

**SCREENING AUSGEWÄHLTER AUSTRALISCHER *CORTINARIEN* DER
SUBGATTUNG *DERMOCYBE* MIT SPEZIELLEN FOKUS AUF DIE
PHOTOAKTIVITÄT DER ANTRACHINONPIGMENTE**

MASTERARBEIT

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

MAGISTRA DER PHARMAZIE

AM INSTITUT FÜR PHARMAZIE / PHARMAKOLOGIE

DER LEOPOLD-FRANZENS-UNIVERSITÄT

INNSBRUCK

EINGEREICHT VON

KATHARINA BUCHAUER

29.09.2022

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abstract	V
Zusammenfassung	VII
1 Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	3
2 Allgemeiner Teil	4
2.1 Systematische und chemotaxonomische Einteilung der <i>Cortinarien</i> der Subgattung <i>Dermocybe</i>	4
2.2 Photodynamische Therapie	6
2.2.1 Ablauf des Reaktionsmechanismus der photodynamischen Therapie ..	7
2.2.2 Aktuelles Forschungs- bzw. Anwendungsfeld der PDT	8
2.2.3 Zukunftspotential der antimikrobiellen PDT bei Infektionen	9
2.3 Feature-based molecular networking (FBMN)	10
3 Spezieller Teil / Ergebnisse	12
3.1 Extraktausbeute	12
3.2 Farbe der Extrakte	13
3.3 Zusammenführung von Pilzen identischer Extraktfarbe	13
3.3.1 Limitierung der Gruppenbildung nach Farbe	15
3.4 Gruppenbildung innerhalb einer Farbfamilie bzw. durch Überlappung der Chromatogramme	17
3.5 Analyse der Antrachinonpigmente	22
3.5.1 Annotierung der Antrachinonpigmente am Beispiel Emodin	23
3.5.2 Ergebnisse der chromatographischen Analyse	25
3.6 Bestimmung der vorliegenden Pigmentationsmuster	26
3.7 Gruppierung der untersuchten Pilzarten anhand des Pigmentationsmusters auf binären Level	31
3.8 Gruppierung nach Pigmentationsmuster anhand eines Trichterprinzips analog zu Keller [19]	33
3.9 9,10-Dimethylantracen-Assay	36
3.10 Isolierung von Fallacinol aus <i>Cortinarius cinnabarinus</i>	39
3.11 Feature-based molecular networking	42

4	Experimenteller Teil.....	46
4.1	Materialien, Geräte und Methoden	46
4.1.1	Lösungsmittel.....	46
4.1.2	Chemikalien	46
4.1.3	Herkunft der Pilzkollektion.....	46
4.1.4	Geräte	48
4.2	Herstellung der Extrakte	50
4.3	Analyse der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-DAD-ESI-MS	50
4.4	Lyophilisation	52
4.5	Festphasenextraktion der Pilzextrakte.....	52
4.6	Durchführung des Feature-based molecular networking	53
4.7	9,10-Dimethylantracen-Assay.....	55
4.8	Isolierung von Fallacinol aus <i>Cortinarius cinnabarinus</i>	58
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	60
6	Anhang	62
6.1	Graphik der initialen Einteilung nach Farbe der Extrakte.....	62
6.1.1	Gruppe braun gefärbter Extrakte.....	62
6.1.2	Gruppe der restlichen Extrakte.....	63
7	Literaturverzeichnis.....	70
8	Abbildungsverzeichnis	75
9	Tabellenverzeichnis.....	77
	Lebenslauf.....	78
	Eidesstaatliche Erklärung.....	79
	Danksagung	80

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
aPDT	antimikrobielle photodynamische Therapie
Asc	Ascorbinsäure
DAD	Diodenarray-Detektor
DCM	Dichlormethan
DMA	9,10-Dimethylantracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
EtOH	Ethanol
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FA	Ameisensäure
FBMN	Feature-based molecular networking
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
H₂O	Wasser
HPLC	High performance liquid chromatography
min	Minute
MN	Molecular networking
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
PS	Photosensibilisator
RCF	relative centrifugal force
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	reversed phase
UHPLC-HRMS/MS	Ultra-high performance liquid chromatography – high resolution tandem mass spectrometry
UV/VIS	Licht im ultravioletten bzw. sichtbaren Bereich

Abstract

According to economist Jim O'Neill, the monopoly position of antibiotic therapy against microbial infections will lead to a massive health crisis in 2050 due to advancing resistance [1]. In the search for alternative treatments, antimicrobial photodynamic therapy shows potential [2]. This form of treatment requires compounds that can be activated with light, such as those known from plants. Research into naturally occurring photosensitizers revealed structural similarities of light-activatable molecules from plants to anthraquinone pigments from fungi [3]. In this context, photoactive pigments could be detected in numerous representatives of the European species of *Cortinarius subgenus Dermocybe*, as for example Hammerle et al. published for 7,7'-biphyscion [4]. Based on this knowledge, the analysis of the metabolite profiles of Australian *Cortinarius subgenus Dermocybe* was defined as the aim of the present work. In particular, the hypothesis was tested whether the Australian *Cortinarius subgenus Dermocybe* represent a natural resource of photosensitizers analogous to the European representatives.

To prove this assumption, the metabolite profile of 33 representatives of Australian *Cortinarius subgenus Dermocybe* was analyzed by means of HPLC-DAD and HPLC-MS analysis and compared with the literature. Furthermore, a classification of these fungi according to pigment types was aimed at. The *in silico* method feature-based molecular networking was used to visualize similarities in the composition of the different fungal extracts in terms of the mass of the individual components, which were detected by UHPLC-HRMS/MS. By performing the 9,10-dimethylantracene assay, the production of singlet oxygen could be used to infer the photoactivity of the fungi. Furthermore, an attempt was made to isolate the anthraquinone pigment fallacinal from *C. cinnabarinus*.

The pigment analysis of the Australian representatives resulted in a wide range of metabolites, some of which could be assigned to known reference substances from the literature. Based on this, on the one hand a classification according to pigmentation pattern on a binary level could be achieved and on the other hand it was possible to classify the fungi according to their pigment composition on a funnel principle. In addition, the network generated by FBMN revealed pigment-specific clusters within the

Australian *Cortinarius* subgenus *Dermocybe*. During the DMA assay, promising photoactivity was detected for all fungal extracts from Australia. This result provides evidence that the hypothesis is correct and that the Australian *Cortinarius* subgenus *Dermocybe* represent an underestimated resource of photoactive compounds and could be used for PDT. In addition, the photoactive anthraquinone pigment fallacinol was successfully isolated from *C. cinnabarinus*.

Zusammenfassung

Laut dem Ökonomist Jim O'Neill wird die Monopolstellung der Antibiotikatherapie in der Bekämpfung mikrobieller Infektionen bis zum Jahr 2050 zu einer massiven Gesundheitskrise führen [1]. Auf der Suche nach alternativen Behandlungsmethoden zeigt die antimikrobielle, photodynamische Therapie Potential auf [1, 2]. Die Basis dieser Behandlungsform stellen lichtaktivierbare Verbindungen dar, wie sie aus Pflanzen bekannt sind [3]. In Anbetracht der strukturellen Ähnlichkeiten lichtaktivierbarer Moleküle aus Pflanzen zu den Antrachinonpigmenten aus Pilzen, wurde die Suche nach natürlich vorkommenden Photosensitizers im Reich der Pilze fokussiert [3]. In diesem Zusammenhang konnte für zahlreiche Vertreter der europäischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* photoaktive Pigmente nachgewiesen werden, wie zum Beispiel Hammerle et al. für 7,7'-Biphyscion publizierte [4]. Basierend auf diesem Wissen, wurde die Analyse der Metabolitenprofile australischer *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* als Ziel für die vorliegende Arbeit definiert. Im Speziellen wurde dabei die Hypothese geprüft, ob die australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* analog zu den europäischen Vertretern eine natürliche Ressource an Photosensitizers darstellen.

Um diese Annahme zu belegen, wurde in vorliegender Arbeit einerseits mittels HPLC- DAD- sowie HPLC-MS- Analyse das Metabolitenprofil von 33 australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* analysiert und mit der Literatur verglichen. Weiters wurde eine Einteilung jener Pilze nach Pigmenttypen angestrebt. Dabei nutzte man die *in silico* Methode Feature-based molecular networking, um Ähnlichkeiten in der Zusammensetzung der verschiedenen Pilzextrakte bezogen auf die Masse der einzelnen Bestandteile zu visualisieren, welche man mittels UHPLC-HRMS/MS detektierte. Mit der Ausführung des 9,10-Dimethylantracenassays [5] konnte über die Produktion von Singulett-Sauerstoff auf die Photoaktivität der Pilze geschlossen werden. Darüber hinaus wurde versucht das Antrachinonpigment Fallacinol aus *C. cinnabarinus* zu isolieren.

Die durchgeführte Pigmentanalyse der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* resultierte in einer großen Bandbreite an Metaboliten, welche zum Teil bekannten Referenzsubstanzen aus der Literatur zugeordnet werden konnten. Darauf

aufbauend konnte einerseits eine Klassifizierung nach Pigmentationsmuster auf binären Level erreicht werden und andererseits gelang es die Pilze anhand ihrer Pigmentzusammensetzung nach einem Trichterprinzip einzuteilen. Zudem zeigte das durch FBMN generierte Netzwerk pigmentspezifische Cluster innerhalb der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* auf. Im Rahmen des durchgeführten DMA-Assays konnte für sämtliche Pilzextrakte aus Australien eine vielversprechende Photoaktivität nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis liefert Indizien dafür, dass die aufgestellte Hypothese zutrifft und die australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* eine unterschätzte Ressource an photoaktiven Verbindungen darstellen und für die PDT genutzt werden könnten. Zusätzlich wurde das photoaktive Antrachinonpigment Fallacinol erfolgreich aus *C. cinnabarinus* isoliert.

1 Einleitung

Im Jahr 1928 gelang Alexander Fleming durch die Entdeckung des Penicillins der Durchbruch in der Behandlung mikrobieller Infektionen [6]. Über Jahrzehnte etablierte sich jene Wirkstoffklasse der Antibiotika als Mittel der Wahl bei bakteriellen Erkrankungen. In Bezug auf die Monopolstellung der Antibiotika warnt der Ökonomist Jim O'Neill in „The review of Antimicrobial resistance“ vor 10 Millionen Todesfällen im Jahr 2050 als Folge des Wirkverlustes der Antibiotikatherapie, basierend auf der steigenden Zahl antimikrobieller Resistenzen [1].

In Forschungskreisen werden zahlreiche Ansätze diskutiert, um eine adäquate Alternative für die herkömmliche Behandlung mit Antibiotika zu finden [7]. Wainwright und Maisch et al. [8] warnen in diesem Zusammenhang vor der Entwicklung neuer, systemisch wirksamer Medikamente, welche analog zu den konventionellen Antibiotika der Resistenzentwicklung unterliegen werden. Sie fordern stattdessen die Finanzierung der Forschungsarbeit im Bereich der antimikrobiellen, photodynamischen Therapie, welche unspezifisch vom Target wirksam ist und somit keiner Resistenzentwicklung unterliegt [8]. Der dabei ablaufende Wirkmechanismus basiert auf der gezielten Aktivierung einer zuvor applizierten, photoaktiven Verbindung durch eine geeignete Lichtquelle in einer sauerstoffreichen Umgebung. Dies führt zur gezielten Zerstörung der Pathogene in Folge der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies [8].

Während sich die photodynamische Therapie im klinischen Bereich der Onkologie, beispielsweise bei der Behandlung der aktinischen Keratose oder des Basalzellkarzinoms erfolgreich zeigt, blieb das antimikrobielle Potential der PDT bisher weitgehend ungenutzt [8]. Ein Grund dafür ist der unterschätzte Nutzen photoaktiver Verbindungen in Anbetracht der bis dato effizienten Antibiotikatherapie.

Ein zukünftiger Einsatz der aPDT in der Bekämpfung mikrobieller Infektionen erfordert die Verfügbarkeit geeigneter Photosensitizers, welche in Form von lichtaktivierbaren Molekülen als Schlüsselsubstanz der photodynamischen Therapie fungieren [9].

Diesbezüglich wurden bisher vorwiegend synthetische Photosensibilisatoren eingesetzt, wobei natürliche Ressourcen weitgehend unerforscht blieben [3]. Indessen führte das steigende Forschungsinteresse im Bereich der lichtaktivierbaren Verbindungen jedoch zur Entdeckung jener Substanzen im Reich der Pilze, in der Abteilung der *Basidomyceten* [10].

Von besonderem Interesse sind dabei die *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* (dt. Hautköpfe) [11, 12], welche chemotaxonomisch durch einen hohen Gehalt an Anthrachinonen definiert sind [13]. Diese Pigmente sind für die intensive Färbung des Fruchtkörpers verantwortlich und werden daher zum Färben verwendet [14]. Darüber hinaus wird vermutet, dass diese Farbstoffe dem Pilz als lichtinduzierbare Verteidigungsstrategie dienen. Dazu konnten beispielsweise für den europäischen Pilz *Cortinarius rubrophyllus* phototoxische Eigenschaften des Extrakts gegenüber Tumorzelllinien und Bakterien nachgewiesen werden. Dies ist auf die hohe Konzentration des natürlichen Photosensitizers Emodin in den Lamellen zurückzuführen [15].

Basierend auf dem Wissen um photoaktive Verbindungen innerhalb der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* auf der Nordhemisphäre, wird in dieser Arbeit der Fokus auf die Pilzpigmente der australischen Vertreter der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* gelegt.

Abbildung 1 zeigt drei Vertreter der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* mit ihren charakteristisch gefärbten Fruchtkörpern [16]. Diese Pilze der südlichen Hemisphäre wurden bisher nur in geringem Ausmaß erforscht und könnten eine potenzielle Quelle natürlicher Photosensitizer für die aPDT darstellen.



Abbildung 1. Farbvielfalt der australischen Vertreter der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* [16]

1.1 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel verfasst, anhand des verfügbaren Biomaterials von 33 *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* der südlichen Hemisphäre einen generellen Überblick über die enthaltenen Pigmente der Pilze aus Australien zu erhalten. Zudem sollen die Ergebnisse aus einer HPLC-DAD- und HPLC-MS-Analyse zur Klassifizierung nach Pigmentmuster dienen. Ferner wird durch die *in silico* Methode des Feature-based molecular networking eine Visualisierung von pigmentspezifischen Clustern innerhalb der australischen Pilze angestrebt. Überdies wird die Isolierung von Fallacinol aus *C. cinnabarinus* durchgeführt. Im Hinblick auf die Problematik steigender Antibiotikaresistenzen wird mittels DMA-Assay getestet, ob die Pilze über eine ausreichende Photoaktivität für die Verwendung als Photosensitizer im Zuge einer antimikrobiellen, photodynamischen Therapie geeignet sind.

2 Allgemeiner Teil

2.1 Systematische und chemotaxonomische Einteilung der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe*

In der Gattung *Cortinarius* (dt. Schleierlinge) werden 400 verschiedene Pilzarten zusammengefasst. Dazu zählen auch die *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* (dt. Hautköpfe) [17], welche sowohl auf der nördlichen als auch südlichen Hemisphäre beheimatet sind und im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen. Jene Gruppe an Pilzen unterliegt laut Mycobank einer systematischen Einteilung entsprechend der Tabelle 1 [18].

Tabelle 1. Einteilung der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* nach Mycobank [18]

Reich	Fungi
Unterreich	<i>Dikarya</i>
Abteilung	<i>Basidiomycota</i>
Unterabteilung	<i>Agaricomycotina</i>
Klasse	<i>Agaricomycetes</i>
Unterklasse	<i>Agaricomycetidae</i>
Ordnung	<i>Agaricales</i>
Familie	<i>Cortinariaceae</i>
Gattung	<i>Cortinarius</i>
Untergattung	<i>Dermocybe</i>

Charakteristisch für die sogenannten Hautköpfe sind gelb bis rot gefärbte Hüte mit einer glatten bis feinschuppigen, trockenen Huthaut und intensiv gefärbte Lamellen mit extrahierbaren Anthrachinonpigmenten [17]. Die systematische Einteilung dieser Pilze anhand makroskopischer Merkmale gestaltet sich aufgrund zahlreicher Variationen in Farbe und Form als schwierig. In diesem Fall kann eine qualitative und quantitative Analyse, der in allen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* enthaltenen Anthrachinonpigmenten, für die Klassifizierung herangezogen werden [19]. Es handelt sich bei den Anthrachinonen um eine der ersten, genauer beschriebenen Farbstoffe aus

höheren Pilzen, welche das chemotaxonomische Merkmal der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* darstellen [19].

Im Jahr 1925 gelang es Kögl und Postowsky erstmalig die Antrachinone Emodin und Dermocybin aus *C. sanguineus* zu isolieren [20]. Dem folgte der grundlegende Versuch, die Färbung der Fruchtkörper basierend auf den enthaltenen Anthrachinonpigmenten für eine Kategorisierung zu nutzen, wie es Moser 1952 für *C. cinnamomeus* und *C. sanguineus* publizierte [21]. Die Pigmentanalytik der nördlichen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* in Form papierchromatographischer und spektrophotometrischer Untersuchungen führte Mosers Schülerin Gabriel M. durch [22]. Ihre Vorgehensweise bei den europäischen Pilzen wurde in den Arbeiten von Ilse Gruber, einer weiteren Schülerin von Moser, auf südamerikanische und australische Exemplare der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* ausgeweitet [23, 24]. Die Arbeiten dieser Forschungsgruppe belegen, dass die Gruppierung der Arten nach Pigmentationsmuster ein relevantes taxonomisches Merkmal darstellt [21-23].

Die dünnschichtchromatographische Analyse wurde auch für die Bestimmung der Pigmentzusammensetzung von *C. cinnabarinus* und *C. sanguineus* durch Thoen 1970 eingesetzt [25]. Im Jahr 1982 gelang es Keller, durch eine im großen Maßstab durchgeführte DC-Pigmentanalyse, sechzehn verschiedene Spezies europäischer *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* in fünf unterschiedliche Pigmenttypen zu kategorisieren [19]. Im Zuge der durchgeführten Analysen konnten 31 verschiedene Pigmente nachgewiesen werden und Großteils anhand von Referenzsubstanzen [26-30] identifiziert werden. Anhand der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Pigmente konnte für jede Art ein spezifisches Pigmentationsmuster definiert werden und basierend darauf eine Gruppierung der Arten durchgeführt werden [19]. Diese chemotaxonomische Klassifizierung von Keller in die Pigmentationstypen *Cinnamomea*, *Malicoria*, *Sanguinea*, *Anthracina* und *Cinnabarina* wurde der systematischen Gliederung nach Moser vergleichend gegenübergestellt [31]. Dabei ist bemerkenswert, dass eine überwiegende Übereinstimmung vorherrscht.

Bei der Einteilung in Pigmentationstypen zeigt das Pigmentationsmuster von *C. cinnabarinus* eine Sonderstellung auf, weil es mit keinem der europäischen

Hautköpfe in Einklang gebracht werden kann und somit einen eigenen Pigmentationstyp darstellt. Dieser ist charakterisiert durch das Vorliegen von keinem bzw. wenig Flavomannin-6,6'-dimethylether kombiniert mit Endocrocin, Cinnalutein und Cinnarubin sowie Phycion und Fallacinal [19].

In der vorliegenden Arbeit wird anhand der Pigmentanalyse australischer *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* eine mögliche Gruppierbarkeit dieser Pilze nach Pigmentationsmustern analog zu Keller [19] angestrebt. Im Bezug darauf, wird eine mögliche Zugehörigkeit von *C. cinnabarinus* zu den *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* der südlichen Hemisphäre überprüft.

Im Rahmen der Analyse australischer *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* zeigte eine parallel durchgeführte Literaturrecherche auf, dass vorwiegend Publikationen zur Isolierung und Chemie der Pigmente vorliegen. Hierbei ist als Beispiel die frühe Arbeit von Archard et. al über die erstmalige Entdeckung von Austrocortinin in australischen Pilzen zu nennen [32]. Zudem befassen sich jüngere Publikationen wie jene von Beattie aus dem Jahr 2010 mit den antimikrobiellen Eigenschaften der Pigmente [33]. Im Hinblick auf die Pigmentationsuntersuchungen der nördlichen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* nach Keller, findet man jedoch keinerlei vergleichbare Arbeit über die Systematisierung der südlichen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* [19]. Darüber hinaus stagniert die Zuordnung der australischen Pilze häufig bereits auf dem Level der Vergabe von Herbarnummern [34]. Es zeichnet sich jedoch ab, dass zwischen den Pigmenten der europäischen und australischen Pilze deutliche Unterschiede vorliegen [35]. Zum Beispiel stellen die Dermocanarine eine Pigmentgruppe dar, welche charakteristisch für die australischen Vertreter ist [36]. Zusammenfassend ist zu sagen, dass für die australischen Vertreter der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* weiterführende, chemotaxonomische Untersuchungen benötigt werden, um eine Klassifizierung analog zu Keller [19] ermöglichen zu können.

2.2 Photodynamische Therapie

Erstmals wurde der lichtinduzierte Mechanismus der photodynamischen Therapie im Jahr 1900 von Oscar Raab erwähnt [37, 38]. Raab konnte während der Labortätigkeiten im Zuge seiner Dissertation unter der Leitung von Hermann von Tappeiner zufällig beobachten, dass durch Einwirkung von Sonnenlicht, Sauerstoff

sowie dem Farbstoff Acridin, die von ihm untersuchten Mikroorganismen (Paramecia) abgetötet wurden [38]. Aus dieser Entdeckung lassen sich die drei essenziellen Bestandteile der photodynamischen Therapie ableiten. Dabei handelt es sich um die, für sich allein nicht toxischen Komponenten Sauerstoff, Photosensibilisator und Licht einer bestimmten Wellenlänge. Erst das Zusammenspiel dieser Komponenten führt zur Bildung von hochreaktiven Sauerstoffspezies sowie zur zielgerichteten Zytotoxizität dieser Therapieform [39].

2.2.1 Ablauf des Reaktionsmechanismus der photodynamischen Therapie

Durch die lichtinduzierte Aktivierung des Photosensibilisators wird die photochemische Reaktion im Rahmen der PDT eingeleitet. Bei diesem Vorgang wird mit der für den jeweiligen PS spezifischen Wellenlänge eingestrahlt und somit ein Lichtphoton auf den Photosensibilisator übertragen [40]. Im Zusammenhang mit dem sogenannten „intersystem crossing“ wird der PS in den angeregten Triplettzustand überführt. Die dabei generierte Energie kann in unterschiedlichen Reaktionsmechanismen abgegeben werden [41]. Die photochemische Reaktion des Typ 1 beschreibt den Transfer eines Elektrons oder Protons auf Sauerstoff oder ein anderes benachbartes Molekül und resultiert in der Bildung von Radikalkationen bzw. -anionen. Durch die Folgereaktion dieser Radikale mit molekularem O₂ kommt es zur Ausbildung von Superoxidanionen, welche zu Wasserstoffperoxid und weiter zu Hydroxylradikalen reagieren können. Diese hochreaktiven Sauerstoffspezies führen dann über einen Radikalkettenmechanismus zu zellulären Schäden [42]. In der häufiger auftretenden Typ-2-Reaktion reagiert das lichtempfindliche Molekül aus dem angeregten Triplett-Zustand direkt mit ³O₂ im Grundzustand. Dieser Energietransfer führt zur Ausbildung hochreaktiver Sauerstoffspezies in Form von ¹O₂-Sauerstoff. Als Folge dessen entfaltet die PDT ihre selektive Zytotoxizität durch Interaktion der ROS mit Biomolekülen wie Lipiden, Proteine und Nukleinsäuren [41].

2.2.2 Aktuelles Forschungs- bzw. Anwendungsfeld der PDT: Tumorthherapie

Insbesondere für die Therapie von Krebserkrankungen birgt die photodynamische Behandlungsstrategie enormes Potential [43]. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies im Zuge der lichtinduzierten Reaktion ermöglicht drei verschiedene Angriffspunkte auf das Tumorgewebe: einerseits können entartete Zellen direkt angegriffen und abgetötet werden, andererseits wird die Nährstoffzufuhr des Tumors durch Zerstörung der Blutgefäße eingestellt. Im Idealfall resultiert aus diesem lichtinduzierten Prozess zudem eine Anti-Tumor-Immunität. Darunter versteht man den Erwerb eines Immungedächtnisses in Form tumorspezifischer T-Zellen, durch welche das körpereigene Immunsystem bei rezidiv auftretenden Krebsformen autonom agieren kann [41]. Die aktuelle Studienlage bestätigt im präklinischen Bereich die Generierung einer starken adaptiven Immunantwort, jedoch sind klinischen Daten dazu nur beschränkt vorhanden. Daher bedarf es im klinischen Segment der Durchführung weiterer Studien [44]. Bereits zugelassen ist die PDT zum Beispiel für die Therapie von Blasen-, Lungen- oder Ösophagustumoren. Außerdem hat sich die Anwendung bei Veränderungen der Haut wie der aktinischen Keratose oder Akne vulgaris etabliert [45].

2.2.2.1 Vorteile der PDT gegenüber herkömmlichen Behandlungsmethoden

Die standardisierte Behandlung von Gewebswucherungen umfasst neben Operationen im Allgemeinen Chemo- und Radiotherapie. Allen gemeinsam ist dabei der immunsuppressive Nebeneffekt auf den Organismus [46]. Demgegenüber führt die Prägung von tumorspezifischen T-Lymphozyten im Zuge der photodynamischen Behandlung von Tumoren zur Steigerung der körpereigenen Immunabwehr [41]. Ein weiterer Vorteil der PDT zeigt sich in der nicht invasiven Applikation des Photosensibilisators, welche die Compliance des Patienten deutlich erhöht. Zudem zeigt sich eine selektive Akkumulation des Photosensibilisators in den entarteten Zellen im Vergleich zu den gesunden Zellen, wie es Hamblin and Newman für die Photosensibilisatoren der Gruppe der Haematoporphyrine beschreiben [47]. Dies ist auf die erhöhte Zellteilungsrate von Krebszellen zurückzuführen und einer damit verbundenen erhöhten Anwesenheit des Low-Density-Lipoproteins [47]. Es handelt

sich beim Low-Density-Lipoprotein um einen Transporter von Cholesterin, welches für den Aufbau von Zellmembranen benötigt wird. Im Zuge der PDT fungiert dieses Protein als Transporter für den Photosensibilisator [40].

2.2.3 Zukunftspotential der antimikrobiellen PDT bei Infektionen

Mit der Veröffentlichung der Übersichtsarbeit „Tackling a global health crisis“ zielte der Ökonom Jim O’Neill bereits im Jahr 2015 auf eine Bewusstseinsbildung gegenüber dem Anstieg der antimikrobiellen Resistenzen ab. Die Einschätzung der Lage für das Jahr 2050 beinhaltet eine Prognose von 10 Millionen Toten im Zusammenhang mit dem Wirkverlust von Antibiotika [1].

Im Hinblick auf diese drohende Gesundheitskrise erscheint das Konzept der lichtinduzierten Therapie als Alternative zur herkömmlichen Antibiotikatherapie erfolgversprechend. Es handelt sich bei der antimikrobiellen, photodynamischen Therapie um eine Abwandlung, der aus dem Bereich der Krebstherapie bekannten Methode der photodynamischen Therapie (siehe Abschnitt 2.2.2.). Bei der Behandlung von Infektionen zielen die im Zuge der photodynamischen Reaktion generierten, reaktiven Sauerstoffspezies jedoch anstelle von Krebszellen auf mikrobiologische Targets ab, wie zum Beispiel Proteine, Lipide und Nukleinsäuren der Erreger [8]. Aufgrund dieses Target-unabhängigen Wirkmechanismus ist bei dieser Behandlungsmethode mit keiner Resistenzentwicklung zu rechnen [48].

Aktuell belegen klinische Studien im Bereich dentaler [2], gastrointestinaler und dermatologischer Infektionen den Erfolg der aPDT in der Bekämpfung von Mikroorganismen. Dabei erkannte man bei der Anwendung des lichtinduzierten Verfahrens bei Krebszellen und Infektionen Unterschiede im Ablauf der immunologischen Prozesse. Während bei der antikanzerogenen Anwendung sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem aktiviert wird, zeigt sich bei den frühen Studienergebnissen der aPDT lediglich eine Stimulierung des angeborenen Immunsystems [49]. Dies würde bedeuten, dass die Anwendung einer aPDT zu keiner Ausbildung eines Immungedächtnisses führen würde und somit kein Schutz vor rezidivierenden Infektionen gegeben wäre.

2.3 Feature-based molecular networking (FBMN)

Unter dem Begriff Feature-based molecular networking versteht man eine *in silico* Methode zur Auswertung von massenspektroskopischen Daten aus einer UHPLC-HRMS/MS-Analyse [50]. Dabei werden die nach Masse getrennten Fragmente unterschiedlicher Verbindungen in ein gemeinsames Netzwerk eingebunden, welches auf dem Prinzip der größten Ähnlichkeit basiert. Das heißt, dass jene Massespuren mit den stärksten Gemeinsamkeiten in Form eines Clusters miteinander verbunden dargestellt werden und jene, die davon abweichen separiert präsentiert werden.

Für die vorliegende Arbeit nutzte man das FBMN um einen raschen Überblick über Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede in der komplexen Zusammensetzung der Pilzextrakte der europäischen und australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* zu erhalten und daraus resultierende, spezifische Pigmentmuster zu erkennen. Zudem liefert das erhaltene Netzwerk Hinweise auf den Ursprung der beobachteten Bioaktivität [51].

Im Zuge der Generierung eines solchen Netzwerkes ist eine Vorprozessierung der massenspektroskopischen Daten aus der UHPLC-HRMS/MS mit dem Open Source Programm MZmine erforderlich. Dieser Vorgang wird benötigt um störende Faktoren wie Addukte, Komplexe und Hintergrundrauschen herauszufiltern. Außerdem wird für jeden Peak das spezifische m/z- Verhältnis sowie die entsprechende Retentionszeit definiert und als sogenannte „features“ deklariert [52]. Die in diesem Prozess erhaltene MS 1 Level Information kann anhand des Programms MZmine mit dem passenden MS 2 Scan kombiniert ausgegeben werden [52]. Dieser Prozess stellt eine Optimierung des herkömmlichen Molecular Networking dar, welches lediglich spektrale Ähnlichkeiten auf MS 2 Level in die Netzwerke miteinbezieht. In diesem Kontext zeigt sich die Differenzierbarkeit von Isotopen, welche identische MS 2 Spektren aufweisen, sich jedoch in ihrer Retentionszeit unterscheiden, als wesentlicher Vorteil des FBMN [53]. Die im Programm MZmine angewandten Parameter können der Tabelle 13 und Tabelle 14 im experimentellen Teil entnommen werden.

Die Berechnung des Netzwerkes erfolgt auf der bioinformatischen Plattform Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) [54]. Hierbei wurden die Parameter entsprechend der Tabelle 15 im experimentellen Teil angewandt. Durch den Abgleich mit experimentellen Daten kann GNPS zusätzlich Annotierungsvorschläge liefern [54]. Für die Darstellung und Formatierung des generierten Netzwerkes wird die Open Source Software Cytoscape verwendet [55]. Innerhalb eines Netzwerkes wird jede detektierte Massespur aus der UHPLC-HRMS²-Analyse als Knoten dargestellt und über Linien mit den am stärksten verwandten, aber nicht identischen Massespuren in Form von Clustern verbunden [51, 52]. Das Programm bietet dabei die Möglichkeit taxonomische als auch biologische Daten in das Netzwerk zu integrieren. In der vorliegenden Arbeit nutzte man diese Option zur Einbettung der Photoaktivitätsdaten der Extrakte aus dem durchgeführten DMA-Assay. Darüber hinaus können durch Kopplung der Daten mit einer selbst generierten Datenbank Annotierungen aufgezeigt werden [56].

3 Spezieller Teil / Ergebnisse

3.1 Extraktausbeute

Die methanolische Extraktion ($V = 3 \times 5 \text{ ml}$) des Biomaterials aus dem National Herbarium of Victoria ergab für die 33 bereitgestellten Pilze (siehe Tabelle 9) Ausbeuten zwischen 26,8 % und 78,9 % der Einwaage (je 250 mg; Ausnahme: 2089707). Die geringste Extraktausbeute wurde mit 26,8 % der Einwaage für *C. atropurpureus* (MEL 2120791) erzielt. Außerdem hatte die begrenzt zur Verfügung stehende Menge an Biomaterial des zweiten Exemplars von *C. atropurpureus* (MEL 2089707) eine verminderte Einwaage (99,05 mg) zur Folge, welche jedoch zur höchsten Ausbeute von 78,9 % der Einwaage führte. In Abbildung 2 wird für alle analysierten Pilze die erhaltene Extraktausbeute in Prozent der Einwaage als Balkendiagramm dargestellt.

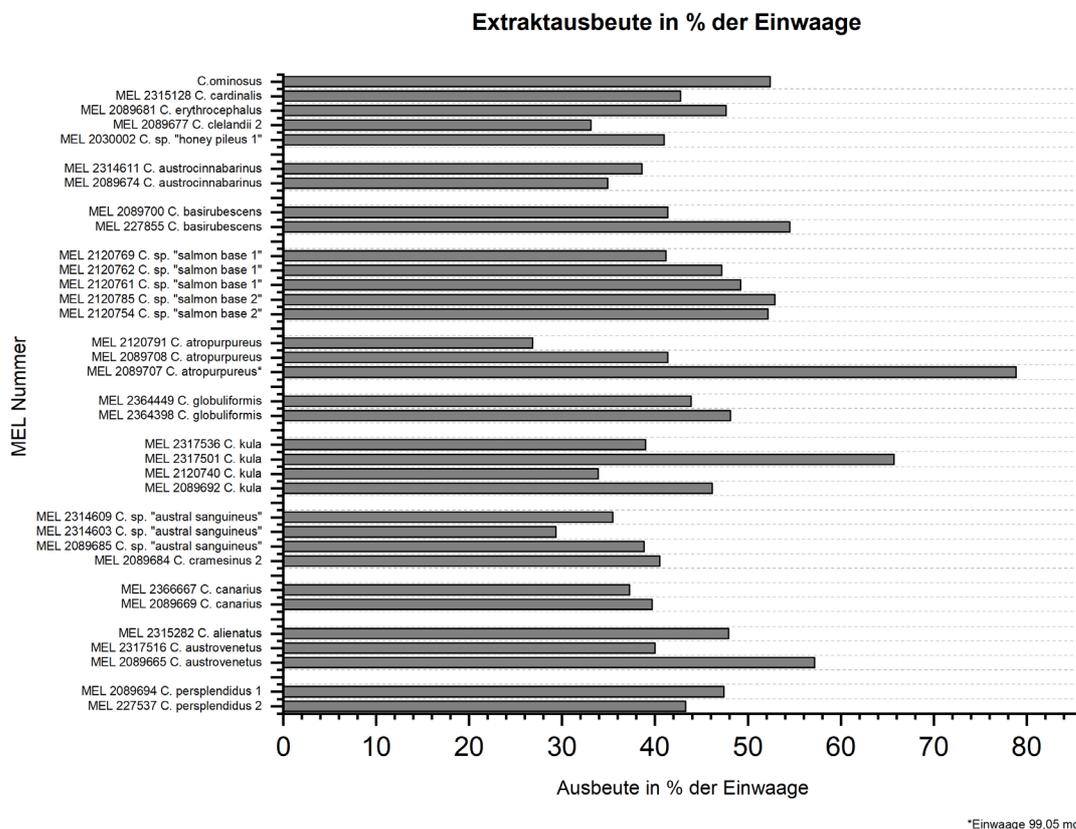


Abbildung 2. Extraktausbeute in % der Einwaage

3.2 Farbe der Extrakte

Bei der visuellen Prüfung der hergestellten Extrakte fällt eine intensive Farbgebung auf. In gelöster Form reicht dabei die Farbpalette der Extrakte von farblos bis dunkelviolett (siehe Abbildung 3). Die im Zuge dieser ersten Sichtung festgestellte violette Färbung könnte ein Hinweis auf das Vorliegen von Hypericin darstellen. Im getrockneten Zustand variiert die Extraktfarbe von Gelbtönen über Orange- und Rotnuancen bis hin zur Braunfärbung. Bemerkenswert ist dabei die farbliche Übereinstimmung zwischen einzelnen Extrakten, wie sie in Abschnitt 3.3 diskutiert wird.



Abbildung 3. Intensive Färbung der gewonnenen Extrakte

3.3 Zusammenführung von Pilzen identischer Extraktfarbe

Das Biomaterial aus dem National Herbarium of Victoria war analog zu den 33 angegebenen MEL Nummern in 33 getrennte Säckchen aufgeteilt und wurde getrennt voneinander extrahiert. Wie in Abschnitt 3.2 erwähnt, konnte jedoch eine farbliche Übereinstimmung zwischen einigen Extrakten festgestellt werden. Dies führte zur Hypothese, dass jene Extrakte mit demselben Farbton von derselben Pilzspezies abstammen könnten. Aus diesem Grund wurde eine HPLC-DAD-Analyse durchgeführt und die erhaltenen Chromatogramme miteinander verglichen. Hierbei konnte für die farblich korrespondierenden Extrakte überwiegend auch eine Vereinbarkeit der Hauptmetabolitenprofile dieser Pilze gezeigt werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass jene Pilze mit derselben Bezeichnung aber verschiedenen Herbarnummern (MEL Nummer) zu einer phylogentischen Spezies zusammengefasst werden können.

Als Beispiel dienen hier die beiden Exemplare von *C. canarius*, welche unterschiedlichen MEL Nummern zugeordnet sind (MEL 2089669, MEL 2366667). Beide Pilze ergaben im Zuge der durchgeführten Extraktion, ein sich in Konsistenz und Farbe (orangebraun) deckendes Extrakt, wie in Abbildung 4 erkenntlich ist. Zudem stimmen die bei einer Wellenlänge von 468 nm aufgenommenen Chromatogramme in der Retentionszeit ihrer vier Hauptpeaks überein (Retentionszeiten: 5,45 min; 5,73 min; 8,29 min; 8,85 min), wie man in Abbildung 5 sehen kann. Diese Resultate bekräftigen das Indiz einer möglichen Kategorisierbarkeit der 33 australischen Pilze nach Extraktfarbe und Übereinstimmung im Metabolitenprofil.



Abbildung 4. Farbliche Übereinstimmung der beiden Extrakte von *C. canarius*

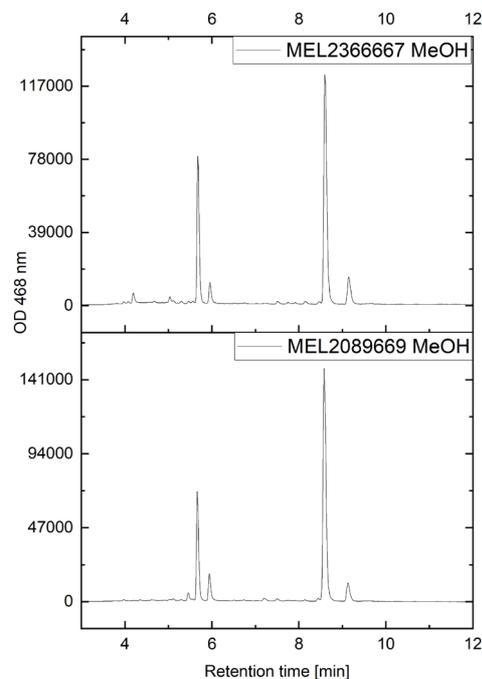


Abbildung 5. Chromatogramme von beiden Exemplaren von *C. canarius* mit vers. MEL Nummern aber identischen Hauptpeaks; chromatographische Bedingungen siehe Abschnitt 4.3 unter Verwendung der in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Säule

Im Zuge durchgeführter Genanalyse konnte für jeden Pilz die phylogenetische Spezies und die entsprechende Einordnung innerhalb des Genbaumes überprüft werden, wie Tabelle 2 und Abbildung 6 zeigen. Die vorgenommene Gruppierung der Pilze nach Farbe und Vereinbarkeit der Metabolitenprofile erhielt durch den Abgleich mit den Daten der Genanalyse überwiegend Bestätigung, wie anhand dieses Beispiels für *C. canarius* gezeigt wird.

Tabelle 2. Auszug der Daten der Genanalyse von *C. canarius*

MEL	ITS GenBank	Name MEL Paket	Phylogenet. Spezies
2089669	JN942305	<i>canaria</i>	<i>C. canarius</i>
2366667	JF960665	<i>canaria</i>	<i>C. canarius</i>

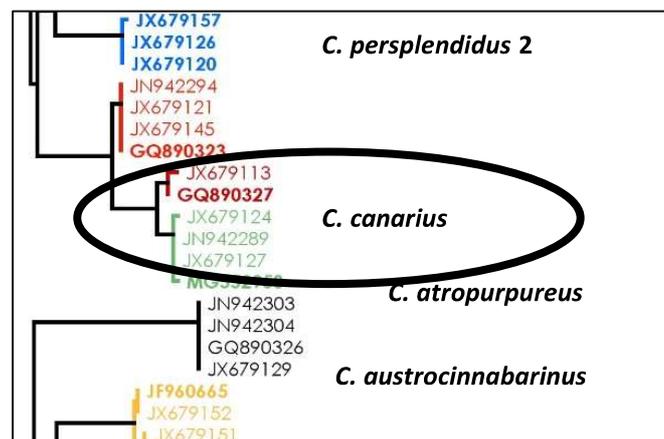


Abbildung 6. Ausschnitt des Genbaumes für *C. canarius*

3.3.1 Limitierung der Gruppenbildung nach Farbe

Das angewandte Prozedere zur Gruppenbildung über Extraktfarbe und Hauptmetabolitenprofil zeigt dennoch Limitierungen auf. Zum Beispiel erwies sich die Einordnung über die gemeinsame orange-braune Färbung (siehe Abbildung 7) und die Ähnlichkeiten im Chromatogramm (siehe Abbildung 8) von vier Pilzen (MEL 2089684; MEL 2089685; MEL 2314603; MEL 2314609) in die phylogenetische Spezies *C. sp. „austral sanguineus“* als Scheingruppierung. Der Pilz mit der MEL Nummer 2089684 konnte anhand der vorliegenden Daten aus der Genanalyse (siehe Tabelle 3) und seiner Platzierung am Genbaum (siehe Abbildung 9) als naher

Verwandter der Spezies *C. sp. „austral sanguineus“* bestimmt werden und somit der eigenständigen Spezies *C. cramesinus 2* neu zugeordnet werden.



Abbildung 7. Farbliche Übereinstimmung der Scheingruppierung *C. sp. "austral sanguineus"*

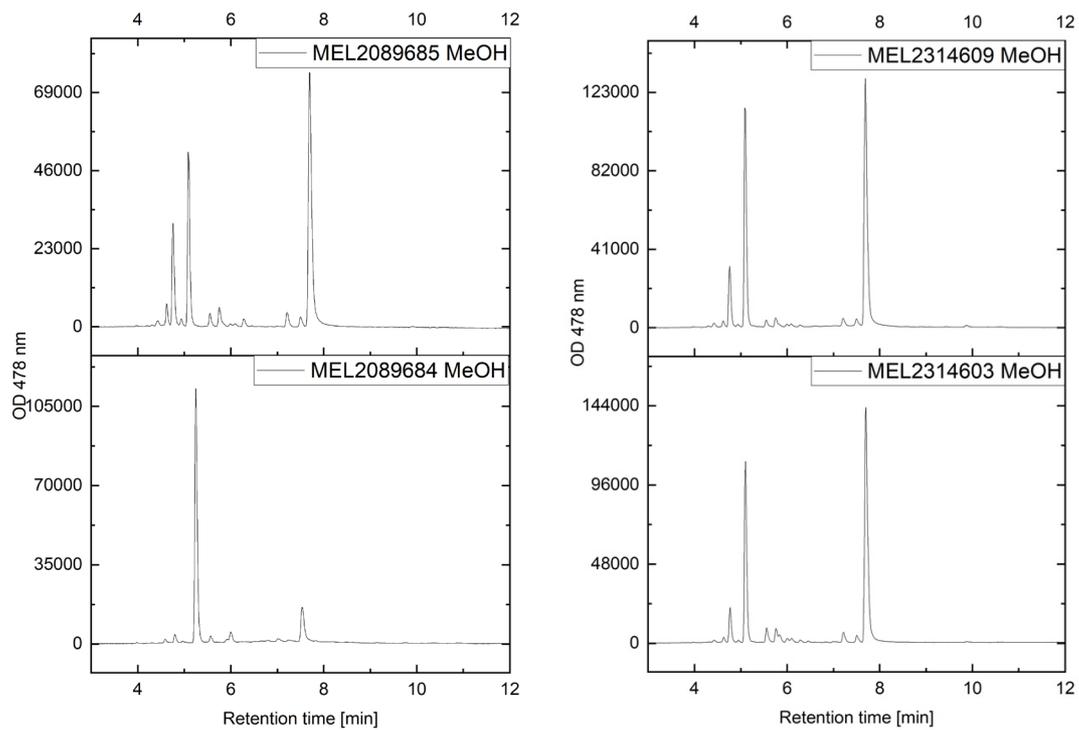


Abbildung 8. Übereinstimmung der Hauptpeaks in der Scheingruppierung *C. sp "austral sanguineus"*; chromatographische Bedingungen siehe Abschnitt 4.3 unter Verwendung der in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Säule

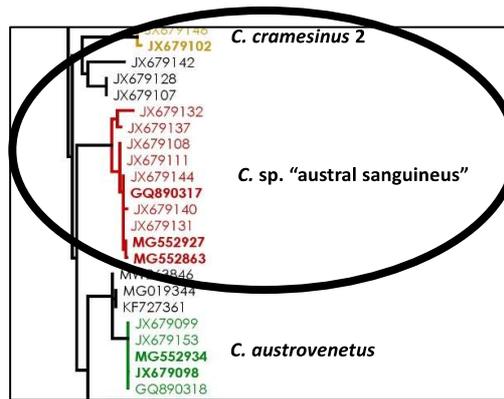


Abbildung 9. Abgrenzung von *C. cramesinus 2* als eigene Spezies laut Genbaum

Tabelle 3. Auszug der Daten der Genanalyse für *C. sp. "austral sanguineus"*

MEL	ITS GenBank	Name MEL Paket	Phylogenet. Spezies
2089684	JX679102	sanguinea	<i>C. cramesinus 2</i>
2089685	GQ890317	sanguinea	<i>C. sp. "austral sanguineus"</i>
2314609	MG552927	austrosanguinea	<i>C. sp. "austral sanguineus"</i>
2314603	MG552863	austrosanguinea	<i>C. sp. "austral sanguineus"</i>

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass die vorgenommene Gruppenbildung unter Abzug dieser Limitierungen dennoch eine Eingliederung der 33 verschiedenen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* aus Australien in siebzehn verschiedene Pilzspezies ermöglicht.

3.4 Gruppenbildung innerhalb einer Farbfamilie bzw. durch Überlappung der Chromatogramme

Nachdem man die Spezieszuordnung der 33 Vertreter der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* nach Extraktfarbe und Hauptmetaboliten abgeschlossen hatte, wurden nun alle Pilzextrakte in drei Farbfamilien gruppiert (siehe Tabelle 4). Dabei wurden einerseits alle orange-roten Extrakte zu einer Gruppe zusammengeführt, andererseits sämtliche braune Extrakte gruppiert und die letzte Kategorie inkludiert die restlichen Extrakte. Im Zuge der Kategorisierung wurden die HPLC-DAD-Chromatogramme der Pilze einer Farbfamilie mit dem Programm Origin übereinandergelegt, um Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede im Metabolitenprofil herauszuarbeiten. Diese Vorgehensweise ermöglichte Unterschiede auch im Bereich der „minor compounds“ zu erkennen.

Tabelle 4. Einteilung der Pilzextrakte in drei Farbfamilien

Gruppe orange-rot gefärbter Pilzextrakte	Gruppe braun gefärbter Pilzextrakte	Gruppe der restlichen Pilzextrakte
<i>C. sp. „honey pileus 1“</i> (MEL 2030002)	<i>C. cramesinus 2</i> (MEL 2089684)	<i>C. atropurpureus</i> (MEL 2089708)
<i>C. basirubescens</i> (MEL 2089700)	<i>C. austrocinnabarinus</i> (MEL 2314611)	<i>C. clelandii 2</i> (MEL 2089677)
<i>C. sp. „salmon base 2“</i> (MEL 2120754)	<i>C. kula</i> (MEL 2089692)	<i>C. sp. „austral sanguineus“</i> (MEL 2314603)
<i>C. sp. „salmon base 1“</i> (MEL 2120761)	<i>C. canarius</i> (MEL 2089669)	<i>C. cardinalis</i> (MEL 2315128)
<i>C. erythrocephalus</i> (MEL 2089681)	<i>C. globuliformis</i> (MEL 2364398)	<i>C. alienatus</i> (MEL 2315282)
<i>C. persplendidus 1</i> (MEL 2089694)		<i>C. austrovenetus</i> (MEL 2317516)

In der Gruppe der orange-rot gefärbten Extrakte konnte kein gemeinsames Gruppenmerkmal für alle zugehörigen Pilzextrakte aufgefunden werden. Dennoch ergab sich für vier der sechs Pilze in dieser Gruppe (*C. sp. „honey pileus 1“*, *C. basirubescens*, *C. sp. „salmon base 2“* und *C. sp. „salmon base 1“*) eine Zusammengehörigkeit über den Peak bei einer Retentionszeit von 8,36 min, welcher ihnen gemeinsam ist. Dieser ist in der Abbildung 10 durch einen orangen Punkt gekennzeichnet. Für die restlichen zwei Pilze dieser Farbfamilie (*C. erythrocephalus* und *C. persplendidus 1*) konnte eine Übereinstimmung im Metabolitenprofil durch den Peak bei einer Retentionszeit von 4,84 min erhalten werden (siehe Abbildung 10, gekennzeichnet durch ein rotes Dreieck).

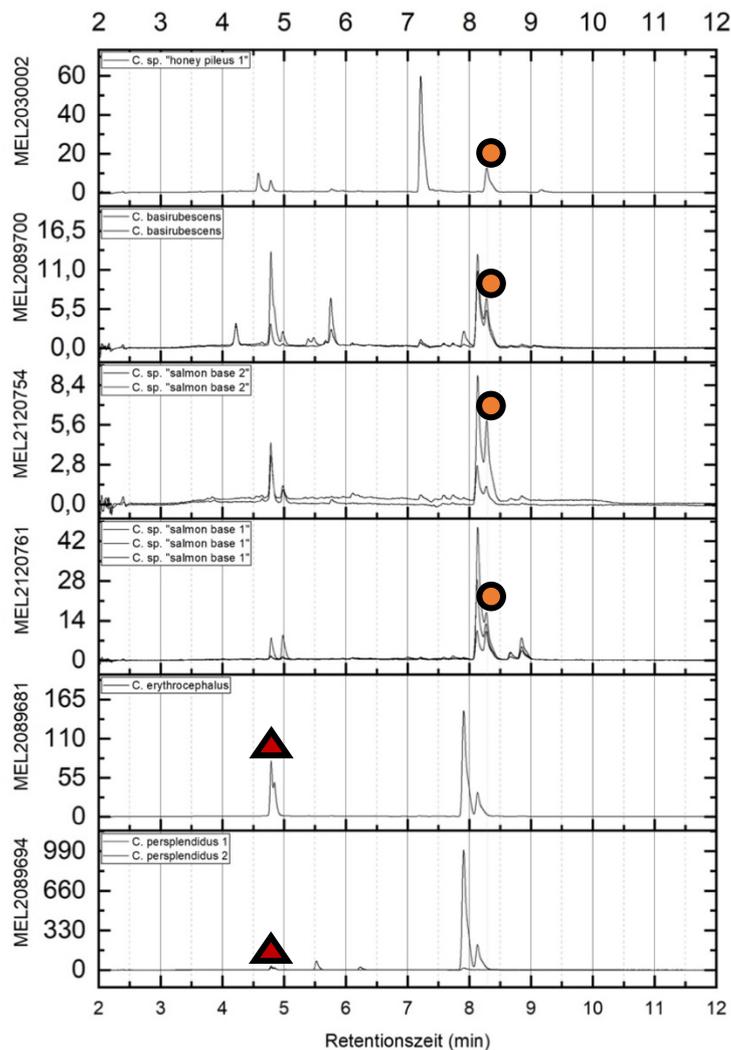


Abbildung 10. Kategorisierung der Pilze nach Farbfamilie (orange-rot)

Die vorgenommene Einteilung nach Farbfamilien kann in ihrer Aussagekraft durch die Literatur bestätigt werden. Stefani et al. publizierte in seiner Arbeit „Concordance of seven gene genealogies compared to phenotypic data reveals multiple cryptic species in Australian dermocyboid *Cortinarius*“ einen phylogenetischen Stammbaum, welcher sämtliche Pilze der orange-roten Kategorie beinhaltet [57]. Bei näherer Betrachtung des Genbaumes wird deutlich, dass alle sechs Vertreter der gebildeten Gruppe in enger Verwandtschaft zueinanderstehen und analog zu den Auswertungen der Metabolitenprofile eine Differenzierung in eine Vierer- (*C. sp. „honey pileus 1“*, *C. basirubescens*, *C. sp. „salmon base 2“* und *C. sp. „salmon base 1“*) beziehungsweise Zweiergruppe (*C. erythrocephalus* und *C. persplendidus 1*) bestätigt

werden kann, wie man in Abbildung 11 durch einen größeren Abstand erkennen kann [57].

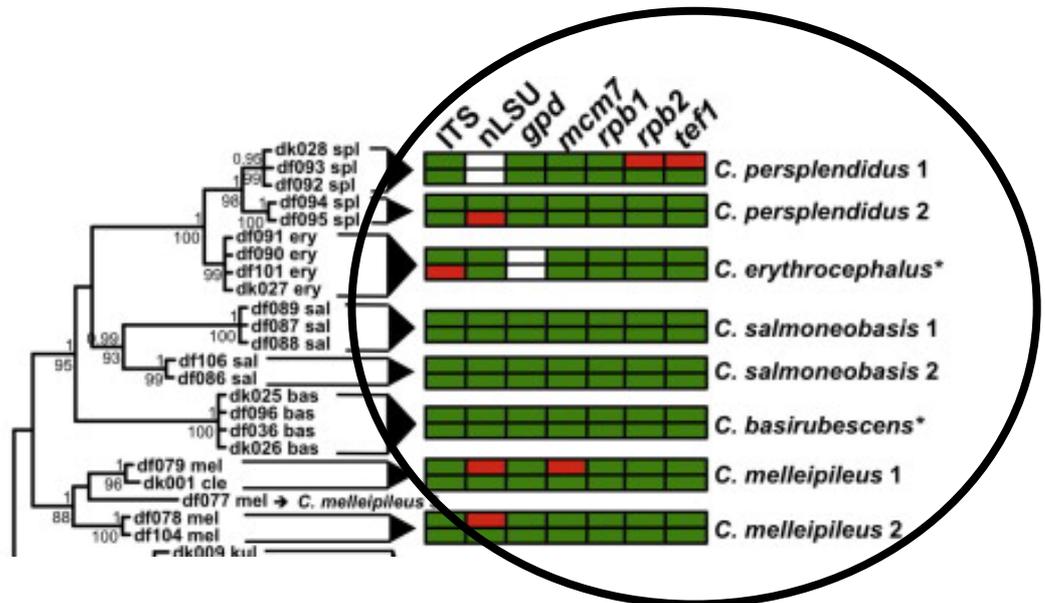


Abbildung 11. Ausschnitt aus dem Genbaum von Stefani et al. [57]

Darüber hinaus basiert die Pigmentanalyse aus der Literatur von Stefani et al. auf dünnschichtchromatographischen Untersuchungen der Pilzextrakte [57]. Im direkten Vergleich zeigt sich die Auswertung dieser DC-Analyse (siehe Abbildung 12) als deutlich schwieriger als jene, der durchgeführten HPLC-DAD-Analysen (siehe Abbildung 10). Diesbezüglich ist die Übersichtlichkeit der generierten Daten beziehungsweise die gute Quantifizierbarkeit bei den HPLC-DAD-Chromatogrammen als Vorteil zu nennen.

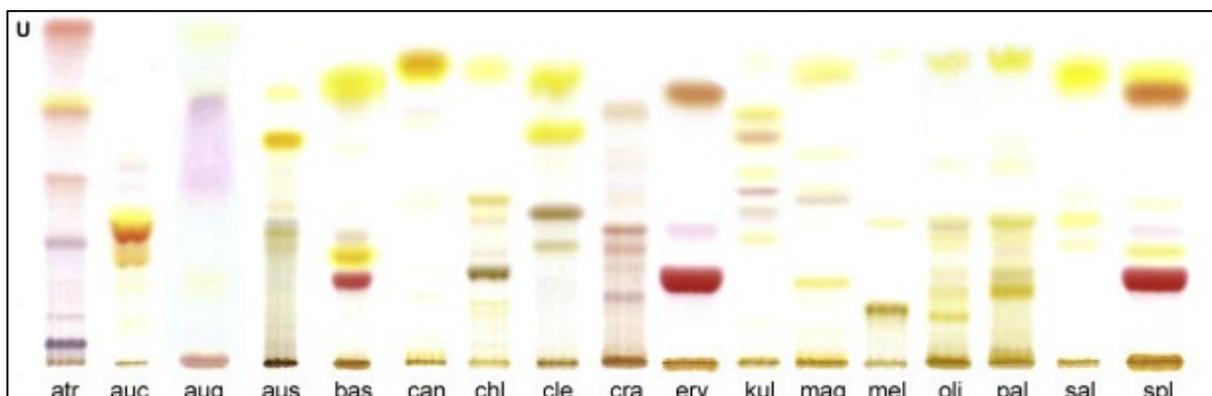


Abbildung 12. DC-Platten Ergebnis laut Stefani et al. [57] unter Verwendung von POLYGRAM SIL G/UV254 vorbeschichteten Plastik in der Größe 10 x 20 cm, mit einer Silica-Schichtdicke von 0,25 mm; als mobile Phase wurde das Gemisch Toluol/Ameisensäureethylester/Ameisensäure (50:49:1 v/v/v) verwendet.

Bei der Gruppe der braunefärbten Extrakte konnte aufgrund der Heterogenität im Metabolitenprofil kein Gruppenmerkmal aufgefunden werden (siehe Graphik im Anhang unter 6.1.1) und somit wird Sinnhaftigkeit dieser Kategorie in Frage gestellt.

In der Kategorie der restlichen Extrakte (siehe Anhang unter 6.1.2) fällt auf, dass sowohl für den Pilz *C. austrovenetus* als auch den Pilz *C. alienatus* nur ein einziger Peak bei einer Retentionszeit von 7,63 min registriert werden konnte. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Vereinbarkeit dieser beiden Pilze in einer Spezies. Ein Übereinanderlegen der Chromatogramme (siehe Abbildung 13) zeigt jedoch bei der Analyse der „minor compounds“ einen minimalen Unterschied bezogen auf zwei Peaks auf, welche mit einem schwarzen Kreis gekennzeichnet sind. Um diese Abweichungen genauer zu verifizieren, würde man jedoch ein größeres Kollektiv benötigen.

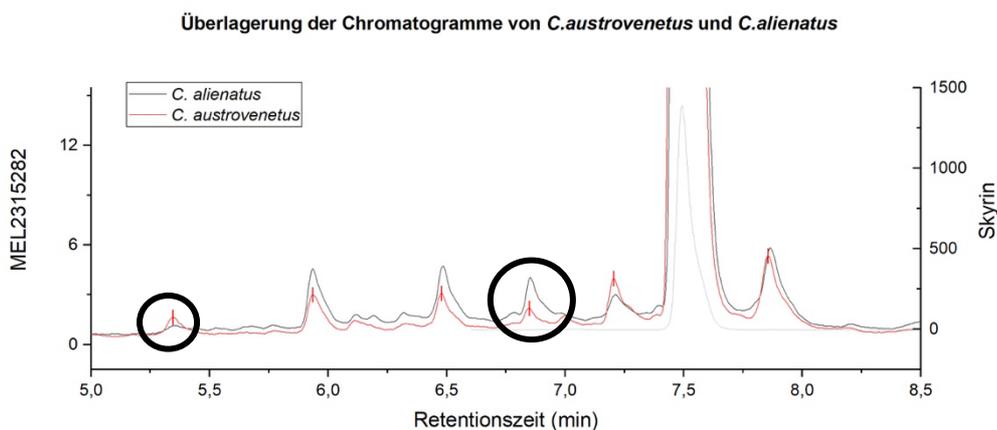


Abbildung 13. Überlagerung C. austrovenetus und C. alienatus; chromatographische Bedingungen siehe Abschnitt 4.3 unter Verwendung der in Abschnitt 4.1.4 beschriebenen Säule

Die durchgeführte Gensequenzierung dieser Pilze bestätigt sowohl die Abgrenzung von *C. alienatus* von der Spezies *C. austrovenetus* als auch deren enges Verwandtschaftsverhältnis (siehe Tabelle 5 und Abbildung 14).

Tabelle 5. Datenauszug der Genanalyse von *C. austrovenetus* und *C. alienatus*

MEL	ITS GenBank	Name MEL Paket	Phylogenet. Spezies
2089665	JX679098	austroveneta	<i>C. austrovenetus</i>
2317516	MG552934	austroveneta	<i>C. austrovenetus</i>
2315282	MG552940	aff. austroveneta NZ	<i>C. alienatus</i>

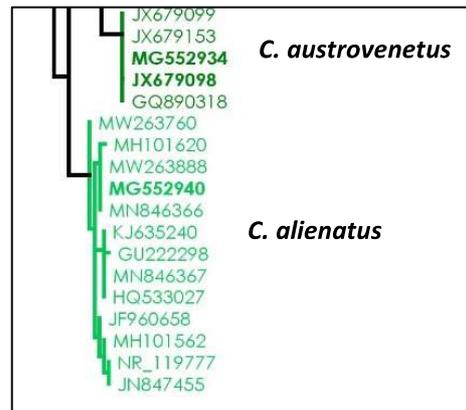


Abbildung 14. Ausschnitt des Genbaumes von *C. austrovenetus* und *C. alienatus*

3.5 Analyse der Antrachinonpigmente

Alle 33 Extrakte der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* wurden wie in Abschnitt 4.3 beschrieben mittels HPLC gekoppelten Diodenarray-Detektor analysiert. Dabei wurden ergänzend die zugehörigen UV/VIS-Spektren (210-800 nm) aufgenommen, welche zum Vergleich mit Referenzsubstanzen genutzt wurden. Zudem bediente man sich der HPLC-DAD-ESI-MS-Analyse zur Massendetektion. Die Kombination dieser Informationen aus Retentionszeit, UV-Spektren, Massespektren und Informationen aus der Literatur ermöglichte die Annotierung der Antrachinonpigmente. Im Folgenden wird die Annotierung der Pigmente anhand eines Beispiels veranschaulicht. Im Abschnitt 3.5.2 werden die Resultate der Analyse diskutiert.

3.5.1 Annotierung der Antrachinonpigmente am Beispiel Emodin

Die Extraktion des Biomaterials von *C.sp. „honey pileus 1“* diente der Vorbereitung für die chromatographische Analyse mittels HPLC-DAD-Systems (entsprechend der in Abschnitt 4.3 beschriebenen Methode). Dabei erhielt man ein Chromatogramm mit vier Hauptpeaks. Die Retentionszeit des Peaks bei 7,2 min (siehe Abbildung 15) korreliert mit jener von Emodin (unter Verwendung derselben Methode) aus früheren Analysen der Forschungsgruppe [58].

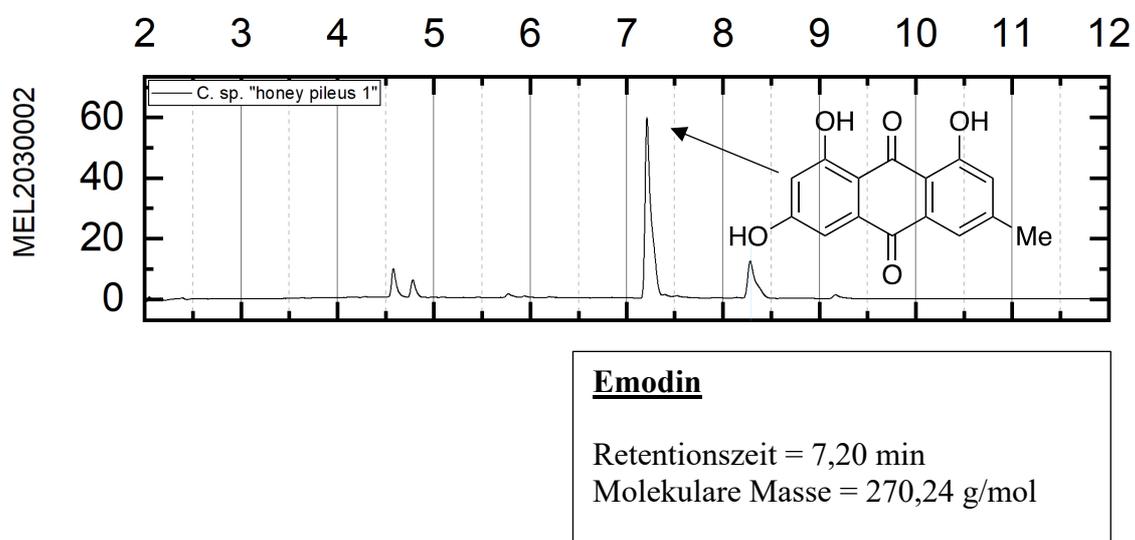


Abbildung 15. HPLC-DAD-Chromatogramm von *C. sp. "honey pileus 1"* laut Methode in Abschnitt 4.3 aufgenommen; Detektionswellenlänge 468 nm

Im Folgenden wurden die UV-Spektren der zu untersuchenden Verbindung aus dem Pilzextrakt von *C.sp. „honey pileus 1“* und jenem der Reinsubstanz [59] gegenübergestellt und verglichen. Die Referenzsubstanz von Emodin weist in ihrem UV-Spektrum Absorptionsmaxima bei $\lambda = 221$ nm und $\lambda = 265$ nm auf sowie eine weitere Bande bei 435 nm [59] (siehe Abbildung 16). Der Vergleich mit dem UV-Spektrum des analysierten Pilzextraktes der Verbindung mit $t_R = 7,20$ min zeigt ein analoges Spektrum. Hierbei liegen die detektierten Absorptionsmaxima bei $\lambda = 223$ nm und $\lambda = 266$ nm sowie $\lambda = 437$ nm.

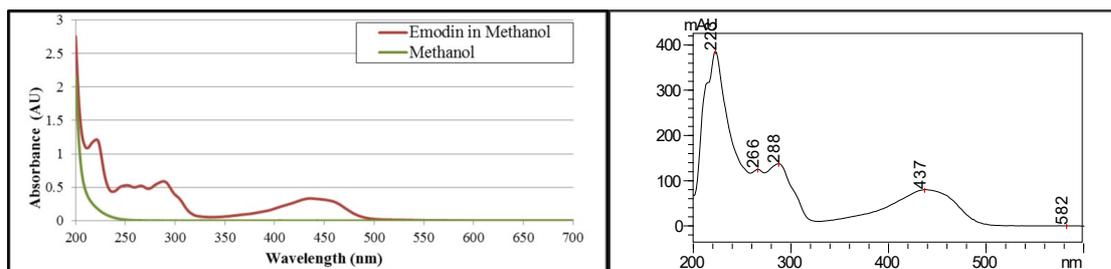


Abbildung 16. UV-Spektren von Emodin: links das Spektrum der Referenzsubstanz [59] und rechts das Spektrum der zu analysierenden Verbindung aus *C. sp. "honey pileus 1"*

Den dritten Aspekt zur Identifizierung des Antrachinonpigments stellt das Massenspektrum der zu analysierenden Verbindung bei $t_R = 7,20$ min dar (siehe Abbildung 17). Hierbei erhielt man im Zuge der durchgeführten HPLC-DAD-ESI-MS-Analyse ein Signal bei m/z 269, welches dem Fragment Emodin im negativen Modus zugeordnet werden kann (Aglykon -H):

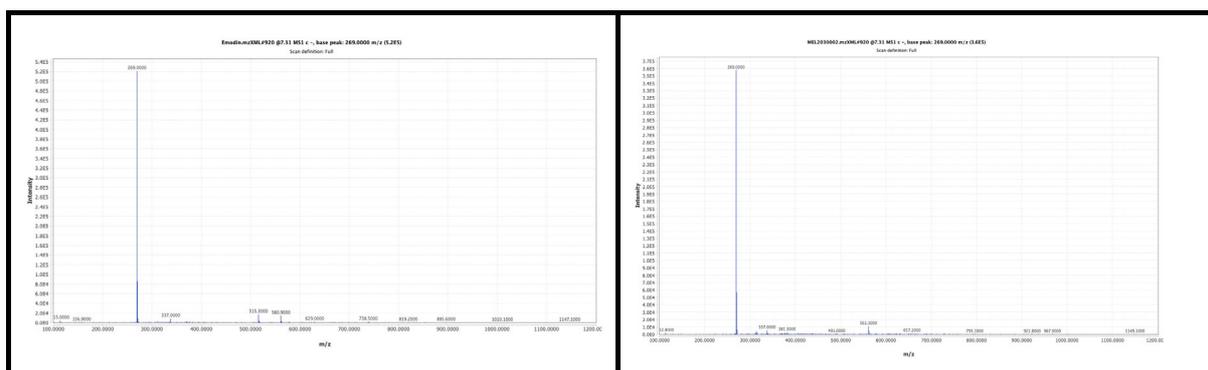


Abbildung 17. Massenspektrum von Emodin, aufgenommen mit HPLC-DAD-ESI-MS (negativer Modus) im Vergleich mit der Referenzsubstanz Emodin (links)

Im Zuge der Überprüfung der drei charakteristischen Parameter Retentionszeit, UV-Spektrum und Masse einer Substanz konnte die zu untersuchende Verbindung als Emodin annotiert werden. Außerdem konnte das Vorkommen des Pigments Emodin in den australischen Vertretern der *Cortinari* der Subgattung *Dermocybe* anhand der Literatur bestätigt werden [33]. Es wurde für die restlichen Pigmente analog dazu vorgegangen (siehe Anhang, Abschnitt 6.3).

3.5.2 Ergebnisse der chromatographischen Analyse der Antrachinonpigmente

Insgesamt konnten für die 33 aufgenommenen HPLC-DAD-Chromatogramme der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* 35 verschiedene Pigmente detektiert werden. Diese Pigmentvielfalt äußert sich in einem breiten Pigmentmuster der australischen Pilze, welches aus bis zu neun verschiedenen Pigmenten pro Pilz zusammengesetzt wird (9 Peaks > 10% bei *C. cardinalis*, MEL 2315128). Aufgrund des großen Umfangs war eine vollständige Annotierung der vorliegenden Pigmente im Rahmen dieser Masterarbeit nicht möglich. Es wurde jedoch eine Zuordnung für dreizehn Pigmente erreicht (siehe Daten zu den Annotierungen im Anhang unter Abschnitt 6.3). Die chemischen Strukturen dieser Verbindungen, welche alle Antrachinonpigmente darstellen, sind in Abbildung 18 dargestellt. Dabei handelt es sich Großteils um neutrale Antrachinone wie Emodin (**A27**), Physcion (**A33**), Dermocybin (**A28**), Austrocortirubin (**A7**) und Austrocortilutein (**A21**). Außerdem konnten die Antrachinoncarbonsäuren Endocrocin (**A17**), Dermolutein (**A13**) und Cardinalic Acid (**A11**) zugeordnet werden. Überdies wurden die Glykoside Emodin-8-glucosid (**A5**), Dermocybinglucosid (**A9**) und Austrocortinin-8-O-gentiobiosid (**A8**) aufgefunden. Bei den Verbindungen Biphyscion (**A35**) und Skyrin (**A29**) handelt es sich um dimere Antrachinonpigmente. Bei den nicht zugeordneten Pigmenten mit verzögerter Retentionszeit wird vermutet, dass es sich um Dimere beziehungsweise Glykoside der bereits identifizierten Pigmente handeln könnte.

Emodin-8-glucosid (A5)	Austrocortirubin (A7)	Austrocortinin-8-O-gentiobiosid (A8)
Dermocybin-glucosid (A9)	Cardinalic Acid (A11)	Dermolutein (A13)
Endocrocin (A17)	Austrocortilutein (A21)	Emodin (A27)
Dermocybin (A28)	Skyrin (A29)	Physcion (A33)
A35 7,7'-Biphyscion (A35)		

Abbildung 18. Chemische Strukturen der annotierten Antrachinonpigmente

Bestimmung der vorliegenden Pigmentationsmuster

Im Allgemeinen wird die qualitative und quantitative Zusammensetzung der enthaltenen Pigmente eines Pilzes als spezifisches Pigmentmuster definiert [19]. Im Falle der zu analysierenden, australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* wurden alle detektierten Pigmente mit einem Code **A1-A35** definiert und ergeben somit für jeden einzelnen Pilz ein spezifisches Set an Pigmenten. Als Beispiel beschreibt das spezifische Auftreten der Verbindungen **A7**, **A8**, **A31** und **A32** das überschaubare Pigmentmuster des Pilz *C. eythrocephalus* (siehe Abbildung 19). Dabei konnte im Zuge der Annotierung (**A7**) als Austrocortirubin und (**A8**) als Austrocortinin-8-O-gentiobiosid putativ zugeordnet werden (siehe 3.5.2). Diese Vorgehensweise wurde für alle Pilze umgesetzt (siehe Abbildung 19-21).

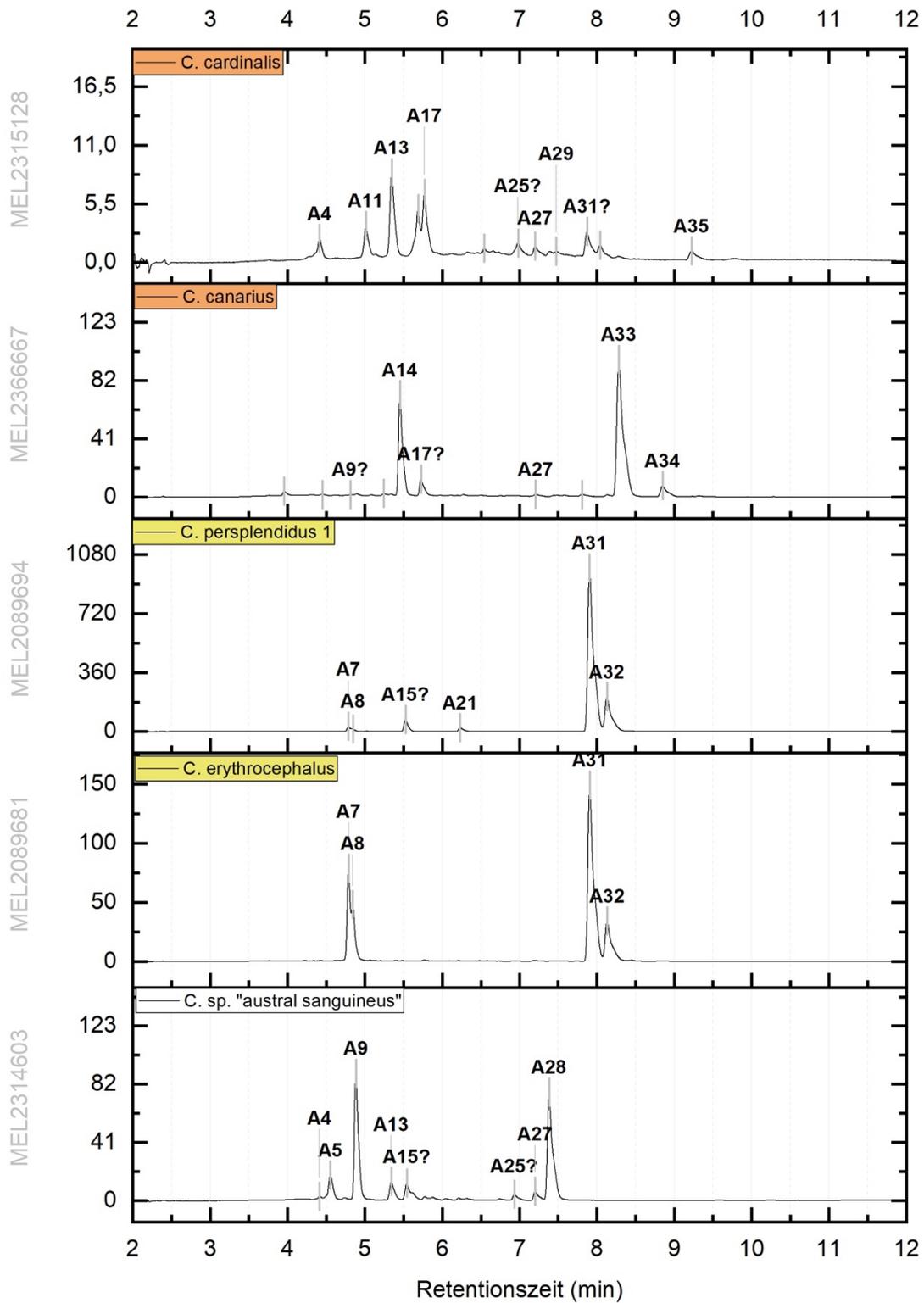


Abbildung 19. Pigmentmuster der australischen Cortinarien der Subgattung *Dermocybe* Teil 1

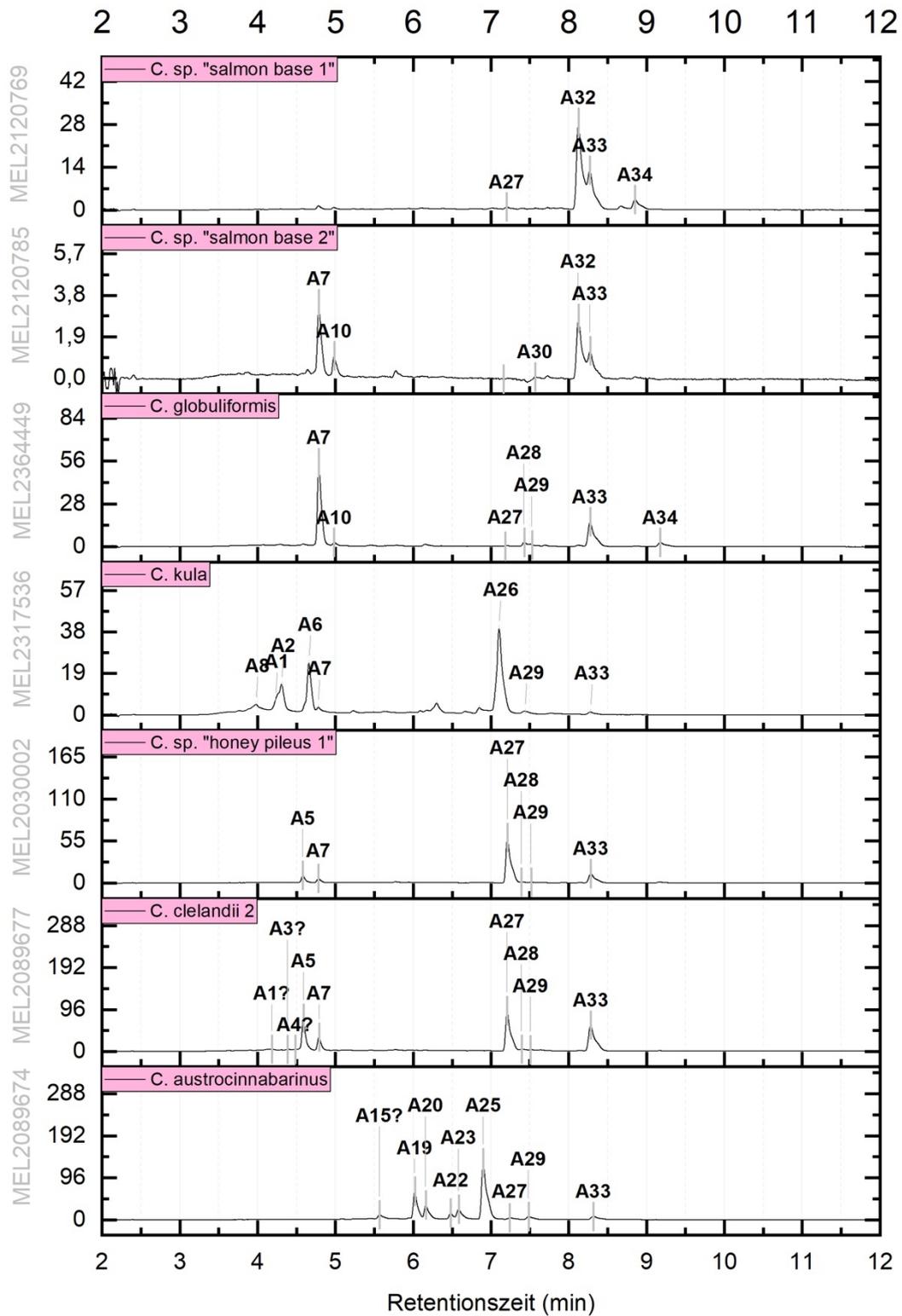


Abbildung 20. Pigmentmuster der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* Teil 2

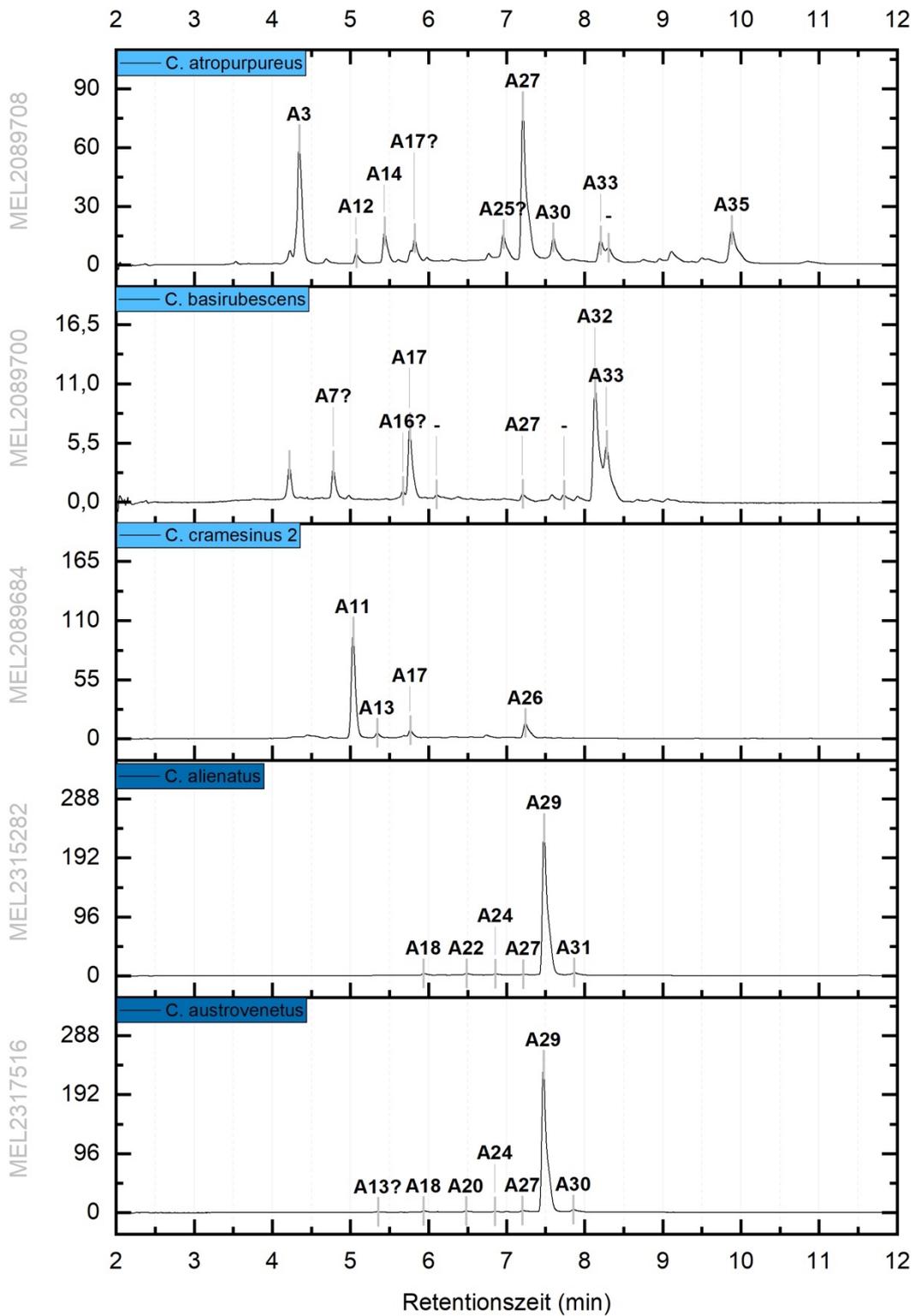


Abbildung 21. Pigmentmuster der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* Teil 3

3.6 Gruppierung der untersuchten Pilzarten anhand des Pigmentationsmusters auf binären Level

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gruppierung der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* nach Pigmentationsmustern angestrebt. Basierend auf der hohen Vielfalt der Pigmente, welche häufig nur in Spuren vorliegen, gestaltete sich die Einteilung nach Pigmentation als schwierig. Dennoch gelang es, eine Kategorisierung in Kleingruppen im binären Stil zu erreichen. Es ergaben sich dabei sechs Gruppen, welche durch das gemeinsame Vorliegen bzw. Fehlen von Pigmenten definiert wurden.

Das Gemeinschaftsmerkmal der ersten Gruppe stellt das Vorhandensein von Emodin (**A27**) und Endocrocin (**A17**) da, welches in den Pilzen *C. canarius* und *C. cardinalis* (siehe Abbildung 19) gefunden werden kann. Die zweite Fraktion setzt sich aus den beiden Vertretern *C. persplendidus 1* und *C. erythrocephalus* zusammen und wird durch die beiden Pigmente Austrocortirubin (**A7**) und Austrocortinin-8-O-gentiobiosid (**A8**) definiert. Beide Pilze enthalten zudem die nicht zugeordneten Pigmente **A31** und **A32** (siehe Abbildung 19). Überdies kann man in Abbildung 19 erkennen, dass der Pilz *C. sp. austral sanguineus* einen Einzelgänger darstellt, der durch sein spezifisches Pigmentmuster kein gemeinsames Pigmentmuster mit einem anderen Pilz aufweist. Er enthält die annotierten Pigmente Emodin-8-O-glucosid (**A5**), Dermocybinglucosid (**A9**), Dermolutein (**A13**), Emodin (**A27**) und Dermocybin (**A28**).

In der Abbildung 20 wird eine sehr große Gruppe bestehend aus sieben Vertretern (*C.sp. „salmon base 1“*, *C. sp. „salmon base 2“*, *C. globuliformis*, *C. kula*, *C. sp. honey pileus 1“*, *C. clelandii 2* und *C. austrocinnabarinus*) der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* dargestellt. Das Gemeinschaftsmerkmal dieser Gruppe liegt im Vorkommen des Pigments Physcion (**A33**).

Zudem bilden die Pilze *C. atropurpureus*, *C. basirubescens* und *C. cramesinus 2* eine weitere Kleingruppe aus, welche durch das Vorhandensein von Endocrocin (**A17**) determiniert wird. Die sechste Untergruppe weist die Pigmentkombination aus Emodin (**A27**) und Skyrin (**A29**) auf und inkludiert die Pilze *C. alienatus* und *C. austrovenetus* (siehe Abbildung 21).

Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über das Vorkommen der Pigmente in den jeweiligen Pilzen und zeigt an, welche Pigmente für die Gruppenbildung verantwortlich sind.

Tabelle 6. Darstellung der enthaltenen Pigmente in den einzelnen Pilzen, mit Hervorhebung der Gruppenmerkmale

Pigmentanzordnung	Zeit	Substanz	C.sp. "austral sanguineus" 2314603	C. erythrocephalus 2089681	C. persplendius 1 2089694	C. canarius 2366667	C. cardinalis 2315128	C. atropurpureus 2089708	C. basirubescens 2089700	C. cramesinus 2 2089684	C. allenatus 2315282	C. austrovenetus 2315716	C. sp. Salmon base 1 2120769	C. globuliformis 2364449	C. sp. Salmon base 2 2120785	C. kula 2317636	C. sp. "honey pileus 1" 2030002	C. clelandii 2 2089677	C. austrocinbarinus 2089674
A1	4,22		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
A2	4,31		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A3	4,34		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
A4	4,41		1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
A5	4,55	Emodin-8-glucosid	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
A6	4,66		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A7	4,79	Austrocortinubin	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0
A8	4,84	Austrocortinin-8-O-gentiobiosid	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A9	4,88	Democytinglucosid	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A10	4,98		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A11	5,01	Cardinalic Acid	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A12	5,08		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A13	5,34	Demolubin	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
A14	5,45		0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A15	5,54		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A16	5,67		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A17	5,73	Endocrocin	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A18	5,94		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A19	6,02		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A20	6,16		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A21	6,23	Austrocortilubin	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A22	6,49		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
A23	6,58		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A24	6,85		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
A25	6,93		1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A26	7,24		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
A27	7,2	Emodin	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
A28	7,38	Democybin	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
A29	7,48	Skyrin	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1
A30	7,6		0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0
A31	7,91		0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
A32	8,13		0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
A33	8,29	Physcion	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
A34	8,85		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
A35	9,22	7,7-Biphyscion	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

3.7 Gruppierung nach Pigmentationsmuster anhand eines Trichterprinzips analog zu Keller [19]

Basierend auf der beschriebenen Einteilung der australischen Pilze auf binären Level wurde eine feinere Gliederung der Gruppen analog zu jener, die Keller [19] für die nördlichen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* generiert hat, angestrebt.

Die Erkenntnisse aus der Kategorisierung auf binären Level wiesen darauf hin, dass die australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* in zwei große Klassen eingeteilt werden können, welche durch das Vorhandensein beziehungsweise Nicht-Vorhandensein von Physcion (**A33**) gekennzeichnet sind. Dem folgend wurde in der jeweiligen Gruppe nach einem weiteren Gemeinschaftsmerkmal gesucht und entsprechend einem Trichter wieder eine Untergruppe mit beziehungsweise ohne dieses Pigment gebildet. Diesem Prinzip folgend konnte entsprechend der Tabelle 7 und 8 eine Einteilung der Spezies in Gruppen erfolgen.

Beispielsweise konnte in der Kategorie der Pilze ohne Physcion (**A33**) eine weitere Unterteilung anhand des Vorliegens beziehungsweise Fehlens des Pigments Emodin (**A27**) gemacht werden. Während die Pilze *C. cardinalis*, *C. sp. „austral sanguineus“*, *C. alienatus* und *C. austrovenetus* Emodin in ihrem Pigmentmuster beinhalten, fehlt dieses Pigment den Pilzen *C. persplendidus 1*, *C. erythrocephalus* und *C. cramesinus 2*. Diesem Prinzip folgend wurde mit jedem vorhandenen Pigment vorgegangen.

Dabei ergaben sich für jene zehn Pilze, die Physcion (**A33**) enthalten sieben verschiedene Kleingruppen, was die Heterogenität der Pigmentzusammensetzung der australischen Pilze unterstreicht. Für die Kategorie der Pilze ohne Physcion (**A33**) wurden lediglich vier Kleingruppen gebildet, welche insgesamt sieben Pilze beinhalten.

Dieses Resultat lässt erkennen, dass es einer noch umfassenderen Aufklärung der enthaltenen Vielzahl an Pigmenten benötigt, um eine aussagekräftige Einteilung nach Pigmentmuster zu erzielen und den jeweiligen Pigmenttyp bestimmen zu können.

Tabelle 7. Einteilung nach Pigmentmuster im Trichterprinzip

Art der vorgefundenen Pigmentationsverhältnisse						Spezies	
Australische Cortinarien der Subgattung Dermocybe	mit Physcion (A33)	mit Skyrin (A29)	mit Emodin (A27)	mit Austro- cortirubin (A7)	mit Emodin- 8- glucosid (A5)	C. sp. „honey pileus 1“ C. clelandii 2	
					ohne Emodin- 8- glucosid (A5)	C. globuliformis	
				ohne Austrocortirubin (A7)		C. austrocinnabarinus	
				ohne Emodin (A27)			C. kula
				ohne Skyrin (A29)	mit Emodin (A27)	mit A32	mit (A7)
		ohne (A7)	C. sp. „salmon base 1“				
		ohne A32				mit (A17)	C. canarius C. atropurpureus

Tabelle 8. Fortsetzung Einteilung nach Pigmentmuster im Trichterprinzip

Art der vorgefundenen Pigmentationsverhältnisse				Spezies	
Australische Cortinarien der Subgattung Dermocybe	ohne Phycion (A33)	mit Emodin (A27)	mit A25	mit A4 und (A13)	<i>C. cardinalis</i> <i>C. sp. "austral sanguineus"</i>
			ohne A25	mit A18 und A24	<i>C. alienates</i> <i>C. austrovenetus</i>
		ohne Emodin (A27)	mit A31 und A32	mit (A7) und (A8)	<i>C. persplendidus 1</i> <i>C. erythrocephalus</i>
			ohne A31 und A32		<i>C. cramesinus 2</i>

3.8 9,10-Dimethylantracen-Assay

Die Fähigkeit der Pilzextrakte zur Produktion von Singulett-Sauerstoff wurde anhand des 9,10-Dimethylantracen-Assays [5] untersucht. Das Analyseergebnis bei einer Belichtung mit blauem Licht ($\lambda = 468 \text{ nm}$) bezogen auf Berberin als Referenzsubstanz wird in Abbildung 22 dargestellt. Zudem wurde bei einer Belichtung im grünen Wellenlängenbereich gemessen ($\lambda = 519 \text{ nm}$) unter Verwendung der Referenzsubstanz Rose bengal (siehe Abbildung 23).

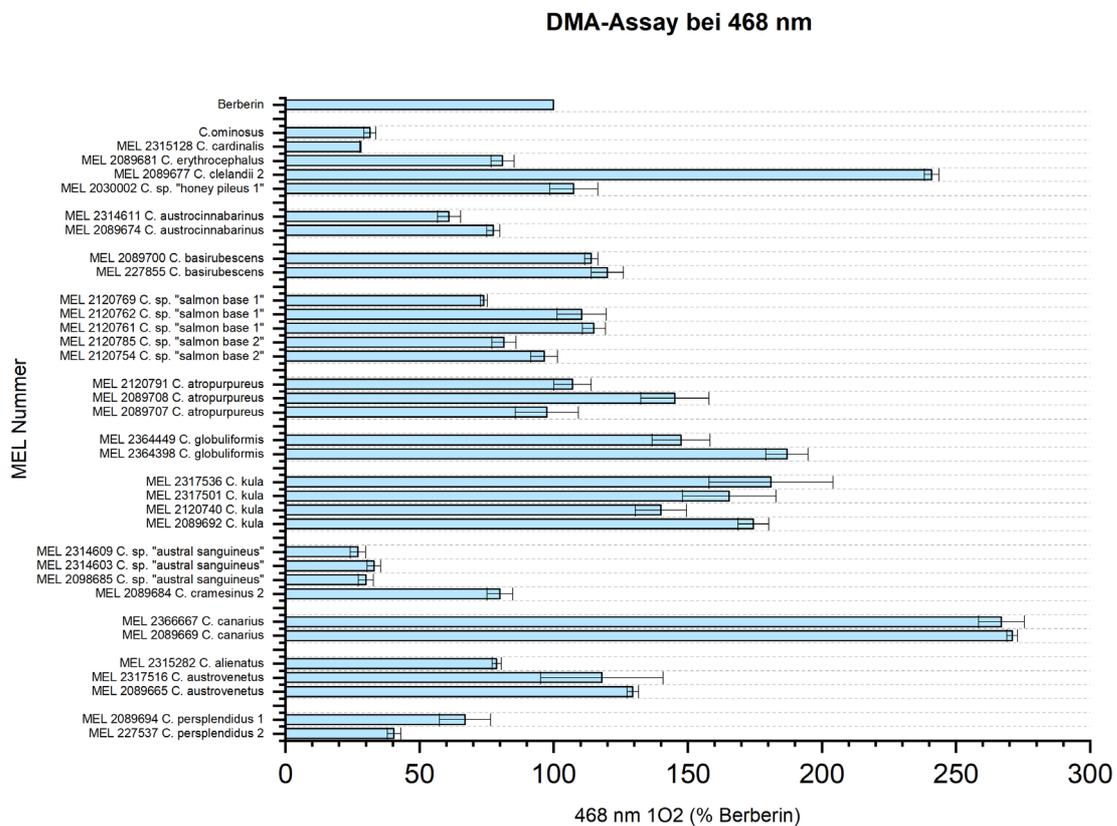


Abbildung 22. Auswertung DMA-Assay bei 468 nm bezogen auf die Referenzsubstanz Berberin

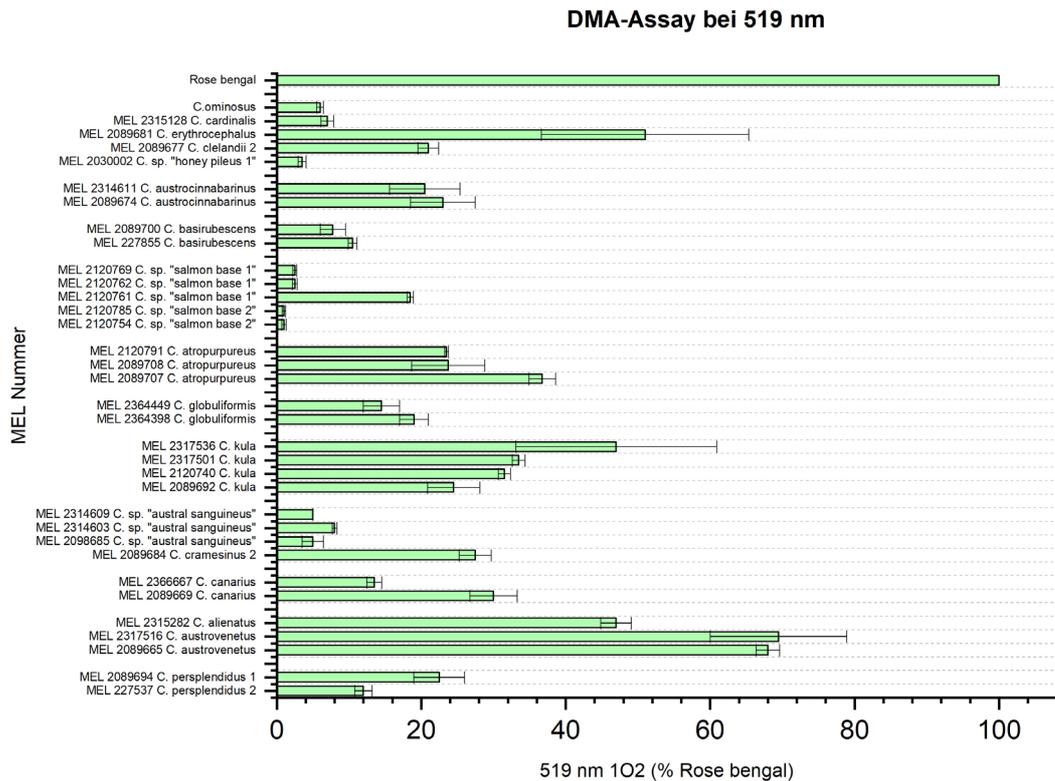


Abbildung 23. Auswertung DMA-Assay bei 519 nm bezogen auf die Referenzsubstanz Rose bengal

Betrachtet man die produzierte Menge an Singulett-Sauerstoff im DMA-Assay für die untersuchten Pilzextrakte, kommt man zu dem Schluss, dass die Pilze aus Australien eine hohe Photoaktivität aufweisen. Kennzeichnend dafür ist, die höhere Quantität an Singulett-Sauerstoff im Verhältnis zur Referenzsubstanz Berberin, welche bei einer Messung im blauen Licht für die Mehrheit der Pilze erzielt wurde (Abbildung 22). Bei Untersuchungen im grünen Lichtbereich erkennt man zwar eine Unterlegenheit der Pilzextrakte gegenüber der Referenzsubstanz Rose bengal in Bezug auf die gemessene Singulett-Sauerstoff-Produktion (Abbildung 23), dennoch entspricht dieses Ergebnis einer nennenswerten Photoaktivität. Dies ist auf den Bezug der DMA-Assays-Ergebnisse auf die jeweilige Referenzsubstanz zurückzuführen [51] und somit auf die höhere Photoaktivität von Rose bengal $\varphi_{\Delta} = 0.86$ [60] im Vergleich zu Berberin $\varphi_{\Delta} = 0.04$ [11, 51].

Die Gegenüberstellung der aus dem DMA-Assay gewonnenen Daten analog der Gruppenbildung aus Abschnitt 3.4 unterstreicht die Zusammengehörigkeit der Pilze in

den geformten Gruppen durch entsprechende Korrelation der gemessenen Singulett-Sauerstoffproduktion im DMA-Assay. Als Beispiel dient hier die vergleichbare Menge an Singulett-Sauerstoff von ca. 120%, welche für beide Pilze von *C. basirubescens* (MEL 227855 und MEL 2089700) im DMA-Assay erreicht wurde. Die geringfügig auftretenden Variationen werden auf abiotische Faktoren wie zum Beispiel Licht, Temperatur oder Standort zurückgeführt.

Hieraus ergibt sich jedoch auch die Möglichkeit, die in Abschnitt 3.3.1 aufgezeigten Limitierungen der Gruppenbildung auf ihre Richtigkeit zu überprüfen. Sowohl im blauen als auch grünen Belichtungsbereich zeigt sich eine klare Diskrepanz in der Singulett-Sauerstoff-Bildung zwischen den drei Vertretern von *C.sp. „austral sanguineus“* (MEL 2314609, MEL 2314603 und MEL 2089685) und dem Pilz *C. cramesinus 2* (MEL 2089684). Während alle drei Pilze von *C.sp. „austral sanguineus“* eine Singulett-Sauerstoff-Produktion unter 40 % aufweisen, liegt dieser Wert bei *C. cramesinus 2* deutlich höher bei ca. 80% relativ zu Berberin als Referenzsubstanz. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Beleg für die Differenzierung dieser Pilze in zwei verschiedene Spezies.

Beachtenswert ist außerdem die Empfindlichkeit des DMA-Assays in Bezug auf Unterschiede in den „minor compounds“ der Pilzextrakte. Wie im Abschnitt 3.4 thematisiert differenzieren sich die Vertreter von *C.sp. austrovenetus* (MEL 2317516, MEL 2089665) und *C. alienatus* (MEL 2315282) lediglich in den als Spuren vorkommenden Inhaltsstoffen. Diese Variation resultiert jedoch in einem deutlichen Unterschied in der Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu produzieren. Während *C. alienatus* in Relation zur Ausbeute an Singulett-Sauerstoff von Rose bengal bei ca. 48% im grünen Licht stagniert, erreichen die beiden Vertreter von *C. austrovenetus* ca. 68%.

Zusammenfassend ist hier zu sagen, dass die australischen Vertreter der *Cortinari* der Subgattung *Dermocybe* vielversprechende Photoaktivitätsdaten zeigen und potenzielle Photosensitizer in der aPDT darstellen könnten.

3.9 Isolierung von Fallacinol aus *Cortinarius cinnabarinus*

Die Extraktion des Pilzes *Cortinarius cinnabarinus* erfolgte in einem dreistufigen Prozess, um entsprechend der elutropen Reihe die unterschiedlichen Polaritäten des Lösungsmittels auszunutzen. Dabei wurde zuerst mit Petrolether extrahiert, was zu einem gelb gefärbten Extrakt führte. Weiters ergab der Dichlormethanextrakt eine Orangefärbung und die methanolische Extraktion resultierte in einer intensiven Rotfärbung (siehe Abbildung 24).

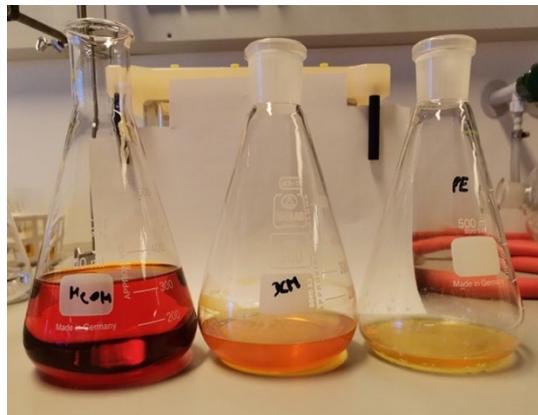


Abbildung 24. Färbung der unterschiedlichen Extrakte aus *C. cinnabarinus*

Die zu isolierende Substanz Fallacinol wurde aufgrund der mittleren Elutionskraft des Lösungsmittels in der Dichlormethanphase erwartet. Den weiteren Isolierungsschritten vorangehend wurde die Extraktausbeute für den Dichlormethanextrakt ($m = 288,2 \text{ mg}$; $\eta = 1,31\%$) bestimmt. Im Anschluss an die Flüssig-Flüssig-Extraktion im Scheidetrichter entsprechend Abschnitt 4.8 wurde anhand einer HPLC-DAD-MS-Analyse das Massespektrum der isolierten Verbindung aus *C. cinnabarinus* aufgezeichnet (siehe Abbildung 25), welches sich durch einen Massepeak von $m/z = 299,26$ ($[M-H]^-$) auszeichnet und dem der Referenzsubstanz Fallacinol aus früheren Analysen des Instituts entspricht (siehe Abbildung 26).

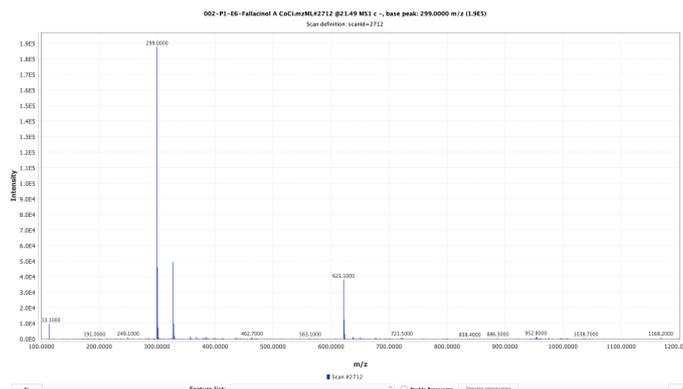


Abbildung 25. Massepeak von Fallacinol aus dem Pilz *C. cinnabarinus*

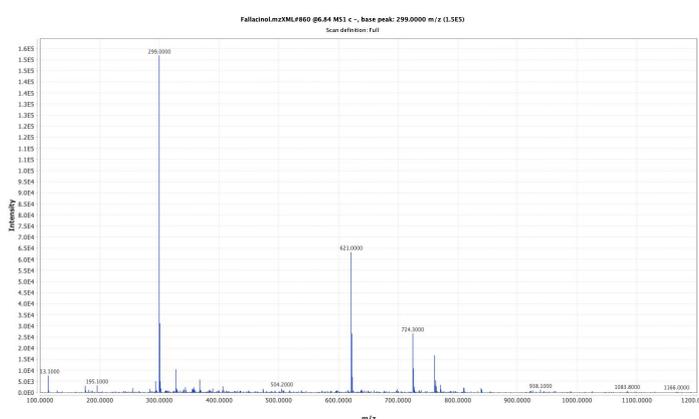


Abbildung 26. Massepeak der Referenzsubstanz Fallacinol

Außerdem erfolgte die chemische Charakterisierung der isolierten Reinsubstanz mittels Vergleich des UV-VIS-Spektrums mit der Literatur [34], in welcher für Fallacinol Absorptionsmaxima von λ_{max} (EtOH) = 221, 261, 289 und 421 nm angegeben werden. Diese können auch für die isolierte Substanz bestätigt werden (siehe Abbildung 27). Weiters wurde ein $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum der Verbindung aufgenommen (siehe Abbildung 28) und konnte mit den Literaturdaten verglichen werden [34]. Das aufgenommene IR-Spektrum von Fallacinol findet man im Anhang unter 6.2. Zum Schluss wurde ein Schmelzpunkt von 236°C für Fallacinol bestimmt, welcher innerhalb des in der Literatur angegeben Schmelzbereiches von $236\text{-}237^\circ\text{C}$ liegt [12].

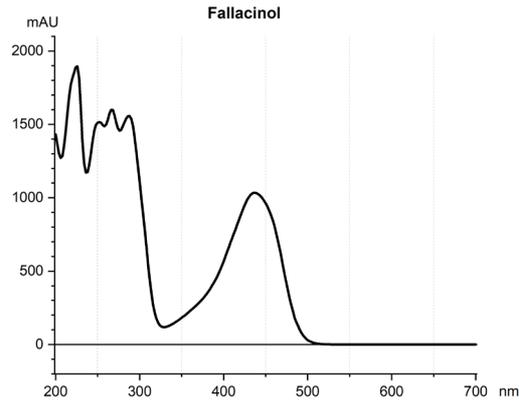


Abbildung 27. UV-VIS-Spektrum der isolierten Reinsubstanz

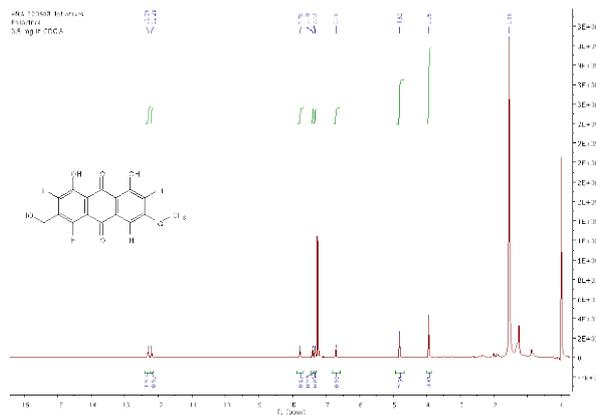


Abbildung 28. ¹H-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung

Ergänzend wurde noch der Schmelzpunkt der in Form von gelben Nadeln vorliegenden Verbindung bestimmt, welcher bei 236° Celsius lag. In der Literatur wird ein Wert im Schmelzbereich von 236-237° Celsius für Fallacinol angegeben [12]. Abschließend wurde die Ausbeute an Rohfallacinol ermittelt (140,39 mg; 0,64%). Anhand dieser chemischen Charakterisierung konnte die Isolierung von Fallacinol bestätigt werden entsprechend der Strukturformel in Abbildung 29.

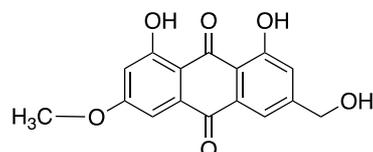


Abbildung 29. Strukturformel von Fallacinol

Das Ergebnis des DMA-Assays zeigt eine hohe Photoaktivität des DCM-Extrakts sowohl im blauen Licht (468 nm) mit 247,5 % im Verhältnis zur Referenzsubstanz Berberin als auch im grünen Licht (519 nm) mit 53,5 % im Vergleich zur Referenz Rose bengal. Für die Rohfallacinolphase ergab sich ebenfalls eine hohe Photoaktivität mit 182 % bei einer Messung im blauen Licht und 106,5 % bei einer Messung im grünen Licht. Möglicherweise ist die erniedrigte Photoaktivität des Rohfallacins gegenüber dem DCM-Extrakt auf noch vorhandene Verunreinigungen zurückzuführen.

3.10 Feature-based molecular networking

Mit dem computerunterstützten Tool des Feature-based molecular networking konnte ein Netzwerk bestehend aus den zu untersuchenden australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* zusammen mit Vertretern der nördlichen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* aus einem bereits bestehenden Datensatz und dem bisher noch nicht klar einzuordnen Pilz *C. cinnabarinus* generiert werden (siehe Abbildung 30).

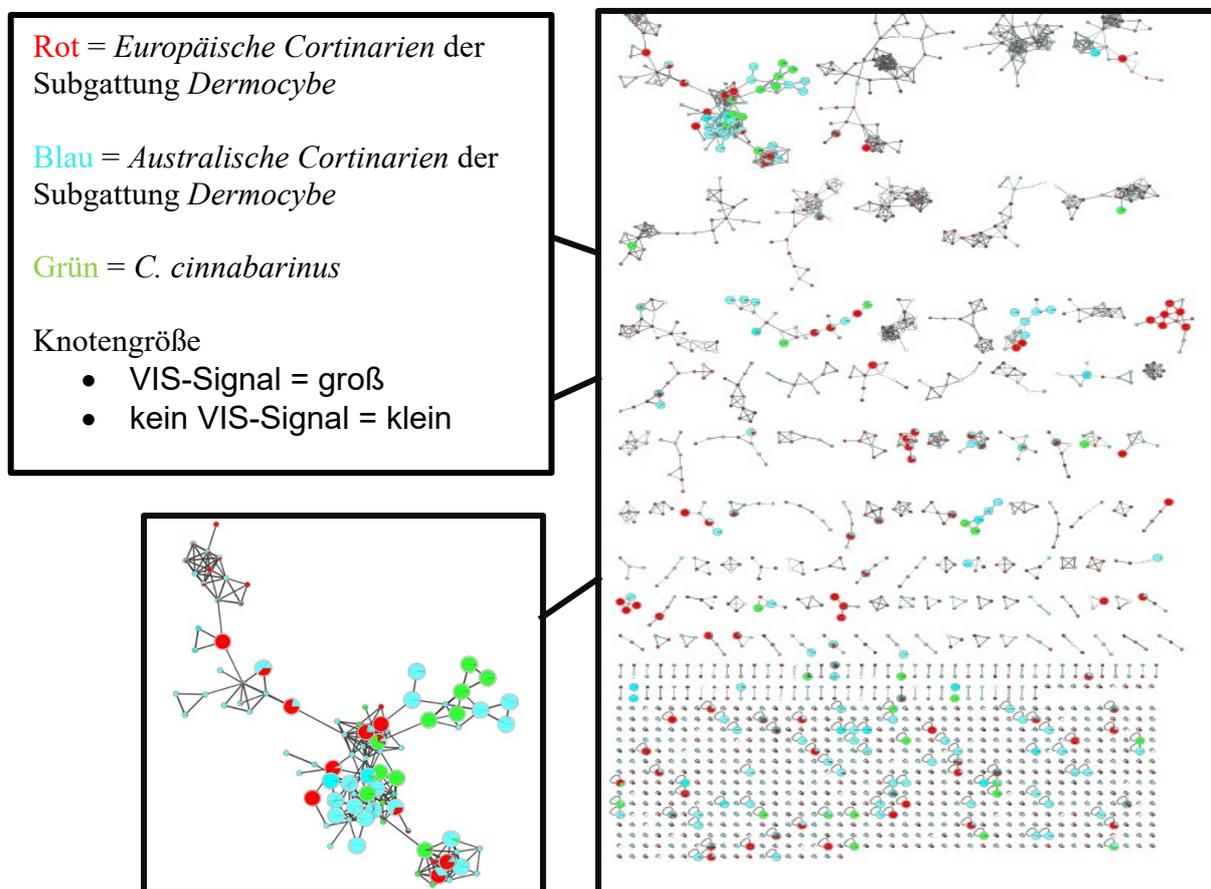


Abbildung 30. Netzwerk südlicher und nördlicher Vertreter der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe*

Eine genauere Betrachtung einzelner Cluster (siehe gezoomter Ausschnitt in Abbildung 30) bestätigt das Vorliegen spezifischer Pigmentcluster innerhalb der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe*, was anhand der rein türkis gefärbten Gruppierungen zu erkennen ist. Dies bedeutet, dass die vorkommenden Pigmente keine entsprechenden Ähnlichkeiten zu den Pigmenten in europäischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocyben* aufweisen, welche rot gefärbt sind und im Falle dieses Clusters in keiner Verbindung zu den türkisenen Knoten stehen.

Darüber hinaus wurde der Frage nach der Zugehörigkeit des Pilzes *C. cinnabarinus* nachgegangen, da dieser bisher nicht eindeutig den europäischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* zugeordnet werden konnte. Bemerkenswert ist hierbei die Clusterbildung zwischen den australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* (türkis) und *C. cinnabarinus* (grün). Diese Verbindung lässt eine gewisse Zugehörigkeit von *C. cinnabarinus* zu den australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* vermuten (siehe Abbildung 30).

Zusätzlich ermöglicht das FBMN die Photoaktivitätsdaten aus dem durchgeführten 9,10-Dimethylantracenenassay mit in das Netzwerk miteinzubringen. Dies erfolgt mittels eines farbigen Rand um den jeweiligen Knoten. Diese Daten wurde sowohl für die Messung bei 468 nm als auch bei der Messung bei 519 nm integriert, wie Abbildung 31 und Abbildung 32 zeigen.

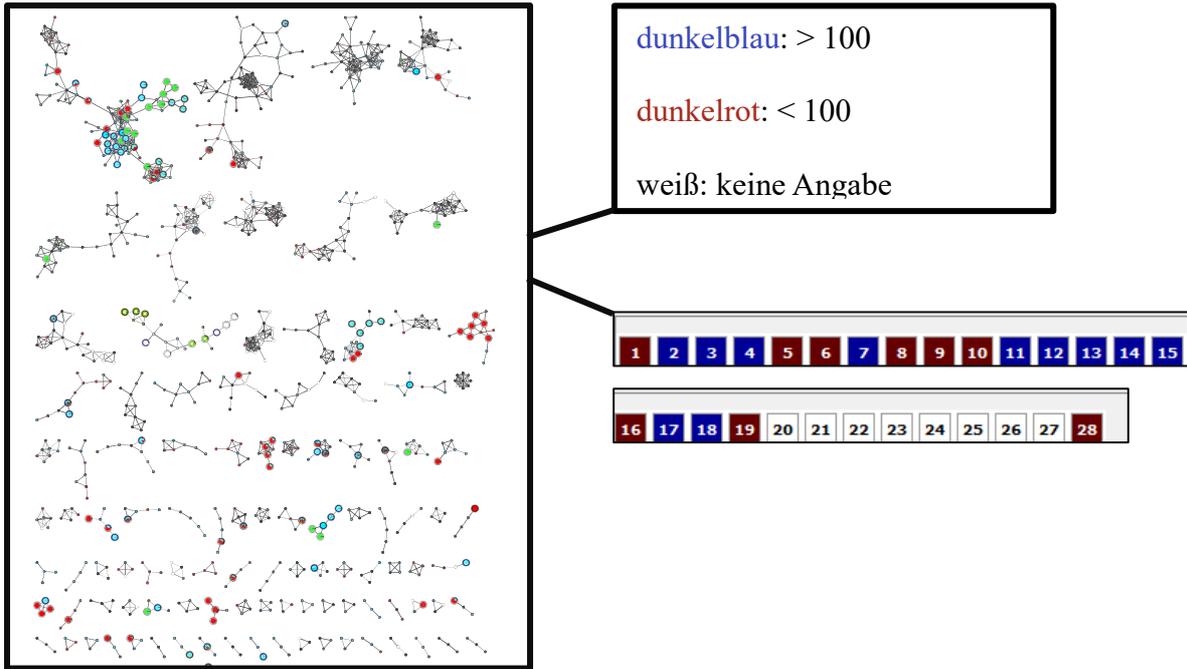


Abbildung 31. Netzwerk mit integrierten Photoaktivitätsdaten (Messung bei 468 nm)

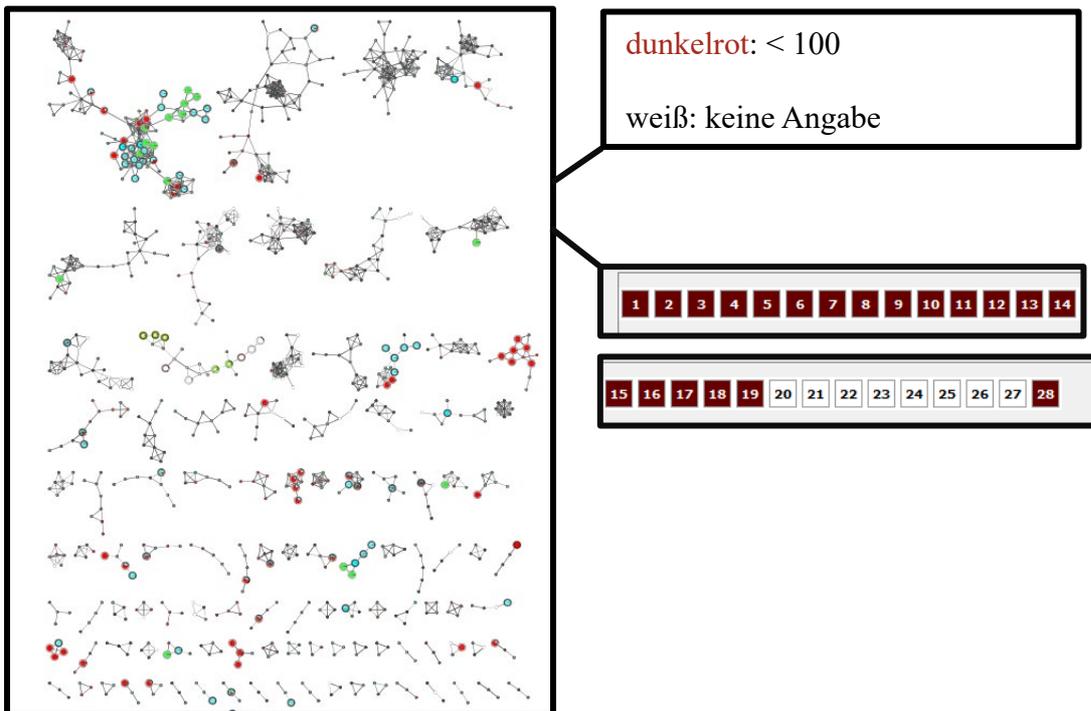


Abbildung 32. Netzwerk mit integrierten Photoaktivitätsdaten (Messung bei 519 nm)

In Bezug nehmend auf die Photoaktivität der australischen *Cortinari* der Subgattung *Dermocybe* lässt sich aus den generierten Netzwerken sehr rasch erkennen, dass die Mehrheit der australischen *Cortinari* der Subgattung *Dermocybe* eine hohe Aktivität

aufzeigen sowohl in Bezug auf die Referenzsubstanz Berberin (Werte > 100) im blauen Licht als auch auf die Referenzsubstanz Rose bengal (Werte < 100) im grünen Licht.

Für weiterführende Untersuchungen der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* liefert das FBMN einen umfassenden Überblick über relevante Pigmentcluster gekoppelt mit der Information über die photoaktiven Eigenschaften des jeweiligen Pilzes.

4 Experimenteller Teil

4.1 Materialien, Geräte und Methoden

4.1.1 Lösungsmittel

Es wurde sowohl mit Ethanol gradient grade for liquid chromatography als auch Methanol HPLC grade von Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) gearbeitet. Alle weiteren Lösungsmittel die in dieser Arbeit verwendet wurden stammen von VWR Chemicals (Wien, Österreich) und wurden gegebenenfalls vor Verwendung destilliert. Das verwendete doppelt ionisierte Wasser mit einer Leitfähigkeit von 0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$ wurde mit dem Reinstwassersystem Arium® 611 UV der Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, Deutschland) hergestellt.

4.1.2 Chemikalien

Im Zuge der durchgeführten Experimente wurden 9,10-Dimethylantracen (Produktnr. D0252) sowie Rose bengal (Produktnr. R0041) von TCI Deutschland GmbH (Eschborn, Deutschland) verwendet. Außerdem kamen L-(+)-Ascorbinsäure (Produktnr. 50074.0100) und Natriumhydrogenphosphatmonohydrat von Merck (Darmstadt, Deutschland) zur Anwendung. Das verwendete Berberin stammt von der Österreichischen Heilmittelstelle (Wien, Österreich). Zudem wurde 99-100%-ige Ameisensäure von VWR Chemicals (Wien, Österreich) eingesetzt. Darüber hinaus wurde Perinaphtenon (Produktnr. P10801-1G) der Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland) verwendet.

4.1.3 Herkunft der Pilzkollektion

Das zu untersuchende Biomaterial stammt aus dem National Herbarium of Victoria und wurde von Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Ursula Peintner (Institut für Mikrobiologie, Universität Innsbruck) zur Verfügung gestellt. Das erhaltene Biomaterial umfasst 33, in getrockneter Form vorliegende, *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* aus

Australien. Genauere Details zur Sendung können der unten abgebildeten Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 9. Auflistung des verwendeten Biomaterials

MEL Nummer	Pilz	Aktueller Name laut Mycobank
MEL 227537	<i>Dermocybe splendida</i>	<i>Cortinarius persplendidus</i>
MEL 227855	<i>Dermocybe basirubescens</i>	<i>Cortinarius basirubescens</i>
MEL 2030002	<i>Dermocybe sp. B.</i>	<i>C. sp. „honey pileus 1“</i>
MEL 2089665	<i>Dermocybe austroveneta</i>	<i>Cortinarius austrovenetus</i>
MEL 2089669	<i>Dermocybe canaria</i>	<i>Cortinarius canarius</i>
MEL 2089674	<i>Dermocybe cinnabarina</i>	<i>Cortinarius cinnabarinus</i>
MEL 2089677	<i>Dermocybe clelandii</i>	<i>Cortinarius clelandii</i>
MEL 2089681	<i>Dermocybe erythrocephala</i>	<i>Cortinarius erythrocephalus</i>
MEL 2089684	<i>Dermocybe sanguinea</i>	<i>Cortinarius sanguineus</i>
MEL 2089685	<i>Dermocybe sanguinea</i>	<i>Cortinarius sanguineus</i>
MEL 2089692	<i>Dermocybe kula</i>	<i>Cortinarius kula</i>
MEL 2089694	<i>Dermocybe splendida</i>	<i>Cortinarius persplendidus</i>
MEL 2089700	<i>Dermocybe umbonata</i>	<i>Dermocybe umbonata</i>
MEL 2089707	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2089708	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2120740	<i>Dermocybe kula</i>	<i>Cortinarius kula</i>
MEL 2120754	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2120761	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2120762	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2120769	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2120785	<i>Dermocybe</i>	<i>Cortinarius subgen. Dermocybe</i>
MEL 2120791	<i>Dermocybe atropurpurea</i>	<i>Cortinarius atropurpureus</i>
MEL 2314603	<i>Dermocybe austrosanguinea</i>	n.A.
MEL 2314609	<i>Dermocybe austrosanguinea</i>	n.A.
MEL 2314611	<i>Cortinarius austrocinnabarinus</i>	n.A.
MEL 2315128	<i>Dermocybe cardinalis</i>	<i>Cortinarius cardinalis</i>
MEL 2315282	<i>Dermocybe austroveneta</i>	<i>Cortinarius austrovenetus</i>
MEL 2317501	<i>Dermocybe kula</i>	<i>Cortinarius kula</i>
MEL 2317516	<i>Dermocybe austroveneta</i>	<i>Cortinarius austrovenetus</i>
MEL 2317536	<i>Dermocybe kula</i>	<i>Cortinarius kula</i>
MEL 2364398	<i>Cortinarius</i>	<i>Cortinarius</i>
MEL 2364449	<i>Cortinarius</i>	<i>Cortinarius</i>
MEL 2366667	<i>Dermocybe canaria</i>	<i>Cortinarius canarius</i>

Für die Isolierung von Fallacinal aus *Cortinarius cinnabarinus* wurden als Ausgangsmaterial verschiedene Pilzkollektionen gepoolt, welche man der Tabelle 10 entnehmen kann.

Tabelle 10. Ausgangsmaterial von *C. cinnabarinus*

Fundort	Sammelzeitpunkt	Kollektion	Genbank Nummer
Dullaberg	1980		*
Baseo del Lago di Campotosto	2019		*
Monte penne	2019	IBF2019/0142	*
Campotosto, Pratozocchiano	2019		*
Compo Felice, AQ	2019	IBF20190153	OM638753
Biebental-Königsberg		IBF2017/400	*
Hahen	2019	IBF2019/14	*

*Von den mit Stern gekennzeichneten Pilzkollektionen wurde jeweils eine entsprechende Menge einbehalten, um eine Gensequenzierung durchführen zu können.

4.1.4 Geräte

Das getrocknete Pilzmaterial wurde anhand von Reibschale und Pistill aus Keramik zerkleinert und nachfolgend mit einer Analysenwaage der Sartorius weighing technology GmbH (Göttingen, Deutschland) in Zentrifugenröhrchen (V = 25 ml) der Firma VWR International GmbH (Wien, Österreich) eingewogen. Für sämtliche Pipettiervorgänge benutzte man Kolbenhubpipetten der Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) oder STARLAB International GmbH (Hamburg, Deutschland) sowie die dazu passenden Spitzen. Zur Durchmischung der Proben kam der Vortex-Mischer Vortex-Genie 2, K-550-GE der Firma Scientific Industries, Inc (Bohemia, NY, USA) zum Einsatz. Im Extraktionsprozess fand das Ultraschallbad Sonorex RK53 der Firma Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland) Anwendung. Im weiteren Verlauf wurde die Laborfuge 400 function line der Firma VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland) zur Zentrifugation genutzt. Für die Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bediente man sich einer HPLC/UFLC XR

Anlage der Shimadzu USA Manufacturing Inc (Canby, OR, USA). Die Ausstattung dieses Analysengeräts inkludiert eine binäre Pumpeinheit, Vialsampler, Säulenofen, Säulenthermostat und einem Diodenarray-Detektor. In diesem Kontext wurde die Säule Synergi 4u MAX- RP 80A mit den Maßen 150 x 4,60 mm und einer Partikelgröße von 4 μm der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) verwendet. Ferner konnten massenspektroskopische Untersuchungen mit dem modularen System Agilent Technologies 1260 Infinity II der Firma Shimadzu USA Manufacturing Inc (Canby, OR, USA) durchgeführt werden, welches eine quaternäre Pumpe, Vialsampler, Säulenthermostat, Diodenarray-Detektor und ein Esquire 3000 Plus Ionenfallen-Massenspektrometer mit Elektronensprayionisation umfasst. Dieses Gerät wurde von der Firma Bruker Daltonics (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zudem wurde für den Lyophilisierungsvorgang das Gerät BenchTop Pro with Omnitronics (Graz, Österreich) von Bartelt genutzt.

Unabhängig davon wurde für die Ausführung des beschriebenen DMA- Assays ein entsprechendes Belichtungssetup benötigt. Dieses setzt sich aus dem Netzteil Agilent E3611A Dc Power supply (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) sowie einem LED-Panel der Universität Leiden (Leiden, Niederlande) zusammen [5]. Hierbei wurden LED-Panels mit $\lambda = 468 \pm 27 \text{ nm}$ sowie $\lambda = 519 \pm 33 \text{ nm}$ für die Analyse herangezogen. Im Zusammenhang mit den Absorptionmessungen sowie der Bestimmung der optischen Dichte kam das Mikrotiterplatten- Lesegerät Tecan Spark $\text{\textcircled{R}}$ 10M (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) zur Anwendung. Zudem setzte man die Reagenzreservoirs von StarTub Reagent Reservoirs 25 ml PS der Firma STARLAB (Hamburg, Deutschland) ein. Zur Einstellung des pH-Wertes der Ascorbinsäure-Stammlösung mittels 0.1N Natronlauge diente das pH-Meter Seven Multi der Firma Mettler Toledo GmbH (Wien, Österreich).

Für die Aufreinigung der Extrakte mittels Festphasenextraktion fanden SPE C Strata $\text{\textcircled{R}}$ C18 E (55 μm , 70 \AA , 50 mg/ 1ml) Säulen sowie das entsprechende Modul zur Festphasenextraktion der Firma Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland) Anwendung.

Im Zuge des Feature-based molecular networking wurde das UHPLC-HRMS² System Orbitrap Exploris 120 mit Vanquish LC ausgestattet mit Pumpe, Autosampler,

Säulenofen und variablen Wellenlängendetektor der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) zur massenspektroskopischen Analyse eingesetzt.

4.2 Herstellung der Extrakte

Bei der Extraktion des Biomaterials wurde eine parallele Vorgehensweise mit jeweils acht verschiedenen Pilzen gewählt. Die ersten Schritte umfassten hierbei die Zerkleinerung des getrockneten Pilzmaterials mit Reibschale und Pistill als auch die nachfolgende Einwaage (250 mg) in ein zuvor beschriftetes Zentrifugenröhrchen. In Folge wurden die Proben mit Methanol ($V = 5 \text{ ml}$) versetzt. Es folgte die Durchmischung der Proben mittels Vortex-Mischer für ca. 15-20 Sekunden, die Behandlung im Ultraschallbad für zehn Minuten sowie eine Zentrifugation ebenfalls für zehn Minuten mit einer relativen Zentrifugalkraft von 2500 RCF. Der so erhaltene Überstand wurde anhand einer Kolbenhubpipette in ein zuvor beschriftetes und tariertes Rollrandglas überführt und das Extraktionsmittel durch Luftstrom abgedampft. Bei diesem Vorgang wurden die Proben mit Alufolie vor Lichteinstrahlung geschützt. Der gesamte Extraktionsprozess wurde wie oben beschrieben noch zweimal wiederholt. Die vereinigten Überstände wurden dann über Nacht unter Luftstrom bis zur Trockne eingedampft. Abschließend wurde die Ausbeute durch Wägen der Rollrandgläser ermittelt. Um sicherzustellen, dass die Extrakte frei von Lösungsmittelrückständen sind, wurden diese im Anschluss lyophilisiert und wiederholt gewogen. Dieser Vorgang wurde bei $p = 56 \text{ } \mu\text{bar}$ und ca. $T = -80 \text{ } ^\circ\text{C}$ über 24 Stunden vorgenommen. Bis zur Weiterverwendung der hergestellten Extrakte erfolgte die Lagerung in einer lichtgeschützten Box.

4.3 Analyse der Extrakte mittels HPLC-DAD und HPLC-DAD-ESI-MS

Für die Analyse mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde eine kleine Menge ($m = 1 \text{ mg}$) des jeweiligen Extraktes in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Gefäßgröße = 1,5 ml) eingewogen und mit Dimethylsulfoxid ($c = 1 \text{ mg/ ml}$) versetzt. Zur Beschleunigung des Lösevorgangs setzte man für 15-20 Sekunden den Vortex-Mischer ein. Im Folgenden wurden die erhaltenen Lösungen in zuvor beschriftete, braune HPLC-Vials durch Watte filtriert. Die Bedingungen für die

Auftrennung der vorbereiteten Proben mittels HPLC- DAD waren eine Säulenofen-Temperatur von 40°C sowie eine Flussrate von 1 ml/min. Das verwendete Laufmittelsystem weist im Laufe der 15-minütigen Methode einen gradientischen Verlauf auf. Dieser ist gekennzeichnet durch eine Konzentrationsabnahme des Eluenten A bestehend aus Wasser mit 0,1% Ameisensäure sowie einer Konzentrationszunahme des Eluenten B bestehend aus Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure. Aus der Tabelle 11 kann die Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase über die Zeit entnommen werden.

Tabelle 11. Gradientisches HPLC-Laufmittelsystem

Time [min]	Eluent A: [H₂O + 0,1 % FA]	Eluent B: [ACN + 0,1% FA]
1	Start	Start
3	50	50
5	10	90
7	1	99
11	1	99
11,01	90	10
15	Stop	Stop

Zur Charakterisierung von Sekundärmetaboliten wurde neben einer HPLC- DAD- Analyse auch eine HPLC-DAD-MS-Analyse durchgeführt, welche mit Unterstützung von Mag. pharm. Johannes Fiala umgesetzt werden konnte. Die Elektronenspray-Ionisierung wurde an dieser Stelle sowohl im Positiv- Modus als auch im Negativ-Modus angewandt. Die gerätespezifischen Einstellungen können der Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12. Parameter für massenspektroskopische Analyse

Parameter	
Drying Gas Flow (l/min)	12.0
Nebulizer Pressure [61]	1294
Drying Gas Temperature (°C)	320
Capillary Voltage (V)	4500 (Positiv- und Negativ-Modus)
Corona Current (µA)	N/A
Charging Voltage (V)	N/A

4.4 Lyophilisation

Zur Entfernung von verbliebenen Lösungsmittels Spuren in den getrockneten Pilzextrakten wurden diese gefriergetrocknet. Dabei wurden Bedingungen von ca. $p = 56 \mu\text{bar}$ und eine Temperatur von $T = -80 \text{ }^\circ\text{C}$ gewählt und der Vorgang über $t = 24$ Stunden durchgeführt.

4.5 Festphasenextraktion der Pilzextrakte

Die Pilzextrakte wurden an der Universität Innsbruck, am Institut für Pharmakognosie (Innsbruck, Österreich) in einer massenspektroskopischen Analyse mittels UHPLC-DAD-HRMS² untersucht. Im Vorfeld dieser Analyse erfolgte eine Vorbereitung der Pilzextrakte mittels Festphasenextraktion. Dazu stellte man eine MeOH-H₂O-Mischung ($V = 200 \text{ ml}$; 9/1 v/v %) her. Im ersten Schritt erfolgte die Aktivierung der C18-Säulen mittels Methanol HPLC grade ($V > 3 \text{ ml}$). Hierbei wurde das Modul für die Festphasenextraktion an die Vakuumpumpe angeschlossen. Dem folgte das Equilibrieren mit dem bereitgestellten MeOH-H₂O-Gemisch ($V = 3 \text{ ml}$). Für den Ladevorgang der Proben wurde eine entsprechende Menge der Extrakte ($m = 10\text{-}15 \text{ mg}$) mit dem vorbereiteten MeOH-H₂O Gemisch ($= 1 \text{ ml}$) versetzt, das Lösen der Extrakte im Ultraschallbad beschleunigt und die Proben auf die Säulen aufgebracht. Abschließend erfolgte die Elution ebenfalls mit der oben beschriebenen MeOH-H₂O-Mischung ($V = 5 \text{ ml}$).

4.6 Durchführung des Feature-based molecular networking

Für die Vorprozessierung der Rohdaten aus der UHPLC-HRMS²-Analyse wurden im Programm MZmine entsprechende Parameter laut Tabelle 13 und Tabelle 14 gewählt:

Tabelle 13. Parameter für die Vorprozessierung in MZmine

Schritte	Parameter	Werte
		Negative Ionisation
1	Mass detection -> Noise level (same masses list):	
	MS1	1.5E5
	MS2	0
2	Peak detection -> ADAP chromatogram builder	
	Min group size in # of scans	5
	Group intensity threshold	1.5E5
	Min highest intensity	1.5E5
	m/z tolerance [ppm]	8 ppm
3	Peak detection -> chromatogram deconvolution Wavelets (ADAP)	
	S/N threshold	80
	S/N estimator:	intensity window SN
	m/z center calculation	Auto
	Min feature height	1.5E5
	Coefficient area threshold	100
	Peak duration range [min]	0.01...0.80
	RT wavelet range [min]	0.01 – 0.04
	m/z range for MS2 scan pairing [Da]	0.025
	RT range for MS2 scan pairing [min]	0.05
4	Isotopic peaks grouper	
	m/z tolerance [ppm]	0.005 m/z or 8.0 ppm
	Retention time tolerance absolute [min]	0.05 min
	Maximum charge	1
	Representative isotope	Most intense

Tabelle 14. Fortsetzung der Parameter für MZmine Vorprozessierung

5	Alignment -> JOIN	
	m/z tolerance [ppm]	8
	Weight for m/z [Da]	70
	Retention time tolerance absolute [min]	0.05
	Weight for RT	30
	Require same charge state	<input checked="" type="checkbox"/> -> not necessary
	Compare isotope pattern ->	8 ppm 1E4 → 1E5 (intensity established based on the third isotope!) Min score 80% → not necessary
6	Gap filling -> Peak finder (NI)	
	Intensity tolerance	20%
	m/z tolerance [ppm]	0.005 m/z or 8.0 ppm
	Retention time tolerance (min)	0.05
	RT correction	False
7	Filtering -> Duplicate peak filter: NEW AVERAGE Filtering → Time	
	m/z tolerance [ppm]	0.005 m/z or 8.0 ppm
	Retention time tolerance absolute [min]	0.05
8a	Filtering -> peak list rows filter ->	
	Retention time	0.5-8.0 min
	Keep only peaks with MS2 scan [54]	<input checked="" type="checkbox"/>
	Reset the peak number ID	<input checked="" type="checkbox"/>
8b	Identification -> Custom DB, adduct search, complex search (also on Na+, K+, NH4+)	Datenbank AQ_FH
	Retention time tolerance absolute [min]	
	m/z tolerance [ppm]	0.005 m/z or 8.0 ppm
	Max complex/adduct peak height	500%
9	Export to .csv	
9	Export to GNPS	

Auf der Plattform GNPS wurden folgende Werte für die Generierung des Netzwerkes definiert (siehe Tabelle 15):

Tabelle 15. Parameter für die Generierung eines Netzwerkes auf der GNPS-Website

10	GNPS		
	Precursor Ion Mass tolerance		0.02
	Fragment Ion Mass tolerance		0.02
	Run MS Cluster?		No
	Minimum Cluster size		1
	Min pairs Cos		0.6
	Min matched fragment ions		4
	Network TopK		10
	Max connected component size (Beta)		100
	Advanced filtering options	Filter below Std Dev	0.0
		Filter Precursor Window	Filter
		Filter peaks in 500 Da Window	Filter
		Filter Spectra from G6 as Blanks Before Networking	Filter

4.7 9,10-Dimethylantracen-Assay

Zur Ausführung des 9,10-Dimethylantracen-Assays war die Herstellung zweier Stocklösungen erforderlich. Die Einwaage von DMA ($m = 14,4 \text{ mg}$, $\eta = 1,40 \text{ mmol}$) sowie das Auffüllen mit Ethanol auf die Markierung des Maßkolben ($V = 50 \text{ ml}$) ergab eine ethanolische DMA-Lösung. Der Lösevorgang wurde unter zur Hilfenahme des Ultraschallbads beschleunigt. Zudem wurde eine L- Ascorbinsäurelösung vorbereitet. Dazu wurde L-(+)-Ascorbinsäure ($m = 880 \text{ mg}$, $\eta = 0,25 \text{ mol}$) mit doppelt ionisiertem Wasser mit einer Leitfähigkeit von $0,055 \text{ } \mu\text{S/cm}$ ($V = 20 \text{ ml}$) ergänzt und mittels pH- Meter auf einen pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt wurde. Diese Anpassung wurde durch tropfenweise Zugabe von Natronlauge ($n = 0.1 \text{ N}$) erzielt. Anschließend konnte im Maßkolben auf eine Konzentration von $c = 0,1 \text{ M}$ mit doppelt ionisiertem Wasser mit einer Leitfähigkeit von $0,055 \text{ } \mu\text{S/cm}$ aufgefüllt werden.

Die zu testenden Pilzextrakte wurden in braunen Eppendorf-Reaktionsgefäßen in DMSO ($c = 1 \text{ mg/ml}$) gelöst, mit dem Vortex-Mischer durchmischt und ins Ultraschallbad gegeben ($t = 5 \text{ min}$).

Außerdem wurde eine reine DMSO Lösung als Kontrolle bereitgestellt. Die Referenzsubstanzen wurden einerseits in Form einer 1%-igen (0,09/ 99,91 m/m%) Berberinlösung in DMSO ($c = 0,27 \mu\text{M}$) für Messungen bei $\lambda = 468 \text{ nm}$ (blaues Licht) und andererseits als 0,1%-ige Rose bengal Lösung in DMSO ($c = 0,01 \text{ mM}$) für die Messung bei $\lambda = 519 \text{ nm}$ (grünes Licht) gewählt.

Aus den vorbereiteten Stocklösungen wurden anschließend die Arbeitslösungen hergestellt ($V = 5 \text{ ml}$). Dabei handelte es sich zum einen um Ethanol, zweitens um eine Mischung (75/25 v/v %) aus Ethanol ($V = 3750 \mu\text{l}$) und DMA ($V = 1250 \mu\text{l}$; $\eta = 1,40 \text{ mmol}$) drittens um eine Kombination (65/25/10 v/v%) aus Ethanol ($V = 3250 \mu\text{l}$) und DMA ($V = 1250 \mu\text{l}$; $\eta = 1,40 \text{ mmol}$) sowie Ascorbinsäure ($V = 500 \mu\text{l}$) (65/25/10 v/v %) und viertens um eine Lösung (90/10 v/v %), bestehend aus Ethanol ($V = 4500 \mu\text{l}$) und Ascorbinsäure ($V = 500 \mu\text{l}$; 10 mM). Die Aufbewahrung der vorbereiteten Lösungen erfolgte im Kühlschrank bzw. unter Lichtschutz.

Für die Abwicklung des DMA-Assays wurde in einer Rotlichtkammer gearbeitet und entsprechend dem etablierten Pipettierschema aus Abbildung 33 vorgegangen. Hierbei stehen die Zahlen 1- 6 für die verschiedenen zu analysierenden Pilzextrakte, welche in der entsprechenden Reihe je von 2-9 zu je $10 \mu\text{l}$ in die Mikrotiterplatte mit 96 Wells pipettiert wurden um eine 1%-ige Probenlösung der Pilzextrakte zu testen. Im Anschluss daran wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ der DMSO-Kontrolle in Reihe B und E in die Position 10 und 11 pipettiert, sowie die entsprechende Referenzlösung zu je $10 \mu\text{l}$ in Reihe C, D, F und G in Position 10 und 11. Mit den vier Arbeitslösungen wird wie folgt vorgegangen: Jede Lösung wird mit einer 8- Wege- Pipette zu je $190 \mu\text{l}$ pipettiert. Erstens wird EtOH in Spalte 2- 3 sowie Spalte 10 B-D pipettiert, zweitens die Mischung aus EtOH und DMA in Spalte 4-5 sowie Spalte 10 E-G, drittens die Arbeitslösung aus EtOH, DMA und Ascorbinsäure in Spalte 6-7 sowie in Spalte 11 B-D und viertens die Mischung aus EtOH und Ascorbinsäure in Spalte 11 E-G. Die Wells der Reihe A und H sowie der Spalte 1 und 12 bleiben frei.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1	1	1	1	1	1	1	1	DMSO	DMSO	
C		2	2	2	2	2	2	2	2	Referenz	Referenz	
D		3	3	3	3	3	3	3	3	Referenz	Referenz	
E		4	4	4	4	4	4	4	4	DMSO	DMSO	
F		5	5	5	5	5	5	5	5	Referenz	Referenz	
G		6	6	6	6	6	6	6	6	Referenz	Referenz	
H												
		EtOH		EtOH + DMA		EtOH + DMA + Asc		EtOH +				

Abbildung 33. Pipettierschema für den DMA-Assay

Im Anschluss an die Pipettiervorgänge erfolgt die Absorptionsmessung zum Zeitpunkt Null mittels Mikrotiterplatten-Lesegerät. Hierbei wird allenfalls bei $\lambda = 377$ nm gemessen, sowie entsprechend der gewählten Belichtungswellenlänge entweder bei $\lambda = 468 \pm 27$ nm oder 519 ± 33 nm. Um eine vergleichbare Lichtdosis von $24,7$ J/cm² bei unterschiedlichen Belichtungswellenlängen zu erzielen, ergibt sich ein Belichtungsintervall für blaues Licht ($\lambda = 468$ nm) von 4 x 5 Minuten und für grünes Licht ($\lambda = 519$ nm) von 4 x 4,6 Minuten.

Nach jedem Belichtungsvorgang wurde die Messung der optischen Dichte bei der entsprechenden Wellenlänge wiederholt durchgeführt. Die Auswertung des DMA-Assays erfolgte mittels Excel.

4.8 Isolierung von Fallacinol aus *Cortinarius cinnabarinus*

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Fallacinol aus *Cortinarius cinnabarinus* wurden die im Abschnitt Herkunft der Pilzkollektion, in Tabelle 9 aufgelisteten Kollektionen verwendet. Das getrocknete Biomaterial wurde mit Reibschale und Pistill zerkleinert und die verfügbare Menge des Pilzmaterials eingewogen (22 g).

In der Reihenfolge Petrolether, Dichlormethan und Methanol wurde das jeweilige Extraktionsmittel ($V = 110 \text{ ml}$) zum zerkleinerten Biomaterial gegeben, im Ultraschallbad extrahiert ($t = 10 \text{ min}$) und mit dem Büchner-Trichter abgenutscht. Dieser Vorgang wurde pro Extraktionsmittel dreimal wiederholt und in einem separaten Gefäß gesammelt. Das verbleibende Extraktionsmittel wurde mit dem Rotationsverdampfer entfernt und die Ausbeute bestimmt. Der orange Dichlormethan-Extrakt wurde für eine Flüssig-Flüssigextraktion im Scheidetrichter ($V = 500 \text{ ml}$) in Dichlormethan wieder gelöst und im 1:1 Verhältnis gegen Wasser ausgeschüttelt, um mögliche wasserlösliche Verunreinigungen sowie Glykoside abzutrennen. Die Gegenphase wurde nochmals mit DCM gewaschen und die vereinigten DCM-Phasen eingedampft. Der Rückstand wurde in einem 1:2 Verhältnis von Methanol und Petrolether im Scheidetrichter extrahiert. Dieser Schritt diente der Abtrennung von fettigen Begleitstoffen. Die Petroletherphase wurde mit Methanol gewaschen und die vereinigten Methanolphasen im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und stellen die sogenannte Rohphase des Fallacinols dar. Durch mehrmalige Umkristallisation aus Methanol in kleinem Maßstab konnte das Fallacinol ($m = 8,6 \text{ mg}$; $\eta = 0,086\%$) gewonnen werden. Zudem wurde sowohl vom DCM-Extrakt als auch von der Rohfallacinolphase ein DMA-Assay entspr. Abschnitt 4.7 durchgeführt.

4.8.1 Chemische Charakterisierung von Fallacinol

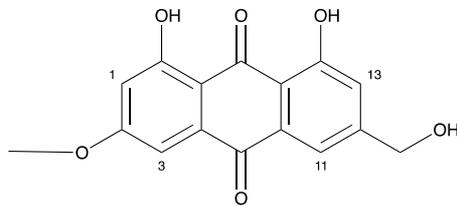


Abbildung 34. Strukturformel von Fallacinol

Fallacinol (auch Teloschistin genannt, CAS 569-05-1) wurde nach Umkristallisation in Form von gelben Kristallen gewonnen ($m = 1.2 \text{ mg}$, $\eta = 0.014 \%$). R_f (SiO₂; Aceton/Toluol 1:4) = 0,51; Smp. = 236°C; ¹H-NMR (400MHz, Chloroform-d) $\delta = 12.29$ (s, 1H, C(8)-OH), 12.20 (s, 1H, C(1)-OH), 7.78 (s, 1H, CH(5)), 7.40 (s, 1H, CH (7)), 7.33 (s, 1H, CH (4)), 6.71 (s, 1H, CH (2)), 4.82 (s, 2H, CH₂), 3.95 (s, 3H, OCH₃) ppm; MS (ESI, neg-Modus) $m/z = 299.0$ (100%, [M-H]⁻), 300.0 (20%, [M]⁻), 621.0 (40%, [2M+Na-1H]⁻), 622.0 (17.3%, [2M+Na-2H]⁻); IR $\tilde{\nu} = 3008w, 1739w, 1674w, 1629m, 1614m, 1560m, 1479m, 1443m, 1368s, 1322s, 1292s, 1208s, 1162s, 1099s, 1038s$ (cm⁻¹).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Vorfeld der Erarbeitung der vorliegenden Masterarbeit wurde das Screening von 33 australischen Vertretern der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* als Ziel definiert. Der Fokus sollte dabei erstens auf der Testung der Photoaktivität der Pilze liegen, zweitens wurde eine Einteilung der Pilze nach Pigmenttypen angestrebt und drittens sollte das Pigment Fallacinol aus *C. cinnabarinus* isoliert werden und die Zugehörigkeit dieses Pilzes zur nördlichen oder südlichen Hemisphäre geklärt werden, da dieser Pilz bisher nicht eindeutig den *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* der Nordhemisphäre zugeordnet werden konnte.

Ausgehend vom durchgeführten 9,10-Dimethylantracenassay konnte für sämtliche Vertreter der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* eine starke Photoaktivität in Relation zu den bekannten Photosensibilisatoren Berberin und Rose bengal gemessen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die aufgestellte Hypothese, dass die australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* eine unterschätzte, natürliche Ressource an photoaktiven Verbindungen darstellen, welche analog zu den nördlichen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* für eine antimikrobielle, photodynamische Therapie potenziell genutzt werden können. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die steigenden Antibiotikaresistenzen von hoher Relevanz.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Einteilung der Pilze nach Pigmenttypen. Einerseits konnte sowohl eine Klassifizierung der Pilze auf binärem Level erreicht werden als auch eine Gruppierung nach dem Trichterprinzip erzielt werden. Andererseits war es jedoch aufgrund der großen Vielfalt an Pigmenten nicht möglich im Rahmen dieser Masterarbeit alle Pigmente zu annotieren und entsprechende Pigmenttypen zu definieren. Es benötigt dafür weiterführende Analysen im Bereich der mikroskopischen und makroskopischen Merkmale der australischen *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* als auch die Einteilung der Gattung in Sektionen. Im Bereich des Clustering mittels Maschinellen Lernens birgt das semi-etablierte Verfahren Feature-based molecular networking [51] großes Potential für die Zukunft.

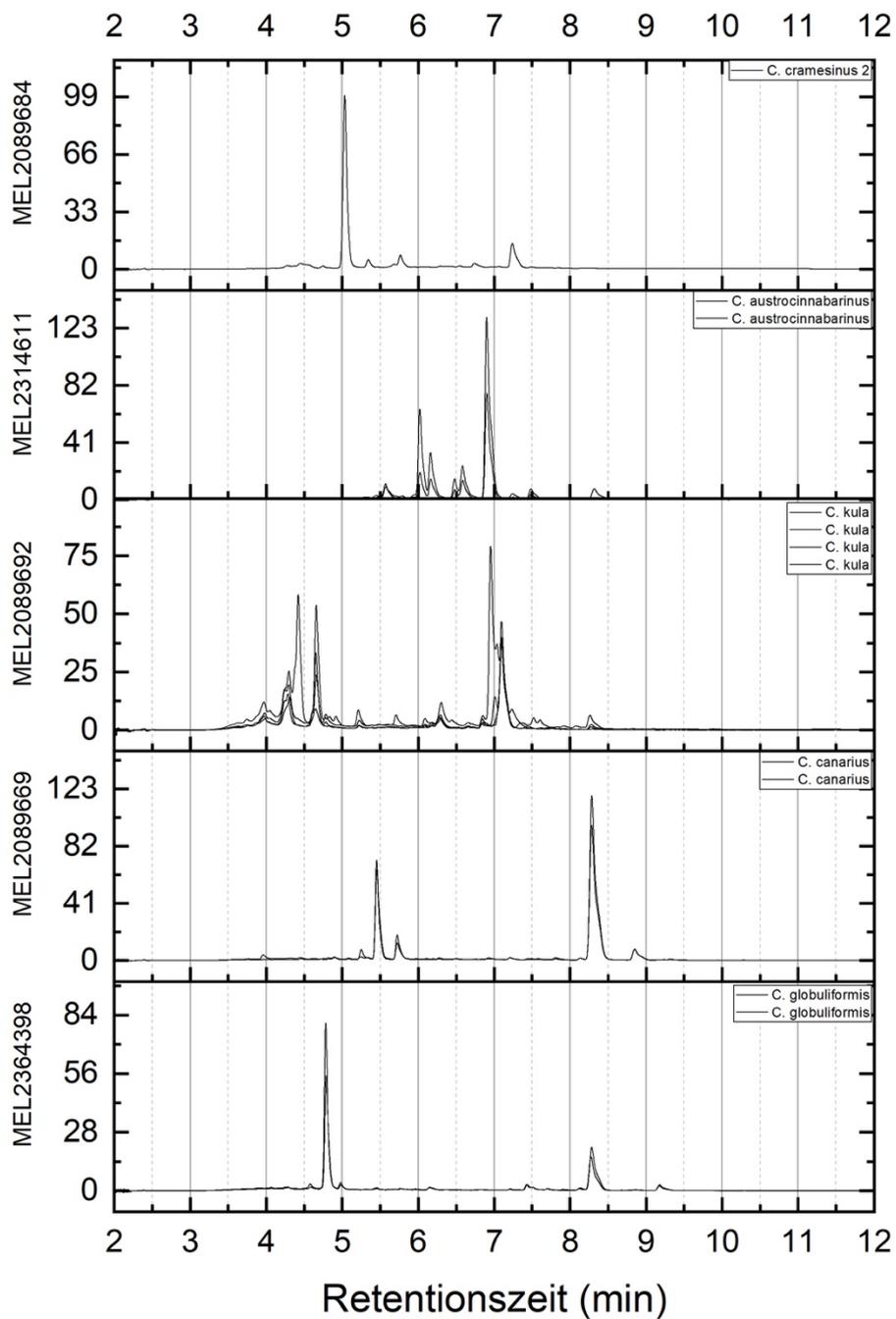
Die Isolierung des Pigments Fallacinol aus *C. cinnabarinus* stellte das dritte Ziel dar und konnte erfolgreich durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Einordnung des Pilzes

zur südlichen oder nördlichen Hemisphäre gab es im Zuge der Anwendung der computerunterstützten Methode FBMN vielversprechende Hinweise, dass jener Pilz zu den südlichen Vertretern der *Cortinarien* der Subgattung *Dermocybe* zählt.

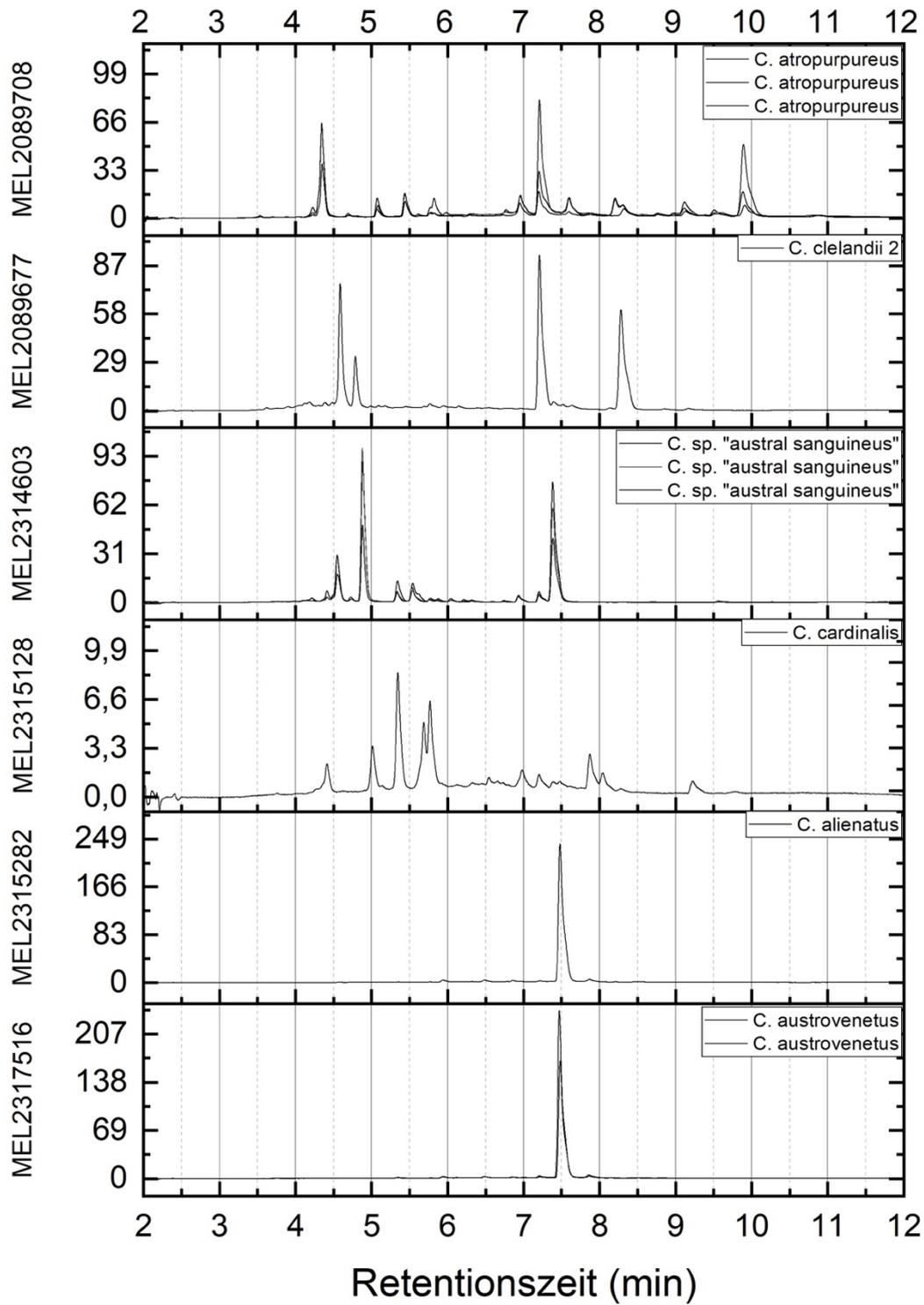
6 Anhang

6.1 Graphik der initialen Einteilung nach Farbe der Extrakte

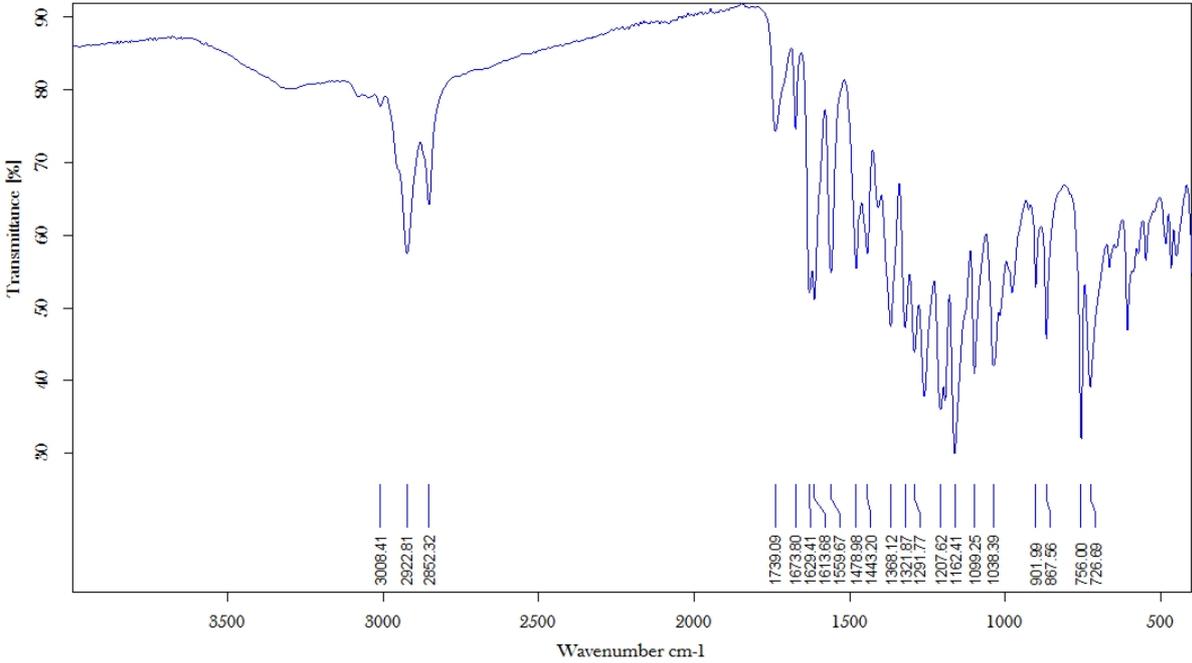
6.1.1 Gruppe braun gefärbter Extrakte



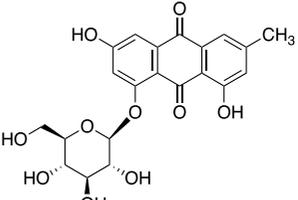
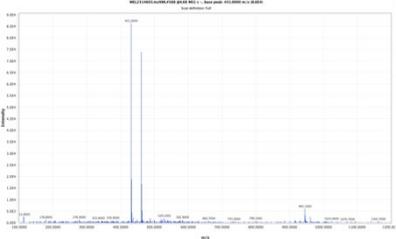
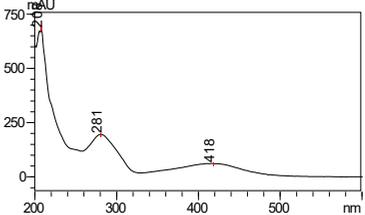
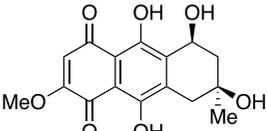
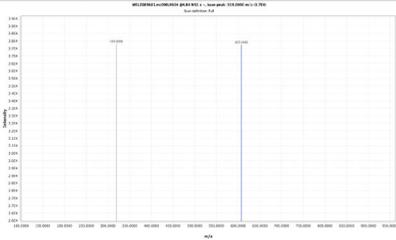
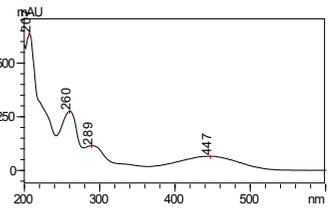
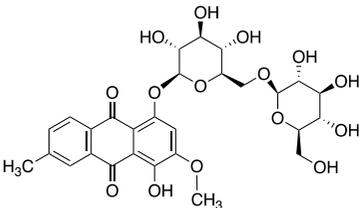
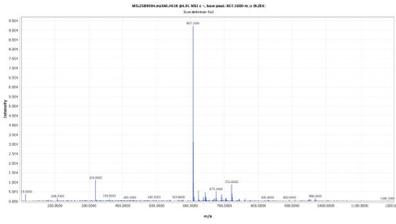
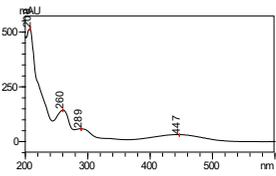
6.1.2 Gruppe der restlichen Extrakte

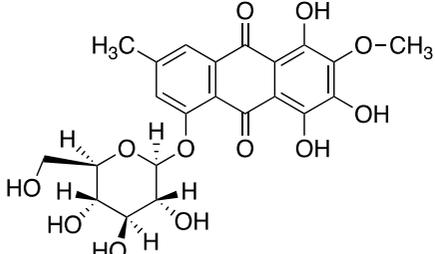
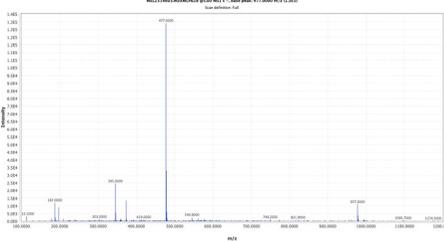
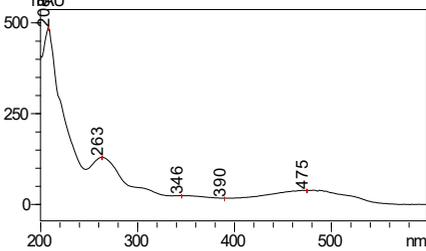
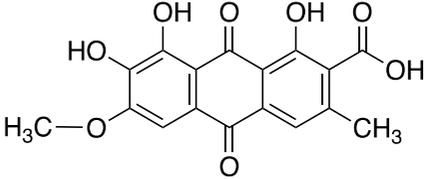
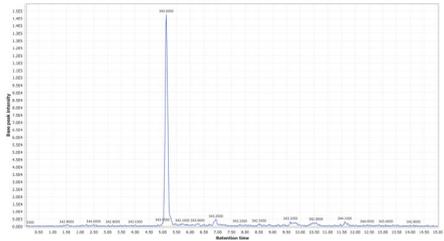
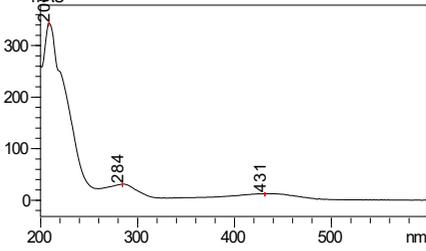
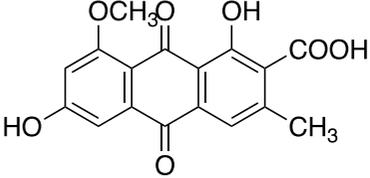
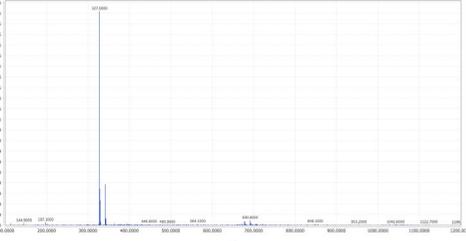
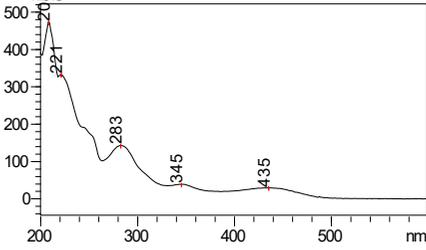


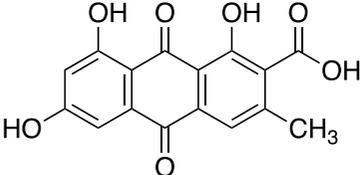
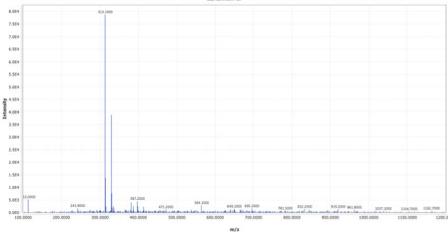
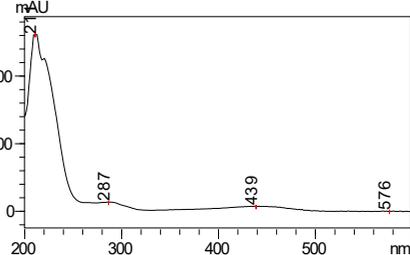
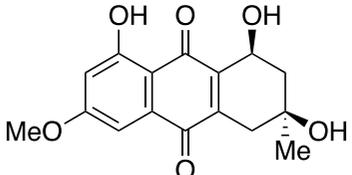
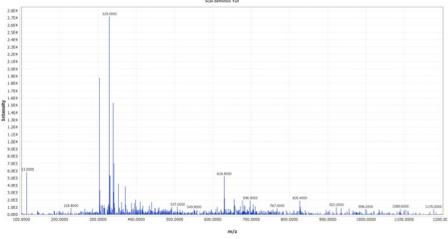
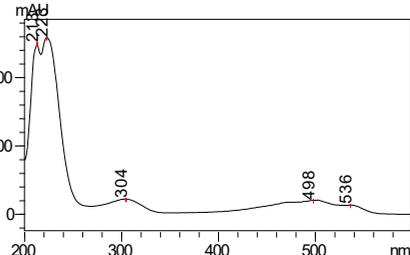
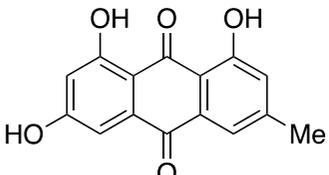
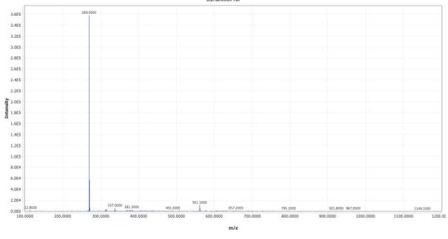
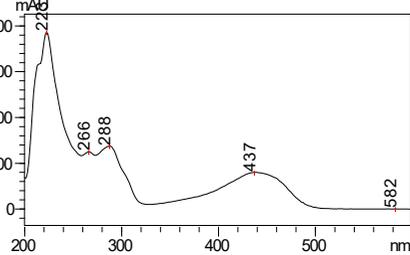
6.2 IR Spektrum von Fallacinol

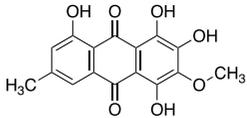
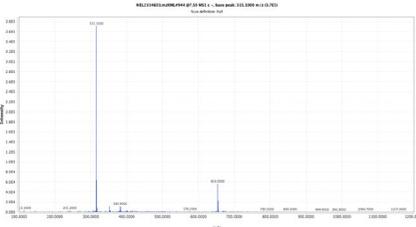
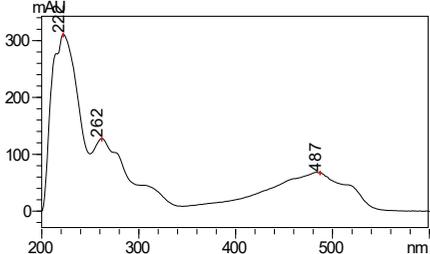
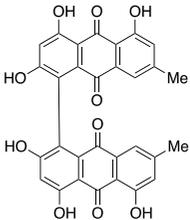
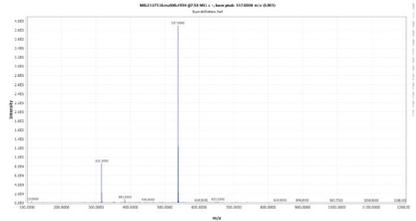
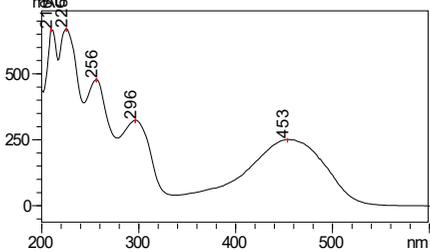
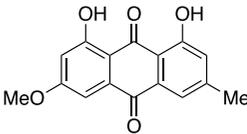
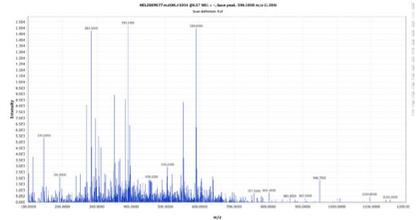
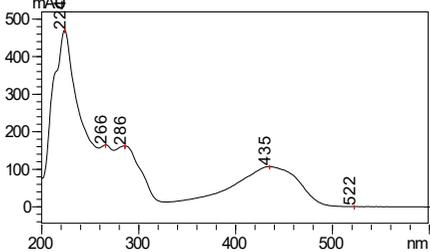


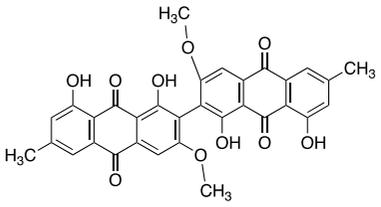
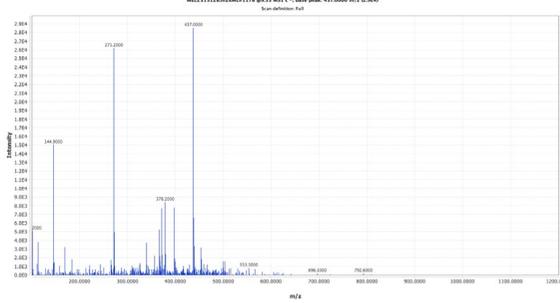
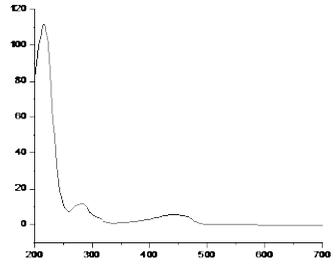
6.3 Annotierte Pigmente mit MS-Spektrum, UV/VIS-Spektrum und Retentionszeit

Annotierte Pigmente	MS Spektrum	UV/VIS	RT Origin	Pilz Beispiel
<p>A5 Emodin-8-glucosid</p>  <p>Molecular Weight: 432,38</p>			4,55	<i>C.sp. "australsanguineus"</i>
<p>A7 Austrocortirubin</p>  <p>Molecular Weight: 320,30</p>			4,79	<i>C. erythrocephalus</i>
<p>A8 Austrocortinin-8-O-gentiobiosid</p>  <p>Molecular Weight: 608,55</p>			4,84	<i>C. persplendidus 1</i>

Annotierte Pigmente	MS Spektrum	UV/VIS	RT Origin	Pilz Beispiel
<p data-bbox="230 272 611 304">A9 Dermocybin-glucosid</p>  <p data-bbox="286 619 555 643">Molecular Weight: 478,41</p>			4,88	<i>C. sp. „austral sanguineus“</i>
<p data-bbox="271 695 573 727">A11 Cardinalic Acid</p>  <p data-bbox="271 962 573 986">Molecular Weight: 344,28</p>			5,01	<i>C. cardinalis</i>
<p data-bbox="293 1042 551 1074">A13 Dermolutein</p>  <p data-bbox="271 1308 573 1332">Molecular Weight: 328,28</p>			5,34	<i>C. sp. „austral sanguineus“</i>

Annotierte Pigmente	MS Spektrum	UV/VIS	RT Origin	Pilz Beispiel
<p data-bbox="295 268 548 300">A17 Endocrocin</p>  <p data-bbox="264 534 582 566">Molecular Weight: 314,25</p>			5,76	<i>C. basirubescens</i>
<p data-bbox="257 614 586 646">A21 Austrocortilutein</p>  <p data-bbox="264 877 582 909">Molecular Weight: 304,30</p>			6,23	<i>C. persplendidus</i>
<p data-bbox="324 960 519 992">A27 Emodin</p>  <p data-bbox="264 1220 582 1252">Molecular Weight: 270,24</p>			7,21	<i>C. sp „honey pileus 1“</i>

Annotierte Pigmente	MS Spektrum	UV/VIS	RT Origin	Pilz Beispiel
<p>A28 Dermocybin</p>  <p>Molecular Weight: 316,27</p>			7,38	<i>C. sp.</i> „ <i>austral sanguineus</i> “
<p>A29 Skyrin</p>  <p>Molecular Weight: 538,46</p>			7,48	<i>C. austro-venetus</i>
<p>A33 Physcion</p>  <p>Molecular Weight: 284,27</p>			8,28	<i>C. clelandii</i> 2

Annotierte Pigmente	MS Spektrum	UV/VIS	RT Origin	Pilz Beispiel
<p data-bbox="280 311 593 343">A35 7,7'-Biphyscion</p>  <p data-bbox="336 582 537 606">Molecular Weight: 566,52</p>			<p data-bbox="1769 454 1848 494">9,22</p>	<p data-bbox="1915 438 2060 510"><i>C. cardinalis</i></p>

7 Literaturverzeichnis

1. O'Neill, J., *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*. 2014;(accessed 6.6. 16).
2. Liu, Y., Qin, R., Zaat, S.A.J., Breukink, E., & Hege, M., *Antibacterial photodynamic therapy: overview of a promising approach to fight antibiotic-resistant bacterial infections*. J. Clin. Trans. Sci., 2015, 1, 140-167.
3. Siewert, B. & H. Stuppner, *The photoactivity of natural products - An overlooked potential of phytomedicines?* Phytomedicine, 2019, 60, 152985.
4. Hammerle, F., Bingger, I., Pannwitz, A., Magnutzki, A., Gstir, R., & Rutz, A., *Targeted isolation of photoactive pigments from mushrooms yielded a highly potent new photosensitizer: 7,7'-biphyscion*. Sci. Rep., 2022, 12, 1108.
5. Hopkins, S.L., Siewert, B., Askes, S.H., Veldhuizen, P., Zwier, R., & Heger, M., *An in vitro cell irradiation protocol for testing photopharmaceuticals and the effect of blue, green, and red light on human cancer cell lines*. Photochem. Photobiol. Sci., 2016, 15, 644-53.
6. 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, 10, 226.
7. Czaplewski, L., Bax R., Clokie M., Dawson M., Fairhead H., & Fischetti V.A., *Alternatives to antibiotics—a pipeline portfolio review*. Lancet Infect. Dis., 2016, 16, 239-251.
8. Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., & Tegos, G. P., *Photoantimicrobials—are we afraid of the light?* Lancet Infect. Dis., 2017, 17, 49-55.
9. Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., & Al-Ahmad A., *Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't*. Crit. Rev. Microbiol., 2018, 44, 571-589.
10. Siewert, B., Vrabl, P., Hammerle, F., Bingger, I. & Stuppner H., *A convenient workflow to spot photosensitizers revealed photo-activity in basidiomycetes*. RSC Adv., 2019, 9, 4545-4552.

11. Görner, H., Miskolczy, Z., Megyesi, M., & Biczok, L., *Photoreduction and ketone-sensitized reduction of alkaloids*. Photochem. Photobiol., 2011, 87, 284-91.
12. Murakami, T., *The coloring matters of Xanthoria fallax (Hepp.) Arn. fallacinal and fallacinol*. Pharm. Bull., 1956, 4, 298-302.
13. Gill, M. & Steglich, W., *Pigments of fungi (Macromycetes)*. Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products, 1987, 1-297.
14. Räsänen, R., *Anthraquinones from the fungus Dermocybe sanguinea as textile dyes*. 2009.
15. Siewert, B., Curak, G., Hammerle, F., Huymann L., Fiala J., & Peintner, U., *The photosensitizer emodin is concentrated in the gills of the fungus Cortinarius rubrophyllus*. J. Photochem. Photobiol., B, 2022, 228, 112390.
16. SmugMug, I., *Steve Axford. Photographer and Sony ambassador. Regularly presents on the science and beauty of fungi*. 2022.
17. Lüder, B., *Grundkurs Pilzbestimmung - Eine Praxisanleitung für Anfänger und Fortgeschrittene*. 2008, 2. Auflage.
18. Mykologie, D.G.f., *Mycobank Database*. 2004-2020.
19. Keller, G., *Pigmentationsuntersuchungen bei europäischen Arten aus der Gattung Dermocybe (Fr.) Wünsche*. in Sydowia. Ann. mycol., 1982.
20. Kögl, F., & Postowsky, J., *Untersuchungen über Pilzfarbstoffe. II. Über die Farbstoffe des blutroten Hautkopfes (Dermocybe sanguinea Wulf.)*. Justus Liebigs Ann. Chem., 1925, 444, 1-7.
21. Moser, M., *Die Gattung Cortinarius Fr.(Schleierlinge) in heutiger Schau*. 1952.
22. Gabriel, M., *Contribution a la chimiotaxinomie des Agaricales: pigments des bolets et des cortinaires*.1965.
23. Gruber, I., *Anthrachinonfarbstoffe in der Gattung Dermocybe und Versuch ihrer Auswertung für die Systematik*. 1970.
24. Moser, M. & Horak, E., *Cortinarius Fr. und nahe verwandte Gattungen in Südamerika: von Meinhard Moser und Egon Horak, mit einem Beitrag von Ilse Gruber*. 1975.
25. Thoen, D., *Cortinarius sanguineus (Wulf.) Fr. et Cortinarius cinnabarinus Fr., deux cortinaires souvent confondus*. Les Naturalistes Beiges, 1970, 148, 51-54.

26. Steglich, W. & Austel, V., *Die Struktur des Dermocybins und Dermoglaucins*. Tetrahedron Lett., 1966, 7, 3077-3079.
27. Steglich, W., & Lösel, W., *Pilzpigmente, X. Anthrachinon-glucoside aus Dermocybe sanguinea (Wulf. ex Fr.) Wünsche*. Chemische Berichte, 1972, 105, 2928-2932.
28. Steglich, W., & Reininger, W., *Pilzpigmente, IX. Anthrachinon-Pigmente aus Dermocybe cinnabarina (Fr.) Wünsche*. Chemische Berichte, 1972, 105, 2922-2927.
29. Steglich, W., Lösel, W., & Austel, V., *Pilzpigmente, IV. Anthrachinon-Pigmente aus Dermocybe sanguinea (Wulf. ex Fr.) Wünsche und D. semisanguinea (Fr.)*. Chemische Berichte, 1969, 102, 4104-4118.
30. Steglich, W., Töpfer-Petersen E., Reininger, W., Gluchoff K., & Arpin N., *Isolation of flavomannin-6, 6'-dimethyl ether and one of its racemates from higher fungi*. Phytochemistry, 1972, 11, 3299-3304.
31. Moser, M., *Die Gattung Dermocybe (Fr.) Wünsche (Die Hautköpfe)*. Schweizerische Zeitschrift für Pizkunde, 1974, 52, 97-108.
32. Archard, M.A., Gill, M., & Strauch, R.J., *Anthraquinones from the Genus cortinarius*. Phytochemistry, 1985, **24**, 2755-2758.
33. Beattie, K.D., Rouf, R., Gander, L., May, T.W., Ratkowsky D., Donner C.D., *Antibacterial metabolites from Australian macrofungi from the genus Cortinarius*. Phytochemistry, 2010, 71, 948-55.
34. Gill, M., & Morgan, P. M., *New fungal anthraquinones*. Arkivoc, 2001, 7, 145-156.
35. RÖMPP-Redaktion, *Dermocyben-Farbstoffe*. RD-04-00619 (2002).
36. Gill, M., & Gimenez, A., *The dermocanarins, unique macrocyclic lactones from the fungus dermococybe canaria*. Tetrahedron Lett., 1990, 31, 3505-3508.
37. Raab, O., *Über die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien*. Z. biol., 1900, 39, 524-546.
38. Von Tappeiner, H., *Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab* Muench Med Wochenschr, 1900, 47.
39. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, A., Foster, T. H., Girotti, A. W., & Gollnick, S. O., *Photodynamic therapy of cancer: an update*. Ca-Cancer J. Clin., 2011, 61, 250-81.

40. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., & Knap-Czop, K., *Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations*. Biomed. & Pharmacother., 2018, 106, 1098-1107.
41. van Straten, D., Mashayekhi, V., de Bruijn H. S., Oliveira S., & Robi D. J., *Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions*. Cancers (Basel), 2017, 9.
42. Calixto, G.M.F., Bernegossi, J., De Freitas, L. M., Fontana, C. R., & Chorilli, M., *Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review*. Molecules, 2016, 21, 342.
43. Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H., & Stewart, F. A., *Photodynamic therapy in oncology*. Oncologist, 2006, 11, 1034-44.
44. Beltrán Hernández, I., Yu, Y., Ossendorp, F., Korbelik, M., & Oliveira, S., *Preclinical and Clinical Evidence of Immune Responses Triggered in Oncologic Photodynamic Therapy: Clinical Recommendations*. J. Clin. Med., 2020, 9.
45. Yun, S.H. & Kwok, S. J. J., *Light in diagnosis, therapy and surgery*. Nat. Biomed. Eng., 2017, 1.
46. Castano, A. P., Mroz, P., & Hamblin, M. R., *Photodynamic therapy and anti-tumour immunity*. Nat. Rev. Cancer., 2006., 6, 535-45.
47. Hamblin, M.R. & Newman, E. L., *Photosensitizer targeting in photodynamic therapy II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins*. J. Photochem. Photobiol., B. 1994, 26, 47-157.
48. Hamblin, M.R., *Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes.*, Curr. Opin. Microbiol., 2016, 33, 67-73.
49. Reginato, E., Wolf, P., & Hamblin, M.R., *Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects*. World J. Immunol., 2014, 4, 1-11.
50. Nothias, L.F., Petras, D., Schmid, R., Dührkop, K., Rainer, J., & Sarvepalli, A., *Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment*. Nat. Methods, 2020, 17, 905-908.
51. Hammerle, F., Quiros-Guerrero, L., Rutz, A., Wolfender, J. L., Schöbel, H., & Peintner, U., *Feature-Based Molecular Networking-An Exciting Tool to Spot Species of the Genus Cortinarius with Hidden Photosensitizers*. Metabolites, 2021, 11.

52. Aron, A.T., Gentry, E. C., McPhail, K. L., Nothias, L.-F., Nothias-Esposito, M., & Bouslimani, A., *Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS*. Nat. Protoc., 2020, 15, 1954-1991.
53. Phelan, V.V., *Feature-Based Molecular Networking for Metabolite Annotation*. Methods Mol. Biol., 2020, 2104, 227-243.
54. GNPS, *Global Natural Products Social Molecular Networking*. 2021.
55. Shannon, P., Markiel, A., Ozier O., Baliga, N. S., Wang, J. T., & Ramage, D., *Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks*. Genome Res., 2003, 13, 2498-504.
56. Github, M., *MZmine 3*. 2022.
57. Stefani, F.O.P., R.H. Jones, & May, T. W., *Concordance of seven gene genealogies compared to phenotypic data reveals multiple cryptic species in Australian dermocyboid Cortinarius (Agaricales)*. Mol. Phylogenet. Evol., 2014, 71, 249-260.
58. Curak, G., *Quantitative Analyse von Antrachinon-Pigmenten in den verschiedenen Bestandteilen von Fruchtkörpern der Arten Cortinarius malicorius var. rubrophyllus und Cortinarius holoxanthus (Diplomarbeit)*. 2020.
59. Farrugia, C., & Duca, D., *Development and Validation of HPLC-PDA Assay method of Frangula emodin*. Mediterr. J. Chem., 2016, 5, 374.
60. Redmond, R.W., & Gamlin, J. N., *A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules*. Photochem. Photobiol., 1999, 70, 391-475.
61. Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., & Peng, Y., *Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking*. Nat. Biotechnol., 2016, 34, 828-837.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Farbvielfalt der australischen Cortinarien der Subgattung Dermocybe	2
Abbildung 2. Extraktausbeute in % der Einwaage	12
Abbildung 3. Intensive Färbung der gewonnen Extrakte	13
Abbildung 4. Farbliche Übereinstimmung der beiden Extrakte von <i>C. canarius</i>	14
Abbildung 5. Chromatogramme von beiden Exemplaren von <i>C. canarius</i>	14
Abbildung 6. Ausschnitt des Genbaumes für <i>C. canarius</i>	15
Abbildung 7. Farbliche Übereinstimmung der Scheingruppierung <i>C. sp. "austral sanguineus"</i>	16
Abbildung 8. Übereinstimmung der Hauptpeaks in der Scheingruppierung <i>C. sp "austral sanguineus"</i>	16
Abbildung 9. Abgrenzung von <i>C. cramesinus</i> 2 als eigene Spezies laut Genbaum	17
Abbildung 10. Kategorisierung der Pilze nach Farbfamilie (orange-rot)	19
Abbildung 11. Ausschnitt aus dem Genbaum von Stefani et al. [58]	20
Abbildung 12. DC-Platten Ergebnis laut Stefani et al. [58]	20
Abbildung 14. Ausschnitt des Genbaumes von <i>C. austrovenets</i> und <i>C. alienatus</i>	22
Abbildung 15. HPLC-DAD-Chromatogramm von <i>C. sp. "honey pileus 1"</i>	23
Abbildung 16. UV-Spektren von Emodin	24
Abbildung 17. Massenspektrum von Emodin	24
Abbildung 18. Chemische Strukturen der annotierten Antrachinonpigmente	26
Abbildung 19. Pigmentmuster der australischen Cortinarien der Subgattung <i>Dermocybe</i> Teil 1	28
Abbildung 20. Pigmentmuster der australischen Cortinarien der Subgattung <i>Dermocybe</i> Teil 2	29
Abbildung 21. Pigmentmuster der australischen Cortinarien der Subgattung <i>Dermocybe</i> Teil 3	30
Abbildung 22. Auswertung DMA-Assay bei 468 nm	36
Abbildung 23. Auswertung DMA-Assay bei 519 nm	37
Abbildung 24. Färbung der unterschiedlichen Extrakte aus <i>C. cinnabarinus</i>	39
Abbildung 25. Massepeak von Fallacinol aus dem Pilz <i>C. cinnabarinus</i>	40
Abbildung 26. Massepeak der Referenzsubstanz Fallacinol	40
Abbildung 27. UV-VIS-Spektrum der isolierten Reinsubstanz	41
Abbildung 28. ¹ H-NMR-Spektrum der isolierten Verbindung	41

<i>Abbildung 29. Strukturformel von Fallacinol</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 30. Netzwerk südlicher und nördlicher Vertreter der Cortinarien der Subgattung Dermocybe.....</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 31. Netzwerk mit integrierten Photoaktivitätsdaten (468 nm).....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 32. Netzwerk mit integrierten Photoaktivitätsdaten (519 nm).....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 33. Pipettierschema für den DMA-Assay</i>	<i>57</i>

9 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1. Einteilung der Cortinarien der Subgattung Dermocybe nach Mycobank....</i>	4
<i>Tabelle 2. Auszug der Daten der Genanalyse von C. canarius</i>	15
<i>Tabelle 3. Auszug der Daten der Genanalyse für C. sp. "austral sanguineus".....</i>	17
<i>Tabelle 4. Einteilung der Pilzextrakte in drei Farbfamilien</i>	18
<i>Tabelle 5. Datenauszug der Genanalyse von C. austrovenetus und C. alienatus</i>	22
<i>Tabelle 6. Darstellung der enthaltenen Pigmente in den einzelnen Pilzen</i>	32
<i>Tabelle 7. Einteilung nach Pigmentmuster im Trichterprinzip</i>	34
<i>Tabelle 8. Fortsetzung Einteilung nach Pigmentmuster im Trichterprinzip</i>	35
<i>Tabelle 9. Auflistung des verwendeten Biomaterials</i>	47
<i>Tabelle 10. Ausgangsmaterial von C. cinnabarinus.....</i>	48
<i>Tabelle 11. Gradientisches HPLC-Laufmittelsystem</i>	51
<i>Tabelle 12. Parameter für massenspektroskopische Analyse</i>	51
<i>Tabelle 13. Parameter für die Vorprozessierung in MZmine.....</i>	53
<i>Tabelle 14. Fortsetzung der Parameter für MZmine Vorprozessierung</i>	54
<i>Tabelle 15. Parameter für die Generierung eines Netzwerkes</i>	55

Lebenslauf

KATHARINA BUCHAUER
6152 TRINS 133A

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum: 02.04.1992 in Hall in Tirol
Telefon: 0664/6375445
Email: Katharina.Buchauer@student.uibk.ac.at
Staatsbürgerschaft: Österreich

DERZEITIGE TÄTIGKEIT

Bis dato: Hochschulstudium der Pharmazie an der
Leopold-Franzens-Universität in Innsbruck

BERUFLICHE TÄTIGKEIT

August 2011 bis Februar 2013: Land Tirol (Abteilung Wirtschaftsförderung)

SCHULABSCHLUSS

Juni 2011 Matura HBLA-West

SCHULBILDUNG

2006 bis 2011: HBLA-West, Sprachenzweig
2002 bis 2006: Hauptschule Steinach
1998 bis 2002: Volksschule Trins

FERIALARBEIT UND PRAKTIKUM

Sommer 2007 und 2008: jeweils Verkäuferin im „Baguette“
Sommer 2009: 3-monatiges Praktikum Gasthof Lamm
Sommer 2010, 2013, 2014, 2015: Mautnerin bei „ASFINAG“

BESONDERE KENNTNISSE UND INTERESSEN

EDV: ECDL (Europäischer Computerführerschein)
Kosmetik: Kosmetik-Update 4: Effektives Anti-Aging
Kosmetik-Update 5: Kosmetische Produkte zur
unterstütz. Behandlung von Hauterkrankungen
Sprachen: Englisch, Französisch, Italienisch
Kleines Latinum

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die wörtlich oder inhaltlich den angegebenen Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form noch nicht als Magister-/Master-/Diplomarbeit/Dissertation eingereicht.

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle gilt ein herzliches Dankeschön jenen, die mich, während meinem Studium begleitet und unterstützt haben.

Erstens möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Hermann Stuppner danken, dass ich meine Masterarbeit am Institut für Pharmazie, im Fachbereich Pharmakognosie erarbeiten konnte.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Bianka Siewert für die hervorragende Betreuung meiner Masterarbeit. Im Zuge zahlreicher Besprechungen unterstütze sie mich mit ihrer Expertise und ließ dabei auch Raum für Diskussionen. Mit ihrem Taktgefühl und Verständnis für besondere Umstände erleichterte sie mir die Verfassung meiner Masterarbeit wesentlich, was ich sehr zu schätzen weiß.

Weiters möchte ich Mag. pharm. Johannes Fiala danken, der mich während meiner praktischen Arbeit im Labor angeleitet und unterstützt hat. Er hatte zu jederzeit ein offenes Ohr für meine Anliegen.

Nicht zu vergessen sind die Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Abteilung für Pharmakognosie, die mir stets mit Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft begegneten.

Abschließend ein großer Dank an meine Eltern, die mir mein Studium ermöglichen haben und meinen Weg immer befürwortet haben.