

Die chemische Verteidigung des Rindenpilzes *Aleurodiscus amorphus* mithilfe eines maßgeschneiderten, Blausäure freisetzenden Cyanhydrinethers**

Bernhard L. J. Kindler und Peter Spiteller*

Die Orangefarbene Mehlscheibe (*Aleurodiscus amorphus* RABENH.) ist ein in Europa, Asien und Nordamerika heimischer Rindenpilz, der gelegentlich Äste und Zweige abgestorbener oder absterbender Weißtannen (*Abies alba*) überzieht.^[1] Bemerkenswerterweise werden die oft nur stecknadelkopfgroßen, kräftig rosa- bis orangefarbenen Pilzfruchtkörper praktisch nie angefressen. Wir berichten hier über die Entdeckung eines maßgeschneiderten Cyanhydrins, des Aleurodisconitrils (**1**; siehe Schema 1), das bei Verletzung der Fruchtkörper über einen bisher in der Natur unbekannten oxidativen Abbaumechanismus Blausäure freisetzt und so Fraßfeinde abschreckt.

Immer unmittelbar nach Verletzung der Fruchtkörper machte sich ein typischer Geruch nach Blausäure bemerkbar. Diese Beobachtung wurde durch Derivatisierung eines wässrigen Rohextraktes mit Pentafluorbenzylbromid durch GC/MS bestätigt.^[2] Außerdem unterschieden sich die HPLC-Metabolitenprofile der Methanolextrakte unverletzter und verletzter Fruchtkörper. In intakten Pilzen war Aleurodisconitril (**1**) die Hauptkomponente, während in den verletzten Fruchtkörpern stattdessen Aleurodiscoester (**2**; siehe Schema 2) dominierte. In der Mycelkultur von *A. amorphus* waren dagegen weder **1** noch **2** nachweisbar.

Zur Strukturaufklärung der beiden Verbindungen wurden 737 mg der relativ seltenen Fruchtkörper vorsichtig von der Weißtannennrinde abgenommen und unmittelbar darauf mit Methanol extrahiert. Dieser Rohextrakt wurde durch präparative HPLC an reverser Phase aufgetrennt. Auf diese Weise

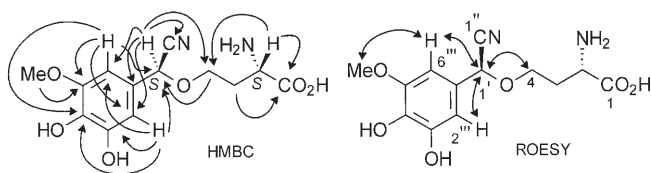
wurden 2.9 mg Aleurodisconitril und 1.2 mg Aleurodiscoester isoliert.

Im UV-Spektrum von **1** deuten Absorptionsmaxima bei $\lambda = 212$ und 246 nm auf ein Aren hin. Dies ist in Einklang mit der aus hochauflösender Massenspektrometrie mit chemischer Ionisation bei Atmosphärendruck (HR-APCIMS) abgeleiteten Summenformel $C_{13}H_{16}N_2O_6$ und dem 1H -NMR-Spektrum, das neben insgesamt sieben Signalen im aliphatischen Bereich auch die Signale von zwei CH-Gruppen in der Arenregion bei $\delta_H = 6.67$ (H-6'') und 6.68 ppm (H-2'') enthält; die Kopplungskonstante von $J = 1.8$ Hz spricht dafür, dass sie zueinander *meta*-ständig sind. Das ^{13}C -NMR-Spektrum enthält 13 Signale. Von den sieben Signalen im aromatischen Bereich können zwei mithilfe des HSQC-Spektrums den oben erwähnten CH-Gruppen des aromatischen Rings zugeordnet werden, während die restlichen fünf von quartären C-Atomen stammen. Aus dem HMBC-Spektrum geht hervor, dass das Signal bei $\delta_C = 118.7$ (C-1'') nicht zum aromatischen Ring gehört und dass die CH-Gruppe bei $\delta_H = 5.34$ (H-1') dem quartären C-Atom des aromatischen Rings bei $\delta_C = 125.5$ (C-1'') benachbart ist, das von den beiden CH-Gruppen des aromatischen Rings bei $\delta_C = 104.1$ (C-6'') und 109.5 ppm (C-2'') flankiert wird. Ein Kern-Overhauser-Effekt (NOE) zwischen dem H-Atom des aromatischen Rings bei $\delta_H = 6.67$ (H-6'') und den H-Atomen bei $\delta_H = 3.88$ ppm lässt darauf schließen, dass sich eine Methoxygruppe an C-5'' befindet, während die beiden restlichen tieffeldverschobenen C-Atome am aromatischen Ring, C-3'' und C-4'', OH-Gruppen tragen. Die CH-Gruppe bei $\delta_H = 5.34$ (H-1') zeigt eine $^3J_{CH}$ -Korrelation im HMBC-Spektrum und ist demzufolge über eine Etherbindung mit der OCH_2 -Gruppe bei $\delta_C = 67.7$ (C-4) verknüpft. Aus dem COSY-, dem HSQC- und dem HMBC-Spektrum ist ersichtlich, dass diese OCH_2 -Gruppe ($\delta_H = 3.74$ – 3.78 und 3.85 – 3.89 ppm) Teil eines Homoserinrestes ist, zu dem auch die CH_2 -Gruppe mit Signalen bei $\delta_H = 2.07$ – 2.13 und 2.24 – 2.29 (H-3) und die CH-Gruppe mit einem Signal bei $\delta_H = 3.66$ ppm (H-2) gehören. Der noch nicht bestimmte Substituent der CH-Gruppe bei $\delta_H = 5.34$ (H-1') ist gemäß der Summenformel und einer $^2J_{CH}$ -Korrelation vom H-Atom bei $\delta_H = 5.34$ (H-1') zum C-Atom bei $\delta_C = 118.7$ ppm (C-1'') eine CN-Gruppe. Somit ergibt sich die in Schema 1 gezeigte Struktur für Aleurodisconitril. Aus dem Vergleich der Circular dichroismus-Spektren (CD-Spektren) von **1** mit (*R*)-Amygdalin folgt die *S*-Konfiguration für das Cyanhydrinkohlenstoffatom von **1**. Die *S*-Konfiguration des Stereozentrums der Homoserineinheit wurde indirekt über den Ester **2** (siehe unten) bestimmt. Die Struktur von **1** ist in Einklang mit Überlegungen zur Biosynthese. Analog zur

[*] Dipl.-Chem. B. L. J. Kindler, Dr. P. Spiteller
Institut für Organische Chemie und Biochemie II
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching bei München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13210
E-Mail: peter.spiteller@ch.tum.de

[**] Wir danken Janina Erl für ihre Unterstützung bei der Synthese von Modellverbindungen, Prof. Dr. Michael Spiteller, Silke Richter, Dr. Marc Lamshöft und Dr. Sebastian Zülke (Institut für Umweltforschung, Universität Dortmund) und Andreas Lajoja (Bayer AG, Leverkusen) für LC-APCIMS- und HR-APCIMS-Messungen sowie Dr. Dieter Spiteller (Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie, Jena) für Drehwertmessungen. Außerdem danken wir den Mitgliedern des Vereins für Pilzkunde München e.V., insbesondere Dr. Christoph Hahn, dass sie uns auf *A. amorphus* aufmerksam gemacht haben. Jakob Braun sind wir dafür dankbar, dass er uns mehrere Fundstellen gezeigt hat. Diese Arbeit wurde durch ein Emmy-Noether-Stipendium (SP 718/1-2) der DFG unterstützt.

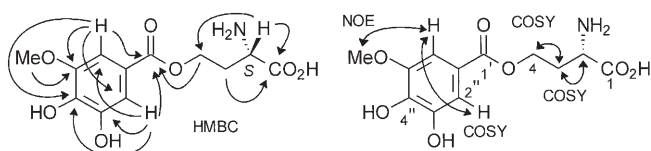
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.



Schema 1. Aleurodisconitril (**1**) mit ausgewählten HMBC- und ROESY-Korrelationen.

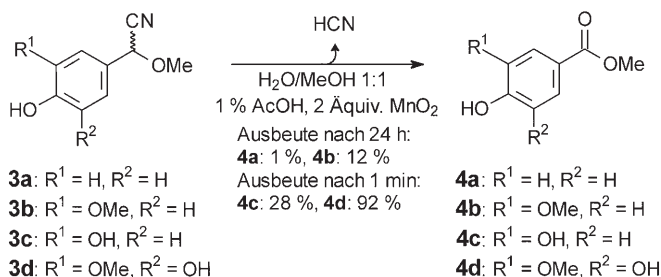
Biosynthese der Blausäureglycoside^[3] könnte das Cyanhydrin aus Tyrosin gebildet werden, während der Homoserinrest aus (*S*)-Adenosylmethionin stammen könnte.

Der Aleurodiscoester (**2**) ist eng mit **1** verwandt; die NMR-spektroskopischen Daten weisen auf einen Homoserinrest und einen aromatischen Ring mit den gleichen Substituenten wie in **1** hin. Im NMR-Spektrum fehlt allerdings das Signal des Cyanhydrin-H-Atoms ebenso wie das ¹³C-Signal des Cyanids. Die Tatsache, dass ein Signal bei $\delta_C = 168.2$ ppm (C-1') anstelle desjenigen bei $\delta_C = 72.0$ ppm auftritt, lässt darauf schließen, dass in **2** eine Esterfunktion die Cyanhydrineinheit ersetzt (Schema 2). Der Ester **2** ist *S*-konfiguriert, denn der Drehwert des Naturstoffes stimmt gut mit demjenigen einer synthetischen Probe überein.

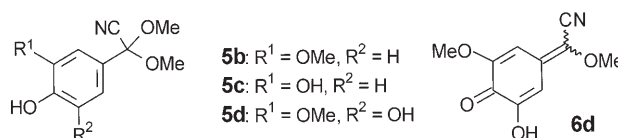


Schema 2. Aleurodiscoester (**2**) mit ausgewählten HMBC-, COSY- und ROESY-Korrelationen.

Anders als bei Blausäureglycosiden wie Amygdalin, bei denen die Cyanhydrineinheit in Form eines Acetals mit einem Zuckerrest verknüpft ist und problemlos enzymatisch hydrolysiert werden kann,^[3] ist die Etherbindung zwischen der Cyanhydrineinheit und dem Homoserinrest in **1** kaum hydrolysierbar – daher kann **1** nur oxidativ in **2** und HCN umgewandelt werden. Zur Untersuchung des Reaktionsmechanismus synthetisierten wir die Verbindungen **3a–d**,^[4] in denen die Homoserinseitenkette verkürzt und die Substituenten am aromatischen Ring variiert wurden. Diese Modellverbindungen wurden in wässrigem Methanol gelöst und mit MnO₂ als Oxidationsmittel versetzt. Der Reaktionsverlauf wurde durch wiederholte Probennahme und anschließende Trimethylsilylierung mithilfe von GC/MS verfolgt. Enthält der aromatische Ring nur eine Hydroxygruppe in *para*-Position (**3a,b**), so tritt praktisch keine Reaktion ein. **3c** wird hingegen rasch zu **4c** abgebaut, da sich hier eine zusätzliche OH-Gruppe in der benachbarten Position befindet. Noch etwas schneller läuft die Reaktion ab, wenn darüber hinaus eine OMe-Gruppe wie in **3d** vorhanden ist (Schema 3). Der aromatische Ring im Naturstoff **1** ist also auf leichte Oxidierbarkeit optimiert. Führt man die Oxidation von **3b–d** in Methanol durch, so werden die Produkte **5b–d** gebildet (Schema 4); bei der Oxidation von **3d** in absolutem Acetonitril entsteht dagegen das Chinonmethid **6d** (Schema 4).

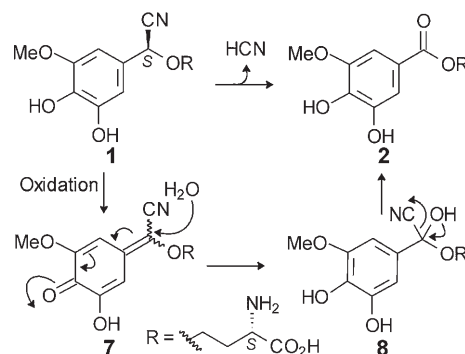


Schema 3. Oxidativer Abbau der Modellverbindungen **3a–d** zu den entsprechenden Estern **4a–d** unter Freisetzung von HCN.



Schema 4. Oxidationsprodukte der Modellverbindungen **3b–d**.

Auf der Grundlage dieser Befunde schlagen wir folgenden Mechanismus für den Abbau von Aleurodisconitril (**1**) zum Ester **2** und HCN vor:^[5] Im ersten Schritt wird **1** zum *ortho*-Chinon oxidiert, das sich in das Chinonmethid **7** umlagert. Nun wird formales H₂O an **7** unter Bildung des Intermediates **8** addiert, aus dem HCN eliminiert und so der Ester **2** gebildet wird (Schema 5).



Schema 5. Postulierter Verlauf des oxidativen Abbaus von **1** zu **2**.

Mechanische Verletzungen induzieren in Pilzen häufig oxidative Prozesse.^[6] Diese werden oft durch relativ unspezifische Tyrosinasen (oder Enzyme mit ähnlicher Funktion) eingeleitet, die in Pilzen weit verbreitet sind und erst bei Verletzung aktiv werden.^[7] Daher überrascht es nicht, dass sich **2** bildet, wenn man **1** mit kommerziell erhältlicher Pilztyrosinase inkubiert.^[8]

Da wir aus 737 mg frischer Pilzfruchtkörper 2.9 mg des Nitrils **1** isolieren konnten, können pro Gramm Pilz bis zu 0.35 mg HCN entstehen, was *A. amorphus* offensichtlich wirksam vor Fraßfeinden schützt.^[9] Die Produktion von Blausäure ist in der Natur recht selten und wurde besonders in Pflanzen,^[10] aber auch in Algen,^[11] Bakterien,^[12] Tieren^[13] und Pilzen^[14] nachgewiesen. In Pflanzen findet man cyano-gene Verbindungen vor allem in Form von Blausäureglyco-

siden, die bei Verletzung der Pflanzen enzymatisch hydrolysiert werden und nach Zerfall des Cyanhydrins HCN als Fraßschutz freisetzen.^[3] In Bakterien dagegen wird Blausäure oft aus Glycin über einen oxidativen Mechanismus durch das Enzym HCN-Synthase gebildet.^[12] In höheren Pilzen ist die HCN-Produktion vor allem von Vertretern der Familien der Tricholomataceae, der Pleurotaceae, der Polyporaceae und der Stereaceae bekannt.^[14] Zur letztgenannten Familie gehört auch *A. amorphus*, der vor dieser Arbeit noch nicht auf das Vorkommen von Blausäure untersucht wurde. Wie Blausäure in Pilzen gebildet wird, wurde bisher nur bei einer Mycelkultur eines phytopathogenen, unbestimmten Basidiomyceten untersucht: Dieser erzeugt HCN wahrscheinlich aus Glycin.^[15]

Der Mechanismus des oxidativen Abbaus von Aleurodisconitril (**1**) zu Aleurodiscoester (**2**) und HCN unterscheidet sich fundamental von dem der Oxidation von Glycin in Bakterien, aber auch von dem der Blausäurefreisetzung aus Blausäureglycosiden in Pflanzen.^[10b] Während bei Pflanzen die leichte Hydrolysierbarkeit durch Glycosidasen entscheidend ist, kommt es im Falle von *A. amorphus* auf die leichte Oxidierbarkeit des aromatischen Rings an. Der Abbau leicht oxidierbarer aromatischer Cyanhydrine ist somit eine dritte Möglichkeit zur Bildung von Blausäure in der Natur.

Experimentelles

Zur Isolierung von **1** und **2** wurden frische oder eingefrorene Fruchtkörper mit MeOH extrahiert und durch präparative HPLC an RP-18 getrennt.

1: Farbloser Feststoff; CD (MeOH): λ ($\Delta\epsilon$) = 210 nm (+1.8); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, Referenz: δ = 3.31 ppm, 330 K): δ = 2.07–2.13 (m, 1H; H-3), 2.24–2.29 (m, 1H; H-3), 3.66 (dd, 1H, J = 7.0, 4.9 Hz; H-2), 3.74–3.78 (m, 1H; H-4), 3.85–3.89 (m, 1H; H-4), 3.88 (s, 3H; OCH₃), 5.34 (s, 1H; H-1'), 6.67 (d, 1H, J = 1.8 Hz; H-6'''), 6.68 ppm (d, 1H, J = 1.8 Hz; H-2'''); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD, Referenz: δ = 49.0 ppm, 298 K): δ = 31.9 (C-3), 54.4 (C-2), 56.8 (OCH₃), 67.7 (C-4), 72.0 (C-1'), 104.1 (C-6'''), 109.5 (C-2'''), 118.7 (C-1''), 125.5 (C-1'''), 136.8 (C-4'''), 147.0 (C-3'''), 149.9 (C-5'''), 173.6 ppm (C-1); UV/Vis (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 212 (4.07), 246 (3.31), 274 nm (2.79); HR-APCIMS: m/z : 297.1079 [$M+H$]⁺, ber. für C₁₃H₁₇N₂O₆: 297.1087.

2: Farbloser Feststoff; $[\alpha]_D^{25}$ = +70 cm³ g⁻¹ dm⁻¹ (c = 0.00135 g cm⁻³ in MeOH); ¹H-NMR (600 MHz, CD₃OD, 300 K): δ = 2.17–2.23 (m, 1H; H-3), 2.34–2.40 (m, 1H; H-3), 3.67 (dd, 1H, J = 7.3, 5.5 Hz; H-2), 3.88 (s, 3H; OCH₃), 4.38–4.46 (m, 2H; H-4), 7.20 (d, 1H; J = 1.9 Hz; H-6''), 7.24 ppm (d, 1H, J = 1.9 Hz; H-2''); ¹³C-NMR (151 MHz, CD₃OD, 300 K): δ = 32.1 (C-3), 53.9 (C-2), 56.7 (OCH₃), 62.3 (C-4), 106.2 (C-6''), 112.1 (C-2''), 121.1 (C-1''), 141.1 (C-4'), 146.4 (C-3''), 149.2 (C-5''), 168.2 (C-1'), 174.8 ppm (C-1); UV/Vis (MeOH): λ_{max} (lg ϵ) = 217 (3.57), 277 nm (3.18); HR-APCIMS: m/z = 286.0916 [$M+H$]⁺, ber. für C₁₂H₁₆NO₇: 286.0927.

Eingegangen am 7. Juni 2007

Online veröffentlicht am 20. September 2007

Stichwörter: Blausäure · Chemische Verteidigung · Naturstoffe · Pilze · Strukturaufklärung

- [1] G. J. Kriegelsteiner, A. Kaiser in *Die Großpilze Baden-Württembergs*, Bd. 1 (Hrsg.: G. J. Kriegelsteiner), Eugen Ulmer, Stuttgart, **2000**, S. 144–146.
- [2] A. Miki, M. Nishikawa, H. Tsuchihashi, *J. Health Sci.* **2000**, *46*, 81–88.
- [3] M. A. Hughes in *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Bd. 1 (Hrsg.: U. Sankawa), Elsevier, Amsterdam, **1999**, S. 881–895.
- [4] a) D. P. Roelofsen, E. R. J. Wils, H. van Bakkum, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1971**, *90*, 1141–1152; b) K. Utimoto, Y. Wakabayashi, Y. Shishiyama, M. Inoue, H. Nozaki, *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 4279–4280.
- [5] Synthesebeispiel einer cyanidvermittelten oxidativen Veresterung: E. J. Corey, N. W. Gilman, B. E. Ganem, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 5616–5617.
- [6] M. Gill, W. Steglich in *Progress in the Chemistry of Natural Products*, Bd. 51 (Hrsg.: W. Herz, H. Griesebach, G. W. Kirby, C. Tamm), Springer, Wien, **1987**, S. 249–253.
- [7] a) H. Decker, T. Schweikardt, F. Tuzcek, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4658–4663; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4546–4550; b) S.-Y. Seo, V. K. Sharma, N. Sharma, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2837–2853; c) A. M. Mayer, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2318–2331; d) S. Halaoui, M. Asther, J.-C. Sigoillot, M. Hamdi, A. Lomascio, *J. Appl. Microbiol.* **2006**, *100*, 219–232.
- [8] Pilztyrosinase aus *Agaricus bisporus* wird allerdings kompetitiv von Cyanid gehemmt, sodass es im Modellversuch zu keinem quantitativen Umsatz kam. Zur Hemmung von Pilztyrosinase durch Cyanid: a) T. Tatsuma, K. Komori, H.-H. Yeoh, N. Oyama, *Anal. Chim. Acta* **2000**, *408*, 233–240; b) H. W. Duckworth, J. E. Coleman, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 1613–1625.
- [9] a) Auswirkungen von Blausäure auf Insekten: M. M. Hay-Roe, J. Nation, *J. Chem. Ecol.* **2007**, *33*, 319–329; b) J. E. Poulton in *Handbook of Natural Toxins*, Bd. 1 (Hrsg.: R. F. Keeler, A. T. Tu), Marcel Dekker, New York, **1983**, S. 118–157.
- [10] a) D. A. Jones, *Phytochemistry* **1998**, *47*, 155–162; b) E. E. Conn, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **1980**, *31*, 433–451; c) B. Tschiersch, *Pharmazie* **1967**, *22*, 76–82.
- [11] H.-S. Gewitz, G. H. Lorimer, L. P. Solomonson, B. Vennesland, *Nature* **1974**, *249*, 79–81.
- [12] C. Blumer, D. Haas, *Arch. Microbiol.* **2000**, *173*, 170–177.
- [13] a) S. S. Duffey, M. S. Blum, H. M. Fales, S. L. Evans, R. W. Roncardori, D. L. Tiemann, Y. Nakagawa, *J. Chem. Ecol.* **1977**, *3*, 101–113; b) M. S. Blum, J. P. Woodring, *Science* **1962**, *138*, 512–513.
- [14] T. Stijve, A. A. R. de Meijer, *Dtsch. Lebensm.-Rundsch.* **1999**, *95*, 366–373.
- [15] a) E. W. B. Ward, A. N. Starratt, J. R. Robinson, *Can. J. Bot.* **1977**, *55*, 2065–2069; b) C. J. Knowles, *Bacteriol. Rev.* **1976**, *40*, 652–680.