

# Hygrophorone

## Neue antifungische Cyclopentenonderivate aus *Hygrophorus*-Arten (Basidiomycetes)

Dissertation

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

vorgelegt der

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

von Herrn Dipl.-Chem. Tilo Lübken  
geboren am 10. September 1975 in Eberswalde-Finow

Gutachter:

1. Prof. Dr. Ludger Wessjohann
2. Prof. Dr. Wolfgang Steglich

Halle (Saale), 16. März 2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000010474**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010474>]



Argentum atque aurum  
facile est laenamque togamque  
Mittere, boletos mittere difficile est.

*Leicht ist es Silber und Gold,  
Mantel und Toga zu verschenken,  
schwer ist es aber, auf Pilze zu verzichten.*

Marcus Valerii Martialis  
Epigrammaton Liber XIII; XLVIII  
1. Jh. n. Chr.



# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Saale) unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann angefertigt. Sie wurde teilweise vom Land Sachsen-Anhalt im Rahmen des Hochschul- und Wissenschaftsprogramms (HWP) sowie von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, AR 358/3-1) gefördert.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben. An erste Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ludger Wessjohann, der mir dieses interessante Thema überlassen hat. Sein permanentes Interesse am Fortschritt meiner Arbeiten, seine Diskussionen und Visionen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Steglich für die Übernahme des Zweitgutachtens, aber auch für die vielen Inspirationen bedanken.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe. So ein gegenseitig befruchtendes und motivierendes Arbeitsklima gibt es nur selten. Es hat großen Spaß gemacht, hier zu arbeiten.

Ein großer Dank gilt meinem zweiten Doktorvater und direkten Betreuer Herrn Dr. Norbert Arnold. Seine Ungeduld, sein Wissensdrang, seine exzellente Betreuung waren Motivation für mich. Viele Stunden haben wir gemeinsam im Wald verbracht um mit vollen Körben heimzukehren. Danke, dass ich so viel über Pilze lernen durfte. Natürlich wäre diese Arbeit ohne ihn, ohne sein mykologisches Wissen nie zustandegekommen. Kann ich eigentlich jemals wieder ohne KOH in einen Wald gehen?

Frau Dr. Andrea Porzel verdient meinen Dank, weil sie mir nicht nur die Kunst des Spektrenlesens beigebracht hat. Ihr kritisches Hinterfragen, ihre wissenschaftliche Ungläubigkeit haben mich sehr beeindruckt. Mit ihr hatte ich viele interessante Diskussionen und einige verlorene Wetten. Auch dafür danke!

Was wäre ich ohne Dr. Jürgen Schmidt, ohne sein Wissen, seine Erfahrungen in der Massenspektrometrie. Wie oft habe ich geflucht, weil mir die MS nicht die von mir gewünschten Ergebnisse erzeugt hat. Obwohl ich mich bei meinen Arbeiten nicht hauptsächlich um die vielen Alkaloide und Terpensäuren gekümmert habe, die statt dessen auftauchten, hatten wir viele Diskussionen, nicht nur um Zerfallsmechanismen. Mit Dr. Christoph Böttcher hatte ich eine schöne Zusammenarbeit auf dem Gebiet der MS. Nur durch die Ergebnisse seine hochaufgelösten MS-MS-Messungen waren wichtige Fragmente erklärbar. Vielen Dank auch an Christine Kuhnt und Martina Lerbst für ihre schnelle und erfolgreiche Hilfe.

Für die Anfertigung dieser Arbeit hatte ich nicht nur fachliche Unterstützung. Ein besonderer Dank geht an meine vielen Doktormütter, an Monika Kummer, Maritta Süße, Angela Schaks und Gisela Schmidt, die sich rührend um mich gekümmert haben.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Brandt möchte ich mich für viele Berechnungen bedanken, ohne die ich einige Probleme nicht hätte lösen können.

Mit Gudrun Hahn habe ich viele lehrreiche Bastelstunden an der HPLC verbracht um Fehler zu finden oder um das System zu optimieren. Auch dafür danke.

Bei Elisabeth Kaydamov und Elvira Schotte möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung bedanken. Frank Broda und Holger Bartz waren bei Computerproblemen prompt zur Stelle. Danke!

Bei „meinen“ beiden Diplomanden Axel Teichert und Sanela Baćinović möchte ich mich sehr bedanken. Es hat Spaß gemacht, mit euch zusammenzuarbeiten. Danke für die schönen Ergebnisse.

Mit Herrn Prof. Dr. Bernhard Westermann, Gisela Schmidt und Tobias Dräger hatte ich eine interessante Zusammenarbeit zur Synthese der Hygrophorone. Viel Glück bei weiteren Derivaten!

Eine große Hilfe war Manfred Huth. Durch seine Kenntnisse und Erfahrungen in den Wäldern rund um Freyburg konnten viele *Hygrophorus*-Kollektionen gesammelt werden. Bei Hans Valda möchte ich mich sehr bedanken. Er hat in Österreich Märzschnecklinge für mich gesammelt. Schade, dass ich darin keine Hygrophorone finden konnte.

Bei Dr. Emiko Harada möchte ich mich besonders bedanken. Sie hat wesentliche Teile des japanischen Patents über *Rigidoporus lineatus* übersetzt. Ohne diese Hilfe hätte ich die Arbeiten an *R. lineatus* nicht so erfolgreich durchführen können.

Monika Kummer hat viele Biotests für mich durchgeführt und mich im Labor tatkräftig unterstützt. Danke dafür! Vielen Dank auch an Dr. Grit Rothe und Dr. Sabine Rosahl für Entwicklung und Durchführung der Tests an *Phytophthora infestans*. Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Hans Locher sowie der Firma Morphochem für deren Durchführung von Biotests bedanken.

Katja Thiele hat sich die Mühe gemacht, das Manuskript nach orthographischen und grammatikalischen Fehlern zu durchsuchen. Nicht nur, aber auch dafür danke! Alle verbliebenen Fehler gehen natürlich auf meine Kappe.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre immaterielle und materielle Unterstützung vor, während und nach dem Studium, ohne die diese Arbeit auch nicht möglich gewesen wäre. Danke Jörg! Dank gebührt auch all meinen Freunden. Vor allem die letzte Zeit war sicher nicht einfach. Danke Ernst für all die Jahre, die schöne Zeit in unserer WG.

Bei Herrn Peter Sodann und beim Neuen Theater Halle möchte ich mich herzlich für die schöne Zeit bedanken. Vielen Dank auch allen, mit denen ich Volleyball gespielt habe. Danke liebe Saaleperlen, liebe Weinberg-Hoppers und auch allen vom Uni-Sport.

Noch einmal großen Dank an alle, die auf irgendeine Weise am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren! Danke für die vielen Anregungen, Motivationen und für das Interesse.

# Danke.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>2. Summary</b>	<b>7</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>9</b>
3.1. Inhaltstoffe von Pilzen . . . . .	11
3.2. Inhaltsstoffe in Pilzen der Gattung <i>Hygrophorus</i> . . . . .	13
<b>4. Allgemeiner Teil</b>	<b>19</b>
4.1. Die Gattung der Schnecklinge – <i>Hygrophorus</i> . . . . .	19
4.2. Übersicht über Farbreaktionen . . . . .	20
<b>5. Spezieller Teil</b>	<b>23</b>
5.1. <i>Hygrophorus personii</i> - Olivgestiefler Schneckling . . . . .	23
5.2. <i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> - Natternstieliger Schneckling . . . . .	27
5.3. <i>Hygrophorus pustulatus</i> - Schwarzpunktierter Schneckling . . . . .	29
5.4. <i>Hygrophorus latitabundus</i> - Großer Kiefern-schneckling . . . . .	30
5.5. Konfiguration der Hygrophorone . . . . .	35
5.5.1. Hygrophorone A und B . . . . .	36
5.5.2. Hygrophorone C und D . . . . .	37
5.6. MS-Untersuchung ausgewählter Hygrophorone . . . . .	39
5.6.1. Positive Ionisierung . . . . .	40
5.6.2. Negative Ionisierung . . . . .	44
5.7. Screening auf Hygrophorone in <i>Hygrophorus</i> spp. . . . .	50
5.7.1. Screening mittels Dünnschichtchromatographie . . . . .	50
5.7.2. <sup>1</sup> H-NMR-Screening . . . . .	50
5.7.3. Screening mittels Selected Reaction Monitoring (SRM) . . . . .	51
5.8. Biosynthese der Hygrophorone . . . . .	54
5.8.1. Hygrophorone F und G . . . . .	54
5.8.2. Hygrophorone A – E . . . . .	54
5.8.3. Verimpfungsexperimente an Pilzfruchtkörpern . . . . .	58
5.8.4. Verimpfungsexperimente an Myzelkulturen . . . . .	58
5.9. <i>Rigidoporus lineatus</i> . . . . .	58
5.9.1. Fragmentierungsverhalten . . . . .	60

5.9.2. Verfütterungsexperimente . . . . .	60
5.10. Biotest . . . . .	61
5.10.1. Antifungische Aktivität . . . . .	61
5.10.2. Antibakterielle Aktivität . . . . .	62
5.10.3. Membranintegrität . . . . .	62
5.10.4. Aktivität gegen <i>Phytophthora infestans</i> . . . . .	64
5.11. Vergleich der Hygrophorone mit Naturstoffen . . . . .	65
<b>6. Experimenteller Teil</b>	<b>67</b>
6.1. Geräte . . . . .	67
6.2. Chemikalien . . . . .	70
6.2.1. Kulturmedien . . . . .	70
6.3. Pilzmaterial . . . . .	71
6.4. Extraktion und Reinigung . . . . .	71
6.4.1. Gewinnung der Petrolether-Rohextrakte . . . . .	71
6.4.2. <i>Hygrophorus personii</i> . . . . .	71
6.4.3. <i>Hygrophorus olivaceoalbus</i> . . . . .	73
6.4.4. <i>Hygrophorus pustulatus</i> . . . . .	74
6.4.5. <i>Hygrophorus latitabundus</i> . . . . .	74
6.5. Screening auf Hygrophrone - Gewinnung der Rohextrakte . . . . .	74
6.6. Submerskulturen von <i>Rigidoporus lineatus</i> . . . . .	76
6.7. Verimpfungsexperimente . . . . .	77
6.7.1. Fruchtkörper von <i>Hygrophorus</i> spp. . . . .	77
6.7.2. Kulturen von <i>Rigidoporus lineatus</i> . . . . .	77
6.8. Biotest . . . . .	77
6.8.1. Bestimmung der antifungischen Aktivität . . . . .	77
6.8.2. Bestimmung der antibakteriellen Aktivität <i>in vitro</i> . . . . .	77
6.8.3. Untersuchung der Membranintegrität . . . . .	78
6.8.4. Hämolytische Aktivität . . . . .	78
6.8.5. Aktivität gegen <i>Phytophthora infestans</i> . . . . .	78
<b>7. Charakterisierung</b>	<b>81</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>105</b>
<b>A. Anhang</b>	<b>115</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>121</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>123</b>



# Abkürzungen

## allgemein

---

ber.	berechnet
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
MeOH	Methanol
MIC	Minimale Hemmkonzentration (minimal inhibition concentration)

## NMR

---

APT	Attached Proton Test
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionsless Enhancement by Polarisation Transfer
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
NOE	Nuclear Overhauser Effekt
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
$\delta$	Chemische Verschiebung, angegeben in ppm
<i>br</i>	breites Signal
<i>s</i>	Singulett
<i>d</i>	Dublett
<i>dd</i>	Dublett von Dubletts
<i>ddd</i>	Dublett von Dublett von Dubletts
<i>dt</i>	Dublett von Triplets
<i>J</i>	skalare Kern-Kern-Kopplungskonstante, angegeben in Hz
<i>t</i>	Triplett
<i>m</i>	Multiplett

## IR

---

$\mu$	Wellenzahl in $\text{cm}^{-1}$
<i>br</i>	breites Signal
<i>m</i>	mittel
<i>s</i>	stark
<i>vw</i>	sehr schwach
<i>w</i>	schwach

---

<b>MS</b>	Massenspektroskopie
<i>m/z</i>	Masse/Ladungszahl
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
APPI	Atmospheric Pressure Photoionisation
CID	Collision Induced Dissociation
ESI	Elektrospray Ionization
FT-ICR	Fourier-Transform-Ionencyclotronresonanz
SRM	Selected Reaction Monitoring