

Karsten Krohn:
**DIVERSITÄT BIOLOGISCH AKTIVE NATURSTOFFE
AUS ENDOPHYTISCHEN TERRESTRISCHEN UND MARINEN PILZEN**

Ihnen allen ist der Durchbruch in der medizinischen Versorgung durch die Entdeckung des Antibiotikums Penizillin G, eines Stoffwechselprodukts des Schimmelpilzes *Penicillium notatum*, im Jahr 1928 durch Fleming bekannt. [1] Die Entdeckung wurde 1945 durch die Verleihung des Nobelpreisen an Fleming, Chain und Florey gewürdigt. Die breite und segensreiche Anwendung begann jedoch erst nach dem zweiten Weltkrieg. Inzwischen sind zahlreiche weitere Antibiotika und insbesondere auch Antitumormittel und andere Arzneimittel für andere Indikationen hinzugekommen. Man rechnet damit, dass immerhin fast die Hälfte der heute auf dem Markt befindlichen Medikamente sich indirekt von Naturstoffen ableitet. Eine schöne Übersicht dazu wurde kürzlich von Newman et al publiziert. [2] Ein ähnliches Bild ergibt sich auch für den Pflanzenschutz. Die heute üblichen Monokulturen, die erst die Ernährung der enorm angestiegenen Bevölkerung ermöglicht haben, brauchen einen Pflanzenschutz. Dazu gehören drei Bereiche: Herbizide, Fungizide und Pestizide. In Deutschland ist aus den Erzählungen der Eltern noch die große Hungersnot im Jahr 1917 bekannt, die durch die Kartoffelfäule verursacht wurde. Das ließe sich heute vermeiden. Ein großer Teil der Weltbevölkerung ernährt sich heute von Reis. In den feuchten Anbaugebieten würden Schimmelpilze einen großen Teil der Ernte vernichten (riceblast), wenn dies nicht durch den Einsatz von Fungiziden verhindert würde. Ähnliches gilt für den Weinbau, auch hier in Ungarn. Moderne, ökologisch gut abbaubare Fungizide sorgen für gesundes Wachstum. Das ist besser, als Kupfersalze oder Schwefeldioxid anzuwenden. (Wieso? zB: Sie sind den umweltschädlichen, schwer abbaubaren, etc Kupfersalzen oder Schwefeldioxid vorzuziehen.)

Nun gibt es aber ein Problem sowohl bei den Antibiotika als auch bei Pflanzenschutzmitteln. Es ist die unvermeidlich nach einer Zeit der Anwendung auftretende Resistenzbildung. Die biologische Unumgänglichkeit dieses Prozesses hat kürzlich C. Walsh in seiner Monographie über Antibiotika nachgewiesen. [3] Die Natur ist eben seit dreieinhalb Milliarden Jahren auf den Kampf ums Überleben getrimmt und es gibt eine große Zahl von Mechanismen, um eine Resistenz gegen Umwelteinflüsse aller Art zu entwickeln. Bei der Entwicklung von Arzneimitteln und Pflanzenschutzmitteln muss man sich daher notgedrungen auch darauf einstellen. Es kommt einem manchmal vor, wie der Wettlauf von Igel und Hase. Natürlich ist die Natur der schnelle Hase, der uns immer eine Länge voraus ist. Wir müssen uns als langsame Igel etwas Besonderes einfallen lassen, genau wie der Igel, der seine Frau mit ins Rennen schickte.

Und genau hier beginnt mein eigentlicher Vortrag. Wir und auch andere Gruppen haben uns die sog. endophytischen Pilze als Quelle für neue bioaktive chemische Strukturen ausgesucht. Die Pilze liefern dabei Sekundärmetabolite, die im günstigen Fall den Chemikern und Pharmazeuten als so genannte Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Präparate dienen. Was sind endophytische Pilze? Sie alle (schließt Du da vielleicht nicht von dir auf andere?) kennen den unangenehmen Befall von Rosen oder Obstbäumen durch Pilze, wegen der rötlichen Flecken meist „Rost“ genannt. Das sind phytopathogene Pilze; die sind hier nicht gemeint. Endophytische Pilze leben ohne erkennbare Merkmale in den meisten Pflanzen. Wie die Abb. 1 zeigt, durchdringen die Hyphen des Pilzes die Zellen der Pflanze nicht, sondern wachsen um Zellen herum.

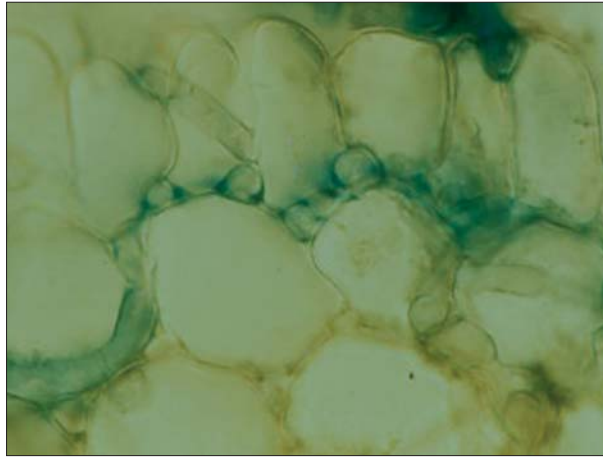


Abb. 1: Die Hyphen eines endophytischen Pilzes umwachsen die Zellen von *Gerstedrechslera*.

Die Biologen sprechen zwar nicht von einer Symbiose, wie das bei den Pilzen der Baumwurzeln der Fall ist (Mycorizza), aber es ist von einem mutualistischen Nebeneinander die Rede, von dem beide Organismen wohl ihren Vorteil haben. Natürlich versorgt die Pflanze den Pilz zunächst einmal mit Nährstoffen. Aber was hat die Pflanze davon? Das ist in Abb. 2 gezeigt. Es handelt sich um Mais-Setzlinge (*P. indicamais*). Die linke Pflanze ist mit einem Endophyten vergesellschaftet, die rechte ist steril ohne Endophyten aufgewachsen. Deutlich erkennt man das bessere Wachstum der linken Pflanze. Endophyten erhöhen auch die Überlebenschancen der Pflanze bei Trockenheit oder Nährstoffmangel.



Abb. 2. Der positive Effekt auf das Wachstum von Mais-Setzlingen (*P. indicamais*) durch Endophyten (linke Pflanze).

Dabei spielen die von dem Pilz produzierten Sekundärmetabolite offenbar eine große Rolle. Sekundärmetabolite tragen nicht unmittelbar zum Energiehaushalt eines Organismus bei, sondern man schreibt ihnen eine sekundäre Funktion wie z. B. die Abwehr von Bakterien oder anderen Pilzen zu. Auf die Suchen nach diesen Sekundärmetaboliten haben wir uns nun in unserer Arbeitsgruppe gemacht. Wir führen die Arbeiten in Zusammenarbeit mit einer mykologischen Arbeitsgruppe von Frau Priv. Doz. Dr. B. Schluz und Dr. S. Draeger in Braunschweig durch. Um die endophytischen Pilze aus den Pflanzen oder Algen zu isolieren, wird die Oberfläche des Pflanzenteils (Blatt oder Stil) zunächst mit Ethanol von Bakterien befreit (Oberflächensterilisation), die ja überall auf allen erdenklichen Oberflächen vorhanden sind. Das Pflanzenteil wird dann auf eine Agarschale gelegt und der Pilz wächst in das Nährmedium hinein. Die Kultur wird dann ein paar Mal überimpft (geklont) um eine reine Spezies zu erhalten. Eine dieser Kulturen auf der Agarschale ist in Abb. 3 zu sehen.



Abb. 3. Pilzkulturen auf einer Agarschale.

Pilzkulturen in größerem Maßstab können entweder in Flüssigkultur in Kolben (Abb. 4) oder Fermentern oder auf Festagarplatten (Abb. 5) gezogen werden.



Abb. 4. Kultivierung in Flüssigkultur.



Abb. 5. Kultivierung auf Festagarplatten.

Um die Inhaltsstoffe (Sekundärmetabolite), die durch den Pilz im Laufe der Kultivierung gebildet wurden zu isolieren und zu erkennen, muss die wässrige Kultur zunächst mit einem organischen Lösungsmittel extrahiert werden. Wir benutzen dazu meist Ethylacetat. Mit diesem Lösungsmittel mittlerer Polarität können wir die meisten Sekundärmetabolite aus der wässrigen Kultur herauslösen. Es kann sich bei den chemischen Verbindungen um ein Gemisch recht verschiedener Strukturen handeln, über deren chemischer Natur wir zunächst überhaupt nichts wissen. Das macht die Jagd nach diesen Stoffen auch so reizvoll. Einen ersten Überblick verschaffen uns die so genannten Dünnschichtchromatogramme. Dabei werden die einzelnen chemischen Verbindungen aus dem Gemisch des Rohextrakts auf eine dünne Schicht von amorphem Kieselgel in einzelne Flecken aufgetrennt. Im Idealfall entspricht dann ein Fleck auch einer einheitlichen reinen Verbindung. Eine besondere Variante ist das Bioautogramm, bei der die Dünnschichtplatte mit einer Suspension eines Mikroorganismus besprüht wird, in diesem Falle einer Nährlösung mit dem Pilz *Cladosporium*. Man erkennt in Abb. 6, dass das Wachstum des Pilzes *Cladosporium* an den Stellen gehemmt ist, wo ein Fleck mit einer antifungischen Substanz vorhanden ist. Auf diese Weise kann man bestimmten Verbindungen auch gleich eine biologische Wirkung zuordnen.

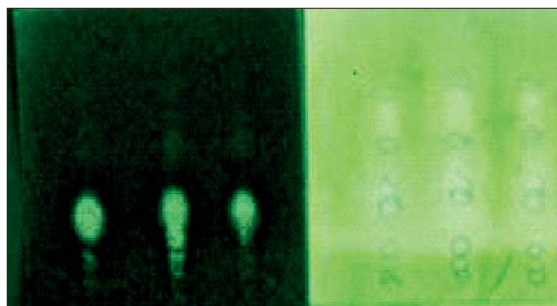


Abb. 6. Bioautogramm: Das Wachstum des Pilzes *Cladosporium* ist dort gehemmt, wo sich eine antifungische Verbindung auf der Platte befindet.

Nach diesen Voruntersuchungen kommt dann die eigentliche chemische Arbeit, die oft recht mühsam und zeitaufwendig ist. Die einzelnen Verbindungen müssen durch so genannte chromatographische Verfahren in die einzelnen reinen Verbindungen aufgetrennt werden. Als Trennmittel dienen meist Säulen aus Kieselgel oder Sephadex, auf denen die Rohextrakte in einem flüssigen Laufmittel in die reinen Verbindungen aufgetrennt werden. Ein Chemiker möchte immer gerne sehr reine Verbindungen in der Hand haben. Das erleichtert die Aufklärung der chemischen Zusammensetzung, der „Struktur“. In täglichen Leben kommen wir meist mit Gemischen chemischer Verbindungen in Berührung. Gelegentlich aber auch mit (fast) reinen Stoffen wie Rohrzucker (Saccharose) oder auch Kochsalz (NaCl). In unserem Arbeitskreis möchten wir gerne nicht nur die biologisch aktiven, sondern das gesamte Spektrum aller chemischen Verbindungen isolieren und aufklären. Zunächst einmal soll kurz erläutert werden, wie es gelingt, die chemische Struktur eines unbekanntes Stoffes überhaupt herauszubekommen.

Dazu werden die spektralen Daten der reinen Verbindung vermessen. Jede chemische Verbindung unterscheidet sich in diesen Daten in gewisser Weise. Die Chemiker haben gelernt, diese kleinen Unterschiede in den Daten in chemische Strukturelemente zu übersetzen. Die wichtigsten Spektren sind dabei die kernmagnetischen Resonanzspektren. In Abb. 7 ist ein ¹H-NMR Spektrum einer unserer Verbindungen gezeigt. Daneben ist die chemische Struktur gezeigt (Abb. 8). Leider handelte es sich bei der schönen Struktur um eine schon bekannte Verbindung. Um nicht allzu viel Zeit mit der Strukturaufklärung bekannter Verbindungen zu

verlieren, nutzen wir eine große Zahl chemischer Datenbanken, in der die physikalischen und spektroskopischen Daten bekannter Verbindungen beschrieben sind, z. B. Chemical Abstracts, Chapman and Hall Naturstoffdatenbank, Antibase, ChemInform etc.. In unserer eigenen Literaturdatenbank „Biblio“ habe ich einen großen Teil der für uns wichtigen Literatur schon gespeichert und die Datenbank wird laufend durch aktuelle Literatur erweitert. Heute ist auch der sofortige Zugriff auf die pdf-Dateien der jeweiligen Publikationen auf Knopfdruck möglich.

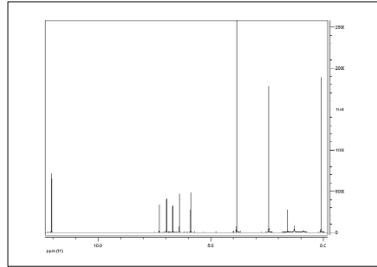


Abb. 7 ¹H-NMR Spektrum des Fusidienols A.

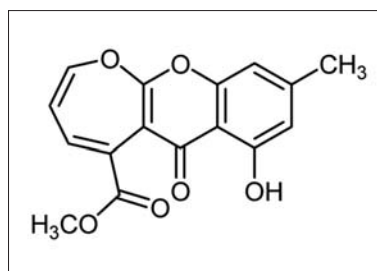


Abb. 8. Chemische Struktur des Fusidienols A, einer bekannten Verbindung.

In Glücksfällen, wenn schöne Kristalle vorliegen (wir sprachen schon von Zucker oder Kochsalz) gelingt auch eine Röntgenstrukturanalyse. Aus den Daten der Streuung des Röntgen-Strahlen könnten Spezialisten, bei uns in Paderborn ist das Dr. U. Flörke, die Struktur der chemischen Verbindung ermitteln. So eine Struktur ist in Abb. 9 gezeigt. Wenn man einen neuen Naturstoff gefunden hat, darf man ihm auch einen Namen geben. Abb. 9 zeigt z. B. das Ascochin, abgeleitet von dem Pilznamen *Ascochyta* sp., aus der die Verbindung isoliert wurde.

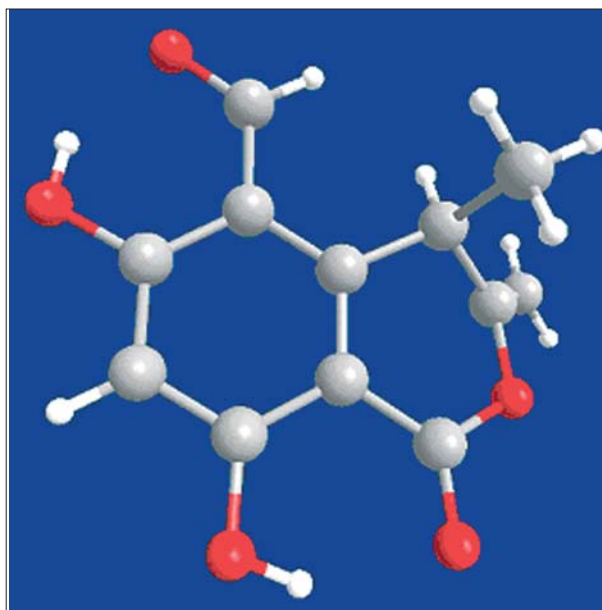


Abb. 9. Röntgenstruktur eines neuen Naturstoffs, den wir Ascochin genannt haben.

Gustav Röntgen war ja der erste Träger des Nobelpreises für Physik. Er hat seinerzeit kein Patent auf die Entdeckung angemeldet, sondern sie der Menschheit zur kostenlosen Nutzung zur Verfügung gestellt. Ist Ihnen übrigens bekannt, dass nicht weniger als sieben Nobelpreise für Chemie und Physik auf der Entdeckung der Röntgenstrahlen beruhen (Karle, Huber, Michel, Peruz, von Laue, Barkla, Siegbahn)?

Wenn es schließlich gelungen ist, die chemische Struktur der Fermentationsprodukte aufzuklären, beginnt die biologische Testung. In unserem Falle arbeiten wir in einem Verbundprojekt, das vom Bundesministerium für Forschung und der BASF AG (ehemals IG Farben) gefördert wird. Wir stellen der BASF AG die reinen Verbindungen für die Testung im Pflanzenschutz zur Verfügung.

Ein hoher Prozentsatz der isolierten reinen Verbindungen und auch der rohen Extrakte aus endophytischen Pilzen zeigt eine biologische Aktivität. Das zeigt die nächste Graphik (Abb. 10), in der die meisten Verbindungen gegen den Pilz *Microbotryum* und die Alge *Chlorella* Aktivität zeigen. In einem der BASF-BMB-Verbundprojekte wurde immerhin das Strobilurin gefunden, das als Leitstruktur zahlreicher neuer Fungizide dient, die fast alle Firmen entwickelt haben, die auf dem Pflanzenschutzsektor arbeiten. Es handelt sich um Produkte sicher mit einem Milliarden-Euro-Umsatz. [4]

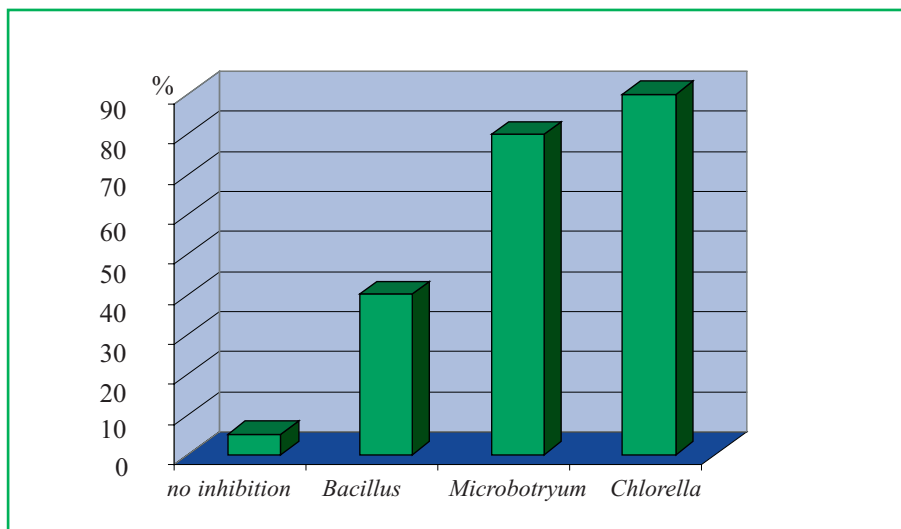


Abb. 10. Ein hoher Anteil der reinen Verbindungen zeigt biologische Aktivität.

Zum Abschluss muss ich noch ein paar chemische Strukturen zeigen. Ich habe einfache Beispiele ausgewählt, an denen ich die Möglichkeiten zur Erzeugung der chemischen Diversität der Naturstoffe erläutern möchte. [5] Unter chemischen Diversität versteht man eine möglichst große strukturelle Vielfalt von chemischen Strukturen. Die Natur wendet dabei die verschiedensten Prinzipien an. Das erste Beispiel (Abb. 11) zeigt 13 Verbindungen, die alle aus dem Pilz *Geniculosporium* Sp. (Stamm 6580) von Frau Dr. J. Dai isoliert wurden. Sie erkennen sicher auch als Nichtchemiker, dass es sich um vier ganz verschiedene Strukturtypen handelt, die jeweils in den Boxen umrahmt sind. Als erstes Beispiel für Erzeugung von Diversität haben wir also die Synthese grundverschiedener Metabolite, die auf verschiedenen Biosynthesewegen hergestellt sind.

In der ersten Box erkennen Sie aber auch sehr ähnliche Verbindungen. Sie unterscheiden sich alle durch kleine Umwandlung der chemischen Struktur. Die Natur kann also auch mit geringem Aufwand an „chemischer Leistung“ eine große Vielfalt von verschiedenen Verbindungen herstellen. Chemisch sprechen wir von Transformation der chemischen

Funktionalitäten. Es gibt bestimmte Gruppen oder Bereiche in chemischen Strukturen, die sich besonders leicht, sowohl im Labor als auch in der Natur, in andere ähnliche Gruppen umwandeln lassen.

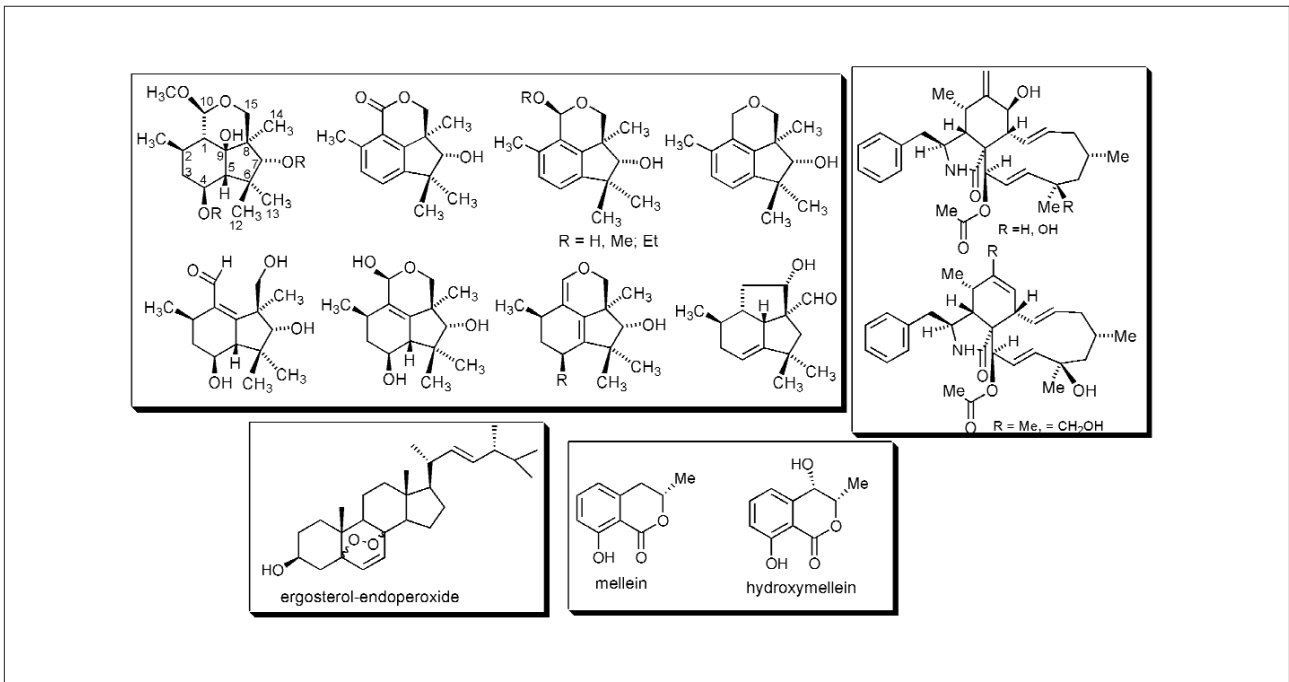


Abb. 11. Diversität aufgrund verschiedener Biosynthesewege und Transformation funktioneller Gruppen.

In Abb. 12 sind aber noch zwei andere Methoden auf dem Wege zur Diversität aufgezeigt, für die wir in letzter Zeit in unserer Gruppe eine ganz besondere Vielfalt gefunden haben. In der Abbildung sind einzelne Moleküle besonders farbig hervorgehoben. Bei Verbindungen, die alle aus dem Pilz vom internen Stamm 7093 isoliert wurden, erkennt man im oberen Bereich offenkettige und cyclische Formen. Im rechten Fall ist das zuerst etwas verborgen. Wenn man aber eine Carboxylgruppe (COOH-Gruppe) an die mittlere Verbindung addiert, kann ein Chemiker sich daraus sehr leicht die violett gefärbte cyclische Form vorstellen. Im mittleren Teil sind monomeren Formen dargestellt. Die chemische Verbindung dieser Einheiten, die ebenfalls allesamt aus dem gleichen Pilz isoliert wurden, liefert die drei verschieden unten gezeigten dimeren Verbindungen. Es ist sehr selten, dass man die verschiedenen offenkettigen, cyclischen, monomeren und dimeren Bestandteile alle gleichzeitig aus dem Organismus, in diesem Fall der Pilzkultur, isolieren kann. Ein so vollständiges Bild vieler Sekundärmetabolite liefert auch wertvolle Hinweise über die Entstehung der Verbindungen in den biologischen Organismen, man spricht von der Biosynthese. In der Tat gehört dazu auch ein außerordentlich sorgfältiges Arbeiten, um alle diese Verbindungen in hochreiner Form zu isolieren. Unsere Arbeitsgruppe ist in dieser Hinsicht Frau Dr. Dai zu großem Dank verpflichtet. Wir haben also neben den verschiedenen Biosynthesewegen, und der Transformation der funktionellen Gruppen noch zwei weitere Wege zur Produktion von Diversität kennen gelernt: Die Koexistenz offenkettiger und cyclischer Formen sowie von monomeren und dimeren oder gar trimeren oder oligomeren Verbindungen.

Es gibt eine einleuchtende Erklärung dafür, warum die Natur alle diese Wege einschlägt. Auf diese Weise wird die Chance erhöht, dass eine dieser Verbindungen (rein zufällig) eine für den produzierenden Organismus nützliche Eigenschaft hat. Bakterien, Schwämmen, Korallen auch Pilzen oder Pflanzen haben keine Fluchtmöglichkeit, sich Gefahren zu entziehen, wie unser schneller Hase beim Wettlauf mit dem Igel, der sich seinerseits Stacheln

zur Verteidigung hat wachsen lassen. Ihnen bleibt nur die chemische Abwehr. Aber da begeben wir uns schon in das Reich der Spekulation und ich möchte nicht dem Gedanken einer zielgerichteten Evolution das Wort reden. Wie dem auch sein, wir Menschen können davon profitieren, indem wir die Idee dieser biologisch wirksamen Strukturen aufnehmen, sie möglicherweise abwandeln und für unsere Zwecke auf intelligente Weise nutzen.

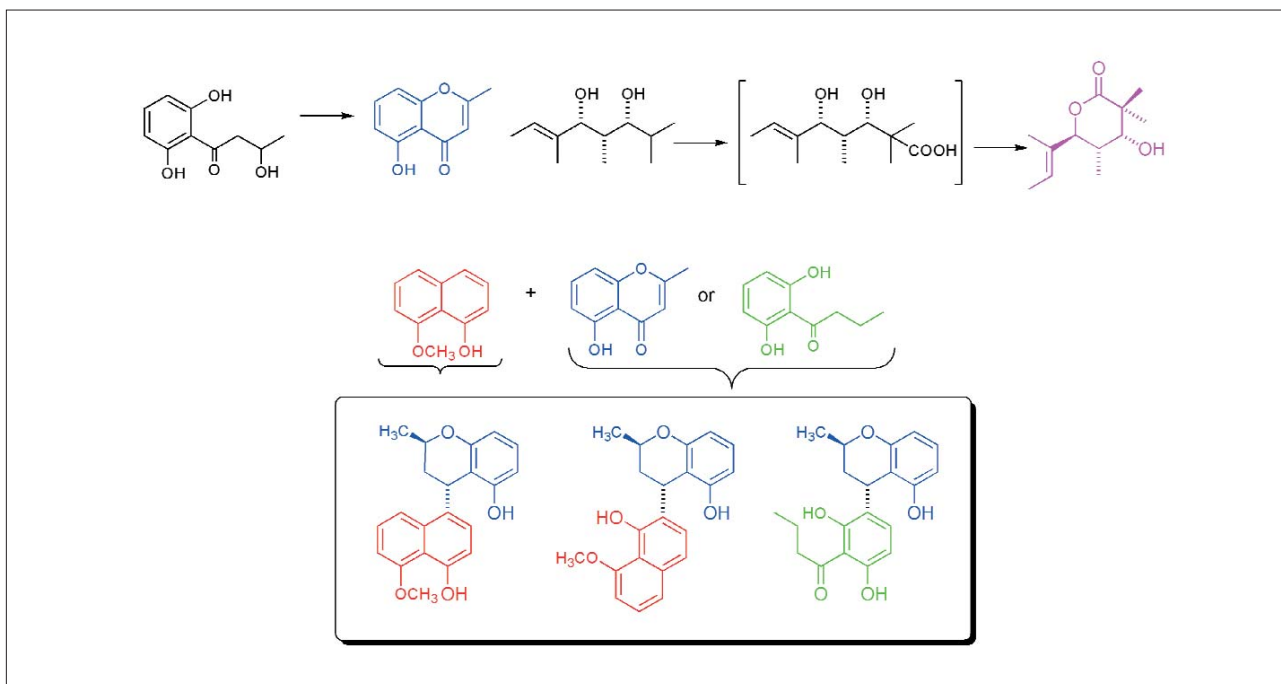


Abb. 12. Diversität aufgrund der Koexistenz von offenkettigen und cyclischen sowie monomeren und dimeren Strukturen.

Referenzen:

- [1] R. Reiner, *Antibiotika und ausgewählte Chemotherapeutica*, Georg Thieme Verlag **1974**.
- [2] D. J. Newman, G. M. Gragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
- [3] C. Walsh, *Antibiotics: actions, origins, resistance*, ASM Press, Washington, DC **2003**.
- [4] H. Sauter, W. Steglich, T. Anke, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1416-1438.
- [5] U. Höller, A. D. Wright, G. F. Matthée, G. M. König, S. Draeger, H.-J. Aust, B. Schulz, *Mycological Res.* **2000**, *104*, 1354-1365.



Karsten KROHN (1944) Seit 1991 Lehrstuhlinhaber der Department Chemie der Universität Paderborn. Zwischen 1994-1997 Dekan des Fachbereichs Chemie und Chemietechnik der Universität Paderborn. Ehrenmitglied des Humboldt-Vereins Ungarn (2002). Seit 2002 Mitherausgeber des *J. of Antibiotics*, des *J. Carbohydr. Chem.* und von „ARKIVOK“ (elektronische Zeitschrift für Organische Chemie).