

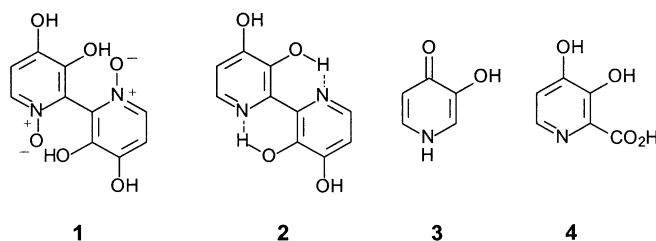
Biosynthese von Orellanin

Zum Vorkommen des Pilzgiftes Orellanin als Diglucosid und Untersuchungen zu seiner Biosynthese**

Peter Spiteller, Michael Spiteller und Wolfgang Steglich*

Professor Meinhard H. Zenk
zum 70. Geburtstag gewidmet

Der Orangefuchsig-schleierling (*Cortinarius orellanus* (Fr.) Fr.) gehört zu den gefährlichsten Giftpilzen,^[1] und sein Genuss führt nach einer Latenzzeit von ein bis zwei Wochen zum irreversiblen Verlust der Nierenfunktion.^[2] Die Giftigkeit des Pilzes wurde erst vor etwa 50 Jahren bemerkt, nachdem eine Massenvergiftung in Polen zu zahlreichen Todesfällen geführt hatte.^[3] Dem aus dem Pilz isolierten Toxin Orellanin^[4] wurde die Struktur des 2,2'-



Bipyridin-3,3',4,4'-tetroxide-1,1'-dioxids **1** zugeordnet,^[5] die durch mehrere Synthesen^[6] und eine Röntgenstrukturanalyse^[7] bestätigt wurde.

Hier berichten wir über erste Untersuchungen zur Biosynthese des Orellanins und die Entdeckung, dass das Toxin im Pilz hauptsächlich als das wasserlösliche 4,4'-Diglucopyranosid **5** vorliegt.

Die symmetrische Struktur von Orellanin (**1**) lässt auf seine Bildung aus 3-Hydroxy-1H-pyridin-4-on (**3**) durch oxidative Kupplung und doppelte N-Oxidation des entstehenden 2,2'-Dimers Orellin (**2**) schließen. Dies wird durch den Nachweis von **3** im sauren methanolischen Rohextrakt von *C. orellanus* gestützt, der außerdem noch 3,4-Dihydroxypyridin-2-carbonsäure (**4**) als mögliches Intermediat der

[*] Prof. Dr. W. Steglich, Dr. P. Spiteller
Department Chemie
Ludwig-Maximilians-Universität
Butenandtstraße 5–13, Haus F, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-mail: wos@cup.uni-muenchen.de
Prof. Dr. M. Spiteller
Institut für Umweltforschung
Universität Dortmund
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Wir danken Dr. N. Arnold für seine Unterstützung und wertvolle mykologische Hinweise sowie H. Avak und J. Oeßelmann (Thermo Finnigan) für die IRMS-Messungen. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 369) gefördert.

Biosynthese enthält. Beide Verbindungen wurden durch GC/MS-Vergleich mit synthetischen Proben identifiziert. **3** war bereits als Abbauprodukt von Mimosin bekannt und kommt in getrockneten Blättern der Leguminose *Leucaena leucocephala* vor.^[8]

Für die Biosynthese einfacher Pyridin-Derivate kommen mehrere Wege in Betracht. Wie beim Mimosin^[9] könnte der Pyridinring aus Lysin entstehen. Alternativ könnte sich **3** aus Ammoniak und 3-Hydroxy-4H-pyran-4-on bilden, das sich wie Maltol^[10] von Kohlenhydraten ableiten lässt. Weiterhin sind Anthranilsäure und Tryptophan als Vorstufen denkbar, die von Tieren und Hefen über 3-Hydroxyanthranilsäure in Nicotinsäure umgewandelt werden.^[11] In Bakterien und Höheren Pflanzen wird Nicotinsäure dagegen aus Asparaginsäure und Dihydroxyacetonphosphat aufgebaut.^[12]

Zur Klärung der Orellanin-Biosynthese wurden Verfütterungsexperimente mit Fruchtkörpern am natürlichen Standort ausgeführt. Da *C. orellanus* in Deutschland sehr selten ist, wurde an seiner Stelle der in Bayern häufigere Spitzbuckelige Orangenschleierling (*C. rubellus* Cooke = *C. speciosissimus* Kühn. Romagn.) verwendet, der die gleichen Inhaltsstoffe enthält.^[13] Nach Injektion einer wässrigen Lösung der markierten Vorstufe in 5–20 Fruchtkörper von *C. rubellus* wurden die Pilze 5–12 Tage im Wald belassen, daraufhin eingesammelt und aufgearbeitet. Verfütterungsexperimente mit [U-¹³C]Glucose oder einer Mischung U-¹³C-markierter Aminosäuren führten gemäß ¹³C-NMR-Analyse zu keiner signifikanten ¹³C-Anreicherung, was gegen eine Beteiligung von Lysin oder Glucose an der Orellanin-Biosynthese spricht. Ebenso erfolglos verlief die Verfütterung von [U-¹³C]Glycerin.

Wird dagegen dem Pilz [¹⁵N]Anthranilsäure appliziert, so deuten ¹⁵N-NMR-Messungen auf einen geringen Einbau in Orellanin hin. Allerdings ist das Ergebnis wegen der sehr geringen Einbauraten von etwa 0.1–0.2% nicht eindeutig. Daher wurde der Einbau mit der hochempfindlichen und präzisen ¹⁵N/¹⁴N-Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) überprüft,^[14] die erst in den letzten Jahren ausgehend von der bereits länger verwendeten ¹³C/¹²C-IRMS entwickelt wurde.^[15] Die nach Verfütterung von [¹⁵N]Anthranilsäure erhaltenen ¹⁵N-Anreicherungen sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die gemessene ¹⁵N-Anreicherung von etwa 30% beweist zweifelsfrei den Einbau von Anthranilsäure. Die Nachweis-

grenze liegt mit dieser Methode bei einer Anreicherung von unter 0.1%.

Bei Verimpfung von [ring-¹⁵N]Tryptophan betrug die ¹⁵N-Anreicherung etwa 7%. Dies spricht für eine direkte Umwandlung der Anthranilsäure in 3-Hydroxyanthranilsäure, während der von Tryptophan ausgehende Kynurenin-Weg offenbar für die Biosynthese des Orellanins von untergeordneter Bedeutung ist.

Um auszuschließen, dass die ¹⁵N-Anreicherung von einem Abbau der ¹⁵N-Anthranilsäure und einer unspezifischen Verteilung von ¹⁵N im Pilz herrührt, wurde auch ¹⁵NH₄¹⁵NO₃ in hoher Dosis (50 mg pro Fruchtkörper) an *C. rubellus* verfüttert. Die ¹⁵N-Anreicherung betrug lediglich um 13%.

Bei der Aufarbeitung von *C. rubellus* oder *C. orellanus* war die Ausbeute an Orellanin stets wesentlich höher, wenn dem methanolischen Rohextrakt vorher einige Tropfen 2N HCl zugesetzt wurden. Eine Untersuchung dieses Befundes ergab, dass der neutrale Rohextrakt zusätzlich zwei sehr polare Verbindungen enthält, die beim Ansäuern in Orellanin übergehen. Die LC/MS-Spektren sprechen dafür, dass es sich um Di- und Monoglycoside des Orellanins handelt. Die Hauptkomponente ließ sich durch sorgfältige HPLC an einer Aminophase von Begleitzuckern abtrennen und mit ein- und zweidimensionaler NMR-Spektroskopie als Orellanin-4,4'-di-β-D-glucopyranosid (**5**) identifizieren.^[16] Bei Verfütterungsexperimenten mit [U-¹³C]Glucose werden bis zu 10% der Vorstufe in den Zuckeranteil von **5** eingebaut. Der Einbau gibt sich dabei durch die Erhöhung der Molekülmasse um 6 bzw. 12 Einheiten im LC/MS sowie durch das Fragmentierungsmuster im LC/MSMS (Verlust von *m/z* 168 (¹³C₆H₄O₅)) zu erkennen. Die Position der Glucosereside wird durch die in Abbildung 1 angegebenen HMBC-Korrelationen bewiesen. Das Vorliegen von Orellanin als wasserlösliches Diglucosid erklärt die widersprüchlichen Literaturbefunde zur Löslichkeit des Orellanus-Toxins.^[17]

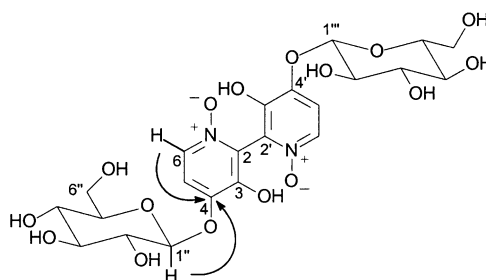


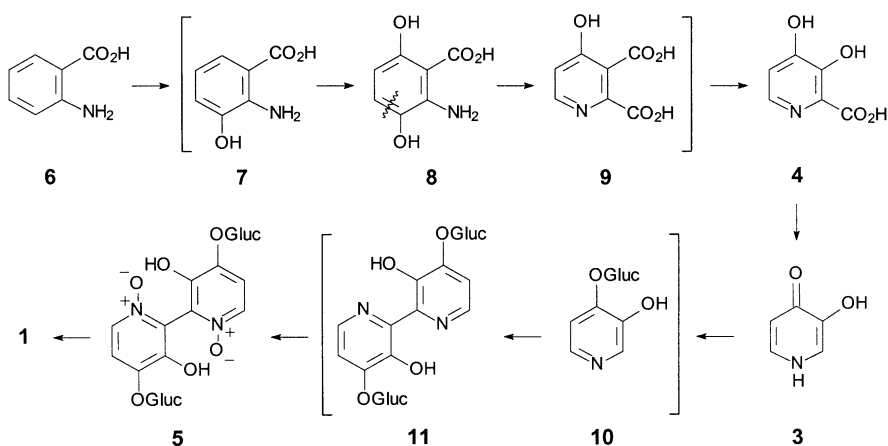
Abbildung 1. Orellanin-4,4'-diglucopyranosid **5** mit ausgewählten HMBC-Korrelationen.

Für die Biosynthese des Orellanins schlagen wir aufgrund der genannten Befunde den in Schema 1 dargestellten Reaktionsweg vor, wobei die Abfolge einiger Schritte willkürlich ist. Danach geht die Biosynthese von Anthranilsäure (**6**) aus, die über 3-Hydroxyanthranilsäure (**7**) in 3,6-Dihydroxyanthranilsäure (**8**) überführt wird. **8** wurde von uns kürzlich als Baustein des Pilzfarbstoffs Blennion erkannt.^[18] Nach oxidativer Ringspaltung und erneutem Ringschluss könnte aus **8** 4-Hydroxypyridin-2,3-dicarbonsäure (**9**) entstehen, die

Tabelle 1: Einbauexperimente mit ¹⁵N-markierten Verbindungen an *C. rubellus*.

Verimpfungsstoff	¹⁵ N/ ¹⁴ N-Verhältnis [%] ^[a]	¹⁵ N-Anreicherung [%] ^[a]	Einbauraten [%]
Wasser (Blindprobe)	0.36705	0.20	0.00075
[¹⁵ N]Anthranilsäure (Probe 1)	0.46010	25.62	0.0938
[¹⁵ N]Anthranilsäure (Probe 2)	0.48497	32.40	0.1187
[ring- ¹⁵ N]-D,L-Trp	0.39323	7.35	0.0269
¹⁵ NH ₄ ¹⁵ NO ₃	0.41544	13.42	0.0491

[a] Die ¹⁵N-Anreicherungen im isolierten Orellanin aus *C. rubellus* beziehen sich auf das natürliche ¹⁵N/¹⁴N-Verhältnis des Luftstickstoffs von 0.36630% (internationaler Standardwert).



Schema 1. Hypothetische Biosynthese von Orellanin (**1**) aus Anthranilsäure. Die in Klammern stehenden Zwischenstufen wurden bisher nicht im Pilz nachgewiesen.

anschließend durch oxidative Decarboxylierung in 3,4-Dihydroxypyridin-2-carbonsäure (**4**), der Vorstufe von **3**, umgewandelt wird. Spätestens jetzt sollte die Glucosylierung in Position 4 stattfinden, die die regioselektive Kupplung von **10** zu Orellin-4,4'-di- β -D-glucopyranosid (**11**) durch Bildung eines Phenoxylradikals in 2-Stellung gewährleistet.^[19] Zweifache N-Oxidation könnte schließlich zum Orellanin-4,4'-di- β -D-glucopyranosid (**5**) führen. Orellanin selbst wird durch Hydrolyse von **5** über das Monoglucosid gebildet.

Im Einklang mit der vorgeschlagenen Biosynthese ist das Ergebnis einer $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ -IRMS-Messung.^[20] Dabei zeigte sich, dass alle Sauerstoffatome des Orellanins aus Luftsauerstoff stammen, da für $\Delta^{18}\text{O}$ ein Wert von 11‰ gemessen wurde. Für Sauerstoff aus Wasser würde dieser Wert bei 30‰ liegen,^[21] womit Vorstufen aus dem Kohlenhydratstoffwechsel ausgeschlossen sind.

Orellanin ist ein weiteres Beispiel für die Rolle der Anthranilsäure bei der Bildung von Pilzmetaboliten. Von ihr leiten sich außerdem 2-Aminobenzaldehyd, der Geruchsstoff des Süßriechenden Fählblings (*Hebeloma sacchariolens*),^[22] das Chromoalkaloid Necatoron^[23] aus dem Tannenreizker (*Lactarius necator*) und die Aminobenzochinon-Farbstoffe Blennion^[18] und Lilacinon^[24] aus *Lactarius*-Arten ab.

Experimentelles

Die Verfütterungsexperimente mit *C. rubellus* wurden in einem feuchten Fichtenforst in der Nähe von Penzberg oder Leutstetten/Oberbayern von Juli bis September in den Jahren 1998 bis 2001 ausgeführt. Im Allgemeinen wurden für jedes einzelne Experiment 5–20 Fruchtkörper verwendet. In jeden Pilz wurden mit einer Spritze je 20 mg der potenziellen Vorstufe, gelöst in ca. 50 μL Wasser, injiziert. Die so behandelten Pilze wurden nach 5–12 Tagen eingesammelt und eingefroren.

Isolierung von 1: In einem Becherglas wurden 10 g gefrorene Fruchtkörper mit MeOH ($3 \times 100 \text{ mL}$) je 30 min bei 25°C extrahiert. Die Extrakte wurden filtriert, vereinigt und mit 10 mL 2 N HCl versetzt. Nach Eindampfen bei 60°C im Vakuum wurde der Rückstand in 1 mL MeOH gelöst, über eine RP-18-Kartusche vorgereinigt und **1** durch präparative HPLC isoliert. $t_R = 23.5 \text{ min}$ (Säule: Nucleosil 100 C-18, 7 μm , $20 \times 250 \text{ mm}$ (Knauer); Gradient: 100% H_2O linear in 40 min auf 100% MeOH; Flussgeschwindigkeit: 6 mL min^{-1} ;

Detektion: UV bei $\lambda = 280 \text{ nm}$). Ausbeute: 12 mg (0.12% bezogen auf das Frischgewicht). ^{15}N -NMR (61 MHz, $[\text{D}_6]\text{DMSO}$, Bezugspunkt: DMF $\delta = 77.7$): $\delta = 207.8 \text{ ppm}$. LC/ESI-MS: $t_R = 16.4 \text{ min}$ (Säule: Nucleosil 100 C-18, 5 μm , $250 \times 2 \text{ mm}$ (Macherey-Nagel); Gradient: 5 min mit 100% H_2O , dann linear von 100% H_2O in 30 min auf 100% MeCN, Flussgeschwindigkeit: 0.25 mL min^{-1} ; Detektion: UV bei $\lambda = 300 \text{ nm}$); m/z : 253 $[M+H]^+$.

Isolierung von 5: Die Herstellung des Rohextraktes erfolgte wie bei der Isolierung von **1** beschrieben, nur wurde auf den Säurezusatz verzichtet und von 50 g eingefrorenen Pilzen ausgegangen. Aus diesem Extrakt wurde **5** durch HPLC isoliert. $t_R = 7\text{--}12 \text{ min}$ (Säule: Nucleosil 100 NH_2 , 5 μm , $25 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm}$ (Macherey-Nagel); Laufmittel: MeCN/ H_2O (1:1), isokratisch; Flussgeschwindigkeit:

2 mL min^{-1} ; Detektion: UV bei $\lambda = 330 \text{ nm}$). Ausbeute: 12 mg (0.024% bezogen auf das Frischgewicht).^[16] farblos, Feststoff. UV/Vis (H_2O): λ_{max} ($\lg \epsilon$) = 237 (3.68), 262 (sh, 3.14), 318 nm (3.15); CD (H_2O): λ_{max} ($\Delta \epsilon$) = 220 (–1.5), 237 (–16.5), 257 (sh, –5.1), 284 (0.1), 314 (–5.6), 344 (0.9), 360 (–0.1), 373 (0.7); ^1H -NMR (600 MHz, D_2O): $\delta = 3.43$ (dd, $^3J = 9.0, 8.4 \text{ Hz}$, 2H, 4''/4'''-H), 3.53 (dd, $^3J = 9.4, 9.0 \text{ Hz}$, 2H, 3''/3'''-H), 3.58 (dd, $^3J = 9.4, 7.5 \text{ Hz}$, 2H, 2''/2'''-H), 3.63 (dd, $^3J = 8.4, 5.5 \text{ Hz}$, 2H, 5''/5'''-H), 3.68 (dd, $^2J = 12.6, ^3J = 5.5 \text{ Hz}$, 2H, 6''/6'''-H), 3.84 (dd, $^2J = 12.6, ^3J = 1.8 \text{ Hz}$, 2H, 6''/6'''-H), 5.07 (dd, $^3J = 7.5, ^4J = 1.6 \text{ Hz}$, 2H, 1''/1'''-H), 7.01 (d, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 2H, 5'/5''-H), 7.53 ppm (d, $^3J = 6.8 \text{ Hz}$, 2H, 6'/6''-H); ^{13}C -NMR (151 MHz, D_2O): $\delta = 61.1$ (C-6''/6'''), 69.9 (C-4''/4'''), 73.2 (C-2''/2'''), 75.7 (C-3''/3'''), 76.9 (C-5''/5'''), 100.9 (C-1''/1'''), 111.0 (C-5'/5''), 126.3 (C-6'/6''), 132.7 (C-2'/2''), 151.5 (C-4'/4''), 154.5 ppm (C-3'/3''). LC/ESI-MS: $t_R = 13.1 \text{ min}$ (Programm und Säule wie bei der Isolierung von **1**) m/z : 577 $[M+H]^+$. LC/ESI-MS/MS (Mutterion: m/z 577, 25 eV) m/z (%): 577 (24) $[M+H]^+$, 415 (65) $[M+H-C_6H_{10}O_5]^+$, 253 (100) $[M+H-(2 \times C_6H_{10}O_5)]^+$.

Nachweis der Verbindungen 3 und 4 durch GC/MS: 2 g eines eingefrorenen Fruchtkörperstückes von *C. rubellus* oder *C. orellanus* wurden mit MeOH ($2 \times 20 \text{ mL}$) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden filtriert und das Filtrat nach Zugabe von 2 mL 2 N HCl bei 50°C im Vakuum eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 mL MeOH aufgenommen und durch präparative HPLC an RP-18 von Zuckern befreit. Das Eluat wurde vollständig eingengt und der Rückstand mit 100 μL *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyltrifluoroacetamid (MSTFA) 2 h bei 40°C pertrimethylsilyliert. Der GC/MS-Vergleich erfolgte durch Coinjektion mit den entsprechenden synthetischen Derivaten, die in Anlehnung an Lit. [6e] hergestellt wurden.

3,4-Bis(trimethylsilyloxy)pyridin: GC/MS (Säule: DB5ms, 30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$, 0.25 μm , Programm: 2 min isotherm bei 50°C dann mit 10°C min^{-1} linear auf 300°C); $R_i = 1430$; EI-MS: m/z (%): 255 (76), 240 (100), 182 (1), 168 (17), 147 (21), 152 (7), 75 (23), 73 (77), 45 (8).

3,4-Bis(trimethylsilyloxy)pyridin-2-carbonsäuretrimethylsilyl-ester: GC/MS (gleiche Messbedingungen wie oben); $R_i = 1820$; EI-MS: m/z (%): 371 (4), 356 (100), 298 (9), 254 (4), 194 (3), 147 (2), 73 (15).

Eingegangen am 30. Januar 2003 [Z51066]

Stichwörter: Anthranilsäure · Biosynthese · Massenspektrometrie · Naturstoffe · Orellanin

[1] H. Besl, A. Bresinsky, *Colour Atlas of Poisonous Fungi*, CRC, Boca Raton, 1990.

- [2] Beispiele: a) J. F. Marichal, F. Trilby, J. L. Wiederkehr, R. Carbiener, *Nouv. Presse Med.* **1977**, 6, 2973–2975; b) R. Flammer, *Schweiz. Med. Wochenschr.* **1982**, 112, 1181–1184; c) T. Schumacher, K. Høiland, *Arch. Toxicol.* **1983**, 53, 87–106; d) J.-M. Richard, J. Louis, D. Cantin, *Arch. Toxicol.* **1988**, 62, 242–245; e) H. Prast, E. R. Werner, W. Pfaller, M. Moser, *Arch. Toxicol.* **1988**, 62, 81–88; f) N. Delpech, S. Rapior, P. Donnadiou, A. P. Cozette, J. P. Ortiz, G. Huchard, *Nephrologie* **1991**, 12, 63–66.
- [3] S. Grzymala, *Z. Pilzkd.* **1957**, 23, 139–142.
- [4] S. Grzymala, *Bull. Trimest. Soc. Mycol. Fr.* **1962**, 78, 394–404.
- [5] W. Z. Antkowiak, W. P. Gessner, *Tetrahedron Lett.* **1979**, 1931–1934.
- [6] a) E. V. Dehmlow, H.-J. Schulz, *Tetrahedron Lett.* **1985**, 26, 4903–4906; b) M. Tiecco, M. Tingoli, L. Testaferri, D. Chianelli, E. Wenkert, *Tetrahedron* **1986**, 42, 1475–1485; c) E. V. Dehmlow, H.-J. Schulz, *Liebigs Ann. Chem.* **1987**, 857–861; d) H. A. Hasseberg, H. Gerlach, *Helv. Chim. Acta* **1988**, 71, 957–963; e) F. Trécourt, M. Mallet, O. Mongin, B. Gervais, G. Quéguiner, *Tetrahedron* **1993**, 49, 8373–8380.
- [7] M. Kubicki, T. Borowiak, W. Z. Antkowiak, *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* **1991**, 21, 401–405.
- [8] T. Acamovic, J. P. F. D'Mello, K. W. Fraser, *J. Chromatogr.* **1982**, 236, 169–179, zit. Lit.
- [9] a) J. W. Hylin, *Phytochemistry* **1964**, 3, 161–164; b) H. P. Tiwari, W. R. Penrose, I. D. Spenser, *Phytochemistry* **1967**, 6, 1245–1248.
- [10] H. Chen, G. Agnihotri, Z. Guo, N. L. S. Que, X. H. Chen, H.-W. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 8124–8125.
- [11] Übersichten: a) G. Magni, A. Amici, M. Emanuelli, N. Raffaelli, S. Ruggieri, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1999**, 73, 135–182; b) T. P. Begley, C. Kinsland, R. A. Mehl, A. Osterman, P. Dorrestein, *Vitam. Horm.* **2001**, 61, 103–119.
- [12] Übersicht: R. F. Dawson, D. R. Christman, R. U. Bjerrum, *Methods Enzymol.* **1971**, 18B, 90–113.
- [13] G. E. B. Koller, K. Høiland, K. Janak, F. C. Stormer, *Mycologia* **2002**, 94, 752–756. Neben Orellanin und Orellin konnten wir in *C. rubellus* auch die einfachen Pyridinderivate **3** und **4** nachweisen.
- [14] W. A. Brand, *J. Mass Spectrom.* **1996**, 31, 125–235.
- [15] R. A. Werner, B. A. Bruch, W. A. Brand, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, 13, 1237–1241.
- [16] Die Ausbeute an Diglucosid schwankt erheblich. Sie hängt vom Alter und Zustand der Pilze ab, außerdem treten durch die große Hydrolyseempfindlichkeit und die starke Adsorption des Diglucosids an die Aminophase erhebliche Verluste auf.
- [17] H. Kürsteiner, M. Moser, *Mycopathologia* **1981**, 74, 65–72.
- [18] P. Spiteller, W. Steglich, *J. Nat. Prod.* **2002**, 65, 725–727.
- [19] Die Möglichkeit, dass die Carbonsäure **4** nach Glucosylierung direkt zum Orellindiglucosid **11** kuppelt und **3** damit ein Nebenprodukt der Biosynthese ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Wir danken einem der Gutachter für diesen Hinweis.
- [20] H.-L. Schmidt, R. A. Werner, A. Roßmann, *Phytochemistry* **2001**, 58, 9–32.
- [21] J. Koziat, *J. Mass Spectrom.* **1997**, 32, 103–108.
- [22] F. von Nussbaum, W. Spahl, W. Steglich, *Phytochemistry* **1997**, 46, 261–264.
- [23] a) J. D. Klamann, B. Fugmann, W. Steglich, *Phytochemistry* **1989**, 28, 3519–3522; b) „Bioactive Compounds from Plants“: W. Steglich, B. Steffan, T. Eizenhöfer, B. Fugmann, R. Herrmann, J.-D. Klamann, *Ciba Found. Symp.* **1990**, 154, 56–65.
- [24] P. Spiteller, N. Arnold, W. Steglich, *J. Nat. Prod.*, eingereicht.