

University of Groningen

Das Gift des Fliegenpilzes

Obermaier, Sebastian; Müller, Michael

Published in:
 Chemie in unserer zeit

DOI:
[10.1002/ciuz.202000085](https://doi.org/10.1002/ciuz.202000085)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
 Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
 2022

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
 Obermaier, S., & Müller, M. (2022). Das Gift des Fliegenpilzes: Von den Geheimnissen des Narrenschwamms. *Chemie in unserer zeit*, 56(4), 256-264. <https://doi.org/10.1002/ciuz.202000085>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Von den Geheimnissen des Narrenschwamms

Das Gift des Fliegenpilzes

SEBASTIAN OBERMAIER | MICHAEL MÜLLER

Die Natur ist eine Meisterin der Chemie: Unzählige Naturstoffe werden von ihr hervorgebracht. Deren Entstehungsprozess aufzudecken ist seit jeher ein faszinierendes Forschungsobjekt. Der Fliegenpilz soll uns als Beispiel dienen und uns mit auf eine Reise zur Biosynthese seiner Giftstoffe nehmen. Ein anschließender Exkurs zeigt die geschichtliche Entwicklung der Biosyntheseforschung, die in den letzten Jahrzehnten eine wahre Verwandlung durchlebt hat.

Naturstoffe waren lange für die Menschheit von zentraler Bedeutung und sind es noch immer: vom Indigo-Blau, über Antibiotika wie Penicillin zum allgegenwärtigen Aromastoff Vanillin. Die organische Chemie beschäftigt sich

deshalb seit jeher mit der Bestimmung ihrer chemischen Struktur und mit ihrer Totalsynthese im Labor. Je nach Komplexität des Moleküls kann dies mehrere Jahre oder gar Jahrzehnte in Anspruch nehmen, und das bei teilweise sehr kleinen Ausbeuten. Doch wie macht das eigentlich die Natur? Diese Frage ist sicherlich genauso interessant: sei es, um die wissenschaftliche Neugier zu befriedigen, um neuartige Enzyme zu entdecken, um Biosynthesewege aufzuklären und biotechnologisch zu nutzen, um die Selektivität der beteiligten Reaktionen zu verstehen – oder um, auf umgekehrtem Weg, neue Naturstoffe zu finden.

Woher kommt das Gift des Fliegenpilzes?

Der Fliegenpilz, *Amanita muscaria*, ist durch seinen leuchtend roten Hut mit weißen Sprenkeln wohl der auffälligste unter den Waldpilzen. Dieses Aussehen in Kombination mit seiner Giftigkeit hat ihn zu einer regelrechten Berühmtheit gemacht. Wer aufmerksam ist, dem begegnet er überall, nicht nur im Wald: als Glückssymbol, als rot-weißes Ziermuster, in Vorgärten, als Spielzeug; er ist der „erfolgreichste“ unter den Pilzen.

Seine Giftwirkung ist zurückzuführen auf die beiden Naturstoffe Ibotensäure und Muscimol (Abbildung 1). Erstere ist eine ungewöhnliche Aminosäure, welche einen unter Naturstoffen relativ seltenen Heterozyklus, einen Isoxazolring, beinhaltet. Dieser Heterozyklus besitzt eine ähnliche Größe und Polarität wie eine Carbonsäuregruppe und kann daher letztere ersetzen (man nennt diese Ähnlichkeit auch Bio-Isosterie). Dies macht Ibotensäure strukturell ähnlich zum Neurotransmitter Glutamat, und erklärt ihre aktivierende Wirkung an menschlichen Glutamatrezeptoren [1]. Interessanterweise ist Ibotensäure auch an Geschmacksrezeptoren im Mund dem Glutamat ähnlich: Sie soll einen ausgeprägten Umami-Geschmack besitzen [2] (was aber nicht fälschlich als Aufforderung verstanden werden sollte!).

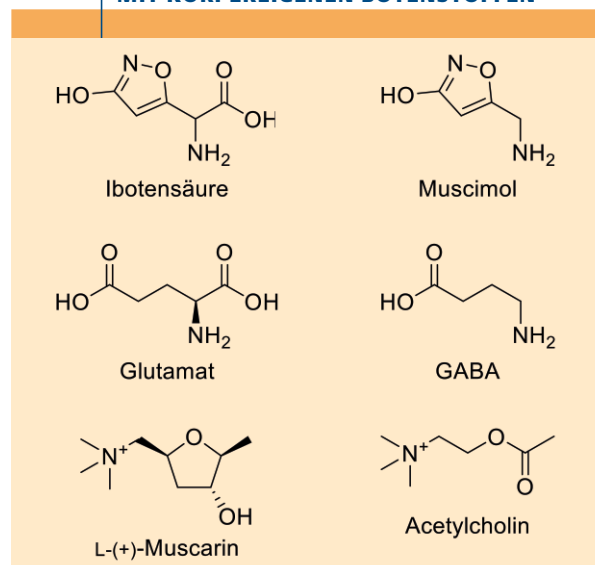
Durch Decarboxylierung entsteht im Pilz aus Ibotensäure das Muscimol. Das Alkaloid ist bio-isoster zu einem weiteren Neurotransmitter: γ -Aminobuttersäure (GABA). Demensprechend wirkt Muscimol als Agonist an GABA-Rezeptoren [3]. Die Wirkung des Fliegenpilzes auf den Menschen ist vor allem auf Muscimol zurückzuführen: Koordinationsstörungen, Schwindel, Übelkeit, Euphorie oder Dysphorie, bis hin zu Wahrnehmungsveränderungen [4]. Die Bandbreite der beschriebenen Folgen des (beabsichtigten oder unbeabsichtigten) Genusses von Fliegenpilzen ist sehr breit, und scheint von einigen Faktoren abzuhängen. Nicht zuletzt ist die Konzentration an Wirkstoffen in den Pilzen sehr variabel. Bei unseren eigenen Untersuchungen kam es vor, dass in manchen gesammelten Exemplaren Ibotensäure nur in Spuren zu finden war, während andere Pilze ein Vielfaches enthielten.

Weiterhin finden sich im Narrenschwamm auch Spuren eines völlig anderen Giftstoffes: Mit „Muscarin“ wurde er sogar nach dem Fliegenpilz benannt (lat. *musca*, Fliege); und das, obwohl andere Pilze weitaus mehr Muscarin enthalten. So produzieren Risspilze (*Inocybe*) erheblich größere Mengen an Muscarin, was sie zu gefährlichen Giftpilzen macht [4]. Ähnlich wie die oben beschriebenen Substanzen wirkt auch Muscarin als „Imitator“ eines Neurotransmitters im menschlichen Nervensystem: Acetylcholin (Abbildung 1).

Neben dem Aussehen und der Giftigkeit hat der Fliegenpilz noch eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft: seinen Namen. Leider ist dessen Ursprung nicht abschließend geklärt. Eine sehr naheliegende Erklärung ist die überlieferte Verwendung als natürliches Fliegengift [4], denn Ibotensäure und Muscimol wirken nicht nur auf den Menschen, sondern auch auf Insekten. Diese Eigenschaft machte man sich angeblich in manchen Gegenden zu Nutze, um unliebsame Gäste zu töten. Bei wissenschaftlichen Untersuchungen der Giftstoffe um 1965 zeigte sich jedoch Überraschendes: In der Tat erlebten Stubenfliegen (*Musca domestica*) zwar innerhalb einiger Minuten nach Fliegenpilzverzehr Bewegungsausfälle,



ABB. 1 | ÄHNLICHKEIT DER FLIEGENPILZ-GIFTSTOFFE MIT KÖRPEREIGENEN BOTENSTOFFEN



Strukturformeln von Ibotensäure, Muscimol, Glutamat und GABA, Muscarin und Acetylcholin.

die sich bis zur gänzlichen Leblösigkeit ausweiteten. Jedoch erwachten die scheinototen Insekten nach über 50 Stunden wieder – falls die Dosis nicht zu groß war. Die Autoren fügten hinzu: „Diese Behandlung kann nach Belieben an den Fliegen wiederholt werden, ohne dass übermäßig schädliche Effekte beobachtet werden“ [5]. Der Gebrauch als Fliegenfalle scheint also wenig nachhaltig zu sein, und sei deshalb hier nicht empfohlen.

Es könnte aber auch sein, dass der Name Fliegenpilz eher etwas mit der psychotropen Wirkung auf den Menschen zu tun hat. Fliegen als Symbol des Wahnsinns? Oder hinterlässt der Pilz bei Verzehr einen Eindruck des Fliegens durch die Lüfte [6]? Dafür spräche auch ein anderer Name: Narrenschwamm. Tatsächlich kann der Konsum des Pilzes zu ausgeprägten psychischen Wirkungen führen. Allerdings widersprechen sich die Berichte darüber, welche Art von Wirkung sich zeigt. Die Beschreibungen reichen von einer Art Trunkenheit mit Verwirrung, Schwindel und starker Müdigkeit bis hin zu tiefergreifenden Veränderungen in Wahrnehmung und Denken. Teilweise wird von visuellen und auditiven Effekten gesprochen [4]. Die Unterschiede in

den beschriebenen Effekten mögen unter anderem durch die extremen Unterschiede im Gehalt von Muscimol und Ibotensäure zu erklären sein. Konsistenter wird vor allem von einer begleitenden Übelkeit gesprochen.

Diese Wirkungen des Narrenschwamms wurden von einigen Völkern sowohl spirituell als auch hedonistisch genutzt. So berichtet LANGSDORFF von Beobachtungen während seines Aufenthalts in Kamtschatka (Ostasien) 1806–1807,

dass die indigene Bevölkerung der Kamtschadalen den Konsum der Fliegenpilze demjenigen des Alkohols vorgezogen haben soll. Diese Liebe ging laut seinen Berichten so weit, dass der Urin von Fliegenpilz-berauschten getrunken wurde, da wohl ein erheblicher Anteil der Wirkstoffe darüber ausgeschieden wird [7]. In unseren Breiten scheint der Gebrauch der Pilze von keiner großen Bedeutung (mehr) zu sein.

Biosynthese der Giftstoffe aufklären

Der Fliegenpilz ist also aus chemischer Sicht durchaus vielversprechend. Die Strukturformeln der beiden Giftstoffe sind seit den oben erwähnten Tierversuchen bekannt. Doch eine grundlegende Information fehlt: Wie entstehen diese Giftstoffe im Pilz? Trotz der Bekanntheit des Pilzes und der beiden Giftstoffe war bis vor Kurzem nichts über deren Entstehung bekannt. Wir wollen anhand dieses Beispiels die Vorgehensweise moderner Biosynthese-Aufklärung erläutern, die wie das Vordringen in eine „weiße Landkarte“ verstanden werden kann.

Die Biosynthese eines Naturstoffs beginnt mit der chemischen Modifikation eines oder mehrerer **Primärmetabolite** (siehe Infokasten 1) mittels Enzymen. Diese Enzyme sind oft spezialisiert für ihre Aufgabe zur Produktion des Naturstoffs, und mehrere Enzyme arbeiten sozusagen Hand in Hand, um eine mehrstufige Biosynthese zu vollziehen. Enzyme sind Proteine, und als solche werden sie im Erbgut durch Gene codiert. Bei Bakterien und Pilzen sind die Gene einer Biosynthese oftmals direkt nebeneinander auf der DNA lokalisiert; sie bilden **Biosynthese-Gencluster**. Dieses gemeinsame Auftreten von Genen, die eine gemeinsame Funktion besitzen, lässt sich gut dazu nutzen, um einem Naturstoff seine jeweiligen Biosynthese-Gene zuzuordnen. Oft lassen sich aus der Struktur des Naturstoffs Voraussagen über die erwarteten Enzyme machen. Das Erbgut des Organismus



kann dann auf Gencluster mit den vorausgesagten Funktionen durchsucht werden.

Das gesamte Erbgut, auch **Genom**, von *A. muscaria* ist vollständig sequenziert und frei zugänglich. Ibotensäure selbst ist eine α -Aminosäure, so wie auch die Grundbausteine von Proteinen und Peptiden. Daher liegt der Verdacht nahe, dass Ibotensäure durch Modifikation aus einer Aminosäure des Primärstoffwechsels entsteht. Wie wir bereits gesehen haben, ist Ibotensäure bio-isoster zu Glutamat: Sie besitzt fünf Kohlenstoffatome und in γ -Position ein Carbonsäurederivat (eine cyclische Hydroximsäure). So ist es nicht unwahrscheinlich, dass Ibotensäure aus Glutamat entsteht, oder möglicherweise aus dem verwandten Glutamin.

Diese theoretischen Betrachtungen wurden bereits in den 1960er Jahren angestellt. Kurz nachdem die Struktur von Ibotensäure und Muscimol aufgeklärt wurde, machten

EUGSTER und Mitarbeiter die Beobachtung, dass im Fliegenpilz mit 4-Hydroxypyrrolidon ein weiterer Metabolit vorkommt, welcher strukturell mit den Giftstoffen verwandt ist. Die Gruppe suchte daher eine gemeinsame Erklärung sowohl für Ibotensäure als auch für 4-Hydroxypyrrolidon. Sie fanden diese Erklärung in einer hydroxylierten Form des Glutamats. Der hypothetische Biosyntheseweg, den

die Gruppe vorschlug, war somit: A) 3-Hydroxyglutamat wird durch Decarboxylierung und Ringschluss zu 4-Hydroxypyrrolidon, und B) 3-Hydroxyglutamat wird durch Einführung eines Stickstoffs, Ringschluss und Oxidation zur Ibotensäure (Abbildung 2) [8].

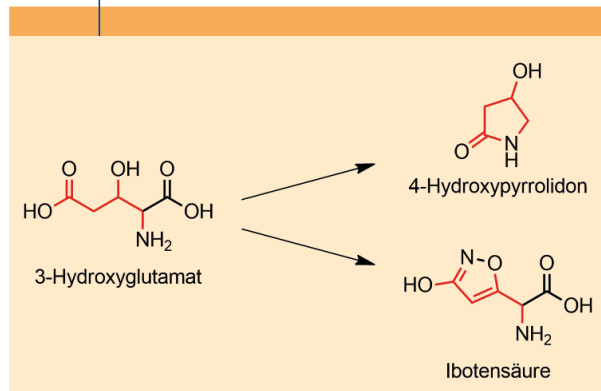
Mit diesem Wissen ausgestattet, haben wir nun schon eine Hypothese zum ersten Schritt in der Biosynthese der Fliegenpilzmetabolite: Hydroxylierung von Glutamat in Position 3. Doch wie kann das entsprechende Enzym identifiziert werden? Eine Möglichkeit wäre die Isolierung des Enzyms aus dem Fliegenpilzgewebe, geleitet durch Aktivitätstests. Dazu würde man testen, ob Fliegenpilz-Extrakte

1: METABOLITE

Alle Lebewesen produzieren oder nutzen Stoffe, die sie mit anderen Lebewesen gemein haben, so zum Beispiel Zucker, Aminosäuren und Lipide. Diese Substanzen sind oftmals lebensnotwendig und werden zu den **Primärmetaboliten** gerechnet. Manche Organismen produzieren aber auch Substanzen, die in nur wenigen Arten vorkommen und nicht unmittelbar für deren Überleben notwendig sind. Daher wurde eine, etwas willkürliche, Unterscheidung in die lebensnotwendigen Primärmetabolite und die „optionalen“ **Sekundärmetabolite** eingeführt. Letztere sind chemisch sehr divers und können für ihre Produzenten vielen Zwecken dienen, wie zum Beispiel der Signalübertragung, der Abwehr von Konkurrenten, der Nährstoffaufnahme und dem

Schutz vor Umwelteinflüssen. Viele dieser Stoffe konnten jedoch noch keiner genauen Funktion zugeordnet werden. Tatsächlich ist die Zuordnung einer Substanz zum Primär- oder Sekundärmetabolismus oftmals nicht eindeutig möglich. So können unter bestimmten Bedingungen Substanzen für den Organismus essentiell sein, wohingegen dieselben Substanzen unter anderen Bedingungen eine andere oder gar keine Rolle einnehmen können. Daher wird oftmals der Ausdruck „Naturstoff“ als weitgehendes Synonym zu „Sekundärmetabolit“ benutzt. Sekundärmetabolite kommen in verschiedensten Organismen vor, wie etwa Pflanzen, Tieren, Bakterien und Pilzen. Insbesondere die letzten beiden sind eine schier unerschöpfliche Quelle von Naturstoffen.

ABB. 2 | HYPOTHESE



3-Hydroxyglutamat als hypothetische Vorstufe von Ibotensäure und 4-Hydroxypyrrolidon im Fliegenpilz [8].

in der Lage sind, Glutamat zu hydroxylieren. Die Gesamtproteine würden dann in immer kleinere Fraktionen aufgetrennt werden, bis man bei der reinen Hydroxylase ankommt. Diese Möglichkeit ist zwar prinzipiell einfach, kann aber technisch bald zu Problemen führen, und man hat keine Garantie, dass man ein reines Enzym erhalten wird. Wir wollen daher einen anderen Weg beschreiten und dem entsprechenden Gen bioinformatisch auf die Spur kommen. Dazu können wir uns zu Nutze machen, dass Enzyme mit ähnlicher Funktion oft aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind und damit verwandt sind. Dies spiegelt sich in einer ähnlichen Abfolge von Aminosäuren – der Aminosäure-Sequenz – wider. Je näher verwandt zwei Enzyme sind, desto ähnlicher sind sich auch ihre Sequenzen.

WAS MAN WISSEN MUSS

Die Fliegenpilzgifte Ibotensäure und Muscimol werden im Pilz aus Glutamat hergestellt. Die Grundgerüste von (oligomeren) Naturstoffen werden über drei Hauptwege biosynthetisiert.

Auch Abweichungen dieser Hauptprinzipien sind möglich.

Bioinformatisch lassen sich oft Biosynthese-Gencluster im Genom finden, die für die nötigen Enzyme codieren.

Biosynthese-Gene lassen sich in Modellorganismen exprimieren, um ihre Funktion zu untersuchen.

TAKE-HOME MESSAGE

The toxins ibotenic acid and muscimol are produced from glutamate in the fly agaric.

The scaffolds of natural substances are biosynthesized via three main pathways.

Deviations from these main principles are also possible.

Bioinformatics can often identify biosynthetic gene clusters in the genome that code for the necessary enzymes.

Biosynthesis genes can be expressed in model organisms to study their function.

Die bioinformatische Spur führt uns zu einem weiteren Naturstoff, dessen Struktur 3-Hydroxyglutamin enthält, nämlich dem Peptid Pneumocandin B₀. Dessen Biosynthese-Gencluster im Schimmelpilz *Glarea lozoyensis* ist bereits seit längerem bekannt, und enthält neben einem NRPS-Gen (siehe unten) auch eine Glutamin-Hydroxylase [9]. Deren Sequenz ist in der DNA des Gens festgeschrieben, und kann

TAB. 1 | MEILENSTEINE IN DER BIOSYNTHEFORSCHUNG VON NATURSTOFFEN

Jahr	Ereignis	Personen
1804	Isolation von Morphin aus dem Schlafmohn, <i>Papaver somniferum</i>	F. Sertürner, A. Séguin, B. Courtois
1837	Hefe wird als Mikroorganismus erkannt	C. Cagniard de la Tour, T. Swann, F. Kuetzing
1858	Prägung des Wortes „Biochemie“; vorher bekannt als „physiologische Chemie“	V. Kletzinsky
1878	Das Wort „Enzym“ wird eingeführt	W. F. Kühne
1926/1930	Enzyme werden als (reine) Proteine erkannt	J. B. Sumner, J. H. Northop, W. M. Stanley
1937	Aufklärung des Citratzyklus	H. A. Krebs, W. A. Johnson, Vorarbeiten von A. Szent-Györgyi
1955	Hypothese der Polyketid-Biosynthese aus Acetateinheiten bestätigt (¹⁴ C-markiert)	A. Birch, Vorarbeiten von J. Collie
1959	Enzymatische Synthese von Farnesylpyrophosphat <i>in vitro</i>	F. Lynen
1961	Enzymatische Synthese von 6-Methylsalicylsäure <i>in vitro</i>	F. Lynen
1970	Reinigung der nicht-ribosomalen Peptidsynthetase des Tyrocidins	F. Lipmann, K. Kurahashi
1984	Klonierung des Biosynthese-Genclusters von Actinorhodin	D. A. Hopwood
1995	Sequenzierung des ersten vollständigen Genoms: das Bakterium <i>Haemophilus influenzae</i>	J. C. Venter

2: SEQUENZANALYSE – INFORMATIK DER DNA

Die Erbinformation aller Lebewesen ist in deren Zellen festgeschrieben; pro Zelle einmal. Diese Information ist in einem gigantischen Molekül codiert, der DNA. Die Abfolge der einzelnen DNA-Bestandteile – der „Buchstaben“ A, T, C und G – wird Sequenz genannt. In dieser DNA-Sequenz wiederum ist die Aminosäure-Sequenz für alle vielen tausend verschiedenen Proteine einer Zelle codiert, und damit ihr Bauplan. Für den Menschen ist diese Abfolge an Aminosäuren allerdings wenig aussagekräftig.

Um die Funktion eines Proteins zu verstehen, kann es hilfreich sein, dessen Aminosäure-Sequenz mit bereits bekannten zu vergleichen. Dies geschieht in Datenbanken, in denen Wissenschaftler die Sequenzen bereits untersuchter Proteine hinterlegen können. Diese Datenbanken sind riesig und enthalten Millionen von Einträgen. Um nun die ähnlichsten Einträge einer unbekannt Sequenz zu finden, kann man zum Beispiel das Werkzeug BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) nutzen – sozusagen eine Suchmaschine für Proteinsequenzen. Sie gleicht in beeindruckender Geschwindigkeit die Suchsequenz mit allen Zielsequenzen in der Datenbank ab und zeigt die ähnlichsten Treffer. Wenn die Ziel- und Suchsequenzen sehr gut übereinstimmen, macht das wahrscheinlich, dass die beiden Proteine die gleiche Funktion haben. Stimmen sie etwas weniger überein, dann haben sie vermutlich zumindest eine ähnliche Funktion (in unserem Beispiel: Hydroxylierung von Aminosäuren). Durch weitere Sequenzanalyse-Werkzeuge lassen sich außerdem viele andere Eigenschaften von unbekannt Proteinen voraussagen: ihre 3D-Struktur, ihre Verwandtschaft mit anderen Proteinen, ihre Evolution, ihre Lage innerhalb der Zelle und vieles mehr.

leicht ausgelesen werden. Daher können wir die Sequenz dazu verwenden, um im Genom von *Amanita muscaria* nach einem ähnlichen Protein zu suchen. Wir füttern ein Programm mit der Sequenz der Hydroxylase aus *Glarea* und bereits nach kurzer Zeit spuckt es eine Liste ähnlicher Proteine aus dem Fliegenpilz-Genom aus. Und tatsächlich findet sich an oberster Stelle der Liste ein Treffer: Mit 43 % Sequenzidentität ist das identifizierte Protein erstaunlich

nahe am *Glarea*-Protein, vor allem, wenn man bedenkt, dass *Glarea* und *Amanita* nicht besonders nahe miteinander verwandt sind.

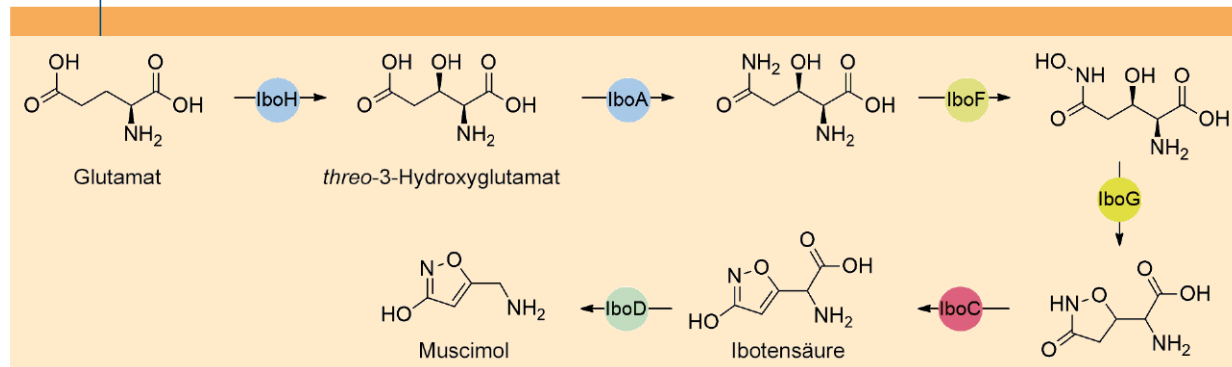
Aufgrund der vermuteten Beteiligung an der Ibotensäure-Biosynthese nennen wir das gefundene Gen *iboH* – *ibo* als Abkürzung für die Gene des vermuteten Ibotensäure-Genclusters, und einem zusätzlichen Buchstaben für die Funktion „Hydroxylierung“. Auf diese oder ähnliche Weise werden viele Gene benannt; meist werden Gene kursiv und klein geschrieben, die dazugehörigen Proteine normal und mit einem Großbuchstaben am Anfang.

Wir erinnern uns, dass in Pilzen biosynthetische Gene oft in Clustern organisiert sind. Sehen wir uns nun die direkte genetische Umgebung von *iboH* an, finden wir fünf weitere Gene. Durch BLAST (s. Infokasten 2) und andere Sequenzanalysen erkennen wir, dass diese Gene für folgende Enzyme codieren könnten: zwei Oxidasen, ein Carboxyl-aktivierendes Enzym, ein Pyridoxalphosphat-abhängiges Enzym (in zweifacher Ausführung) und eine Decarboxylase. Passen diese Enzyme zur vermuteten Biosynthese? In der Tat.

Abbildung 3 zeigt die mutmaßlichen Rollen der einzelnen Enzyme. Von 3-Hydroxyglutamat zu Ibotensäure bedarf es zwei Oxidationsschritte (zwei Oxidasen: das Flavin-abhängige IboF und das Cytochrom P450 IboC), der Ausbildung einer Amidbindung (das Carboxyl-aktivierende Enzym IboA) und eines Ringschlusses (das Pyridoxalphosphat-abhängige Enzym IboG). Entfernen der Carboxylgruppe durch die Decarboxylase IboD ergibt anschließend Muscimol. Damit haben wir den hypothetischen Biosynthese-Gencluster der Ibotensäure gefunden.

Wir finden eine weitere Stütze dieser Hypothese in Daten zur Genexpression von *A. muscaria*: Unterschiedliche Kultivierungsbedingungen führen zu paralleler Veränderung der Expression genau dieser Gene. Die Gene des Clusters werden unter bestimmten Bedingungen zeitgleich hochreguliert. Diese parallele Expression deutet stark auf eine gemeinsame Funktion der Gene hin und stützt unsere Annahme.

ABB. 3 | ENZYME



So könnte die Biosynthese von Ibotensäure und Muscimol ablaufen. Die genaue Abfolge der Reaktionen und die Funktionen der einzelnen Enzyme sind noch nicht abschließend geklärt. IboA: Carboxyl-aktivierendes Enzym, IboC: CYP-Oxidase, IboF: Flavin-Oxidase, IboG: Pyridoxalphosphat-Enzym, IboD: Decarboxylase.

Nun wollen wir die Hypothese biochemisch überprüfen. Als erste Wahl bietet sich hier IboH an, die vermutete Glutamat-Hydroxylase. Um deren Funktion zu bestimmen, wollen wir sie in Reinform erhalten. Hier zeigt sich ein großer Vorteil moderner Biotechnologie: Man kann Gene und deren zugehörige Enzyme unabhängig vom ursprünglichen Organismus untersuchen. Dazu können wir das *iboH*-Gen in einen neuen Wirtsorganismus überführen, welcher das codierte Enzym in großen Mengen produziert. Dazu eignet sich hervorragend das Modellbakterium *Escherichia coli*, welches seit Jahrzehnten zu diesem Zweck eingesetzt wird, und in der Lage ist, sehr große Mengen „fremdes“ Protein in den Zellen herzustellen.



Das *iboH*-Gen wird in einen sogenannten Vektor (ein Plasmid) eingebracht, welcher vom Bakterium aufgenommen werden kann. Dieser Vektor vermehrt sich in den Zellen und ermöglicht es, das Gen abzulesen und dessen codiertes Enzym zu produzieren. Werden die biotechnologisch veränderten Bakterien nun unter den richtigen Bedingungen kultiviert, bildet sich das Protein in großen Mengen, und es reichert sich in den Zellen an. Letztere werden aufgebrochen, und das Protein kann gezielt isoliert werden. Damit haben wir einen relativ unkomplizierten Zugang zu reinem Enzym. Dieses kann nun auf seine Funktion untersucht werden.

Dazu bieten wir dem Enzym drei Zutaten an: Sauerstoff aus der Luft (dieser wird als Oxidationsmittel benötigt), 2-Oxoglutarat (als Cosubstrat, also ein von dem Enzym zusätzlich benötigtes Substrat) und entsprechend unserer Hypothese entweder Glutamat oder Glutamin (als verdächtige Substrate). Um eine etwaige Produktbildung zu erkennen, brauchen wir noch eine geeignete Analysemethode. Bei enzymatischen Reaktionen wird typischerweise mit sehr verdünnten Lösungen gearbeitet (im mikromolaren Bereich). Für solch geringe Mengen eignen sich am besten chromatographische Methoden. Wir verwenden hier die Gas-Chromatographie (nach Derivatisierung) gekoppelt mit Massenspektrometrie (GC-MS). Diese Detektion hat den Vorteil, dass wir direkt chemische Informationen bekommen, etwa Molekülmasse und Fragmentierungsmuster.

Aus der Analyse der Enzymtests ergeben sich folgende Ergebnisse: Glutamin blieb unverändert im Ansatz, während mit Glutamat als Substrat ein neuer Peak im Chromatogramm auftauchte. Die beobachtete Fragmentierung passt zu 3-Hydroxyglutamat. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, führen wir den Enzymansatz in größerem Maßstab durch und isolieren das neu gebildete Produkt, wozu wir einige Milligramm benötigen. Das mag sich zwar nach sehr wenig anhören, kann aber bei besonders widerwilligen Enzymen eine große Herausforderung darstellen.

Wir haben Glück. Nach Ausprobieren von verschiedenen Verfahren erhalten wir eine genügende Menge des

Produkts. ¹H-NMR-Spektroskopie ergibt ein Spektrum, das wir eindeutig einem literaturbekannten Stoff zuordnen können: dem *threo*-Diastereomer des 3-Hydroxyglutamats (Abbildung 4). Passenderweise können wir mit der gaschromatographischen Analyse auch in gesammelten Fliegenpilzen kleine Mengen von 3-Hydroxyglutamat identifizieren – das hypothetische Zwischenprodukt kommt also tatsächlich im Fliegenpilz vor. Nachzulesen sind diese Ergebnisse in einem kürzlich erschienenen Artikel [10].

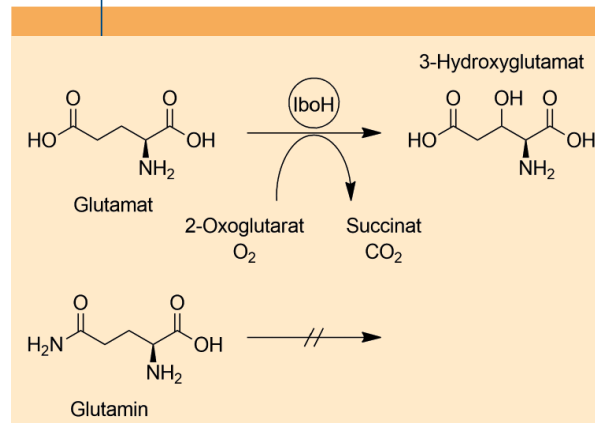
Biosyntheseforschung im Wandel

So wie oben dargestellt lief die Naturstoff-Forschung natürlich nicht immer ab. Die Entwicklung neuer Techniken und Geräte hat, wie überall, den Ablauf deutlich verändert (Infokasten 3). Speziell in den letzten zwei Jahrzehnten kam mit der „Genom-Ära“ neuer Wind in die Biosyntheseforschung. Doch bereits vorher wurden mächtige Schritte gemacht.

Die Geschichte der Erforschung von definierten Naturstoffen mit zugeordneter Bioaktivität begann mit der Isolation des **Alkaloids** Morphin; SERTÜNER extrahierte im Jahr 1804 einen Stoff aus dem Schlafmohn (beziehungsweise dessen getrockneten Milchsafte Opium), den er Morphium nannte [11]. Erst etwa 120 Jahre später wurde die heute gültige Strukturformel von Morphin aufgestellt [12]. Nach und nach kamen immer mehr Strukturformeln verschiedener Sekundärmetabolite hinzu.

Trotz der erstaunlichen Vielfalt der Naturstoffe ließen sich einige wenige gemeinsame Prinzipien in ihren Strukturen erkennen. So kann ein Großteil der Naturstoffe einer von drei strukturellen Gruppen zugerechnet werden: Polyketide, nicht-ribosomale Peptide und Terpene (Abbildung 5). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Kombinationen und weitere Substanzgruppen, wie Alkaloide (Stickstoff-

ABB. 4 | HYDOXYLIERUNG



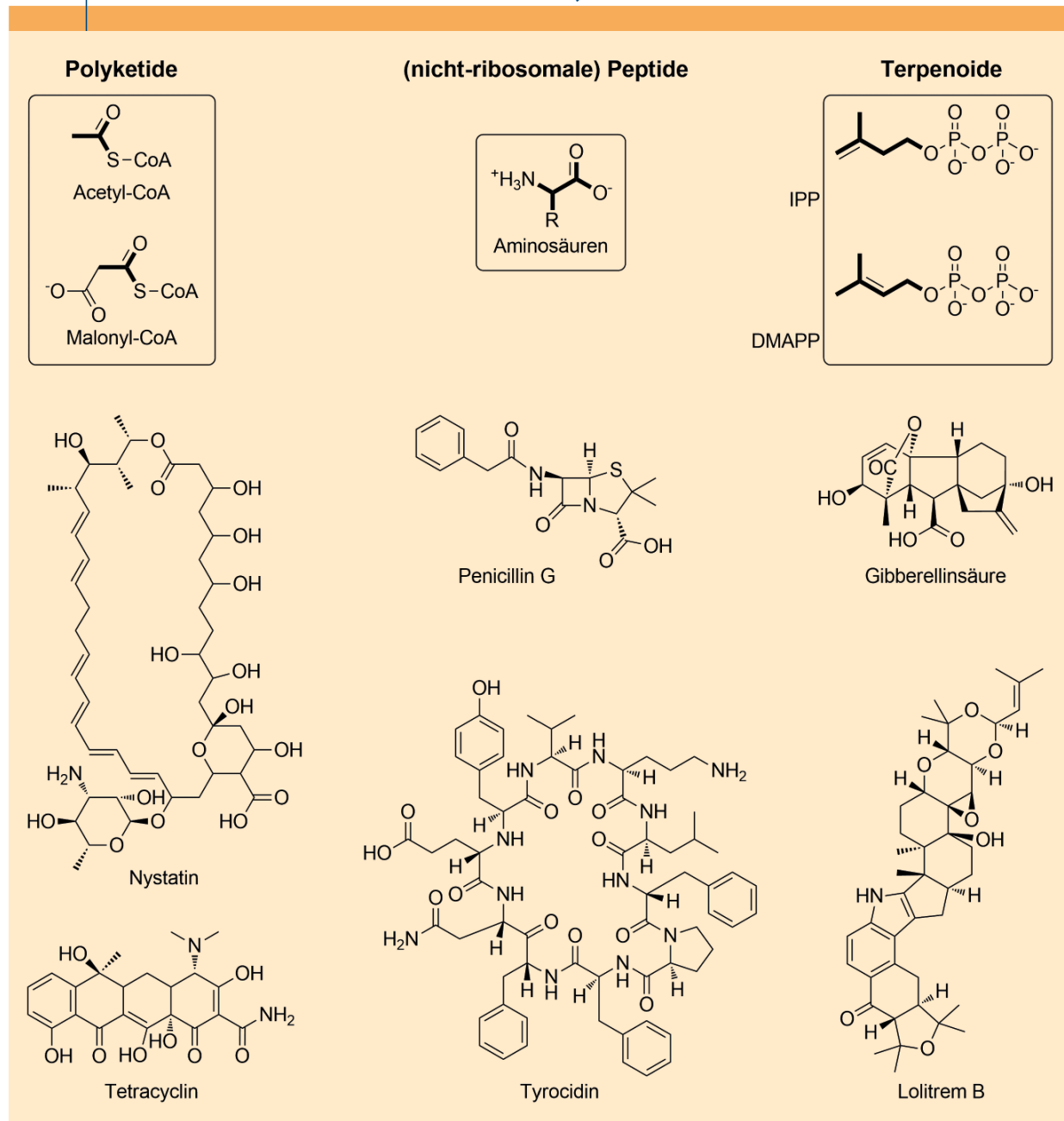
Enzymatische Hydroxylierung von Glutamat durch das Fliegenpilz-Enzym IboH. Glutamin wird nicht umgesetzt.

3: NEUE METHODEN ERMÖGLICHEN FORTSCHRITTE IN DER FORSCHUNG

Die Durchbrüche in der Naturstoffforschung gingen einher mit methodischen Fortschritten. Diese umfassten chromatographische Reinigungsverfahren (wie Dünnschichtchromatographie und Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie HPLC), spektroskopische Methoden (wie NMR, Massenspektrometrie MS und chiroptische Methoden), gekoppelte Verfahren wie HPLC-MS,

molekularbiologische Techniken (wie PCR und Genom-Sequenzierung), und nicht zuletzt bioinformatische Beiträge. Die Röntgenstrukturanalyse und in jüngster Zeit Kryoelektronenmikroskopie sind entscheidende methodische Fortschritte bei der Aufklärung der Struktur und Funktion der biochemischen Katalysatoren: Enzyme und Multi-Enzym-Komplexe.

ABB. 5 | BEISPIELE VON NATURSTOFFEN DER POLYKETIDE, NICHT-RIBOSOMALEN PEPTIDE UND TERPENOIDE



Tetracyclin, Tyrocidin und Penicillin G sind Antibiotika, Nystatin ein Antimykotikum, Gibberellinsäure ein Pflanzenhormon, welches auch von Pilzen produziert wird und Lolitrem B ist ein Mykotoxin.

enthaltende Naturstoffe), die nicht einem gemeinsamen Weg zugeordnet werden können.

Eine der wohl bekanntesten Gruppen sind die Polyketide, zu denen viele pharmazeutisch genutzte Stoffe gehören, darunter so verschiedene Klassen wie Makrolactone (beispielsweise Antibiotika wie Erythromycin) und Polyphenole (zum Beispiel Antibiotika wie Tetracyclin und Abführmittel im Aloe-Extrakt). Jedoch war lange nicht bekannt, dass all diese Naturstoffe durch ein gemeinsames Biosyntheseprinzip entstehen. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts stellte Collie die Hypothese auf, dass aromatische Naturstoffe durch intramolekulare Kondensation aus Polyketonen entstehen könnten [13]. Obwohl er damit goldrichtig lag, wurden seine Arbeiten kaum zur Kenntnis genommen, geschweige denn überprüft. Erst Mitte der 1950er Jahre nahm das Thema mit den Experimenten von BIRCH Fahrt auf.

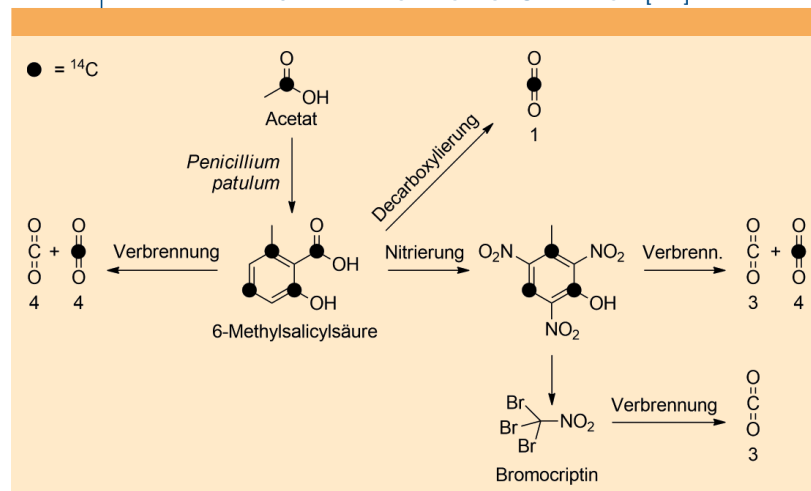
Birch erwartete, dass lineare Polyketone durch Kondensation von einzelnen Acetateinheiten entstehen, welche dann durch intramolekularen Ringschluss zu Polyphenolen führen würden. Um dies zu überprüfen, verfütterte er ^{14}C -isotopenmarkiertes Acetat (Essigsäure) an den Pilz *Penicillium griseofulvum* [14]. Er konnte zeigen, dass die radioaktiven Nuklide des Acetats in der 6-Methylsalicylsäure, einem der einfachsten Polyketide, auftauchen (Abbildung 6). Und das nicht einfach zufällig, sondern nach einem ganz regelmäßigen Muster. Durch gezielte, teils sehr kreative, Abbaureaktionen wurde klar, dass die Radioaktivität genau so verteilt war, wie durch „Kopf-an-Schwanz“-Kondensation von Acetat zu erwarten war [15]. Damit war die Polyketon-Hypothese bestätigt – und die Stoffgruppe bekam später den Namen **Polyketide**.

Der nächste Durchbruch kam schon kurz darauf, als die biochemischen Grundlagen der 6-Methylsalicylsäure-Biosynthese gelegt wurden. Im Vorfeld war bereits bekannt, dass auch Fettsäuren *in vivo* aus Acetateinheiten aufgebaut werden. Die entsprechenden Enzyme (Fettsäuresynthasen) wurden als große, multifunktionale Enzyme erkannt [13]. Hier kommt Acetyl-Coenzym A und ein ebenfalls aktivierter zweiter Baustein, das Malonyl-Coenzym A, zum Einsatz, welches an eine Starteinheit Acetyl-Coenzym A kondensiert wird. LYNNEN und TADA konnten dies auch für die entsprechende **Polyketidsynthase** (PKS) aus *Penicillium* zeigen; Umsetzung eines Zellextraktes mit Acetyl- und Malonyl-Coenzym A zusammen mit NADPH *in vitro* führte tatsächlich zur Bildung von 6-Methylsalicylsäure [13].

Wenig später gab es ähnliche Erfolge zur Biosynthese von **nicht-ribosomalen Peptiden**. Wie der Name verrät, sind dies peptidische Naturstoffe. Sie werden nicht wie Proteine an Ribosomen synthetisiert, sondern durch spezialisierte Enzyme. Dies wurde erstmals direkt mit gereinigten Enzymen aus *Bacillus brevis* beobachtet; Lipmann und



ABB. 6 | ABBAUREAKTIONEN DER MIT ^{14}C RADIOAKTIV MARKIERTEN 6-METHYLSALICYLSÄURE NACH [14]



Der extrahierte Naturstoff wurde durch vier Reaktionen untersucht, nämlich direkte Verbrennung, Decarboxylierung unter Hitze, Nitrierung und Nitrierung/Bromocriptin-Abbau. Die ersten beiden Methoden lieferten direkt CO_2 , an die letzteren wurde ein Verbrennungsschritt angeschlossen, um CO_2 zu erhalten. Nach Fällung als BaCO_3 (und $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$) wurde die Radioaktivität gemessen. Aus dem Verhältnis der Radioaktivitäten konnte die relative Anreicherung der Fraktionen mit ^{14}C errechnet werden.

Mitarbeiter erhielten damit aus Aminosäuren und ATP (der Energiewährung der Zellen) das Antibiotikum Tyrocidin [16]. Dies ist ein ringförmiges Peptid bestehend aus zehn Aminosäuren (Abbildung 5). Da die Versuchslösung keinerlei DNA oder RNA enthielt, war zugleich bewiesen, dass die Bildung nicht, wie bei der ribosomalen Proteinsynthese, durch Translation (Übersetzung des genetischen DNA-Codes) geschieht. Die Abfolge der Aminosäuren musste somit „in den Enzymen“ codiert sein. Heute ist bekannt, dass diese Enzyme mit den Polyketidsynthasen verwandt sind und nach einem ähnlichen Prinzip arbeiten: Die Aminosäuren werden nach und nach durch ATP aktiviert und zu einer Kette aufgebaut, ähnlich wie Polyketidsynthasen (PKS) aktiviertes Acetat oligomerisieren. Daher werden die Enzyme **nicht-ribosomale Peptidsynthetasen** (NRPS) genannt.

Eine weitere Gruppe von Naturstoffen sind die **Terpenoide**, welche sich formal aus einer variablen Anzahl von Isopentenyleinheiten ableiten.

Auch hierzu hat die Arbeitsgruppe um Lynen geforscht. Sie haben Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) Ende der 1950er Jahre als biologische Vorstufe der Terpenoide erkannt. Durch *In-vitro*-Analysen identifizierten sie ein Enzym, welches durch Kondensation aus zwei Molekülen IPP und einem Molekül DMAPP das Farnesylpyrophosphat synthetisiert [17]. Allgemein werden diese Enzyme **Prenyltransferasen** oder **Terpensynthasen** genannt. Je nachdem, wie viele Isopren-

einheiten eingebaut werden, erzeugen sie beispielsweise Moleküle mit C₅ (Hemiterpenoide), C₁₀ (Monoterpenoide), C₁₅ (Sesquiterpenoide) oder C₂₀ (Diterpenoide). Die nachgeschaltete Cyclisierung der linearen Produkte durch **Terpenoidcyclasen** erschließt ein weites Feld an Naturstoffen. Hierdurch wird aus den recht einförmigen Grundstrukturen eine schier unerschöpfliche, diverse Vielfalt an Sekundärmetaboliten generiert.

Der nächste große Fortschritt in der Biosyntheseforschung kam mit der Weiterentwicklung genetischer Methoden. Da Proteine von Genen codiert werden, war es ein bedeutender Fortschritt, DNA im Hochdurchsatz sequenzieren zu können. Kombiniert mit der Vervielfältigung von DNA über PCR und deren Überführung in Modellorganismen (Gentechnik) hat dies die biochemische Forschung nachhaltig verändert. Dies kulminierte in der Identifizierung des zusammenhängenden DNA-Abschnittes, der für die gesamte Produktion des Polyketids Actinorhodin verantwortlich ist.



Im Jahr 1984 übertrugen MALPARTIDA und HOPWOOD diesen DNA-Bereich aus *Streptomyces coelicolor* in einen verwandten Organismus, *Streptomyces parvulus*. Dieser Organismus war daraufhin selbst in der Lage, das leuchtend blau gefärbte Actinorhodin zu produzieren [18]. Spätere Sequenzierung der DNA zeigte, dass alle für die Biosynthese gebrauchten Gene nebeneinander auf dem Chromosom liegen – der erste Biosynthese-Gencluster war gefunden. Als Kernstück ist eine Polyketidsynthase (PKS) codiert, welche das Grundgerüst synthetisiert. Weiterhin sind sogenannte **tailoring enzymes** codiert, ein Oberbegriff für eine breite Palette an Enzymen, die biosynthetische Schritte am Grundgerüst katalysieren. Dazu gehören beispielsweise Enzyme für Hydroxylierung, Methylierung, Halogenierung, Glycosylierung, Reduktion, Isomerisierung, Cyclisierung und Dimerisierung.

Die Organisation von Biosynthese-Genen in Clustern ist weit verbreitet, speziell in Bakterien und Pilzen. Dies hat sich gezeigt, seitdem es möglich ist, komplette Genome von Organismen zu sequenzieren. Seit der ersten solchen **Genomsequenz** des Bakteriums *Haemophilus influenzae* erkannte man außerdem, dass es wesentlich mehr Biosynthese-Gencluster als bekannte Naturstoffe gibt; viele der Gencluster sind „still“, und ihr entsprechendes Produkt wird unter den meisten Wachstumsbedingungen nicht gebildet. Vor allem Pilze haben ein enormes biosynthetisches Potential. So sind in *Aspergillus*-Arten pro Genom zwischen 30 und 115 Biosynthese-Gencluster zu finden. In der Mehrzahl ist aber nicht bekannt, für welchen Naturstoff diese Cluster zuständig sind. Daher ist in der Genom-Ära nicht mehr das Auffinden von biosynthetischen Genen

oder Enzymen das Problem, sondern deren Zuordnung zu einem bekannten oder noch zu findenden Naturstoff. Strategien zur präzisen Voraussage der Strukturformel eines Naturstoffs aus der Gensequenz sind bisher nicht möglich. Aber wer weiß, vielleicht kann irgendwann die ganze chemische Vielfalt von Lebewesen am Computer reproduziert werden. Bis dahin ist aber vor allem eines gefragt: viel Laborarbeit.

Schlagwörter

Biosynthese, Fliegenpilz, Pilzgift, Ibotensäure, Gencluster.

Literatur

- [1] P. Krosggaard-Larsen, T. Honoré, J. J. Hansen, D. R. Curtis, D. Lodge, *Nature* **1980**, *284*, 64–66.
- [2] S. Yamaguchi, T. Yoshikawa, S. Ikeda, T. Ninomiya, *J. Food Sci.* **1971**, *36*, 846–849.
- [3] M. Chebib, G. A. R. Johnston, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1999**, *26*, 937–940.
- [4] D. Michelot, L. M. Melendez-Howell, *Mycol. Res.* **2003**, *107*, 131–146.
- [5] K. Bowden, A. C. Drysdale, G. A. Mogyey, *Nature* **1965**, *206*, 1359–1360.
- [6] Hans, E. Kothe, in *Pilzgeschichten*, Springer, Berlin, Heidelberg, **1996**, pp. 67–79.
- [7] G. H. von Langsdorff, in *Sammlung Auserlesener Abhandlungen Und Merkwürdiger Nachrichten Russ. Ärzte Und Naturforscher* (Ed.: J. Rehmann), St. Petersburg, Moskau, Riga, Leipzig, **1812**, pp. 55–68.
- [8] T. Matsumoto, W. Trueb, R. Gwinner, C. H. Eugster, *Helv. Chim. Acta* **1969**, *52*, 716–720.
- [9] H. Renata, E. Shimizu, C. R. Zwick, *Tetrahedron* **2021**, 132190, <https://doi.org/10.1016/j.tet.2021.132190>.
- [10] S. Obermaier, M. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, no. 30, 12432–12435.
- [11] I. Jurna, *Schmerz* **2003**, *17*, 280–283.
- [12] J. Gulland, R. Robinson, *Mem. Lit. Philos. Soc. Manchester* **1925**, *69*, 79–86.
- [13] F. Lynen, M. Tada, *Angew. Chemie* **1961**, *73*, 513–519.
- [14] J. Staunton, K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380–416.
- [15] A. Birch, R. Massy-Westropp, C. Moye, *Aust. J. Chem.* **1955**, *8*, 539.
- [16] R. Roskoski, W. Gevers, H. Kleinkauf, F. Lipmann, *Biochemistry* **1970**, *9*, 4839–4845.
- [17] F. Lynen, B. W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, E. M. Möslin, *Angew. Chemie* **1959**, *71*, 657–663.
- [18] F. Malpartida, D. A. Hopwood, *Nature* **1984**, *309*, 462–464.

Die Autoren

Michael Müller führte seine Promotion im Arbeitskreis von Wolfgang Steglich in München durch, und wurde, nach einem Aufenthalt in Seattle, Gruppenleiter am Forschungszentrum Jülich. Seit 2004 hat er eine Professur am Lehrstuhl für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Universität Freiburg inne.

Sebastian Obermaier wurde nach seinem Pharmaziestudium in München im Freiburger Arbeitskreis Müller promoviert. Dort führte er unter anderem die vorgestellten Arbeiten zur Ibotensäure-Biosynthese durch. Derzeit ist er Postdoktorand an der Universität Groningen.

Korrespondenzadresse:

s.obermaier@protonmail.com