

TELMA	Band 40	Seite 245 - 254	6 Abb.	Hannover, November 2010
-------	---------	-----------------	--------	-------------------------

Kultivierung und Identifizierung des endophytischen Pilzes *Penicillium janthinellum* Biourge aus dem Großen Moor bei Uchte (Niedersachsen) und Charakterisierung eines sekundären Stoffwechselproduktes

Cultivation and identification of the endophytic fungus *Penicillium janthinellum* Biourge from the Großen Moor near Uchte (Niedersachsen) and characterization of a secondary metabolite

JUTTA NIGGEMANN, KLAUS GERTH, NICOLE HORSTMANN,
ANDREAS BAUEROCHSE und MARKUS KALESSE

Zusammenfassung

Aus einer Hochmoortorf-Probe aus dem Großen Moor bei Uchte (Ldkr. Nienburg/Weser) in Niedersachsen wurde der endophytische Pilz *Penicillium janthinellum* Biourge isoliert und in 100 ml Medium kultiviert. Als Sekundärmetabolit konnte hieraus ein Diketopiperazin isoliert und dessen Struktur mittels HR-MS und 1D- und 2D-NMR-Spektren bestimmt werden.

Abstract

From a raised bog peat sample from the Großen Moor near Uchte (Nienburg/Weser-Distrikt), Lower Saxony, the endophytic fungus *Penicillium janthinellum* Biourge was isolated and cultivated in 100 ml medium. As a secondary metabolite a diketopiperazine could be isolated and the structure determined by HR-MS and 1D- and 2D-NMR-spectroscopic analysis.

1. Einleitung

Bei Bohr- und Ausgrabungsarbeiten in den Hochmooren Nordwestdeutschlands finden sich sowohl im stark zersetzten Schwarztorf als auch innerhalb der schwach zersetzten Weißtorflagen immer wieder kleine weiße, zumeist nicht einmal die Größe eines Stecknadelkopfes erreichende Gebilde. Vereinzelt oder in kleinen nestförmigen Vorkommen auf-

tretend, heben sie sich aufgrund ihrer hellen Farbe deutlich vom Torf ab (Abb. 1). Dabei stellt sich den Bearbeitern im Gelände immer wieder aufs Neue die Frage, um was es sich dabei im Einzelnen handelt.

In einem gemeinsamen Projekt des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH, des Instituts für Organische Chemie der Leibniz Universität Hannover und des Niedersächsischen Landesamtes für Denkmalpflege, Schwerpunktbereich Moorarchäologie, wurde dieser Frage nun anhand einer an der Fundstelle der Moorleiche des Mädchens aus dem Großen Moor bei Uchte (Ldkr. Nienburg/Weser; BAUEROCHSE et al. 2008) entnommenen Probe aus dem Hochmoortorf gezielt nachgegangen.



Abb. 1: Der zumeist nicht einmal die Größe eines Stecknadelkopfes erreichende Pilz *Penicillium janthinellum* findet sich häufig in Hochmoortorfen (Aufnahme mit 20-facher Vergrößerung)
The mostly not even the size of a pinhead reaching *Penicillium janthinellum* is often found in raised bog (20-times magnified)

Dabei hat sich gezeigt, dass es sich bei den Vorkommen um den endophytischen Pilz *Penicillium janthinellum* Biourge handelt (Abb. 2). Über seine Isolierung sowie über die Strukturaufklärung des aus 100 ml Kulturmedium isolierten Diketopiperazins **1** (Abb. 3) berichten wir hier. Dies geschieht vor dem Hintergrund, dass der Isolierung von Natur-



Abb. 2: In Flüssigmedium bei 30° C kultivierter *Penicillium janthinellum*. Im Vergleich zu den Vorkommen im Gelände erreicht der Pilz unter idealen Laborbedingungen deutlich größere Ausmaße
 In liquid medium at 30°C cultivated *Penicillium janthinellum*. In comparison to the occurrence in the field the fungus reaches a considerably larger size under laboratory conditions

stoffen aus Pflanzen und Mikroorganismen (Bakterien und Pilzen) aufgrund ihrer großen strukturellen Vielfalt bei der Suche nach neuen anti-infektiven Wirkstoffen eine wichtige Bedeutung zukommt.

2. Material und Methoden

Kulturbedingungen: Der Pilz wurde aus der Torfprobe isoliert und auf Agar-Platten (Myc-Medium: Phytone™-Peptone 1.0 %, Glucose 1.0 %, HEPES 50 mM, pH 7.0, 1.6 % Bacto-Agar) bei 30° C angezogen, anschließend in 20 ml Flüssigmedium überimpft und in 100 ml Myc-Medium in Gegenwart von 2.0 % Amberlite® XAD-16 für 14 Tage bei 30° C kultiviert.

Pilzbestimmung: Die Identifizierung des Pilzes wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig nach morphologischen Merkmalen (Kolonien auf Malzextrakt-Agar und Czapek-Dox-Agar bei 25°C) durchgeführt. Demnach handelt es sich um die Art *Penicillium janthinellum* Biourge.

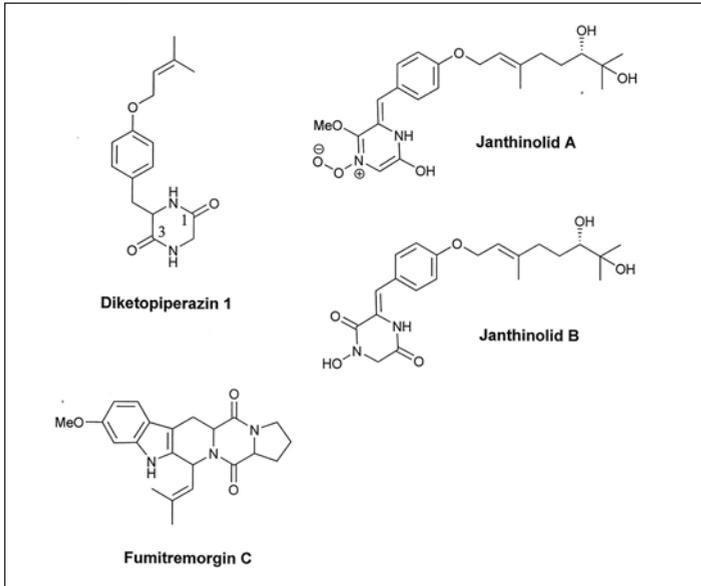


Abb. 3: Diketopiperazin-Derivate aus *Penicillium janthinellum* bzw. *Aspergillus fumigatus*
Diketopiperazin derivatives from *Penicillium janthinellum* and *Aspergillus fumigatus*

Isolierung: Durch Sieben von Pilz und Medium wurde das XAD-Harz abgetrennt, mit H₂O gewaschen und mit Methanol (30 ml) eluiert. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte am Rotationsverdampfer. Der Rückstand wurde in Ethylacetat und Wasser aufgenommen, drei mal mit Ethylacetat extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt.

Chromatographische Methoden

Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC): Der Rohextrakt wurde in 2 ml Methanol gelöst und auf einer Nucleodur C-18 Säule (EC 125/2, Pyramid 5 µm, Machery Nagel) analysiert (Abb. 4a-b).

Die **UV-Detektion** erfolgte mit einem Dioden-Array Detektor.

Eluent A: H₂O/CH₃CN 95:5, 5 mM NH₄OAc, pH 5.5; Eluent B: CH₃CN/ H₂O 95:5, 5 mM NH₄OAc, pH 5.5; Gradient: 10% B auf 100% B in 30 min, Flussrate: 0.3 ml/min.

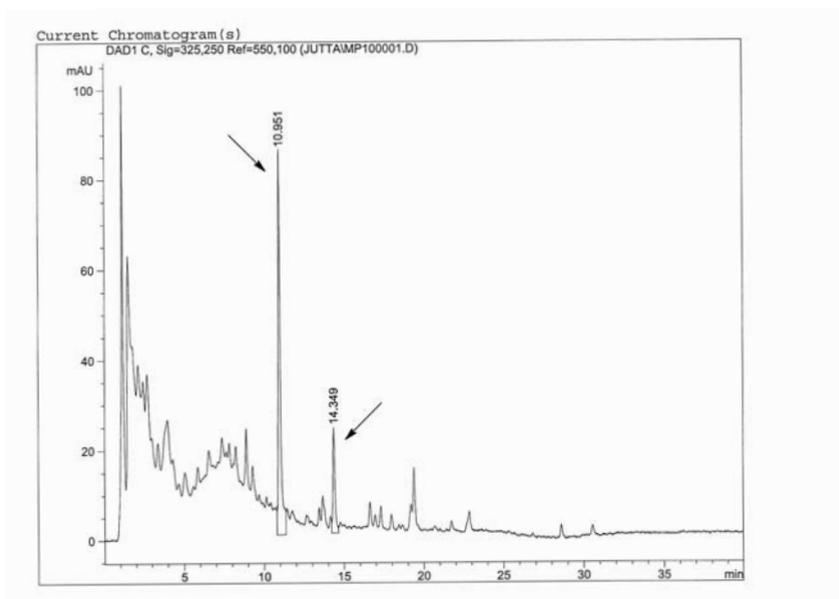


Abb. 4a: HPLC-Spektrum des Rohextraktes
HPLC-spectrum of the crude extract

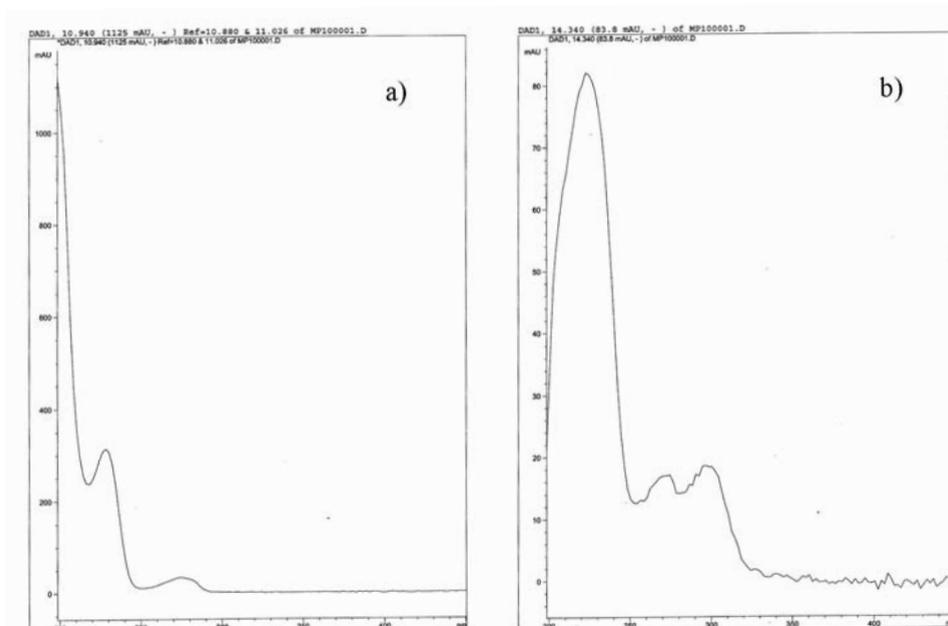


Abb. 4b: DAD-Spektren a) von Diketopiperazin **1** ($r_t = 10.9$ min) und b) von einer nicht charakterisierten Verbindung ($r_t = 14.3$ min)
DAD-spectra a) of diketopiperazin **1** ($r_t = 10.9$ min) and b) of a not characterized compound ($r_t = 14.3$ min)

Präparative HPLC: Für die Isolierung des Diketopiperazins **1** erfolgte die Trennung des Rohextraktes über Gradientenelution auf einer Nucleosil 100-7 C-18 Säule (16 x 250 mm, Machery Nagel). Laufmittel A: 10 % CH₃CN in H₂O, Laufmittel B: 100 % CH₃CN; Gradient: 100 % A auf 100 % B in 60 min, Flussrate 10 ml/min, Detektion bei 230 nm). Die Produktfraktion wurde bis zur Wasserphase eingengt, drei mal mit Ethylacetat extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und eingengt.

Ausbeute: 2.5 mg Diketopiperazin **1** als weißer amorpher Feststoff

Charakterisierung des Produktes

Analytische HPLC: $r_t = 10.9$ min.

Dünnschichtchromatographie (DC): Laufmittel: CH₂Cl₂-MeOH 90:10, $R_f = 0.50$. DC-Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck; die Detektion erfolgte durch Anfärbung mit Cer(IV)sulfate/Molybdophosphorsäure in Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen.

Drehwert-Bestimmung: $[\alpha]_D^{21} = +40.0$ ($c = 0.11$, MeOH), Perkin-Elmer Polarimeter 245.

Massenspektrometrie (HR-MS): Die Bestimmung der exakten molekularen Masse erfolgte durch hochauflösende (high resolution) Elektrospray-Ionisation (ESI) mit einem Bruker maXis™ UHR-TOF (ultra-high resolution time-of-flight).

HR-MS (ESI): m/z calcd. für C₁₆H₂₀N₂O₃ $[M + H]^+$ 289.1546; gefunden 289.1548.

NMR-Spektroskopie (nuclear magnetic resonance): Die Strukturaufklärung erfolgte mit 1D- und 2D-NMR-Spektren, die auf einem Bruker Spektrometer AM 300 (¹H: 300 MHz, ¹³C: 75.5 MHz) in CDCl₃ aufgenommen wurden.

Die Zuordnung der ¹H- und ¹³C-Signale (Abb. 5 und Abb. 6) erfolgte mit 2D-NMR-Spektren:

- COSY (correlation spectroscopy): direkte ¹H-¹H-Korrelationen;
- HSQC (heteronuclear single quantum coherence): direkte ¹H-¹³C-Korrelationen;
- HMBC-Spektrum (heteronuclear multiple bond correlation): long-range ¹H-¹³C-Korrelationen;
- NOE-Spektrum (nuclear Overhauser enhancement): Nachweis räumlicher Nachbarschaft.

$^1\text{H-NMR}$: $\delta = 7.12$ (d, $J = 8.7$ Hz, 7-H), 6.86 (d, $J = 8.7$ Hz, 8-H), 5.97 (bs, 4-NH), 5.88 (bs, 2-NH), 5.47 (m, 11-H), 4.48 (d, $J = 6.8$ Hz, 10-H₂), 4.19 (m, 4-H), 3.75 (dd, $J = 17.3$ Hz, 2.1 Hz, 2-H_a), 3.33 (d, $J = 17.5$ Hz, 2-H_b), 3.16 (m, 5-H_a), 3.02 (m, 5-H_b), 1.79 (s, 13-H₃), 1.74 (s, 14-H₃).

$^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 167.6$ (C-3), 165.6 (C-1), 158.6 (C-9), 138.5 (C-12), 130.9 (C-7), 126.5 (C-6), 119.6 (C-11), 115.3 (C-8), 64.9 (C-10), 56.5 (C-4), 44.8 (C-2), 39.6 (C-5), 25.9 (C-13), 18.3 (C-14).

(δ = chemische Verschiebung, J = Kopplungskonstante, Signalaufspaltung: d = Dublett, dd = Doppeldublett, m = Multiplett, s = Singulett, bs = breites Singulett)

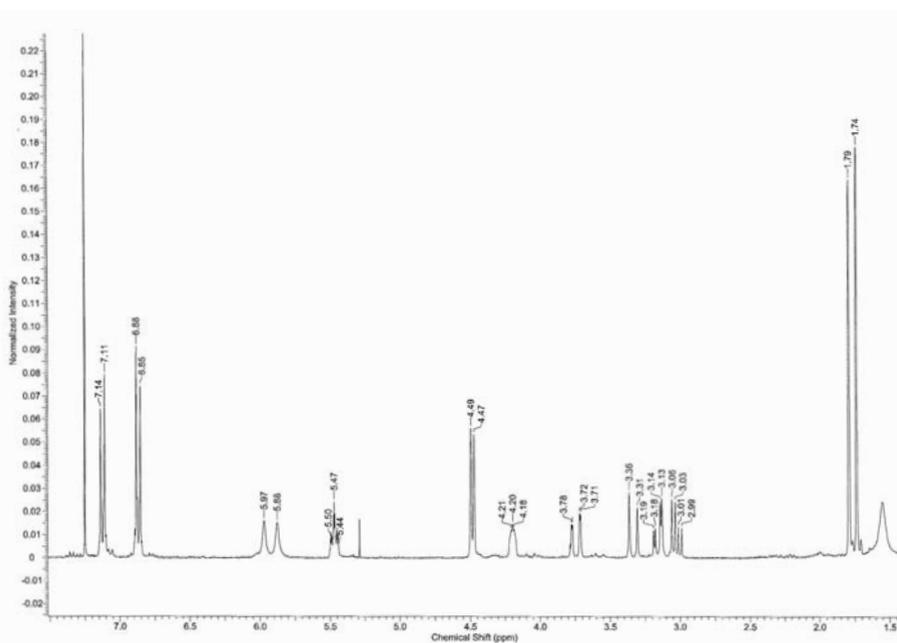


Abb. 5: $^1\text{H-NMR}$ Spektrum des Diketopiperazins **1**
 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of diketopiperazine **1**

3. Ergebnisse und Diskussion

Aus dem Kulturmedium des aus der Hochmoor-Torfprobe isolierten Pilzes konnte mit Hilfe des beschriebenen Verfahrens Diketopiperazin **1** (2.5 mg) als weißer amorpher Feststoff isoliert werden. Durch hoch auflösende HR-ESI-MS und in Übereinstimmung mit den $^{13}\text{C-NMR}$ Daten, wurde die Summenformel des Diketopiperazins als $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3$ bestimmt und acht Doppelbindungsäquivalente (DBEs) berechnet. Neben einem *para*-disubstituierten Aromaten (4 DBEs) und der Doppelbindung eines Alkens (C-11/C-12) lie-

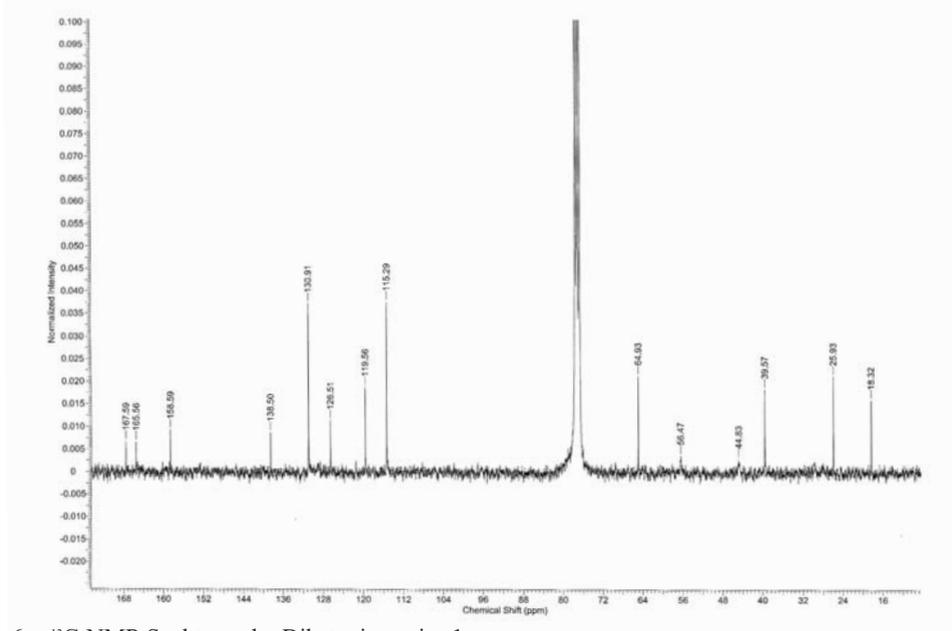


Abb. 6: ^{13}C -NMR Spektrum des Diketopiperazins **1**
 ^{13}C -NMR spectrum of diketopiperazine **1**

gen gemäß ihrer chemischen Verschiebung bei $\delta_{\text{C}} = 165.6$ und 167.6 ppm zwei Ketofunktionen vor. Das verbleibende Doppelbindungsäquivalent wurde mittels ^1H - ^{13}C -Korrelationen im 2D-HMBC-Spektrum als Ringschluss zu einem an C-4 substituierten Diketopiperazin identifiziert und durch entsprechende NOEs der NH-Protonen bei $\delta_{\text{H}} = 5.97$ und 5.88 ppm bestätigt.

Während der Rohextrakt des Torfpilzes schwache antibiotische Aktivität zeigte, konnte für das Diketopiperazin **1** keine antimikrobielle Wirkung gegen Bakterien, Hefen und Pilze festgestellt werden.

Bei dem Diketopiperazin **1** (Abb. 3) handelt es sich um ein O-(3-Methylbut-2-enyl)-Derivat des Cyclo-(Glycyl-L-Tyrosins), einem cyclischen Dipeptid, welches bereits 1988 von KIRBY et al. als Co-Metabolit von Gliotoxin aus dem Pilzstamm *Gliocladium virens* isoliert worden ist (KIRBY et al. 1988). Weitere Diketopiperazine aus einem *Penicillium janthinellum* Stamm, der aus der Weichkoralle *Dendronephthya* sp. isoliert wurde, sind die Janthinolide A und B (Abb. 3; XUE et al. 2006).

Im HPLC-Spektrum des Rohextraktes (Abb. 4a-b) ist neben dem Diketopiperazin **1** ($r_{\text{t}} = 10.9$ min) eine in geringer Menge gebildete und bisher nicht isolierte Verbindung ($r_{\text{t}} = 14.3$ min) zu erkennen, deren Summenformel mit HR-ESI-MS als $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$ 380.1975) bestimmt wurde.

Hierbei könnte es sich um das aus *Aspergillus fumigatus* isolierte tremorgene Mykotoxin Fumitremogin C handeln (Abb. 3; COLE & COX 1981). Bekannte tremorgene Mykotoxine aus *Penicillium janthinellum* Stämmen sind die Indol-Diterpinoide Janthitrem A-G (GALLAGHER et al. 1980, DE JESUS et al. 1984, PENN et al. 1993), die mit ‚Ryegrass staggers‘, einer neuromuskulären Erkrankung bei Schafen und Rindern, in Verbindung gebracht werden. Um hier eine eindeutige Charakterisierung mittels NMR-Spektroskopie zu erreichen, ist im weiteren Verlauf der Untersuchungen die Kultivierung von *Penicillium janthinellum* Biourge in größerem Maßstab vorgesehen.

4. Danksagung

Wir danken Diana Telkemeyer für die Mitarbeit bei der Pilz-Kultivierung und den antimikrobiellen Tests, Christel Kakoschke und Beate Jaschok-Kentner für die Aufnahme der NMR-Spektren und Kerstin Schober für die Messung des HR-MS-Spektrums.

5. Literaturverzeichnis

- BAUEROCHSE, A., PÜSCHEL, K. & HASSMANN, H. (Hrsg. 2008): „Moora“, das Mädchen aus dem Uchter Moor. Materialhefte zur Ur- und Frühgeschichte Niedersachsens **37**, 138 S.; Rhaden/Westf .
- COLE, R.J. & COX, R.H. (1981): Handbook of toxic fungal metabolites, Academic press, p 364.
- DE JESUS, A.E., STEYN, P.S., VAN HEERDEN, F.R. & VLEGGAAR, R. (1984): Structure elucidation of the janthitrems, novel tremorgenic mycotoxins from *Penicillium janthinellum*. - J. Chem. Soc. Perkin Trans I: 697-701.
- GALLAGHER, R.T., LATCH, G.C.M. & KEOGH, R.G. (1980): The janthitrems: fluorescent tremorgenic toxins produced by *Penicillium janthinellum* isolates from ryegrass pastures. - Appl. Environ. Microbiol. **39**: 272-273.
- KIRBY, G.W., RAO, G.V. & ROBINS, D.J. (1988): New co-metabolites of gliotoxin in *Gliocladium virens*. - J. Chem. Soc. Perkin Trans I: 301-304.
- PENN, J., SWIFT, R., WIGLEY L.J., MANTLE, P.G., BILTON, J.N. & SHEPPARD, R.N. (1993): Janthitrems B and C, two principal indole-diterpenoids produced by *Penicillium janthinellum*. - Phytochemistry **32**: 1431-1444.
- XUE, C., LI, T., DENG, Z., FU, H. & LIN, W. (2006): Janthinolide A-B, two new 2,5-piperazinedione derivatives from the endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from the soft coral *Dendronephthya* sp.. - Pharmazie **61**: 1041-1044.

Anschriften der Verfasser:

Dr. J. Niggemann^[a, b], Dr. K. Gerth^[a], Dr. N. Horstmann^[a], Dr. A. Bauerochse^[c],
Prof. Dr. M. Kalesse^[a, b]

[a] Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH
Inhoffenstraße 7
D-38124 Braunschweig
E-Mail: Jutta.Niggemann@helmholtz-hzi.de

[b] Leibniz Universität Hannover
Institut für Organische Chemie
Schneiderberg 1B
D-30167 Hannover
E-Mail: Markus.Kalesse@oci.uni-hannover.de

[c] Niedersächsisches Landesamt für Denkmalpflege
Scharnhorststraße 1
D-30175 Hannover

Manuskript eingegangen am 14. Juli 2010