

3. Einleitung

Alexander Fleming hat als Lazarettarzt im Ersten Weltkrieg erleben müssen, wie Soldaten, deren Verletzungen durchaus heilbar gewesen wären, an den Folgen von bakteriellen Wundinfektionen gestorben sind. Ihm waren die Hände gebunden, denn Antibiotika standen ihm nicht zur Verfügung. Bekannt waren nur Antiseptika wie Karbolsäure (Phenol), Iod oder Chlorwasser. Diese zerstören jedoch die Leukozyten, sie sind daher für die innere Anwendung nicht geeignet (Gießen 2003; Friedrich 2005). Deshalb suchte er nach antibakteriellen Substanzen und fand heraus, dass Nasensekret und Tränenflüssigkeit Bakterien auflösen können. Ursache ist das dort enthaltene Enzym Lysozym (Fleming 1922). Leider ist dessen Wirkspektrum nicht sehr groß. Während es die meisten für den Menschen harmlose Bakterien schnell lysiert, zeigt es gegen gefährliche Krankheitserreger wie *B. typhosus*, *B. pestis* oder *Pneumococci* keinen Effekt (Fleming 1922; Fleming und Allison 1922).

Eine seiner *Staphylokokken*-Kulturen hatte eine Schimmelpilz-Fremdinfektion. Fleming (1929) machte hier die erstaunliche Beobachtung, dass im Umkreis dieses Pilzes die Bakterien ebenso lysiert waren. Es stellte sich heraus, dass der Schimmel *Penicillium notatum* eine Substanz bildet, die gegen eine Reihe von Bakterien, vor allem gegen Gram-positive Bakterien, tödlich wirkt. Er konnte zeigen, dass Penicillin, so nannte er diese Substanz, nicht toxisch gegen Kaninchen oder Mäuse ist. Leukozyten werden von Penicillin nicht geschädigt. Leider war es ihm nicht möglich, Penicillin als Reinsubstanz zu isolieren.

Auch Gerhard Domagk war auf der Suche nach antibakteriellen Substanzen. Dabei baute er auf Arbeiten von Robert Koch und Paul Ehrlich auf, die Bakterien mit Farbstoffen selektiv anfärben und so nachweisen konnten. Domagk postulierte, dass man so die Bakterien nicht nur sichtbar, sondern sogar gezielt zerstören kann. Daher ließ er tausende Farbstoffe synthetisieren und in seinem Labor auf antibakterielle Wirkung testen. Darunter war ein ziegelrotes Sulfonamid, das sich als sehr aktiv gegen Streptokokken erwies. Er nannte es

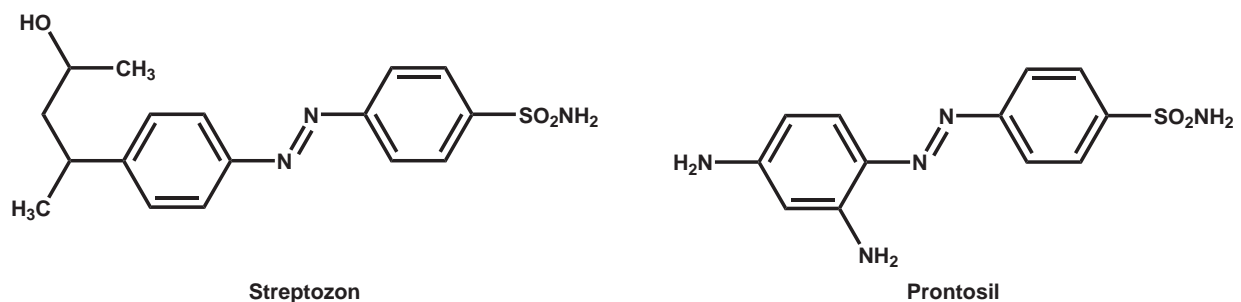


Abbildung 3.1. Die ersten von Domagk 1935 synthetisierten, antibakteriell wirksamen Sulfonamide.

folglich Streptozon. Die zu geringe Wasserlöslichkeit verhinderte aber dessen Einsatz als Medikament. Durch Modifikation konnte das Derivat Prontosil mit besseren Löslichkeitseigenschaften erhalten werden (Abb. 3.1). Gemeinsam mit seinen Mitarbeitern zeigte er erfolgreich, dass man Bakterien nicht nur *in vitro*, sondern auch im menschlichen Körper bekämpfen kann (Domagk 1935). Dafür erhielt er 1939 den Medizin-Nobelpreis.

Nachdem die Entdeckung des Penicillins zunächst für einige Zeit unbeachtet blieb, gelang es 1938 Howard W. Florey, Ernst B. Chain und ihren Mitarbeitern es aus dem Kulturfiltrat von *Penicillium*-Kulturen in größeren Mengen zu isolieren und gegen Infektionskrankheiten, anfangs bei Tieren und ab 1941 bei Menschen, erfolgreich anzuwenden. Nachdem die technologischen Schwierigkeiten der Fermentation und Isolation überwunden worden waren, konnte Penicillin ab 1944 im größeren Maßstab hergestellt werden. Für ihre Arbeiten wurde deshalb 1945 der Medizin-Nobelpreis Fleming, Chain und Walter verliehen.

1943 isolierten Selman A. Waksman und seine Mitarbeiter das Aminoglykosid Streptomycin aus *Streptomyces griseus*. Es avancierte erfolgreich zum Heilmittel gegen die gefürchtete Tuberkulose. *Streptomyces*-Arten erwiesen sich als sehr potente Quelle neuer Antibiotika. So wurden in der Folge z. B. auch Chloramphenicol, Tetracyclin und Aureomycin aus *Streptomyces*-Arten isoliert.

Durch diese Entdeckungen änderte sich die Medizin und mit ihr die Naturstoffchemie dramatisch. Das Zeitalter der Antibiotika war geboren. Plötzlich hatte man Substanzen in den Händen, mit denen man wirksam gegen Bakterien vorgehen konnte. Bakterielle Infektionen, die bis dahin zu den Haupttodesursachen zählten, verloren ihre Schrecken.

Sehr schnell wurde die Euphorie über die neuen Wunderwaffen gedämpft, als man erkannte, dass sich die Bakterien wehren. Durch den vermehrten Einsatz von Antibiotika wurden viele Bakterienstämme resistent gegen die eingesetzten Substanzen. Das Wettrüsten hatte begonnen. Immer neue Wirkstoffe wurden gebraucht und gefunden. Die Bakterien hingegen fanden immer wieder eine Möglichkeit, Resistenzen auszubilden. Dieser Kampf gegen die Krankheitserreger ist endlos. Es ist nur eine Frage der Zeit, wann neu auf den Markt gebrachte Medikamente nicht mehr wirksam sind.

Der Bedarf an neuen Substanzen ist daher ungebrochen. Dabei ist die Suche nach Wirkstoffen, nicht nur die Suche nach Antibiotika, immer schwieriger und teurer geworden. Das liegt auch daran, dass die Ansprüche an neue Wirkstoffe gestiegen sind. Erstens sollen sie selbstverständlich besser sein als die etablierten. Das heißt, sie sollen in geringeren Dosen wirken, einen größeren therapeutischen Bereich haben und weniger Nebenwirkungen besitzen. Und zweitens müssen sie sich natürlich auch verkaufen können. Das heißt, die Kosten für den Wirkstoff bzw. für das Medikament dürfen nicht zu hoch sein.

Es gibt mehrere Wege, neue bioaktive Substanzen zu finden. Ein Weg ist die Synthese neuer Verbindungen - klassisch oder kombinatorisch. Wenn man nach neuen Leitstrukturen sucht, ist dieser Weg sehr steinig. Viele Verbindungen müssen synthetisiert und dann getestet werden.

Ein anderer Weg ist der Blick in die Natur. Über Jahrtausende kämpfen dort Arten um ihr Überleben. Viele Verteidigungsstrategien wurden entwickelt und evolutiv angepasst und verbessert. Manche Arten haben mechanische Schutzmechanismen wie Dornen, Stacheln

oder harte Panzer gebildet. Andere bevorzugten chemische Waffen. Letztere gilt es zu isolieren und für den Menschen nutzbar zu machen.

Statt tausende Verbindungen im Labor aufwendig zu synthetisieren, kann man der Natur die Synthese und der Evolution die Auslese der besten Strukturen überlassen. Wenn die Waffen der Natur isoliert und deren Struktur aufgeklärt worden sind, kann eine Synthese entworfen und Derivate oder Mimetika synthetisiert werden, die für eine Nutzung im oder am Menschen geeigneter sind als die ursprüngliche natürliche Leitsubstanz.

3.1. Inhaltstoffe von Pilzen

Neben Stoffen des Primärstoffwechsels wie Zucker, Fettsäuren, Aminosäuren oder Nukleinsäuren stellen Pflanzen und Pilze Sekundärstoffe her, deren Funktion über Energiehaushalt und Lebenserhaltung hinausgeht. Während sich der Primärstoffwechsel von Pilzen und Pflanzen kaum unterscheidet, gibt es doch Unterschiede im Sekundärstoffwechsel. Ergosterol zum Beispiel ist ein typisches Sterol, welches in Pilzen ubiquitär verbreitet ist, während es in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen wurde. Dagegen fehlen typische pflanzliche Sterole wie Sitosterol oder Campesterol in Pilzen. Während die Biosynthese der Sterole, ausgehend von Acetyl-CoA über Isopentenylidiphosphat bis zur Bildung von Squalenepoxid, bei allen Eukaryonten gleich ist, unterscheidet sie sich bei Tieren, Pflanzen und Pilzen in weiteren Schritten. Es kommt zur Bildung von typisch pflanzlichen, tierischen oder pilzlichen Sterolen (Benveniste 1986; Benveniste 2004; Darnet und Rahier 2004).

Trotzdem kann man bei der Untersuchung von Naturstoffen immer wieder auch Überraschungen erleben. So konnten Radulovic et al. (2005) aus dem Erdwarzenpilz (*Thelephora terrestris*) die drei Pregnan-Steroide Stizophyllin, Terresteron A und B isolieren. Pregnan-Steroide sind typische Pflanzensteroiden. Bis dato wurden sie in Pilzen nicht nachgewiesen.

Während manche Substanzen ubiquitär verbreitet sind, gibt es auch Substanzen, die spezifisch für die Familie, sogar für die einzelne Art sind. So sind zum Beispiel innerhalb der Ordnung der Röhrlinge (*Boletales*) Hydroxypulvinsäuren weit verbreitet (Gill und Steglich 1987). Bei vielen Boleten verfärbt sich der Schwamm auf Druck oder nach Verletzung mehr oder weniger schnell blau. Dafür verantwortlich sind die Hydroxypulvinsäuren Xerocomsäure (1) bzw. Variegatsäure (2). Sie werden enzymatisch zu blau gefärbten Chinonmethid-Anionen oxidiert (siehe Abbildung 3.2). Die Biosynthese der Pulvinsäuren startet von zwei Molekülen Tyrosin (3), welche nach Desaminierung zu Atromentin (4) verknüpft werden (siehe Abbildung 3.3). Nach enzymatischer oxidativer Ringöffnung und Recyclisierung entsteht Atromentinsäure (5), die weiter zu Xerocom- (1) bzw. Variegatsäure (2) oxidiert wird (Gill und Steglich 1987).

Hydroxypulvinsäuren findet man aber nicht nur in „Schwammpilzen“ wie den Steinpilzen (*Boletus*), Rauhfußröhrlingen (*Leccinum*), Filzröhrlingen (*Xerocomus*) oder Schmierröhrlingen (*Suillus*), sondern auch in einigen Lamellenpilzen wie den Kremplingen (*Paxillus*), Gelbfüßen (*Chroogomphus*) oder Schmierlingen (*Gomphidius*). Pulvinsäurederivate lassen sich auch in gastroiden Gattungen wie in Trüffeln (*Melanogaster*) oder Wurzeltrüffeln (*Rhizopogon*) nachweisen. (Gill und Steglich 1987, siehe Abbildung 3.3)

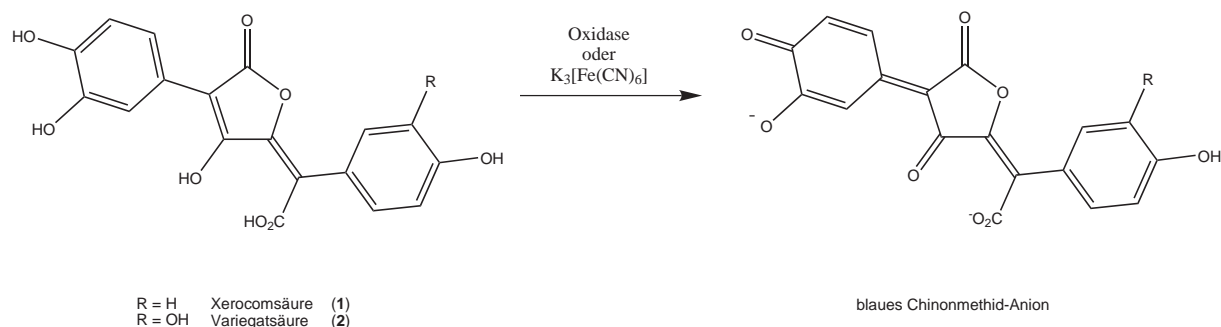


Abbildung 3.2. Die Pulvinsäuren Xerocomsäure (1) und Variegatsäure (2) sind verantwortlich für die Blaufärbung des Fruchtkörper der Röhrlinge nach Druck oder Verletzung.

Biosynthetisch und strukturell sehr ähnliche Substanzen sind die Diarylcyclopentanoide. So enthält z. B. der Kahle Krempling (*Paxillus involutus*) (–)-Involutin (6, Edwards et al. 1967; Edwards und Gill 1973) sowie als Begleitsubstanzen (–)-Chamonixin ((–)-7, Steglich et al. 1977; Feling 2000), Anhydroinvolutin (8, Gill und Steglich 1987) und (+)-Involuton (9, Antkowiak et al. 2003). Aus der Bläuenden Bergtrüffel (*Chamonixia caespitosa*) konnten Gyrocyenin (10), Gyroporin (11) sowie (+)-Chamonixin ((+)-7, Steglich et al. 1977), aus dem Erlengrübbling (*Gyrodon lividus*) (–)-Chamonixin ((–)-7) und (–)-Involutin (6) isoliert werden (Besl et al. 1980). Gyrocyenin (10) und Gyroporin (11) waren schon aus dem Kornblumenröhrling (*Gyroporus cyanescens*) bekannt (Besl et al. 1973).

Die Biosynthese der hydroxylierten Diarylcyclopentenone ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden. Sicher scheint aber, dass auch hier Tyrosin der Vorläufer ist (Feling 2000; Gruber 2002). Aufgrund retrobiosynthetischer sowie biomimetischer Überlegungen können drei Wege diskutiert werden (siehe Abbildung 3.3, Gill und Steglich 1987; Gruber 2002; Feling 2000): Entweder Atromentinsäure (5) wird oxidativ zu Gyrocyenin (10) umgelagert oder Gyrocyenin (10) entsteht durch oxidative Ringverengung aus Atromentin (4) oder Gyrocyenin (10) wird direkt aus der dimeren p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (12) gebildet. Die anderen Diarylcyclopentanoide entstehen dann durch selektive Reduktion, Oxidation, Hydratisierung bzw. Dehydratisierung aus Gyrocyenin (10) (Feling 2000).

Eine weitere nah verwandte Substanzgruppe sind die Grevilline. Auch sie leiten sich von Tyrosin ab (siehe Abbildung 3.3). Sie entstehen durch Lactonisierung der dimeren p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure (12). Die Grevilline A – D (13 – 16) unterscheiden sich im Hydroxylierungsmuster der aromatischen Ringe. Sie kommen vor allem in den Schmierröhrlingen (*Suillus*) vor (Besl und Bresinsky 1997; Gill und Steglich 1987).

Der Nachweis von Hydroxypulvinsäuren und Diarylcyclopentenoiden nicht nur in boletalen Gattungen, sondern auch in agaricalen und gastroiden Gattungen (Gill und Steglich 1987; Arnold et al. 1996) ließ eine enge Verwandtschaft dieser Gattungen mit den *Boletales* vermuten und führte zu einer Erweiterung dieser Ordnung (Bresinsky 1996). Schaut man sich z. B. die Lamellen der Paxillus-Arten unter diesem Aspekt genauer an, kann man die

Querrippen als Ursprung des Schwammgewebes deuten. Auch molekularbiologische Untersuchungen (Fischer et al. 1997; Bruns et al. 1998; Kretzer und Bruns 1999) legen eine verwandtschaftliche Beziehung von *Paxillus* zu den Boletales nahe.

Ein weiteres Beispiel für chemotaxonomische Marker sind substituierte Anthrachinone. Sie kommen in Fruchtkörpern der *Dermocyben* (Hautköpfe) vor und führten zur Eingliederung dieser Gattung als neue Untergattung in *Cortinarius* (Høiland 1983; Arnold et al. 1987).

3.2. Inhaltsstoffe in Pilzen der Gattung *Hygrophorus*

Bisher ist sehr wenig über sekundäre Inhaltsstoffe aus Pilzen der Gattung *Hygrophorus* berichtet worden. Das in Pilzen ubiquitär vorkommende Sterol Ergosterol und seine Derivate wurden in mehreren *Hygrophoraceen* nachgewiesen (Wakita 1977). In *Hygrophorus hypothejus* und *H. olivaceoalbus* ist Ergosterol das Hauptsterol. Weiterhin konnte Ergost-7-en-3 β -ol (Δ^7 -Campesterol) und Ergosta-7,22-dien-3 β -ol in geringeren Mengen nachgewiesen werden (Morrica et al. 1984). Im Gegensatz dazu ist das Hauptsterol in *H. lucorum* Ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol. In geringeren Mengen wurde dort auch Ergosta-5,7-dien-3 β -ol, Ergosta-7,22-dien-3 β -ol und Ergost-7-en-3 β -ol nachgewiesen (Cordella et al. 1982). Aus dem Methanolextrakt von *H. discoideus* konnte Baćinović (2006) 5 α ,8 α -Ergosterolperoxid isolieren.

Einige Arten der Gattung *Hygrophorus* zeichnen sich durch einen intensiven Geruch aus, der beispielsweise für *H. cossus* ss. Mos. als „Geruch nach Weidenbohrraupen“ oder für *H. agathosmus* als „Bittermandel-Geruch“ beschrieben wird (Moser 1983). Im Wasserdampfdestillat von *H. cossus* konnten Steglich und Li (Fugmann 1985) größere Mengen Aceton, 2-Butanon und Phoron (2,6-Dimethyl-2,5-heptadien-4-on) nachweisen und als 2,4-Dintrophenylhydrazon isolieren. Duftstoffanalysen führten in *H. agathosmus* zum Nachweis von Benzaldehyd (Breheret et al. 1997a; Rapior et al. 1997; Talou et al. 2000), Phenylacetaldehyd, Benzylalkohol, Phenylacetonitril, 2-Phenylethanol (Rapior et al. 1997) sowie α -Pinen und β -Phellandren (Breheret et al. 1997b). Weiterhin wurde Tridecanal in größeren Mengen in *H. agathosmus* und *H. eburneus* nachgewiesen (Rapior et al. 1997). Indol und 3-Chlorindol sind die Ursache für den widerlichen Geruch von *Hygrophorus paupertinus* (Wood et al. 2003).

Untersuchungen an *Hygrophorus lucorum* (Fugmann 1985; Gill und Steglich 1987) führten zur Isolierung und Strukturaufklärung des neuen γ -Butyrolactons Hygrophorsäure (17). Dessen Biosynthese verläuft über eine oxidative Spaltung des aromatischen Ringes von Kaffeesäure (18) zwischen C-3 und C-4 und Recyclisierung zum Lacton (Abb. 3.5). Dies konnte durch Synthese und den Einbau von [α - 2 H]-Kaffeesäure in Hygrophorsäure in einem Feldversuch bewiesen werden. In einem Screening von 20 *Hygrophorus*-Arten (siehe Tabelle 3.1) konnte die Hygrophorsäure in zumindest 4 Arten sicher nachgewiesen werden. Parallel dazu wurde Muscaflavin (19) in 3 Arten der Gattung *Hygrophorus* nachgewiesen (Fugmann 1985, siehe Tabelle 3.1). Auffällig ist, dass Muscaflavin nicht in *H. lucorum* nachgewiesen werden konnte, obwohl dort Hygrophorsäure in größeren Mengen enthalten

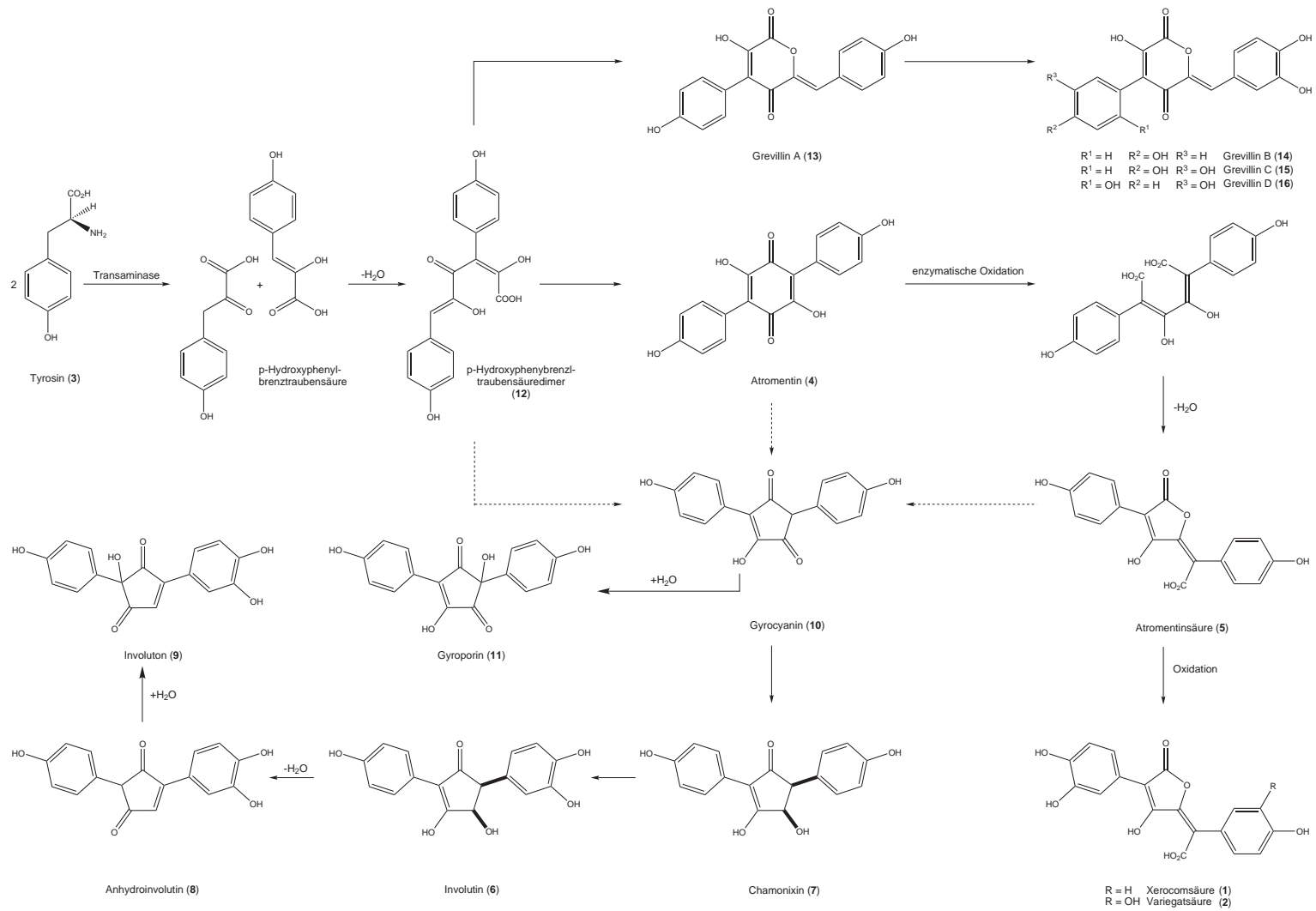


Abbildung 3.3. Biosynthese typischer Boletus-Metabolite wie Hydroxypulvinsäuren (**1**, **2**), Diarylcyclopentenone (**6**, **7**, **10**) oder Grevilline (**13** – **16**) ausgehend von Tyrosin (**3**), verändert nach Feling 2000; Gruber 2002; Gill und Steglich 1987.

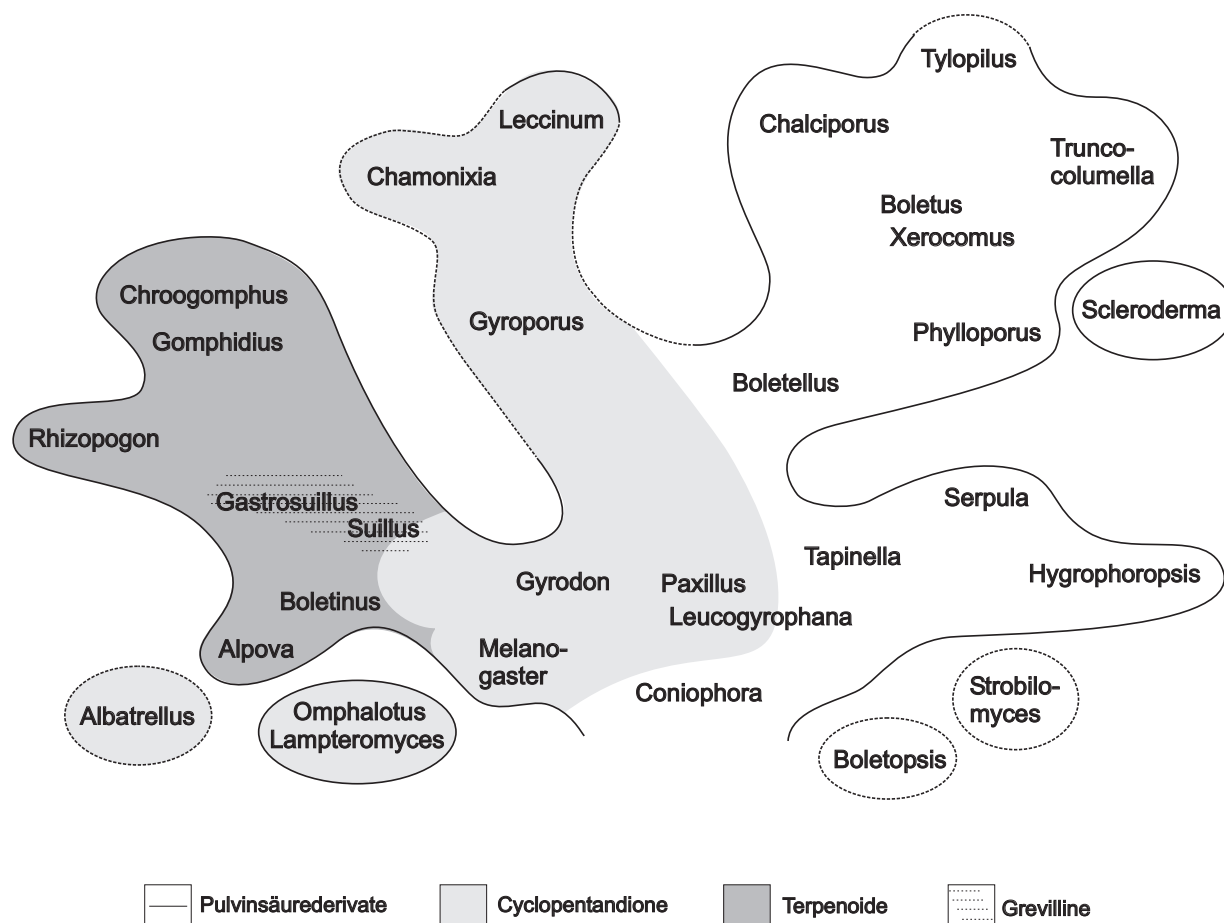


Abbildung 3.4. Verwandtschaftliche Beziehungen der Gattungen innerhalb der Ordnung Boletales bzw. zu Gattungen verwandter Ordnungen aufgrund übereinstimmender Pigmente (Bresinsky 1996).

ist. Muscaflavin (**19**) ist ein gelbes Pigment des Fliegenpilzes (*Amanita muscaria*) (Döpp et al. 1971; Döpp und Musso 1973a; Döpp und Musso 1973b; Barth et al. 1981). Die Biosynthese von Muscaflavin verläuft über enzymatische Ringöffnung von L-DOPA (L-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin, **20**) zwischen C-2 und C-3 und anschließender Cyclisierung (Abb. 3.5). Weitere Pigmente des Fliegenpilzes sind die orangefarbenen Musca-Aurine und das rotviolette Muscapurpurin (Musso 1979; Gill und Steglich 1987). Musca-Aurine sind Imine der Betalaminsäure (**21**) mit verschiedenen Aminosäuren (Strack et al. 2003). Auch Muscapurpurin soll ein Imin der Betalaminsäure sein (Gill und Steglich 1987; Musso 1979). Die Biosynthese der Betalaminsäure verläuft auch über L-DOPA (**20**), wobei hier der aromatische Ring zwischen C-4 und C-5 enzymatisch gespalten wird (Mueller et al. 1997; Terradas und Wyler 1991).

Auch aus *Hygrocyben* (Saftlinge), die in älterer Literatur mitunter in *Hygrophorus* eingeordnet wurden, konnte Muscaflavin isoliert (Ardenne et al. 1974; Fugmann 1985) bzw. chro-

Tabelle 3.1. Vorkommen von Hygrophorsäure und Muscaffavin in der Gattung *Hygrophorus* (verändert nach Fugmann 1985)

Art	Hygrophorsäure (17)	Muscaffavin (19)
<i>H. agathosmus</i>	–	n.u.
<i>H. atramentosus</i>	–	n.u.
<i>H. aureus</i>	+	+
<i>H. chrysodon</i>	(+)	n.u.
<i>H. cossus</i>	–	n.u.
<i>H. dichrous</i>	–	n.u.
<i>H. eburneus</i>	–	n.u.
<i>H. erubescens</i>	–	n.u.
<i>H. fuscoalbus</i>	–	n.u.
<i>H. gliocyclus</i>	–	n.u.
<i>H. hypothejus</i>	++	++
<i>H. leucophaeus</i>	–	n.u.
<i>H. lucorum</i>	+++	–
<i>H. marzuolus</i>	–	n.u.
<i>H. nemoreus</i>	(+)	n.u.
<i>H. olivaceoalbus</i>	–	n.u.
<i>H. poetarum</i>	–	n.u.
<i>H. pudorinus</i>	–	n.u.
<i>H. russula</i>	–	n.u.
<i>H. speciosus</i>	++	++

+++ = viel isoliert, ++ = isoliert, + = DC-Nachweis, (+) = unsicher, – = nicht nachgewiesen; n.u. = nicht untersucht

matographisch nachgewiesen (Kronawitter 1984; Bresinsky und Kronawitter 1986) werden. Betalaminsäure hingegen konnte in den Saftlingen nicht nachgewiesen werden (Ardenne et al. 1974). Offenbar fehlt den Hygrocyben eine 4,5-Dioxygenase. Es scheint daher die Frage interessant, ob in *Hygrophorus*-Arten Betalaminsäure oder deren Derivate nachweisbar sind.

Im Rahmen chemischer und ökologischer Untersuchungen konnte bei Applizierung von Rohextrakten mit unterschiedlicher Polarität aus verschiedenen *Hygrophorus*-Arten die Beeinflussung der Larvalentwicklung von *Drosophila melanogaster* gezeigt werden. Zudem wiesen einzelne Rohextrakte eine antifungische Aktivität gegen *Cladosporium herbarum* sowie antibakterielle Aktivität gegen *Escherichia coli*, *Pseudomonas acidovorans*, *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* auf (Haselberger 1986).

Aus *Hygrophorus eburneus* konnten Teichert et al. (2005) acht ungewöhnliche Fettsäuren (**22** – **29**) isolieren, die durch eine γ -Oxoacrylat-Teilstruktur gekennzeichnet sind (siehe auch Teichert 2004). Sie sind bioaktiv gegen den phytopathogenen Pilz *Cladosporium cucumerinum*. Außerdem zeigen sie in ersten Versuchen antibakterielle Eigenschaften gegen

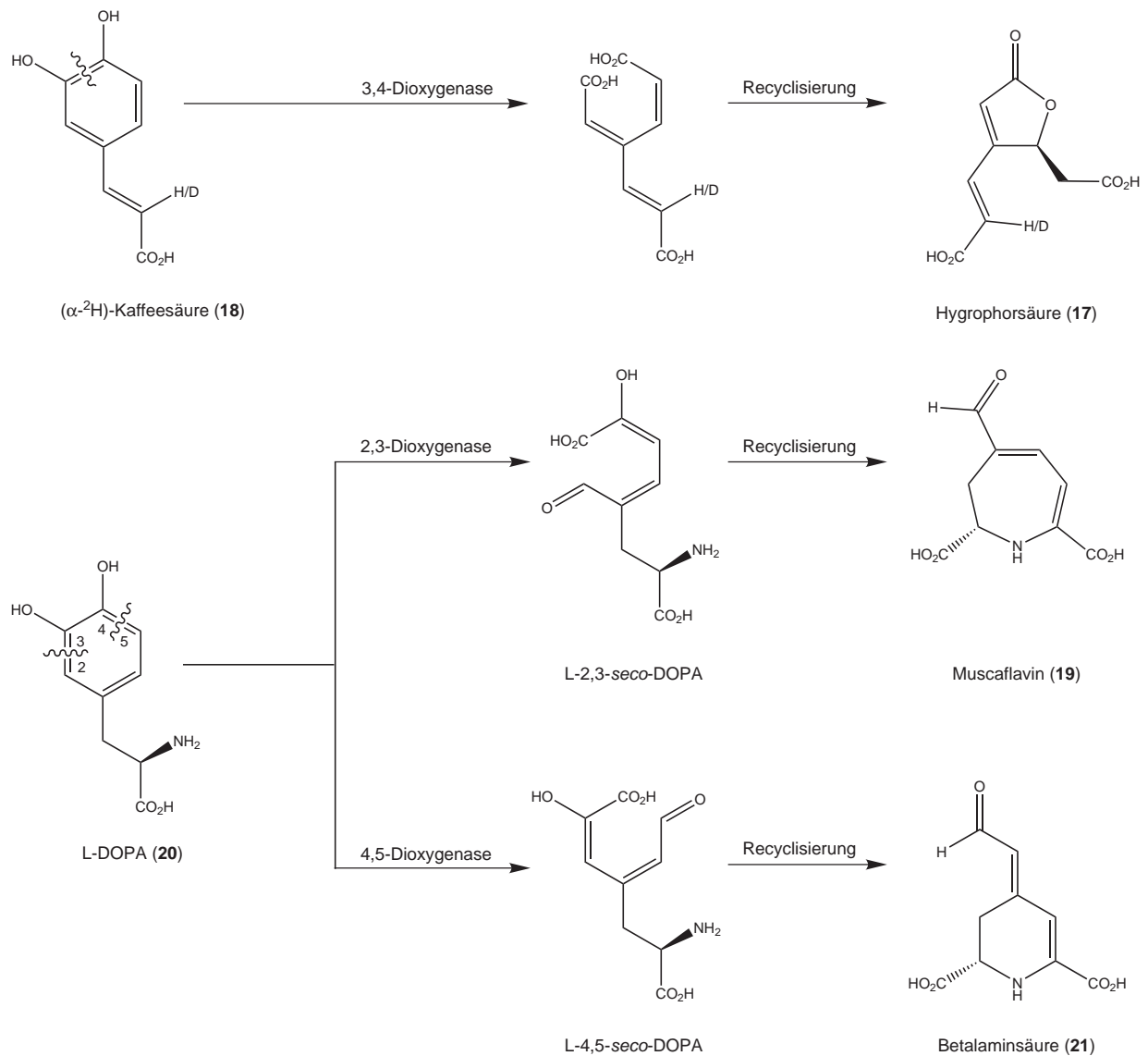


Abbildung 3.5. Biosynthese von Hygrophorsäure (17) aus Kaffeesäure (18) (nach Gill und Steglich 1987) sowie von Muscaflavin (19) und Betalaminsäure (21) aus L-DOPA (20) (nach Strack et al. 2003).

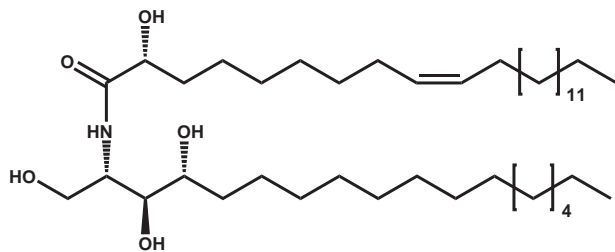


Abbildung 3.6. Hygrophamid (30) aus *H. eburnesus* [sic!] (Qu et al. 2004)

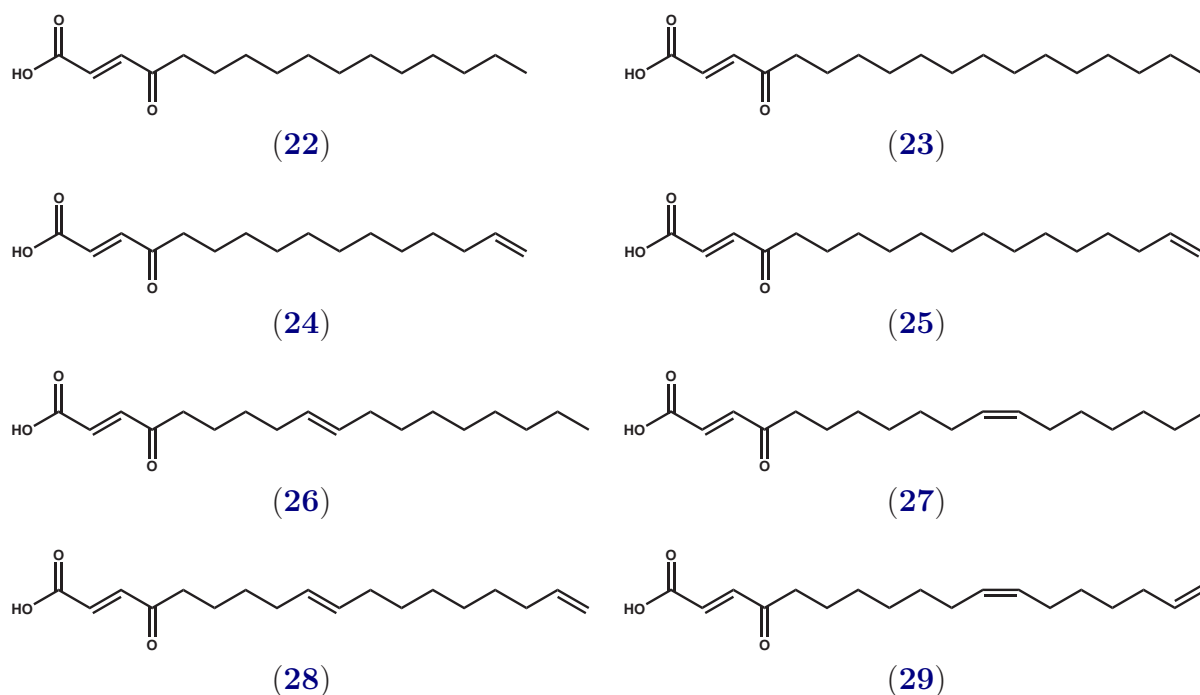


Abbildung 3.7. Ungewöhnliche Fettsäuren mit γ -Oxoacrylat-Teilstruktur, die aus *H. eburneus* isoliert wurden (Teichert et al. 2005).

die Leuchtbakterien *Vibrio fischeri*. Aus *H. eburneus* (sic!, gemeint ist wohl *H. eburneus*) konnten Qu et al. (2004) das neue Ceramid Hygrophamid (30) isolieren.

Wie *Hygrophorus* sind auch die Nachbararten *Hygrocybe* (Saftlinge), *Camarophyllus* (Ellerlinge) sowie *Dermoloma* (Samtrittlinge) bisher kaum mykochemisch untersucht worden. Neben den Vorkommen von Ergosterol und deren Derivaten (Yokokawa und Mitsuhashi 1981) sowie dem oben erwähnten Muscaflavin und deren Vorläufern ist der Nachweis von Psilocybin und Psilocin (Gartz 1986) in *Hygrocyben* beschrieben worden.

Ziel dieser Dissertation war es, aus ausgesuchten Arten der Gattung *Hygrophorus* neue, bioaktive Substanzen zu isolieren und deren Struktur aufzuklären.