälligkeit zeigt. Die anderen acht Messungen liegen im normalen Bereich von +/- 5 s. Die Pearson Korrelationskoeffizienten (Messreplikate und Extraktionsreplikate) sind im Falle der Extraktionen D2 100 % MeOH und D2 *n*-Hexan sehr gut. Bei *n*-Hexan ist die Korrelation der Extraktionsreplikate sogar wesentlich besser als bei positiver Ionisierung (Tabelle 6). Dies hängt vermutlich mit den enthaltenen Verbindungen zusammen, bei welchen es sich

hauptsächlich um Fettsäuren handeln könnte, die aufgrund der Carboxylgruppe sehr gut im negativen ESI-Modus ionisierbar sind. Bei Extraktion C ist die Reproduzierbarkeit der technischen Replikate und der Extraktionsreplikate mit Korrelationskoeffizienten von $R^2 \sim 0,84$ schlechter als bei positiver Ionisierung. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden auch in diesem Fall die Messreihen wiederholt und lieferten ähnliche Ergebnisse.

Tabelle 6 Kriterien zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit, sowie die erhaltenen Ergebnisse für die jeweiligen Extrakte bei positiver und negativer Ionisierung. Der harmonische Mittelwert berücksichtigt im Gegensatz zu dem arithmetischen Mittelwert die Klassengröße und ist somit repräsentativer.

Kriterium		Extraktionsmethode C	Extraktionsmethode D2	
			MeOH	n-Hexan
Mittelwert Δt_R (s)	(+)ESI	23	23	33
	(-)ESI	38	77	85
Harmonischer Mittelwert Δt_R (s)	(+)ESI	9	8	10
	(-)ESI	15	35	19
Mittelwert S_{rel} (%)	(+)ESI	25	25	50
	(-)ESI	36	35	32
Harmonischer Mittelwert S_{rel} (%)	(+)ESI	22	21	44
	(-)ESI	30	26	32
Anzahl Peaks	(+)ESI	636	484	354
	(-)ESI	420	321	378
R^2 techn. Replikate	(+)ESI	0,94	0,92	0,96
	(-)ESI	0,84	0,92	0,98
R^2 Extraktionsreplikate	(+)ESI	0,94	0,93	0,71
	(-)ESI	0,84	0,92	0,94

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen der verschiedenen Extraktionsmethoden ist D2 am besten für weitere Experimente geeignet, da hier sowohl im positiven als auch im negativen Ionisierungsmodus reproduzierbare Ergebnisse in Bezug auf die technischen und Extraktionsreplikate erhalten werden konnten. Außerdem ist die Ausbeute mit 12 % der lyophilisierten Trockenmasse vergleichsweise hoch. Neben einem geringen Zeitaufwand wurden ebenfalls die meisten Peaks detektiert, was auf eine höhere Metabolitenvielfalt hindeuten könnte. Darüber hinaus ist die Extraktionsmethode D2 sowohl für LC-MS Messungen als auch für eine Applikation im Biotest (MeOH-Extrakte) sehr gut geeignet.

4.2 Biologische Aktivität

Für die Identifizierung von antibakteriellen Metaboliten war es außerdem notwendig einen geeigneten Biotest zu entwickeln, der robust, aber auch quantifizierbar und vor allem reproduzierbar ist. Da in Extrakten Verbindungen oftmals nur in sehr geringen Mengen vorhanden sind, war es zudem erforderlich, ein möglichst empfindliches Testsystems zu verwenden. Daher war die Fluoreszenzdetektion die Methode der Wahl, um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen. Zur Vermeidung von Problemen durch Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen, wurde ein genetisch modifizierter *Bacillus subtilis* Stamm ausgewählt, der in der Lage ist eine verbesserte Variante des Gelb-fluoreszierenden Proteins (YFP) zu produzieren.⁽⁷⁸⁾ Die Expression des Fusionsproteins wird dabei durch den Promotor *abrB* gesteuert, welcher in der exponentiellen Phase aktiv ist. Es besteht daher ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Fluoreszenzintensität und der Vitalität der Bakterienzellen. Ein weiterer Vorteil der intrinsischen Produktion des YFP ist die ausschließliche Detektion von lebenden Zellen, wohingegen es bei Messung der Optischen Dichte (OD) oftmals zur Verfälschung der Messergebnisse kommt, da sowohl lebende als auch tote Zellen erfasst werden. Dadurch ist eine sehr exakte quantitative Bestimmung möglich. Die Durchführung des Biotests erfolgt im 96er Mikrotiterplattenformat.

4.2.1 Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten Biotests (*Bacillus subtilis*)

Bacillus subtilis ist ein gram-positives, peritrich begeißeltes, stäbchenförmiges Bakterium, das ubiquitär vorkommt. Eine Besonderheit ist die endoderme Sporenbildung, welche als Überdauerungsform dient. *Bacillus subtilis* wird in vielen verschiedenen Bereichen wie zum Beispiel in der Biotechnologie oder Lebensmittelindustrie eingesetzt, dient aber auch als Testorganismus für ein Vor-Screening in der Naturstoffanalytik, insbesondere da *B. subtilis* im Gegensatz zu *B. anthracis* und *B. cereus* als nicht pathogen eingestuft wird.

Vorgehensweise zur Entwicklung eines Fluoreszenz-basierten Biotest

1. Kontrolle auf Funktionalität der YFP-Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie
2. Aufnahme der Wachstumskurven mittels OD-Messung ($\lambda = 570 \text{ nm}$)
 - Abschätzung der Wachstumszeit
 - Optimierung der Inokulum-Zellzahl
3. Aufnahme der Wachstumskurven mittels Fluoreszenzintensitätsmessung
 - Optimierung der gerätespezifischen Einstellungen
 - Zellzahloptimierung

4. Nachweis der Korrelation zwischen OD-Wachstum und Fluoreszenzintensität

5. Ermittlung der Lösungsmittelverträglichkeit (MeOH und DMSO)

6. Bestimmung der Detektionsgrenze

7. Standardisierung mit verschiedenen Antibiotika und Verifizierung mit OD-Messung

- Bestimmung der IC_{50} Werte und Überprüfung der Reproduzierbarkeit

8. Übertragung auf Rohextrakte und Fraktionen

Für die Entwicklung eines antibakteriellen Biotests wurden zunächst Wachstumskurven mittels Trübungsdichtemessung ($OD_{570\text{ nm}}$) bei verschiedenen Zellzahlen direkt in der Mikrotiterplatte als Kinetikmessung über 40 Stunden aufgenommen (Abb. 18 A). Dafür wurde eine 24 h alte Vorkultur mittels frischem Medium auf $1,6 \times 10^7$, $1,6 \times 10^6$ und $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL verdünnt und als Inokulum eingesetzt (jeweils 6 Replikate).

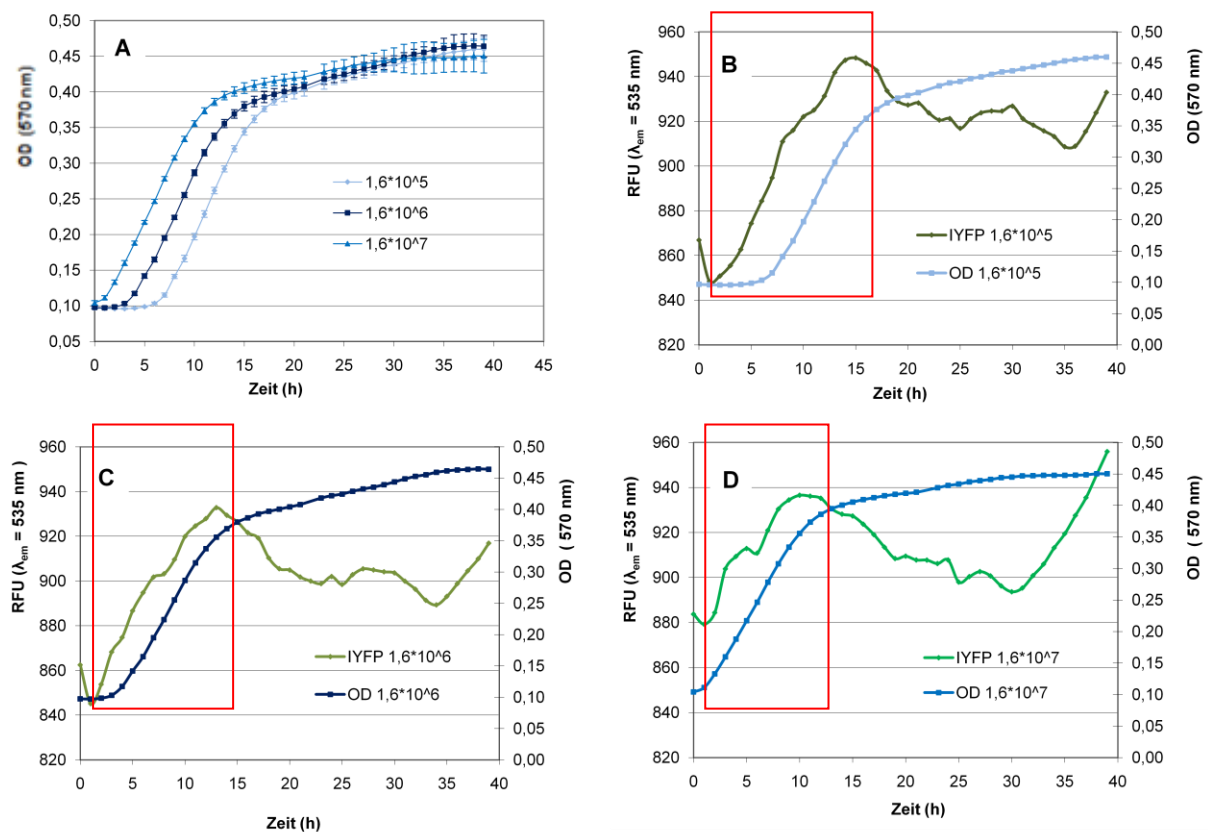


Abb. 18 Wachstumskurven von *B. subtilis* (abrB-iyfp) bei verschiedenen Zellzahlen. **A:** Vergleich der Wachstumskurven bei OD-Messung ($\lambda = 570\text{ nm}$) **B:** Vergleich der OD-Wachstumskurve und Fluoreszenz-Wachstumskurve (Relative Fluoreszenzeinheiten RFU bei $\lambda_{ex} = 510\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 535\text{ nm}$, gain 45) bei $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL als Inokulum **C:** $1,6 \times 10^6$ Zellen/mL **D:** bei $1,6 \times 10^7$ Zellen/mL.

Zum Nachweis, dass die Expression des IYFP und somit die Fluoreszenzintensität direkt proportional zum Wachstum ist, wurden außerdem Wachstumskurven mittels Fluoreszenzdetektion (Emission) aufgenommen. Die Exzitation des Fluorophors erfolgt bei

$\lambda_{ex} = 510$ nm und die Emission bei $\lambda_{em} = 535$ nm. Anhand Abb. 18 B, C und D ist deutlich zu sehen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem bakteriellen Wachstum und der Fluoreszenzintensität besteht. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Anfangszellzahl einen großen Einfluss auf die Dauer der Lag-Phase und das Ende der Exponentiellen Phase hat. Da die größte Sensitivität und somit das beste Signal-Rausch Verhältnis am Fluoreszenzmaximum und demzufolge am Ende der Exponentiellen Phase erreicht wird, hat die Anfangszellzahl einen entscheidenden Einfluss auf die Inkubationszeit. Während bei einer Zellzahl von $1,6 \times 10^7$ Zellen/mL die Exponentielle Phase bereits nach ca. einer Stunde beginnt, dauert die Lag-Phase bei $1,6 \times 10^6$ bzw. $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL vier bzw. sechs Stunden. Als Folge dessen ist bei $1,6 \times 10^7$ Zellen/mL das exponentielle Wachstum bereits nach 10 Stunden und bei $1,6 \times 10^6$ bzw. $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL erst nach 13 bzw. 15 Stunden beendet. Da bei $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL als Inokulum die größte Fluoreszenzintensität erreicht wurde, bietet dies die besten Voraussetzungen.

Biologische Testsysteme erfordern überwiegend wässrige Bedingungen. Diese Tatsache kann allerdings zu Problemen führen, da die wenigsten Naturstoffe oder Syntheseprodukte wasserlöslich sind. Aus diesem Grund ist es unumgänglich, einen gewissen Anteil eines organischen Lösungsmittels dem Testsystem beizufügen. Daher wurde die Lösungsmittelverträglichkeit des Testorganismus gegenüber DMSO und MeOH bestimmt. Als maximaler Anteil können 10 % (v/v) eingesetzt werden, dies hängt mit dem Gesamtvolumen von 300 μ L pro Well zusammen, auf welches der Assay konzipiert wurde (240 μ L Medium, 30 μ L Bakteriensuspension, 30 μ L Probe). Daher wurden 2,5 %, 5 % und 10 % (v/v) MeOH bzw. DMSO zugesetzt. Überraschenderweise ist die Verträglichkeit gegenüber den beiden Lösungsmitteln äußerst unterschiedlich. Während bei MeOH bis zu 10 % (v/v) eingesetzt werden kann, ist bereits bei 2,5 % (v/v) DMSO eine relativ starke Wachstumsinhibierung zu erkennen (Abb. 19). Darüber hinaus scheint durch die Zugabe von MeOH ein sehr gleichmäßiges Wachstum der Bakterien zu erfolgen, welches anhand eines höheren Fluoreszenzintensitätsmaximums deutlich wird.

Zur Bestimmung der Detektionsgrenze wurde der Testorganismus mit einer Inokulumzellzahl von $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL direkt in der Mikrotiterplatte mit 10% (v/v) MeOH für 15 h bei 30°C inkubiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer, wurde von der Bakteriensuspension eine Verdünnungsreihe mit frischem Medium (mit 10 % (v/v) MeOH) hergestellt (unverdünnt, 1:1 – 1:4 – 1:8 – 1:16 – 1:32 – 1:64 – 1:128 – 1:256 – 1:512). Von jeder Verdünnung (jeweils 6 Replikate) wurde anschließend die Fluoreszenzintensität ermittelt (Abb. 20). Anhand der Abbildung wird deutlich, dass der lineare Bereich sich über fünf Verdünnungsschritte erstreckt. Erst ab einer Verdünnung von 1:64 ist die Detektionsgrenze erreicht, eine Unterscheidung zwischen der Fluoreszenzintensität des Mediums und der Bakterien ist nicht mehr möglich.

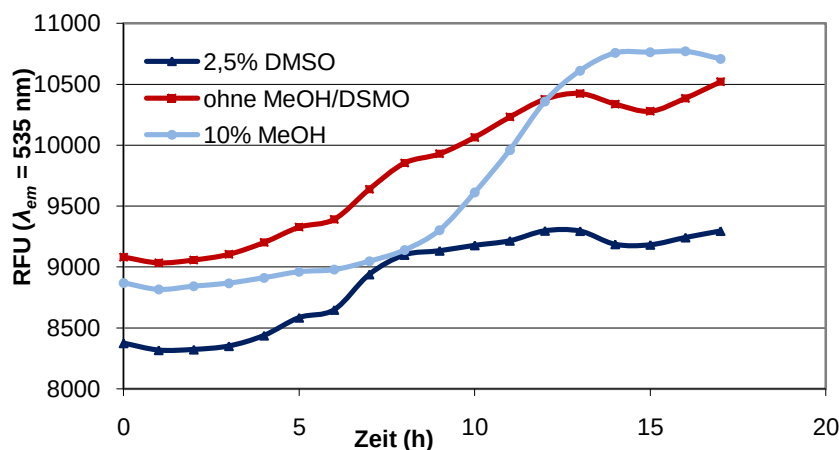


Abb. 19 Die Abbildung zeigt den Verlauf der Wachstumskurven bei einer Inokulum Zellzahl von $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL (Fluoreszenzdetektion $\lambda_{ex} = 510$ nm, $\lambda_{em} = 535$ nm) bei Zusatz von 2,5 % DMSO (v/v) und 10 % MeOH (v/v) bzw. ohne Lösungsmittelzusatz.

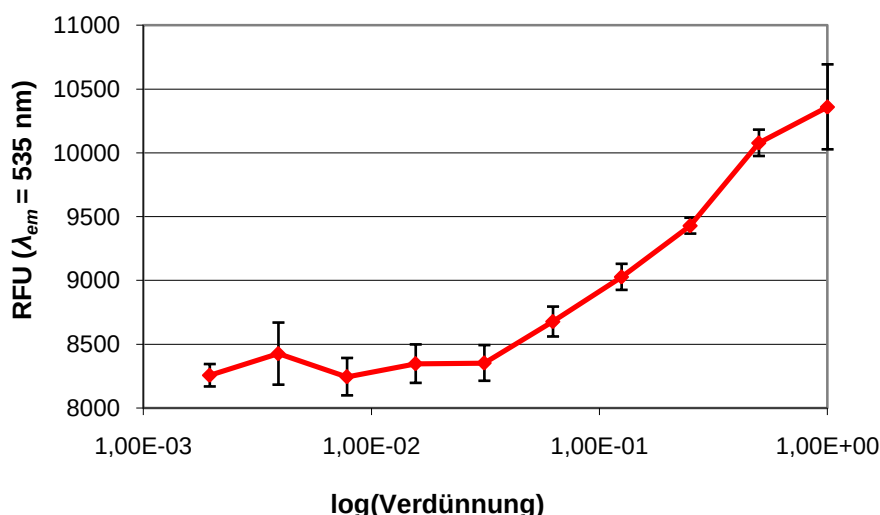


Abb. 20 Diese Abbildung zeigt den Verlauf (halblogarithmische Darstellung) der Fluoreszenzintensität ($\lambda_{ex} = 510$ nm, $\lambda_{em} = 535$ nm) bei schrittweiser Verdünnung der inkubierten Bakteriensuspension zur Bestimmung der Detektionsgrenze.

Um die Funktionalität des Biotests gewährleisten zu können, wurde eine Standardisierung mittels bekannter Antibiotika und Verifizierung mittels Trübungsdichtemessung durchgeführt. Als Referenzsubstanzen kamen das Makrolid-Antibiotikum Erythromycin (**5**) und Rifampicin als Vertreter der Ansamycine zum Einsatz. Um einen möglichst großen Bereich abzudecken wurden die folgenden Konzentrationen (im Well) eingesetzt: 0,001 – 0,01 – 0,025 – 0,050 – 0,075 – 0,10 – 1 $\mu\text{g/mL}$ in MeOH. Nach der Inkubationszeit wurden die prozentuale Wachstumshemmung in Bezug auf die Wachstumskontrolle (=K3) bei 10 % MeOH Volumenanteil ermittelt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit und um Verfälschungen zu vermeiden, wurden außerdem jeweils die Anfangswerte (RFU) zum Zeitpunkt $t = 0$ h von den Endwerten ($t = 15$ h) abgezogen. Die durchschnittliche relative Standardabweichung (CV) der RFU-Messwerte lag sowohl bei den Anfangswerten als auch bei den Endwerten bei ca. 3 – 4 % (Tabelle 7 und Tabelle 8).

Tabelle 7 Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse für Erythromycin (**5**) (Verstärkungsfaktor 45). Symbolerläuterungen: β – Massenkonzentration, t_0 und t_{15} – Zeitpunkt vor Inkubation (t_0) bzw. nach 15 h Inkubationszeit (t_{15}), CV – Variationskoeffizient, RFU – relative Fluoreszenzeinheiten.

β ($\mu\text{g/mL}$)	Mittelwert t_0 (RFU)	CV t_0 (%)	Mittelwert t_{15} (RFU)	CV t_{15} (%)	Δ RFU $t_{15} - t_0$	Wachstum (%)	Inhibierung (%)
K3	1168,1	3,9	1488,9	3,6	320,8	100	0
0,001	1173,5	0,4	1512,9	1,5	339,4	105,8	-5,8
0,010	1142,6	1,3	1420,7	2,3	339,4	105,8	-5,8
0,025	1129,9	3,8	1336,8	3,2	278,0	86,7	13,3
0,050	1262,0	2,8	1262,0	2,8	131,7	41,1	58,9
0,075	1077,1	3,3	1182,0	1,9	104,9	32,7	67,3
0,10	1100,8	1,1	1194,2	1,0	93,4	29,1	70,9
1,00	1122,8	0,2	1211,3	0,8	88,4	27,6	72,4

Tabelle 8 Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse für Rifampicin (Verstärkungsfaktor 45).

β ($\mu\text{g/mL}$)	Mittelwert t_0 (RFU)	CV t_0 (%)	Mittelwert t_{15} (RFU)	CV t_{15} (%)	Δ RFU $t_{15} - t_0$	Wachstum (%)	Inhibierung (%)
K3	1168,1	4,0	1488,9	3,6	320,8	100	0
0,001	1195,1	1,5	1507,3	3,9	312,2	97,3	2,7
0,010	1187,9	3,9	1370,3	2,2	182,4	56,9	43,1
0,025	1189,3	3,3	1310,3	4,7	120,9	37,7	62,3
0,050	1189,7	3,3	1282,0	3,0	92,3	28,8	71,2
0,075	1143,1	2,4	1225,6	1,8	82,5	25,7	74,3
0,10	1162,1	3,3	1249,7	2,7	87,5	27,3	72,7
1,00	1174,4	4,0	1264,3	1,8	90,0	28,0	72,0

Eine Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse erfolgte über die Ermittlung der prozentualen Wachstumsinhibierung mittels OD-Messung. In Abb. 21 sind die Ergebnisse der beiden Verfahren dargestellt. In beiden Fällen ist eine relativ gute Übereinstimmung der Wachstumsinhibierung zu erkennen. Es fällt jedoch auf, dass sowohl bei Rifampicin, aber auch verstärkt bei Erythromycin (**5**) die durch OD-Messung ermittelten Inhibierungen geringer sind als bei Fluoreszenzdetektion. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass mittels OD-Messung alle Zellen erfasst werden und somit ein höheres Wachstum (geringe Hemmung) vorgetäuscht wird. Im Gegensatz dazu werden mittels IYFP-Fluoreszenzmessung selektiv nur die vitalen Zellen erfasst. Weiterhin wird deutlich, dass die Schwankungen der Ergebnisse (siehe Fehlerbalken) bei Detektion mittels OD größer sind als bei Fluoreszenzmessung. Diese beiden Auffälligkeiten zeigen deutlich, dass mittels Fluoreszenzdetektion sowohl empfindlichere aber auch genauere Ergebnisse erhalten werden können.

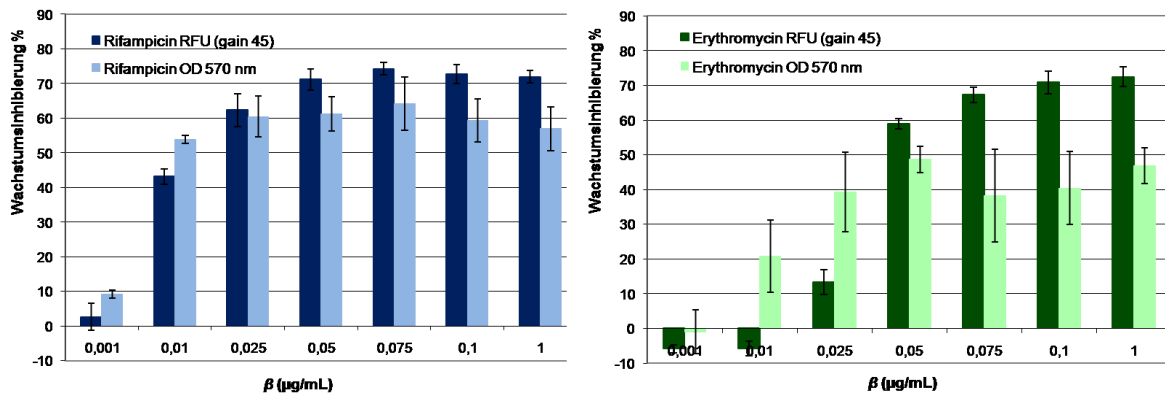


Abb. 21 Die Abbildung zeigt den Vergleich der mittels OD- und Fluoreszenzmessung erhaltenen Ergebnisse der konzentrationsabhängigen Inhibierung durch die Antibiotika Rifampicin (links) und Erythromycin (5) (rechts).

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit erfolgte die Bestimmung der Konzentration bei welcher 50 % Hemmung erreicht wird (IC_{50} -Werte). Da eine hohe Reproduzierbarkeit sowohl für hoch aktive Substanzen als auch für schwach aktive erforderlich ist, wurde dafür Rifampicin und das gegenüber *B. subtilis* schwach aktive Antibiotikum Amoxicillin (β -Lactam Antibiotikum) ausgewählt. In beiden Fällen wurden insgesamt neun verschiedene Konzentrationen eingesetzt: $10^3 \mu M$ – $10^2 \mu M$ – $10^1 \mu M$ – $10^0 \mu M$ – $10^{-1} \mu M$ – $10^{-2} \mu M$ – $10^{-3} \mu M$ – $10^{-4} \mu M$ – $10^{-5} \mu M$ in MeOH. Der sich daraus ergebende IC_{50} -Wert ist bei Rifampicin $0,68 \mu M$ und bei Amoxicillin $710 \mu M$. Die beiden IC_{50} Werte unterscheiden sich um den Faktor 100. Mit einem Abstand von 7 Tagen wurde die IC_{50} -Bestimmung wiederholt und lieferte vergleichbare Ergebnisse ($IC_{50}(\text{Rifampicin}) = 0,675 \mu M$ und $IC_{50}(\text{Amoxicillin}) = 710 \mu M$). Weiterhin wurde der IC_{50} -Wert von Erythromycin (5) bestimmt, der mit $0,47 \mu M$ ähnlich dem von Rifampicin ist.

Als letzten Schritt der Entwicklung eines antibakteriellen Biotests erfolgte die Übertragung des Testsystems auf Rohextrakte. Dafür wurde erneut eine Kinetikmessung basierend auf der Fluoreszenzintensität über die gesamte Wachstumszeit aufgenommen. Als Referenzsubstanz (Positivkontrolle) kam Erythromycin (5) zum Einsatz und als Rohextrakt wurde ein methanolischer Extrakt aus *Hygrophorus pustulatus* ausgewählt. Weiterhin wurde eine Kontrolle auf Eigenfluoreszenz des Extraktes (K1) und eine Wachstumskontrolle (Bakterien und Medium) sowie die Bezugskontrolle (Medium, Bakterien, 10 % (v/v) MeOH) mitgeführt. In Abb. 22 ist der Verlauf des bakteriellen Wachstums dargestellt. Sowohl im Fall des Antibiotikums Erythromycin (5) als auch bei dem Rohextrakt ist deutlich zu erkennen, dass das bakterielle Wachstum in Abhängigkeit von der Konzentration inhibiert wird. Beim Vergleich der Wachstumskurven in Abb. 22 fällt auf, dass im Falle des Erythromycins (5) (links) das Wachstum in Abhängigkeit von der Konzentration deutlich gehemmt wird, aber dennoch der Beginn der Exponentiellen Phase bei allen Konzentrationen gleich bleibt.

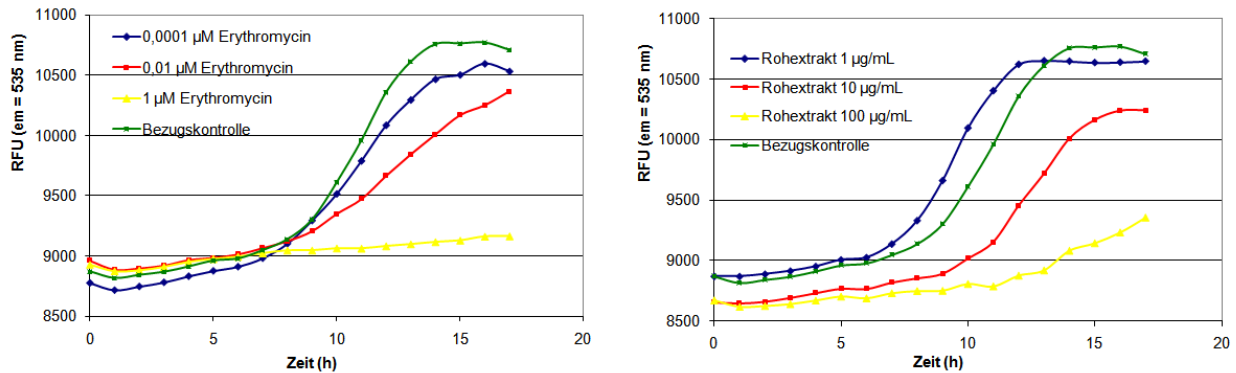


Abb. 22 Die Abbildung zeigt den Verlauf des bakteriellen Wachstums in Abhängigkeit von verschiedenen Konzentrationen der Referenzsubstanz Erythromycin (**5**) (links) und vom Rohextrakt (rechts). Die Fluoreszenzintensität (RFU) wurde bei dem Verstärkungsfaktor 60 ermittelt.

Im Gegensatz dazu wird bei dem Rohextrakt (rechts) der Beginn der Exponentiellen Phase in Abhängigkeit von der Konzentration verzögert. Dies könnte bedeuten, dass das Wachstum der Bakterienzellen durch die aktive(n) Substanz(en) im Rohextrakt verhindert wird und erst nach einer gewissen Zeit eine Adaption erfolgt ist. Der Vergleich der Ergebnisse der Referenzsubstanz und des Rohextraktes zeigen, dass es möglich ist, auch Rohextrakte und Fraktionen auf ihre antibakterielle Aktivität gegenüber *B. subtilis* (abrB-iyfp) zu testen.

4.2.2 Biologische Aktivität von *Hygrophorus*-Extrakten

Die Vertreter der Gattung *Hygrophorus* produzieren eine Vielzahl von biologisch aktiven Sekundärmetaboliten. Zur Erfassung des Aktivitätsprofils wurde die antibakterielle Wirkung von insgesamt 15 verschiedenen *Hygrophorus* spp. mit Hilfe des entwickelten Fluoreszenz-basierten Biotests ermittelt. Des Weiteren wurde der Einfluss des Extraktionsmittels (Polarität) und der Zustand (tiefgefroren, lyophilisiert, getrocknet) des Pilzmaterials auf die biologische Aktivität analysiert.

4.2.2.1 Antibakterielle Wirkung in Abhängigkeit vom Extraktionsmittel

Um den Einfluss des Extraktionsmittels auf die biologische Aktivität näher zu untersuchen, wurden sowohl *n*-Hexan-Extrakte als auch methanolische Extrakte (80 % und 100 % MeOH) auf ihre antibakterielle Wirkung hin untersucht. Die nachfolgende Abb. 23 zeigt die prozentuale Wachstumsinhibierung von *B. subtilis* (abrB-iyfp) durch Rohextrakte verschiedener *Hygrophorus* spp. sowie unterschiedlicher Polarität. Es ist deutlich zu erkennen, dass die antibakterielle Wirkung der 100 % MeOH-Extrakte (dunkelblau) bei *Hygrophorus chrysodon*, *H. agathosmus* und *H. latitabundus* (tiefgefroren) viel größer ist als bei den jeweiligen 80 % MeOH-Extrakten (hellblau).

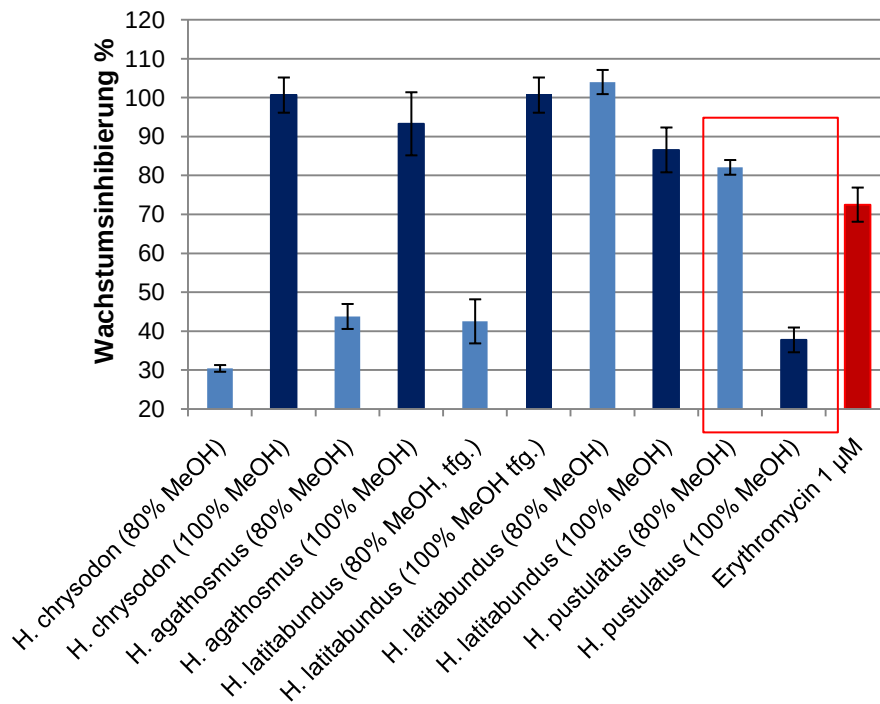


Abb. 23 Die Abbildung zeigt die antibakterielle Wirkung von Rohextrakten ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH im Well, $n = 3$, *H. pustulatus* $n = 6$) verschiedener *Hygrophorus* spp. sowie unterschiedlicher Polarität. Als Referenzsubstanz ist Erythromycin ($c = 1 \mu\text{M}$ in MeOH im Well) mit aufgeführt.

Entgegensätzlich verhalten sich die methanolischen Extrakte aus *H. latitabundus* (lyophilisiert) und *H. pustulatus* (ganz rechts). Während bei *H. latitabundus* (lyophil.) sowohl der 80 % MeOH-Extrakt als auch der 100 % MeOH eine sehr hohe Aktivität aufweisen, ist bei *H. pustulatus* der 80 % MeOH-Extrakt hoch aktiv und der 100 % MeOH-Extrakt lediglich schwach aktiv. Da die Extrakte alle unter gleichen Bedingungen mittels Extraktor (Methode C bei 80 % MeOH und Methode D1 bei 100 % MeOH) hergestellt wurden (Ausnahme *H. latitabundus* tiefgefroren = tfg.), ist dieser deutliche Unterschied im Vergleich zu den anderen Extrakten sehr ungewöhnlich. Um weitere Aussagen über den Einfluss des Extraktionsmittels treffen zu können, wurde die antibakterielle Wirkung sowohl von 100 % MeOH-Extrakten als auch von *n*-Hexan-Extrakten analysiert. Dafür wurden in Zusammenarbeit mit Kristin Mißbach (Diplomarbeit in Vorbereitung) insgesamt vier *Hygrophorus* spp. aus zwei Sektionen (Sek.) mittels Extraktionsmethode D2 extrahiert und auf ihre biologische Aktivität hin untersucht (Abb. 24). Zur Vermeidung bzw. Minimierung von Schwankungen zwischen den Extrakten wurden je drei Extraktionsreplikate hergestellt, welche jeweils mit drei technischen Replikaten analysiert wurden ($n = 9$).

Anhand der Abb. 24 ist zu erkennen, dass bei den Vertretern der Sektion Erubescens (links), *H. erubescens* und *H. russula*, jeweils die *n*-Hexan-Extrakte (hellblau) eine stärkere Wachstumsinhibierung induzieren als die jeweiligen MeOH-Extrakte. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, dass mit abnehmender Polarität des Extraktionsmittels die biologische Aktivität zunimmt. Der gleiche Effekt konnte auch bei den Extrakten aus *H. poetarum* und

H. pudorinus, als Vertreter der Sektion Pudorini (rechts), festgestellt werden. Der Unterschied zwischen den MeOH-Extrakten und *n*-Hexan-Extrakten ist in diesem Fall jedoch nicht so stark ausgeprägt wie zuvor.

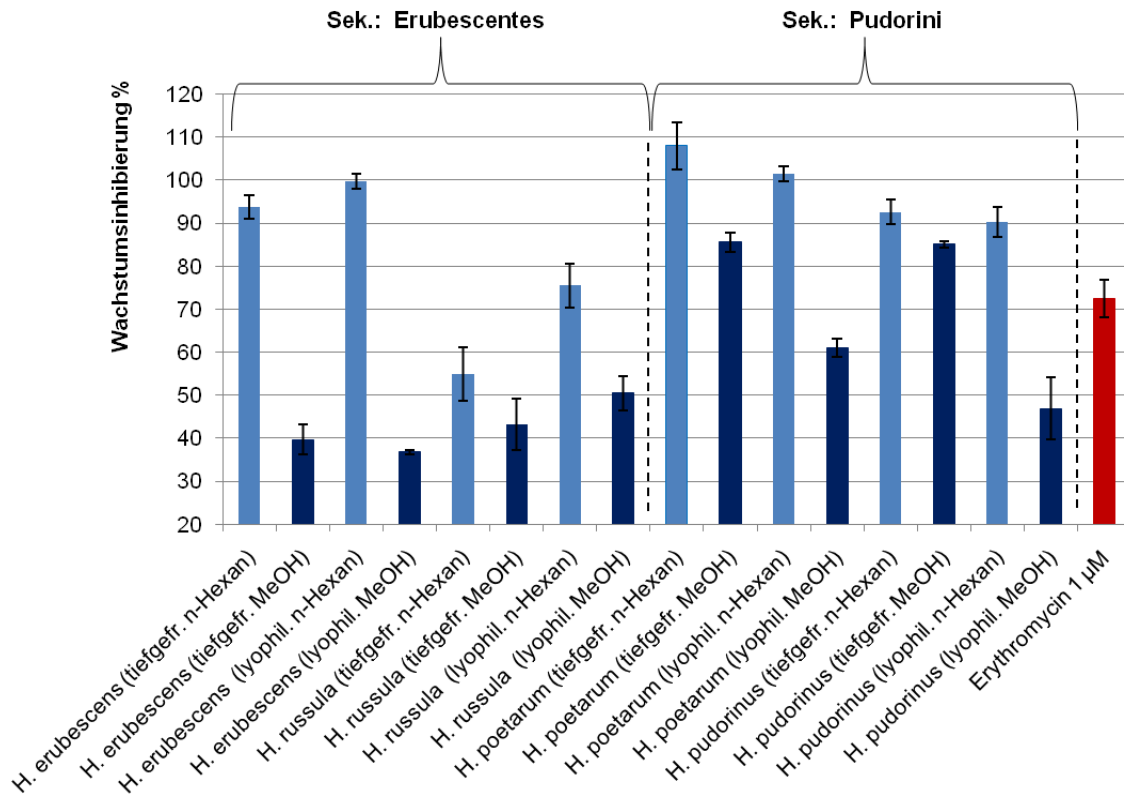


Abb. 24 Übersicht über die antibakterielle Aktivität von verschiedenen Rohextrakten ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ im Well in MeOH) der Spezies *H. erubescens*, *H. russula*, *H. poetarum* und *H. pudorinus* sowie von der Referenzsubstanz Erythromycin ($c = 1 \mu\text{M}$ in MeOH im Well).

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigen somit die Vermutung, dass das Extraktionsmittel einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität hat. Weiterhin kann geschlussfolgert werden, dass im Falle der Gattung *Hygrophorus* die antibakterielle Aktivität mit abnehmender Polarität des Extraktionsmittels zunimmt.

4.2.2.2 Antibakterielle Wirkung von lyophilisierten bzw. tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern

Neben dem Einfluss des Extraktionsmittels auf die antibakterielle Aktivität wurde außerdem geprüft, ob der Zustand des Pilzmaterials einen entscheidenden Einfluss auf die biologische Aktivität hat. Daher wurde ein umfassender Vergleich zwischen lyophilisiertem und tiefgefrorenem Pilzmaterial durchgeführt. Zum Einsatz kamen ebenfalls Extrakte der Spezies *H. erubescens*, *H. russula*, *H. poetarum* und *H. pudorinus*. Die Extraktion der lyophilisierten Pilzfruchtkörper erfolgte, wie zuvor dargestellt, mittels Extraktor ($n = 9$). Die Herstellung der Extrakte aus den tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern wurde in Anlehnung daran, mittels

Ultraschall unter Verwendung von *n*-Hexan und MeOH als Extraktionsmittel durchgeführt. Der Übersicht halber werden im Folgenden die MeOH- und *n*-Hexan-Extrakte getrennt behandelt. In Abb. 25 sind die antibakteriellen Wirkungen der MeOH-Extrakte gezeigt. Es fällt auf, dass die MeOH-Extrakte von *H. erubescens* und *H. russula* als Vertreter der Sektion *Erbubescentes* (links) insgesamt nur schwach bis mittelmäßig aktiv sind. Einen eindeutigen Unterschied zwischen den Extrakten aus lyophilisierten Pilzmaterial (dunkelblau) und tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern (hellblau) ist nicht zu erkennen. Es scheint, als wenn die Extrakte aus tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern eine leicht höhere Aktivität haben, aber aufgrund der relativ hohen Standardabweichungen kann keine eindeutige Aussage getroffen werden. Im Gegensatz dazu ist bei den Extrakten von *H. poetarum* und *H. pudorinus* (Sektion *Pudorini*) sehr deutlich zu sehen, dass die antibakterielle Aktivität bei Extrakten aus tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern größer ist (Abb. 25 rechts). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die aktivitätsrelevanten Metaboliten entweder durch das Lyophilisieren ganz oder teilweise zerstört werden oder dass diese aufgrund eines höheren Wasseranteils in tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern effizienter extrahiert werden können. Neben den MeOH-Extrakten wurde außerdem der Einfluss des Pilzmaterials bei den *n*-Hexan-Extrakten analysiert. In diesem Fall konnte jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen Extrakten aus lyophilisierten bzw. tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern festgestellt werden (Abb. 26). Daher wurde das Experiment um insgesamt vier Spezies der Sektionen *Discoidei*, *Olivaceoumbrini* und *Pudorini* erweitert, bei welchen die antibakterielle Wirkung von MeOH-Extrakten aus getrockneten (bei 40°C im Trockenschrank) und tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern analysiert wurde. Eine allgemeine Tendenz ist jedoch auch in diesem Fall nicht erkennbar. Vielmehr wurde beobachtet, dass es stark speziesabhängig ist. So zeigt zum Beispiel der MeOH-Extrakt aus getrockneten Pilzfruchtkörpern bei *H. agathosmus* mit $I = 88 \pm 4 \%$ Wachstumsinhibierung bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH eine deutlich höhere Aktivität als der Extrakt aus den tiefgefrorenen Fruchtkörpern ($I = 55 \pm 7 \%$). Im Gegensatz dazu ist bei *H. arbustivus* der Extrakt aus den tiefgefrorenen Fruchtkörpern eindeutig aktiver als aus getrockneten (tiefgefr.: $I = 75 \pm 12 \%$ und getrockn. $I = 43 \pm 4 \%$). Bei den Spezies *H. discoideus* und *H. nemoreus* ist dagegen kaum ein Unterschied erkennbar.

Die Schlussfolgerung ist daher, dass der Zustand des Pilzmaterials die antibakterielle Wirkung der Extrakte zwar beeinflussen kann, aber artspezifische Variationen relevanter sind.

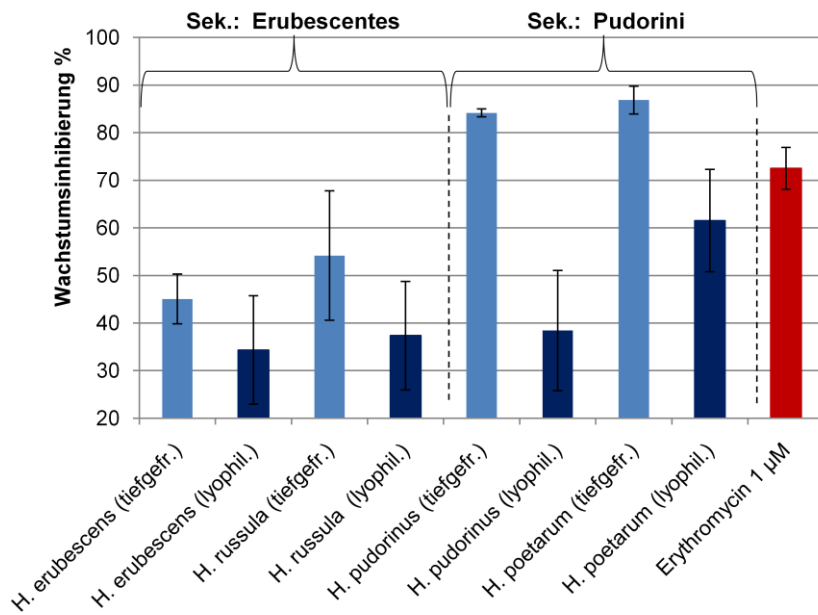


Abb. 25 Vergleich der antibakteriellen Wirkung von MeOH-Extrakten aus lyophilisierten und tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH im Well).

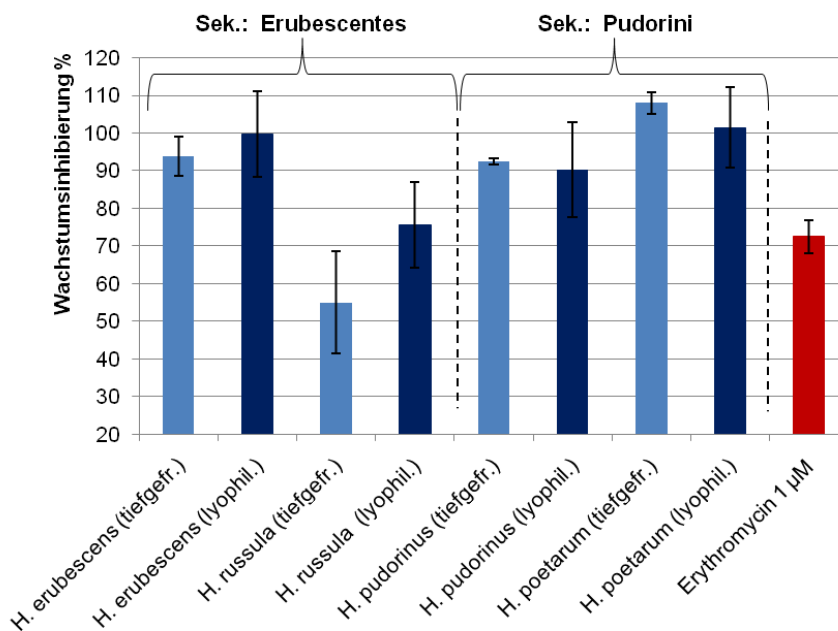


Abb. 26 Die Abbildung zeigt den Vergleich der antibakteriellen Wirkung von *n*-Hexan-Extrakten ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH im Well) verschiedener Spezies, sowie den Einfluss des Zustandes der Pilzfruchtkörper.

4.2.2.3 Antibakterielle Aktivität ausgewählter *Hygrospora*-Arten

Weiterhin erfolgte ein Screening von verschiedenen Extrakten unterschiedlicher *Hygrospora* spp. auf ihre antibakterielle Wirkung gegenüber *B. subtilis*. Die ermittelte biologische Aktivität ausgewählter Vertreter jeder Sektion ist in der nachfolgenden Abb. 27 dargestellt. Das biologische Aktivitätsprofil der Sektion Olivaceoumbrini ist in Abb. 27 A zu sehen. Aus dieser Sektion zeigt *H. latitabundus* die höchste antibakterielle Aktivität.

Bemerkenswert ist ebenfalls die Aktivität von *H. chrysodon* als Vertreter der Sektion Hygrophorus (Abb. 27 C links) und *H. poetarum* aus der Sektion Pudorini (Abb. 27 D). Die biologische Aktivität von *H. russula* und *H. erubescens* der Sektion Erubescentes (Abb. 27 C rechts) ist vergleichsweise gering. Insgesamt zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die Gattung *Hygrophorus* eine vielversprechende Quelle für biologische aktive Sekundärmetaboliten ist.

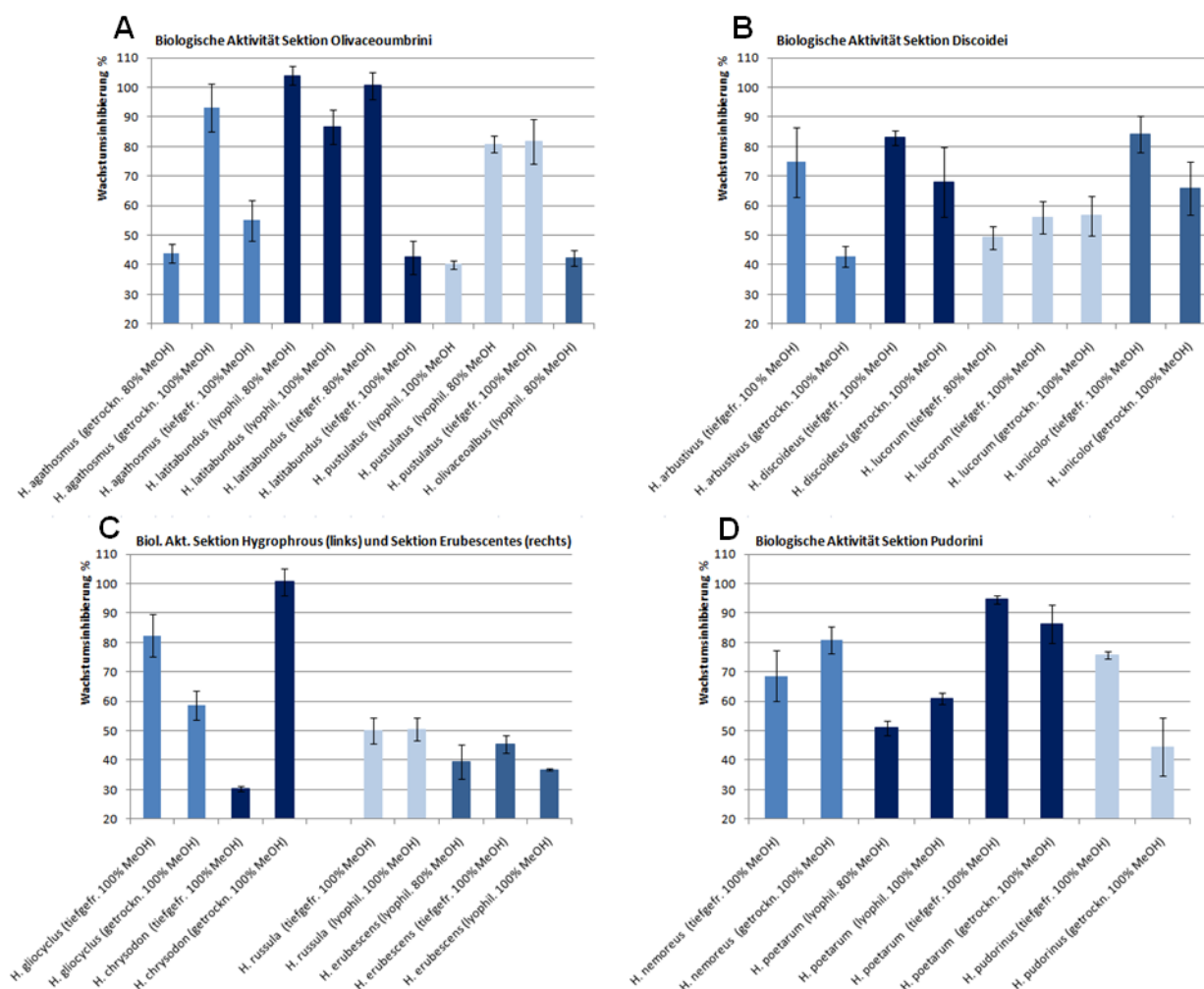


Abb. 27 Übersicht über die antibakterielle Aktivität verschiedener Extrakte ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH im Well) ausgewählter *Hygrophorus* spp. **A:** Biologische Aktivität Sektion Olivaceoumbrini **B:** Biologische Aktivität Sektion Discoidei **C:** Biologische Aktivität Sektion Hygrophorus (links) und Sektion Erubescentes (rechts) **D:** Biologische Aktivität Sektion Pudorini.

4.2.3 Biologische Aktivität von Hygrophoronen

Neben dem Screening von Rohextrakten aus *Hygrophorus* spp., wurden außerdem synthetisch erzeugte Hygrophorone und deren Derivate auf ihre biologische Aktivität gegenüber *B. subtilis* untersucht (Tobias Dräger, Dissertation in Vorbereitung). Es zeigte sich, dass diese das Wachstum von *B. subtilis* bereits in geringen Konzentrationen sehr stark inhibieren. Dabei scheint die Aktivität insbesondere durch die Anzahl der C-Atome der

Seitenkette beeinflusst zu werden. So ist die Aktivität bei einer Kettenlänge von C11 am größten, wohingegen Hygrophoron-Derivate mit einer kürzeren (C7) bzw. längeren (C14) Seitenkette eine geringere Aktivität aufweisen. Eine Übersicht über die getesteten Verbindungen sowie die erhaltenen Ergebnisse ist im Anhang in Tabelle a - 6, Seite 151 dargestellt.

4.3 Massenspektrometrie

Parallel zur Bestimmung der biologischen Aktivität, erfolgte außerdem eine Analyse der Naturstoffextrakte mittels LC-ESI-MS. Dies ermöglicht eine sehr sensitive Detektion der enthaltenen Substanzen (Metaboliten etc.), aber gleichzeitig auch die Erfassung eines großen dynamischen Bereiches. Durch die vorgeschaltete Flüssigkeitschromatographie (LC) wird außerdem eine Trennung der Naturstoffe entsprechend ihrer Polarität erreicht, wodurch Ionensuppressionseffekte minimiert werden können. Darüber hinaus ist es möglich ohne vorherige Derivatisierung ein breites Spektrum an unterschiedlichen Metaboliten zu analysieren.

4.3.1 Entwicklung einer automatisierten LC-MSⁿ Methode zur Analyse von komplexen Mischungen

Für die Analyse von Naturstoffen in komplexen Mischungen wurde eine LC-MSⁿ Methode etabliert, die eine automatische Fragmentierung ermöglicht. So konnten zusätzlich strukturelle Informationen erhalten werden, wodurch eine Identifizierung „vereinfacht“ wird. Da als Massenanalysator des MS-Systems eine Ionenfalle zum Einsatz kam, war es außerdem möglich, sequentielle MSⁿ Fragmentierungen durchzuführen und sogenannte Fragmentierungsbäume zu erstellen. Daher wurde eine „data dependent“ LC-MS³ Methode (DDIT – data dependent ion tree) entwickelt, welche eine automatische Fragmentierung der enthaltenen Metaboliten während der Analyse erlaubt. Die Detektion erfolgte dabei in einem m/z -Bereich von 100 – 1000 Da, sowohl bei positiver als auch bei negativer Ionisierung. Sofern die im MS¹ detektierten Metaboliten einen bestimmten Intensitätsschwellenwert (10^5 a.i.) überschritten, erfolgte die automatische Fragmentierung in einem MS²-Experiment. Dabei wurde pro Scan immer der intensivste Peak für die MS²-Analyse ausgewählt und nach fünf Scans der nächst intensivere Peak. Weiterhin wurden die daraus resultierenden Tochterionen ebenfalls fragmentiert (MS³), sofern deren eine Mindestintensität von $5 \cdot 10^3$ a.i. überschritten. Um zu vermeiden, dass immer dieselben Ionen fragmentiert werden, wurden die bereits analysierten Peaks zu einer zeitlich begrenzten Ausschlussliste hinzugefügt, wodurch für die nächsten 30 s keine wiederholte Fragmentierung erfolgte. Bei der Entwicklung der DDIT-LC-MS³ Methode wurde insbesondere darauf geachtet, dass für jeden LC-Peak ausreichend Scans erzielt wurden, um eine verlässlichen Quantifizierung bzw. Bestimmung der Intensität zu gewährleisten. Gleichzeitig war es aber auch erforderlich eine qualitativ hochwertige Fragmentierung zu erhalten. Daher wurde eine Optimierung der Einstellungen dahingehend durchgeführt, dass pro LC-Peak mindestens 15 - 20 Scans im MS-Modus und ca. 10 Scans im MS²-Modus für die weitere Datenanalyse zur Verfügung standen.

4.4 „Reverse Metabolomics“ – Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA)

Nachdem sowohl eine Extraktionsmethode für Pilzfruchtkörper, ein Biotest zur Erfassung der biologischen Aktivität, als auch eine DDIT-LC-ESI-MS³ Methode zur Detektion der enthaltenen Metaboliten etabliert wurde, war es erforderlich eine geeignete Methode zu entwickeln, welche die Identifizierung der bioaktiven Metaboliten in komplexen Mischungen erlaubt – „Reverse Metabolomics“: Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA).

„Reverse Metabolomics“ ist ein neuer Ansatz, welcher eine Kombination aus modernen Metabolomics-Methoden und klassischer Naturstoffisolierung darstellt. Der Begriff wurde erstmals und bisher einmalig im Rahmen einer Dissertation in einem anderen Zusammenhang („Functional Metabolomics“ in Bezug auf den veränderten Metabolismus von Prostata- und Neuroendokrinetumoren) erwähnt.⁽⁷⁹⁾ In der vorliegenden Arbeit wird „Reverse Metabolomics“ zur Identifizierung der aktivitätsrelevanten Metaboliten bzw. Metabolitencluster in komplexen Mischungen angewendet. Die *ab initio* Identifizierung wird durch eine direkte Korrelation der Metabolitenprofile (LC-MS) mit den Aktivitätsprofilen ermöglicht. Dies bietet den Vorteil, dass eine gezielte Isolierung und Identifizierung ausschließlich der aktivitätsrelevanten Metaboliten möglich ist. Im Gegensatz zur klassischen bzw. bioaktivitäts-geleiteten Naturstoffisolierung ist dieser Ansatz weniger zeitaufwendig, da die Isolierung und Aufreinigung in Hinblick auf den jeweiligen *m/z*-Wert und einer bekannten Retentionszeit *t_R* erfolgen kann. Da zusätzlich strukturelle Informationen erhalten werden, wird außerdem die Dereplikation minimiert. Einer der wesentlichen Vorteile ist jedoch die Möglichkeit, dass das jeweilige Metabolitenprofil nur einmal erfasst werden muss, aber dennoch mit einer Vielzahl von Aktivitätsprofilen aus verschiedenen Biotests korreliert werden kann. Dadurch ist es möglich, das vielversprechende Potential von Naturstoffextrakten in Hinblick auf biologisch aktive Verbindungen effektiver auszunutzen.

4.4.1 Prinzip

Der zuvor dargestellte „Reverse Metabolomics“ Ansatz basiert auf einer Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) zwischen verschiedenen Metabolitenprofilen und den jeweiligen (Bio-)Aktivitätsprofilen. Die Grundannahme hierbei ist, dass die Aktivität direkt proportional zu der Konzentration der aktiven Substanz ist und die Konzentration wiederum, direkt proportional zur Peakintensität ist. Daraus ergibt sich ebenfalls ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Aktivität und der Peakintensität, welcher für die Identifizierung der aktivitätsrelevanten Metaboliten zu Grunde gelegt wird (Abb. 28). In den meisten Fällen unterliegt dieser Korrelation aber weder ein linearer, noch ein einheitlicher Zusammenhang, wodurch die Analyse erschwert wird. Zudem müssen substanzspezifische Schwellwerte z.B. minimale Hemmkonzentration berücksichtigt werden.

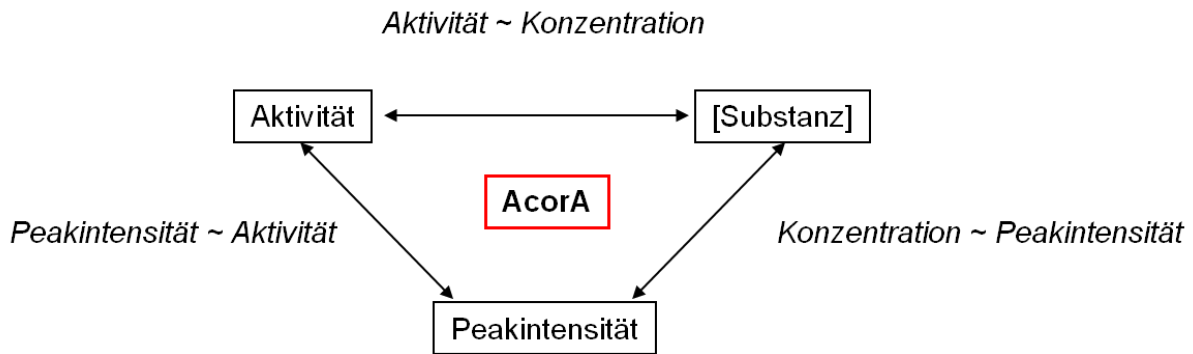


Abb. 28 Die Abbildung stellt die Grundannahme der Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) dar.

Da ein Extrakt aus vielen Einzelsubstanzen besteht und jede einzelne durch mehrere MS-Peaks repräsentiert wird, ist es erforderlich, eine Korrelation zwischen der Gesamtbioaktivität und jedem einzelnen Peak bzw. dessen Peakintensität aufzustellen. Dabei wird angenommen, dass die aktivitätsrelevanten Peaks die beste Korrelation aufweisen. Voraussetzung für die Korrelationsanalyse ist jedoch ein gewisses Maß an Variation, sowohl bei der biologischen Aktivität, als auch bei den Peakintensitäten der Metabolitenprofile. Dies kann erreicht werden, indem zum Beispiel Extrakte eng verwandter Spezies, unter der Annahme, dass diese ähnliche Metabolitenprofile aufweisen, eingesetzt werden. Sofern nur ein biologisch aktiver Rohextrakt zur Verfügung steht, kann die notwendige Variation und Vervielfältigung, durch Anwendung von verschiedenen Modifikationsmethoden erzeugt werden. Dadurch wird ein großer Satz leicht veränderter Extraktvarianten erhalten. Durch die leichte Veränderung des Metabolitenprofils wird eine Erhöhung bzw. eine Verringerung der relativen Konzentration der enthaltenen Verbindungen erreicht, was anhand einer veränderten Gesamtbioaktivität und Peakintensität deutlich wird. Mittels AcorA erfolgt dann ein Vergleich des „Verhaltens“ bzw. des tendenziellen Verlaufs der Bioaktivität und der Peakintensität über alle Metabolitenprofile. Da kein linearer Zusammenhang zwischen Bioaktivität und Konzentration und somit Peakintensität besteht, bildet die Spearman Rangkorrelationsanalyse die Grundlage von AcorA. Als Ergebnis wird eine Hitliste von Peaks (m/z , t_R , Korrelationskoeffizient, Peakintensität) erhalten, die eine statistisch signifikante Korrelation zu der Bioaktivität aufweisen. Um nachzuweisen, dass das Prinzip auch in der Praxis gültig ist und für die Identifizierung von aktivitätsrelevanten Metaboliten genutzt werden kann, wurde zu Beginn ein „Proof of concept“ Experiment durchgeführt, bei welchem artifizielle Extrakte und bekannte Antibiotika eingesetzt wurden (in Zusammenarbeit mit Mark Haid und André Gohr, Dissertationen in Vorbereitung).

4.4.2 „Proof of concept“ mit artifiziellen Extrakten

Für das „Proof of concept“ Experiment, wurden fünf artifizielle Extrakte (AE) aus 15 – 19 biologisch inaktiven Reinsubstanzen bekannter Konzentration hergestellt (AE1-AE5). Die Zusammensetzung der AE's, sowie die Konzentrationen der enthaltenen Verbindungen wurden dafür zufällig aus einem Pool von insgesamt 23 Primär- und Sekundärmetaboliten generiert (Anhang, Tabelle a - 5). Zur Simulation einer biologischen Aktivität (Wachstumsinhibierung) und der Variationserzeugung, erfolgte außerdem die Zugabe von biologisch aktiven Substanzen in Form von verschiedenen Antibiotikamischungen. Dafür wurden die Antibiotika Rifampicin ($IC_{50} = 6,8 \cdot 10^{-4}$ mM), Erythromycin ($IC_{50} = 4,7 \cdot 10^{-4}$ mM) und Amoxicillin ($IC_{50} = 7,1 \cdot 10^{-1}$ mM) aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirksamkeit gegenüber *B. subtilis* ausgewählt. Durch zufällige Kombination der Antibiotika in je drei Konzentrationen, sowie „0 mM“, konnten insgesamt 16 verschiedene Mischungen erzeugt werden (AB1-AB16). Aliquote der zuvor hergestellten AE's wurden nach dem Zufallsprinzip mit den Antibiotikamischungen versetzt, so dass für die weitere Datenanalyse insgesamt 16 verschiedene bioaktive Extraktvarianten und fünf inaktive AE's zur Verfügung standen (siehe auch Experimenteller Teil, Kapitel 5.5.1, Seite 115, Tabelle 30). Die Erfassung der Metabolitenprofile erfolgte mittels DDIT-LC-ESI-MS³ bei positiver Ionisierung und die Ermittlung des Aktivitätsprofils mit Hilfe des zuvor entwickelten Fluoreszenz-basierten Biotests mit *B. subtilis* als Testorganismus (Abb. 29). Das Ziel des Experimentes war die Identifizierung der bioaktiven Metaboliten mittels AcorA.

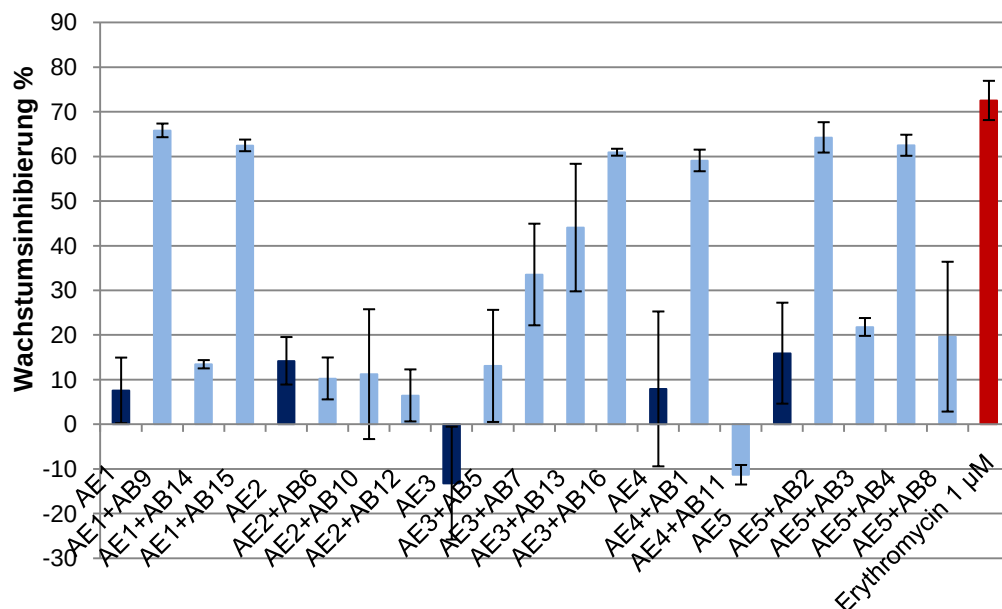


Abb. 29 Übersicht über die ermittelten Bioaktivitäten (Wachstumsinhibierung % von *B. subtilis*) der AE's versetzt mit den Antibiotikamischungen (AB) bei einer Konzentration von $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ im Well in MeOH. Die artifiziellen Extrakte ohne Antibiotika-Zusatz sind in dunkelblau dargestellt.

Nach der biologischen Testung und der LC-MS Analyse erfolgte die Vorverarbeitung der erhaltenen Rohdaten mittels XCMS. Nach dem Peakpicking und Alignment der AE-Rohdaten ($n = 63$) umfasste der Datensatz insgesamt 3475 Peaks in allen Messungen. Zusammen mit den Bioaktivitätsdaten wurde anschließend die Spearman Rangkorrelationsanalyse durchgeführt. Dabei erfolgte die Bestimmung der Signifikanzschwelle als zweiseitiger Signifikanztest ($\alpha = 5 \%$) mittels eines Permutationstests ($n = 1000$ Wiederholungen). Als Ergebnis der AcorA zeigten 228 Peaks eine signifikante, positive Korrelation zu der Bioaktivität (Korrelationskoeffizient $\geq 0,4282$) (Anhang, Tabelle a - 7). Bei näherer Betrachtung der Hitliste fällt auf, dass bestimmte t_R mehrfach wiederholt werden und vor allem Peakcluster, bestehend aus Isotopenpeaks, Fragmenten und Addukten, eine signifikante Korrelation zeigen. Anhand der m/z -Werte konnten die jeweiligen Peaks den zugesetzten Antibiotika zugeordnet werden. Ohne das chromatographische und massenspektrometrische Verhalten der Antibiotika zu kennen, war es daher möglich, mittels AcorA, sowohl die jeweiligen Rifampicin-Peaks, als auch die Erythromycin-Peaks zu identifizieren.

Es wurde außerdem festgestellt, dass sowohl mehrere Erythromycin- als auch Rifampicin-Derivate in den Antibiotikallösungen enthalten waren. Diese Tatsache ist jedoch nicht ungewöhnlich, da beide Substanzen biotechnologisch produziert werden und die Zusammensetzung in Abhängigkeit der Chargen variieren kann. Dadurch wurden bei Erythromycin zwei verschiedene Derivate bei den Retentionszeiten $t_{R1 \text{ Ery}} = \sim 2 \text{ min}$ & $t_{R2 \text{ Ery}} = \sim 9 \text{ min}$ identifiziert, bei welchen es sich um $[\text{Ery}+\text{H}]^+ m/z 734$ ($t_{R1 \text{ Ery}} = \sim 2 \text{ min}$) und $[\text{Ery}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+ m/z 716$ ($t_{R2 \text{ Ery}} = \sim 9 \text{ min}$) handelt. Bei Rifampicin konnten insgesamt drei Derivate bei $t_{R1 \text{ Rif}} = \sim 11 \text{ min}$, $t_{R2 \text{ Rif}} = \sim 13 \text{ min}$, $t_{R3 \text{ Rif}} = \sim 15 \text{ min}$ identifiziert werden. Die Hauptverbindung $[\text{Rif}+\text{H}]^+ m/z 823$ eluiert bei $t_{R2 \text{ Rif}} = \sim 13 \text{ min}$ und wird begleitet von zwei Nebenkomponten, die als $[\text{Rif}-\text{H}_2+\text{H}]^+ m/z 821$ ($t_{R1 \text{ Rif}} = \sim 11 \text{ min}$) und $[\text{Rif}+\text{O}+\text{H}]^+ m/z 839$ ($t_{R3 \text{ Rif}} = \sim 15 \text{ min}$) identifiziert werden konnten. Zur Bestätigung wurden die zugesetzten Antibiotika im Nachhinein mittels LC-MS^{2,3} analysiert. So konnte eine Verifizierung der Retentionszeiten und Fragmentierung erfolgen.

Es war jedoch nicht möglich eine Korrelation zu dem dritten Antibiotikum (Amoxicillin) aufzustellen, da Amoxicillin in der eingesetzten Konzentration keine Wirkung gegen *B. subtilis* zeigt. Die „Nicht-Identifizierung“ ist daher richtig.

Neben den Korrelationen zu den Antibiotika-Peaks, wurden zum Teil auch Korrelationen zu Verunreinigungen der Antibiotikallösungen d.h. Antibiotikaderivate und Nebenprodukte mittels AcorA gefunden. Da die jeweiligen Peaks der Derivate sich genauso verhalten wie die Hauptantibiotika-Peaks, können diese als „richtig positive Hits“ gesehen werden. Des Weiteren ist eine deutliche Korrelation zwischen der Bioaktivität und einem nicht identifiziertem Peakcluster bei einer $t_R = \sim 20 \text{ min}$ zu erkennen. Da dies in den

nachfolgenden Experimenten (siehe 4.4.3, S. 62) ebenfalls beobachtet wurde, kann dieses Peakcluster vermutlich auch den Antibiotika-Verunreinigungen zugeordnet werden. Es sind jedoch auch einzelne Peaks in der Hitliste enthalten, die keinen eindeutigen Zusammenhang zu den Antibiotika aufweisen und daher mit „not annotated (NA)“ gekennzeichnet wurden bzw. unter Sonstige geführt werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse, sowie deren Zuordnung ist in Tabelle 9 dargestellt. In der Übersicht ist jeweils die Anzahl der Peaks zu der entsprechenden t_R der Antibiotika aufgeführt, wobei eine Unterteilung in eindeutig und nicht eindeutig (z.B. NA) in Bezug auf den Zusammenhang zum Antibiotikum, vorgenommen wurde.

Tabelle 9 Übersicht über die jeweilige Anzahl der signifikant korrelierenden Hits und deren Zuordnung. Die Retentionszeit t_R des jeweiligen Hauptproduktes ist fett dargestellt.

Substanz	t_R Bereich* (min)	Zusammenhang zum Antibiotikum		Summe
		n (eindeutig)	n (nicht eindeutig)**	
Erythromycin	1,91-3,17	14	33	47
	9,78-9,89	6	0	6
Rifampicin	11,18-11,96	18	2	20
	13,15-13,96	59	36	95
	15,58-15,66	5	0	5
nicht identifiziertes Peakcluster	20,27-20,34	0	12	12
sonstige (NA)	-	0	43	43
				= 228

* innerhalb der artifiziellen Extrakte ** Peaks, die zu derselben t_R eluieren, aber deren Zusammenhang zum Antibiotikum nicht eindeutig geklärt ist.

Anhand der Ergebnisse ist deutlich zu erkennen, dass der „Reverse Metabolomics“-Ansatz auch in der Praxis anwendbar ist. Mittels AcorA war es möglich, die aktivitätsrelevanten Substanzen in einer Mischung zu identifizieren.

Darüber hinaus zeigen bei den „richtig positiven“ Hits jeweils ganze Peakcluster bestehend aus Isotopenpeaks, Addukten und Fragmenten/Derivaten eine signifikante Korrelation zu der Bioaktivität. Im Gegensatz dazu sind Peaks, die nur einmal, ohne Isotopenpeaks usw., in der Ergebnisliste auftauchen leicht als vermutlich „falsch Positive“ identifizierbar. Da manche Metaboliten aufgrund ihrer Struktur jedoch bevorzugt Addukte bilden oder bereits „In-Source-Fragmentierung“ zeigen und andere nicht, ist es nicht möglich Einzelpeaks als grundsätzlich „falsch positiv“ zu bewerten. Peakcluster hingegen können als Bestätigung der „richtig positiven“ Korrelation gesehen werden und sollten daher bei unbekannten Extraktinhaltsstoffen zur Beurteilung der Hitliste herangezogen werden.

4.4.3 „Proof of concept“ mit nativen Extrakten

Um zu Überprüfen ob das Konzept auch bei hochkomplexen Naturstoffextrakten angewendet werden kann, wurde das zuvor vorgestellte „Proof of concept“ Experiment ebenfalls mit antibakteriell inaktiven Rohextrakten durchgeführt. Dafür kamen insgesamt fünf unterschiedliche Extrakte aus verschiedenen *Hygrophorus* spp. zum Einsatz (Tabelle 10).

Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Extrakte, sowie deren native biologische Aktivität gegen *B. subtilis*.

Spezies	Extrakt	Wachstumshemmung* (%) $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$
<i>Hygrophorus lucorum</i> (E1)	80 % MeOH	25
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (E2)	80 % MeOH	8
<i>Hygrophorus agathosmus</i> (E3)	EtOAc	19
<i>Hygrophorus pustulatus</i> (E4)	100 % MeOH	17
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> (E5)	100 % MeOH	12

* $I \leq 25 - 30$ % unspezifisches Rauschen

4.4.3.1 Variationssimulation mittels zugesetzter Antibiotika

Zur Simulation einer biologischen Aktivität wurden einzelne Aliquote der Rohextrakte in gleicher Weise mit Antibiotika versetzt wie zuvor dargestellt. Die Erfassung der Metabolitenprofile erfolgte anschließend ebenfalls mit DDIT-LC-ESI-MS³ (jeweils drei Replikate in zufälliger Reihenfolge) bei positiver Ionisierung. Die entsprechenden biologischen Aktivitäten wurden parallel dazu mit Hilfe des antibakteriellen Biotests ermittelt (Abb. 30). Die Vorverarbeitung der Daten erfolgte ebenfalls mittels XCMS, jedoch nur mit einem Alignment und ohne Retentionszeitkorrektur. Die daraus hervorgegangene Peakmatrix umfasste insgesamt 5890 Peaks in allen Messungen ($n = 63$). Nach der AcorA zeigten davon 182 Peaks eine signifikante, positive Korrelation zu der Bioaktivität (Korrelationskoeffizient $\geq 0,4129$). Auch in diesem Fall ist deutlich zu erkennen, dass vor allem Peakcluster der aktivitätsrelevanten Verbindungen die Hitliste dominieren (Anhang, Tabelle a - 8). Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, dass als Cluster korrelierende Peaks „richtig positive“ Hits sind. Demnach war es also möglich, die Antibiotika auch in einer hochkomplexen Mischung ohne Aufreinigung zu identifizieren.

Eine Übersicht über die jeweilige Anzahl der Peaks, sowie deren Zuordnung ist in Tabelle 11 dargestellt. Ähnlich wie zuvor konnten sowohl bei Erythromycin, als auch bei Rifampicin mehrere Derivate bzw. Isomere identifiziert werden.

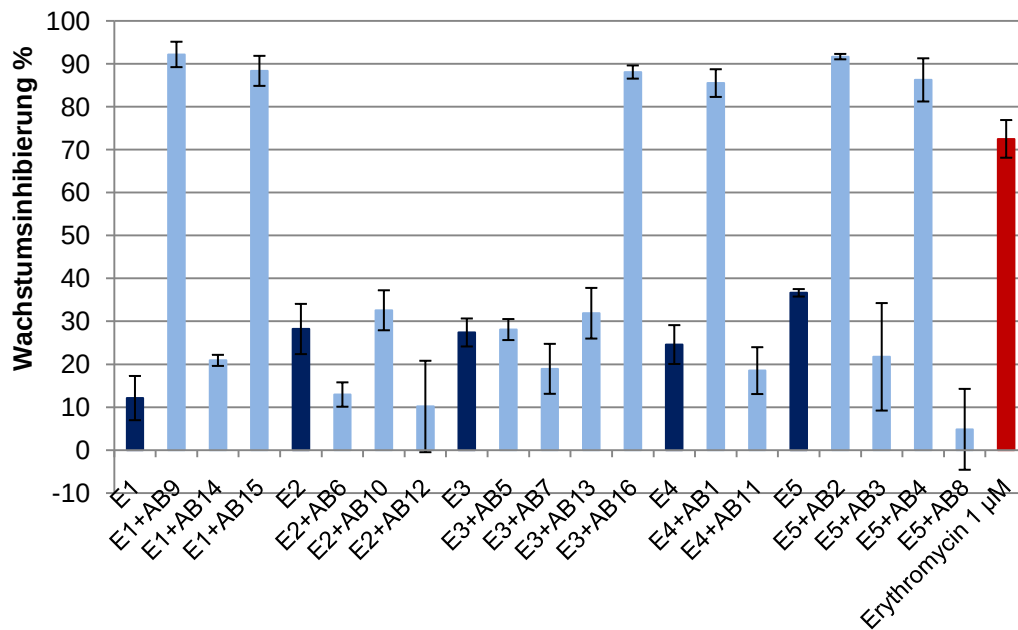


Abb. 30 Die Abbildung zeigt eine Übersicht der ermittelten Bioaktivitäten (Wachstumshemmung von *B. subtilis*) der mit Antibiotika versetzten Extrakte ($\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ im Well in MeOH). Die Extrakte ohne Antibiotika-Zusatz sind in dunkelblau dargestellt.

Tabelle 11 Übersicht über die Anzahl der signifikant korrelierenden Peaks, sowie deren Zuordnung. Die Retentionszeit t_R der Hauptverbindung ist fett dargestellt.

Substanz	t_R Bereich* (min)	Zusammenhang zum Antibiotikum		Summe
		n (eindeutig)	n (nicht eindeutig)**	
Erythromycin	1,72-2,41	13	64	77
	3,01-3,44	4	0	4
	7,66-7,68	2	0	2
	10,25-10,28	3	0	3
Rifampicin	11,90-11,97	8	0	8
	13,73-13,95	35	3	38
	15,41-15,70	3	0	3
nicht identifiziert	19,47-20,38	0	15	15
sonstige (NA)	-	0	32	32
				= 182

* innerhalb der Extrakte ** Peaks, die zu derselben t_R eluieren, aber deren Zusammenhang zum Antibiotikum nicht eindeutig geklärt ist.

Im Gegensatz zu dem „Proof of concept“ Experiment mit artifiziellen Extrakten, wurden insgesamt vier Erythromycin-Derivate identifiziert. Bei einer $t_{R1 \text{ Ery}} = \sim 2 \text{ min}$ und $t_{R2 \text{ Ery}} = \sim 3 \text{ min}$ handelt es sich vermutlich um Isomere, wobei ersteres bevorzugt Addukte bildet. So wurden bei der $t_{R1 \text{ Ery}} = \sim 2 \text{ min}$ hauptsächlich $[\text{Ery}+\text{NH}_4+\text{H}]^+ m/z 751,8$, und $[\text{Ery}+\text{K}]^+ m/z 772$ Addukte, sowie Fragmente nach Verlust von jeweils einer Zuckereinheit $[\text{Ery}-176+\text{H}]^+ m/z 558$ und $[\text{Ery}-157+\text{H}]^+ m/z 577$, detektiert (Anhang, Tabelle a - 8).

Wohingegen bei einer $t_{R2 \text{ Ery}} = \sim 3$ min das Antibiotikum fast ausschließlich als $[\text{Ery}+\text{H}]^+$ m/z 734 repräsentiert wird. Darüber hinaus zeigten zwei weitere Derivate bei $t_{R3 \text{ Ery}} = \sim 7$ min $[\text{Ery}-\text{O}+\text{H}]^+$ m/z 718 und $t_{R4 \text{ Ery}} = \sim 10$ min $[\text{Ery}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ m/z 716, eine signifikante Korrelation zu der biologischen Aktivität. Bei Rifampicin wurden auch in diesem Fall dieselben drei Derivate identifiziert wie zuvor ($t_{R1 \text{ Rif}} = \sim 11$ min $[\text{Rif}-\text{H}_2+\text{H}]^+$ m/z 821, $t_{R2 \text{ Rif}} = \sim 13$ min $[\text{Rif}+\text{H}]^+$ m/z 823, $t_{R3 \text{ Rif}} = \sim 15$ min $[\text{Rif}+\text{OH}+\text{H}]^+$ m/z 839). Interessanterweise, wurde bei diesem Experiment ebenfalls eine Korrelation zu dem Peakcluster $t_R = \sim 20$ min erhalten, was vermuten lässt, dass ein direkter Zusammenhang zu der Antibiotikamischung besteht. Wie erwartet, konnte zu dem dritten Antibiotikum Amoxicillin keine signifikante Korrelation aufgestellt werden, da die eingesetzten Konzentrationen nicht ausreichend sind, um das Wachstum von *B. subtilis* zu inhibieren. Ein Vergleich der Ergebnisse beider „Proof of concept“ Experimente ist in Abb. a - 1 (Anhang) dargestellt. Insgesamt wurden ca. 80 % der in der Peakmatrix (insgesamt 5892 Peaks) enthaltenen Antibiotika-Peaks (68/82) mittels AcorA als signifikant korrelierend identifiziert. Bei den aktivitätsrelevanten Peaks, die nicht gefunden wurden, handelt es sich hauptsächlich um Isotopenpeaks, die aufgrund zu geringer Intensität nur vereinzelt detektiert wurden oder um Peaks, die nur in ein oder zwei Extraktvarianten enthalten sind und für die somit keine signifikante Korrelation erhalten werden konnte. Dies zeigt, dass es unbedingt erforderlich ist, ausreichend Variation bei den Metabolitenprofilen, in Bezug auf Zusammensetzung und relative Konzentration der Extraktbestandteile, zu erzeugen. Denn je häufiger ein Metabolit, hier z.B. Rifampicin, in den Extraktvarianten vorkommt, desto sicherer kann die Korrelation bestimmt werden. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass dies einen Einfluss auf die Rangfolge der Hitliste hat. Bei diesem Experiment ist z.B. Rifampicin durch das Zufallsprinzip in fast allen Extraktvarianten enthalten. Im Vergleich zu Erythromycin wird die Hitliste von Rifampicin-Peaks dominiert. Die Rangfolge der Hitliste steht daher in keinem Zusammenhang zu der Stärke der Aktivität. Es erfolgt also mittels AcorA keine Unterscheidung zwischen hoch und schwach aktiven Substanzen, solange diese eine signifikante Korrelation zu der Bioaktivität aufweisen.

Die durchgeführten „Proof of concept“ Experimente zeigen, dass es durchaus möglich ist, die Korrelation zwischen der biologischen Aktivität und den aktiven Substanzen (Peakintensität) zur *ab initio* Identifizierung der aktivitätsrelevanten Metaboliten in komplexen Mischungen zu nutzen.

4.4.3.2 Variationserzeugung mittels verschiedener Modifikationsmethoden

Neben der Zugabe von verschiedenen Antibiotika-Mischungen zur Simulation der Verteilung, wurde die notwendige Variation außerdem mittels verschiedener Modifikationsmethoden erzeugt. Für die **Entwicklung von Modifikationsmethoden** wurden daher verschiedene physikalisch-chemische Techniken angewendet und deren Einfluss auf eine Änderung des

Metabolitenprofils analysiert. Als Ausgangsmaterial kamen jeweils 50 mg Aliquote eines MeOH-Extraktes aus *H. pustulatus* (46/03, lyophilisiert, Extraktionsmethode D1) zum Einsatz. Die Analyse der daraus resultierenden Metabolitenprofile erfolgte auf Grundlage der LC-MS-Daten bei positiver und negativer Ionisierung, sowie mittels Dünnschichtchromatographie (DC-System 7).

Modifikation durch Erhitzen

Um den Einfluss sowohl von trockener als auch feuchter Hitze auf das Metabolitenprofil auszutesten, wurden die getrockneten Extrakt-Aliquote (jeweils zwei Replikate) für 10 und 30 min einer Temperatur von 100°C (Trockenschrank) ausgesetzt. Da jedoch keine eindeutige Änderung der Extraktzusammensetzung erkennbar war, wurden die Extrakte in Wasser gelöst (suspendiert) und erneut der Einwirkung von Hitze unterzogen. Zusätzlich erfolgte eine Modifikation durch Hitze in einem Dampfautoklaven. Die Extrakt-Aliquote wurden hierfür ebenfalls in getrockneter sowie in gelöster Form für 20 min bei 121°C autoklaviert. In beiden Fällen, trockene und feuchte Hitze, konnte eine Änderung des Metabolitenprofils festgestellt werden, sofern die Extrakt-Aliquote zuvor gelöst wurden. Des Weiteren wurden die Extrakt-Aliquote für 15 min in MeOH zum Sieden (T = 68 °C) gebracht, wodurch eine deutlich sichtbare Änderung, speziell der unpolaren Bestandteile, des Extraktes herbeigeführt wurde (Abb. 31).

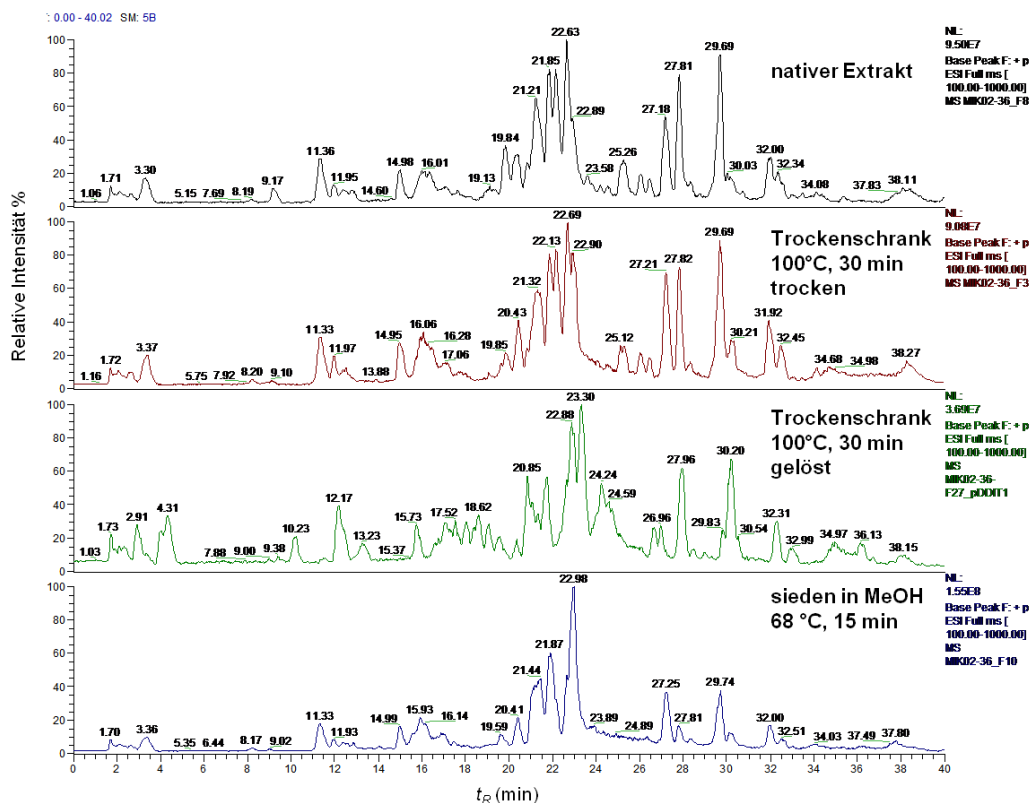


Abb. 31 Vergleich der LC-MS-Basispeak Chromatogramme (positive Ionisierung) des nativen Extraktes aus *H. pustulatus* nach der Modifikation durch Hitze.

Modifikation durch UV-Bestrahlung

Da von vielen Naturstoffen bekannt ist, dass diese durch UV-Licht zerstört oder chemisch verändert werden, erfolgte als weitere Modifikationsmethode die Bestrahlung der Extrakt-Aliquote mit Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm für 60 min. Es konnte jedoch keine Änderung des Metabolitenprofils detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass diese Modifikationsmethode für Extrakte aus *H. pustulatus* ungeeignet ist.

Modifikation durch Adsorption an Aktivkohle

Als weitere Modifikationsart wurde Aktivkohle eingesetzt, da je nach Art der Extraktinhaltsstoffe, diese mit unterschiedlicher Geschwindigkeit und Effizienz an das poröse Material adsorbiert werden. Dadurch kann sowohl eine quantitative als auch qualitative Änderung der Metaboliten erfolgen. Um den Einfluss der Aktivkohlemenge und die Einwirkzeit auf den Grad der Änderung beurteilen zu können, wurden 5, 50 und 500 mg Aktivkohle zu jeweils 50 mg Extrakt-Aliquoten, gelöst in 50 mL MeOH, zugesetzt. Der Adsorptionsvorgang erfolgte außerdem bei variabler Zeitdauer (1 – 5 – 10 min) unter stetigem Rühren. Während bei 5 mg Aktivkohle kein Unterschied zwischen 1 min und 10 min Einwirkzeit festgestellt werden konnte, ist ein deutlicher Einfluss durch die Menge der Aktivkohle feststellbar (Abb. 32). Dies ist beim Vergleich der Basispeak-Chromatogramme bei Zugabe von 50 mg und 500 mg Aktivkohle für 5 min zu sehen. Diese Art der Modifikation zur Variationserzeugung ist demnach sehr gut für „Reverse Metabolomics“ und AcorA geeignet.

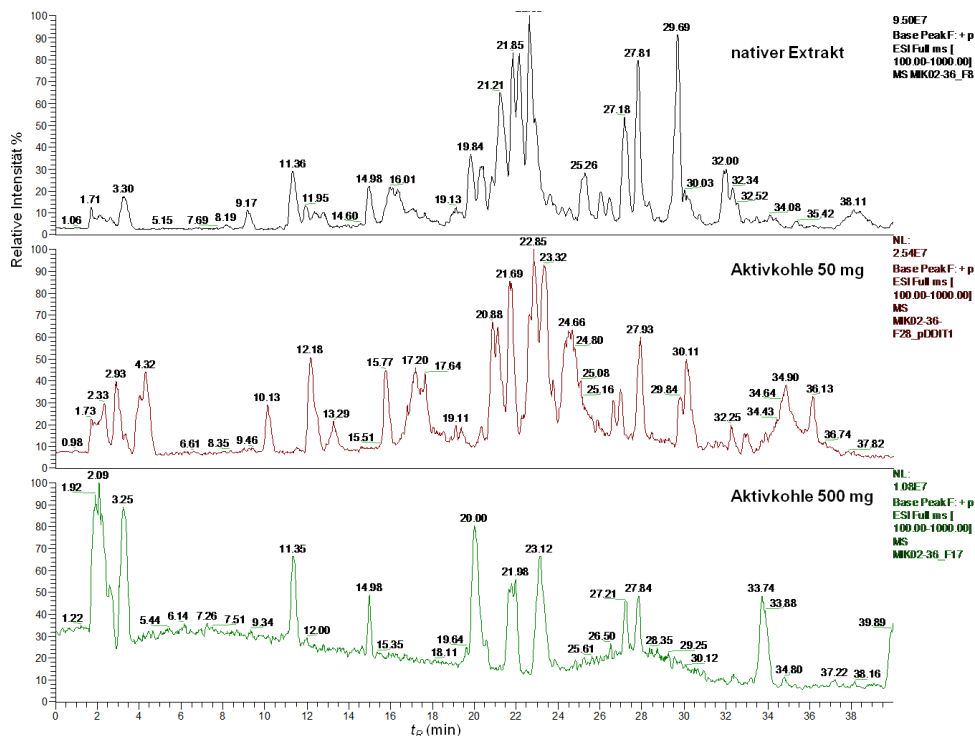


Abb. 32 Vergleich der LC-MS-Basispeak Chromatogramme (positive Ionisierung) des nativen Extraktes aus *H. pustulatus* und nach Modifikation für 5 min mit unterschiedlichen Mengen Aktivkohle.

Chemische Modifikation

Zusätzlich wurden zur Modifizierung der Metabolitenprofile chemische Methoden wie zum Beispiel Ozonolyse ausgetestet. Es zeigte sich jedoch, dass diese Modifikationsmethode zu radikal ist, da das Metabolitenprofil zu stark verändert wurde. Des Weiteren erfolgte eine Oxidation mit H₂O₂, welches allerdings keinen erkennbaren Einfluss hatte und somit für diese Extrakte ebenfalls nicht geeignet ist.

Modifikation durch chromatographische Verfahren

Zur weiteren Modifizierung von Extrakt-Aliquoten wurden außerdem verschiedene polymere Phasen wie zum Beispiel XAD-7HP (Acrylester) und Diaion-HP20 (Styrol-Divinylbenzol-Einheiten) eingesetzt. Die Elution erfolgte jeweils mit H₂O, MeOH und EtOAc, wodurch eine deutliche Änderung der Metabolitenprofile erreicht wurde. Allerdings erwies sich EtOAc aufgrund zu geringer Polarität als ungeeignet und wurde daher im Folgenden durch EtOAc/MeOH 1:1 (v/v) ersetzt. Des Weiteren kamen neben den polymeren Phasen, auch Ionenaustauschermaterialien zum Einsatz. Es wurde hier sowohl ein starker Anionenaustauscher (SAX), als auch ein starker Kationenaustauscher (SCX) verwendet. Die Elution erfolgte in beiden Fällen mit MeOH/H₂O 1:1 (v/v) und 100 % MeOH.

Die Analyse der Extraktvarianten hat gezeigt, dass die Modifizierung mittels chromatographischer Verfahren effizient und wirkungsvoll ist. Da jedoch die Gefahr besteht, dass die erzeugten Extraktvarianten zu wenige Ähnlichkeiten aufweisen, sollte keine stringente Trennung erfolgen. Das heißt die Metabolitenprofile der Fraktionen (Extraktvarianten) sollten auch nach der chromatographischen Trennung zumindest teilweise, qualitative Übereinstimmungen aufweisen.

Nach der Entwicklung von geeigneten Modifikationsmethoden, wurde ein weiteres „**Proof of concept**“ **Experiment** auf der Basis eines mit Antibiotika versetzten Rohextraktes durchgeführt, bei welchem die Variation durch verschiedene Modifikationen herbeigeführt wurde. Als Rohextrakt wurde dafür ein biologisch schwach aktiver MeOH-Extrakt aus *H. chrysodon* (Batsch.) Fr. (1883) (130/94, lyophilisiert, Extraktionsmethode D1) ausgewählt, welcher mit jeweils 10 µM Rifampicin und Erythromycin versetzt wurde. Anschließend erfolgte die Modifikation von Extrakt-Aliquoten unter Verwendung der zuvor entwickelten Modifikationsmethoden (Experimenteller Teil, Kapitel 5.5.2, Tabelle 32, Seite 119117). Für die weitere Analyse standen so insgesamt 18 Extraktvarianten zur Verfügung. Die Erfassung der jeweiligen Metabolitenprofile erfolgte mittels DDIT-LC-ESI-MS³ (Triplikate) bei positiver Ionisierung. Als biologische Aktivität wurde die antibakterielle Wirkung gegen *B. subtilis* bei einer Konzentration von $\beta = 10$ µg/mL ermittelt (Anhang, Tabelle a - 9). Da jedoch aufgrund zu starker Wachstumshemmungen keine ausreichende Variation der Aktivitäten erreicht werden konnte, wurden die biologischen Aktivitäten bei einer Konzentration von $\beta = 6,67$ µg/mL herangezogen. Das resultierende Aktivitätsprofil ist in Abb. 33 dargestellt.

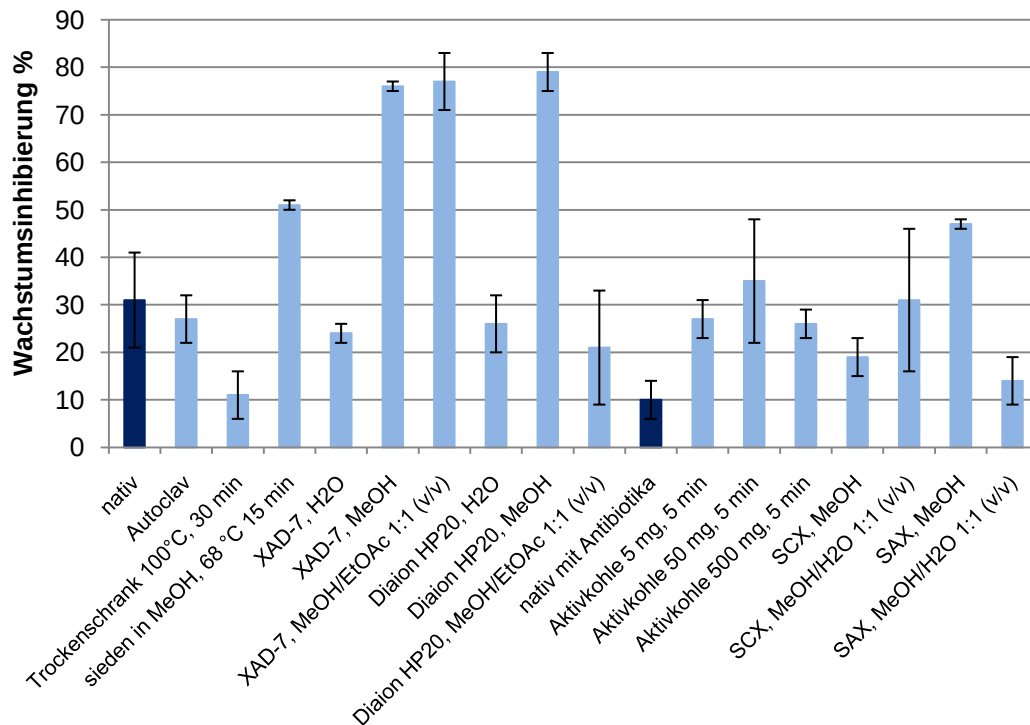


Abb. 33 Die Abbildung zeigt die ermittelten Bioaktivitäten gegen *B. subtilis*, der mit Antibiotika versetzt und modifizierten Extrakt-Aliquote bei einer Konzentration von $\beta = 6,67 \mu\text{g/mL}$ im Well in MeOH.

Nach der Vorverarbeitung wurde eine Peakmatrix mit insgesamt 3965 Peaks in allen Messungen erhalten, von diesen zeigten insgesamt 50 Peaks eine signifikante Korrelation zu der Bioaktivität (Korrelationskoeffizient $\geq 0,4502$). Bei näherer Betrachtung der Hitliste fällt auf, dass vor allem verschiedene Erythromycin-Peaks mittels AcorA identifiziert wurden (Tabelle a - 10). Insgesamt ist jedoch der Anteil der bekannten Antibiotika-Peaks im Vergleich zu den vorhergehenden Experimenten sehr gering. Es ist aber deutlich zu erkennen, dass eine signifikante Korrelation zu zwei unbekannten Peakclustern bestehend aus Molekülionenpeak und den dazugehörigen Isotopenpeaks aufgestellt wurde (Peakcluster 1 $t_{R1} = 16,9 \text{ min}$, m/z 360 & Peakcluster 2 $t_{R2} = 18,5 \text{ min}$, m/z 374), welche möglicherweise auf native, bioaktive Metaboliten zurückzuführen sind. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten war es jedoch nicht möglich eine signifikante Korrelation zu Rifampicin aufzustellen. Die einfachste Erklärung hierfür ist, dass die Rifampicin-Peaks nicht in der Datenmatrix enthalten sind, welches jedoch ausgeschlossen werden kann. Es wurde beim Überprüfen der Peakmatrix allerdings festgestellt, dass insgesamt weniger Antibiotika-Peaks enthalten sind, als zuvor. Diese Tatsache lässt sich vermutlich auf eine neue Charge an Antibiotika zurückführen, in welcher weniger Derivate enthalten sind. Es wurde außerdem festgestellt, dass die Hauptverbindung der Rifampicin-Lösung bei dieser Charge das dehydrierte Derivat darstellt. Eine geringere Anzahl an Antibiotika-Peaks ist jedoch keine Erklärung dafür, warum keine Rifampicin-Peaks in der Hitliste enthalten sind. Um die

Ursache hierfür zu finden, wurden zunächst die MS-Basispeak-Chromatogramme und die ermittelten Bioaktivitäten näher in Augenschein genommen (Anhang, Abb. a - 2). Bei näherer Betrachtung fiel auf, dass der native Extrakt (ohne Antibiotika) sowohl bei $\beta_{10} = 10 \mu\text{g/mL}$ Konzentration (nativ $I = 52 \pm 3 \%$, mit Antibiotika $I = 45 \pm 2 \%$), als auch bei $\beta_{6,67} = 6,67 \mu\text{g/mL}$ Konzentration (nativ $I = 31 \pm 4 \%$, mit Antibiotika $I = 10 \pm 4 \%$) eine höhere Aktivität aufweist, als mit Antibiotika-Zusatz (Anhang, Tabelle a - 9). Um fehlerhafte Testergebnisse ausschließen zu können, wurden von den Extrakten (nativ und mit Antibiotika) insgesamt zwei Biotest-Wiederholungen mit je drei Replikaten durchgeführt. Zusätzlich wurden die Bioaktivitäten der Antibiotika bei der entsprechenden Konzentration von $c_{\text{Well}} = 0,1 \mu\text{M}$ ermittelt (Abb. 34).

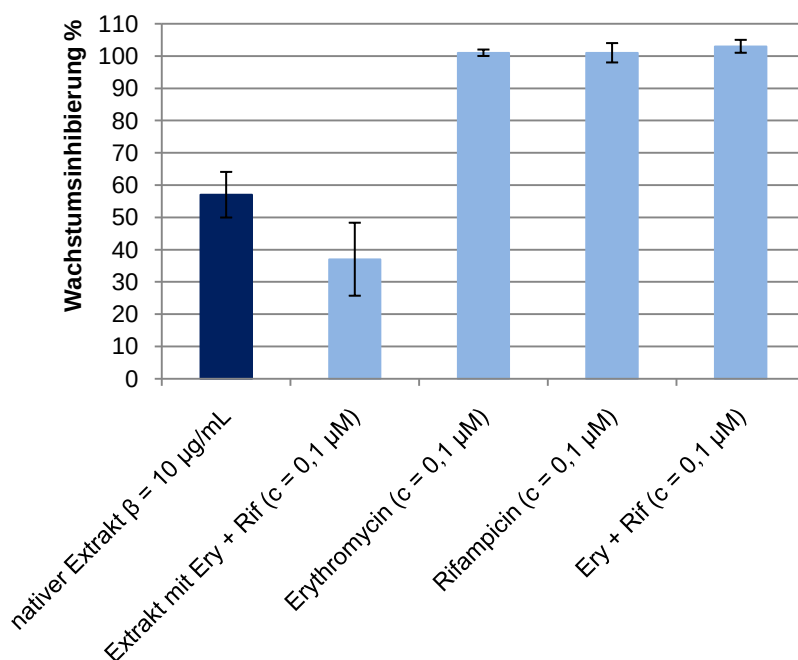


Abb. 34 Vergleich der biologischen Aktivitäten des nativen Extraktes bei $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ Konzentration ($n = 6$), mit Antibiotika Zusatz ($n = 6$), sowie die jeweiligen Aktivitäten der Antibiotika bei $c = 0,1 \mu\text{M}$ (jeweils $n = 3$) und in Kombination ($n = 3$).

Der Vergleich bestätigt die Beobachtung, dass keine signifikante Aktivitätssteigerung durch Zusatz der Antibiotika erfolgt, obwohl Erythromycin und Rifampicin ohne Extrakt, jeweils einzeln und in Kombination, das Wachstum zu 100 % inhibieren. Diese Tatsache lässt vermuten, dass bestimmte Extraktinhaltsstoffe die Wirkung der Antibiotika unterdrücken. Es handelt sich daher vermutlich um einen antagonistischen bzw. kompetitiven Effekt. Die Ursache hierfür könnte auch mit der Beobachtung im Zusammenhang stehen, dass in der Hitliste einige unbekannte Peakcluster enthalten sind, welche eventuell. auf native aktivitätsrelevante Metaboliten zurückzuführen sind. Es wäre denkbar, dass diese einen größeren bzw. eindeutigeren Zusammenhang zu der Bioaktivität aufweisen als die Rifampicin-Peaks.

Dieses Experiment zeigt allerdings, dass die relativen Konzentrationen der Extraktinhaltsstoffe durchaus mittels verschiedener Modifikationsmethoden verändert werden können, was sowohl in der Peakintensität deutlich wird, aber auch zu einer erhöhten oder verringerten Gesamtbioaktivität führt. Es ist demzufolge also möglich, die notwendige Variation für AcorA durch die entwickelten Modifikationsmethoden zu erzeugen.

Die vorgestellten „Proof of concept“ Experimente demonstrieren das Potential des „Reverse Metabolomics“ – Ansatzes. Sofern eine gewisse Variation vorhanden ist, ist also möglich über die „indirekte“ Korrelation zwischen der Bioaktivität und der Peakintensität die aktivitätsrelevanten Metaboliten in komplexen Mischungen zu identifizieren ohne diese vorher aufzureinigen.

4.4.4 Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten in biologisch aktiven Extrakten

Nachdem gezeigt wurde, dass die Grundannahme der AcorA – Methode auch in der Praxis angewendet werden kann, wurde die entwickelte LC-MS basierte Methode zur Identifizierung von nativen, aktivitätsrelevanten Metaboliten in biologisch aktiven Rohextrakten eingesetzt. Dafür kamen sowohl ein antibakteriell aktiver Rohextrakt zum Einsatz, welcher unter Anwendung von verschiedenen Techniken modifiziert wurde, als auch mehrere Extrakte aus verschiedenen *Hygrophorus* spp.

4.4.4.1 Anwendung der AcorA – Methode auf einen Methanol-Extrakt aus *Hygrophorus latitabundus*

Als Rohextrakt wurde dafür ein MeOH-Extrakt aus *H. latitabundus* Britz. (1899) (87/02, lyophilisiert, Extraktionsmethode D1) ausgewählt, da dieser innerhalb der Sektion Olivaceoumrini eine bemerkenswerte antibakterielle Aktivität gegen *B. subtilis* aufweist und somit eine vielversprechende Quelle für bioaktive Naturstoffe darstellt (Abb. 27 A). Für die Identifizierung der aktivitätsrelevanten Metaboliten mittels AcorA, wurden Aliquote des Rohextraktes verschiedenen Modifikationsmethoden unterzogen und anschließend auf ihre biologische Aktivität untersucht (Experimenteller Teil, Kapitel 5.5.3, Tabelle 33, Seite 120). Die Bestimmung der antibakteriellen Wirkung erfolgte sowohl bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$, $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ als auch $\beta = 1 \mu\text{g/mL}$ (nicht gezeigt). Die jeweiligen Aktivitätsprofile sind in Abb. 35 dargestellt. Weiterhin erfolgte die Erfassung der Metabolitenprofile mittels DDIT-LC-ESI-MS³.

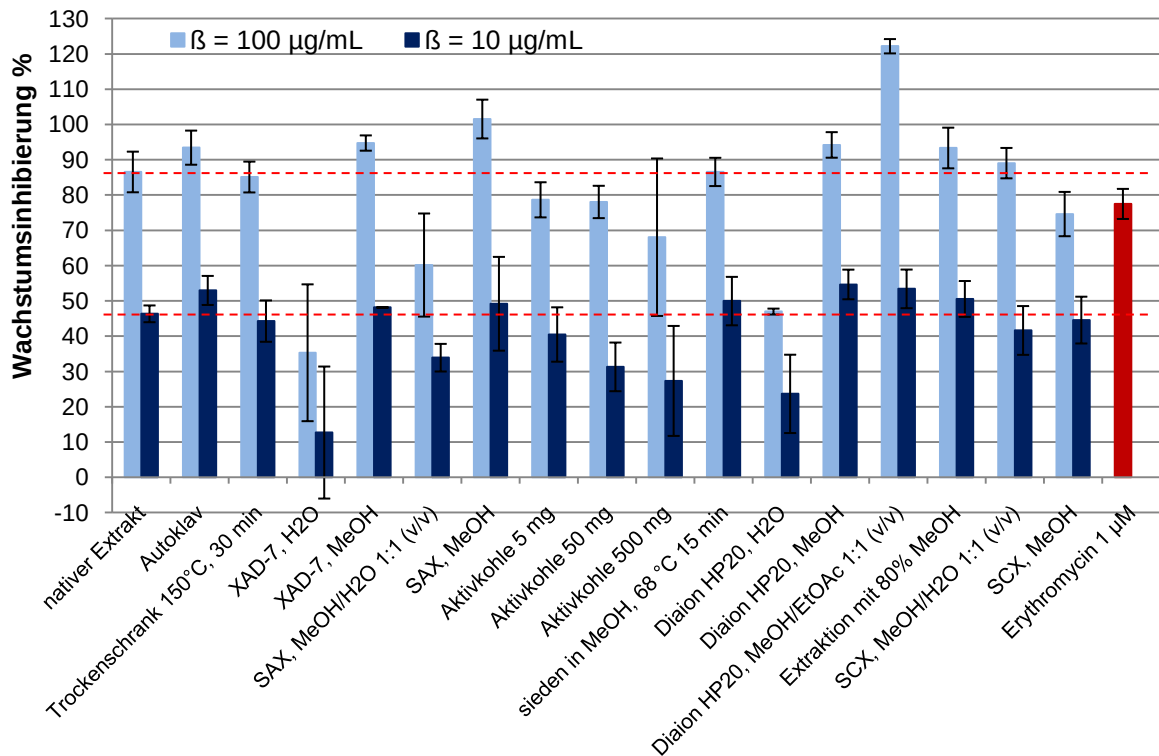


Abb. 35 Übersicht über die ermittelten biologischen Aktivitäten (Wachstumsinhibierung bei $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH (hellblau) und $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ in MeOH (dunkelblau)) der modifizierten Extrakt-Aliquote aus *H. latitabundus*. Die roten gestrichelten Linien kennzeichnen die biologische Aktivität des nativen Extraktes und dienen als Orientierungshilfe.

Als biologische Aktivität des nativen Extraktes wurde eine Wachstumsinhibierung von $I = 46 \pm 2 \%$ bei $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ und $I = 87 \pm 6 \%$ bei $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ ermittelt. Durch das Autoklavieren des, in Wasser gelösten Extraktes, ist bei beiden Konzentrationen eine leichte Erhöhung der Wachstumsinhibierung erkennbar. Im Gegensatz dazu ist die biologische Aktivität nach dem 30 minutigen Erhitzen im Trockenschrank jedoch kaum verändert. Dies wird auch anhand der jeweiligen Metabolitenprofile bei negativer Ionisierung deutlich (Anhang, Abb. a - 3). Während das Metabolitenprofil bei dem autoklavierten Extrakt-Aliquot eindeutige Änderungen aufweist, ist bei dem im Trockenschrank erhitzten kaum eine Veränderung sichtbar. Dies ist vermutlich auf die unterschiedlichen Temperaturen zurückzuführen. So wird beim Autoklavieren aufgrund der erhöhten Druckverhältnisse eine Temperatur von 121°C erreicht (bezogen auf das Autoklaviergut), wohingegen die Temperatur des Extrakt-Aliquoten im Trockenschrank geringer ist. Auffällig ist weiterhin, dass es zu einer deutlichen Aktivitätsabnahme nach Behandlung mit XAD-7 Material und Elution mit H₂O kommt. Der gleiche Effekt wurde auch bei Behandlung mit Diaion HP20 und H₂O. Wohingegen es bei Elution mit MeOH in beiden Fällen zu einer Erhöhung der Aktivität kommt. Besonders deutlich wird dies auch bei Elution mit MeOH/EtOAc 1:1 (v/v), Diaion HP20, aber auch bei Modifikation mittels SAX und Elution mit MeOH (Abb. 36). Eine

Abstufung der Aktivität ist auch bei Adsorption an unterschiedliche Mengen Aktivkohle feststellbar.

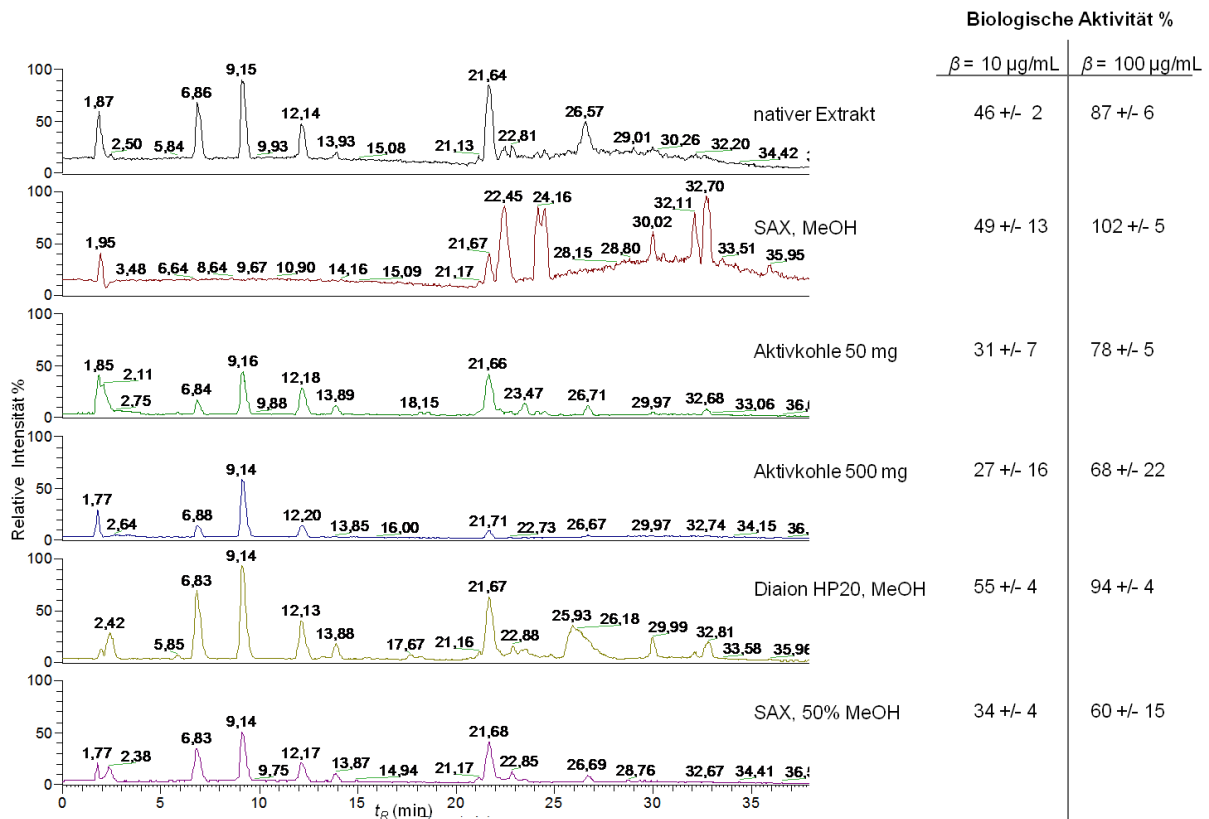


Abb. 36 Die Abbildung zeigt den Vergleich der Metabolitenprofile (LC-MS-Basispeak-Chromatogramme bei negativer Ionisierung) ausgewählter Extraktvarianten, sowie deren korrespondierende biologische Aktivität (Wachstumsinhibierung von *B. subtilis*) bei verschiedenen Konzentrationen.

Nach der Datenvorverarbeitung wurden in diesem Fall 2185 Peaks in allen Messungen erhalten (negative Ionisierung). Die Analyse mittels AcorA erfolgte anschließend auf dieser Basis in Kombination mit den biologischen Aktivitäten bei einer Konzentration von $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$. Insgesamt zeigten 238 Peaks eine signifikante, positive Korrelation zu der antibakteriellen Aktivität (Korrelationskoeffizient $\geq 0,4647$). Besonders auffällig an der Hitliste ist das Peakcluster an Position 2 und 3, welches auf einen Metaboliten mit der Masse $[M-H]^-$ m/z 311 ($t_R = 22,47$ min) und dessen ersten Isotopenpeak (m/z 312) zurückzuführen ist (Tabelle 12). Ein weiteres Peakcluster ist an Position 5 und 6 erkennbar - m/z 642 ($t_R = 27,76$ min) und m/z 643 1. Isotopenpeak. Wie vorherige Experimente gezeigt haben, deuten Korrelationen zu Peakclustern meist auf „richtig positive“ Hits hin. Daher wurde eine detailliertere Auswertung auf der Basis dieser Erkenntnis durchgeführt. Da die Peakcluster jedoch nicht zwangsläufig an aufeinanderfolgenden Positionen in der Hitliste vorkommen, wird eine leichtere Zuordnung durch Ordnen nach t_R erreicht. In diesem Fall konnte so ein weiteres Peakcluster identifiziert werden, welches auf einen Metaboliten mit der Masse

[M-H]⁺ m/z 313 (t_R = 24,37 min) und dessen ersten Isotopenpeak (m/z 314) zurückzuführen ist (Tabelle 12). Die vollständige Hitliste, sowie eine Übersicht über die Peakcluster ist in Tabelle a - 11 (Anhang) dargestellt.

Tabelle 12 Ausschnitt aus der Hitliste nach AcorA mit einem MeOH-Extrakt aus *H. latitabundus*.

Nr.	Korrelationskoeffizient	m/z	t_R (min)
1	0,8703	407,44	37,44
2	0,8020	312,14	22,47
3	0,7742	311,13	22,47
4	0,7581	405,50	36,79
5	0,7534	642,38	27,76
6	0,7511	643,36	27,76
...	...	...	...
48	0,6220	314,15	24,36
...	...	...	...
67	0,5975	313,16	24,38
...	...	...	...

Für einen weiteren Vergleich der oben aufgeführten Peakcluster wurden die jeweiligen Ionenchromatogramme (extracted ion chromatogram – EIC) näher in Augenschein genommen. Anhand der Abb. 37 ist zu sehen, dass sowohl der Metabolit m/z 311 als auch der Metabolit m/z 313 deutlich in dem nativen Rohextrakt enthalten sind. Das Peakcluster m/z 642/643 ist dagegen nur relativ schwach zu sehen. Dies könnte jedoch darauf hinweisen, dass der zugehörige Metabolit bereits in geringen Konzentrationen eine hohe Aktivität aufweist. Außerdem, wurde das EIC von dem ersten Hit m/z 407 analysiert (nicht gezeigt), es stellte sich hier jedoch heraus, dass dieser Peak in einer relativ geringen Konzentration in dem nativen Extrakt enthalten ist und darüber hinaus lediglich als Einzelpeak in der Hitliste auftaucht. Daher wurde das Hauptaugenmerk auf die Metaboliten m/z 311 und m/z 313 gelegt. Um die Korrelation zwischen der Peakintensität und der Aktivität zu verdeutlichen sind in Abb. 38 die „Verläufe“ der Peakintensitäten der Metaboliten m/z 311 (links) und m/z 313 (rechts) im Vergleich zu der Gesamtbioaktivität über alle Extraktvarianten dargestellt. In beiden Fällen ist deutlich zu sehen, dass sich die Metaboliten in Bezug auf die Veränderung durch die Modifikationen sehr ähnlich verhalten. So „sinkt“ die Peakintensität bei abnehmender Aktivität und „steigt“ bei zunehmender Aktivität. Weiterhin ist in beiden Fällen sehr auffällig, dass es zu einem drastischen Anstieg der Peakintensität bei einer Extraktvariante kommt, welche der Modifikation durch SAX und Elution mit MeOH

entspricht. Diese Extraktvariante ist ebenfalls zuvor durch eine stark erhöhte biologische Aktivität von $I = 102 \pm 5 \%$ ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$) aufgefallen. Außerdem wurde ebenfalls nach Modifikation mittels Diaion HP20 und Elution mit MeOH/EtOAc 1:1 (v/v) ein starker Anstieg der Aktivität beobachtet. Daraufhin wurden die entsprechenden Metabolitenprofile bei LC(-)ESI-MS näher analysiert und es ist deutlich zu erkennen, dass beide Metaboliten m/z 311 und m/z 313 jeweils zu einem relativ großen Anteil enthalten sind (Abb. a - 4).

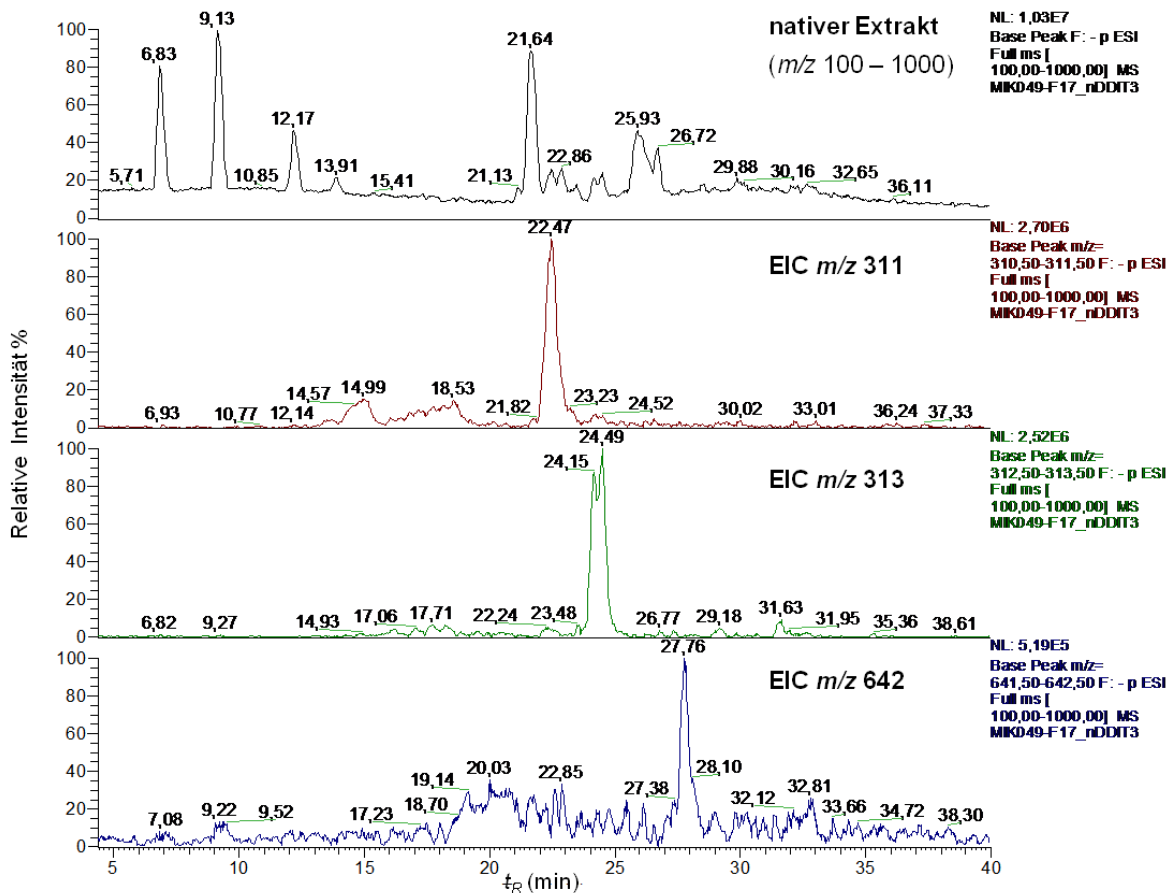


Abb. 37 Vergleich der extrahierten Ionenchromatogramme der Metaboliten m/z 311; 313 und 642, sowie das Basispeak-Chromatogramm des nativen Extraktes m/z 100 – 1000 bei negativer Ionisierung.

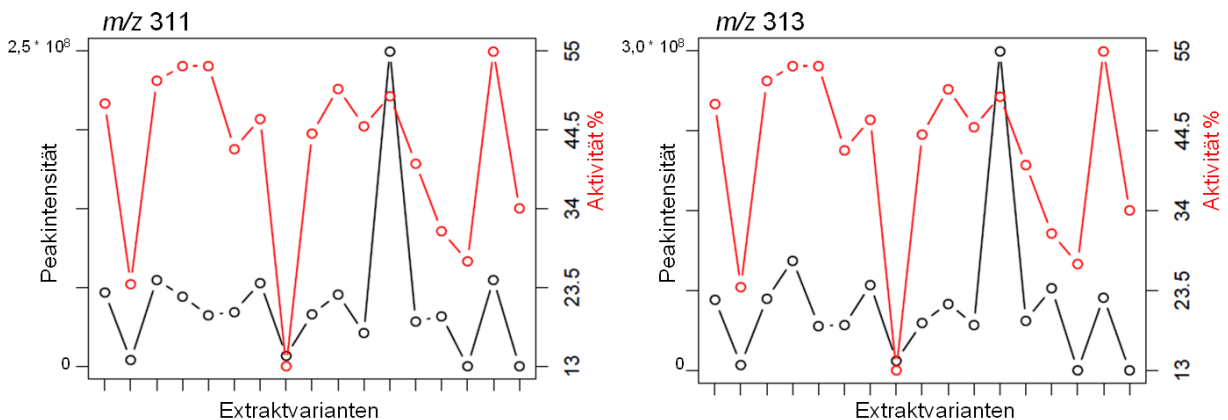


Abb. 38 Die Abbildung zeigt die Korrelation zwischen der Gesamtaktivität (rot) bei $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ und der Peakintensität (schwarz) der Metaboliten m/z 311 (links) und m/z 313 (rechts) über alle Extraktvarianten.

Eine weitere Analyse erfolgte auf der Basis der Metaboliten m/z 311 und m/z 313, bei welchen es sich vermutlich um ähnliche Verbindungen handelt. So wurden mittels FTICR-MS die exakten Massen bestimmt und die Summenformeln berechnet. Für den Metaboliten m/z 311 ergab dies $C_{18}H_{31}O_4^-$, sowie $C_{18}H_{33}O_4^-$ für den Metaboliten m/z 313. Da die Metabolitenprofile mittels DDIT-LC-MS³ erfasst wurden, war es außerdem möglich weitere strukturelle Informationen aus dem Fragmentierungsverhalten zu gewinnen. Bei beiden Metaboliten wird das MS²-Spektrum des jeweiligen $[M-H]^-$ von einem sehr starken Wasserverlust dominiert. Erst bei der Fragmentierung im MS³-Modus $[M-H]^- / [M-H-H_2O]^-$ entstehen weitere Fragmentationen (siehe später). Aufgrund dieses Verhaltens handelt es sich bei den Metaboliten vermutlich um oxidierte Fettsäuren. Um nachzuweisen, dass es sich tatsächlich um die aktivitätsrelevanten Metaboliten handelt, erfolgte die Isolierung und Verifizierung der biologischen Aktivität, sowie die Strukturaufklärung beider Verbindungen (Kapitel 4.5 Seite 78).

4.4.4.2 Anwendung der AcorA – Methode auf Methanol-Extrakte verschiedener *Hygrophorus*-Spezies

Eine andere Möglichkeit die für AcorA erforderliche Variation zu erhalten, ist die Verwendung von verschiedenen Spezies innerhalb einer Gattung. Unter der Voraussetzung, dass diese ähnliche, aber dennoch unterschiedliche Metabolitenprofile aufweisen, ist es möglich die natürliche Variation für die Identifizierung von biologischen aktiven Naturstoffen mittels AcorA zu nutzen. Zusätzlich ist es möglich, eine weitere Variation durch Modifikation der Extrakte, unterschiedliche Extraktionsmethoden oder auch durch den Biomassezustand wie zum Beispiel frisches oder getrocknetes Material einzuführen. Daher kamen in einem weiteren Experiment insgesamt neun verschiedene *Hygrophorus*-Spezies zum Einsatz (Tabelle 13).

Tabelle 13 Übersicht über die verwendeten *Hygrophorus*-Spezies, sowie deren Zuordnung zu einer Sektion.

Sektion	<i>Hygrophorus</i> -Spezies
Discoidei	<i>H. discoideus</i>
	<i>H. lucorum</i>
	<i>H. unicolor</i>
	<i>H. arbustivus</i>
Hygrophorus	<i>H. gliocyclus</i>
Olivaceoumbrini	<i>H. pustulatus</i>
	<i>H. agathosmus</i>
Pudorini	<i>H. poetarum</i>
	<i>H. nemoreus</i>

Von jeder Spezies wurden zum einen tiefgefrorene Fruchtkörper mittels Ultraschall mit MeOH extrahiert und zum anderen die Fruchtkörper bei 40°C getrocknet und anschließend mittels Extraktor mit MeOH extrahiert. So standen für die weitere Datenanalyse insgesamt 18 Extrakte zur Verfügung, welche jeweils auf ihre biologische Aktivität gegen *B. subtilis* untersucht wurden. Außerdem erfolgte die Analyse der Metabolitenprofile mittels DDIT-LC-ESI-MS³ und Datenvorverarbeitung mit XCMS.

Bei den meisten Spezies ist kein deutlicher Unterschied in der biologischen Aktivität bei tiefgefrorenen bzw. getrockneten Pilzfruchtkörpern zu erkennen (Abb. 39). Ausnahmen bilden hierbei die Spezies *H. arbustivus*, *H. gliocyclus* und *H. agathosmus*.

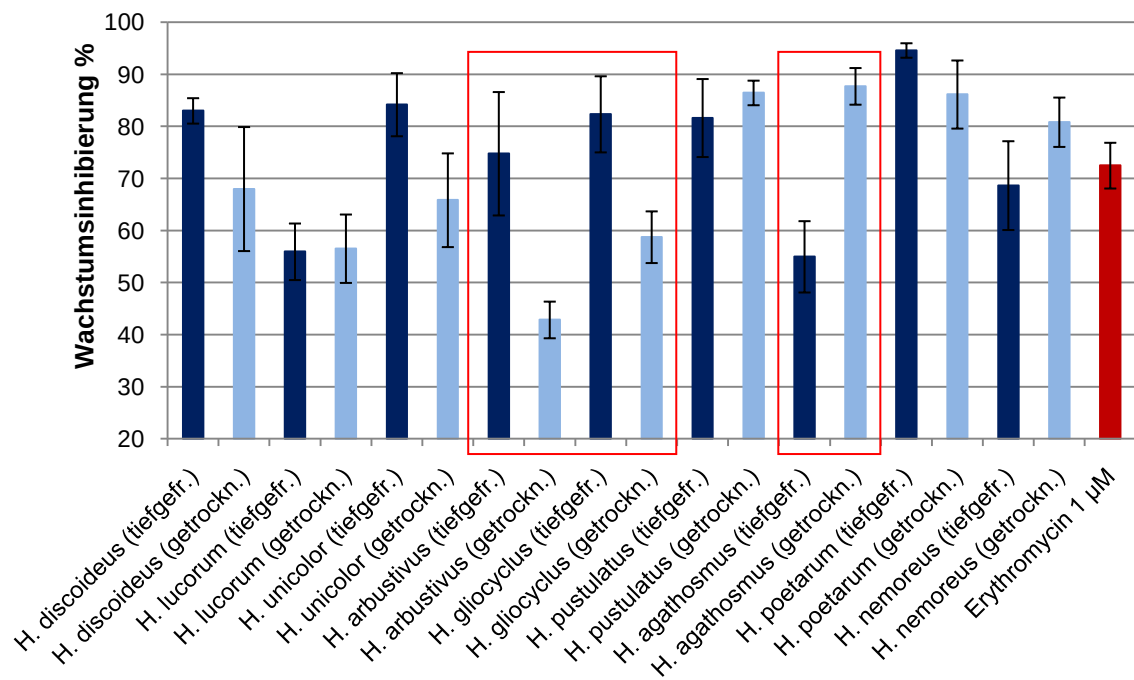


Abb. 39 Die Abbildung zeigt das ermittelte Aktivitätsprofil (prozentuale Wachstumshemmung von *B. subtilis*) der tiefgefrorenen und getrockneten (bei 40 °C im Trockenschrank) *Hygrospora* spp. bei einer Konzentration von $\beta_{well} = 100 \mu\text{g/mL}$ in MeOH.

Während bei *H. arbustivus* und *H. gliocyclus* jeweils die Extrakte aus tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern eine höhere antibakterielle Aktivität zeigen, ist bei *H. agathosmus* der Extrakt aus getrocknetem Material deutlich aktiver (Abb. 39 rote Rahmen). Dies bestätigt die Beobachtung, dass der Einfluss des Biomassezustands auf die biologische Aktivität artspezifisch ist. Parallel dazu wurde ein „manueller“ Vergleich zu den jeweiligen Metabolitenprofilen (negative Ionisierung) durchgeführt. So ist zum Beispiel bei dem Metabolitenprofil von *H. arbustivus* eine deutliche Änderung feststellbar. In diesem Fall sind, bei dem Metabolitenprofil aus dem getrockneten Pilzmaterial die Intensitäten der Peaks im t_R – Bereich 12 – 17 min deutlich erhöht. Eine ähnliche Feststellung wurde auch bei *H. agathosmus* gemacht, bei welchem eine deutliche Intensitätserhöhung des Peaks bei

$t_R \sim 12$ min und zu erkennen ist. Im Gegensatz dazu ist bei *H. gliocyclus* auf den ersten Blick kein direkter Unterschied sichtbar. Für die Identifizierung der signifikant korrelierenden Peaks wurde daher AcorA durchgeführt. Dafür wurde die alignierte Peakmatrix ($n = 3047$), sowie die biologischen Aktivitäten bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ zu Grunde gelegt. Als Ergebnis zeigten 146 Peaks eine signifikante Korrelation zu der antibakteriellen Wirkung (Korrelationskoeffizient $\geq 0,4468$). Die Auswertung der Hitliste wurde ebenfalls basierend auf Peakclustern durchgeführt (Anhang, Tabelle a - 12). Dabei fiel auf, dass der Metabolit m/z 311 ($t_R = 22$ min) auch in diesem Fall eine deutliche Korrelation zu der Bioaktivität aufweist (Position 28). Ähnlich wie zuvor wird dieser Metabolit als Peakcluster bestehend aus dem 1. Isotopenpeak m/z 312 und einem Fragment m/z 113 repräsentiert (Abb. 40). Darüber hinaus wurde ein weiteres Peakcluster identifiziert, welches auf einen Metaboliten mit der Masse m/z 341 ($t_R = 27$ min, $[\text{M-H}]^- \text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{O}_5^-$), den 1. Isotopenpeak m/z 342, sowie ein Fragment mit der Masse m/z 265 und 1. Isotop m/z 266 zurückzuführen ist (Abb. 40). Bei einem Vergleich mit der Hitliste aus dem vorherigen Experiment (Modifikation von Extrakt-Aliquoten aus *H. latitabundus*, Kapitel 4.4.4.1) stellte sich heraus, dass dieser bereits zuvor eine signifikante Korrelation aufwies, allerdings nur als Einzelpeak in der Hitliste auftrat (Position 86, Tabelle a - 11, Anhang). Eine Korrelation zu den Isotopenpeaks konnte zuvor nicht aufgestellt werden, da diese vermutlich aufgrund zu geringer Intensität nicht in der alignierten Peakmatrix enthalten sind.

Des Weiteren sind einige andere Peakcluster in der Hitliste enthalten (Tabelle a - 12, Anhang). Auffällig ist allerdings, dass diese hauptsächlich auf Metaboliten mit hohen Massen (> 500 Da) zurückzuführen sind. Da die Metaboliten m/z 311 und m/z 341 in beiden Experimenten eine signifikante Korrelation aufwiesen, wurde das Hauptaugenmerk zunächst jedoch auf diese gerichtet.

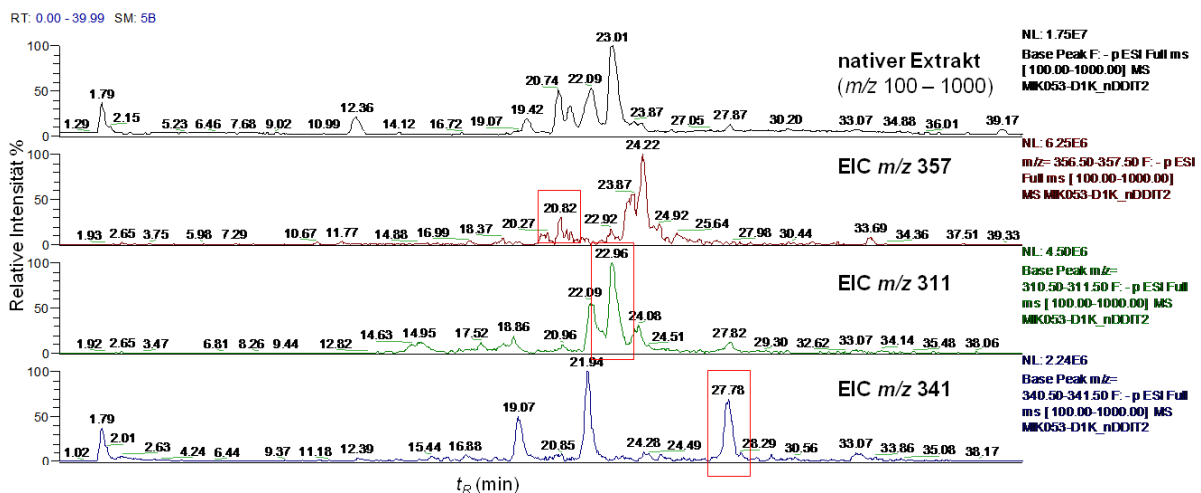


Abb. 40 Vergleich der LC-MS-Basispeak Chromatogramme des Extraktes aus tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern von *H. poeitarum* (negative Ionisierung), sowie die jeweiligen EIC ausgewählter Hits. Die roten Rahmen verdeutlichen um welche spezifischen Peaks es sich handelt.

4.5 Isolierung und Strukturaufklärung der aktivitätsrelevanten Verbindung

Da bereits erste Vorkenntnisse über das chromatographische Verhalten der aktivitätsrelevanten Verbindungen aus den Modifikationen gewonnen werden konnten, erfolgte die Isolierung der Verbindungen mit den $[M-H]^-$ m/z 311 und m/z 313 in Anlehnung daran. Im Falle der Metaboliten m/z 311 und m/z 313 hat sich gezeigt, dass sowohl SAX, Elution mit MeOH, als auch Diaion HP20, Elution mit MeOH/EtOAc 1:1 (v/v) gut geeignet sind (Anhang, Abb. a - 4). Da eine Aufreinigung mittels SAX allerdings nicht ohne weiteres bei größeren Mengen angewendet werden kann, wurde der gewonnene Rohextrakt (ca. 5 g) zu Beginn mittels Diaion HP20 (SC1) grob fraktioniert. Um die Korrelation zu der antibakteriellen Aktivität zu verdeutlichen, erfolgte zunächst eine Anreicherung der beiden Metaboliten in einer Fraktion. Dafür wurde der Rohextrakt nach der Vortrennung an Diaion HP20 und Elution mit MeOH/EtOAc 1:1 (v/v), mittels wiederholter präparativer und analytischer HPLC (präp. HPLC: Säule 5 RP18, Gradient 1 und 2 MeOH/H₂O, anal. HPLC: Säule 4 RP18, Gradient 3 MeCN/H₂O), nachfolgender Größenausschlusschromatographie (SC2), sowie Trennung an Kieselgel (SC4) vorgereinigt. Die so erhaltene, angereicherte Fraktion wurde schließlich mittels analytischer HPLC (Säule 4 RP18, Gradient 1 MeCN/H₂O) getrennt und die daraus resultierenden Sub-Fractionen auf ihre biologische Aktivität getestet. Anhand der Abb. 41 ist deutlich zu sehen, dass ausschließlich die Peaks der gesuchten Verbindungen (in Rot Peak 2 und Peak 4) das Wachstum von *B. subtilis* inhibieren. Bei Peak 1 und Peak 3 handelt es sich vermutlich um weitere Fettsäuren, die jedoch keine Aktivität gegen *B. subtilis* aufweisen.

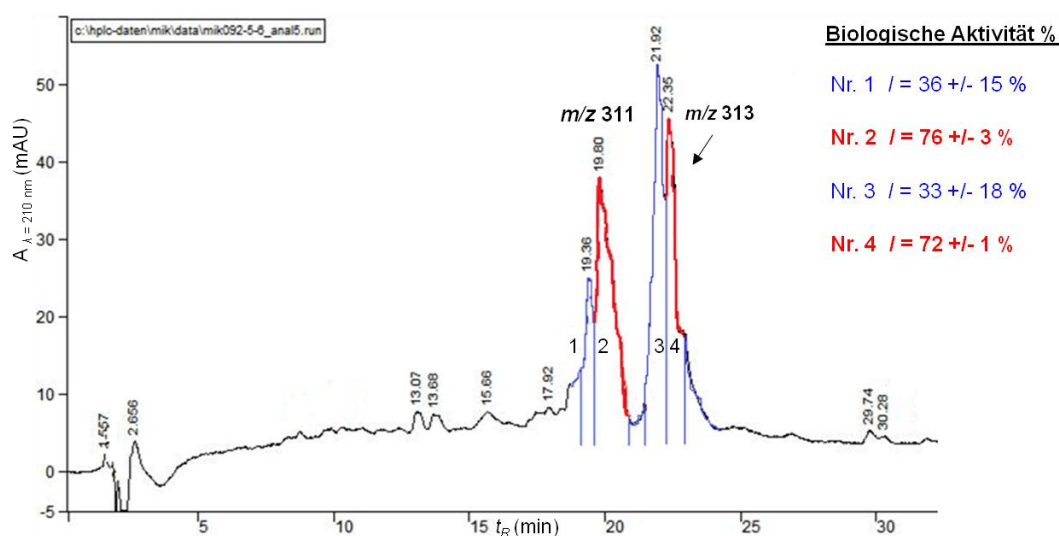


Abb. 41 HPL-Chromatogramm bei $\lambda = 210$ nm der mit, den Metaboliten m/z 311 $t_R \sim 19,80$ min und m/z 313 $t_R \sim 22,35$ min, angereicherten Fraktion, sowie die korrespondierende Aktivität (Wachstumsinhibierung % von *B. subtilis* bei $\beta = 100$ $\mu\text{g/mL}$ im Well in MeOH) der Sub-Fractionen. (Säule 4 RP18, Gradient 1 MeCN/H₂O, Fluß 1 mL/min)

Zur Verifizierung der biologischen Aktivität der ausgewählten, signifikant korrelierenden Metaboliten m/z 313, m/z 311, m/z 341 und zur Strukturaufklärung, erfolgte eine separate Isolierung und Identifizierung.

4.5.1 Metabolit m/z 313

Für die Isolierung des Metaboliten m/z 313 (**60**) wurde ein MeOH-Rohextrakt aus lyophilisierten Pilzfruchtkörpern von *H. latitabundus* eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die zuvor etablierten Modifikationsmethoden. Dabei wurde eine m/z – geleitete Isolierung durchgeführt. Diese Vorgehensweise ist weniger zeitaufwendig, da die Auswahl der Fraktionen nicht auf der Grundlage der Aktivität erfolgt, sondern durch LC-MS-Daten gesteuert wurde. Zur Bestätigung der biologischen Aktivität wurden die Fraktionen und die isolierten Metaboliten im Nachhinein auf ihre antibakterielle Wirkung gegen *B. subtilis* getestet.

4.5.1.1 Isolierung

Die Vorgehensweise zur Isolierung des Metaboliten m/z 313 (**60**) ist in Abb. 42 schematisch dargestellt. Zunächst erfolgte eine Trennung an Diaion HP20 und Elution mit MeOH/EtOAc 1:1 (v/v) (SC1). Nach anschließender Reinigung mittels repetitiver, präparativer HPLC (Säule 5 RP18, Gradient 2 MeOH/H₂O) wurde eine Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 und MeOH (SC3) durchgeführt. Eine weitere Reinigung erfolgte im Anschluss daran mittels MPLC unter Verwendung von RP18-Material als stationäre Phase und ein Gemisch aus MeCN/Ac₂O 59:41 (v/v) und H₂O als mobile Phase (MPLC4). Für die Feinreinigung wurde eine Trennung mittels analytischer HPLC (Säule 1 RP18-AQ, Gradient 4 MeCN/H₂O) durchgeführt.

Aufgrund starker Überlagerung (siehe hierzu auch Abb. 41) durch andere Fettsäuren und strukturverwandte Verbindungen, die sich auch durch Gradientenoptimierung, oder Säurezusatz nicht abtrennen ließen, war es notwendig, lange HPLC-Säulen mit einer hohen Trennleistung zu verwenden. Daher kamen für die Feinreinigung ausschließlich Säulen mit einem Partikeldurchmesser von 3 μ m zum Einsatz. Außerdem wurde die Fließgeschwindigkeit herabgesetzt, was ebenfalls zur Erhöhung der Selektivität geführt hat. Zusätzlich waren eine langsame Steigerung des unpolaren Anteils der mobilen Phase, sowie absolut stabile Bedingungen in Bezug auf Druck, Temperatur usw. erforderlich. So war es möglich, den aktivitätsrelevanten Metaboliten m/z 313 (**60**) zu isolieren und eine Verifizierung der biologischen Aktivität zu erreichen.

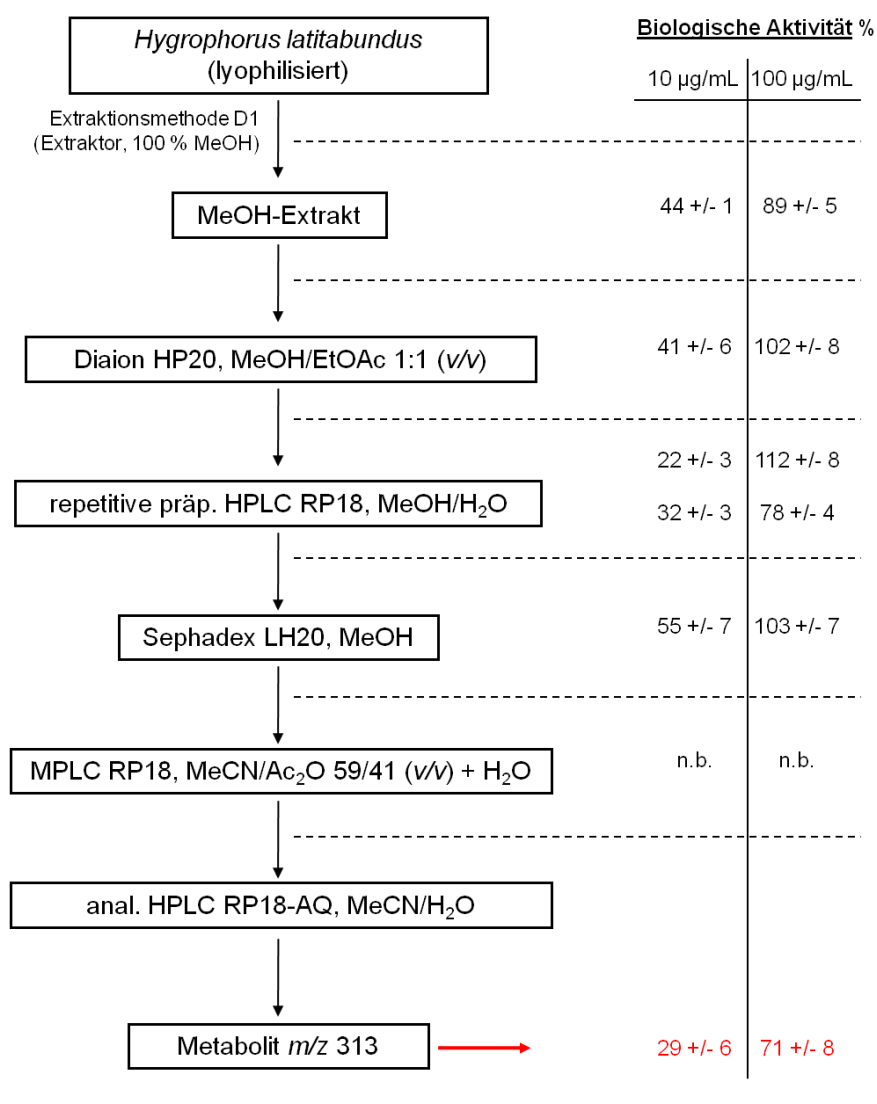


Abb. 42 Vorgehensweise zur Isolierung des aktivitätsrelevanten Metaboliten *m/z* 313 (**60**). Es wurde eine *m/z* – geleitete Isolierungsstrategie verfolgt. Die Bestimmung der biologischen Aktivität erfolgte erst im Nachhinein (β = 100 µg/mL und β = 10 µg/mL Konzentration in MeOH). n.b. – nicht bestimmt

In Abb. 43 ist das HPL-Chromatogramm aus dem letzten Schritt der Aufreinigung dargestellt. Die Vergrößerung zeigt, dass der erste Peak dem Metaboliten *m/z* 313 (**60**) zuzuordnen ist. Weiterhin sind die jeweiligen biologischen Aktivitäten dargestellt, die durch anschließende Bestimmung der antibakteriellen Wirkung ermittelt werden konnten. Bei dem Metaboliten *m/z* 313 (**60**) handelt es sich demnach in der Tat um einen aktivitätsrelevanten Naturstoff, welcher mittels AcorA bereits vorab identifiziert werden konnte.

4. Spezieller Teil – Isolierung und Strukturaufklärung

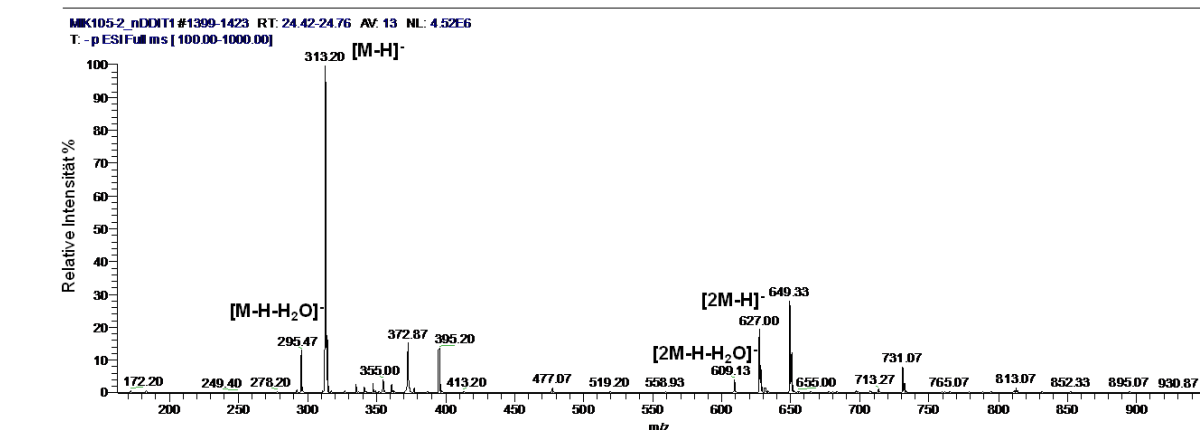
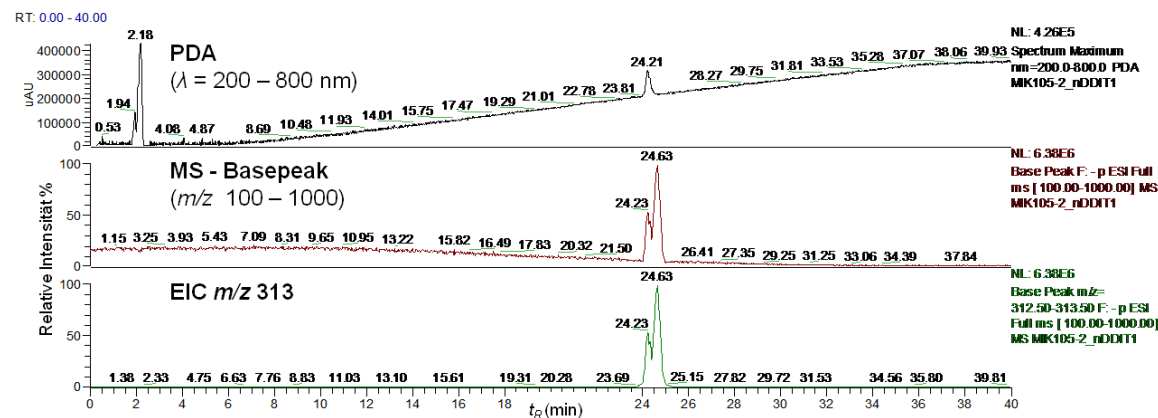


Abb. 44 LC-MS-Basispeak- und EIC-Chromatogramm (bei negativer Ionisierung) der isolierten Verbindung **60**. Zum Vergleich ist das PDA-Chromatogramm (oben) und das entsprechende MS-Spektrum bei einer $t_R = 24,42 - 24,76$ min aufgeführt (LC-MS1).

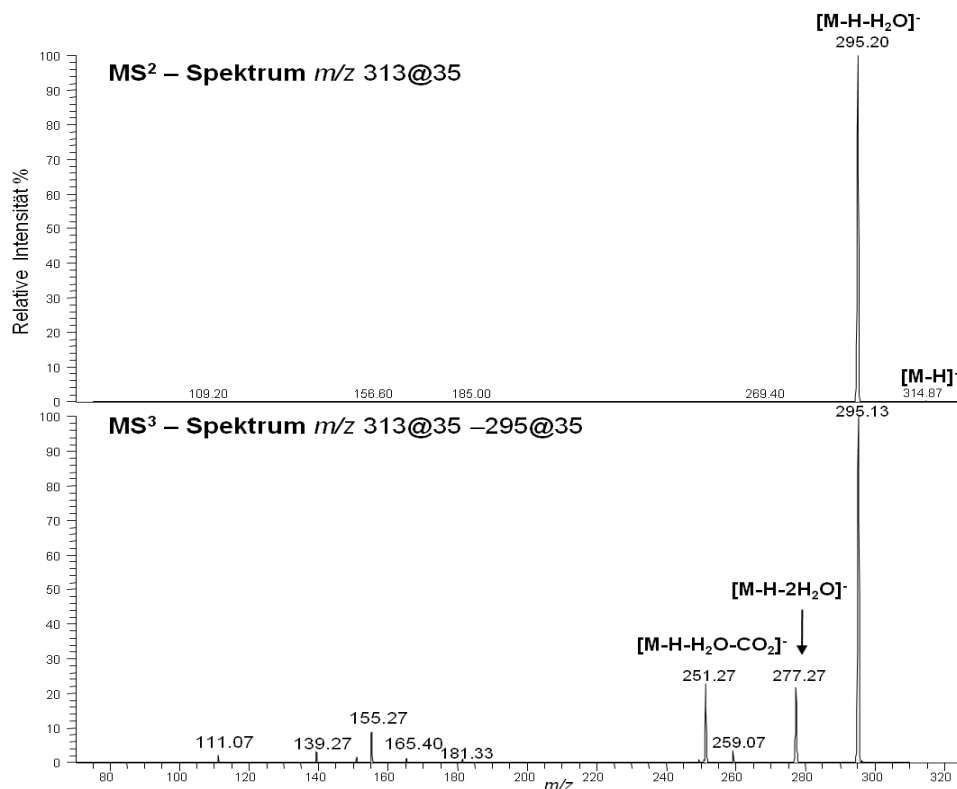


Abb. 45 MS^2 -Spektrum (Ionenfalle) der Verbindung **60** bei m/z 313 (oben), sowie das MS^3 -Spektrum des Tochterions m/z 295 (unten). Als relative normalisierte Energie (NCE) wurden jeweils 35 % bei (-)ESI eingesetzt.

In Abb. 46 ist das MS²-Spektrum des Diacetats des Metaboliten **60** mit einem [M-H]⁻ bei *m/z* 397 dargestellt. Nach dem Verlust eines Wasserstoffradikals vom [M-H]⁻ und darauf folgender H₂O – Abspaltung, entsteht das Ion *m/z* 378. Durch Kettenverlust von dem [M-H]⁻ wird das Fragment *m/z* 355 gebildet. Die weitere Fragmentierung der Tochterionen bei *m/z* 355 und *m/z* 337 im MS³-Modus führt hauptsächlich zum Verlust von Essigsäure (Abb. 47). Zur Bestätigung erfolgte die Analyse außerdem mittels LC-ESI-QqQ-MS².

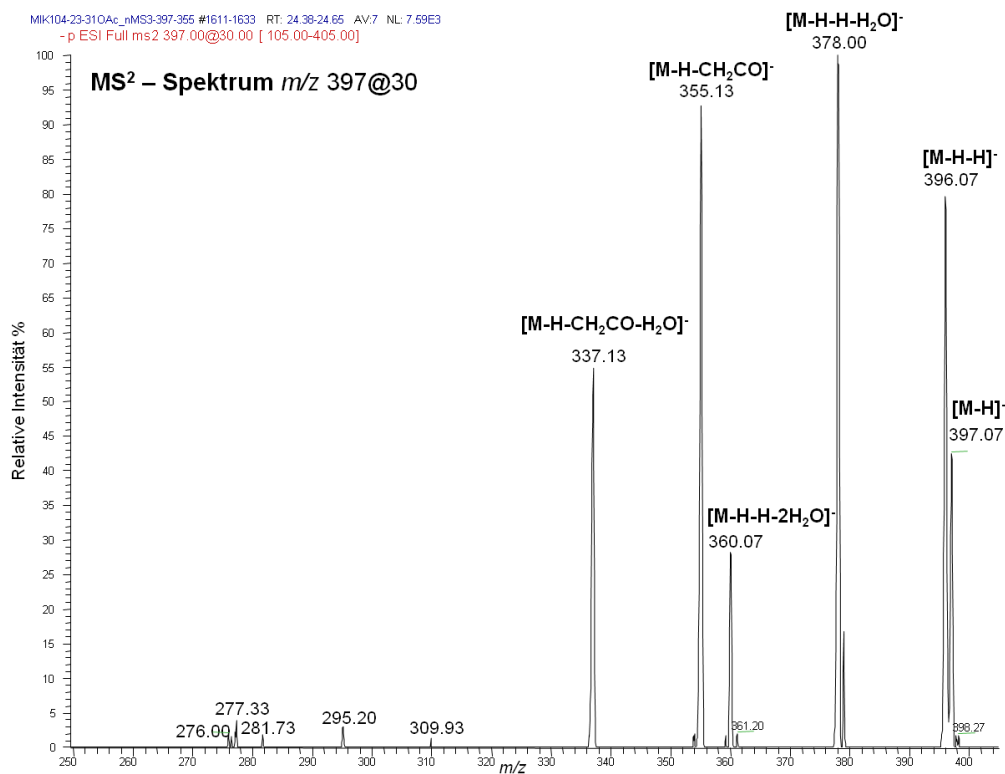


Abb. 46 MS²-Spektrum (Ionenfalle) des diacetylierten Metaboliten *m/z* 313 bzw. *m/z* 397 bei negativer Ionisierung. Die kollisionsinduzierte Fragmentierung wurde bei 30 % erzeugt.

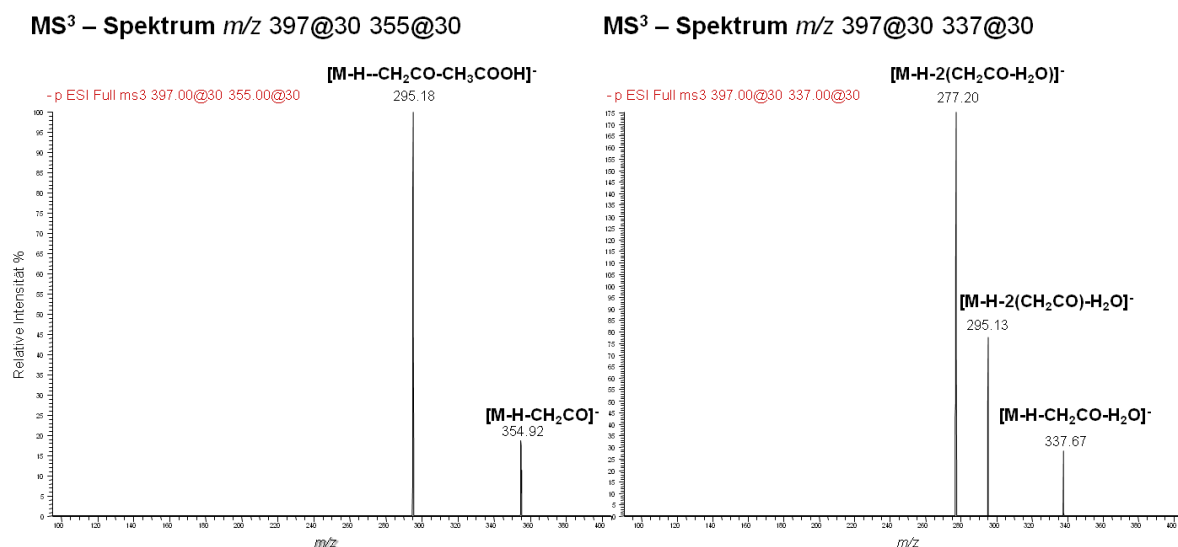
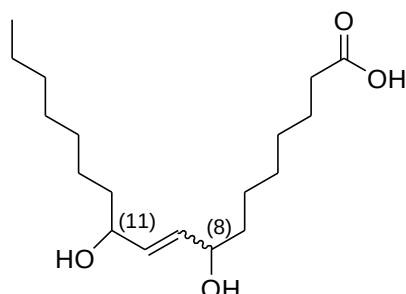


Abb. 47 MS³ – Spektrum (Ionenfalle) von *m/z* 397–355 (links) und *m/z* 397–337 (rechts) des acetylierten Metaboliten **60**.

Eine vollständige Identifizierung mittels GC-MS war nicht möglich, da die Verbindung vermutlich bereits bei der Derivatisierung z.B. Trimethylsilylierung (nach Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid) bzw. bei der GC-MS Analyse sehr leicht eine H₂O-Abspaltung gezeigt hat. Die Lokalisierung der Hydroxylgruppen und die Strukturaufklärung erfolgten



8,11-Dihydroxyoctadec-9-ensäure

60

daher mittels hochauflösender (high resolution - HR) UPLC-ESI-QTOF-MS² Experimente (Abb. 48). Bei der ESI-Fragmentierung von hydroxylierten Fettsäuren kann die Position der OH-Gruppe durch die α -Spaltprodukte bestimmt werden.^{(80) (81) (82)} Dies wurde ebenfalls durch einen Vergleich mit verschiedenen Referenzsubstanzen (mono- und dihydroxylierte 18:1 und 18:2 Fettsäuren) bestätigt.

Abb. 48 Strukturformel des Metaboliten *m/z* 313.

Da im Gegensatz zur GC-MS Analyse keine Derivatisierung erforderlich ist, hat die Strukturaufklärung von Fettsäuren mittels ESI-MS/MS in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen.^{(80) (81) (83)} Das Fragmentierungsverhalten kann unter ESI-Bedingungen jedoch durch benachbarte Doppelbindungen entscheidend beeinflusst werden. Erst kürzlich konnte der zugrundeliegende Mechanismus von Oliw und Mitarbeiter aufgeklärt werden.⁽⁸³⁾ Anhand der 7,11-Dihydroxyoctadeca-9-ensäure (7,10-diOH 18:1 (8(E)) Fettsäure) aus *Pseudomonas aeruginosa*, sowie verschiedene ¹⁸O- und ²H-Isotopomere, konnte gezeigt werden, dass ein „charge-driven“ Fragmentierungsmechanismus mit einer β -Eliminierung von Wasserstoff, unter gleichzeitiger Bildung einer Doppelbindung vorliegt. Demzufolge werden bei dieser Art Verbindung überwiegend Fragmente gebildet, die dem ω -Ende zugeordnet werden können.

In Tabelle 14 ist eine Übersicht über die Fragmente aus der HR-ESI-MS²-Analyse von **60** aufgeführt. Die blau unterlegten *m/z* - Werte können als Schlüsselfragmente angesehen werden, da diese für die Lokalisierung der OH-Gruppen und der Doppelbindung eine entscheidende Rolle spielen (Abb. 49). Bei der massenspektrometrischen Fragmentierung mittels QTOF-MS² bildet das Fragment **a** (*m/z* 183) den Basispeak (Abb. 50). Durch konsekutiven Verlust von CO₂ und C₂H₄ werden die Fragmente *m/z* 139 (**a**-CO₂) und *m/z* 111 (**e**) erzeugt. In Analogie zu der Literatur⁽⁸³⁾ ermöglichen die Schlüsselfragmente *m/z* 165 (**b**-H₂O), *m/z* 155 (**c**) und *m/z* 127 (**d**) die Bestimmung der Positionen der OH-Gruppen an C8 und C11, sowie die Bestimmung der Lage der Doppelbindung an C9. Die Massenspektrometrie erlaubt jedoch keine Bestimmung der Stereoisomerie. Eine Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie gestaltete sich schwierig, da dafür keine

ausreichenden Mengen isoliert werden konnten und diese zum Teil noch Verunreinigungen enthielten, wobei es vermutlich um schlecht abtrennbare ungesättigte und einfach hydroxylierte Fettsäuren handelte. Eine Bestimmung der *cis/trans*-Isomerie der Doppelbindungskonfiguration war daher nicht möglich.

Tabelle 14 Übersicht über die Fragmente aus der UPLC-QTOF-MS² Analyse des Metaboliten **60**. Die blau unterlegten Felder kennzeichnen die Schlüsselfragmente.

<i>m/z</i> (gem.)	Intensität (%)	<i>m/z</i> (ber.)	Δ Da	Summenformel
313,2355	3	313,2384	0,0029	C ₁₈ H ₃₃ O ₄ ⁻
295,2285	12	295,2279	-0,0006	C ₁₈ H ₃₁ O ₃ ⁻
251,2342	6	251,2380	0,0038	C ₁₇ H ₃₁ O ⁻
183,1022	100	183,1027	0,0005	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ ⁻
165,1280	10	165,1285	0,0005	C ₁₁ H ₁₇ O ⁻
155,1427	22	155,1441	0,0014	C ₁₀ H ₁₉ O ⁻
139,1117	18	139,1128	0,0011	C ₉ H ₁₅ O ⁻
137,0957	8	137,0972	0,0015	C ₉ H ₁₃ O ⁻
127,1117	6	127,1128	0,0011	C ₈ H ₁₅ O ⁻
111,0794	8	111,0815	0,0021	C ₇ H ₁₁ O ⁻

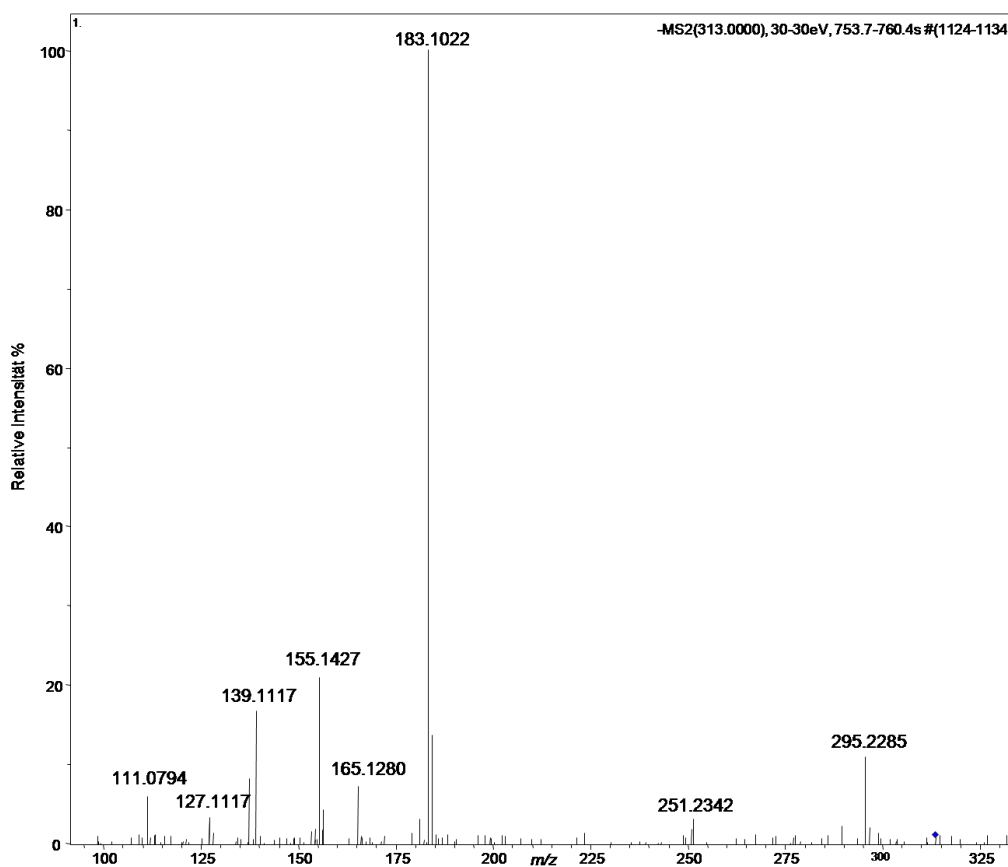


Abb. 49 QTOF-MS²-Spektrum der Verbindung **60**. Die kollisionsinduzierte Fragmentierung wurde bei 30 eV bei (-)ESI herbeigeführt.

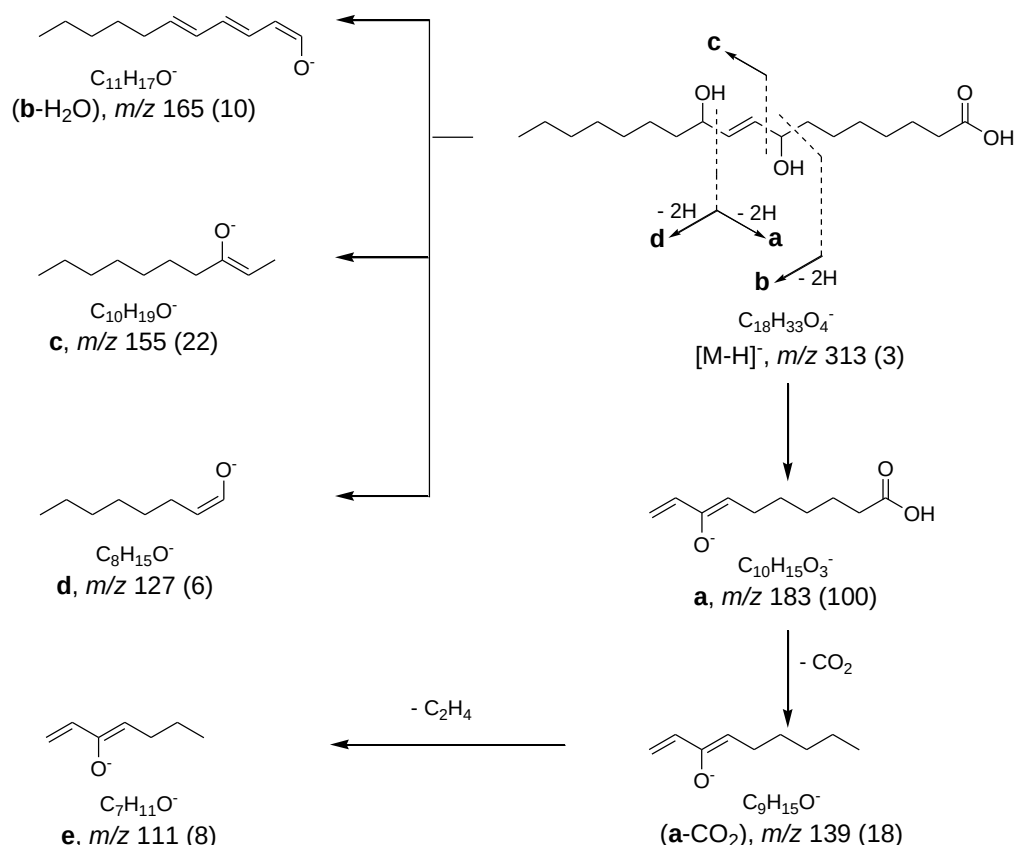


Abb. 50 Massenspektrometrische Fragmentierung des $[M-H]^-$ Ions von Verbindung **60** unter (-)ESI-Bedingungen. Die Elementarzusammensetzung der einzelnen Schlüsselionen wurde durch HR-ESI-QTOF-CID-MS²-Messungen bestätigt; die relativen Intensitäten sind in % (in Klammern) angegeben.

Ein Vergleich der mittels Ionenfalle MS²/MS³ und QTOF-MS² gebildeten Fragmente ist in Tabelle a - 13 (Anhang) aufgeführt.

Mit Hilfe von verschiedenen chromatographischen Methoden und Techniken wurde der signifikant korrelierende Metabolit m/z 313 (**60**) isoliert und als 8,11-Dihydroxyoctadec-9-ensäure (8,11 – diOH 18:1 (9(E/Z))) identifiziert. Außerdem war es möglich, die antibakterielle Aktivität mit Hilfe des zuvor entwickelten Biotests gegen *B. subtilis* zu verifizieren.

4.5.2 Metabolit m/z 311

Weiterhin wurde der Metabolit m/z 311 (**61**) isoliert und die biologische Aktivität verifiziert. Die Vorgehensweise zur Isolierung ist in Abb. 51 dargestellt. Auch in diesem Fall wurde eine m/z - geleitete Isolierungsstrategie verfolgt.

4.5.2.1 Isolierung

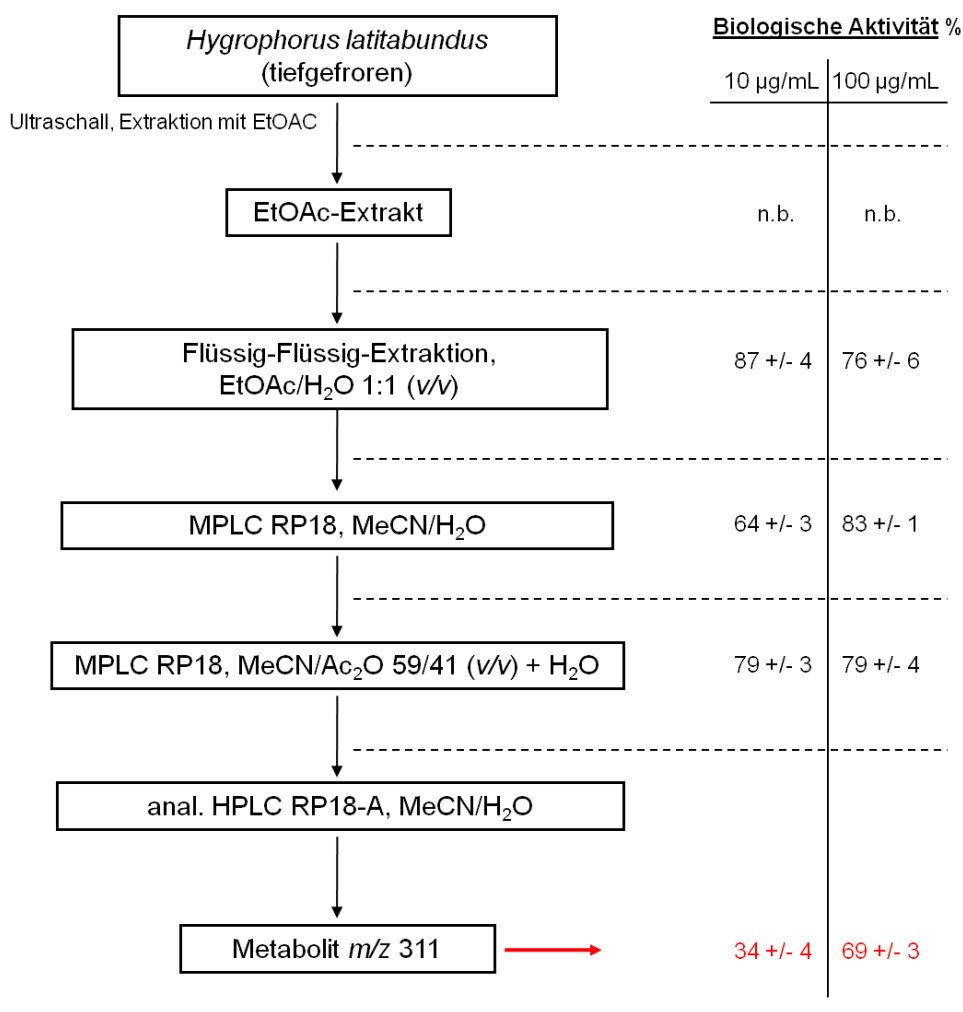


Abb. 51 Vorgehensweise zur Isolierung des Metaboliten *m/z* 311 (**61**). Rechts sind zusätzlich die biologischen Aktivitäten bei zwei verschiedenen Konzentrationen aufgeführt, wobei deren Bestimmung erst im Nachhinein erfolgte.

Im Gegensatz zu **60** wurden in diesem Fall tiefgefrorene Pilzfruchtkörper mittels EtOAc unter Anwendung von Ultraschall extrahiert. Durch eine anschließende Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde zusätzlich eine erste Separation nach Polarität erreicht (Abb. 51). Weiterhin erfolgte eine erste chromatographische Trennung nach Polarität mittels MPLC unter Verwendung von RP18-Material als stationäre Phase und MeCN/H₂O als mobile Phase (MPLC1). In einem nächsten Schritt wurde erneut eine Trennung mittels MPLC durchgeführt, bei welcher als mobile Phase auf MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v) und H₂O verwendet wurde (MPLC2). Die abschließende Feinreinigung erfolgte auch in diesem Fall mittels HPLC unter Verwendung von langen HPLC-Säulen mit kleinem Partikeldurchmesser. Ähnlich wie zuvor waren auch hier sehr stabile Bedingungen für eine Trennung notwendig.

Es stellte sich heraus, dass neben anderen Fettsäuren mehrere Isomere des Metaboliten m/z 311 (**61**) enthalten waren, die zwar sehr ähnliche t_R , aber deutlich unterschiedliche biologische Aktivitäten aufwiesen (Abb. 52).

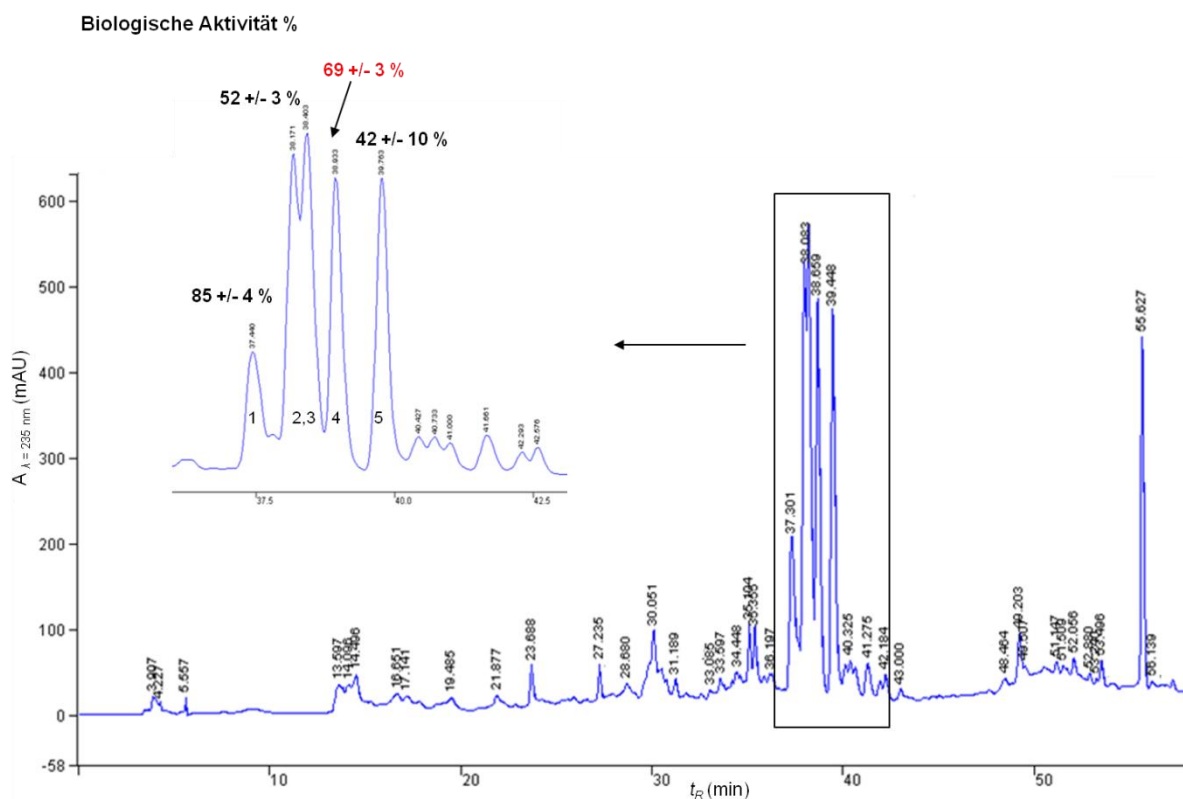


Abb. 52 HPL-Chromatogramm der Fraktion, die einer letzten Feinreinigung unterzogen wurde. Die Vergrößerung zeigt die relevanten Peaks, sowie deren biologische Aktivitäten (prozentuale Wachstumsinhibierung von *B. subtilis*) bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$.

Durch eine vergleichende Analyse mittels LC-ESI-MS^{2,3} stellte sich heraus, dass die Peaks 2 – 5 auf Isomere des Metaboliten m/z 311 (**61**) zurückzuführen sind (Abb. a - 5, Anhang). Dabei entspricht der Peak 4 dem Isomer mit der höchsten Aktivität ($I = 69 \pm 3 \%$). Weiterhin ist aus den LC-MS Daten zu erkennen, dass Peak 1 zu einer Fettsäure mit einem $[M-H]^-$ von m/z 295 ($t_R = 21,7 \text{ min}$, LC-MS1) gehört und daher in keinem Zusammenhang zu dem Metaboliten m/z 311 (**61**) steht. Zum Vergleich wurde die antibakterielle Wirkung des 4-OAcetyl-Hygrophorons D12 (**28**) bestimmt ($I = 67 \pm 5 \%$, $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ und $I = 45 \pm 13 \%$, $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$), die mit der Aktivität des Peak 4 m/z 311 (**61**) vergleichbar ist (Abb. 53). Durch Kombination von **28** und Peak 2 konnte keine eindeutige Steigerung der Wirkung erzielt werden, jedoch ist eine starke Erhöhung der Aktivität bei Kombination von Peak 1 (m/z 295) und Peak 2 (m/z 311) erkennbar. Da jedoch aufgrund zu geringer Mengen keine Replikate angefertigt werden konnten, ist dies nur ein Hinweis auf eine Aktivitätssteigerung durch Kombination mehrerer Fettsäuren. Das könnte bedeuten, dass eine komplexe Mischung an funktionalisierten Fettsäuren die Grundlage der konstitutiven Pathogenabwehr des Pilzes bildet.

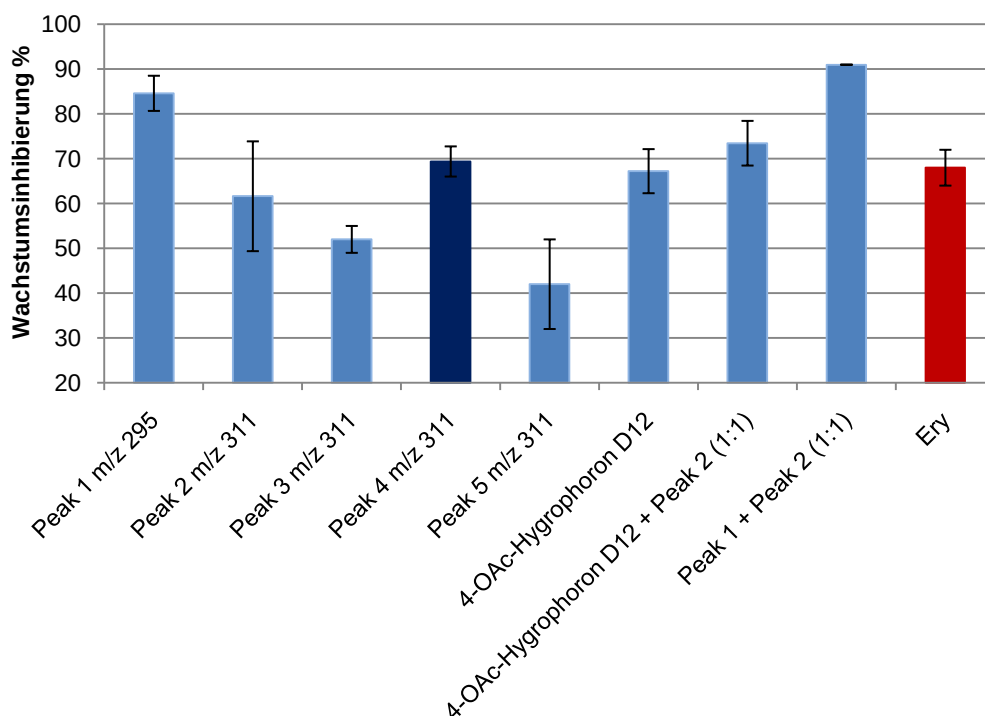


Abb. 53 Vergleich der ermittelten antibakteriellen Wirkungen der Peaks 1 – 5 bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$. Zum Vergleich ist die Aktivität des 4-OAcetyl-Hygrophoron D12 (**28**) (einzeln) aufgeführt, sowie in Kombination mit Peak 2. Weiterhin wurde die Aktivität nach Kombination von Peak 1 und Peak 2 ermittelt.

Da der Metabolit m/z 311 (**61**, Peak 4) im Vergleich zu den anderen Isomeren die höchste Aktivität gezeigt hat, wurde diese Verbindung strukturell charakterisiert. Weiterhin wurde die Struktur des Metaboliten m/z 295 (Peak 1) aufgeklärt.

4.5.2.2 Strukturaufklärung

Zur Bestätigung, dass es sich bei dem isolierten Metaboliten m/z 311 (**61**, Peak 4) um den mittels AcorA identifizierten handelt, wurde ein Vergleich der Retentionszeiten durchgeführt. Anhand von Abb. 54 ist deutlich zu sehen, dass der isolierte Metabolit bei $t_R = 22,7 \text{ min}$ (LC-MS1) eluiert und somit dem gesuchten Hit entspricht.

Analog zu Verbindung **60** konnte beim Metaboliten **61** mittels Acetylierung gezeigt werden, dass es sich um eine zweifach hydroxylierte Fettsäure handelt. Die entsprechenden MS^2 -Spektren sind in Abb. 55 dargestellt, wobei m/z 395 dem diacetylierten Metaboliten entspricht. Die weitere Strukturermittlung erfolgte durch hochauflösende UPLC(-)ESI-QTOF- MS^2 Messungen (Abb. 56, Abb. 57). In Tabelle a - 14 (Anhang) ist ein Vergleich der Ionen bei Fragmentierung mittels Ionenfalle MS^2/MS^3 und QTOF- MS^2 aufgeführt.

4. Spezieller Teil – Isolierung und Strukturaufklärung

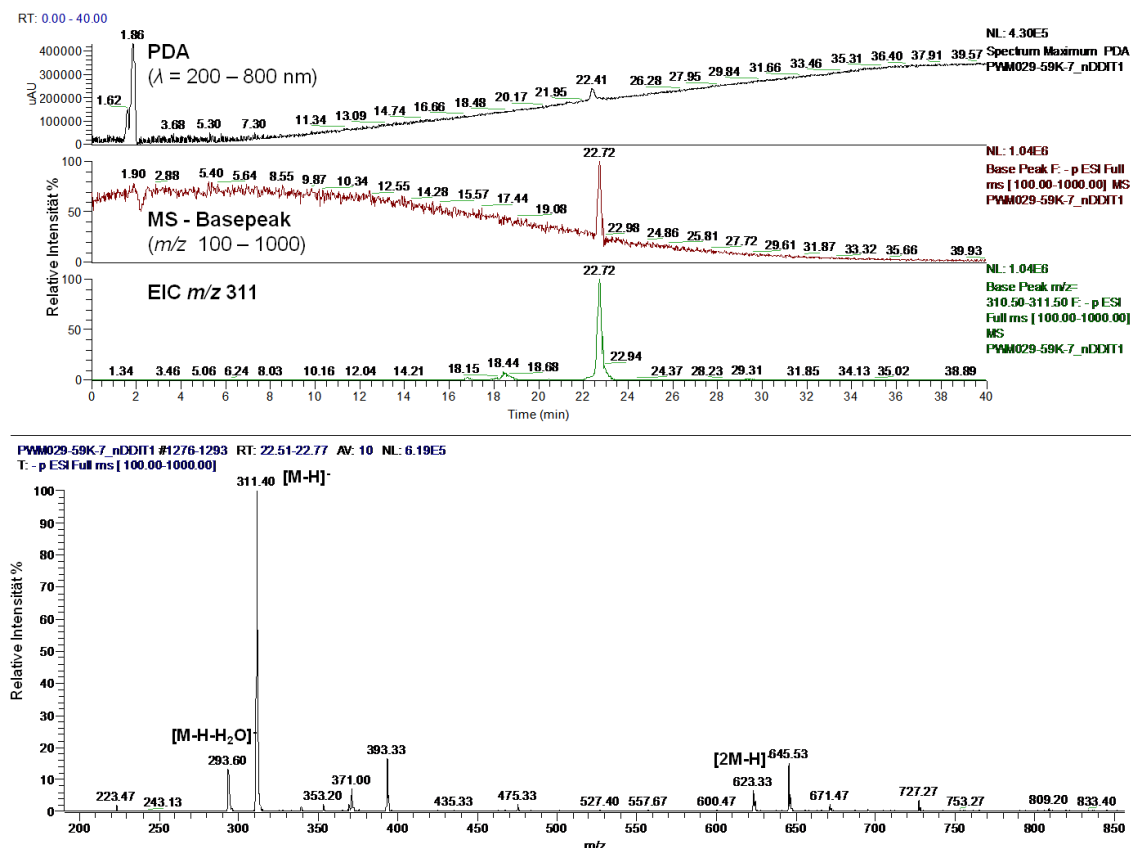


Abb. 54 PDA- (oben) und LC-MS-Chromatogramm (Mitte), sowie EIC (unten) des isolierten Metaboliten *m/z* 311 (**61**). Zusätzlich ist das korrespondierende MS-Spektrum dargestellt. (LC-MS1)

Der Metabolit **61** bildet als Basispeak ein Fragment vom Typ $a-H_2O$ bei *m/z* 211 (Abb. 57, Tabelle 15). Die Entstehung dieses Fragments kann durch α -Spaltung zwischen C12 und C13 und einem damit verbundenen Verlust von H_2O erklärt werden (Abb. 58). Durch Kombination mit den Fragmenten *m/z* 199 (**b**), *m/z* 197 (**b-2H**) und *m/z* 181 (**b-H₂O**) können die OH-Gruppen an C11 und C12 lokalisiert werden (Abb. 56). In Analogie zur Literatur⁽⁸³⁾ kann anhand der Ionen *m/z* 169 (**c**) und *m/z* 113 (**d**) die Lage der Doppelbindungen an C9 und vermutlich C13 ermittelt werden. In diesem Fall kann die Bildung des Ions *m/z* 113 (**d**) auf eine Spaltung zwischen C11 und C12 in Analogie zu **60** (Fragment bei *m/z* 155) zurückgeführt werden. Auf der Basis des zuvor vorgestellten Fragmentierungsverhaltens wird für die Struktur des Metaboliten **61** eine 11,12-Dihydroxyoctadeca-9,13-diensäure (11,12 diOH 18:2 (9,13 (*E/Z*))) vorgeschlagen werden (Abb. 56). Wie die dargestellten Ergebnisse zeigen, ist der Hit *m/z* 311 (**61**) damit ebenfalls ein aktivitätsrelevanter Metabolit, welcher mittels AcorA identifiziert wurde.

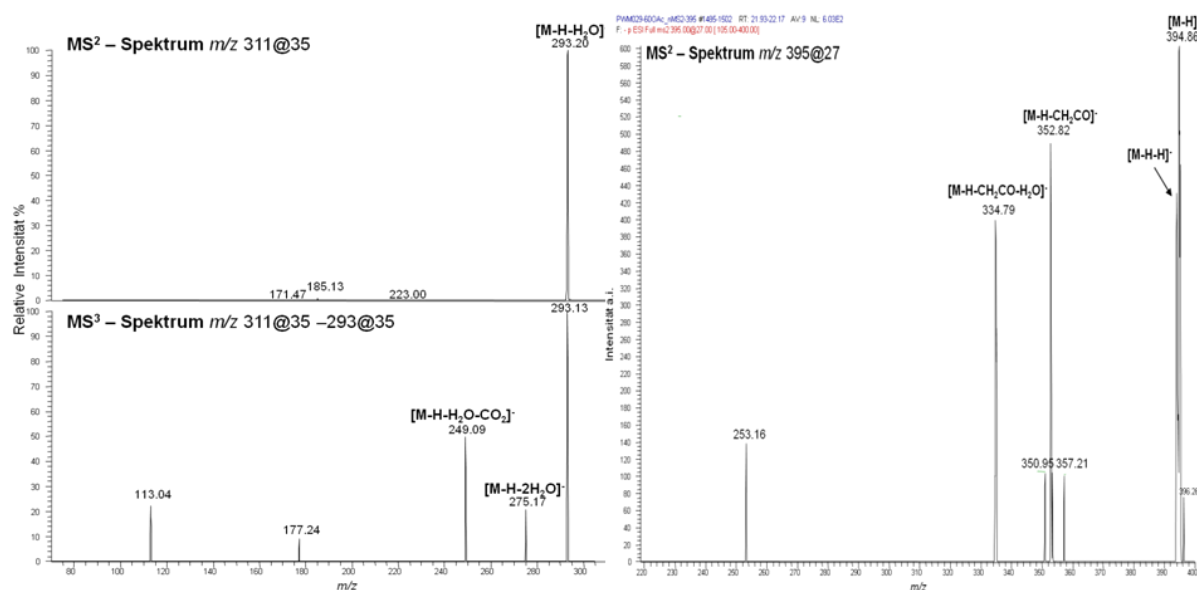
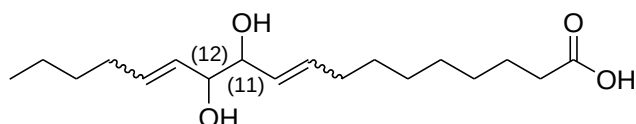


Abb. 55 MS²- und MS³-Spektrum der Verbindung **60** (links), sowie MS²-Spektrum des acetylierten Derivats *m/z* 395 (rechts). Die kollisionsinduzierte Fragmentierung wurde bei 35 % und 27 % NCE bei (-)ESI herbeigeführt

Tabelle 15 Fragmente aus der UPLC-QTOF-MS² Analyse. Die wichtigen Schlüsselfragmente sind blau unterlegt.

<i>m/z</i> (gem.)	Intensität (%)	<i>m/z</i> (ber.)	Δ Da	Summenformel
311,2203	22	311,2228	0,0025	C ₁₈ H ₃₁ O ₄ ⁻
293,2103	30	293,2122	0,0019	C ₁₈ H ₂₉ O ₃ ⁻
275,1969	8	275,2017	0,0048	C ₁₈ H ₂₇ O ₂ ⁻
265,2184	8	265,2173	-0,0011	C ₁₇ H ₂₉ O ₂ ⁻
249,2199	8	249,2224	0,0025	C ₁₇ H ₂₉ O ⁻
211,1325	100	211,1340	0,0015	C ₁₂ H ₁₉ O ₃ ⁻
199,1323	27	199,1340	0,0017	C ₁₁ H ₁₉ O ₃ ⁻
197,1184	57	197,1183	-0,0001	C ₁₁ H ₁₇ O ₃ ⁻
181,1237	6	181,1234	-0,0003	C ₁₁ H ₁₇ O ₂ ⁻
169,1231	6	169,1229	-0,0002	C ₁₀ H ₁₇ O ₂ ⁻
113,0960	7	113,0972	0,0012	C ₇ H ₁₃ O ⁻



11,12-Dihydroxyoctadeca-9,13-diensäure

61

Abb. 56 Strukturformel des isolierten Metaboliten *m/z* 311 (**61**).

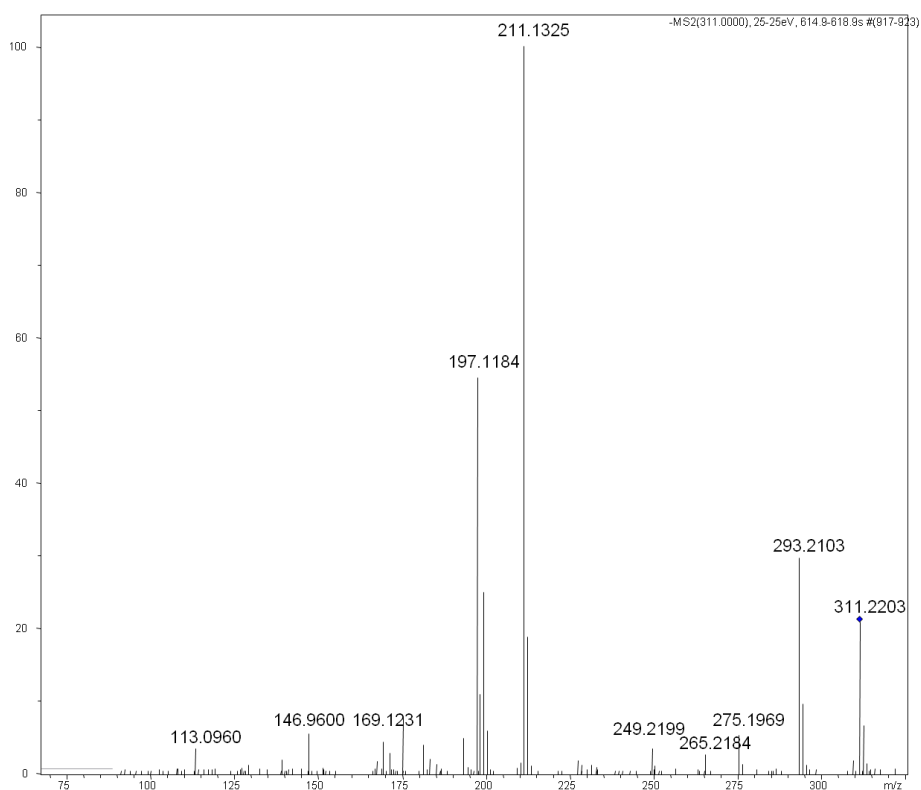


Abb. 57 QTOF-MS²-Spektrum von **61**. Die kollisionsinduzierte Dissoziation wurde bei 25 eV bei (-)ESI erzeugt.

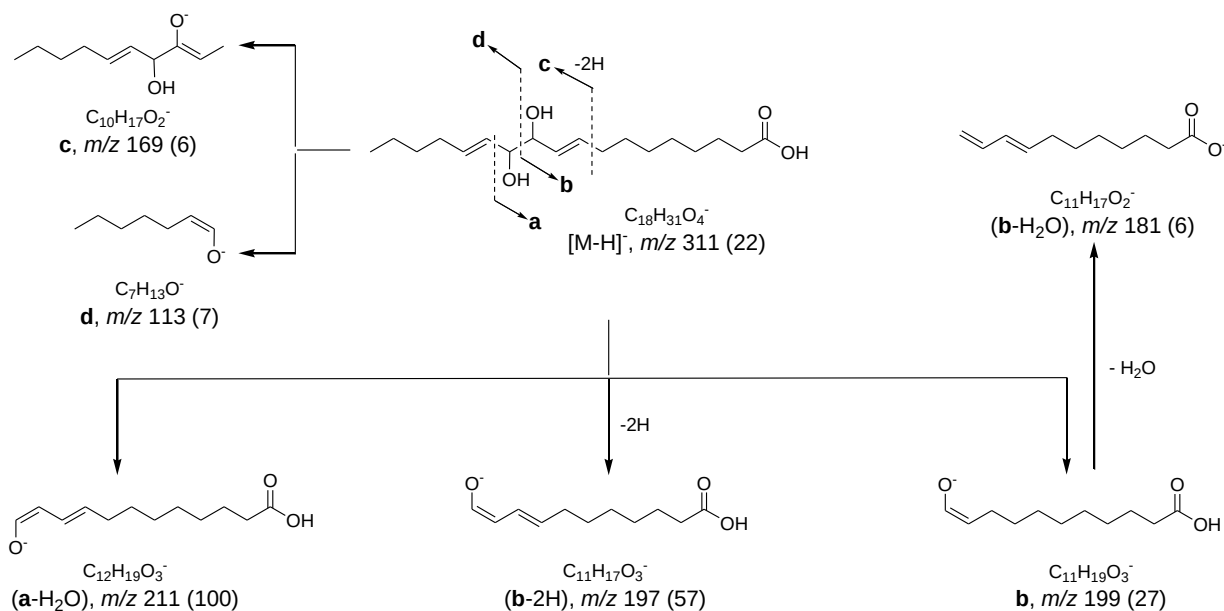


Abb. 58 Massenspektrometrische Fragmentierung des $[M-H]^-$ Ions von Verbindung **61** unter (-)ESI-Bedingungen (Die Elementarzusammensetzungen der einzelnen Schlüsselionen wurde durch QTOF-MS²-Messungen bestätigt, die relativen Intensitäten sind in % (in Klammern) angegeben).

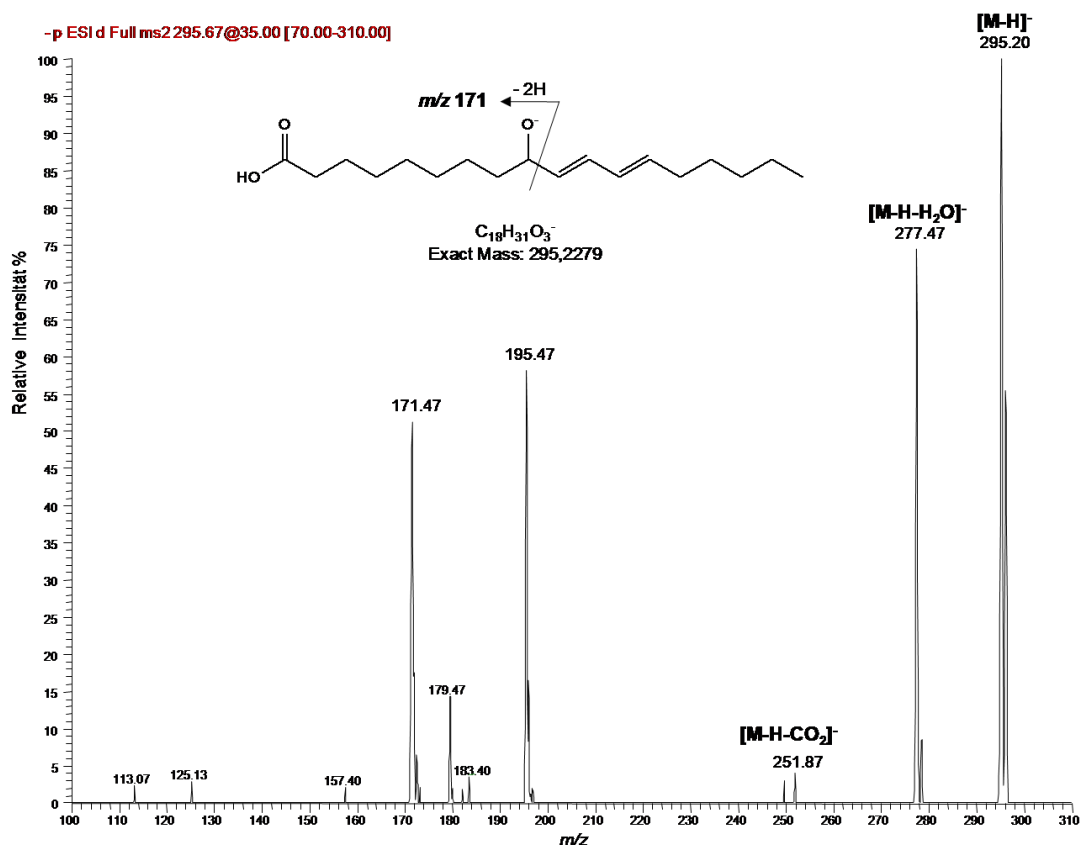


Abb. 60 MS²-Spektrum der Verbindungen **62** und **63** bei negativer ESI. Die kollisionsinduzierte Dissoziation wurde bei einer relativen Stoßenergie von 35 % erzeugt.

Wie in Abb. 61 gezeigt, weisen die Verbindungen **61** (Peak 4) und **62/63** (Peak 1) eine leicht unterschiedliche Aktivität auf. Dies ist wahrscheinlich auf die Unterschiede in der relativen Konzentration zurückzuführen. So waren relativ große Mengen an biologisch inaktiven Fettsäuren „in Peak 4“ enthalten, jedoch nur ein verhältnismäßig niedriger Anteil an **61**. Dies lässt darauf schließen, dass **61** bereits in geringen Mengen aktiv ist. Der hohe prozentuale Anteil („Reinheitsgrad“) von **62/63** deutet darauf hin, dass diese Verbindung erst in höheren Konzentrationen eine biologische Aktivität gegen *B. subtilis* aufweist.

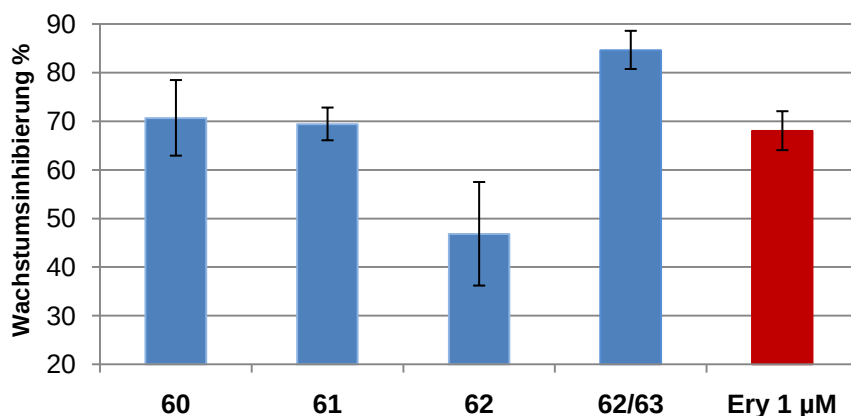


Abb. 61 Vergleich der antibakteriellen Aktivität (prozentuale Wachstums-inhibierung) gegen *B. subtilis* von Verbindung **60** – **63** (β = 100 µg/mL) und von Erythromycin (c = 1 µM).

Im Gegensatz zu **61** wurden die Verbindungen **62/63** mittels AcorA nicht als signifikant korrelierend identifiziert. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Peak bei $t_R = 21$ min (LC-MS1) der Hauptverbindung (**62/63**) des Extraktes entspricht und daher keine ausreichende Variation vorhanden war (siehe hierzu Abb. 37, Kapitel 4.4.4.1 S. 74). Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass es auch in diesem Fall zur Überlagerung von mindestens zwei verschiedenen Isomeren (**62/63**) der Masse m/z 295 $[M-H]^-$ kommt, wovon jedoch nur **63** eine deutliche Aktivität aufweist. Verbindung **62** wurde ebenfalls als isolierte Reinsubstanz auf die antibakterielle Aktivität getestet, es konnte jedoch nur eine schwache Wachstumsinhibierung von *B. subtilis* in den eingesetzten Konzentrationen festgestellt werden (Abb. 61). Dies bedeutet, dass entweder ein additiver Effekt vorliegt oder die Aktivität allein durch Verbindung **63** verursacht wird. Es konnte in diesem Fall keine Identifizierung mittels AcorA erfolgen, da Verbindung **63** nur zu einem geringen Anteil in dem Peak bei $t_R = 21$ min enthalten ist und daher von dem inaktiven Isomer **62** überlagert wird. Darüber hinaus ist der Peak bei $t_R = 21$ min mit einem $[M-H]^-$ bei m/z 295 nur als Einzelpeak in der alignierten Peakmatrix enthalten. Deshalb erfolgte bereits beim Peakpicking keine Isomerenunterscheidung. Die Verbindung **63** ist vermutlich als „falsch negativer“ Hit der AcorA anzusehen, jedoch handelt es sich um einen sehr schwierigen Fall, bei dem die Grenzen der automatischen Datenanalyse erreicht werden.

4.5.3 Metabolit m/z 341

Neben den Metaboliten m/z 311 (**61**) und m/z 313 (**60**) zeigte der Metabolit m/z 341 (**64**) ebenfalls eine signifikante Korrelation zu der biologischen Aktivität, die vor allem durch Co-Korrelation der zugehörigen Isotopenpeaks und Fragmente bestätigt wurde. Darüber hinaus konnte dieser Metabolit in beiden Experimenten mit nativen *Hygrophorus*-Extrakten als signifikant positiv korrelierend identifiziert werden (siehe hierzu Kapitel 4.4.4.1 Seite 70 und Kapitel 4.4.4.2 Seite 75).

4.5.3.1 Isolierung

Die Isolierung des Metaboliten m/z 341 (**64**) erfolgte ebenfalls aus tiefgefrorenen Pilzfruchtkörpern von *H. latitabundus* mit EtOAc als Extraktionsmittel (Abb. 62). Nach der darauf folgenden Flüssig-Flüssig-Extraktion erfolgte eine chromatographische Trennung mittels MPLC mit RP18-Material als stationäre Phase und einem Gradienten aus MeCN/H₂O (MPLC1). Eine Feinreinigung mittels HPLC war im Gegensatz zu **60** und **61** nicht erforderlich. Auch in diesem Fall wurde eine m/z – geleitete Isolierungsstrategie verfolgt. Die aufgeführten biologischen Aktivitäten wurden daher erst im Nachhinein erfasst und dienten lediglich zur Verifizierung.

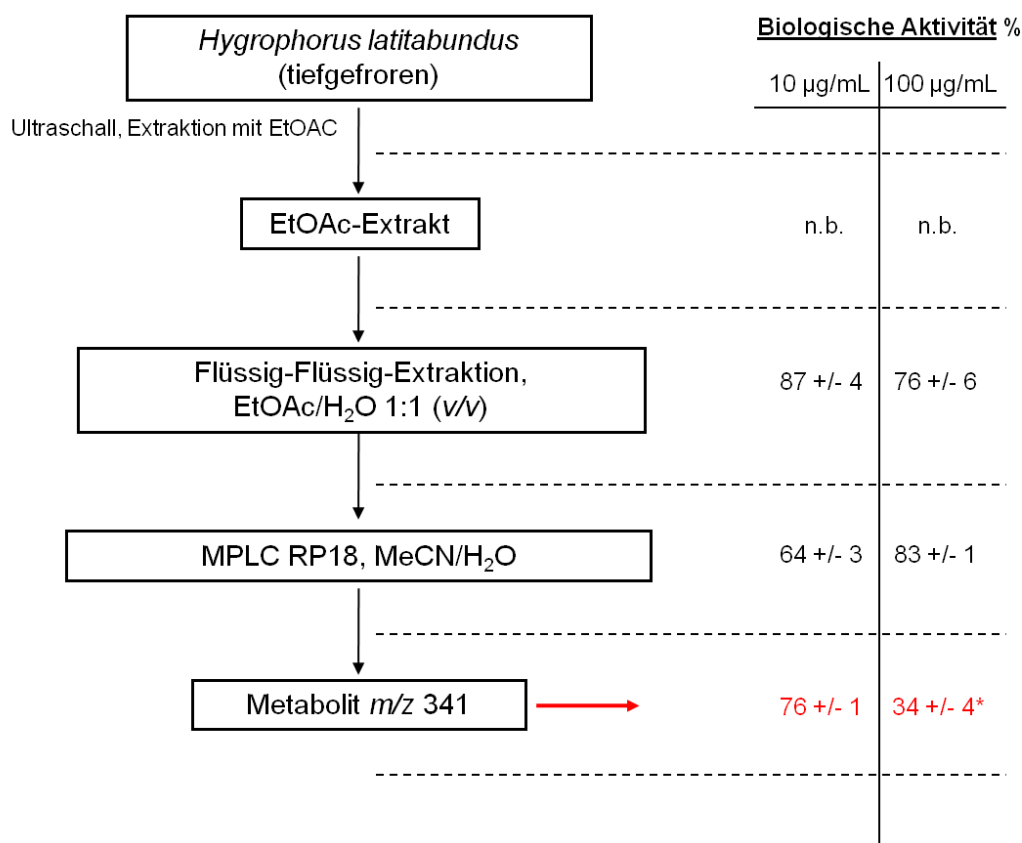


Abb. 62 Vorgehensweise zur Isolierung des Metaboliten *m/z* 341 (**64**). Zusätzlich sind die jeweiligen biologischen Aktivitäten gegen *B. subtilis* aufgeführt. *Störung der Messung durch Eigenfluoreszenz

4.5.3.2 Strukturaufklärung

Die Strukturaufklärung des Metaboliten *m/z* 341 (**64**) erfolgte hauptsächlich auf Basis des Fragmentierungsverhaltens bei LC-MS²/MS³ Analyse (Ionenfalle) und Vergleich mit dem entsprechenden Deuterium-markierten Isotopomer. Zusätzlich erfolgte eine NMR-spektroskopische Analyse, welche einschließlich Vergleich mit bekannten NMR-Daten zeigte, dass 4-OAcetyl-Hygrophoron D12 (**28**) vorliegt (Abb. 63).^{(54) (55)} Da dies durch die MS-Daten nicht bestätigt werden konnte, handelt es sich bei dem Metaboliten *m/z* 341 (**64**) vermutlich um ein Artefakt. Die Massendifferenz von 10 amu bei Verbindung **64**, lässt eine Addition von MeOH an die Doppelbindung bei gleichzeitiger Deacetylierung vermuten (Abb. 63). Die exakte Masse des Metaboliten *m/z* 341 [M-H]⁻ (**64**) wurde mittels FTICR-MS bestimmt und die Summenformel C₁₉H₃₃O₅⁻ berechnet. Die Analyse der MS²/MS³-Daten zeigt, dass das Fragmentierungsverhalten dem des 4-OAcetyl-Hygrophoron D12 (**28**) ähnlich ist (Tabelle 17).⁽⁸⁴⁾ Der Metabolit *m/z* 341 (**64**) zeigt keine Abspaltung von CH₂CO. Dafür ist jedoch ein Verlust von CH₃OH direkt vom Molekülion detektierbar (siehe blau unterlegte Zeilen). Diese Beobachtung wurde außerdem durch den Neutralverlust zum Basispeak (fett) bestätigt. Während der Basispeak mit der Masse *m/z* 265 bei dem 4-OAcetyl-Hygrophoron D12 (**28**) einem Fragment [M-H-CO₂-CH₂CO]⁻ (ΔM = 86 Da) entspricht, ist dieser bei dem

Metaboliten m/z 341 (**64**) durch ein Ion vom Typ $[M-H-CO_2-CH_3OH]^-$ ($\Delta M = 76$ Da) charakterisiert (Tabelle 17). Diese Beobachtung lässt ebenfalls vermuten, dass es sich um ein Methoxy-Derivat handelt. Um dies zu bestätigen wurde der Metabolit **64** mit CD_3OD behandelt und erneut mittels LC-MS²/MS³ analysiert (Abb. 64).

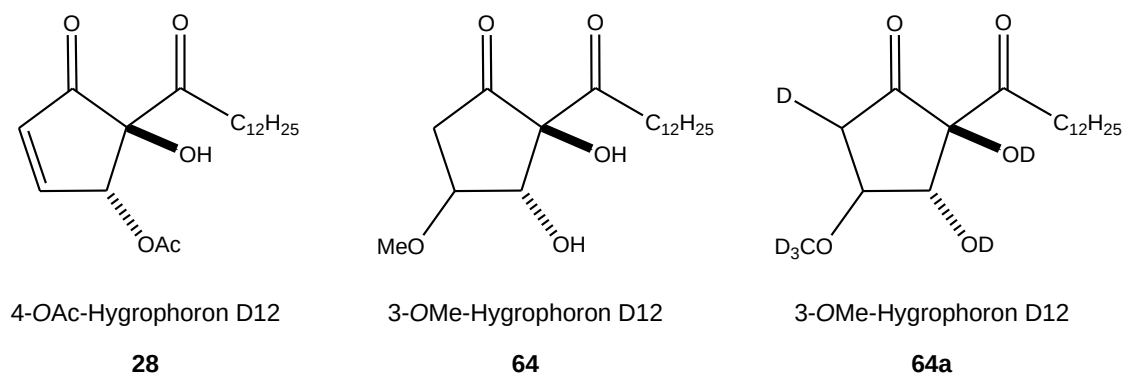


Abb. 63 Strukturformeln des 4-OAcetyl-Hygrophorons D12 (**28**), Metabolit m/z 341 (**64**) und des Deuterium-markierten Isotopomers **64a**.

Tabelle 17 Vergleich der Fragmentierung des 4-OAcetyl-Hygrophorons D12 (**28**) und des Metaboliten m/z 341 (**64**). Die blau unterlegten Bereiche sollen die differenziellen Fragmente hervorheben.

$[M-H-X]^-$	4-OAc Hygrophoron D12*	Metabolit m/z 341**
	m/z	m/z
$[M-H]^-$	351	341
$[M-H-H_2O]^-$	333	323
$[M-H-CO]^-$	323	-
$[M-H-CH_2CO]^-$	309	-
$[M-H-CH_3OH]^-$	-	309
$[M-H-CO_2]^-$	307	297
$[M-H-HOAc]^-$	291	-
$[M-H-CO_2-CH_2CO]^-$	265	-
$[M-H-CO_2-CH_3OH]^-$	-	265

der jeweilige Basispeak ist fett dargestellt. * bezieht sich auf Fragmentierung mittels LC-ESI-QqQ-MS².^{(55) (84)} ** bezieht sich auf MS²-Fragmentierung mittels Ionenfalle

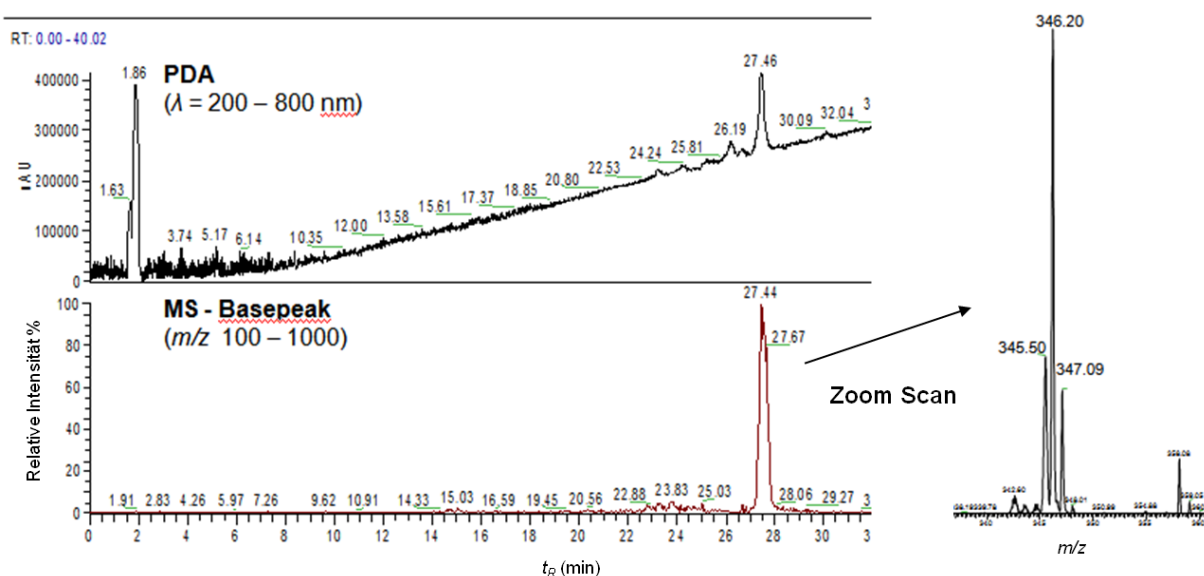


Abb. 64 LC-PDA- (oben) und LC-MS Chromatogramm (unten) (LC-MS1) nach Behandlung mit CD_3OD m/z 346 des isolierten Metaboliten m/z 341 (**64**) $t_R = 27,44$ min, sowie das korrespondierende Zoom Scan MS-Spektrum (rechts).

Zur genaueren Analyse nach Umsetzung mit CD_3OD , wurde ein „Zoom Scan“ durchgeführt. Dies zeigte, dass insgesamt sechs Deuteriumatome eingebaut wurden (m/z 346 $[\text{M-D}]^-$, **64a**) (Abb. 64 rechts). Zur Bestätigung wurde ebenfalls mittels FTICR-MS die exakte Masse bestimmt und daraus die Summenformel $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{D}_6^-$ abgeleitet. Ein Vergleich der MS^2 -Spektren vor und nach Markierung zeigt deutlich, dass anstelle von CH_3OH , CD_3OH direkt vom Molekölion abgespalten wird und in Kombination mit einem Verlust von CO_2 zum Basispeak m/z 266 $[\text{M-H-CO}_2\text{-CD}_3\text{OD}]^-$ führt (Abb. 65 und Tabelle 18). Zur Bestätigung wurde die Analyse ebenfalls mittels LC-ESI-QqQ- MS^2 durchgeführt.

Tabelle 18 Vergleich der MS^2 -Fragmente vor Markierung mit Deuterium m/z 341 (links) und nach Einbau (rechts) von fünf Deuterium m/z 346. (fett – Basispeak)

$[\text{M-H-X}]^-$	m/z 341 $[\text{M-H}]^-$	$[\text{M-D-X}]^-$	m/z 346 $[\text{M-H}]^-$
	m/z (Intensität %)		m/z (Intensität %)
$[\text{M-H}]^-$	341 (<5)		346 (<5)
$[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$	323 (<5)	$[\text{M-D-D}_2\text{O}]^-$	-
$[\text{M-H-CH}_3\text{OH}]^-$	309 (5)	$[\text{M-D-CD}_3\text{OH}]^-$	311 (<5)
$[\text{M-H-CO}_2]^-$	297 (10)	$[\text{M-D-CO}_2]^-$	302 (<5)
$[\text{M-H-CO}_2\text{-CH}_3\text{OH}]^-$	265 (100)	$[\text{M-D-CO}_2\text{-CD}_3\text{OD}]^-$	266 (100)

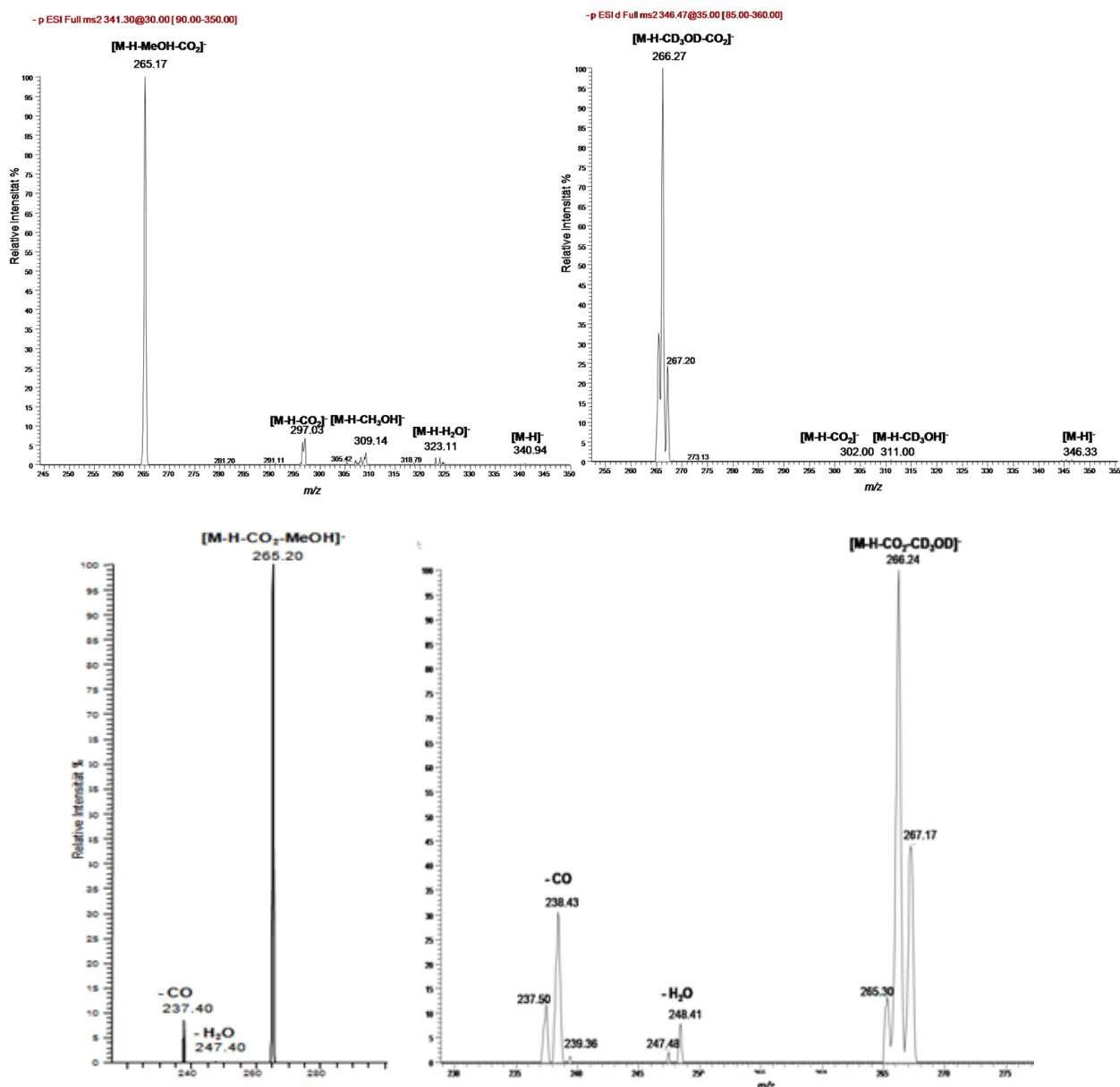


Abb. 65 Vergleich der MS²-Spektren vor (oben links) und nach Behandlung mit CD₃OD (oben rechts), sowie die MS³-Spektren des Basispeaks vorher (unten links) und nachher (unten rechts). Die Fragmentierung wurde bei einer relativen Stoßenergie von 30 % bei **64** und 35 % bei **64a** erzeugt.

Die Ergebnisse lassen eine Addition von MeOH bzw. CD₃OD vermuten. Zusätzlich sind bei dem markierten Isotopomer **64a** zufolge die Protonen der Hydroxylgruppen gegen Deuterium ausgetauscht. Daher handelt es sich bei dem Metaboliten **64** vermutlich um 3-OMethyl-2,3-dihydrohygrophoron D12 (**64**) mit einem Cyclopentanon-Grundgerüst (Abb. 63). Weitergehende Versuche zeigten, dass eine Addition von EtOH jedoch nicht möglich ist. Dieselbe Beobachtung wurde unter vergleichbaren Bedingungen ebenfalls bei dem 4-OAcetyl-Hygrophoron D14 (**30**) gemacht (nicht gezeigt).

Das heißt, dass in diesem Fall eine Korrelation zu einem Hygrophoron aufgestellt wurde, dieses jedoch durch **64** repräsentiert wird. Demnach ist der mittels AcorA identifizierte Metabolit m/z 341 (**64**) ebenfalls auf einen aktivitätsrelevanten Metaboliten zurückzuführen.

4.5.4 Vergleich der isolierten Metaboliten mit den Metabolitenprofilen von *H. latitabundus* und *H. poetarum*

In einem Rohextrakt aus *H. latitabundus* konnten mittels AcorA die Metaboliten in der Mischung identifiziert werden, die eine signifikante Korrelation zu der biologischen Aktivität aufweisen. Dabei fielen insbesondere die Metaboliten m/z 313 (**60**) und m/z 311 (**61**) auf, da diese als Peakcluster in der Hitliste enthalten waren. Um nachzuweisen, dass die identifizierten Peaks tatsächlich auf antibakterielle Verbindungen zurückzuführen sind, wurden diese isoliert, deren Struktur aufgeklärt und die biologische Aktivität verifiziert. Zum Vergleich ist in Abb. 66 das LC-MS Chromatogramm bei negativer Ionisierung des Rohextraktes aus *H. latitabundus* dargestellt (oben), sowie die LC-MS Chromatogramme der isolierten Metaboliten **60** und **61** (unten). Anhand der t_R ist deutlich zu erkennen, dass diejenigen Metaboliten isoliert wurden, die zuvor als positiv, korrelierend identifiziert wurden. Zudem konnte die biologische Aktivität gegen *B. subtilis* verifiziert werden. Es handelt sich daher bei den isolierten Verbindungen **60** und **61** in der Tat um aktivitätsrelevante Metaboliten.

In einem weiteren Experiment, bei welchen die Korrelationsanalyse bei verschiedenen Rohextrakten aus insgesamt neun unterschiedlichen *Hygrophorus* spp. durchgeführt wurde, war es ebenfalls möglich, eine signifikante Korrelation zwischen der biologischen Aktivität und einzelnen Peaks zu identifizieren. Dabei fiel auf, dass die isolierte Verbindung **61** auch in diesem Fall zu den aktivitätsrelevanten Peaks gehört. Weiterhin wurde ein Peakcluster identifiziert, welches auf den Metaboliten **64** zurückzuführen ist. Die Korrelation war in diesem Fall sehr auffällig, da sowohl die Isotopenpeaks des Molekülions als auch die Fragmente und deren Isotopenpeaks als signifikant korrelierend identifiziert werden konnten. Zur Bestätigung der biologischen Aktivität wurden die Metaboliten **61** und **64** aus *H. latitabundus* isoliert und auf die antibakterielle Wirkung gegen *B. subtilis* getestet. Anhand Abb. 67 ist deutlich zu erkennen, dass auch in diesem Fall die Metaboliten isoliert wurden, welche mittels AcorA bereits zuvor als aktivitätsrelevant identifiziert wurden.

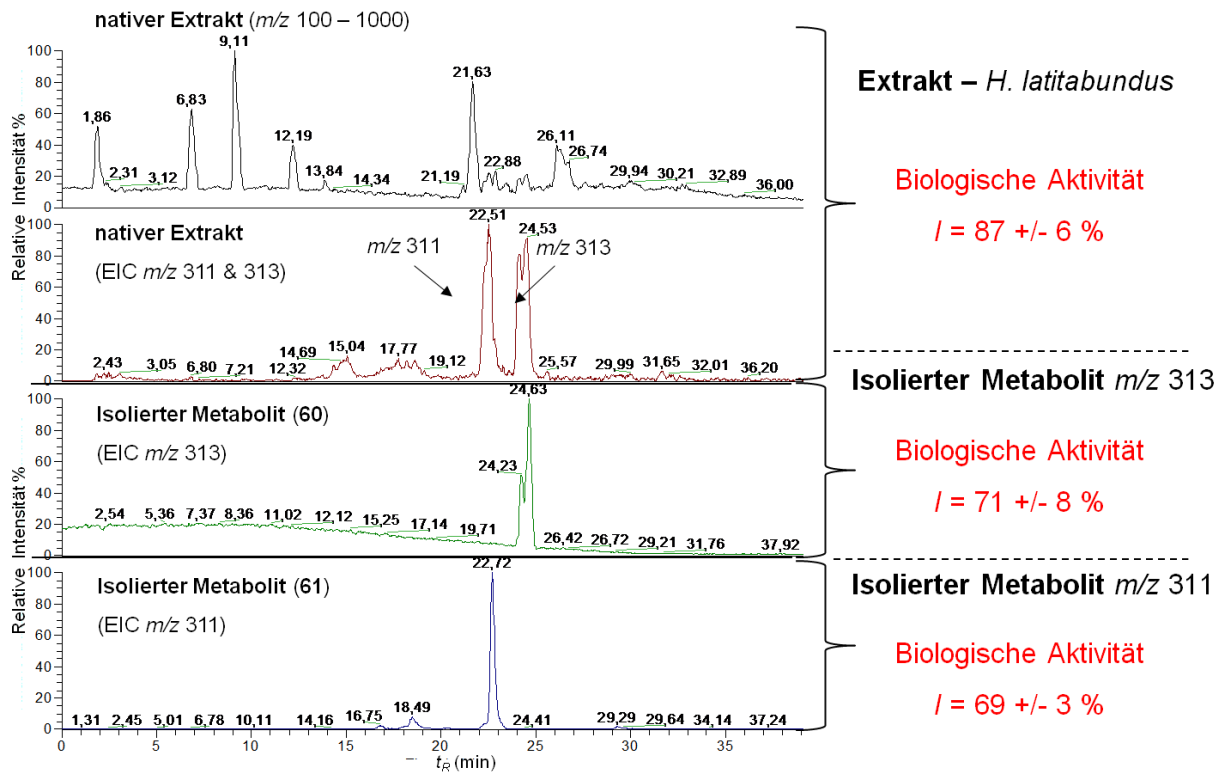


Abb. 66 Vergleich der LC-(-)ESI-MS Chromatogramme (LC-MS1) des Rohextraktes aus *H. latitabundus* und der isolierten Verbindungen **60** (m/z 313) und **61** (m/z 311). Zusätzlich sind an der rechten Seite die jeweiligen Aktivitäten gegen *B. subtilis* bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ aufgeführt.

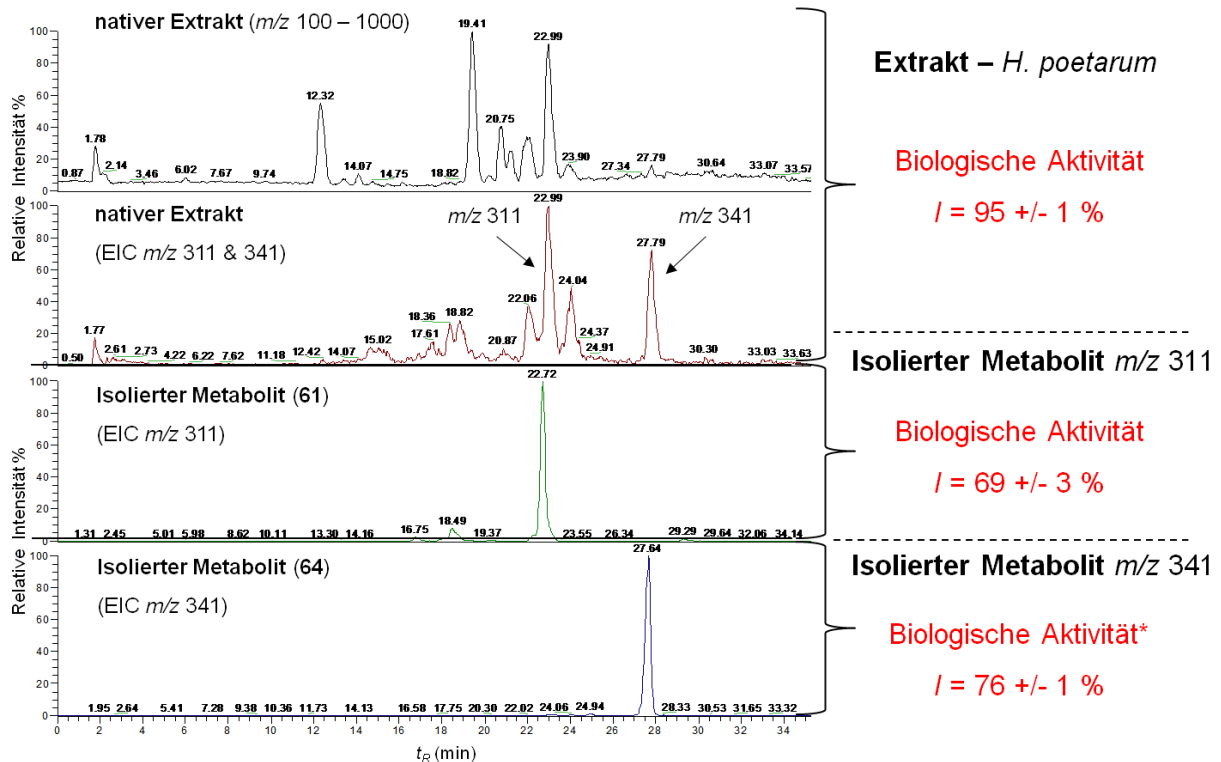


Abb. 67 Vergleich der LC-(-)ESI-MS Chromatogramme (LC-MS1) des Rohextraktes aus *H. poetarum* (getrocknet) und der isolierten Metaboliten **61** (m/z 311) und **64** (m/z 341). Die jeweiligen biologischen Aktivitäten gegen *B. subtilis* sind bei einer Konzentration von $\beta = 100 \mu\text{g/mL}$ bzw. bei **64** bei $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$, auf der rechten Seite aufgeführt.

5. Experimenteller Teil

5.1 Pilzmaterial

Die direkt aus frischem Material tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Nachfolgend ist in den Tabelle 19 bis Tabelle 22 das, in dieser Arbeit verwendete, Pilzmaterial aufgeführt.

Tabelle 19 Übersicht über das für den Vergleich der biologischen Aktivität, die Optimierung der Extraktion, der automatisierten LC-MSⁿ Methode sowie für die Datenanalyse mittels XCMS verwendete Pilzmaterial.

Spezies	Fundort	Datum	leg./det.	Kollektion
<i>Hygrophorus pustulatus</i> (Pers.) Fr. (1838)	Neudorf, Harz	25.11.03	Arnold	46/03
	Neudorf/Harzgerode, Harz	06.11.02	Arnold	84/02
	Neudorf, Harz	21.10.08	Arnold	111/08
<i>Hygrophorus erubescens</i> (Fr.) Fr. (1838)	Girnitztal, Regensburg	31.07.07	Arnold	40/97
	Reisberg, Ingolstadt	30.08.05	Arnold	34/05
<i>Hygrophorus russula</i> (Schaeff.) Kauffmann (1918)	Karlstadt, Main	06.10.98	Arnold	289/98
	Karlstadt, Main	20.10.05	Arnold	69/05
<i>Hygrophorus poetarum</i> Heim (1948)	Karlstadt, Main	11.10.95	Arnold	201/95
	Andechs, Bayern	20.10.04	Arnold	62/04
<i>Hygrophorus pudorinus</i> (Fr.) Fr. (1836)	Girnitztal, Regensburg	19.10.95	Arnold	262/95
	Regensburg	02.2007	Arnold	88/08
<i>Hygrophorus discoxanthus</i> Rea (1908)	Karlstadt, Main	26.10.01	Arnold	82/01
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> (Fr.) Fr. (1838)	Neudorf, Harz	30.09.03	Arnold	07/03
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	13.11.02	Lübken/ Arnold	87/02
<i>Hygrophorus agathosmus</i> (Fr.) Fr. 1838	Reisberg, Ingolstadt	06.10.00	Arnold	72/00

Tabelle 20 Übersicht über das, bei dem „Proof of concept“ mit nativen Extrakten, verwendete Pilzmaterial.

Spezies	Fundort	Datum	leg./det.	Kollektion
<i>Hygrophorus lucorum</i> Kalchbr. (1874)	Freyburg	30.10.07	Arnold	63/07
<i>Hygrophorus chrysodon</i> (Batsch.) Fr. (1838)	Uffenheim, Naturwald Reservat Wolfsee	26.09.94	Arnold	130/94
<i>Hygrophorus agathosmus</i> (Fr.) Fr. 1838	Reisberg, Ingolstadt	06.10.00	Arnold	72/00
<i>Hygrophorus pustulatus</i> (Pers.) Fr. (1838)	Neudorf, Harz	25.11.03	Arnold	46/03
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> (Fr.) Fr. (1838)	Smaland (Schweden)	17.-24.09.07	Arnold	-

Tabelle 21 Übersicht über das, für die Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten mittels AcorA, verwendete Pilzmaterial.

Spezies	Fundort	Datum	leg./det.	Kollektion
<i>Hygrophorus pustulatus</i> (Pers.) Fr. (1838)	Neudorf, Harz	07.11.03	Teichert	40/03
<i>Hygrophorus discoideus</i> (Pers.) Fr. (1838)	Andechs, Bayern	29.10.04	Arnold	81/04
<i>Hygrophorus lucorum</i> Kalchbr. (1874)	Freyburg	10.11.02	Arnold	65/02
<i>Hygrophorus poetarum</i> Heim (1948)	Andechs, Bayern	29.10.04	Arnold	88/04
<i>Hygrophorus unicolor</i> Gröger (1980)	Freyburg	02.11.02	Arnold	61/02
<i>Hygrophorus nemoreus</i> (Pers.) Fr. 1838	Freyburg	30.10.07	Arnold	53/07
<i>Hygrophorus arbustivus</i> Fr. (1836)	Freyburg	30.10.07	Huth	55/07
<i>Hygrophorus agathosmus</i> (Fr.) Fr. 1838	Prügel, Burgkunstadt	17.10.05	Arnold	38/05
<i>Hygrophorus gliocyclus</i> Fr. (1861)	Bad Bibra, Harz	30.10.02	Arnold	50/02
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	13.11.02	Arnold	87/02

Tabelle 22 Übersicht über das, für die Isolierung der bioaktiven Verbindungen, verwendete Pilzmaterial.

Spezies	Fundort	Datum	leg./det.	Kollektion
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	25.10.02	Huth	38/02
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	25.10.02	Huth	39/02
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	22.10.02	Huth	44/02
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	13.11.02	Arnold	87/02
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	08.11.03	Arnold	42/03
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	04.11.04	Arnold	97/04
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Bad Bibra, Harz	01.11.05	Arnold	78/05
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Freyburg	13.11.06	Arnold	85/06
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Freyburg	11.10.07	Arnold	39/07
<i>Hygrophorus latitabundus</i> Britzelm. (1899)	Freyburg	26.10.08	Arnold	114/08

5.2 Extraktion

Die Extraktion der zuvor aufgeführten Pilzfruchtkörper erfolgte entweder unter Verwendung eines automatischen Extraktors (Fa. Dionex ASE 200 Accelerated Solvent Extraction) bei getrocknetem Material, unter stetigem Schütteln oder mittels Ultraschall (Abb. 68).

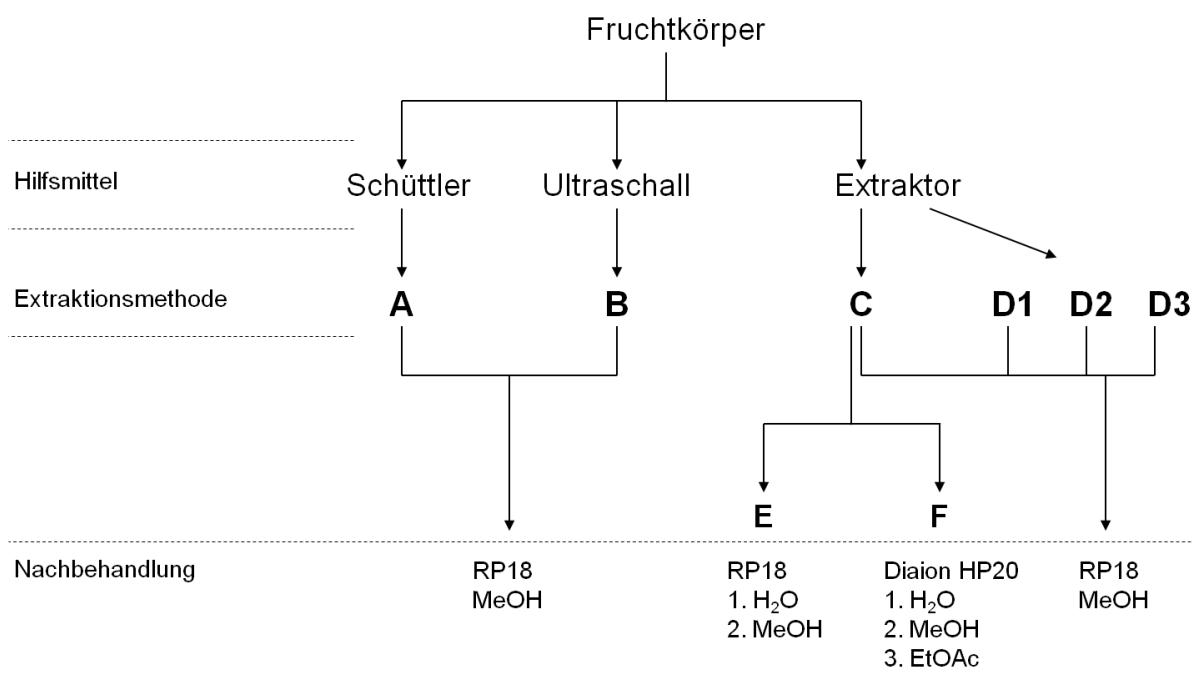


Abb. 68 Übersicht über die verwendeten Extraktionsmethoden und die jeweiligen Nachbehandlungen.

5.2.1 Extraktionsoptimierung

5.2.1.1 Mittels Ultraschall

Die tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper wurden von Moosresten und anhaftenden Blättern/Tannenadeln befreit und anschließend unter Zuhilfenahme eines Mixers (Fa. Braun) bzw. Ultraturrax (Fa. Jahnke und Kunkel) zerkleinert. Die Extraktionen erfolgten schließlich in einem Ultraschallbad der Firma Sonorex mit einer Frequenz von 35 kHz und einer Leistung von 320 W.

Verwendete Extraktionsmethoden für die Optimierung der Extraktion, LC-MS Methode und Datenanalyse

Für die Optimierung der Extraktion, LC-MS Methode und Datenanalyse mittels XCMS wurden die Fruchtkörper von *Hygrophorus pustulatus* (46/03) verwendet.

Extraktionsmethode A

10 g tiefgefrorene Pilzfruchtkörper wurden grob zerkleinert, mit 200 mL Petrolether versetzt und 1 h unter Schütteln extrahiert. Anschließend wurde die Pilzsuspension filtriert und der Pilzrückstand erneut mit 200 mL Petrolether versetzt. Nach einer Stunde wurde die Pilzsuspension erneut filtriert und gemäß der elutropen Reihe nach ansteigender Polarität in gleicher Vorgehensweise mit Ethylacetat, Aceton und Methanol (jeweils 2 x 200 mL) extrahiert.

Die jeweiligen Filtrate wurden vereinigt und anschließend *in vacuo* bis zur Trockne eingengt.

Extraktionsmethode B

10 g tiefgefrorene Pilzfruchtkörper wurden mit 50 mL Methanol versetzt und für 60 s im Mixer (Fa. Braun) zerkleinert. Anschließend wurden weitere 150 mL Methanol hinzugefügt und für 30 min mittels Ultraschall extrahiert. Die unlöslichen Pilzrückstände wurden durch Filtration von dem Extrakt abgetrennt. Nach der Trocknung *in vacuo* wurde der Extrakt in 10 mL MeOH gelöst. Ein Teil (ca. 50 %) des so erhaltenen Extraktes stand nun als MeOH-Extrakt zur Verfügung (ca. 70 mg). Der restliche Extrakt wurde anschließend in ca. 300 mL EtOAc/H₂O 5:1 (v/v) aufgenommen und 5 min lang gut durchmischt. Nach dieser Zeit wurde die Phasentrennung über Nacht herbeigeführt. Zur vollständigen H₂O Entfernung aus der Ethylacetat-Phase, wurde wasserfreies Na₂SO₄ hinzugegeben und anschließend durch Filtration abgetrennt.

Die so erhaltenen MeOH-, EtOAc- bzw. H₂O-Extrakte wurden bei 30°C mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt.

5.2.1.2 Mittels Extraktor

Die Extraktion von getrockneten und lyophilisierten Pilzfruchtkörpern erfolgte unter Verwendung eines automatischen Extraktors (Fa. Dionex). Die Pilzfruchtkörper wurden zuvor von Tannennadeln und Moosresten befreit und anschließend mittels Mörser und Pistill zerkleinert. Das so vorbereitete Pilzmaterial wurde zu gleichen Teilen auf die Extraktionszellen verteilt. Die Extraktion erfolgte anschließend unter der Vorgabe der in Tabelle 23 aufgeführten Einstellungen.

Für die Optimierung der Extraktion wurden jeweils 1 g lyophilisierte Fruchtkörper von *Hygrophorus pustulatus* (46/03) verwendet. Die Extraktion erfolgte unter Anwendung der gleichen Methodeneinstellungen (Tabelle 23). Zusätzlich wurde eine Blindprobe mitgeführt, welche durch Extraktion einer leeren Extraktionszelle erhalten werden konnte. Für die Optimierung der Extraktion und der Vorbereitung für weitere Analysen wurden zusätzlich verschiedene Nachbehandlungen durchgeführt (Tabelle 24).

Tabelle 23 Methodeneinstellung für die Extraktion mittels Extraktor (jeweils 3 Zyklen).

Vorgang	Einstellung
Vorheizen	2 min
Heizen	5 min
Statisch	10 min
Spülen	60 % vol
Entlüften	30 s
Druck	70 bar
Temperatur	40°C
Extraktionsmittel 1	80 % MeOH/H ₂ O
Extraktionsmittel 2	100 % MeOH
Extraktionsmittel 3	100 % <i>n</i> -Hexan

Tabelle 24 Übersicht über die Extraktionsmethoden und die jeweiligen Nachbehandlungen.

Extraktionsmethode	Extraktionsmittel	Nachbehandlung
C	80 % MeOH/H ₂ O	RP18 Kartusche, 100 % MeOH
D1	100 % MeOH	RP18 Kartusche, 100 % MeOH
D2	1. 100 % <i>n</i> -Hexan 2. 100 % MeOH	RP18 Kartusche, 100 % MeOH
D3	100 % <i>n</i> -Hexan	RP18 Kartusche, 100 % MeOH
E	80 % MeOH/H ₂ O	RP18 Kartusche 1. H ₂ O 2. MeOH
F	80 % MeOH/H ₂ O	Diaion HP20 1. H ₂ O 2. MeOH 3. EtOAc Anschließend RP18 Kartusche und MeOH für jeden einzelnen Extrakt

Extraktionsmethode C

Der gewonnene Extrakt wurde für die weiteren Analysen mittels Chromabond® RP18 Kartusche (500 mg/3 mL, Macherey-Nagel) und 100 % MeOH vorbereitet (Tabelle 24).

Extraktionsmethode D1, D2, D3

Die Vorbereitung für weitere Analysen erfolgte ebenfalls unter Verwendung von Chromabond® RP18 Kartusche (500 mg/3 mL, Macherey-Nagel) und Elution mit 100 % MeOH.

Extraktionsmethode E

Der erhaltene Extrakt wurde *in vacuo* so weit eingeeengt bis nur noch der wässrige Anteil vorhanden war. Anschließend wurden 2 x 10 mL dest. H₂O hinzugegeben und der Extrakt unter Verwendung einer Chromabond® RP18 Kartusche (500 mg/3 mL, Macherey-Nagel) in den wässrigen und methanolischen Anteil (Elution mit 5 x 3 mL MeOH) fraktioniert.

Extraktionsmethode F

Der erhaltene Extrakt wurde *in vacuo* bis zur Trockne eingeeengt und anschließend in 5 mL H₂O aufgenommen. Die Fraktionierung der Extraktsuspension erfolgte mit dest. H₂O, MeOH und EtOAc unter Verwendung von Diaion HP20 (Fa. Supelco).

Die erhaltenen Extrakte wurden *in vacuo* bis zur Trockne eingeeengt und anschließend mittels RP18 Kartuschen für die LC-MS Analyse (siehe hierzu Kapitel 5.7, Seite 121) vorbereitet.

5.2.2 Sonstige Extraktionsmethoden

Extraktionsmethoden für den Vergleich der biologischen Aktivität

Um den Einfluss des Extraktionsmittels bzw. den Zustand der Pilzfruchtkörper auf die biologische Aktivität zu analysieren, wurden die lyophilisierten Fruchtkörper mittels Mörser und Pistill zerkleinert und unter Verwendung des Extraktors mit *n*-Hexan und MeOH extrahiert (Extraktionsmethode D2). Hierfür wurden pro Spezies jeweils 3 x 1 g extrahiert. Die erhaltenen Extrakte wurden getrennt als biologische Replikate behandelt.

Zusätzlich wurden die tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper der gleichen Spezies in analoger Weise jedoch mittels Ultraschall ($P = 320 \text{ W}$, $f = 35 \text{ kHz}$, Fa. Sonorex) extrahiert. Dafür wurden jeweils 3 x 10 g Pilzmaterial unter Verwendung eines Mixers zerkleinert und anschließend mit 10 mL *n*-Hexan versetzt. Die Extraktion erfolgte dann für 10 min bei 40°C. Nach dieser Zeit wurde die Pilzsuspension filtriert und erneut mit 10 mL *n*-Hexan versetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal mit *n*-Hexan und anschließend dreimal mit 100 % MeOH durchführt. Die Filtrate wurden vereinigt und *in vacuo* bis zur Trockne eingeeengt. Siehe hierzu auch im Anhang Tabelle a - 1.

Extraktionsmethoden für das „Proof of concept“ mit nativen Extrakten

Neben den oben aufgeführten Extraktionsmethoden A, C, D1 und D2 wurden die Pilzfruchtkörper unter Verwendung einer Schere grob zerkleinert und anschließend mit 80 % MeOH/H₂O oder 100 % MeOH unter stetigem Schütteln extrahiert. Das Lösungsmittel wurde bei 30°C im Vakuumrotationsverdampfer entfernt. Siehe hierzu auch Tabelle a - 2 im Anhang.

Extraktionsmethoden für die Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten

Für die Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten in Rohextrakten wurde die Extraktionsmethode D1 (lyophilisiertes und getrocknetes Pilzmaterial) verwendet. Sofern getrocknetes Material eingesetzt wurde, erfolgte die Trocknung für 32 Stunden bei 40°C im Trockenschrank (Fa. Binder). Anschließend wurde die Extraktion von jeweils 2 g Trockengewicht unter Verwendung von Extraktionsmethode D1, wobei jede Zelle zweifach extrahiert wurde, durchgeführt. Zusätzlich wurden tiefgefrorene Pilzfruchtkörper mittels Ultraschall ($P = 320 \text{ W}$, $f = 35 \text{ kHz}$, Fa. Sonorex) extrahiert. Hierfür wurden jeweils ca. 60 g tiefgefrorene Pilzfruchtkörper mit ca. 80 mL MeOH versetzt und mittels Ultraturrax (Fa. Jahnke und Kunkel) zerkleinert. Anschließend wurden ca. 320 mL MeOH hinzugegeben und die Pilzsuspension bei 40°C mittels Ultraschall für 20 min extrahiert. Nach dieser Zeit wurden ca. 200 mL des Extraktes entfernt und erneut 200 mL MeOH hinzugegeben. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Zum Schluss wurde alles vereinigt und mittels Filtration von dem Pilzrückstand getrennt. Die Trocknung erfolgte *in vacuo* bei 30°C. Siehe hierzu auch Tabelle a - 3 im Anhang.

Extraktionsmethoden für die Isolierung und Aufreinigung

Hierfür wurden sowohl lyophilisierte als auch tiefgefrorene Pilzfruchtkörper von *Hygrophorus latitabundus* verwendet. Die lyophilisierten Pilzfruchtkörper wurden mittels Mörser und Pistill zerkleinert und anschließend mit Hilfe des Extraktors (Extraktionsmethode D1, 100 % MeOH) extrahiert. Ca. 30 g des getrockneten Pilzmaterials wurden dafür gleichmäßig auf 16 Extraktionszellen verteilt und jede Zelle 3x extrahiert. Anschließend wurde alles vereinigt und am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt. Für die Isolierung wurde der MeOH-lösliche Teil des Extraktes verwendet (ca. 5,3 g). Für die Extraktion der tiefgefrorenen Pilzfruchtkörper wurden ca. 1,5 kg eingesetzt. Die Fruchtkörper wurden unter Zuhilfenahme eines Mixers zerkleinert und anschließend zu gleichen Teilen auf mehrere Erlenmeyerkolben verteilt. Anschließend wurde jeweils 1 L EtOAc hinzu gegeben und die Pilzsuspension für 30 min mittels Ultraschall extrahiert. Der Überstand wurde anschließend filtriert und erneut 1 L EtOAc hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde pro Kolben insgesamt dreimal durchgeführt. Zum Schluss wurden die Filtrate vereinigt und *in vacuo* bis zur Trockne eingengt. Der so erhaltene Extrakt wurde erneut in EtOAc aufgenommen und zu gleichen Teilen mit dest. H₂O versetzt. Das Zweiphasen-System wurde kräftig durchmischt und anschließend die Phasentrennung herbeigeführt. Nach der Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgetrennt und die EtOAc-Phase erneut 1:1 (v/v) mit dest. H₂O versetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Zum Schluss wurde die EtOAc-Phase durch Zugabe von wasserfreien Na₂SO₄ getrocknet und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel wurde *in vacuo* vollständig entfernt. Es wurden ca. 5 g Rohextrakt gewonnen.

5.3 Biotest

Für die Bestimmung der biologischen Aktivität wurde ein Fluoreszenz-basierter, antibakterieller Biotest entwickelt und etabliert. Die Durchführung erfolgte dabei im Mikrotiterplatten-Format unter (semi-)quantitativen Bedingungen. Als Testorganismus wurde ein gentechnisch veränderter Stamm des gram-positiven Bakteriums *Bacillus subtilis* 168 (P_{AbrB} -IYFP) verwendet, welcher von Prof. O. Kuipers (Universität Groningen, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurde.⁽⁷⁸⁾ Der Testorganismus besitzt die Fähigkeit eine verbesserte Variante des gelb-fluoreszierenden Proteins (IYFP) zu produzieren, wobei die Expression des Fusionsproteins durch den Promotor *abrB* gesteuert wird. Da der Promotor nur während der exponentiellen Wachstumsphase aktiv ist, wird nur in dieser Zeit das gelb-fluoreszierende Protein produziert. Die Fluoreszenz ist somit direkt proportional zu der Zellzahl und ermöglicht daher die Quantifizierung der Zellvitalität.

5.3.1 Medium

Für die Kultivierung des Testorganismus *Bacillus subtilis* 168 wurde ein komplexes Nährmedium (Trypton-Hefeextrakt TY) verwendet (Tabelle 25 und Tabelle 26). Zur Selektion der Mutanten wurde zusätzlich Chloramphenicol dem Medium hinzugesetzt.

Alle verwendeten Instrumente und Nährmedien wurden für 20 min bei 121°C im Autoklaven (Fa. H +P) sterilisiert. Die Antibiotika-Lösung wurde unter Zuhilfenahme eines Sterilfilters (Fa. Nalgene), Porengröße 0,2 µm sterilisiert und dem sterilen Nährmedium gesondert zugesetzt. Die Stammhaltung des Testorganismus auf festem Nährmedium erfolgte für 12 – 24 h bei 30°C und anschließend bei 4°C. Sofern feste Nährmedien verwendet wurden, wurden jeweils 1,5 % Agar Agar (Fa. Fluka) hinzugefügt.

Tabelle 25 Sporulationsmedium

	Konzentration
Dehydrated nutrient broth	8 g/L
NaOH	0,5 mM
MgSO ₄	1 mM
KCl	1 g/L
Ca(NO ₃) ₂	1 mM
MnCl ₂	0,01 mM
FeSO ₄	0,001 mM
Chloramphenicol	5 µg/mL

Tabelle 26 TY – Nährmedium (*Bacillus subtilis*)

	Anteil (%)	Menge für 900 mL
Trypton, (Fa. BD)	1	9 g
Hefeextrakt, (Fa. Serva)	0,5	4,5 g
NaCl, (Fa. Roth)	1	9 g
Chloramphenicol $\beta = 1$ g/L	5 μ g/mL	4,5 mL

5.3.2 Testsystem

Die Durchführung des antibakteriellen Biotests erfolgte in schwarzen 96-Well Mikrotiterplatten (Fa. BD™ Falcon). Um eine möglichst geringe Wölbung der Flüssigkeitsoberfläche zu erzielen, wurden Mikrotiterplatten mit einem flachen Well-Boden ausgewählt. Das maximale Wellvolumen betrug dabei 340 μ L. Als Inokulum wurde eine 24 h - Vorkultur verwendet, welche in sterilen 100 mL Erlenmeyerkolben angezogen wurde. Dafür wurden ca. 50 mL TY-Medium mit einer Impföse voll angeimpft. Die Inkubation erfolgte anschließend für 24 h bei 30°C als Standkultur. Nach dieser Zeit wurde die Bakterienzellzahl der Vorkultur mittels Neubauer-Kammer (Durchschnittliche Anzahl Zellen pro Kleinstquadrat $\times 4000 \times 10^3 = \text{Zellzahl/mL}$) bestimmt und auf die erforderliche Zellzahl von $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL in 10er Schritten mit TY-Medium verdünnt. Je Mikrotiterplatte wurden drei Kontrollen K1, K2 und K3 mitgeführt (jeweils sechs Replikate außer bei K1). K1 dient dabei als Kontrolle auf Eigenfluoreszenz der Extrakte. K2 ist die Wachstumskontrolle für die Bakteriensuspension und K3 ist die Wachstumskontrolle mit Lösungsmittel (Bezugskontrolle), welche 100 % Wachstum entspricht. Zusätzlich wurde Erythromycin ($c = 10^{-4}$; 10^{-2} und 10^0 μ M in MeOH) als Referenzsubstanz verwendet. Die Proben wurden jeweils in drei verschiedenen Konzentrationen ($\beta = 1$; 10 und 100 μ g/mL in MeOH) mit je drei Replikaten getestet. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die vorliegende Konzentration in der Kavität.

TY: 300 μ L TY-Medium

K1: 270 μ L TY-Medium + 30 μ L Probe (höchste Konzentration)

K2: 270 μ L TY-Medium + 30 μ L Bakteriensuspension (Inokulum $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL)

K3: 240 μ L TY-Medium + 30 μ L MeOH + 30 μ L Bakteriensuspension (Inokulum $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL)

Proben: 240 μ L TY-Medium + 30 μ L Probe (in 100 % MeOH) + 30 μ L Bakteriensuspension (Inokulum $1,6 \times 10^5$ Zellen/mL)

Nach dem Beimpfen der Mikrotiterplatten mit dem Inokulum erfolgte sofort die Messung zum Zeitpunkt t_0 mit einem Mikrotiterplattenreader GENios Pro (Fa. Tecan) bei einer Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{ex}} = 510 \text{ nm}$ und einer Emissionswellenlänge von $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$ (Tabelle 27). Die Inkubation erfolgte anschließend für 15 h bei 30°C als Standkultur. Nach dieser Zeit wurde die Mikrotiterplatte erneut gemessen (Zeitpunkt t_{15}). Die Berechnung der prozentualen Wachstumsinhibierung erfolgte nach der folgenden Formel bezogen auf K3.

$$\% - \text{Inhibierung} = \left(1 - \frac{\overline{X}_{\text{arithm}}(\text{Probe}[t_{15} - t_0])}{\overline{X}_{\text{arithm}}(\text{K3}[t_{15} - t_0])} \right) * 100$$

Tabelle 27 Übersicht über die Messparameter.

Messparameter	Einstellung
Emissionswellenlänge λ_{em}	510 nm (Bandbreite 10)
Exzitationswellenlänge λ_{ex}	535 nm (Bandbreite 10)
Messmodus	von oben
Verstärkung (manuell)	60
Anzahl der Blitze	10
Verzögerungszeit	0 μs
Integrationszeit	40 μs
Spiegelauswahl (automatisch)	50 %
Messungen pro Kavität	3x3 quadratisch
Temperatur	27°C
Schütteldauer (linear)	10 s
Schüttelintensität	Niedrig
Setzzeit	1 s
Einheit	RFU

5.4 Entwicklung von Modifikationsmethoden

Für die Entwicklung von verschiedenen Modifikationsmethoden wurde lyophilisiertes Material von *Hygrophorus pustulatus* verwendet. Dafür wurden ca. 12 g mit 100 % MeOH (Methode D1, 2x pro Zelle) extrahiert. Der so erhaltene Extrakt wurde auf die notwendige Anzahl Extrakt-Aliquote zu jeweils 50 mg aufgeteilt. Für die Entwicklung von geeigneten Modifikationsverfahren, wurden die in Tabelle 28 aufgeführten Methoden mit jeweils zwei Replikaten durchgeführt.

Modifikation durch Erhitzen

Der Einfluß von Hitze auf die Extrakte wurde mittels Erwärmen auf 100°C im Trockenschrank (Fa. Heraeus) und auf 121°C im Dampfautoklav (Fa. H+P) getestet. Dafür wurden die

Extrakt-Aliquote sowohl in getrockneter Form der Modifikationsmethode unterzogen (Tabelle 28, F1-F6), als auch in Wasser gelöst (Tabelle 28, F27 und F29). Beides erfolgte bei einer Einwirkzeit von 10 min und 30 min.

Zusätzlich wurden die Extrakt-Aliquote in Methanol auf 68°C erhitzt. Dafür wurden diese in 40 mL MeOH gelöst und mit Hilfe eines Wasserbades ($T_{\text{Wasserbad}} = 90^{\circ}\text{C}$) für 15 min in MeOH zum Sieden gebracht (Tabelle 28, F9 – F10, $T_{\text{Probe}} = 65^{\circ}\text{C}$).

Tabelle 28 Übersicht über die verwendeten Modifikationsmethoden.

Bezeichnung	Lösungsmittel	Modifikationsmethode
F1 & F2	Trocken	Trockenschrank 100°C, 10 min
F3 & F4	Trocken	Trockenschrank 100°C, 30 min
F5 & F6	Trocken	Autoklav, 121°C, 20 min
F7 & F8	-	Nativ
F9 & F10	40 mL MeOH	In MeOH sieden ($T = 68^{\circ}\text{C}$), 15 min
F11 & F12	20 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1 (v/v)	Ozonolyse, 30 min
F13 & F14	ca. 4 mL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v)	SAX, Elution mit $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v) und MeOH
F15 & F16	ca. 9 mL A. dest	Diaion HP20, Elution mit H_2O , MeOH und EtOAc
F17 & F18	50 mL MeOH	500 mg Aktivkohle, 5 min
F19 & F20	4 mL $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v)	SCX, Elution mit $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v) und MeOH
F21 & F22	ca. 9 mL A. dest	XAD 7-HP, Elution mit H_2O , MeOH und EtOAc
F23	50 mL MeOH	UV $\lambda = 254$ nm 60 min
F24	50 mL MeOH	5 mg Aktivkohle, 1 min
F25	50 mL MeOH	5 mg Aktivkohle, 10 min
F26	1,5 mL MeOH	6 mL 3 % H_2O_2 -Lösung, 1 h
F27	50 mL A. dest	Trockenschrank, 100°C 30 min
F28	50 mL MeOH	50 mg Aktivkohle, 5 min
F29	3 mL A. dest	Autoklav, 121°C, 20 min

Die Analyse der modifizierten Extrakte erfolgte im Anschluß mittels LC-MS.

Modifikation durch UV-Bestrahlung

Für die Modifikation durch UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm wurden die Extrakt-Aliquote (50 mg) in 50 mL MeOH gelöst und in einem unverschlossenem Becherglas für 60 min von oben mit einer Leistung von 8 W bestrahlt (Tabelle 28, F23).

Modifikation durch Adsorption an Aktivkohle

Die Adsorption der enthaltenen Metaboliten erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Mengen (5; 50; 500 mg) an Aktivkohle und variabler Zeitdauer ($t = 1; 5; 10$ min). Die Extrakt-Aliquote (50 mg) wurden dafür in 50 mL MeOH gelöst und unter stetigem Rühren an Aktivkohle (Fa. Merck) adsorbiert (Tabelle 28, F17-F18, F24-F25 und F28). Nach dieser Zeit wurde die Suspension zuerst durch einen Faltenfilter (Fa. Sartorius) und zusätzlich durch einen PTFE-Spritzenfilter (Fa. Carl Roth GmbH) mit einer Porengröße von 0,45 μm gereinigt.

Modifikation durch Oxidation mit H_2O_2 und Ozonolyse

Die chemische Modifikation der Extrakt-Aliquote (50 mg) erfolgte durch die Oxidation mit H_2O_2 und durch Ozonolyse. Für die Oxidation mit H_2O_2 wurden die Extrakt-Aliquote in 1,5 mL MeOH gelöst und mit 6 mL wäßriger 3 %iger H_2O_2 -Lösung versetzt und 60 min lang unter gelegentlichem Umschwenken dem oxidativen Einfluss des H_2O_2 ausgesetzt (Tabelle 28, F26).

Für die Modifikation durch Ozonolyse wurde der Extrakt in 20 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1:1 (v/v) gelöst. Die Einleitung von O_3 erfolgte in den eisgekühlten Extrakt unter stetigem Rühren. Nach ca. 30 min wurde das O_3 durch N_2 ausgetrieben und die Reaktion durch die Zugabe von 100 μL DMS gestoppt (Tabelle 28, F11-F12).

Modifikation durch chromatographische Verfahren

Für die Modifikation mittels verschiedener chromatographischer Methoden erfolgte zum einen die Adsorption an polymere stationäre Phasen und zum anderen die Ionenaustauschchromatographie mittels starken Anionen- und Kationenaustauscher.

Vor der Adsorption an die polymeren Phasen, Diaion HP20 (Fa. Supelco) und XAD 7-HP (Fa. Supelco), wurden diese 15 min mit einem Überschuss an MeOH aktiviert. Nach dieser Zeit wurde das MeOH abdekantiert und das Adsorbermaterial mehrfach mit H_2O gewaschen. Anschließend wurde die Suspension in eine Kartusche (Varian Bond Elut Reservoir, Fa. Varian) gefüllt und mit destilliertem Wasser (A. dest) konditioniert. Die Extrakt-Aliquote (50 mg) wurden ebenfalls in ca. 9 mL A. dest gelöst und gleichmäßig auf die Kartusche aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 3 Säulenvolumen (SV) destillierten H_2O , 5 SV MeOH und zum Schluß 4 SV EtOAc (Tabelle 28, F15-F16 und F21-F22).

Die Modifikation mittels Anionen- und Kationenaustauscher erfolgte in ähnlicher Weise. In beiden Fällen wurden starke Ionenaustauscher Materialien verwendet. Der starke Kationenaustauscher (500 mg LiChrolut SCX- Na^+ -Form, Fa. Merck) bzw. der starke Anionenaustauscher (400 mg Adsorbex® SAX- Cl^- -Form², Fa. Merck) und der Anionenaustauscher III (OH^- -Form, Fa. Merck) wurden zu Beginn mit 2 SV MeOH

² Gegenion ist vermutlich Cl^- (alte Lagerbestände)

konditioniert und anschließend mit 3 SV MeOH/H₂O 1:1 (v/v) equilibriert. Die Extrakt-Aliquote wurden mit 2 mL MeOH versetzt und im Anschluss daran 2 mL A. dest hinzugefügt. Die Elution erfolgte zu Beginn mit 4 SV MeOH/H₂O 1:1 (v/v) und 4 SV MeOH (Tabelle 28, F13-F14, F19-F20).

Alle modifizierten Extrakt-Aliquote wurden vor der weiteren Analyse mittels LC-ESI-Ion trap-MS³ unter Zuhilfenahme von Chromabond® SPE RP18 Kartuschen 3 mL/500 mg (Fa. Macherey-Nagel) vorbereitet. Dafür wurden die Extrakte in 3 x 3 mL MeOH gelöst und auf die zuvor mit 5 SV konditionierte RP18 Kartusche aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 5 SV MeOH unter Vakuum (-20 In Hg) mit Hilfe einer Probenkammer (Fa. Macherey-Nagel).

5.5 Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten

Für die Methodenentwicklung zur Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

5.5.1 „Proof of concept“ mit artifiziellen Extrakten

Zu Beginn wurden fünf künstliche Extrakte (AE) bestehend aus 15 -19 biologisch inaktive Reinsubstanzen mit „bekannter Konzentration hergestellt. Die Auswahl der Reinsubstanzen erfolgte zufällig aus einem Pool von insgesamt 23 Einzelsubstanzen (Anhang, Tabelle a - 5). Die Zusammensetzung der künstlichen Extrakte sowie die jeweilige Konzentration der enthaltenen Verbindungen wurde zufällig generiert (Tabelle 29).

Für die Herstellung der künstlichen Extrakte wurden jeweils 50 µL der in Tabelle 29 aufgeführten Ausgangslösungen verwendet. Sofern „0“ generiert wurde, wurden 50 µL MeOH dem künstlichen Extrakt zugesetzt. So dass das Gesamtvolumen bei allen fünf AE's 1100 µL betrug. Aufgrund dessen erfolgte eine Verdünnung (Faktor 1:22) aller Substanzen. Zu den so erhaltenen künstlichen Extrakten wurden verschiedene Mischungen und Konzentrationen der Antibiotika Amoxicillin, Erythromycin und Rifampicin (Endkonzentration $c = 10; 0,1; 0,0001; 0 \mu\text{M}$) hinzugefügt. Die Zusammensetzung der 16 Antibiotika Mischungen und die Kombination mit den verschiedenen AE's erfolgte ebenfalls nach dem Zufallsprinzip (Tabelle 30). Von den hergestellten Extrakten wurden jeweils 350 µL Aliquote mit 50 µL der angegebenen Antibiotika-Lösung versetzt. Eine „Konzentration von 0“ µM wurde entsprechend durch 50 µL MeOH ersetzt.

Die so erhaltenen antibiotisch aktiven Extrakte wurden anschließend 1:10 und 1:100 mit MeOH verdünnt und auf ihre antibakterielle Aktivität gegen *Bacillus subtilis* getestet. Parallel dazu erfolgte die Messung mittels „data dependent“ (DDIT) LC-ESI-Ion trap-MS³ bei positiver Ionisierung (Kapitel 5.7.1, Seite 122). Die Extrakte wurden dabei in zufälliger Reihenfolge mit jeweils drei Replikaten gemessen.

Die Datenanalyse sowie die Korrelationsanalyse wurden entsprechend den in Kapitel 5.6, Seite 120, aufgeführten Angaben durchgeführt. Für die Korrelationsanalyse wurden die biologischen Aktivitäten bei einer 1:10 Verdünnung der Extrakte verwendet.

Tabelle 29 Zusammensetzung der künstlichen Extrakte (AE) 1 bis 5. Die angegebene Konzentration bezieht sich auf die Ausgangslösung der jeweiligen Substanz. Sofern „0“ angegeben ist wurde MeOH hinzugefügt.

Substanz	Stammlösung c (mM) in MeOH				
	AE1	AE2	AE3	AE4	AE5
Prolin	0,01	0,01	1	0,1	0,01
Fumarsäure	0,01	1	0	0,01	1
Nicotinsäure	0,01	0,01	0,01	0	0
Tyramin	0	0,01	0	0,1	0,1
Anthranilsäure	1	1	0,01	0,01	0,01
Norharman	0,1	0,01	0,1	0	1
Indolessigsäure	1	1	1	0	1
4-Methoxyzimtsäure	0,01	1	1	0	0,1
Mannose	0	1	0	1	0,01
Mannitol	0,01	0	0	1	0
Ferulasäure	0,01	0,1	0,01	0,01	0,01
Tryptophan	0,1	0,01	0	0	0,01
Palmitinsäure	0	1	1	0,1	0,01
Adenosin	0,1	0,01	0,01	0,1	0,01
Emodin	0,1	0	0,1	0,1	0
Codein	0,01	0,01	0,1	1	1
Dimethoxy-chalepentin	0	1	0,01	0,1	0,01
Swietenocoumarin F	0,01	0,1	0	0,1	1
Salazinsäure	0,01	1	1	0,1	0,01
Tomatidin	0	0	1	0,1	0
Betulinsäure	0,1	0,1	1	0,1	0,01
Solanin	1	1	1	0,1	1

Tabelle 30 Übersicht über die verwendeten Antibiotika-Mischungen, sowie deren Kombination mit den AE's und die ermittelte Bioaktivität bei $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ im Well.

Antibiotika Mischung Nr.	Stammlösung c (μM) in MeOH			Kombination mit AE Nr.	Inhibierung (%)
	Amoxicillin	Erythromycin	Rifampicin		
1	10^{-2}	10^{-2}	100	4	59,1 +/- 2,4
2	100	1	100	5	64,2 +/- 3,4
3	0	10^{-2}	0	5	21,8 +/- 2,0
4	10^{-2}	10	100	5	62,5 +/- 2,4
5	10^{-2}	0	1	3	13,0 +/- 12,6
6	100	10^{-2}	10^{-2}	2	10,2 +/- 4,7
7	1	10^{-2}	0	3	33,5 +/- 11,4
8	0	0	10^{-2}	5	19,6 +/- 16,8
9	1	10	10^{-2}	1	65,8 +/- 1,5
10	100	0	10^{-2}	2	11,2 +/- 14,5
11	0	10^{-2}	0	4	-11,3 +/- 2,2
12	100	10^{-2}	10^{-2}	2	6,4 +/- 5,8
13	1	1	10^{-2}	3	44,0 +/- 14,3
14	100	1	1	1	13,4 +/- 0,9
15	1	10^{-2}	100	1	62,4 +/- 1,3
16	0	0	100	3	60,9 +/- 0,8

5.5.2 „Proof of concept“ mit nativen Extrakten

Variationssimulation mittels zugesetzter Antibiotika

Zur Steigerung der Komplexität der Matrix wurde das oben dargestellte „Proof of concept“ Experiment in gleicher Weise mit nativen Extrakten (E) durchgeführt. Dafür wurden biologisch schwach aktive Extrakte aus fünf verschiedenen *Hygrophorus*-Arten verwendet (Tabelle 31 und Tabelle a - 2).

Tabelle 31 Übersicht über die verwendeten Spezies und die Extrakt Nummer.

Spezies	Extrakt Nr.
<i>Hygrophorus lucorum</i>	1
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	2
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	3
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	4
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	5

Vor der weiteren Verwendung der Extrakte erfolgte die Vorbereitung mittels SPE Chromabond® RP18 Kartuschen (siehe hierzu Kapitel 5.7, Seite 121) und MeOH als Elutionsmittel. Von den Extrakten wurde anschließend eine $\beta = 18$ mg/mL Stammlösung in MeOH angesetzt. Die Variation der biologischen Aktivität wurde mittels zugesetzter Antibiotika simuliert. Die Zugabe der Antibiotika-Mischungen und die Kombination mit den nativen Extrakten erfolgte in gleicher Weise wie in Tabelle 30 dargestellt. Es wurde jedoch die geringste Konzentration der Antibiotika durch eine zehnfach höhere ersetzt (Endkonzentration $c = 10; 0,1; 0,01$ μ M). Von den Extrakten E1 – E5 wurden jeweils 850 μ L Aliquote mit je 50 μ L der angegebenen Antibiotika-Lösung bzw. 50 μ L MeOH versetzt. So dass ein Gesamtvolumen von 1000 μ L erhalten werden konnte. Die Endkonzentration der mit Antibiotika versetzten Extrakte betrug somit $\beta = 15,3$ mg/mL.

Für die Ermittlung der biologischen Aktivität wurden die Extrakte ebenfalls 1:10 und 1:100 in MeOH verdünnt und auf ihre antibakterielle Wirkung getestet. Die DDIT-LC-(+)ESI-Ion trap-MS³ Messung und die Datenanalyse erfolgten in gleicher Weise wie zuvor beschrieben.

Variationssimulation mittels verschiedener Modifikationsmethoden

Für die Variationssimulation mittels verschiedener Modifikationsmethoden wurde lyophilisiertes Material von *Hygrophorus chrysodon* verwendet. Für das folgende Experiment wurden ca. 2,26 g Rohextrakt eingesetzt. Der Extrakt wurde in 226 mL MeOH gelöst, so dass eine $\beta = 10$ mg/mL Stammlösung zur Verfügung stand. Die unlöslichen Teile wurden verworfen. Zur Simulation einer nativen Bioaktivität wurden die Antibiotika Erythromycin und Rifampicin hinzugefügt, so dass jeweils 10 μ M in der Extraktlösung enthalten waren. Der so erhaltene bioaktive Extrakt wurde zu 50 mg Aliquoten den in Tabelle 32 aufgeführten Modifikationsmethoden unterzogen (siehe auch Kapitel 5.4., Seite 112). Anschließend erfolgte die Analyse mittels DDIT LC-(+)ESI-Ion trap-MS³ und die Bestimmung der biologischen Aktivität (siehe Kapitel 5.3 Seite 110). Für die Korrelationsanalyse wurden die Bioaktivitäten der 1:15 Verdünnungen herangezogen.

Tabelle 32 Übersicht über die verwendeten Modifikationsmethoden zur Erzeugung der Variation eines *Hygrophorus chrysodon* MeOH-Extrakt.

Bezeichnung	Lösungsmittel	Modifikationsmethode
F1	MeOH	Nativ ohne Antibiotika
F2	50 mL A.dest	Autoklav, 121°C, 20 min
F3	50 mL A. dest	Trockenschrank, 100°C 30 min
F4	6 mL A. dest	XAD 7-HP, Elution mit H ₂ O, MeOH und MeOH/EtOAc 1:1 (v/v)
F5	50 mL MeOH	In MeOH sieden (T = 68°C), 15 min
F6	6 mL A. dest	Diaion HP20, Elution mit H ₂ O, MeOH und MeOH/EtOAc 1:1 (v/v)
F7	MeOH	Nativ mit Antibiotika
F8	50 mL MeOH	5 mg Aktivkohle, 5 min
F9	4 mL MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	SCX, Elution mit MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v) und MeOH
F10	4 mL MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	SAX, Elution mit MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v) und MeOH
F11	50 mL MeOH	50 mg Aktivkohle, 5 min
F12	50 mL MeOH	500 mg Aktivkohle, 5 min

Die Analyse der modifizierten Extrakte erfolgte im Anschluß mittels LC-MS.

5.5.3 AcorA mit biologisch aktiven Extrakten

Methanol Extrakt aus Hygrophorus latitabundus

Für die Identifizierung der aktivitätsrelevanten Metaboliten wurden ca. 7 g lyophilisiertes Material von *Hygrophorus latitabundus* mittels Extraktionsmethode D1 (100 % MeOH) extrahiert. Nach der Extraktion standen ca. 1,8 g Rohextrakt zur Verfügung. Der so erhaltene Rohextrakt wurde zu 50 mg Aliquoten verschiedenen Modifikationsmethoden unterzogen (Tabelle 33). Die Durchführung erfolgte in in gleicher Art und Weise wie in Kapitel 5.4, Seite 112 beschrieben. Im Anschluss daran wurden die modifizierten Extrakt-Aliquote mittels Chromabond® RP18 Kartuschen vorbereitet. Von den Extrakten wurde jeweils eine $\beta = 10$ mg/mL Lösung in MeOH hergestellt. Für die DDIT-LC-ESI-Ion trap-MS³ Analyse wurden die Extrakte 1:3 mit MeOH verdünnt und anschließend bei positiver und negativer Ionisierung gemessen. Parallel dazu erfolgte die Bestimmung der biologischen Aktivität. Für die Korrelationsanalyse wurden ebenfalls die Aktivitäts-Ergebnisse der 1:10 Verdünnungen verwendet.

Tabelle 33 Übersicht über die angewendeten Modifikationsmethoden bezogen auf 50 mg Extrakt.

Bezeichnung	Lösungsmittel	Modifikationsmethode
F1	50 mL MeOH	Trockenschrank, 150°C 30 min, ($T_{\text{Extrakt}} = 100^{\circ}\text{C}$)
F2	50 mL MeOH	In MeOH siedend ($T = 68^{\circ}\text{C}$), 15 min
F3	4 mL MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	SCX, MeOH
F4	4 mL MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	SAX, MeOH
F5	50 mL MeOH	5 mg Aktivkohle, 5 min
F6	50 mL MeOH	50 mg Aktivkohle, 5 min
F7	50 mL MeOH	500 mg Aktivkohle, 5 min
F8	6 mL A. dest	Diaion HP20, MeOH
F9	4 mL MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	SAX, MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)
F10	6 mL A. dest	XAD 7-HP, MeOH
F11	6 mL A. dest	Diaion HP20, H ₂ O
F12	80 % MeOH	Extraktion mit 80 % MeOH
F13	6 mL A. dest	Diaion HP20, MeOH/EtOAc 1:1 (v/v)
F14	50 mL A. dest	Autoklav, 121°C, 20 min
F15*	6 mL A. dest	XAD 7-HP, MeOH/EtOAc 1:1 (v/v)
F16	4 mL MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	SCX, MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)
F17	MeOH	Nativ
F18	6 mL A. dest	XAD 7-HP, Elution mit H ₂ O

*von diesem modifizierten Extrakt-Aliquot wurden keine ausreichenden Mengen für die LC-ESI-Ion trap-MS³ Analyse und Bestimmung der Aktivität erhalten.

Methanol Extrakte aus verschiedenen *Hygrophorus*-Spezies

Für die Identifizierung der biologisch aktiven Verbindungen wurden Methanol-Extrakte aus verschiedenen *Hygrophorus* spp. verwendet (Anhang, Tabelle a - 3). Dafür wurde von jeder Spezies sowohl tiefgefrorenes Pilzmaterial als auch getrocknetes verwendet. Die hergestellten Extrakte wurden mittels DDIT LC-ESI-Ion trap-MS³ bei positiver und negativer Ionisierung als Triplikate in zufälliger Reihenfolge gemessen. Dafür wurde zuvor eine $\beta = 10$ mg/mL Stammlösung in MeOH hergestellt und diese 1:3 verdünnt. Neben der MS-Analyse erfolgte ebenfalls die Bestimmung der biologischen Aktivität. Im Anschluß daran wurde die Aktivitäts-Korrelations-Analyse durchgeführt.

5.6 Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurde die Software R Version 2.5.1 (The R Foundation for Statistical Computing) verwendet. Zuvor erfolgte die Transformation der Rohdaten in mzXML Format.

5.6.1 Peakpicking und Alignment

Für das Peakpicking und Alignment wurde XCMS verwendet.⁽⁷⁷⁾ Als optimierte Parameter für das Peakpicking wurden die folgenden Einstellungen gewählt: $fwhm = 30$, $step = 0,2$, $snr = 5$, $mz\text{-}diff = 0,3$. Im Anschluss an das Peakpicking erfolgte eine Gruppierung der technischen Replikate. Für das sich daran anschließende iterative Alignment wurden die folgenden Einstellungen vorgenommen: $minfrac = 0,67$, $mzwid = 0,3$, $bw = 50 - 30$. Sofern eine Retentionszeitkorrektur durchgeführt wurde, wurde $minfrac = 1$ gesetzt. Für alle anderen Anwendungen war $minfrac = 0,67$. Das vollständige Skript zur Durchführung des Peakpicking und Alignments ist im Anhang aufgeführt. Als Ergebnis wird eine alignierte Datenmatrix ausgegebenen, in welcher jeder Peak neben dem m/z -Verhältnis und der Retentionszeit t_R eine zugehörige Intensität in den jeweiligen Messungen enthält (Tabelle 34).

Tabelle 34 Beispiel einer Datenmatrix nach der Datenverarbeitung mittels XCMS.

ID	m/z	m/z_{min}	m/z_{max}	t_R	t_{Rmin}	t_{Rmax}	Intensität Messung 1	Intensität Messung 2	Intensität ...
1									
2									
...									

5.6.2 Korrelationsanalyse

Für die Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA) wurde der Spearman Rangkorrelationskoeffizient ($\alpha = 5\%$) verwendet. Zur zweiseitigen Bestimmung der Signifikanzschwelle wurde ein Permutationstest ($n = 1000$) durchgeführt.

5.7 Massenspektrometrie

Alle Proben wurden vor der LC-MS-Analyse mittels Chromabond® RP18-Kartuschen vorbereitet.

Die Konditionierung der Chromabond® RP18-Kartuschen erfolgte mit 3 – 5 Säulenvolumina MeOH. Anschließend wurden die Extrakte in 3 mL MeOH gelöst und mit Hilfe der RP18-Kartusche gereinigt. Dieser Vorgang wurde je nach Extraktmenge ca. 3 – 5 Mal wiederholt. Die Elution erfolgte ebenfalls mit 3 – 5 Säulenvolumina MeOH. Der MeOH-unlösliche Teil wurde nicht weiter verwendet. Die so vorbereiteten Extrakte wurden erneut bei 30°C *in vacuo* bis zur Trockne eingeengt. Vor der LC-MS Analyse wurden diese erneut in MeOH gelöst und anschließend bei 13 000 rpm für 5 – 10 min zentrifugiert.

5.7.1 LC-ESI-Ion trap-MSⁿ

Für die Analyse der Extrakte stand die Ionenfalle LCQ Deca XP MAX (Fa. Thermo Finnigan) zur Verfügung. Die Messung der Proben erfolgte bei positiver als auch bei negativer Ionisierung in getrennten Messungen. Die Ionisierung wurde mittels Elektrospray Ionisation (ESI) bei einer Kapillarensparnung von 4 – 5 kV und einer Kapillarentemperatur von 275°C erzeugt. Als Schutzgas wurde Stickstoff (Flussrate 35 – 40 arb. units) verwendet. Zusätzlich ist das MS-System direkt an eine Surveyor Plus micro-HPLC Anlage (Fa. Thermo Finnigan) gekoppelt. Nach der Injektion der Proben mittels Surveyor-Autosampler (Fa. Thermo Finnigan) (Injektionsvolumen 2 µL), wurden die Metaboliten anschließend an einer RP18 Säule (150 x 1 mm, 5 µm, Hypersil GOLD, Fa. Thermo Scientific) getrennt. Die Detektion der Metaboliten erfolgte im Anschluss an die Trennung mittels eines Photodiodenarray-Detektors (Fa. Thermo Finnigan) in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 200 - 800$ nm. Der Photodiodenarray-Detektor und das MS-System sind in Reihe geschaltet. Als mobile Phase kamen MeCN (HPLC-grade, Fa. Baker) und H₂O (Umkehrosmoseanlage, Fa. Millipore) zum Einsatz, welche jeweils 0,2 % CH₃COOH (HPLC-grade, Fa. Baker) enthielten.

Gradientensystem

LC-MS 1: A = H₂O + 0,2 % CH₃COOH, B = MeCN + 0,2 % CH₃COOH:

Start 20 % B, linear in 30 min: 100 % B, 10 min konstant bei 100 % B, Ende 20 % B, $t_{Ges} = 45$ min, 70 µL/min

LC-MS 2: A = H₂O + 0,2 % CH₃COOH, B = MeCN + 0,2 % CH₃COOH:

Start 20 % B, linear in 40 min: 100 % B, 15 min konstant bei 100 % B, Ende 20 % B, $t_{Ges} = 60$ min, 70 µL/min

Data dependent MS³

Für die automatisierte Analyse der komplexen Mischungen und für die Fragmentierung der enthaltenen Metaboliten, wurde eine „data dependent“ LC-MS³ Methode (DDIT – data dependent ion tree) entwickelt. Dabei wurden die Proben in einem Massenbereich m/z 100 – 1000 Da analysiert. Sofern die detektierten Metaboliten eine Intensität von 10⁵ a.i. überschritten, wurde diese automatisch in einem simultanen MS/MS-Experiment fragmentiert. Dabei wurde pro Scan immer der intensivste Peak ausgewählt. Nach fünf Scans in Folge wurde der nächst-intensivere Peak fragmentiert. Weiterhin erfolgte ebenfalls automatisch die Fragmentierung der entstandenen Tochterionen in einem simultanen MS³-Experiment. Die dafür erforderliche Mindestintensität betrug 5000 a.i.. Die Isolierung der zu fragmentierenden Ionen (MS² und MS³) erfolgte in einem Massenbereich von m/z 80 – 1000 Da mit einer Isolierungsweite von +/- 2 Da. Die kollisionsinduzierte Dissoziation wurde

bei einer normalisierten Kollisionsenergie (NCE) von 35 % herbeigeführt. Die Aktivierung der isolierten Ionen erfolgte für 30 ms bei einer Aktivierungsstärke von 0,250 (-).

Die LC-MS Analyse großer Serien erfolgte in zufälliger Reihenfolge, wobei jeweils drei technische Replikate gemessen wurden. Zusätzlich wurde zwischen zwei Proben-Messungen immer MeOH injiziert um das LC-MS System zu „waschen“ und die Säule erneut zu equilibrieren. Zu Beginn einer solchen Messserie wurde die erste Probe mind. 2 – 3 Mal gemessen um möglichst stabile und reproduzierbare LC-MS Bedingungen zu gewährleisten. Die erhaltenen Daten wurden nicht für die Datenanalyse verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Xcalibur 2.0 (Fa. Thermo Scientific).

5.7.2 LC-ESI-QqQ-MS²

Für weiterführende bzw. vergleichende Analysen des Fragmentierungsverhaltens wurde als zusätzliches LC-MS System ein MAT TSQ Quantum Ultra AM (Fa. Finnigan) Quadrupol-Massenanalysator verwendet. Die Proben wurden mittels „hot“ ESI (HESI), bei einer Kapillarentemperatur von 270°C, Kapillarenspannung von 3,5 kV und einer Zerstäubertemperatur von 50°C (Schutzgas Stickstoff) ionisiert. Als Stoßgas wurde Argon verwendet, welches bei einer Stoßenergie von 15 – 35 eV die Dissoziation der ionisierten Moleküle induzierte. Dieses MS-System ist ebenfalls an eine Surveyor Plus micro-HPLC Anlage (Fa. Thermo Electron) gekoppelt. Die Trennung, der mittels Autosampler (Injektionsvolumen 2 µL) injizierten Proben, erfolgte an einer RP18 Säule (150 x 1 mm, 5 µm, Hypersil GOLD, Fa. Thermo Scientific). Die getrennten Metaboliten wurden ebenfalls mittels eines Photodiodenarray-Detektors (Fa. Thermo Electron) in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 200 - 600$ nm detektiert. Als mobile Phase wurde hier ebenfalls ein Gemisch aus MeCN (HPLC-grade, Fa. Baker) und H₂O (Umkehrosmoseanlage, Fa. Millipore) + jeweils 0,2 % CH₃COOH (HPLC-grade, Fa. Baker) verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Xcalibur Version 1.4 (Fa. Thermo Scientific).

Gradientensysteme

LC-MS 3: A = H₂O + 0,2 % CH₃COOH, B = MeCN + 0,2 % CH₃COOH:

Start 20 % B, 30 min: 100 % B, 10 min konstant bei 100 % B, Ende 20 % B,
 $t_{\text{Ges}} = 45$ min, 70 µL/min

LC-MS 4: A = H₂O + 0,2 % CH₃COOH, B = MeCN + 0,2 % CH₃COOH:

Start 15 % B, linear in 15 min: 95 % B, 15/20/30 min konstant bei 95 % B,
Ende 15 % B, $t_{\text{Ges}} = 30/35/45$ min, 50 - 70 µL/min

LC-MS 5: A = H₂O + 0,2 % CH₃COOH, B = MeCN + 0,2 % CH₃COOH:

Start 40 % B, linear in 40 min: 100 % B, 15/20/30 min konstant bei 100 % B,
Ende 15 % B, $t_{\text{Ges}} = 55/60/70$ min, 70 µL/min

5.7.3 UPLC-ESI-Q-TOF-MS

Für die hochauflösenden MS² Massenspektren wurde ein microTOF-Q II (Fa. Bruker) verwendet, welches an eine UPLC Acquity™ (Fa. Waters) Anlage gekoppelt ist. Als mobile Phase wurden Acetonitril + 0,1 % HCOOH und Wasser + 0,1 % HCOOH verwendet. Die Trennung der Metaboliten erfolgte an der UPLC HSS T3 Säule (100 x 1 mm, 1,8 µm, Fa. Waters) bei einer Fließgeschwindigkeit von 150 µL/min. Die Ionisierung erfolgte dabei mittels ESI bei einer Kapillarspannung von 4 kV. N₂ wurde zusätzlich als Zerstäubergas mit einem Druck von 1,4 bar eingesetzt. Als Trockengas wurde ebenfalls N₂ einer Flussrate von 6 L/min und einer Temperatur von 190°C in die Ionenquelle eingeleitet. Für die MS/MS Analysen erfolgte die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) der Ionen bei einer Energie von 10 – 30 eV mit Hilfe von Stickstoff als Stoßgas. Die Kalibrierung des Instrumentes erfolgte mit einer Lithiumformiat Lösung. Die Analyse der Daten sowie die Berechnung der Summenformeln erfolgte mit der Software Data Analysis Version 4.0.

UPLC-MS: A = H₂O + 0,1 % HCOOH, B = MeCN + 0,1 % HCOOH:

Start 5 % B, 1 min konstant bei 5 % B, linear in 16 min 95 % B, 2 min konstant bei 95 % B, Ende 5 % B, $t_{\text{Ges}} = 20$ min, 150 µL/min, Injektionsvolumen 2 µL

5.7.4 ESI-FTICR-MS

Die Bestimmung der exakten Massen erfolgte mit einem hochauflösenden Fourier Transformation Ionenzyklotronresonanz (FTICR) Massenspektrometer Bruker Apex III 70e (Fa. Bruker Daltonics). Das verwendete FTICR-MS Gerät ist dabei mit einer Infinity™ Zelle und einem 7.0 Tesla Magneten ausgestattet. Die Injektion der Proben erfolgte mittels Direkteinlaß unter Verwendung einer Spritzenpumpe (Fließgeschwindigkeit 120 µL/h). Die Ionisierung wurde ebenfalls mittels einer APOLLO-Electrospray Ionenquelle („off-axis“ Spray, Fa. Agilent) bei einer Kapillarspannung von 4,2 kV erzeugt (Capillary Exit 100 V, Skimmer 1: 15 V und Skimmer 2: 6 bzw. 10 V). Zusätzlich wurde Stickstoff als Zerstäubergas mit einer Temperatur von 150°C eingeleitet. Die Auswertung der erhaltenen Massenspektren (512 Datenpunkte) und die Berechnung der Summenformeln erfolgte im Anschluss an die Messung mit der XMass – Software Version 6.1.2 (Fa. Bruker Daltonics).

5.7.5 ESI-MS

Die ESI-Massenspektren wurden mit einem API – 150EX (Fa. Applied Biosystems) aufgenommen, welches mit einer „Turbo Ion Spray“-Ionenquelle ausgestattet ist. Die Injektion der Proben (10 µL) erfolgte dabei mittels Direkteinlaß und einem kontinuierlichem Fluß eines MeOH/H₂O Gemisches 6:4 (v/v) (Fließgeschwindigkeit 400 µL/min).

5.7.6 GC-MS

Die GC-MS Analysen wurden mit einem Voyager (Fa. ThermoQuest Finningan) und einem GC8000/MD-800 (Fa. Fisons Instruments) durchgeführt. Die Ionisierung erfolgte dabei jeweils mit einer Elektronenstoß Ionisationsquelle (EI) bei einer Temperatur von 200°C und einer Stoßenergie von 70 eV.

Die Auftrennung erfolgte dabei an einer DB-5MS Säule (30 m x 0,25 mm, Schichtdicke 0,25 µm, Fa. J&W). Die zuvor derivatisierten Proben wurden bei einer Injektor Temperatur von 250°C splitlos injiziert (1 µL). Als Trägergas kam Helium bei einem konstanten Fluss von 1 mL/min bzw. 0,8 mL/min zum Einsatz. Die Starttemperatur lag bei 60°C und ist nach 1 bzw. 3 min linear mit einer Rate von 10°/min bis auf 300°C bzw. 290°C angestiegen, welche für mindestens 5 min gehalten wurde. Die Interface Temperatur betrug 300°C.

Als Derivatisierungsreaktionen wurde sowohl Methylierung mit Diazomethan bzw. Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) als auch Trimethylsilylierung mit MSTFA (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid) und Umsetzung mit Methylborsäure bzw. Methoxylamin-Hydrochlorid durchgeführt.

5.8 Derivatisierungen

Methylierung mit Diazomethan

Für die Herstellung von Diazomethan wurde 40 % KOH mit Diethylether überschichtet. Dabei wurde eine Temperatur von 5°C nicht überschritten. Anschließend erfolgte die Zugabe einiger Spatelspitzen Nitrosomethylharnstoff. Die Mischung wurde im Eisbad bis zur Gelbfärbung des Ethers geschwenkt. Für die Methylierung der Proben wurden diese mit der etherischen Diazomethanlösung versetzt und über Nacht reagieren lassen.

Anschließend erfolgte die Analyse mittels GC-MS.

Methylierung mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH)

Für die Derivatisierung von empfindlichen Substanzen wurde eine Methylierung mit TMSH durchgeführt. Dafür wurden die Proben in Methanol gelöst und mit einigen Tropfen des TMSH Reagenz versetzt. Die Reaktion erfolgte unter gelegentlichem Umschwenken für ca. 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Lösungsmittel- bzw. Reaktionsmittelgemisch mit einem N₂-Strom verdampft.⁽⁸⁵⁾ Für die Analyse mittels GC-MS wurden die Proben erneut in Methanol aufgenommen.

Trimethylsilylierung

Für die Trimethylsilylierung wurden die Proben in Dichlormethan gelöst, mit *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) versetzt und anschließend für 30 min auf 70°C bzw. 37°C bei empfindlichen Substanzen erhitzt. Anschließend erfolgte die Analyse mittels GC-MS.

Methylboronierung

Für die Erzeugung eines Methylboronats zur Differenzierung von benachbarten *cis*- oder *trans*-ständigen OH – Gruppen wurde eine gesättigte Lösung von Methylborsäure in Pyridin hergestellt. Nach Hinzufügen zu den in CH₂Cl₂ gelösten Proben, wurden diese für 30 min auf 70°C erhitzt. Im Anschluss daran erfolgte die Analyse mittels GC-MS.

Methoxylamin

Zum Nachweis von Ketogruppen wurde als Derivatisierungsreagenz Methoxylamin-Hydrochlorid eingesetzt.⁽⁸⁶⁾ Für die Reaktion wurden 40 µL einer frisch hergestellten Lösung einer Konzentration von $\beta = 20$ mg/mL in Pyridin zu den getrockneten Proben hinzugefügt und anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Proben getrocknet und mit 50 µL MSTFA versetzt und erneut für 30 min bei 37°C inkubiert. Vor der GC-MS Analyse wurden die Proben erneut getrocknet und in Dichlormethan aufgenommen.

Acetylierung

Für die Acetylierung der Hydroxylgruppen wurden die Proben in Pyridin gelöst und mit einigen Tropfen Acetanhydrid versetzt. Als Katalysator wurde 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Sofern die acetylierten Substanzen mittels LC-MS analysiert wurden, wurden diese zuvor über eine RP18-Kartusche gereinigt.

Für die Analyse mittels GC-MS wurde eine zusätzliche Methylierung oder Trimethylsilylierung durchgeführt.

Deuterierung

Für die Markierung mit Deuterium wurden die getrockneten Proben mit einigen Millilitern CD₃OD versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend erfolgte die Analyse mittels LC-MS und FTICR-MS.

5.9 Isolierung und Aufreinigung

Für die Isolierung und Aufreinigung von Metaboliten kamen sowohl säulenchromatographische Normaldruck- als auch Mitteldruck- bzw. hochleistungs-Flüssigkeits-chromatographische Techniken zum Einsatz.

5.9.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Für die dünnschichtchromatographische Analyse wurden Aluminiumfolien verwendet, die mit Kieselgel 60 F254 (Fa. Merck) und RP18-modifizierten Kieselgel F254 (Fa. Merck) beschichtet waren. Die Detektion der Banden erfolgte bei $\lambda = 254$ nm und $\lambda = 366$ nm und durch Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure Reagenz. Als zusätzliche Detektionstechnik und zum Nachweis von Hygrophoronen wurden die entwickelten DC-Folien mit 40 % KOH beträufelt oder im heißen Luftstrom 10 – 15 min erhitzt. ⁽⁵⁵⁾

DC-Systeme

1. RP18, MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v)
2. RP18, MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v) + 5 % H₂O
3. RP18, MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v) + 25 % H₂O
4. RP18, 100 % MeCN
5. RP18, MeCN/H₂O 75/25 (v/v)
6. SiOH, CHCl₃/MeOH 95:5 (v/v)
7. SiOH, CHCl₃/MeOH 9:1 (v/v)
8. SiOH, CHCl₃/MeOH 12:1 (v/v)

Vanillin – H₂SO₄ (Alkohole, Steroide, Phenole) 1,2 g Vanillin, 210 mL MeOH, 25 mL Eisessig, 10 mL 98 % H₂SO₄ in vorgegebener Reihenfolge vorsichtig und unter Kühlung zusetzen.

5.9.2 Säulenchromatographie (SC)

Die säulenchromatographische Trennung erfolgte an zylindrischen Glassäulen. Als stationäre Phase wurde Kieselgel 40 – 63 μ m (Fa. Merck), Sephadex LH20 (Fa. Pharmacia) und Diaion HP20 (Fa. Supelco) verwendet.

- SC1: Diaion HP20 410 g (Säule: 28 x 4 cm), Elution mit A: 1,5 – 2 L H₂O; B: 1,5 – 2 L MeOH; C: 3 L MeOH/EtOAc 1:1 (v/v); D: 2 L EtOAc
- SC2: Sephadex LH20 (Säule: 57 x 1,2 cm) MeOH, 8 – 10 Tropfen/Minute, Fraktionsgröße 6 mL

SC3: Sephadex LH20 (Säule: 90 x 1,5 cm), MeOH, 13 Tropfen/Minute, Fraktionsgröße 4 - 5 mL

SC4: Kieselgel 11 g (Säule: 30 x 1,2 cm), Elution mit CHCl₃/MeOH Gemische, A: 1 L CHCl₃/MeOH 9:1 (v/v) Fraktionsgröße 10 mL, 500 mL CHCl₃/MeOH 4:1 (v/v), 500 mL CHCl₃/MeOH 1:1 (v/v)

SC3: Sephadex LH20 (Säule: 86 x 1,5 cm), MeOH, 13 - 16 Tropfen/Minute, Fraktionsgröße 6 mL

5.9.3 Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie (MPLC)

Für die Auftrennung der Extrakte bzw. Fraktionen wurde die Mitteldruck-Flüssigkeitschromatographie mit einer Isolera (Fa. Biotage) MPLC-Anlage durchgeführt. Die Detektion erfolgte dabei bei $\lambda = 235$ nm und $\lambda = 275$ nm. Als stationäre Phase kamen sowohl RediSep® RP18 Kartuschen als auch SNAP Kieselgel Kartuschen zum Einsatz. Als mobile Phase wurden destillierte bzw. HPLC-grade Lösungsmittel verwendet.

MPLC 1: RediSep® RP18 43 g, A = H₂O, B = MeCN

Equilibrierung 25 % B 3 Säulenvolumina (SV) bei 40 mL/min, Start: 25 % B 1 SV, 25 – 50 % B 1 SV, 50 % B 2 SV, 50 – 75 % B 2 SV, 75 % B 2 SV, 75 – 100 % 4 SV, 100 % B 5 SV, Fließgeschwindigkeit 10 mL/min, Fraktionsgröße 5 mL

MPLC 2: RediSep® RP18 13 g, A = H₂O, B = MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v)

Equilibrierung 25 % B 5 SV, 15 mL/min, Start 25 % B 1 SV, 25 – 50 % B 1 SV, 50 % B 2 SV, 50 – 60 % B 1 SV, 60 % 3 SV, 60 – 95 % 3 SV, 95 % B 3 SV, 95 – 100 % B 1 SV, 100 % B 7,5 SV, Fließgeschwindigkeit 10 mL/min, Fraktionsgröße 8 mL

MPLC 3: SNAP SiOH 10 g, A = CHCl₃, B = MeOH

Start 2 % B 1 SV, 2 – 16 % B 10 SV, 16 % B 2 SV, 16 – 75 % 1 SV, 75 % B 3 SV, Fließgeschwindigkeit 10 mL/min, Fraktionsgröße 8 mL

MPLC 4: RediSep® RP18 13 g, A = H₂O, B = MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v)

Equilibrierung 20 % B 3 SV Fließgeschwindigkeit 15 mL/min, Start 20 % B 1 SV, 20 – 60 % B 2 SV, 60 % B 1 SV, 60 – 75 % B 5 SV, 75 % B 4 SV, 75 – 100 % B 6 SV, 100 % B 10 SV, Fließgeschwindigkeit 10 mL/min, Fraktionsgröße 7 mL

5.9.4 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-chromatographische Trennung der Extrakte und Fraktionen wurden mit einem Varian ProStar® 218 System und einem PrepStar® Photodiodenarraydetektor durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte mittels Chromabond® RP18 Kartuschen (Fa. Macherey-Nagel) und destilliertem MeOH. Als mobile Phase kamen Gemische aus Acetonitril (Fa. Merck) bzw. MeOH (Fa. Rotisolv) und bidestilliertem Wasser (Umkehrosmoseanlage, Fa. Millipore) zum Einsatz. Alle verwendeten Lösungsmittel waren HPLC-grade. Für die HPLC Analysen wurden die folgenden stationären Phasen und Gradientensysteme verwendet. Sofern fraktioniert wurde, wurden unter analytischen Bedingungen die Fraktionen alle 10 s per Hand in dem interessierenden Bereich aufgefangen. Unter präparativen Bedingungen wurden die Fraktionen mittels eines automatischen Fraktionssammlers (Fa. Varina) alle 24 s über die gesamte Zeit gesammelt.

Stationäre Phasen:

- Säule 1: YMC-Pack ODS-AQ, 250 x 4,0 mm, 3 µm, Fa. YMC Europe GmbH
- Säule 2: YMC-Pack ODS-A, 250 x 4,6 mm, 3 µm, Fa. YMC Europe GmbH
- Säule 3: YMC-Pack ODS-A, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Fa. YMC Europe GmbH
- Säule 4: Nucleosil RP18, 150 x 4,6 mm, 5 µm, Fa. Macherey-Nagel
- Säule 5: YMC-Pack ODS 250 x 20 mm, 5 µm, Fa. YMC Europe GmbH

Gradientensysteme:

1. A = H₂O, B = MeCN: Start 20 % B, 30 min: 100 % B, 10 min konstant bei 100 % B, Ende 20 % B, $t_{\text{Ges}} = 45 \text{ min}$, 1 mL/min, 20 µL
2. A = H₂O, B = MeOH: Start 60 % B, 15 min: 100% B, 25 min konstant bei 100 % B, Ende 60 % B, $t_{\text{Ges}} = 45 \text{ min}$, Analytisch 1 mL/min, 20 µL
Präparativ 20 mL/min, 300 – 500 µL
3. A = H₂O, B = MeCN: Start 6 0% B, 15 min: 100 % B, 5 min konstant bei 100 % B, Ende 60 % B, $t_{\text{Ges}} = 25 \text{ min}$, Analytisch 1 mL/min, 20 µL
Präparativ 20 mL/min, 300 – 500 µL
4. A = H₂O, B = MeCN: Start 20 % B, 45 min: 100 % B, 10 min konstant bei 100 % B, Ende 20 % B, $t_{\text{Ges}} = 60 \text{ min}$, 0,7 mL/min, 10 - 15 µL
5. A = H₂O, B = MeCN: Start 20 % B, 50 min: 100% B, 10 min konstant bei 100 % B, Ende 20 % B, $t_{\text{Ges}} = 65 \text{ min}$, 0,7 mL, 10 - 15 µL

5.9.5 Isolierung aktivitätsrelevanter Metaboliten

Metabolit *m/z* 311

Für die Isolierung des Metaboliten *m/z* 311 (**61**) wurde aus ca. 1,5 kg frisch tiefgefrorenen Fruchtkörpern von *Hygrophorus latitabundus* ein EtOAc-Extrakt (*m* = 5 g) hergestellt (siehe hierzu auch Kapitel 5.2.2, Seite 108). Nach der anschließenden Flüssig-Flüssig-Extraktion (EtOAc und H₂O) wurde die EtOAc-Phase mittels Festphasenextraktion (Chromabond® RP18 Kartuschen 500 mg/3 mL, MeOH) für die weitere Reinigung mittels MPLC (MPLC1: RP18, MeCN/H₂O) vorbereitet. Die so erhaltenen Fraktionen 67 – 74 wurden vereinigt (*m* = 100 mg) und erneut unter Verwendung der MPLC (MPLC2: RP18, MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v) und H₂O) fraktioniert. Anschließend erfolgte die Feinreinigung der Fraktion 59 (*m* = 6,7 mg) mittels HPLC (Säule 2, Gradient 5). Dazu wurde die Trennung unter analytischen Bedingungen durchgeführt, da so eine Trennung der vier Isomere erreicht wurde (Tabelle 35). Zusätzlich konnte das *trans*-4-*O*-Acetyl-Hygrophoron D12 (**28**) isoliert und strukturell charakterisiert werden (*t_R* = 55,62 min, *m* = 450 µg).^{(54) (55)}

Tabelle 35 Übersicht über die Menge (µg) und Retentionszeit (min) der isolierten Isomere des Metaboliten *m/z* 311.

Isomer <i>m/z</i> 311	<i>t_R</i> (min) (Säule 2, Gradient 5)	<i>m</i> (µg)
Peak 2	38,17	450
Peak 3	38,40	450
Peak 4 (61)	38,93	300
Peak 5	39,76	400

Metabolit *m/z* 341

Für die Isolierung des Metaboliten *m/z* 341 (**64**) erfolgte die Extraktion des Pilzmaterials, sowie die anschließende Flüssig-Flüssig- und Festphasenextraktion in gleicher Weise wie zuvor für *m/z* 311 (**61**) beschrieben. Durch die anschließende chromatographische Reinigung mittels MPLC unter Verwendung von RP18 Material und einem MeCN/H₂O Gradienten (MPLC1) enthielt die Fraktion 58 ca. *m* = 3,5 mg des Metaboliten *m/z* 341 (**64**). Zusätzlich konnten so durch Vereinigung der Fraktionen 38 – 41 ca. *m* = 80 mg der Verbindung Verbindung **62** isoliert werden.

Metabolit *m/z* 313

Für die Isolierung des Metaboliten *m/z* 313 (**60**) wurden 30 g lyophilisierte Fruchtkörper von *Hygrophorus latitabundus* mittels Extraktionsmethode D1 (Dionex Extraktor, 100 % MeOH)

extrahiert. Der so erhaltene Rohextrakt ($m = 5$ g) wurde anschließend unter Verwendung von Diaion HP20 (SC1) und H_2O (A), MeOH (B), MeOH/EtOAc 1:1 (v/v) (C) und EtOAc als mobile Phase fraktioniert. Die MeOH/EtOAc 1:1 (v/v) Fraktion ($m = 1,4$ g) wurde im Anschluss daran mittels Festphasenextraktion (Chromabond® RP 18 Kartuschen 500 mg/3 mL, MeOH) für die weitere Reinigung vorbereitet ($m = 1,38$ g). Eine weitere Fraktionierung konnte mittels präparativer HPLC (Säule 5, Gradient 2) erreicht werden. Die Fraktionierung erfolgte dabei nach Zeit (alle 24 s, 8 mL Fraktionsgröße). Durch Vereinigung der Fraktionen 40 – 49 ($t_R = 16 - 19$ min) und konnten 254 mg erhalten werden, welche anschließend erneut mittels präparativer HPLC (Säule 5, Gradient 2) fraktioniert wurden. Durch Vereinigung der Fraktionen 37 – 51 ($t_R = 14 - 15$ min) konnten 143 mg erhalten werden. Die weitere Aufreinigung erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie an Sephadex LH20 (SC3). Die Fraktionen 27 und 28 wurden vereinigt ($m = 70$ mg) und anschließend unter Verwendung der MPLC (MPLC 4: RP18, MeCN/Ac₂O 59/41 (v/v) und H_2O) gereinigt. Durch Vereinigung der Fraktionen 19 – 22 ($m = 5,8$ mg) konnte eine stark angereicherte Fraktion des Metaboliten m/z 313 erhalten werden. Die letzte Feinreinigung erfolgte schließlich mittels HPLC (Säule 1, Gradient 4). Die Fraktionierung erfolgte unter analytischen Bedingungen, da es sich auch in diesem Fall um mehrere Isomere Verbindungen handelte (Tabelle 36).

Tabelle 36 Übersicht über die Menge (μg) und Retentionszeit (min) der isolierten Isomere des Metaboliten m/z 313.

Isomer m/z 313	t_R (min) (Säule 1, Gradient 4)	m (μg)
Peak 1 (60)	38,22	300
Peak 2/3	38,68	1200
Peak 4	38,89	200

Alternativ konnten die **Metaboliten m/z 311 und m/z 313** aufgereinigt werden indem nach der SC1 an Diaion HP20 und der ersten präparativen HPLC Trennung (Säule 5, Gradient 2) die Fraktionen 64 – 100 vereinigt wurden ($m = 130$ mg) und anschließend mittels HPLC unter analytischen Bedingungen (Säule 4, Gradient 3 MeCN/ H_2O) eine weitere Reinigung vorgenommen wurde. Dadurch konnten drei Fraktionen (F1 = 0 – 6 min, F2 = 6 – 9 min, F3 = 9 – 20 min) gewonnen werden. Die Fraktion 3 ($m = 61$ mg) wurde anschließend mittels Sephadex LH20 (SC2) nach Größe aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine weitere Renigung der Fraktion 5 ($m = 30$ mg) nach Polarität an Kieselgel (SC4, $CHCl_3$ /MeOH). Im Anschluss daran wurde die letzte Feinreinigung der vereinigten Fraktionen 5 - 6 ($m = 2$ mg) mittels analytischer HPLC (Säule 4, Gradient 1) durchgeführt. Es konnten so angereicherte Fraktionen der Metaboliten m/z 311 und m/z 313 erhalten werden (Tabelle 37).

Tabelle 37 Übersicht über die aufgereinigten Fraktionen (t_R und Menge) der Metaboliten m/z 311 und m/z 313.

Fraktion	t_R (min) (Säule 4, Gradient 1)	m (mg)
1 (m/z 295)	19,15 – 19,56	1
2 (m/z 311)	19,56 – 20,56	1
3 (m/z 297)	21,47 – 22,16	0,5
4 (m/z 313)	22,16 – 23,38	0,9

5.10 NMR-Spektroskopie

Die ^1H -NMR- und die 2D-NMR Spektren (COSY, HSQC, HMBC, ROESY, TOCSY, NOESY) wurden mit einem Varian NMRS 600 bei 599,831 MHz (Fa. Varian) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm bezogen auf den internen Standard TMS ($\delta = 0,000$ ppm) angegeben bzw. auf den internen Sekundärstandard CD_3OD (^{13}C $\delta = 49,0$ ppm).

5.11 Geräte und Chemikalien

Chemikalien

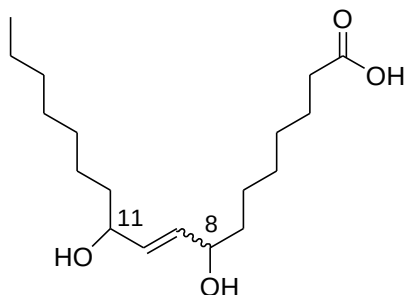
Alle verwendeten Lösungsmittel waren destilliert. Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka, Sigma Aldrich und Roth bezogen.

Geräte

- Vakuumrotationsverdampfer Re111 (Fa. Büchi)
- Fraktionssammler Retriever II (Fa. ISCO)
- Varioklav® 75 S (Fa. H+ P)
- UV-Tisch (Fa. Camac)
- Brutschrank (Fa. Binder)
- Trockenschrank (Fa. Heraeus)
- Mikroskop BX 41 (Fa. Olympus)
- Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 (Fa. Zeiss)
- Laminarbox KS 12 (Fa. Kendro)
- Eppizentrifuge Biofuge pico (Fa. Heraeus)
- Ultraschallbad Super RK510-H (Fa. Sonorex)
- IR-Dancer 360 (Fa. Hettich)
- Vortexer Genie2 (Fa. Scientific Industries)
- Gefriertrocknungsanlage (Fa. Dieter Piatkowski Forschungsgeräte)

6. Charakterisierung

Metabolit *m/z* 313 (60)

Isoliert aus *H. latitabundus* $t_R = 24,63$ min (LC-MS1) $R_f = 0,23$ (DC 3)8,11-Dihydroxyoctadec-9-enoic acid $C_{18}H_{34}O_4$ $\lambda_{max} = 235$ nm

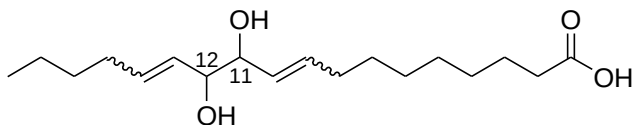
60

Biologische Aktivität prozentuale Wachstumsinhibierung von *B. subtilis*
 $I = 71 \pm 8$ % ($\beta = 100$ $\mu\text{g/mL}$)

(-)-ESI-FTICR-MS gem. m/z 313,2380, ber. 313,2384 $C_{18}H_{33}O_4^-$

UPLC-QTOF-MS² $t_R = 756$ s (UPLC-MS1)
 (-)ESI-CID: 30 eV m/z 313,2355 (3) $C_{18}H_{33}O_4^-$ [M-H]⁻, 295,2285 (12) $C_{18}H_{31}O_3^-$ [M-H]⁻, 251,2342 (6) $C_{17}H_{31}O^-$ [M-H-H₂O-CO₂]⁻, 183,1022 (100) $C_{10}H_{15}O_3^-$ [M-H-C₈H₁₈O]⁻, 165,1280 (10) $C_{11}H_{17}O^-$ [M-H-C₇H₁₆O₃]⁻, 155,1427 (22) $C_{10}H_{19}O^-$ [M-H-C₈H₁₄O₃]⁻, 139,1117 (18) $C_9H_{15}O^-$ [M-H-C₉H₁₈O₃]⁻, 137,0957 (8) $C_9H_{13}O^-$ [M-H-C₉H₂₀O₃]⁻, 127,1117 (6) $C_8H_{15}O^-$ [M-H-C₁₀H₁₈O₃]⁻, 111,0794 (8) $C_7H_{11}O^-$ [M-H-C₁₁H₂₄O₃]⁻

LC-Ion trap-MS^{2,3} (-)ESI: CID 35 % NCE
 MS² 313: m/z 313 (<3) [M-H]⁻, 295 (100) [M-H-H₂O]⁻, 277 (60), 269 (<3)
 MS³ 313-295: m/z 295 (100), 277 (60), 251 (30), 183 (10), 171 (5), 165 (15), 155 (30), 139 (5), 137 (5), 127 (5), 111 (12).

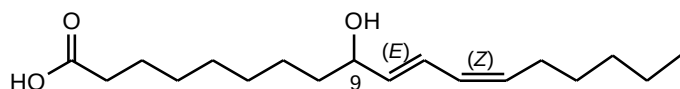
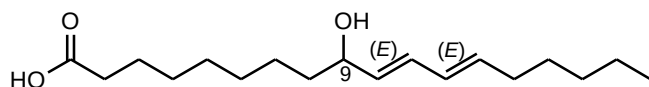
Metabolit m/z 311 (61)Isoliert aus *H. latitabundus* $t_R = 22,72$ min (LC-MS1)11,12-Dihydroxyoctadeca-9,13-diensäure $C_{18}H_{32}O_4$ $R_f = 0,23$ (DC 3)**61** $\lambda_{max} = 235$ nm

Biologische Aktivität prozentuale Wachstumsinhibierung von *B. subtilis*
 $I = 69 \pm 3 \%$ ($\beta = 100 \mu\text{g/mL}$)

(-)-ESI-FTICR-MS gem. m/z 311,2227, ber. 311,2228 $C_{18}H_{31}O_4^-$

UPLC-QTOF-MS² $t_R = 617$ s (UPLC-MS1)
 (-)ESI-CID: 25 eV m/z 311,2203 (22) $C_{18}H_{31}O_4^-$ [M-H]⁻, 293,2103 (30) $C_{18}H_{29}O_3^-$ [M-H-H₂O]⁻, 275,1969 (8) $C_{18}H_{27}O_2^-$ [M-H-2H₂O]⁻, 265,2184 (8) $C_{17}H_{29}O_2^-$ [M-H-H₂O-CO]⁻, 249,2199 (8) $C_{17}H_{29}O^-$ [M-H-H₂O-CO₂]⁻, 211,1325 (100) $C_{12}H_{19}O_3^-$ [M-H-C₆H₁₄O]⁻, 199,1323 (27) $C_{11}H_{19}O_3^-$ [M-H-C₇H₁₂O]⁻, 197,1184 (57) $C_{11}H_{17}O_3^-$ [M-H-C₇H₁₄O]⁻, 181,1237 (6) $C_{11}H_{17}O_2^-$ [M-H-C₇H₁₄O₂]⁻, 169,1231 (6) $C_{10}H_{17}O_2^-$ [M-H-C₈H₁₄O₂]⁻, 113,0960 (7) $C_7H_{13}O^-$ [M-H-C₁₁H₁₈O₃]⁻

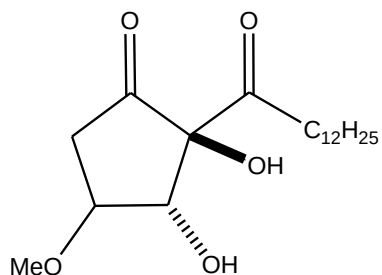
LC-Ion trap-MS^{2,3} (-)ESI: CID 35 % NCE
 MS² 311: m/z 311 (<3) [M-H]⁻, 293 (100) [M-H-H₂O]⁻
 MS³ 311-293: m/z 293 (100), 275 (18), 249 (55), 179 (<3), 177 (10), 155 (8), 113 (35).

Metaboliten m/z 295 (62 & 63)Isoliert aus *H. latitabundus*(10E,12Z)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure $C_{18}H_{32}O_3$ $t_R = 21,71$ min (LC-MS1)**62** $R_f = 0,24$ (DC 3) $\lambda_{max} = 235$ nm(10E,12E)-9-Hydroxyoctadeca-10,12-diensäure $C_{18}H_{32}O_3$ **63**Biologische Aktivität prozentuale Wachstumsinhibierung von *B. subtilis***62**: $I = 47 \pm 11$ % ($\beta = 100$ $\mu\text{g/mL}$)**62 + 63**: $I = 85 \pm 4$ % ($\beta = 100$ $\mu\text{g/mL}$)(-)-ESI-FTICR-MS gem. m/z 295,2280, ber. 295,2279 $C_{18}H_{31}O_4^-$ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CD_3OD) δ ^1H ppm:**62**: 4,010 *m* H-9, 5,609 (15,2/6,8) *dd* H-10, 6,489 (15,2/11,2) *dd* H-11, 5,970 (11,2/11,1) *dd* H-12, 5,405 (10,7/7,9) *dt* H-13, 2,300 *m* H-14.**63**: 4,050 *m* H-9, 5,516 (15,2/7,0) *dt* H-10, 6,137 (15,2/10,6) *dd* H-11, 6,019 (15,1/10,6) *dd* H-12, 5,664 (15,1/7,0) *dt* H-13, 2,10 *m* H-14.LC-Ion trap-MS^{2,3}

(-)ESI: CID 35 % NCE

MS² 295: m/z 295 (<100) $[\text{M-H}]^-$, 277 (75) $[\text{M-H-H}_2\text{O}]^-$, 251 (5) $[\text{M-H-CO}_2]^-$, 195 (60), 183 (5), 171 (55), 157 (3), 125 (5), 113 (3).MS³ 295-171: m/z 171 (100), 127 (90).

Metabolit m/z 341 (64)



3-OMe-Hygrophoron D12 $C_{19}H_{34}O_5$

64

Isoliert aus *H. latitabundus*

$t_R = 27,64$ min (LC-MS1)

$R_f = 0,15$ (DC 2), starke
Violettfrärbung mit Vanillin- $H_2SO_4^-$
Sprühreagenz

$\lambda_{max} = 235$ nm

Biologische Aktivität prozentuale Wachstumsinhibierung von *B. subtilis*
 $I = 76 \pm 1$ % ($\beta = 10$ $\mu g/mL$)

(-)-ESI-FTICR-MS gem. m/z 341,2337, ber. 341,2333 $C_{19}H_{33}O_5^-$

LC-Ion trap-MS^{2,3} (-)-ESI: CID 30 % NCE
MS² 341: m/z 341 (<1) $[M-H]^-$, 323 (4) $[M-H-H_2O]^-$, 309 (5) $[M-H-CH_3OH]^-$, 297 (7) $[M-H-CO_2]^-$, 265 (100) $[M-H-CO_2-CH_3OH]^-$
MS³ 341-265: m/z 265 (100), 247 (<1) $[M-H-H_2O]^-$, 237 (10) $[M-H-CO_2]$

7. Literaturverzeichnis

1. Gullo, V.P., McAlpine, J., Lam, K.S., Baker, D., Petersen, F. Drug Discovery from Natural Products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 523-531.
2. Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 461-477.
3. Hawksworth, D.L. The Magnitude of fungal Diversity: the 1.5 Million Species estimate revisited. *Mycol. Res.* 2001, 105, 1422-1432.
4. Anke, T., Oberwinkler, F., Steglich, W., Schramm, G. The strobilurins - new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex. Fr.) Sing. *J. Antibiot.* 1977, 30, 806-810.
5. Lam, K.S. New Aspects of Natural Products in Drug Discovery. *Trends in Microbiol.* 2007, 15, 279-289.
6. Marston A., Hostettmann, K. Natural Product Analysis over the last Decades. *Planta Med.* 2009, 75, 672-682.
7. Shyur, L.-F., Yang, N.-S. Metabolomics for Phytomedicine Research and Drug Development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008, 12, 66-71.
8. Koehn, F.E. High impact Technologies for Natural Product Screening. [Buchverf.] F., Amstutz, R. Petersen. *Progress in Drug Research*. Basel : Birkhäuser Verlag, 2008.
9. Demain, A.L. From Natural Product Discovery to Commercialization: a Success Story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 33, 486-495.
10. Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 1929, 3, 226-236.
11. von Nussbaum, F., Brands, M., Hinzen, B., Weigand, S., Häbich, D. Antibacterial Natural Products in Medicinal Chemistry - Exodus or Revival? *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006, 45, 5072-5129.
12. Singh, S.B., Barret, J.F. Empirical antibacterial Drug Discovery - Foundation in Natural Products. *Biochem. Pharmacol.* 2006, 71, 1006-1015.
13. Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* 2005, 58, 1-26.
14. Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J. How Antibiotics kill Bacteria: from Target to Networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010, 8, 423-435.
15. Plotz, P.H. & Davies, B.D. Synergism between Streptomycin and Penicillin: a proposed mechanism. *Science.* 1962, 135, 1067-1068.
16. Payne, D.J., Miller, W.H., Berry, V., Brosky, J., Burgess, W.J. et al. Discovery of a Novel and Potent Class of FabI-directed Antibacterial Agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2002, 46, 3118-3124.

17. Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C. et al. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* 1966, 45, 493-496.
18. Vincent, J.G., Vincent, H.W.: Filter Paper Disc Modification of the Oxford Cup Penicillin Determination. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1944, 55, 162-164.
19. Abraham, E.P., Gardner, A.D., Chain, E. et al. Further observations on Penicillin. *Lancet.* 1941, 238, 177-189.
20. Finn, R.K. Theory of Agar Diffusion Methods for Bioassay. *Nature.* 1959, 31, 975-977.
21. Ryan, K.J., Sherris, J.C. Antimicrobial Susceptibility Testing. *Hum. Pathol.* 1976, 7, 277-286.
22. Bonev, B., Hooper, J., Parisot, J. Principles of assessing Bacterial Susceptibility to Antibiotics using the Agar Diffusion Method. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61, 1295-1301.
23. Narasimhachari, N., Ramachandran, S. A simple Bioautographic Technique for Identifying Biologically active Material on Thin-layer Chromatograms. *J. Chromatogr.* 1967, 27, 494.
24. Gottstein, D., Gross, D., Lehmann, H. Mikrobiotest mit *Cladosporium cucumerinum* Ell. & Arth. zum Nachweis fungitoxischer Verbindungen auf Dünnschichtplatten. *Arch. Phytopathol. u. Pflanzenschutz Berlin.* 1984, 20, 111-116.
25. Tengerdy, R.P., Nagy, J.G., Martin, B. Quantitative Measurement of Bacterial Growth by Reduction of Tetrazolium Salts. *Appl. Microbiol.* 1967, 15, 954-955.
26. Casey, W.M., Nguyen, N.T. Use of the Green Fluorescent Protein to Rapidly Assess Viability of *Escherichia coli* in preserved solutions. *J. Pharm. Sci. Technol.* 1995, 50, 352-355.
27. Mayr, L.M. and Bojanic, D. Novel Trends in High-throughput Screening. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2009, 9, 580-588.
28. Peláez, F. The Historical Delivery of Antibiotics from Microbial Natural Products - Can History Repeat? *Biochem. Pharmacol.* 2006, 71, 981-990.
29. Kodali, S., Galgoci, A., Young, K., Painter, R., Silver, L.L., Herath, K.B., Singh, S.B., Cully, D., Barrett, J.F., Schmatz, D., Wang, J. Determination of Selectivity and Efficacy of Fatty Acid Synthesis Inhibitors. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 1669-1677.
30. Chen, X., Rusinko A.R., Young, S.S. Recursive Partitioning Analysis of a large Structure-Activity Data Set using Three-dimensional Descriptors. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1998, 38, 1054-1062.
31. Rusinko, A., Farmen, M.W., Lambert, C.G., Brown, P.L., Young, S.S. Analysis of a large Structure/Biological Activity Data Set using Recursive Partitioning. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 1999, 39, 1017-1026.

32. van Rhee, A.M., Stocker, J., Printzenhoff, D., Creech, C., Wagoner, P.K., Spear, K.L. Retrospective Analysis of an Experimental High-throughput Screening Data Set by Rekursive Partitioning. *J. Comb. Chem.* 2001, 3, 267-277.
33. Nicolaou, C.A., Tamura, S.Y., Kelley, B.P., Bassett, S.I., Nutt, R.F. Analysis of large Screening Data Set via Adaptively Grown Phylogenetic-like Trees. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2002, 42, 1069-1079.
34. Bajorath, J. Integration of Virtual Screening and High-throughput Screening. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002, 1, 882-894.
35. Crisman, T.J., Jenkins, J.L., Parker, C.N., Hill, W.A., Bender, A., Deng, Z., Nettles, J.H., Davies, J.W., Glick, M. Plate-cherry-picking: a Novel semi-sequential Screening Paradigm for Cheaper, Faster, Information-rich Compound Selection. *J. Biomol. Screen.* 2007, 12, 320-327.
36. Tu, Y., Jeffries, C., Ruan, H., Nelson, C., Smithson, D., Shelat, A.A., Brown, K. et al. Automated High-throughput system to Fractionate Plant Natural Products for Drug Discovery. *J. Nat. Prod.* 2010, 73, 751-754.
37. Hostettmann, K., Wolfender, J.L., Terreaux, C. Modern Screening Techniques for Plant Extracts. *Pharm. Biol.* 2001, 39, 18-32.
38. Yamashita, M., Fenn, J.B. Electrospray Ion Source. Another Variation on the Free-Jet Theme. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 4451-4459.
39. Yamashita, M., Fenn, J.B. Negative Ion Production with the Electrospray Ion Source. *J. Phys. Chem.* 1984, 88, 4671-4675.
40. Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M., Fenn, J.B. Electrospray Interface for Liquid Chromatographs and Mass Spectrometers. *Anal. Chem.* 1985, 57, 675-679.
41. Liesener, A., Karst, U. Monitoring Enzymatic Conversions by Mass Spectrometry: a critical Review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 1451-1464.
42. van Elswijk, D.A., Irth, H. Analytical Tools for the Detection and Characterization of Biologically Active Compounds from Nature. *Phytochem. Rev.* 2003, 1, 427-439.
43. de Boer, A.R., Letzel, T., van Elswijk, D.A., Lingemann, H., Niessen, W., Irth, H. On-line Coupling of High-Performance Liquid Chromatography to a Continuous Flow Enzyme Assay based on Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2004, 76, 3155-3161.
44. Chau, F.-T., Chan, H.-Y., Cheung, C.-Y., Xu, C.J., Liang, Y., Kvalheim, O.M. Recipe for Uncovering the Bioactive Components in Herbal Medicine. *Anal. Chem.* 2009, 81, 7217-7225.
45. Lu, X., Zhao, X., Bai, C., Zhao, C., Lu, G., Xu, G. LC-MS based Metabolomics Analysis. *Journal of Chromatography B.* 2008, 866, 64-76.
46. Hyötyläinen, T. Critical Evaluation of Sample Pretreatment Techniques. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 743-758.

47. Kayser, O., Quax, W. *Medicinal Plant Biotechnology*. Weinheim : Wiley-VCH, 2007.
48. Heinrich, M. Ethnopharmacy and Natural Product Research - Multidisziplinäre Opportunities for Research in the Metabolomic Age. *Phytochem. Lett.* 2008, 1, 1-5.
49. Bas, C. Tricholomataceae R. Heim ex Pouz. [Buchverf.] C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E., Vellinga, E.C. Bas. *Flora Agaricina Neerlandica Bd. 2*. Rotterdam : A.A. Balkema, 1990.
50. Arnolds, E. Tribus Hygrophoreae (Kühner) Bas & Arnolds. [Buchverf.] C., Kuyper, T.W., Noordeloos, M.E., Vellinga, E.C. Bas. *Flora Agaricina Neerlandica*. Rotterdam : A.A. Balkema, 1990.
51. Fugmann, B. Neue Niedermolekulare Naturstoffe aus Höheren Pilzen (Basidiomyceten). Isolierung, Strukturaufklärung und Synthese. *Dissertation*. 1985, Universität Bonn.
52. Gill, M., Steglich, W. Pigments of Fungi (Macromycetes). [Buchverf.] W., Grisebach, H., Kirby, G.W., Tamm, C. Herz. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Wien, New York : Springer-Verlag, 1987.
53. Qu, Y., Zhang, H.-B., Liu, J.-K. Isolation and Structure of a new Ceramid from the Basidiomycete *Hygrophorus eburneus*. *Z. Naturforsch.* 2004, 59b, 241-244.
54. Lübken, T., Schmidt, J., Porzel, A., Arnold, N., Wessjohann, L. Hygrophorone A-G: fungicidal Cyclopentenone from *Hygrophorus* Species. *Phytochemistry*. 2004, 65, 1061-1065.
55. Lübken, T. Hygrophorone: Neue antifungische Cyclopentenonderivate aus *Hygrophorus*-Arten. *Dissertation*. 2006, Universität Halle-Wittenberg.
56. Teichert, A. Fungitoxische Inhaltsstoffe aus Fruchtkörpern der Gattung *Hygrophorus* (Basidiomycetes). *Diplomarbeit*. 2004, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale).
57. 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.
58. Teichert, A. Chemische und Biologische Untersuchung von Inhaltsstoffen aus Pilzfruchtkörpern der Gattung *Cortinarius* und *Hygrophorus*. *Dissertation*. 2008, Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
59. Eschen-Lippold, L., Dräger, T., Teichert, A., Wessjohann, L., Westermann, B., Rosahl, S., Arnold, N. Antioomycete Activity of Oxocrotonate Fatty Acids against *P. infestans*. *J. Agric. Food. Chem.* 2009, 57, 9607-9612.
60. Gilardoni, G., Clericuzio, M., Marchetti, A., Finzi, P.V., Zanoni, G., Vidari, G. New Oxidized 4-Oxo Fatty Acids from *Hygrophorus discoxanthus*. *J. Nat. Prod. Commun.* 2006, 12, 1079-1084.

61. Gilardoni, G., Clericuzio, M., Tosi, S., Zanoni, G., Vidari, G. Antifungal Acylcyclopentenenediones from Fruiting Bodies of *Hygrophorus chrysodon*. *J. Nat. Prod.* 2007, 70, 137-139.
62. Teichert, A., Lübken, T., Schmidt, J., Kuhnt, C., Huth, M., Porzel, A., Wessjohann, L., Arnold, N. Determination of Carboline Alkaloids in Fruiting Bodies of *Hygrophorus* spp. by Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry. *Phytochem. Anal.* 2008, 19, 335-341.
63. Tsitsigiannis, D., Keller, N. Oxylipins as Developmental and Host-Fungal Communication Signals. *Trends Microbiol.* 2007, 15, 109-118.
64. Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I. Oxylipins: Structurally diverse Metabolites from Fatty Acid Oxidation. *Plant. Physiol. Biochem.* 2009, 47, 511-517.
65. Christensen, S.A., Kolomiets, M.V. The Lipid Language of Plant-Fungal Interactions. *Fungal Genet. Biol.* 2010, doi: 10.1016/j.fgb.2010.05.005.
66. Tsitsigiannis, D.I., Keller, N.P. Oxylipins act as Determinants of Natural Product Biosynthesis and Seed Colonization in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 2006, 59, 882-892.
67. Brodhagen, M., Tsitsigiannis, D.I., Hornung, E., Goebel, C., Feussner, I., Keller, N. Reciprocal Oxylin-mediated Cross-talk in the *Aspergillus*-seed Pathosystem. *Mol. Microbiol.* 2008, 67, 378-391.
68. Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Fournier, J. et al. Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylin Supports their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* 2005, 139, 1902-1913.
69. Bowers, W.S., Hoch, H.C., Evans, P.H., Katayama, M. Thallophytic Allelopathy: Isolation and Identification of Laetisarinic Acid. *Science*. 1986, 232, 105-106.
70. Kuribayashi, T., Kaise, H., Uno, C., Hara, T., Hayakawa, T., Joh, T. Purification and Characterization of Lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J. Agric. Food. Chem.* 2002, 50, 1247-1253.
71. Wadman, M.W., van Zadelhoff, G., Hamberg, M., Visser, T., Veldink, G.A., Vliegenthart, J.F.G. Conversion of Linoleic Acid into Novel Oxylin by the Mushroom *Agaricus bisporus*. *Lipids*. 2005, 40, 1163-1170.
72. Cantrell, C.L., Case, B.P., Mena, E.E., Kniffin, T.M., Duke, S.O., Wedge, D.E. Isolation and Identification of Antifungal Fatty Acids from the Basidiomycete *Glomphus floccosus*. *J. Agric. Food. Chem.* 2008, 56, 5062-5068.
73. Desbois, A.P., Smith, V. Antibacterial Fatty Acids: Activities, Mechanisms of Action and Biotechnological Potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010, 85, 1629-1642.

74. Kabara, J.J., Swieczkowski, D.M., Conley, A.J., Truant, J.P. Fatty Acids and Derivatives as Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1972, 2, 23-28.
75. Kabara, J.J., Vrable, R., Lie Ken Jie, M.S.F. Antimicrobial Lipids: Natural and Synthetic Fatty Acids and Monoglycerides. *Lipids.* 1977, 12, 753-759.
76. Zheng, C.J., Yoo, J.S., Lee, T.G., Cho, H.Y., Kim, Y.H., Kim, W.G. Fatty Acid Synthesis is a Target for Antibacterial Activity of Unsaturated Fatty Acids. *FEBS Letters.* 2005, 579, 5157-5162.
77. Smith, C.A., Want, E.J., O'Maille, G.O., Abagyan, R., Siuzdak, G. XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, and Identification. *Anal. Chem.* 2006, 78, 779-787.
78. Veening, J.W., Smits, W.K., Hamoen, L.W., Jongbloed, J.D.H., Kuipers, O.P. Visualization of Differential Gene Expression by Improved Cyan Fluorescent Protein and Yellow Fluorescent Protein Production in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 6809-6815.
79. Ippolito, J.E. A Functional Metabolomics Approach to Prostate and Neuroendocrine Carcinogenesis. *Dissertation.* 2007, Universität Washington, St. Louis, USA.
80. Murphy, R.C., Fiedler, J., Hevko, J. Analysis of Nonvolatile Lipids by Mass Spectrometry. *Chem. Rev.* 2001, 101, 479-526.
81. Murphy, R.C., Barkley, R.M, Berry, K.Z., Hankin J., Harrison, K., Johnson, C., Krank, J., McAnoy, A., Uhlson, C., Zarini, S. Electrospray Ionization and Tandem Mass Spectrometry of Eicosanoids. *Anal. Biochem.* 2005, 346, 1-42.
82. Garscha, U., Jernerén, F., Chung, D., Keller, N.P., Hamberg, M., Oliw, E.H. Identification of Dioxygenases Required for *Aspergillus* Development. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 34707-34718.
83. Nilsson, T., Martínez, E., Manresa, A., Oliw, E.H. Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometric Analysis of 7,10-dihydroxyoctadecenoic acid, its Isotopomers, and other 7,10-dihydroxy Fatty Acids formed by *Pseudomonas aeruginosa* 42A2. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 2010, 24, 777-783.
84. Lübken, T., Arnold, N., Wessjohann, L., Böttcher, C., Schmidt, J. Analysis of Fungal Cyclopentenone Derivatives from *Hygrophorus* spp. by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2006, 41, 361-371.
85. Birkemeyer, C., Kolasa, A., Kopka, J. Comprehensive Chemical Derivatization for Gas Chromatography-Mass Spectrometry-based multi-target Profiling of the Major Phytohormones. *J. Chromatogr. B.* 2003, 993, 89-102.
86. Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., Fernie, A. Gas Chromatography Mass Spectrometry-based Metabolite Profiling in Plants. *Nat. Protoc.* 2006, 1, 387-396.

a. Anhang

Extraktion und Pilzmaterial

Tabelle a - 1 Verwendete *Hygrophorus*-Spezies und Extraktionsmethoden für den Vergleich der biologischen Aktivität.

Spezies	Kollektion	Zustand	Extraktions- methode	Extraktions- mittel
<i>Hygrophorus erubescens</i>	40/97	lyophilisiert	D2	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
	34/05	tiefgefroren	Ultraschall	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
<i>Hygrophorus russula</i>	289/98	lyophilisiert	D2	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
	69/05	tiefgefroren	Ultraschall	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
<i>Hygrophorus poetarum</i>	201/95	lyophilisiert	D2	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
	62/04	tiefgefroren	Ultraschall	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
<i>Hygrophorus pudorinus</i>	262/95	lyophilisiert	D2	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH
	88/08	tiefgefroren	Ultraschall	1. <i>n</i> -Hexan 2. MeOH

Tabelle a - 2 Verwendete *Hygrophorus*-Spezies und Extraktionsmethoden für das „Proof of concept“ mit nativen Extrakten.

Spezies	Kollektion	Zustand	Extraktions- methode	Extraktions- mittel
<i>Hygrophorus lucorum</i>	63/07	tiefgefroren	Stetiges Schütteln	80 % MeOH
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	130/94	lyophilisiert	C*	80 % MeOH
	130/94	lyophilisiert	D1**	100 % MeOH
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	72/00	tiefgefroren	A	EtOAc
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	46/03	lyophilisiert	D2	100 % MeOH
<i>Hygrophorus olivaceoalbus</i>	-	In MeOH eingelegt	Stetiges Schütteln	100 % MeOH

* wurde für das „Proof of concept“ Experiment in Kapitel 4.4.3.1 eingesetzt

** bezieht sich auf das Experiment in Kapitel 4.4.3.2

Tabelle a - 3 Verwendete *Hygrophorus*-Spezies und Extraktionsmethoden für die Identifizierung aktivitätsrelevanter Metaboliten.

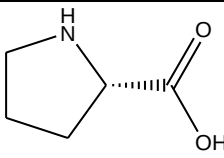
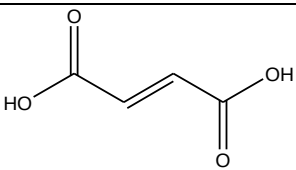
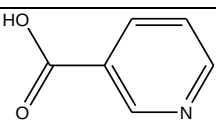
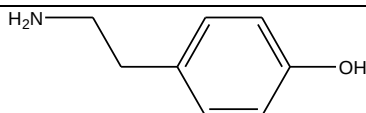
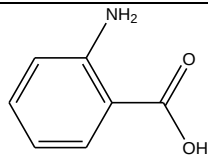
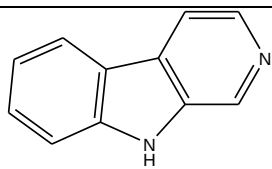
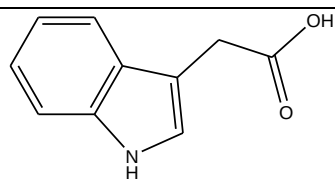
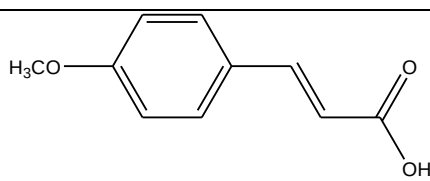
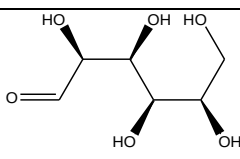
Spezies	Kollektion	Zustand	Extraktions- methode	Extraktions- mittel
<i>Hygrophorus pustulatus</i>	40/03	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	40/03	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus discoideus</i>	81/04	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	81/04	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus lucorum</i>	65/02	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	65/02	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus poetarum</i>	88/04	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	88/04	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus unicolor</i>	61/02	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	61/02	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus nemoreus</i>	53/07	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	53/07	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus arbustivus</i>	55/07	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	55/07	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus agathosmus</i>	38/05	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	38/05	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus gliocyclus</i>	50/02	tiefgefroren	Ultraschall	100 % MeOH
	50/02	bei 40°C getrocknet	D1	100 % MeOH
<i>Hygrophorus latitabundus</i>	87/02	lyophilisiert	D1	100 % MeOH

Tabelle a - 4 Faktorermittlung zur Normierung Frisch- auf Trockengewicht von *H. pustulatus* (111/08).

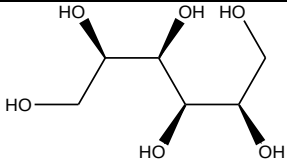
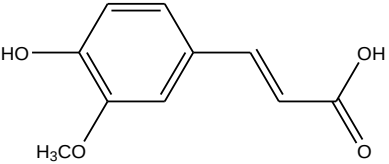
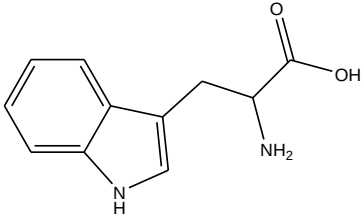
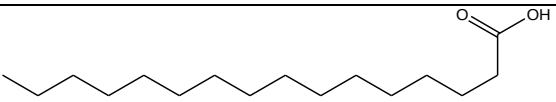
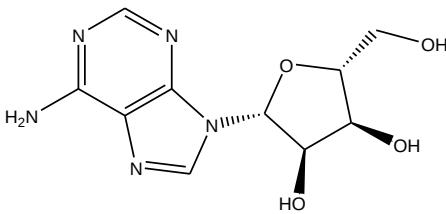
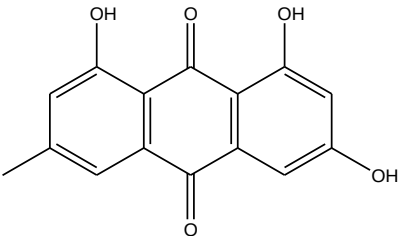
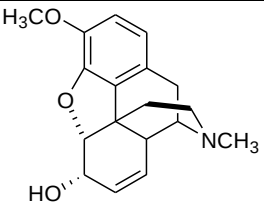
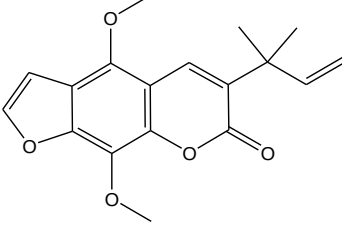
Menge (g) tiefgefr.	Menge (g) lyophil.	Faktor
10,28	1,36	7,56
10,85	1,53	7,09
10,13	1,26	8,04
10,36	1,53	6,77
10,17	1,10	9,25
10,32	1,33	7,76
Ø 10,35 +/- 0,24	Ø 1,35 +/- 0,15	Ø 7,74 +/- 0,79

Zusammensetzung der artifiziellen Extrakten

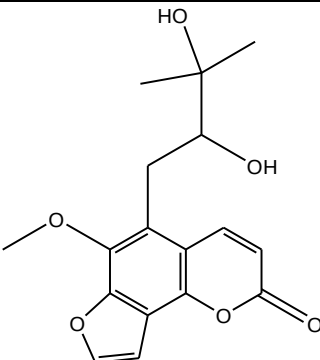
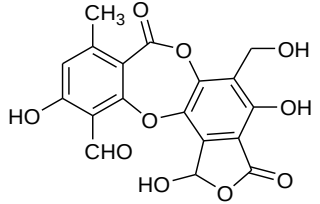
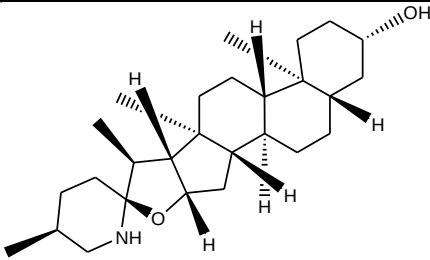
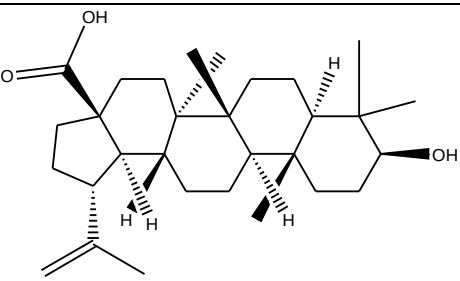
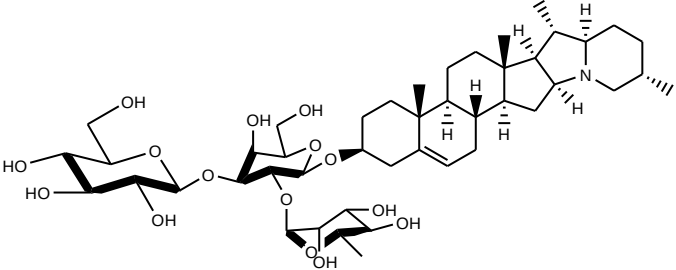
Tabelle a - 5 Übersicht über die für das „Proof of concept“ Experiment mit artifiziellen Extrakten verwendeten Reinsubstanzen, deren Molare Masse und Strukturformel.

Name	M (g/mol)	Strukturformel
Prolin	115,13	
Fumarsäure	116,07	
Nicotinsäure	123,11	
Tyramin	137,08	
Anthranilsäure	137,14	
Norharman	168,19	
Indolessigsäure	175,06	
4-Methoxyzimtsäure	178,18	
Mannose	180,16	

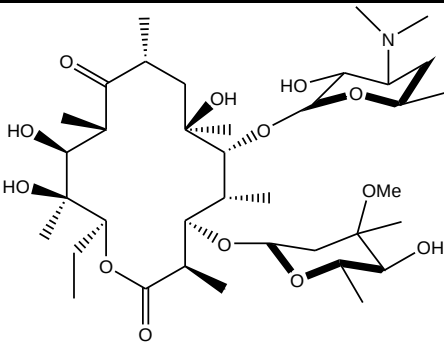
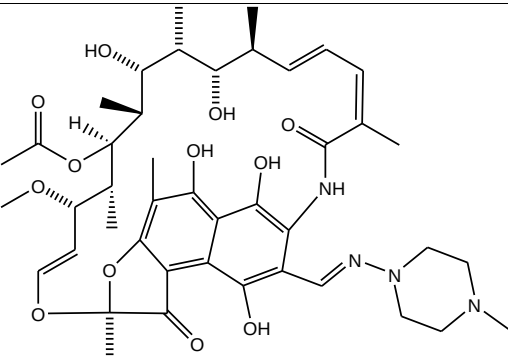
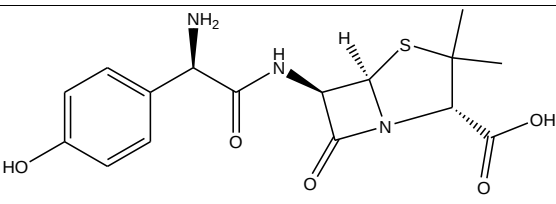
Fortsetzung Tabelle a - 5

Mannitol	182,17	
Ferulasäure	194,18	
Tryptophan	204,09	
Palmitinsäure	256,42	
Adenosin	267,24	
Emodin	270,24	
Codein	299,36	
Dimethoxychalepensin	314,11	

Fortsetzung Tabelle a - 5

Swientenocoumarin F	318,11	
Salazinsäure	388,04	
Tomatidin	415,65	
Betulinsäure	456,71	
Solanin	868,06	

Fortsetzung Tabelle a - 5

Antibiotika		
Erythromycin	733,92	
Rifampicin	822,94	
Amoxicillin	365,40	

Datenanalyse

XCMS-Skript

Starten von XCMS und laden der Bibliotheken

```
> library(xcms)
```

```
> library(esi)
```

Pfadangabe für Eingabe und Ausgabe Daten

```
> setwd('Pfadangabe für Rohdaten')
```

```
> outfilebase <- 'Pfadangabe für Ausgabe';
```

Dateien einlesen und Peakpicking durchführen

```
> method_groupval = "medret"
```



```
> files <- list.files(lpath,full.names = T)
> snr = 5
> fwhm = 30
> step = 0,2
> mzdifff = 0,3
> profmethod = "binlinbase"
> xset <- xcmsSet(files=files,snames = gsub("\\.[^]*$", "", basename(files)), sclass =
gsub("\\.\\$", "sample", dirname(files)), sn = snr, step=step, profmethod = profmethod,
mzdifff=mzdifff, fwhm=fwhm, sleep=0)
> file='Name'
> save(xset,file=file)
> file='Name'
> load(file)
```

Gruppeneinteilung

```
> sampclass(xset)<-
as.factor(c(1,1,1,2,2,2,3,3,3,4,4,4,5,5,5,6,6,6,7,7,7,8,8,8,9,9,9,10,10,10,11,11,11,12,12,
12,13,13,13,14,14,14,15,15,15,16,16,16,17,17,17,18,18,18))
> xset_group1 <- group(xset, minfrac = 0.67, bw = 30, mzwid = 0.3, max = 50)
> xset_group2 <- group(xset_group1, minfrac = 0.67, bw = 30, mzwid = 0.3, max = 50)
> xset_final <- group(xset_group2, minfrac = 0.67, bw = 30, mzwid = 0.3, max = 50)
```

Ausgabe

```
> my.peaks<- peakTable(xset_final)
> write.table(my.peaks, file="peaks",sep ="\\t ")
```

Aktivitäts-Korrelations-Analyse (AcorA)

Starten von AcorA und einlesen der Daten

```
> library(peakcorrs, lib="Pfadangabe des peakcorrs Paket")
> tab<-read.table("Pfadangabe alignierte Peakmatrix")
```

Auswählen der Abschnitte, die die Peakintensitäten enthalten

```
> colnames(tab)
> tab2<-tab[,25:75]
```

Zeile für die Bioaktivitäten anfügen

```
> tab2<-rbind(tab2, ceiling(1:ncol(tab2)/3))
> tab2[nrow(tab2),]
```

```
> rownames(tab2)[nrow(tab2)]<-"group"
> tab2[nrow(tab2),]
```

Hinzufügen der Bioaktivitäten

```
> ba<-c(ba 1, ba 2, ba 3,..., ba n)
> tab2<- rbind(tab2, unlist(lapply(ba, function(x){rep(x, 3)})))
> lapply(ba, function(x){rep(x, 3)})
> tab2[nrow(tab2):(nrow(tab2)-1),]
> rownames(tab2)[nrow(tab2)]<- "ba"
```

Aktivitäts-Korrelations-Analyse durchführen (minfrac = 2/3 oder minsamp = 2)

```
> erg<-doCorAnalysis(as.matrix(tab2), "spearman", 2/3, 1000, 0.05)
> tab_save<-tab[is.element(rownames(tab), names(erg)),]
> rownames(tab_save)
> names(erg)
> ids<-match(names(erg),rownames(tab_save))
> tab_save<-tab_save[ids,]
> tab_save<-cbind(erg,tab_save)
> colnames(tab_save)[1]<-"spearman"
> tab_save2<-rbind(tab_save,NA)
> tab_save2[nrow(tab_save2),]
> tab_save<-tab_save2
> tab_save[nrow(tab_save),26:76]<-ceiling(1:51/3)
> tab_save[nrow(tab_save),]
> rownames(tab_save)[nrow(tab_save)]<-"group"
```

Hinzufügen des Gruppenvorkommens

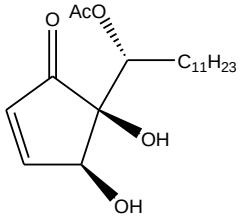
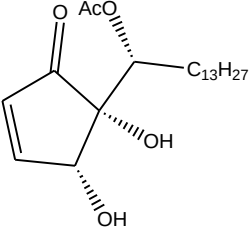
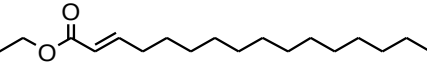
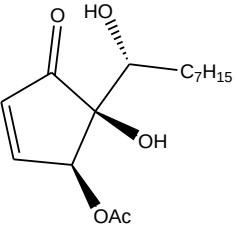
```
> grinfo<-addGroupOccurrenceInfo(as.matrix(tab_save), 2/3, 9)
> colnames(grinfo)
```

Ausgabe der Korrelationsergebnisse

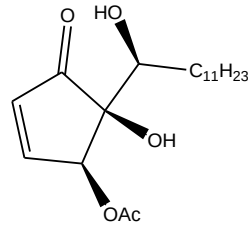
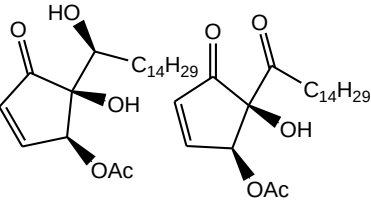
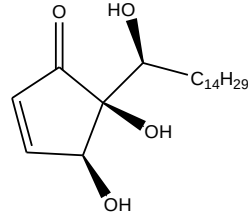
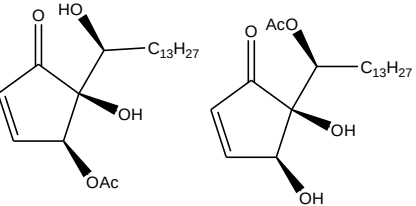
```
> write.csv(grinfo, file="Pfadangabe und Dateiname.csv")
```

Biologische Aktivität von Hygrophoron-Derivaten

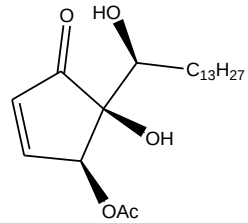
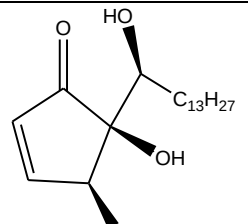
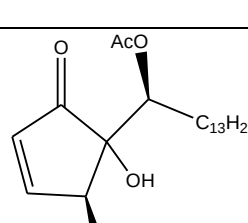
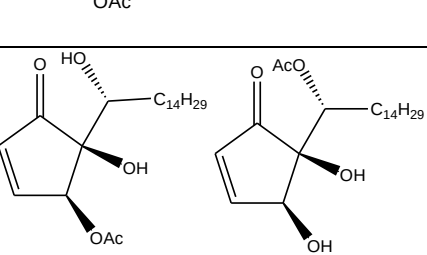
Tabelle a - 6 Übersicht über die biologische Aktivität synthetisch erzeugter Hygrophoron-Derivate (Tobias Dräger, Dissertation in Vorbereitung).

Proben-ID	Struktur	Mol-ID	Wachstumsinhibierung %			
			$\beta = 0,1 \mu\text{g/mL}$	$\beta = 1 \mu\text{g/mL}$	$\beta = 10 \mu\text{g/mL}$	$\beta = 100 \mu\text{g/mL}$
DRT300B		5118	n.b.	15 +/- 8	70 +/- 6	76 +/- 5
DRT305_2		5129	33 +/- 2	73 +/- 4	91 +/- 4	45** +/- 12
DRT217		4163	24 +/- 6	1 +/- 7	26 +/- 7	8 +/- 7
DRT301A		5519	n.b.	7 +/- 15	65 +/- 5	75 +/- 3

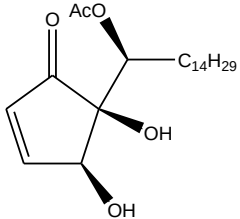
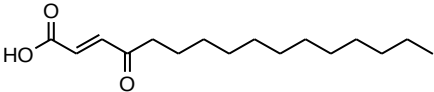
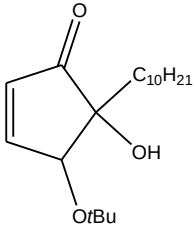
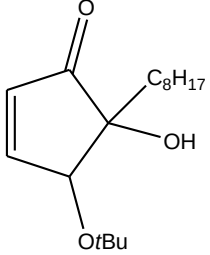
Fortsetzung Tabelle a - 6

DRT300A		5117	33 +/- 2	72 +/- 4	76 +/- 2	70 +/- 8
DRT259		5093	n.b.	-2 +/- 9	16 +/- 5	68 +/- 8
DRT267		5103	n.b.	13 +/- 9	18 +/- 1	65 +/- 8
DRT263-1		5086	n.b.	6 +/- 4	9 +/- 2	39 +/- 19
DRT263-2			8 +/- 4	71 +/- 3	81 +/- 3	33 [#] +/- 2
DRT263-3			29 +/- 5	68 +/- 2	75 +/- 2	52 +/- 2

Fortsetzung Tabelle a - 6

DRT305-1		5128	8 +/- 14	66 +/- 3	76 +/- 6	44 +/- 1
DRT262-2-2		5101	27 +/- 2	56 +/- 5	67 +/- 5	41* +/- 6
DRT260-2		5100	24 +/- 6.	65 +/- 7	75 +/- 5	63 +/- 5
DRT264a		5089	n.b.	-19 +/- 2	67 +/- 1	66 +/- 2
DRT264b			18 +/- 2	69 +/- 3	84 +/- 2	42* +/- 3

Fortsetzung Tabelle a - 6

DRT262-2-3		5102	31 +/- 7	18 +/- 2	70 +/- 6	64 +/- 6
DRT173		5084	n.b.	10 +/- 11	70 +/- 2	73 +/- 2
DRT013		5077	n.b.	25 +/- 5	29 +/- 4	75 +/- 9
DRT020		5079	n.b.	24 +/- 6	26 +/- 3	34 +/- 1

** K1 Wert sehr groß d.h. Eigenfluoreszenz der Probe; * K1 Wert leicht erhöht; # Ausgefallen d.h. Verfälschung der Messwerte durch erhöhte Streustrahlung

„Proof of concept“ mit artifiziellen und nativen Extrakten – Hitlisten**Tabelle a - 7** Hitliste des „Proof of concept“ Experiments mit artifiziellen Extrakten.

Nr.	Korrelationskoeffizient	m/z (+)ESI	t _R (min)	Mögliche Annotation
1	0,7133	733,13	2,26	[Ery] ⁺
2	0,7110	749,26	11,18	gehört vermutlich zu Rifampicin-H ₂
3	0,6775	333,51	13,85	NA
4	0,6726	161,17	13,94	gehört vermutlich zu Rifampicin
5	0,6563	791,94	13,88	[Rif-H ₂ -CH ₃ OH+H] ⁺ 2. Isotop
6	0,6563	792,71	13,88	[Rif-CH ₃ OH+H] ⁺ 1. Isotop
7	0,6563	793,46	13,87	[Rif-CH ₃ OH+H] ⁺ 2. Isotop/ [Rif-CH ₂ O+H] ⁺
8	0,6563	794,26	13,88	[Rif-CH ₂ O+H] ⁺ 1. Isotop
9	0,6563	795,87	13,89	[Rif-CH ₂ O+H] ⁺ 2. Isotop
11	0,6545	123,08	13,90	Verunreinigung von Rifampicin
12	0,6545	163,18	13,86	Verunreinigung von Rifampicin
13	0,6545	175,26	13,86	NA
14	0,6545	191,25	13,88	gehört vermutlich zu Rifampicin
15	0,6545	231,30	13,88	NA
16	0,6545	315,43	13,88	NA
17	0,6545	795,06	13,89	[Rif-CO+H] ⁺
18	0,6545	822,87	13,89	durch Ionisierung entstanden [Rif-H ₂ +H] ⁺ 1. Isotop
19	0,6545	823,94	13,89	[Rif+H] ⁺
20	0,6545	826,07	13,88	[Rif+H] ⁺ 3. Isotop
21	0,6545	828,09	13,88	[Rif-H ₂ O+Na] ⁺ 1. Isotop
23	0,6545	845,29	13,89	[Rif+Na] ⁺
24	0,6545	847,29	13,88	[Rif+Na] ⁺ 2. Isotop
25	0,6545	848,31	13,85	[Rif+Na] ⁺ 3. Isotop
26	0,6545	935,89	13,88	NA
27	0,6528	107,09	13,85	NA
28	0,6528	209,26	13,89	Verunreinigung
29	0,6528	219,27	13,90	NA
30	0,6528	846,29	13,89	[Rif+Na] ⁺ 1. Isotop
31	0,6510	193,23	13,86	gehört vermutlich zu Rifampicin
32	0,6510	827,08	13,89	[Rif-H ₂ O+Na] ⁺
33	0,6510	837,10	13,88	[Rif+Me+H] ⁺
34	0,6493	151,08	13,88	gehört vermutlich zu Rifampicin
35	0,6493	153,11	13,87	gehört vermutlich zu Rifampicin
36	0,6493	173,15	13,90	NA
37	0,6493	838,10	13,88	[Rif+Me+H] ⁺ 1. Isotop
39	0,6493	843,30	13,93	durch Ionisierung entstanden [Rif-H ₂ +Na] ⁺
40	0,6493	893,73	13,86	NA
41	0,6476	135,05	13,90	Verunreinigung
42	0,6476	177,10	13,85	NA
43	0,6476	201,23	13,86	NA
44	0,6476	726,94	20,30	nicht identifiziertes Peakcluster
45	0,6476	748,29	20,32	nicht identifiziertes Peakcluster
46	0,6476	897,81	13,87	NA
47	0,6458	165,12	13,87	NA
48	0,6458	399,53	13,86	NA
49	0,6441	179,17	13,90	NA

Fortsetzung Tabelle a - 7

50	0,6441	400,39	13,90	NA
51	0,6441	821,75	13,90	durch Ionisierung entstanden $[\text{Rif-H}_2+\text{H}]^+$
52	0,6441	872,28	14,14	NA
53	0,6441	912,86	13,92	NA
54	0,6424	836,38	13,90	$[\text{Rif-H}_2\text{O}+\text{Na}]^+$ 3. Isotop
55	0,6406	147,15	13,91	NA
56	0,6389	877,06	13,86	$[\text{Rif-H}_2+56+\text{H}]^+$
57	0,6384	891,06	11,73	gehört vermutlich zu Rifampicin-H ₂
58	0,6371	137,10	13,88	NA
59	0,6371	211,26	13,88	NA
60	0,6371	839,08	13,93	$[\text{Rif}+\text{Me}+\text{H}]^+$ 2. Isotop
61	0,6354	821,41	11,78	$[\text{Rif-H}_2+\text{H}]^+$
62	0,6354	843,30	11,81	$[\text{Rif-H}_2+\text{Na}]^+$
63	0,6354	844,28	11,74	$[\text{Rif-H}_2+\text{Na}]^+$ 1. Isotop
64	0,6354	845,27	11,75	$[\text{Rif-H}_2+\text{Na}]^+$ 2. Isotop
65	0,6337	840,12	13,22	$[\text{Rif-H}_2+\text{H}_2\text{O}]^+$ 1. Isotop
66	0,6337	841,11	13,85	$[\text{Rif-H}_2-\text{H}_2\text{O}]^+$ 2. Isotop
67	0,6337	873,29	14,16	NA
68	0,6319	838,13	11,83	$[\text{Rif-H}_2+\text{OH}+\text{H}]^+$ 1. Isotop
69	0,6284	878,11	13,87	$[\text{Rif-H}_2+56+\text{H}]^+$ 1. Isotop
70	0,6284	936,87	13,85	NA
71	0,6262	352,54	26,57	NA
72	0,6250	855,07	13,86	$[\text{Rif}+2(\text{OH})+\text{H}]^+$
73	0,6250	856,05	13,85	$[\text{Rif}+2(\text{OH})+\text{H}]^+$ 1. Isotop
74	0,6250	857,05	13,87	$[\text{Rif}+2(\text{OH})+\text{H}]^+$ 2. Isotop
75	0,6185	822,41	13,89	$[\text{Rif}]^+$
76	0,6026	825,06	13,88	$[\text{Rif}+\text{H}]^+$ 3. Isotop
77	0,6026	837,54	15,66	$[\text{Rif}+\text{Me}+\text{H}]^+$
78	0,5987	823,10	11,85	$[\text{Rif-H}_2+\text{H}]^+$ 2. Isotop
79	0,5977	823,10	11,85	$[\text{Rif-H}_2+\text{H}]^+$ 2. Isotop
80	0,5917	329,14	1,99	NA
81	0,5912	820,47	11,88	gehört vermutlich zu Rifampicin-H ₂
82	0,5895	791,23	13,90	$[\text{Rif-CH}_3\text{OH}+\text{H}]^+$
83	0,5895	837,13	11,78	$[\text{Rif-H}_2+\text{OH}+\text{H}]^+$
84	0,5836	612,28	2,06	NA
85	0,5836	878,94	13,87	$[\text{Rif-H}_2+56+\text{H}]^+$ 2. Isotop
86	0,5817	109,08	13,86	NA
87	0,5817	695,15	20,29	nichtidentifiziertes Peakcluster
88	0,5817	724,09	20,31	nicht identifiziertes Peakcluster
89	0,5780	670,89	37,19	NA
90	0,5779	694,18	20,31	nicht identifiziertes Peakcluster
91	0,5742	823,38	13,90	$[\text{Rif}+\text{H}]^+$
92	0,5691	883,38	13,86	$[\text{Rif}+56+\text{H}]^+$ 3. Isotop
93	0,5684	842,87	11,76	$[\text{Rif-H}_2+\text{Na}]^+$
94	0,5684	737,89	2,07	$[\text{Ery}+\text{H}]^+$ 3. Isotop
95	0,5679	634,96	2,13	NA
96	0,5672	729,84	2,16	NA
97	0,5665	839,20	13,15	$[\text{Rif-H}_2+\text{H}_2\text{O}]^+$
98	0,5646	790,68	11,76	$[\text{Rif-H}_2-\text{CH}_3\text{OH}+\text{H}]^+$ 1. Isotop
99	0,5646	859,29	11,81	$[\text{Rif-H}_2+\text{K}]^+$

Fortsetzung Tabelle a - 7

100	0,5627	807,50	15,60	[Rif-OH+H] ⁺
101	0,5611	540,27	2,00	gehört vermutlich zu Erythromycin
102	0,5605	210,14	2,01	NA
103	0,5597	853,31	2,31	NA
104	0,5572	822,08	11,79	[Rif-H ₂ +H] ⁺ 1. Isotop
105	0,5544	236,85	39,61	NA
106	0,5515	736,28	2,14	[Ery+H] ⁺ 2. Isotop
107	0,5501	734,69	2,53	Erythromycin [Ery+H] ⁺
108	0,5495	696,08	18,89	NA
109	0,5495	796,66	13,89	[Rif-HCN+H] ⁺
110	0,5476	125,10	13,87	NA
111	0,5476	749,30	20,34	nicht identifiziertes Peakcluster
112	0,5457	881,56	10,02	NA
113	0,5457	319,49	1,96	NA
114	0,5425	755,66	2,00	[Ery+Na] ⁺
115	0,5419	316,29	13,90	gehört vermutlich zu Rifampicin
116	0,5398	867,28	13,96	[Rif+CO ₂ +H] ⁺
117	0,5390	838,73	2,27	NA
118	0,5381	913,88	13,86	NA
119	0,5362	121,13	13,93	NA
120	0,5362	844,27	13,93	durch Ionisierung entstanden [Rif-H ₂ +Na] ⁺ 1. Isotop
121	0,5355	935,08	13,89	NA
122	0,5340	724,90	2,28	NA
123	0,5281	169,33	2,13	NA
124	0,5278	117,06	2,10	NA
125	0,5216	375,71	13,84	NA
126	0,5216	797,48	13,88	[Rif-HCN+H] ⁺ 1. Isotop
127	0,5216	807,82	13,91	[Rif-OH+H] ⁺
128	0,5210	742,27	37,88	NA
129	0,5194	336,49	25,65	NA
130	0,5190	882,43	13,86	[Rif+56+H] ⁺ 2. Isotop
131	0,5175	809,07	13,46	gehört vermutlich zu Rifampicin
132	0,5174	297,45	13,88	gehört vermutlich zu Rifampicin
133	0,5173	693,54	20,29	nicht identifiziertes Peakcluster
134	0,5163	343,42	14,39	NA
135	0,5152	735,36	2,47	[Ery+H] ⁺ 1. Isotop
136	0,5142	887,92	13,95	NA
137	0,5135	725,95	20,31	nicht identifiziertes Peakcluster
138	0,5120	949,26	1,94	NA
139	0,5099	880,45	10,03	NA
140	0,5097	854,41	13,90	NA
141	0,5047	200,16	1,88	NA
142	0,5042	448,87	2,22	NA
143	0,4936	116,01	2,14	NA
144	0,4918	442,27	2,00	NA
145	0,4907	397,31	13,87	gehört vermutlich zu Rifampicin
146	0,4895	942,25	2,18	NA
147	0,4864	874,12	14,14	NA
148	0,4843	711,37	18,71	NA
149	0,4843	720,13	2,26	[Ery-Me+H] ⁺

Fortsetzung Tabelle a - 7

150	0,4843	758,70	2,22	[Ery+Na] ⁺ 2. Isotop
151	0,4843	760,01	1,82	NA
152	0,4843	789,69	11,78	[Rif-H ₂ -CH ₃ OH+H] ⁺
153	0,4832	923,03	2,26	NA
154	0,4813	535,90	1,98	NA
155	0,4792	558,38	9,78	Erythromycin - Zucker 176 amu [Ery-C ₈ H ₁₆ O ₄ +H] ⁺
156	0,4792	706,11	18,72	NA
157	0,4792	715,87	9,83	[Ery-H ₂ O+H] ⁺
158	0,4792	716,33	9,78	[Ery-H ₂ O+H] ⁺
159	0,4792	717,24	9,78	[Ery-H ₂ O+H] ⁺ 1. Isotop
160	0,4792	718,23	9,80	[Ery-H ₂ O+H] ⁺ 2. Isotop/[Ery-O+H] ⁺
161	0,4792	748,15	10,41	NA
162	0,4790	746,33	20,31	nicht identifiziertes Peakcluster
163	0,4790	800,10	13,88	NA
164	0,4788	752,67	2,07	Erythromycin [Ery+H+H ₂ O] ⁺
165	0,4781	245,01	9,89	gehört vermutlich zu Erythromycin
166	0,4779	912,83	11,94	NA
167	0,4761	880,86	13,83	[Rif+56+H] ⁺ 1. Isotop
168	0,4755	878,10	11,96	gehört vermutlich zu Rifampicin-H ₂
169	0,4747	401,04	13,89	NA
170	0,4747	750,30	20,27	nicht identifiziertes Peakcluster
171	0,4747	799,42	13,85	NA
172	0,4747	849,09	14,42	NA
173	0,4747	907,09	13,88	NA
174	0,4729	935,31	35,51	NA
175	0,4726	791,46	11,71	[Rif-H ₂ -CH ₃ OH+H] ⁺ 2. Isotop
176	0,4703	891,37	1,84	NA
177	0,4662	900,92	16,25	NA
178	0,4662	904,88	13,84	NA
179	0,4659	444,83	2,30	NA
180	0,4587	913,71	11,94	NA
181	0,4566	513,51	2,01	NA
182	0,4563	272,92	5,43	NA
183	0,4563	416,61	12,46	NA
184	0,4563	725,33	20,31	nicht identifiziertes Peakcluster
185	0,4563	789,57	13,89	[Rif-H ₂ -CH ₃ OH+H] ⁺
186	0,4563	790,35	13,88	[Rif-H ₂ -CH ₃ OH+H] ⁺ 1. Isotop
187	0,4563	810,11	13,83	NA
188	0,4563	990,69	13,82	NA
189	0,4551	259,27	27,41	NA
190	0,4546	360,07	35,93	NA
191	0,4537	188,80	2,09	NA
192	0,4537	490,07	4,65	NA
193	0,4528	479,46	2,23	NA
194	0,4513	982,96	39,80	NA
195	0,4512	184,43	2,11	NA
196	0,4512	611,33	2,17	NA
197	0,4503	830,00	2,06	NA
198	0,4472	252,81	2,05	NA
199	0,4465	186,81	3,75	NA

Fortsetzung Tabelle a - 7

200	0,4453	700,42	1,96	NA
201	0,4452	974,18	35,48	NA
202	0,4449	354,52	28,76	NA
203	0,4446	972,07	1,83	NA
204	0,4446	749,61	5,22	NA
205	0,4446	310,05	34,97	NA
206	0,4442	784,98	2,14	gehört vermutlich zu Erythromycin
207	0,4433	248,02	37,24	NA
208	0,4433	669,83	1,95	NA
209	0,4419	172,13	24,53	NA
210	0,4406	247,68	6,03	NA
211	0,4406	248,35	6,05	NA
212	0,4406	558,70	5,90	NA
213	0,4406	618,98	5,10	NA
214	0,4403	550,12	2,08	NA
215	0,4396	375,39	34,98	NA
216	0,4390	661,89	5,33	NA
217	0,4363	991,56	1,87	NA
218	0,4346	856,43	2,22	NA
219	0,4336	176,81	3,17	gehört vermutlich zu Erythromycin
220	0,4331	454,64	2,11	gehört vermutlich zu Erythromycin
221	0,4320	300,38	1,92	NA
222	0,4308	708,53	20,30	nicht identifiziertes Peakcluster
223	0,4308	798,72	13,88	[Rif-HCN+H] ⁺ 2. Isotop
224	0,4308	756,76	1,99	[Ery+Na] ⁺ 1. Isotop
225	0,4299	829,29	13,90	gehört vermutlich zu Rifampicin
226	0,4296	310,43	31,73	NA
227	0,4295	862,87	1,91	NA
228	0,4282	128,33	1,93	NA

NA – not annotated

Tabelle a - 8 Hitliste aus dem „Proof of concept“ Experiment mit nativen Extrakten.

Nr.	Korrelations- koeffizient	m/z (+)ESI	t _R (min)	Mögliche Annotation
1	0,6613	904,07	2,28	NA
2	0,6508	163,27	13,78	gehört vermutlich zu Rifampicin
3	0,6456	822,33	11,95	[Rif-H ₂ +H] ⁺ 1. Isotop
4	0,6456	821,52	11,97	[Rif-H ₂ +H] ⁺
5	0,6439	821,07	11,95	[Rif-H ₂ +H] ⁺
6	0,6439	846,37	13,76	[Rif+Na] ⁺ 1. Isotop
7	0,6439	845,40	13,78	[Rif+Na] ⁺
8	0,6421	795,08	13,78	[Rif-CO+H] ⁺
9	0,6404	822,62	13,77	durch Ionisierung entstanden [Rif-H ₂ +H] ⁺ 1. Isotop
10	0,6378	117,11	2,39	NA
11	0,6369	123,13	13,78	Verunreinigung
12	0,6369	151,16	13,78	gehört vermutlich zu Rifampicin
13	0,6335	209,30	13,75	Verunreinigung
14	0,6300	826,23	13,77	[Rif+H] ⁺ 3. Isotop
15	0,6300	839,46	15,41	[Rif+O+H] ⁺
16	0,6282	824,07	13,78	[Rif+H] ⁺ 1. Isotop
17	0,6282	825,21	13,78	[Rif+H] ⁺ 2. Isotop
18	0,6282	792,69	13,80	[Rif-CH ₃ OH+H] ⁺ 1. Isotop
19	0,6282	855,16	13,94	[Rif-(O) ₂ +H] ⁺
20	0,6194	781,94	2,29	NA
21	0,6089	298,08	1,65	NA
22	0,6068	755,10	1,74	[Ery+Na] ⁺
23	0,6068	755,10	1,74	[Ery+Na] ⁺
24	0,6042	861,32	13,80	[Rif+K] ⁺
25	0,6004	191,29	13,78	gehört vermutlich zu Rifampicin
26	0,6004	551,88	2,37	NA
27	0,5966	837,32	11,90	[Rif-H ₂ +O+H] ⁺
28	0,5966	795,87	13,78	[Rif-CO+H] ⁺ 1. Isotop
29	0,5966	791,92	13,80	[Rif-CH ₃ OH+H] ⁺
30	0,5966	856,14	13,95	[Rif+(O) ₂ +H] ⁺ 1. Isotop
31	0,5966	840,44	15,42	[Rif+O+H] ⁺ 1. Isotop
32	0,5947	844,42	11,92	[Rif-H ₂ +Na] ⁺ 1. Isotop
33	0,5947	843,41	11,93	[Rif-H ₂ +Na] ⁺
34	0,5928	847,42	13,79	[Rif+Na] ⁺ 2. Isotop
35	0,5928	839,17	13,86	[Rif+Me+H] ⁺ 2. Isotop
36	0,5910	998,09	2,30	NA
37	0,5910	837,24	13,77	[Rif+Me+H] ⁺
38	0,5910	793,48	13,77	[Rif-CH ₂ O+H] ⁺
39	0,5910	794,27	13,77	[Rif-CH ₂ O+H] ⁺ 1. Isotop
40	0,5910	827,27	13,80	[Rif-H ₂ O+Na] ⁺
41	0,5822	326,75	1,63	NA
42	0,5815	929,11	2,26	NA
43	0,5794	823,45	13,77	[Rif+H] ⁺
44	0,5758	963,11	2,29	NA
45	0,5684	647,08	1,70	NA
46	0,5665	492,21	1,68	NA

Fortsetzung Tabelle a - 8

47	0,5657	791,21	13,80	$[\text{Rif-H}_2\text{-CH}_2\text{O+H}]^+$
48	0,5620	876,32	2,35	NA
49	0,5584	710,29	2,34	gehört vermutlich zu Erythromycin
50	0,5532	933,92	1,90	NA
51	0,5512	869,11	13,73	gehört vermutlich zu Rifampicin
52	0,5460	582,70	2,33	NA
53	0,5417	558,09	1,72	$[\text{Ery-Zucker176}(\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_4)\text{+H}]^+$
54	0,5417	709,23	2,33	gehört vermutlich zu Erythromycin
55	0,5417	709,23	2,33	gehört vermutlich zu Erythromycin
56	0,5401	447,11	1,67	NA
57	0,5353	153,16	13,79	gehört vermutlich zu Rifampicin
58	0,5322	821,82	13,83	durch Ionisierung entstanden $[\text{Rif-H}_2\text{+H}]^+$
59	0,5289	708,65	20,21	nicht identifiziertes Peakcluster
60	0,5283	714,28	38,87	NA
61	0,5215	862,32	13,80	$[\text{Rif+K}]^+$ 1. Isotop
62	0,5172	135,15	13,75	Verunreinigung
63	0,5172	799,07	13,77	NA
64	0,5152	951,92	2,23	NA
65	0,5129	789,71	11,91	$[\text{Rif-H}_2\text{-MeOH+H}]^+$
66	0,5129	838,28	13,81	$[\text{Rif+Me+H}]^+$ 1. Isotop
67	0,5114	964,09	2,27	NA
68	0,5096	604,68	2,40	NA
69	0,5096	828,89	2,14	NA
70	0,5068	200,95	1,65	NA
71	0,5063	472,71	1,67	NA
72	0,4994	627,34	2,33	NA
73	0,4991	179,26	13,78	NA
74	0,4969	748,53	20,11	nicht identifiziertes Peakcluster
75	0,4948	193,34	13,79	gehört vermutlich zu Rifampicin
76	0,4948	399,53	13,80	NA
77	0,4948	749,52	20,10	nicht identifiziertes Peakcluster
78	0,4929	973,89	2,01	NA
79	0,4921	896,94	1,86	NA
80	0,4892	461,26	1,92	NA
81	0,4884	767,48	15,70	gehört vermutlich zu Rifampicin
82	0,4852	537,70	2,37	NA
83	0,4842	282,47	21,71	NA
84	0,4842	386,13	30,17	NA
85	0,4842	752,87	2,08	$[\text{Ery+NH}_4\text{+H}]^+$ 1. Isotop
86	0,4842	444,09	2,35	NA
87	0,4842	468,69	19,98	nicht identifiziert Peakcluster
88	0,4842	482,67	19,73	nicht identifiziertes Peakcluster
89	0,4842	710,92	2,30	gehört vermutlich zu Erythromycin
90	0,4842	555,90	1,74	NA
91	0,4842	580,68	2,32	NA
92	0,4842	601,10	1,68	NA
93	0,4842	506,66	18,96	NA
94	0,4842	482,67	19,73	nicht identifiziertes Peakcluster
95	0,4842	468,69	19,98	nicht identifiziertes Peakcluster
96	0,4842	752,87	2,08	$[\text{Ery+NH}_4\text{+H}]^+$ 1. Isotop

Fortsetzung Tabelle a - 8

97	0,4842	818,87	2,33	NA
98	0,4842	875,70	2,17	NA
99	0,4842	878,67	2,21	NA
100	0,4799	801,98	27,19	NA
101	0,4791	195,39	28,25	NA
102	0,4791	416,91	19,47	nicht identifiziertes Peakcluster
103	0,4791	833,53	1,73	NA
104	0,4791	416,91	19,47	nicht identifiziertes Peakcluster
105	0,4791	914,29	19,90	nicht identifiziertes Peakcluster
106	0,4791	922,70	2,15	NA
107	0,4786	181,99	1,65	NA
108	0,4765	786,32	2,35	NA
109	0,4764	842,06	1,77	NA
110	0,4745	859,38	11,93	[Rif-H ₂ +K] ⁺
111	0,4720	986,75	2,03	NA
112	0,4716	560,06	1,73	NA
113	0,4705	339,09	1,67	NA
114	0,4697	696,30	1,68	NA
115	0,4684	546,69	2,38	NA
116	0,4682	634,80	2,32	NA
117	0,4659	650,51	2,35	NA
118	0,4601	945,75	2,01	NA
119	0,4597	297,31	2,30	NA
120	0,4596	841,30	2,37	NA
121	0,4587	172,68	1,64	NA
122	0,4587	280,11	1,66	NA
123	0,4565	943,68	2,10	NA
124	0,4561	550,67	2,35	NA
125	0,4561	586,31	1,69	NA
126	0,4561	743,47	2,33	NA
127	0,4536	497,72	2,02	NA
128	0,4536	798,72	1,93	NA
129	0,4536	925,47	2,23	NA
130	0,4518	851,21	2,34	NA
131	0,4510	592,92	1,91	NA
132	0,4505	321,09	1,69	NA
133	0,4487	694,49	20,38	nicht identifiziertes Peakcluster
134	0,4485	960,87	2,04	NA
135	0,4467	916,93	1,88	NA
136	0,4458	150,72	0,38	NA
137	0,4458	693,80	20,06	nicht identifiziertes Peakcluster
138	0,4458	726,30	20,07	nicht identifiziertes Peakcluster
139	0,4458	695,30	20,07	nicht identifiziertes Peakcluster
140	0,4458	696,05	20,08	nicht identifiziertes Peakcluster
141	0,4456	293,06	1,68	NA
142	0,4456	780,27	2,32	NA
143	0,4447	194,95	1,66	NA
144	0,4447	499,44	1,69	NA
145	0,4425	500,78	21,84	NA
146	0,4423	837,30	2,35	NA

Fortsetzung Tabelle a - 8

147	0,4384	781,07	33,96	NA
148	0,4377	992,88	1,88	NA
149	0,4375	669,53	2,39	NA
150	0,4351	512,67	2,34	NA
151	0,4332	614,09	1,70	NA
152	0,4332	773,90	2,30	[Ery+K] ⁺ 1. Isotop
153	0,4332	577,50	3,44	[Ery-Zucker157(C ₈ H ₅ NO ₂)+H] ⁺
154	0,4332	718,51	7,67	[Ery-O+H] ⁺
155	0,4332	719,47	7,67	[Ery-O+H] ⁺ 1. Isotop
156	0,4332	773,90	2,30	[Ery+K] ⁺ 1. Isotop
157	0,4310	772,95	2,10	[Ery+K] ⁺
158	0,4310	442,95	2,31	NA
159	0,4307	161,35	13,80	gehört vermutlich zu Rifampicin
160	0,4307	161,35	13,80	gehört vermutlich zu Rifampicin
161	0,4262	312,44	25,64	NA
162	0,4254	577,26	2,05	[Ery-Zucker157(C ₈ H ₅ NO ₂)+H] ⁺
163	0,4250	596,12	2,35	NA
164	0,4247	398,08	1,69	NA
165	0,4234	893,11	2,12	NA
166	0,4230	733,66	3,01	[Ery] ⁺
167	0,4230	734,07	3,38	[Ery+H] ⁺
168	0,4230	716,56	10,25	[Ery-H ₂ O+H] ⁺
169	0,4230	717,42	10,25	[Ery-H ₂ O+H] ⁺ 1. Isotop
170	0,4230	716,07	10,28	[Ery-H ₂ O+H] ⁺
171	0,4230	734,07	3,38	[Ery+H] ⁺
172	0,4212	603,72	24,32	NA
173	0,4206	193,50	2,35	NA
174	0,4191	235,41	2,10	NA
175	0,4185	982,73	2,06	NA
176	0,4184	388,09	2,38	NA
177	0,4174	860,94	1,95	NA
178	0,4167	299,08	2,34	NA
179	0,4167	451,93	27,04	NA
180	0,4167	854,88	2,07	NA
181	0,4131	783,10	2,41	NA
182	0,4129	597,14	1,93	NA

NA – not annotated

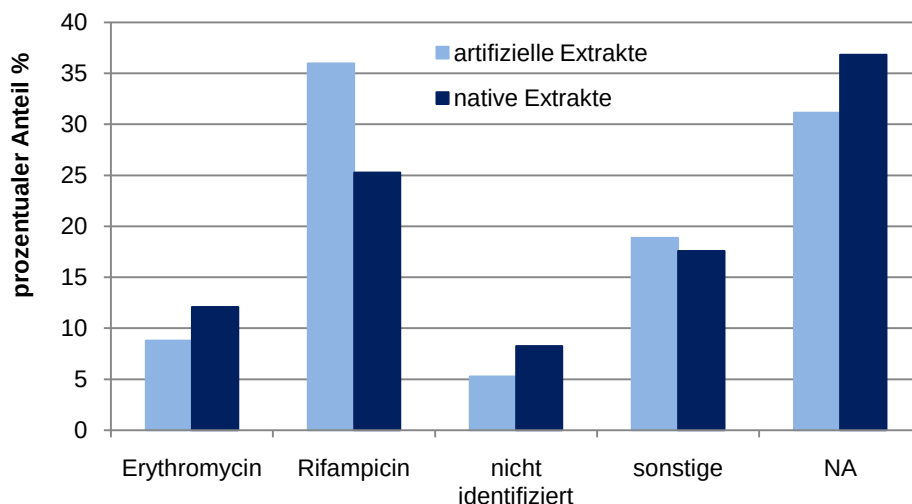


Abb. a - 1 Vergleich der Ergebnisse (prozentuale Anteile der Hitlisten) der „Proof of concept“ Experimente mit artifiziellen Extrakten (hellblau) und nativen Extrakte (dunkelblau), welche jeweils mit Antibiotika versetzt wurden.

Variationserzeugung mittels verschiedener Modifikationsmethoden

Tabelle a - 9 Übersicht über die ermittelten Bioaktivitäten der modifizierten Antibiotika-haltigen Extrakt-Aliquoten bei einer Konzentration von $\beta = 10 \mu\text{g/mL}$ und $\beta = 6,67 \mu\text{g/mL}$ in MeOH.

Modifikationsart	Wachstumsinhibierung %	
	$\beta = 10 \mu\text{g/mL}$	$\beta = 6,67 \mu\text{g/mL}$
nativ	52 +/- 3	31 +/- 10
Autoklav	66 +/- 32	27 +/- 5
Trockenschrank 100°C, 30 min	110 +/- 3	11 +/- 5
sieden in MeOH	109 +/- 4	51 +/- 1
XAD-7, H ₂ O	51 +/- 6	24 +/- 2
XAD-7, MeOH	107 +/- 2	76 +/- 1
XAD-7, MeOH/EA 1:1 (v/v)	111 +/- 4	77 +/- 6
Diaion HP20, H ₂ O	48 +/- 3	26 +/- 6
Diaion HP20, MeOH	106 +/- 1	79 +/- 4
Diaion HP20, MeOH/EA 1:1 (v/v)	102 +/- 5	21 +/- 12
nativ mit Antibiotika	45 +/- 2	10 +/- 4
Aktivkohle 5 mg, 5 min	104 +/- 7	27 +/- 4
Aktivkohle 50 mg, 5 min	105 +/- 0	35 +/- 13
Aktivkohle 500 mg, 5min	25 +/- 6	26 +/- 3
SCX, MeOH	106 +/- 4	19 +/- 4
SCX, MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	107 +/- 2	31 +/- 15
SAX, MeOH	100 +/- 5	47 +/- 1
SAX, MeOH/H ₂ O 1:1 (v/v)	106 +/- 2	14 +/- 5

Tabelle a - 10 Hitliste des „Proof of concept“ Experimentes mit Antibiotika-haltigen, modifizierten Extraktvarianten.

Nr.	Korrelationskoeffizient	m/z (+)ESI	t _R (min)	mögliche Annotation
1	0,8095	357,14	19,59	NA
2	0,6724	733,44	8,91	[Ery] ⁺
3	0,6377	294,09	14,71	NA
4	0,5863	733,67	8,89	[Ery] ⁺
5	0,5814	736,18	8,89	[Ery+H] ⁺ 2. Isotop
6	0,5470	963,68	18,66	NA
7	0,5432	733,25	13,05	NA
8	0,5355	734,21	8,89	[Ery+H] ⁺
9	0,5232	535,90	2,25	NA
10	0,5148	399,12	2,41	NA
11	0,5148	361,16	16,91	nicht identifiziertes Peakcluster 1
12	0,5130	339,20	9,84	NA
13	0,5128	509,29	18,33	NA
14	0,5008	735,18	8,90	[Ery+H] ⁺ 1. Isotop
15	0,4984	467,28	15,41	NA
16	0,4945	206,12	2,40	NA
17	0,4884	327,24	23,85	NA
18	0,4861	870,11	27,92	NA
19	0,4852	325,11	22,20	NA
20	0,4788	751,23	10,20	[Ery+OH+H] ⁺
21	0,4788	720,26	8,61	gehört vermutlich zu Erythromycin
22	0,4786	701,99	35,40	NA
23	0,4750	442,08	20,05	NA
24	0,4750	425,04	20,03	NA
25	0,4750	253,15	19,25	NA
26	0,4750	358,04	18,51	NA
27	0,4750	376,09	18,51	nicht identifiziertes Peakcluster 2
28	0,4750	379,24	18,50	NA
29	0,4750	375,09	18,49	nicht identifiziertes Peakcluster 2
30	0,4750	374,10	18,49	nicht identifiziertes Peakcluster 2
31	0,4750	271,13	18,47	NA
32	0,4750	360,10	16,93	nicht identifiziertes Peakcluster 1
33	0,4750	270,97	15,20	NA
34	0,4667	158,09	8,89	gehört vermutlich zu Erythromycin
35	0,4655	576,32	8,89	[Ery-Zucker157(C ₈ H ₅ NO ₂)+H] ⁺
36	0,4620	753,31	28,57	NA
37	0,4557	726,33	35,48	NA
38	0,4504	975,64	29,90	NA
39	0,4504	923,31	29,85	NA
40	0,4504	342,30	27,40	NA
41	0,4504	674,49	26,45	NA
42	0,4504	688,52	26,23	NA

Fortsetzung Tabelle a - 10

43	0,4504	700,52	26,06	NA
44	0,4504	339,26	25,68	NA
45	0,4504	132,05	22,41	NA
46	0,4504	405,20	21,47	NA
47	0,4504	420,32	20,46	NA
48	0,4502	949,34	24,36	NA
49	0,4502	310,39	21,65	NA
50	0,4502	221,18	1,93	NA

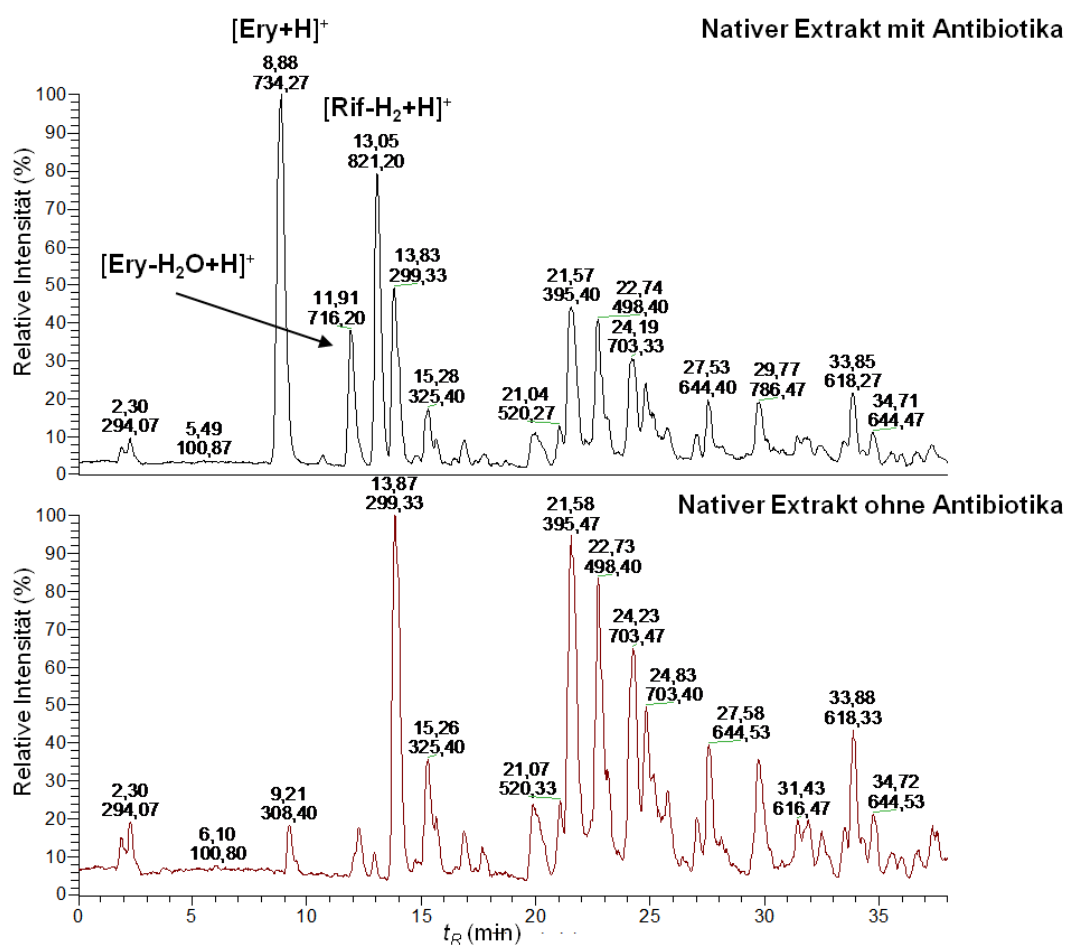


Abb. a - 2 Die Abbildung zeigt die MS-Basispeak-Chromatogramme des mit Antibiotika versetzten Extraktes (oben) und des nativen Extraktes (unten) von *H. chrysodon* bei positiver Ionisierung. Zur Verdeutlichung sind unterhalb der t_R die m/z -Werte des jeweiligen Basispeaks dargestellt.

Identifizierung von aktivitätsrelevanten Verbindungen in biologisch aktiven Rohextrakten

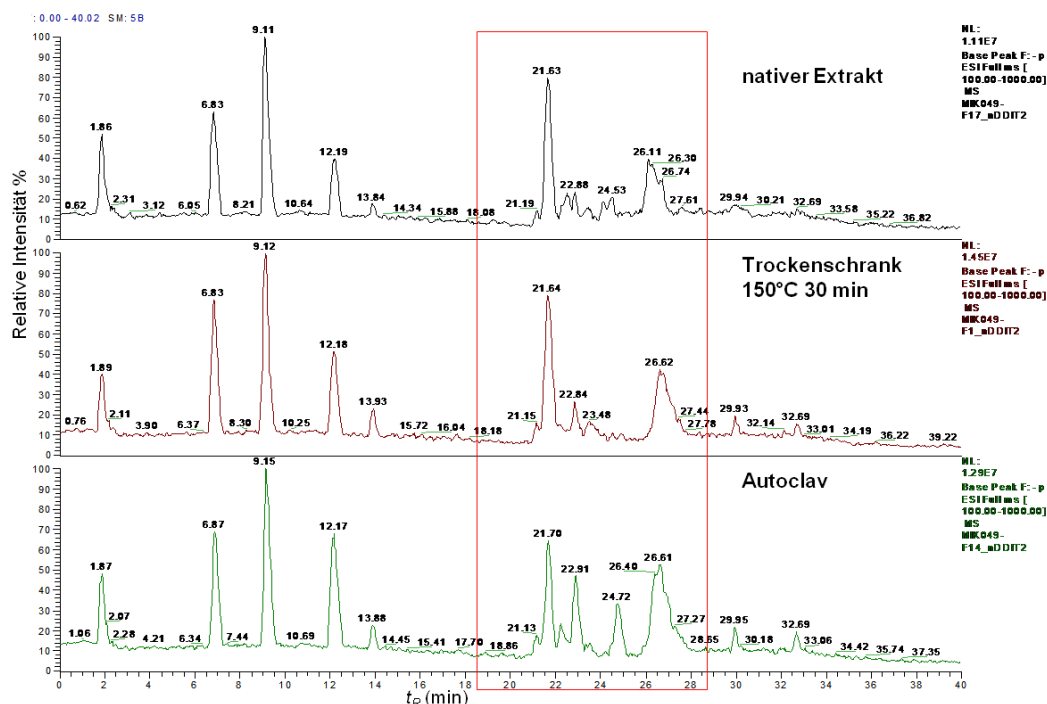


Abb. a - 3 Vergleich der LC-MS-Basispeak Chromatogramme (negative Ionisierung) des nativen Extraktes aus *H. latitabundus*, sowie die Metabolitenprofile der durch Hitze modifizierten Extraktvarianten. Der rote Rahmen verdeutlicht die betreffenden Bereiche.

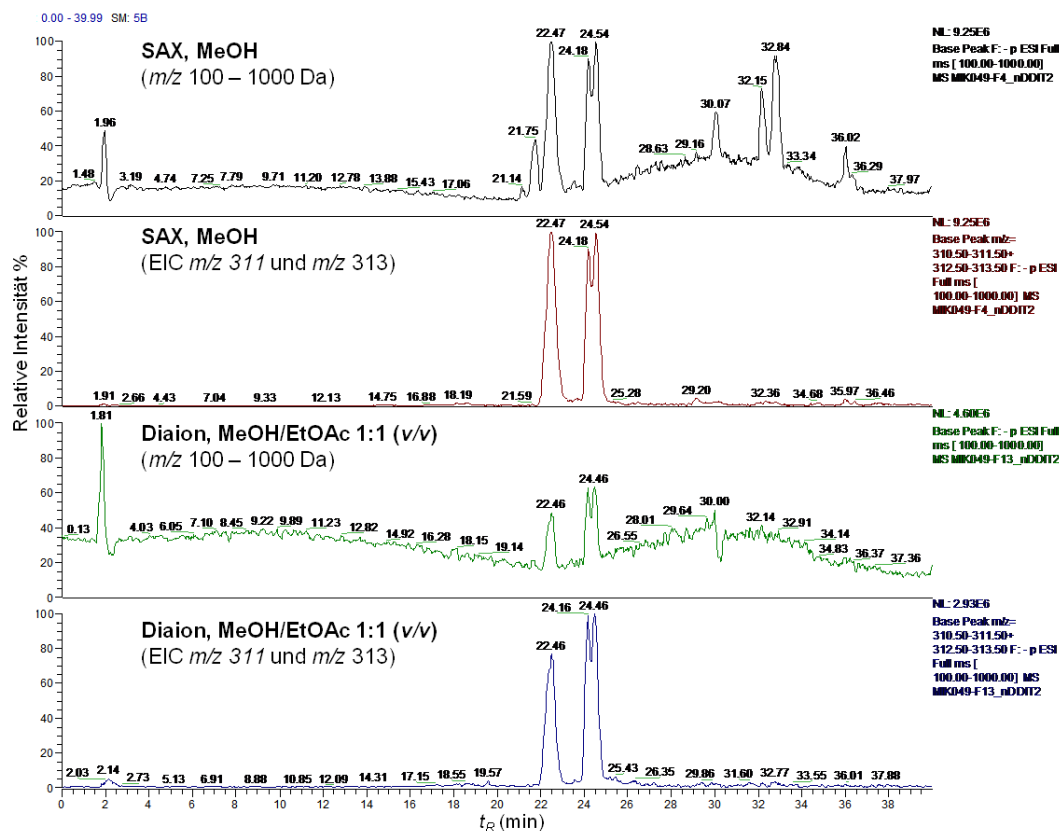


Abb. a - 4 Vergleich der LC-MS-Basispeak Chromatogramme (negative Ionisierung) ausgewählter Extraktvarianten, sowie die EIC der Metaboliten m/z 311 $t_R = 22,46$ min und m/z 313 $t_R = 24,46$ min.

Tabelle a - 11 Hitliste aus dem AcorA Experiment mit einem biologisch aktiven Extrakt aus *H. latitabundus*. Zusammengehörige Peaks bzw. Peakcluster sind durch die gleiche Farbe und durch Buchstaben/Zahlencodes A1 – A47 gekennzeichnet. - Einzelpeak

Nr.	Korrelations- koeffizient	<i>m/z</i> (-)ESI	<i>t_R</i> (min)	Peakcluster
1	0,8703	407,44	37,44	A1
2	0,8020	312,14	22,47	A2
3	0,7742	311,13	22,47	A2
4	0,7581	405,50	36,79	-
5	0,7534	642,38	27,76	A3
6	0,7511	643,36	27,76	A3
7	0,7499	368,24	24,60	-
8	0,7317	375,45	27,28	-
9	0,7174	409,41	32,09	-
10	0,7094	271,34	28,01	-
11	0,7077	845,31	29,94	A4
12	0,6823	372,90	24,31	-
13	0,6818	475,39	29,98	A5
14	0,6800	397,25	29,95	-
15	0,6798	431,42	30,00	-
16	0,6774	334,35	26,36	-
17	0,6712	725,29	32,78	-
18	0,6673	617,21	21,81	-
19	0,6661	890,30	26,67	A6
20	0,6637	554,27	22,55	-
21	0,6615	759,17	2,43	A7
22	0,6583	866,64	26,57	-
23	0,6555	877,08	26,39	-
24	0,6551	597,31	26,32	-
25	0,6542	879,13	26,09	A8
26	0,6528	630,65	1,87	-
27	0,6524	272,32	27,97	-
28	0,6478	452,30	22,22	-
29	0,6466	893,08	26,62	A9
30	0,6455	477,42	30,03	-
31	0,6454	580,28	23,34	A10
32	0,6446	604,34	32,70	A11
33	0,6442	886,47	23,94	-
34	0,6441	525,45	33,59	-
35	0,6430	601,36	37,58	-
36	0,6404	534,70	1,86	A12
38	0,6377	880,09	26,09	A8
37	0,6377	369,28	27,43	-
39	0,6366	581,26	23,35	A10
40	0,6363	811,07	27,15	-

Fortsetzung Tabelle a - 11

42	0,6347	229,06	18,36	-
43	0,6344	306,30	21,99	A13
44	0,6319	509,27	26,93	-
45	0,6305	513,67	37,58	-
46	0,6299	254,83	1,80	-
47	0,6254	477,31	20,95	A14
48	0,6220	314,15	24,36	A15
49	0,6199	714,47	26,70	A16
50	0,6175	758,24	2,43	A7
51	0,6157	531,15	17,74	-
52	0,6157	666,43	28,83	-
53	0,6155	341,25	22,25	-
54	0,6133	532,26	24,47	-
55	0,6119	433,28	26,83	A17
56	0,6110	476,32	20,95	A14
57	0,6084	450,28	17,73	A18
58	0,6084	943,12	26,91	-
59	0,6048	774,98	17,59	-
60	0,6048	481,25	23,54	-
61	0,6047	768,23	26,37	-
62	0,6046	428,38	32,65	-
63	0,6022	507,32	25,66	-
64	0,6009	592,51	36,00	A19
65	0,5999	395,28	21,53	A20
66	0,5983	474,80	29,99	A5
67	0,5975	313,16	24,38	A15
68	0,5975	336,14	10,04	-
69	0,5974	593,53	38,08	-
70	0,5969	717,46	26,68	A21
71	0,5955	432,86	26,48	-
72	0,5946	869,21	26,65	A22
73	0,5935	347,35	23,46	A23
74	0,5926	337,29	30,31	A24
75	0,5922	371,24	27,35	A25
76	0,5913	340,38	32,80	A26
77	0,5910	559,30	25,27	A27
78	0,5885	281,45	32,81	-
79	0,5884	580,26	21,19	A28
80	0,5884	597,36	23,47	-

Fortsetzung Tabelle a - 11

81	0,5876	591,51	36,00	A19
82	0,5839	649,30	25,09	-
83	0,5836	436,79	1,87	-
84	0,5828	894,07	26,60	A9
85	0,5822	396,29	28,30	-
86	0,5820	341,36	27,52	-
87	0,5814	348,46	23,47	A23
88	0,5810	844,35	29,94	A4
89	0,5769	818,33	23,39	A29
90	0,5768	459,45	30,68	-
91	0,5752	808,16	22,75	-
92	0,5743	867,21	26,61	A22
93	0,5743	868,22	26,58	A22
94	0,5736	521,26	22,62	A30
95	0,5730	342,05	32,80	A26
96	0,5723	762,44	23,49	A31
97	0,5722	805,10	27,33	-
99	0,5718	496,28	24,44	-
98	0,5718	153,13	26,60	-
100	0,5713	340,00	30,07	A32
101	0,5702	341,06	32,81	A26
102	0,5684	310,61	22,46	-
103	0,5674	603,34	32,70	A11
104	0,5668	365,41	20,34	-
105	0,5661	393,16	22,46	-
106	0,5622	407,07	23,46	A33
107	0,5616	742,45	29,85	A34
108	0,5587	434,27	26,67	A17
109	0,5576	423,30	21,87	-
110	0,5556	439,31	37,97	A35
111	0,5519	465,27	19,13	-
112	0,5514	889,30	26,62	A6
113	0,5503	572,34	24,89	A36
114	0,5496	558,28	22,91	A37
115	0,5494	339,03	30,06	A32
116	0,5491	279,44	30,03	A24
117	0,5489	605,20	22,71	-
118	0,5484	492,74	26,69	-
119	0,5476	555,59	22,86	A38
120	0,5470	884,45	21,88	-
121	0,5467	815,30	21,39	A47
122	0,5454	571,36	24,79	A36
123	0,5438	338,35	30,07	A24

Fortsetzung Tabelle a - 11

124	0,5429	514,99	27,54	-
125	0,5429	929,10	2,28	-
126	0,5424	408,47	37,42	A1
127	0,5418	606,21	9,66	-
128	0,5401	443,32	30,04	-
129	0,5388	269,33	26,40	-
130	0,5387	475,43	27,80	-
131	0,5387	321,34	30,46	A32
132	0,5379	344,12	23,78	-
133	0,5366	794,29	22,96	-
134	0,5361	509,36	30,15	-
135	0,5341	856,10	2,35	-
136	0,5338	678,00	22,91	-
137	0,5338	447,27	19,81	-
138	0,5326	445,31	32,84	-
139	0,5325	578,26	21,17	A28
140	0,5320	605,48	30,00	-
141	0,5308	392,44	29,95	-
142	0,5305	699,43	32,75	-
143	0,5302	306,30	9,50	-
144	0,5280	535,76	1,90	A12
145	0,5272	870,29	6,60	-
146	0,5272	929,75	6,68	-
147	0,5272	974,11	6,92	-
148	0,5271	902,37	21,90	-
149	0,5245	741,43	29,83	A34
150	0,5239	310,23	27,60	-
151	0,5236	977,52	1,92	-
152	0,5235	716,47	26,70	A21
153	0,5215	338,89	1,88	-
154	0,5209	595,32	22,86	A41
155	0,5208	639,30	2,41	-
156	0,5185	796,44	15,44	-
157	0,5178	556,27	22,88	A38
158	0,5178	557,27	22,88	A37
159	0,5173	307,28	21,93	A13
160	0,5173	409,30	30,21	-
161	0,5152	334,31	31,86	-
162	0,5141	697,38	32,74	-
163	0,5140	499,36	33,01	-
164	0,5138	324,31	22,28	-
165	0,5133	449,28	17,70	A18
166	0,5133	715,46	26,70	A16

Fortsetzung Tabelle a - 11

167	0,5116	153,62	27,53	-
168	0,5103	497,31	22,91	-
169	0,5090	558,31	25,29	A28
170	0,5082	328,25	23,43	-
171	0,5082	761,44	23,56	A31
172	0,5077	443,32	28,06	-
173	0,5065	816,67	1,98	-
174	0,5044	436,28	32,75	A39
175	0,5043	563,29	32,81	-
176	0,5040	441,26	30,43	-
177	0,5030	619,32	21,14	-
178	0,5022	787,11	23,64	-
179	0,5016	520,25	22,66	A30
180	0,5003	394,47	32,59	-
182	0,4981	654,32	13,27	-
181	0,4981	425,16	23,78	-
183	0,4979	501,11	30,38	A40
184	0,4977	998,14	6,87	A46
185	0,4972	502,07	30,40	A40
186	0,4964	716,06	19,50	-
187	0,4963	596,34	22,94	A41
188	0,4957	415,27	32,76	-
189	0,4954	503,14	28,03	-
190	0,4952	791,28	22,83	A42
191	0,4945	424,41	30,36	-
192	0,4943	408,03	23,45	A33
193	0,4936	892,10	27,04	-
194	0,4929	352,13	22,61	-
195	0,4922	440,34	37,87	A35
199	0,4904	990,29	6,88	-
198	0,4904	463,42	23,45	-
197	0,4904	372,26	27,30	A25
196	0,4904	353,35	30,01	-
200	0,4894	594,27	15,59	-
201	0,4892	579,28	21,17	A28
202	0,4892	960,70	6,88	A43
203	0,4883	315,06	32,20	A44
204	0,4883	456,40	32,12	-
205	0,4875	573,30	16,65	A45
206	0,4870	988,08	6,87	-
207	0,4844	687,46	37,14	-
208	0,4841	572,27	16,69	A45
209	0,4838	506,18	32,80	-

Fortsetzung Tabelle a - 11

210	0,4830	669,43	32,71	-
211	0,4823	790,27	22,83	A42
212	0,4812	435,33	32,76	A39
213	0,4812	395,22	27,29	-
214	0,4812	401,15	23,64	-
215	0,4812	795,17	2,34	-
216	0,4812	951,57	9,17	-
217	0,4810	532,24	22,88	-
218	0,4784	504,34	21,16	-
219	0,4782	316,04	32,18	A44
220	0,4778	881,14	26,06	A8
221	0,4778	735,88	1,93	-
222	0,4763	306,28	27,96	-
223	0,4755	997,24	6,87	A46
224	0,4752	483,27	9,60	-
225	0,4732	771,52	30,45	-
226	0,4730	628,32	26,83	-
227	0,4718	427,14	31,28	-
228	0,4712	794,90	12,20	-
229	0,4708	409,09	23,34	-
230	0,4706	396,27	21,54	A20
231	0,4696	332,31	27,52	-
232	0,4694	914,48	1,92	-
233	0,4693	307,26	18,55	-
234	0,4682	958,24	6,87	A43
235	0,4679	819,31	23,39	A29
236	0,4678	538,13	14,40	-
237	0,4676	450,72	1,86	-
238	0,4647	814,32	21,28	A47

Tabelle a - 12 Hitliste aus dem AcorA Experiment mit verschiedenen *Hygrophorus*-Spezies. Peakcluster sind farblich und durch Buchstaben/Zahlencodes B1 – B11 gekennzeichnet. - Einzelpeak

Nr.	Korrelations- koeffizient	<i>m/z</i> (-)ESI	<i>t_R</i> (min)	Peakcluster
1	0,6416	357,30	20,93	-
2	0,6288	479,29	25,25	-
3	0,6249	175,13	2,61	-
4	0,6079	283,28	25,74	-
5	0,6023	582,43	26,45	-
6	0,5950	285,25	28,17	-
7	0,5931	885,32	23,70	-
8	0,5908	255,40	23,01	-
9	0,5908	359,32	23,20	-
10	0,5908	437,26	19,77	-
11	0,5870	221,40	23,53	-
12	0,5865	942,51	18,69	B1
13	0,5865	943,52	18,71	B1
14	0,5843	634,93	1,90	-
15	0,5837	229,33	22,15	-
16	0,5794	341,26	22,01	B2
17	0,5695	242,83	24,19	-
18	0,5622	314,32	21,14	-
19	0,5571	537,04	2,08	-
20	0,5565	406,16	24,56	-
21	0,5565	679,52	34,84	-
22	0,5534	419,41	25,27	-
23	0,5523	309,36	21,72	-
24	0,5475	284,32	22,76	-
25	0,5417	650,33	24,91	-
26	0,5373	352,46	22,00	-
27	0,5311	350,25	21,98	-
28	0,5282	311,18	22,71	B3
29	0,5270	265,43	22,20	-
30	0,5186	632,47	23,02	-
31	0,5022	310,59	22,73	-
32	0,4984	113,06	22,08	B3
33	0,4984	225,41	22,96	-
34	0,4984	227,36	23,11	-
35	0,4984	247,28	9,36	-
36	0,4984	293,36	25,83	-
37	0,4984	300,28	20,21	-
38	0,4984	306,98	9,37	-
39	0,4984	316,32	21,25	-
40	0,4984	320,49	23,24	-
41	0,4984	329,25	23,69	-
42	0,4984	341,25	27,78	B4

Fortsetzung Tabelle a - 12

43	0,4984	342,42	20,57	-
44	0,4984	344,13	24,01	-
45	0,4984	345,31	20,93	-
46	0,4984	364,25	23,18	-
47	0,4984	364,30	24,61	-
48	0,4984	370,66	22,83	-
49	0,4984	380,26	20,66	-
50	0,4984	381,19	21,81	-
51	0,4984	390,13	20,97	-
52	0,4984	391,25	11,18	-
53	0,4984	391,27	18,99	-
54	0,4984	400,13	26,49	-
55	0,4984	404,32	32,51	-
56	0,4984	405,10	24,63	-
57	0,4984	418,41	23,60	-
58	0,4984	421,30	18,62	-
59	0,4984	424,18	21,34	-
60	0,4984	430,20	16,86	-
61	0,4984	513,71	37,78	B5
62	0,4984	514,72	37,78	B5
63	0,4984	520,37	24,65	-
64	0,4984	531,52	35,48	-
65	0,4984	557,51	37,76	-
66	0,4984	571,53	39,28	-
67	0,4984	601,47	37,79	B6
68	0,4984	602,46	37,78	B6
69	0,4984	611,28	21,76	-
70	0,4984	618,45	32,49	-
71	0,4984	619,46	39,15	B7
72	0,4984	620,45	39,14	B7
73	0,4984	631,65	24,07	-
74	0,4984	653,65	21,17	-
75	0,4984	661,46	39,07	B8
76	0,4984	662,45	39,08	B8
77	0,4984	669,51	31,13	-
78	0,4984	670,50	33,67	-
79	0,4984	671,04	22,03	-
80	0,4984	680,53	34,86	-

Fortsetzung Tabelle a - 12

81	0,4984	686,63	37,56	-
82	0,4984	931,28	27,82	B9
83	0,4984	932,28	27,82	B9
84	0,4938	638,41	20,24	-
85	0,4929	256,31	23,02	-
86	0,4929	267,36	23,04	-
87	0,4929	360,32	23,17	-
88	0,4929	373,15	22,97	-
89	0,4929	541,27	22,12	-
90	0,4929	631,50	22,96	-
91	0,4915	484,18	22,07	-
92	0,4890	251,36	17,47	-
93	0,4890	265,34	27,81	B4
94	0,4890	266,38	27,84	B4
95	0,4890	317,37	6,74	-
96	0,4890	342,26	27,78	B4
97	0,4890	505,62	28,13	-
98	0,4890	547,52	33,06	-
99	0,4890	567,95	19,24	-
100	0,4890	637,53	39,67	-
101	0,4890	640,65	39,01	-
102	0,4890	666,46	20,96	-
103	0,4890	702,32	20,96	-
104	0,4890	702,37	19,06	-
105	0,4890	704,21	21,52	-
106	0,4890	722,41	18,13	-
107	0,4890	727,09	20,95	-
108	0,4890	735,84	19,42	B10
109	0,4890	736,43	19,42	B10
110	0,4890	737,42	19,42	B11
111	0,4890	738,44	19,42	B11
112	0,4890	772,32	19,42	-
113	0,4882	684,52	28,70	-
114	0,4870	312,21	22,72	B3
115	0,4850	344,23	21,06	-
116	0,4850	373,16	24,72	-
117	0,4844	664,46	19,42	-
118	0,4802	342,27	22,02	B2

Fortsetzung Tabelle a - 12

119	0,4802	385,25	22,56	-
120	0,4802	387,34	27,83	-
121	0,4789	503,25	23,63	-
122	0,4739	499,97	1,84	-
123	0,4695	605,26	22,92	-
124	0,4677	243,34	24,21	-
125	0,4661	932,93	1,96	-
126	0,4635	988,76	1,91	-
127	0,4625	457,32	14,08	-
128	0,4625	496,97	2,36	-
129	0,4621	195,18	2,06	-
130	0,4617	408,38	22,56	-
131	0,4598	359,16	21,67	-
132	0,4595	360,46	26,66	-
133	0,4595	624,27	22,67	-
134	0,4595	637,46	35,47	-
135	0,4568	125,87	2,37	-
136	0,4568	445,29	26,15	-
137	0,4568	845,29	21,17	-
138	0,4563	636,32	23,54	-
139	0,4546	639,40	20,24	-
140	0,4513	475,00	1,97	-
141	0,4502	394,09	22,55	-
142	0,4502	428,25	21,46	-
143	0,4502	450,13	22,07	-
144	0,4497	362,97	2,27	-
145	0,4496	361,26	23,35	-
146	0,4468	297,13	2,47	-

Isolierung und Strukturaufklärung m/z 313

Tabelle a - 13 Vergleich der Fragmente des Metaboliten m/z 313 (**60**) und deren Intensität bei Analyse mittels Ionenfalle (MS^2/MS^3) und QTOF- MS^2 , sowie die jeweiligen abgeleiteten Summenformeln.

m/z	[M-H-X]-	Intensität (%)			Summenformel
		Ionenfalle MS^2	Ionenfalle MS^3	QTOF- MS^2	
313	-	< 3	-	3	$C_{18}H_{33}O_4^-$
295	- H_2O	100	100	12	$C_{18}H_{31}O_3^-$
277	- 2 x H_2O	< 3	60	-	-
269	- CO_2	< 3	-	-	-
251	- H_2O + CO_2	-	30	6	$C_{17}H_{31}O^-$
183	-	-	10	100	$C_{10}H_{15}O_3^-$
171	-	-	5	-	-
165	-	-	15	10	$C_{11}H_{17}O^-$
155	-	-	30	22	$C_{10}H_{19}O^-$
139	-	-	5	18	$C_9H_{15}O^-$
137	-	-	5	8	$C_9H_{13}O^-$
127	-	-	5	6	$C_8H_{15}O^-$
111	-	-	12	8	$C_7H_{11}O^-$

Isolierung und Strukturaufklärung m/z 311

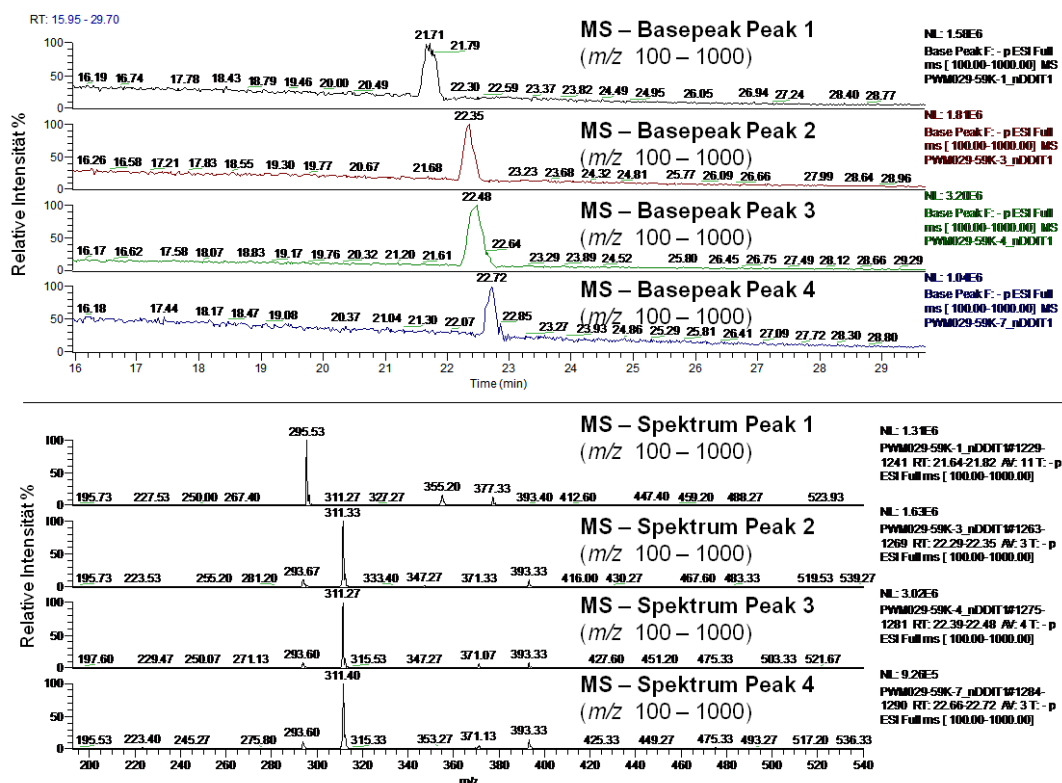


Abb. a - 5 Übersicht über die LC-MS-Chromatogramme (oben) der getrennten Verbindungen bzw. Isomere, sowie die dazugehörigen MS-Spektren (unten). Bei Peak 2 – 4 handelt es sich um Isomere des Metaboliten m/z 311 (**61**) und bei Peak 1 (**62/63**) um eine Mischung von Begleitfettsäuren.

Tabelle a - 14 Vergleich der Ergebnisse des Fragmentierungsverhaltens des Metaboliten m/z 311 (**61**) bei Analyse mittels Ionenfalle (MS^2/MS^3) und QTOF- MS^2 .

m/z	[M-H-X]-	Intensität (%)			Summenformel
		Ionenfalle MS^2	Ionenfalle MS^3	QTOF- MS^2	
311	-	< 3	-	22	$C_{18}H_{31}O_4^-$
293	- H_2O	100	100	30	$C_{18}H_{29}O_3^-$
275	- 2 x H_2O	-	18	8	$C_{18}H_{27}O_2^-$
265	- H_2O + CO	-	-	5	$C_{17}H_{29}O_2^-$
249	- H_2O + CO_2	-	55	7	$C_{17}H_{29}O^-$
223	-	< 3	-	-	-
211	-	-	-	100	$C_{12}H_{19}O_3^-$
199	-	-	-	27	$C_{11}H_{19}O_3^-$
197	-	-	-	57	$C_{11}H_{17}O_3^-$
185	-	< 3	-	-	-
181	-	-	-	6	$C_{11}H_{17}O_2^-$
179	-	-	< 3	-	-
177	-	-	10	-	-
169	-	-	-	6	$C_{10}H_{17}O_2^-$
155	-		8	-	-
113	-	-	35	7	$C_7H_{13}O^-$

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich in erster Linie bei meinem Doktorvater Herrn Professor Wessjohann bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegende Doktorarbeit in seiner Abteilung anzufertigen und weiterhin danke ich ihm für seine Unterstützung während der gesamten Zeit. Ich möchte mich auch ganz besonders bei Herrn Professor Oliver Kuipers, dass er uns den genetisch modifizierten *Bacillus subtilis* Stamm zur Verfügung gestellt hat. Außerdem möchte ich meinen Teamkollegen Mark Haid und André Gohr in erster Linie für den Rückhalt, die gute Teamarbeit, jegliche Diskussionen, Motivation und viel Spaß danken. André Gohr danke ich insbesondere für die „informatische“ Hilfestellung. Frau Dr. Porzel danke ich, dass sie sich nicht nur bei NMR-spektroskopischen Problemstellungen viel Zeit genommen hat und wieder und wieder nach der Nadel im Heuhaufen gesucht hat, sondern auch für ihren Zuspruch und ihre moralische Unterstützung. Bei Herrn Dr. Schmidt möchte ich mich für die Unterstützung bei der Strukturaufklärung bedanken, aber auch dafür, dass er mir „die Falle“ voll und ganz zur Verfügung gestellt hat, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Ebenso danke ich Frau Christine Kuhnt, die mir viel über die Bedienung, „Behandlung“ und vor allem technische Problemlösung in der Massenspektrometrie beigebracht hat. Herrn Dr. Arnold möchte ich für die vielen kritischen Diskussionen danken und das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber auch für seinen fachlichen Rat, seine Hilfe und vor allem für viele lustige Stunden. Herrn Dr. Tilo Lübken und Herrn Dr. Christoph Böttcher danke ich vor allem für die Unterstützung bei der QTOF Analyse, aber auch für die viele Hilfestellung und für ihr Interesse an dieser Arbeit. Dr. Steffen Neumann und seinem Bioinformatikteam möchte ich für die Hilfestellung bei jeglicher Art von „informatischen“ Problemen und für die gute Zusammenarbeit danken. Für die viele praktische Unterstützung danke ich meinen Hiwis und Praktikanten Maria Wiener, Carina Würfel, Kristin Mißbach, Stefan Kaiser, Joachim Kutzera und Alexander Maxones. Insbesondere möchte ich aber Julia Mühlbradt für ihre praktische und moralische Unterstützung und vor allem Motivation in schwierigen Phasen danken. Jeannette Keim danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit, aber in erster Linie für ihre Freundschaft, Hilfsbereitschaft, Unterstützung, Motivation und für viele lustige Geschichten. Für die gute Freundschaft und den vielen Spaß danke ich Annika Denkert und Kristin Schmatloch. Außerdem bedanke ich mich bei dem gesamten Technikum, der Abteilung NWC und dem IPB-Metabolomics Team für gute Zusammenarbeit und eine schöne Zeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt jedoch Michael Klausnitzer und vor allem meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihren Zuspruch, Geduld, moralische Unterstützung, absoluten Rückhalt und für ihr Verständnis insbesondere in der Endphase der Dissertation. Während der gesamten Zeit konnte ich mich in jeglicher Hinsicht auf ihre bedingungslose Unterstützung und Motivation verlassen ohne sie vieles nicht möglich gewesen wäre. **Danke!**

Lebenslauf

Name Katharina Michels

Geburtsdatum/-ort 05.11.1980, Minden (Westfalen)

Schulbildung

08/1991 – 06/2000 Ratsgymnasium Minden,
28.06.2000 Abschluss: Fachhochschulreife

Berufsausbildung

09/2000 – 09/ 2002 Ausbildung zur Biologisch-technischen Assistentin (BTA),
Schulen Dr. Kurt Blindow, Bückeburg
11.09.2002 Abschluss: staatlich anerkannte biologisch-technische
Assistentin (BTA)

Studium

10/2002 – 12/2006 Studium der Biotechnologie, Hochschule Anhalt (FH), Köthen
10/2004 – 03/2005 Praxissemester, University of Adelaide, School of Chemical
Engeneering, Adelaide, Australien
04/2006 – 12/2006 Diplomarbeit: „Isolierung und Charakterisierung von
biologisch aktiven Metaboliten aus der Mikroalge
Eustigmatos magnus“, Leibniz-Institut für Pflanzen-
biochemie, Halle (Saale), Betreuer Prof. Griehl, Prof.
Wessjohann, Prof. Mägert
15.12.2006 Abschluss: Dipl.-Ing. (FH), Biotechnologie

Berufliche Tätigkeiten

06/2005 – 09/2005 Studentische Hilfskraft, im Fachbereich Biotechnologie,
Herr Prof. Pätz, Bioprozesstechnik, Hochschule Anhalt (FH)
10/2005 – 12/2005 Studentische Hilfskraft im Fachbereich Biotechnologie,
Frau Prof. Griehl, Biochemie, Hochschule Anhalt (FH)
11/2006 – 12/2006 Studentische Hilfskraft im Leibniz-Institut für Pflanzen-
biochemie, Abt. Natur- und Wirkstoffchemie
01/2007 – 07/2010 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation, Wissenschaftliche
Mitarbeiterin, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abt.
Natur- und Wirkstoffchemie
08/2010 bis heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Georg-August-Universität
Göttingen, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzen-
wissenschaften, Abt. Biochemie der Pflanze

Halle (Saale), den 22.01.2010

Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen

Michels, K., Gohr, A., Haid, M., Wessjohann, L.A., Reverse Metabolomics: AcorA a new method for direct identification of bioactive compounds in complex mixtures; 5th Plant Science Student Conference (PSSC), 23.-26. Juni 2009 Halle (Saale).

Michels, K., Haid, M., Gohr, A., Wessjohann, L.A., Reverse Metabolomics: AcorA a new method for direct identification of bioactive compounds in complex mixtures; 43. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Massenspektrometrie, 07.-11. März 2010 Halle (Saale).

Vorträge

Michels K., Haid M., Gohr A., Wessjohann L.A., Reverse Metabolomics: a new method for direct identification of bioactive compounds in complex mixtures; PSE – CSIC – Young Scientist Meeting: Future Trends in Phytochemistry in the Global Era of Agri-food and Health, 12.-14. Mai 2009, Los Narejos (Los Alcázares), Murcia, Spanien.

Publikationen

Michels, K., Haid, M., Gohr, A., Wessjohann L.A., *manuscript in preparation*.

Michels, K., Kuipers, O.P., Wessjohann, L.A., *manuscript in preparation*.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Katharina Michels geboren am 05.11.1980 in Minden (Westfalen), an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stelle als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit wurde an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Katharina Michels