

## Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Metaboliten aus *Paxillus atrotomentosus* (Batsch: Fr.) Fr.

A. KÄMMERER

Institut für Botanik  
Universität Regensburg

G. BERNHARDT

Institut für Pharmazie  
Universität Regensburg  
Postfach 397  
D-8400 Regensburg

Eingegangen am 29.5.1989

Kämmerer, A. & G. Bernhardt (1989) – Experimental investigations on the biological activity of *Paxillus atrotomentosus* metabolites. Z. Mykol. 55(2): 175–188.

**Key Words:** *Paxillus atrotomentosus* – fungal metabolites – antibiotic and antineoplastic activity – human breast cancer cell line – nude mice.

**Abstract:** Antibiotic activity of *Paxillus atrotomentosus* metabolites, in particular atromentin, was tested for bacteria, fungi, and plant seedlings. Cell proliferation of almost all the organisms tested was inhibited. The ecological significance of fungal secondary metabolites is discussed. Marked anti-tumour activity on the human breast cancer cell line MDA-MB-231 of crude extracts of carpophores and pure atromentin was demonstrated *in-vitro* and *in-vivo*.

**Zusammenfassung:** Metaboliten aus *Paxillus atrotomentosus*, insbesondere Atromentin, wurden auf antibiotische Wirkung an Bakterien, Pilzen und Pflanzenkeimlingen getestet. Vertreter aller drei Organismengruppen wurden in ihrer Zellproliferation gehemmt. Die ökologische Bedeutung der Sekundärmetaboliten von Pilzen wird diskutiert. An menschlichen Brustkrebszellen (MDA-MB-231) zeigten Fruchtkörpergesamtextrakt und reines Atromentin sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* ausgeprägte antineoplastische Wirkung.

*Paxillus atrotomentosus* (Batsch: Fr.) Fr. repräsentiert eine der vier in Europa verbreiteten Arten der Gattung *Paxillus* (*Paxillaceae*). Die Paxillaceen sind verwandtschaftlich den *Boletales* zuzuordnen, obwohl sie ein Lamellenhymenophor aufweisen. Ihre chemischen Inhaltsstoffe sprechen jedoch für eine nahe Verwandtschaft zu den Röhrlingen.

*Paxillus atrotomentosus*, der Samtfuß-Krempling, findet sich von Juli bis Oktober an Stümpfen von Nadelbäumen, und hier besonders an Kiefern und Fichten. Der Pilz verursacht im Holz eine typische Braunfäule (Jahn 1979), wird jedoch auch als Mykorrhizapartner von *Tsuga heterophylla* (Raf.) Sarg. diskutiert (Kropp 1982, Kropp & Trappe 1982).

Dem Pilzsammler fällt auf, daß Stümpfe, die von *Paxillus atrotomentosus* mit seinen Fruchtkörpern besiedelt werden, kaum andere Makropilze aufweisen.

Kultiviert man das Mycel dieser Pilzart auf künstlichem Agarmedium, so beobachtet man

eine baldige, stark braun-schwarze Pigmentierung des Mediums. Zum Teil ist diese Pigmentierung auf das Terphenylchinon Atromentin zurückzuführen, welches 1878 von Thörner isoliert worden ist, und als eines der ersten Pilzpigmente überhaupt, bereits von Kögl & Postowski (1924) in seiner chemischen Struktur aufgeklärt wurde.

Beim Arbeiten mit Pilzkulturen im Labor zeigt sich sehr bald, daß die *Paxillus-atrotomentosus*-Mycelkulturen beinahe nie Kontaminanten aufwiesen. Diese Beobachtung gab Anlaß zur Untersuchung der antibiotischen Wirkung dieses Pilzes.

#### Material und Methoden

Herkunft des Pilzmaterials:

*Paxillus-atrotomentosus*-Fruchtkörper: Frauenhäusl b. Regensburg und Paintner Forst b. Kelheim, auf Stümpfen von *Picea abies* (L.) Karst.

Die Mycelkulturen stammten, soweit nicht anders angegeben, aus der Kulturensammlung des Instituts für Botanik der Universität Regensburg.

<i>Botrytis cinerea</i> Pers.	1986, aus der Luft
<i>Cryptosporiopsis</i> spec.	1987, auf Fagus-Samen
<i>Fusarium avenaceum</i> (Corda) Sacc.	DSM - 62162
<i>F. culmorum</i> (W. G. Sm.) Sacc.	DSM - 62184
<i>F. oxysporum</i> Schlecht.	DSM - 62287
<i>F. sporotrichoides</i> Sherbakoff	DSM - 62423
<i>Morchella conica</i> Pers. (II, 1)	6.5.80, Augsburg
<i>M. conica</i> (II, 2)	23.4.83, Augsburg
<i>M. conica</i> (II, 3)	27.4.79, Augsburg
<i>M. esculenta</i> Pers. ex St. Amans (I, 1)	1985, Burggriesbach
<i>Paxillus atrotomentosus</i> (Batsch: Fr.) Fr. 310	20.9.77, Viergstetten
<i>P. involutus</i> (Batsch: Fr.) Fr. 620	26.9.85, Etterzhausen
<i>P. panuoides</i> 318 (Fr. ex Fr.) Fr.	8.78, Berchtesgaden
<i>Penicillium</i> spec.	1981, aus der Luft
<i>Phialocephala dimorphospora</i> Kendrick	CBS - 815.68
<i>Phialocephala fortinii</i> Wang & Wilcox	CBS - 976.72
<i>Phoma acicola</i> (Lév.) Sacc.	DSM - 62895
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	DSM - 63002
<i>Tolyposcladium inflatum</i> Gams	CBS - 670.83
<i>Trichoderma polysporum</i> (Link ex Pers.)	Rifai DMCC - 444
<i>Trichoderma viride</i> Pers. ex Gray	CBS - 815.68

#### Kulturmethode:

siehe Besl & al. (1986). Zusätzlich wurde das von uns modifizierte ATCC-Medium 1117 (ATCC 1982) (Modifiziertes Mykorrhiza Medium = MMykM) zur Mycelkultivierung verwendet:

Grundmedium:	Glucose	4,0 g
	Ammoniumtartrat	1,0 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1 g
	NaCl	20,0 mg
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	26,0 mg
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,88 mg
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,81 mg
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,80 mg
	Malzextrakt	1,0 mg
	Agar-Agar	15,0 mg

Zusatz: Der Inhalt einer Kapsel Supradyn® (Fa. Hoffmann-LaRoche) wurde in 0,5 l A.dest. aufgeführt, wovon 5 ml/l dem Grundmedium zugesetzt werden.

Alle Substanzen werden mit A. dest. auf 1L aufgefüllt, der pH-Wert wird auf 5,5 eingestellt

#### Isolierung und Nachweis der Pigmente:

siehe Kämmerer & al. (1985). Fruchtkörpermaterial wurde ebenso aufgearbeitet.

**Herkunft der Bakterien-Teststämme:**

Die Stämme wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. K. O. Stetter, Institut für Mikrobiologie der Universität Regensburg, überlassen. *Erwinia amylovora* stammte vom Institute of Agriculture and Plant Pathology der University of Nebraska, USA.

*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, DSM 10  
*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow et al.  
*Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers, ATCC 11775  
*Pseudomonas acidovorans* den Dooren de Jong, DSM 39  
*Staphylococcus aureus* Rosenbach, ATCC 12600

**Kultur der Bakterien:**

Hefe-Dextrose-Agar (pH 7,0):	
Pepton aus Casein	10,0 g
Hefeeextrakt	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-Agar	15,0 g

+ A. dest. ad 1 l. Inkubation bei 27° C.

**Herkunft der Pflanzen:**

*Pinus sylvestris* L., Samen, Fa. Steingaesser, Miltenberg (Artikel-Nr. 852123850, Reifejahr 1985).

**Sterilisieren der pflanzlichen Samen:**

Die Samen wurden in einem Nylon-Damenkniestrumpf am Leitungswasserhahn befestigt und 1,5 Stunden unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden sie 15 Min. in 10 %igem, wäßrigem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerührt und dann in 30 %iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eingebracht, in dem sie 10 Min. verweilen. In mit sterilem Leitungswasser gefüllte Petrischalen wurden die Samen übertragen und auf diese Weise 2 x gewaschen.

**Kultur der Pflanzen:**

Die sterilen Samen wurden auf Keimungsmedium (0,8 % Leitungswasser-Agar), dem zur Erkennung eventueller Kontaminanten 2 g/l Malzextrakt zugesetzt worden war, bei 23° C im Dunkeln gekeimt.

**Antibiotische Wirkung****Kulturfiltrat:**

Auf Mb-Flüssigmedium mit Watteunterlage (siehe Besl & al. 1986) wurde *Paxillus atrotomentosus* 60 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium durch Cellulosenitrat-Milliporfilter (Fa. Sartorius) (Porendurchmesser 0,2 µm) sterilfiltriert, bei 60° C mit doppelt konzentriertem Nährmedium vereinigt und in Petrischalen gegossen. Diese wurden mit den Testorganismen beimpft und inkubiert. Als Kontrolle dienten Agarplatten ohne Kulturfiltrat.

**Fruchtkörper- und Kultur-Extrakte:**

*Paxillus-atrotomentosus*-Fruchtkörper wurden wie bei Kämmerer & al. (1985) beschrieben, extrahiert, am Rotationsverdampfer zur Gänze eingengt und in dem zur vollständigen Lösung notwendigen Volumen Lösungsmittel aufgenommen. Anschließend wurde sterilfiltriert, das Filtrat mit autoklaviertem Agarnährmedium bei 60°C vereinigt und in Petrischalen gegossen. Die so hergestellten Platten wurden mit den Testorganismen beimpft. Als Kontrolle diente das jeweilige Medium mit entsprechender Menge Lösungsmittel, ohne Pilzextrakt.

4–6 Wochen mit *Paxillus atrotomentosus* inkubierte Mb-Nähragarplatten (Petrischalen 8,5 cm) wurden nach der Methode von Kämmerer & al. (1985) extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden wie oben beschrieben eingesetzt.

**Keimung von *Penicillium*-Sporen:**

Auf mit Mb-Nähragar befüllten Petrischalen wurde *Paxillus atrotomentosus* 30 Tage inkubiert. Das Mycel wurde dann mit einem ausgeglühten Spatel vom Agar abgezogen und letzterer anschließend mit einer Sporensuspension von *Penicillium* spec. beimpft.

**Antagonismus-Test, Mikropilze:**

Mb-Nähragar und MMMykM wurde mit *Paxillus-atrotomentosus*-, *P.-involutus*- und *P.-panuoides*-Mycel in der Mitte der Petrischale beimpft und 13 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Platten, dem mittleren Inokulum kreuzförmig gegenüberliegend, mit vier Inokula pro Platte eines pilzlichen Antagonisten beimpft.

**Testung von reinem Atromentin:**

Säulenchromatographisch abgetrenntes, gereinigtes Atromentin (siehe Kämmerer & al. 1985) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> mol/l) Agarnährmedien zugegeben, die anschließend mit Testorganismen beimpft und inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Nährmedien ohne Atromentin-Zusatz.

**Keimzahlbestimmung in Holz:**

siehe Kreisel & Schauer (1987: 146).

## Antineoplastische Wirkung

### In-vitro-Zellversuche

Geprüft wurden: Gesamtextrakt von *Paxillus atrotomentosus*, Atromentin 1 (aus *P. atrotomentosus*), Polyporsäure 2 (aus *Hapalopilus rutilans*) und Grevillin D 3 (aus *Suillus luteus*). Als Referenzen wurden u. a. klinisch etablierte Cytostatika eingesetzt: 4 (Fluka, Neu-Ulm) Elliptizin 5 (Roth, Nürnberg) 5-Fluor-uracil 6 (Sigma, Deisenhofen) und Triaziqon 7 (Bayer, Leverkusen). Die chemischen Strukturen sind in der Formeltafel angegeben.

### Herkunft der Tumorzellen:

Zelllinie MDA-MB231 Mammakarzinom, ATCC HTB 26. Erstisolierung: Cailleau & al. (1974).

### Zellkultivierung:

Die Stammerhaltung der Zellen erfolgte in Richters-Medium (mit L-Glutamin) + 50 mg/l Gentamycin + 2,5 g/l NaHCO<sub>3</sub> + 10 % NCS (new borne calf serum, Fa. Gibco) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37°C. Die Zellen wurden in 75 qcm Zellkulturflaschen angezogen. Sie wuchsen als Monolayer.

Das Passagieren der Zellen erfolgte 1–2 x wöchentlich, wobei das Medium abgesaugt wurde, den Zellen 3 ml Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Boehringer Mannheim) zugegeben wurden, die nach 1–2 Min. wieder abgesaugt wurden. Nach weiteren 2 Min. wurden die Zellen mit Medium abgelöst. Es erfolgte 1:20-Verdünnung mit frischem Medium.

Messung der antineoplastischen Aktivität im Mikrotiterplatten-Rest (Reile & al. 1989):

Die Zellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät, in einer Konzentration von etwa 10–15 Zellen pro Gesichtsfeld bei 320facher Vergrößerung im Leitz-Umkehrmikroskop (Phasenkontrast) in jeweils 100 µl Medium pro Loch. Nach Anheftung der Zellen wurden diese 48 Stunden inkubiert (Verdopplungszeit der Zellen: ca. 20 Std). Anschließend wurde das Medium aus den Mikrotiterplatten-Löchern abgesaugt und 100 µl Medium + Testsubstanz wurden zugegeben. Die Zugabe der Testsubstanz erfolgte aus 1000fach konzentrierter Stammlösung im Lösungsmittel (Atromentin, Grevillin D: 50% Ethanol; Polyporsäure: 50 % Methanol).

Pro Konzentration wurden 16 Löcher befüllt. Als Kontrolle wurden 16 Löcher mit Medium + Lösungsmittel auf jeder Platte mitgeführt. Nach 48stündiger Inkubation wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden mit 100 µl/Loch Glutaraldehyd (1 % in PBS, i. e. phosphatgepufferte Kochsalzlösung) 15 Min. fixiert. Das Fixativ wurde abgeschüttet.

Die Färbung erfolgte mit wässriger 0,02%iger Kristallviolett-Lösung (100 µl/Loch) 30 Min. lang (nach Reile & al. 1989), der Farbstoff wurde abgeschüttet, anschließend 3 x mit Wasser gespült. Mit je 100 µl 70 %igem Ethanol wurde die Farbe aus den Zellen herausgelöst.

Die Bestimmung der Zellmasse erfolgte durch Vermessen der Extinktion bei 560 nm in einem BIOTECH-INSTRUMENTS Microplate Autoreader EL 309 (Fa. TECHNOMARA). Die Auswertung (T/C- sowie ED<sub>50</sub>-Berechnung erfolgte mit einem OLIVETTI M24 Personal Computer (Birnböck 1988).

### In-vivo-Test auf antitumorale Wirkung:

Es wurde eine Transplantation der menschlichen Tumorzellen (MDA-MB-231) auf immuninkompetente, thymusaplastische (nu/nu)-Mäuse (NMRI) (Nacktmäuse) durchgeführt. Da den Mäusen artfremde Zellen implantiert worden sind, spricht man hier von einer xenogenen Transplantation. Die Therapie erfolgte nach serieller subcutaner Transplantation solider Tumorstückchen (2 x 2 mm) ab Tag 23. Die Test- und Kontrollgruppe bestand aus je 15 Tieren. Die Applikation erfolgte über 3 Wochen 1 x wöchentlich s. c., in einer Dosierung von 5·10<sup>-5</sup> mol/kg in einem Injektionsvolumen von 100 µl. Die Tumorfläche wurde durch Messen zweier senkrecht aufeinander stehender Durchmesser bestimmt.

## Ergebnisse:

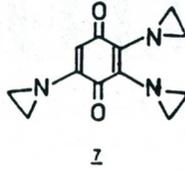
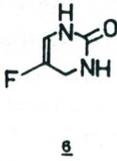
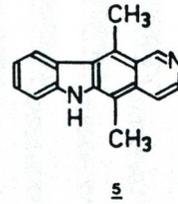
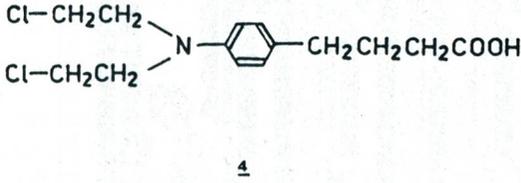
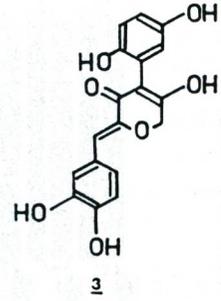
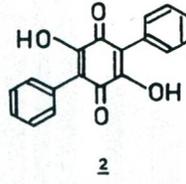
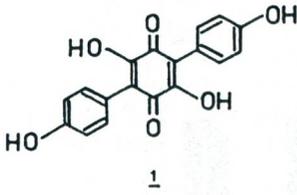
### Antibiotische Wirkung an Bakterien und Pilzen

Hemmung verschiedener Bakterienstämme:

Zur Untersuchung der antibiotischen Potenz der *Paxillus-atrotomentosus*-Metaboliten wurden die Essigester-Extrakte der vom Pilz bewachsenen Agarnährböden und der frischen Pilzfruchtkörper auf ihre Wirkung an folgenden Arten getestet:

*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas acidovorans* und *Staphylococcus aureus*.

Alle fünf Bakterienarten wurden durch die Extrakte gehemmt. Im Falle der Fruchtkörper- und Kulturextrakte ist aufgrund der Aufarbeitung nicht auszuschließen, daß auch intrazelluläre Metaboliten enthalten sind.



1 = Atromentin  
4 = Chlorambuzil  
7 = Triaziqon

2 = Polyporsäure  
5 = Elliptizin

3 = Grevillin D  
6 = 5-Fluoruracil

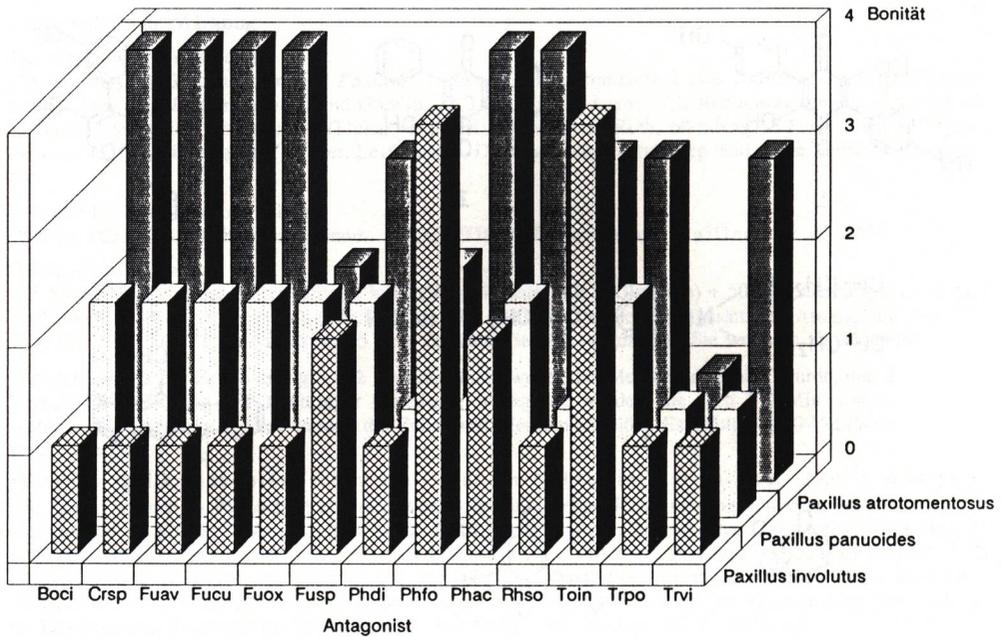


Abb. 1: Antagonistische Reaktionen dreier *Paxillus*-Myzelien auf Konfrontation mit Mikropilzmycelien  
Bonität der antagonistischen Reaktionen

- 1 = Antagonist überwächst *Paxillus*
- 2 = Wachstum bis zum gegenseitigen Kolonierand
- 3 = *Paxillus* bildet Hemmzone aus
- 4 = *Paxillus* überwächst Antagonisten

Boci = *Botrytis cinerea*  
 Crsp = *Cryptosporiopsis spec.*  
 Fuav = *Fusarium avenaceum*  
 Fuox = *Fusarium oxysporum*  
 Fusp = *Fusarium sporotrichoides*  
 Phdi = *Phialocephala dimorphospora*  
 Phfo = *Phialocephala fortinii*  
 Phac = *Phoma acicola*  
 Rhso = *Rhizoctonia solani*  
 Toin = *Tolyocladium inflatum*  
 Trpo = *Trichoderma polysporum*  
 Trvi = *Trichoderma viride*

Fig. 1: Antagonistic reactions of three *Paxillus* mycelia confronted with microfungi mycelia  
Evaluation of the antagonistic reactions

- 1 = Antagonist overgrows *Paxillus*
- 2 = Growth stops when colonies come in contact with each other
- 3 = *Paxillus* produces an inhibitory zone
- 4 = *Paxillus* overgrows antagonist

#### Keimungshemmung von *Penicillium*-Sporen:

Nach Übertragung von *Penicillium*-Konidien auf die von *Paxillus atrotomentosus* bewachsenen Agarplatten, von denen das Mycel entfernt worden war, wurde deren Keimung vollständig unterdrückt, so daß sich kein *Penicillium*-Mycel etablieren konnte. Wurden die Konidien jedoch anschließend auf frisches Nährmedium gebracht, so keimten sie innerhalb von zwei Tagen aus und entwickelten ein normales Mycel.

Die Reversibilität der Keimungs- bzw. Wachstumshemmung zeigt die fungistatische Wirkung extrazellulärer *Paxillus-atrotomentosus*-Metaboliten.

#### Hemmung von Makropilzen:

Im Falle zweier *Morchella*-Arten führte das Atromentin, welches sich nach säulenchromatographischer Auftrennung des Fruchtkörpergesamtextraktes als Hauptpigmentfraktion erweist, zur Wachstumshemmung der Mycelien, wobei das Wachstum einiger Isolate bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l vollständig gestoppt wurde. Nach Gill & Steglich (1987) liegt im Fruchtkörper selbst Leucomentin-3 und Leucomentin-4 vor. Atromentin entsteht bei der Aufarbeitung bzw. nach Austritt aus der Zelle.

#### Hemmung von Mikropilzen:

Die Testung verschiedener Mikropilze (es handelte sich in der Mehrzahl um Rhizosphärenbewohner) zeigte, daß die Hemmwirkung sich nicht auf bestimmte Taxa beschränkt, sondern vielmehr ein breites Artenspektrum erfaßt. In Abb. 1 sind die Ergebnisse der Mycelkonfrontationen von *Paxillus atrotomentosus* mit einer Reihe von Mikropilzen dargestellt. Zum Vergleich sind die Ergebnisse für *Paxillus involutus* und *P. panuoides* mit angegeben.

Die Ergebnisse unserer Experimente mit *Penicillium*-Konidien haben gezeigt, daß die antibiotische Wirkung der extrazellulären Metaboliten des *Paxillus-atrotomentosus*-Mycels nicht ausschließlich dem Atromentin zuzuordnen ist. Bezüglich der *Penicillium*-Konidien erwies sich, daß für eine Keimungshemmung neben dem Atromentin auch andere Metaboliten eine Rolle spielen, da zu beobachten ist, daß die MHK des Gesamtextraktes niedriger liegt als die MHK des entsprechenden Anteils an reinem Atromentin im Gesamtextrakt. Aufgrund des Anteils unbekannter Substanzen können hier keine absoluten MHK-Werte angegeben werden. Eventuell spielen solche Substanzen in ihrer Wirkung mit dem Atromentin additiv oder gar synergistisch zusammen.

Im Holz eines von mehreren Samtfuß-Kremplingen bewachsenen Fichtenstubben wurden für den Pilz charakteristische Metaboliten dünn-schichtchromatographisch nachgewiesen. Mehrere Banden des Fruchtkörpermaterials waren mit denen des Holzextraktes identisch, so auch das Atromentin. Dies deutet darauf hin, daß der in *in-vitro*-Versuchen gefundenen Antibiosis des Pilzmycels wohl auch in der Natur eine ökologische Bedeutung zukommt. Einen Hinweis darauf geben die Keimzahlen, die für das von *Paxillus atrotomentosus* besiedelte Holz, im Vergleich zu von *Armillariella mellea* (Vahl: Fr.) Karst. abgebautem Holz, etwa gleichen Verrottungsgrades, bestimmt worden sind:

*Paxillus atrotomentosus*: 950 000 Keime/g lufttrockenes Holz; *Armillariella mellea*: 9 856 000 Keime/g lufttrockenes Holz.

#### Wirkung auf pflanzliche Keimlinge

Um das Spektrum der Testorganismen zu erweitern, wurden *Pinus-sylvestris*-Keimlinge mit in die Experimente aufgenommen. Bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l Atromentin im Keimungsmedium, wurden 70 % der Samen in ihrer Keimung inhibiert. Dabei ist bemerkenswert, daß sich die Samenschale zwar öffnet, die Keimwurzel jedoch nicht auswächst sondern lediglich hervorquillt.

Die Inkubation junger *Pinus*-Keimlinge in  $10^{-4}$  molarer Atromentin-Lösung zeigte eine Unterdrückung der Morphogenese und führte in der Folge zum Absterben der Keimlinge.

### Antitumor-Wirkung

Die Metaboliten von *Paxillus atrotomentosus* (in erster Linie das Atromentin) haben nicht nur antibiotische Wirkung auf Gram-positive und Gram-negative Bakterien, sondern unterdrücken auch die Zellproliferation von Pilzen und Höheren Pflanzen.

Die Testung der Metaboliten dieses Höheren Pilzes auf antineoplastische Wirkung an menschlichen Tumorzellen lag daher nahe.

### Wirkung am menschlichem Mammakarzinom MDA-MB-231

*In-vitro*-Untersuchungen an Zellkulturen:

Die Ergebnisse sind in Abb. 2, in der die T/C-Werte (Test/Kontrolle·100. Hohe T/C-Werte entsprechen geringen, niedrige Werte entsprechen starken Hemmeffekten) der eingesetzten Testsubstanzen bei unterschiedlichen Konzentrationen dargestellt sind, zusammengefaßt. Zur Verdeutlichung zeigt Abb. 3 stellvertretend die Dosiswirkungskurven für den Gesamtextrakt, 5-Fluoruracil, Atromentin und Triaziqon, wie sie sich aus dem Einsatz der Substanzen in verschiedenen Konzentrationen ergeben. Die Kurven wurden der Probit-Transformation im Wahrscheinlichkeitsnetz unterworfen, so daß sie sich als Geraden darstellen lassen.

In der folgenden Tabelle sind die ED<sub>50</sub>-Werte (diejenige Substanzkonzentration, bei der die behandelten Zellen 50 % der Masse der Kontrollzellen ausmachen) aufgelistet.

Substanz	ED <sub>50</sub> (mol/l)
Pilz-Gesamtextrakt*)	4,1·10 <sup>-6</sup>
Atromentin	1,6·10 <sup>-7</sup>
Polyporsäure	2,8·10 <sup>-6</sup>
Grevillin D	4,9·10 <sup>-7</sup>
Chlorambuzil	2,2·10 <sup>-6</sup>
Elliptizin	3,2·10 <sup>-7</sup>
5-Fluoruracil	8,2·10 <sup>-7</sup>
Triaziqon	kDW

kDW = keine Dosis-Wirkungsbeziehung im hier gewählten Konzentrationsbereich

\*) es wurde das Molekulargewicht für reines Atromentin eingesetzt.

### Testung im Tierversuch

Aufgrund der sehr guten ED<sub>50</sub>-Werte im Zellversuch wurde hier das Atromentin *in-vivo* getestet.

Der ermittelte T/C-Wert im Tierversuch beträgt 61,5 % bei der gewählten Dosierung ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/kg).

Gewichtsdifferenz der Tiere vor und nach der Therapie:

Kontrolle: Tag 37 – Tag 23 = + 2,9 g

Atromentin: Tag 37 – Tag 23 = + 1,4 g

Die Substanz ist also keinesfalls akut toxisch, da keine Gewichtsabnahme der Versuchstiere zu verzeichnen ist, Der zur Wirkung notwendige Plasmaspiegel wird erreicht.

### Diskussion

Die meisten Pilze sind aufgrund ihrer genetischen Konstitution an ganz bestimmte Lebensräume gebunden. Teilen sich verschiedene Pilze ein und dasselbe Habitat, so kommt es zu Konkurrenzphänomenen.

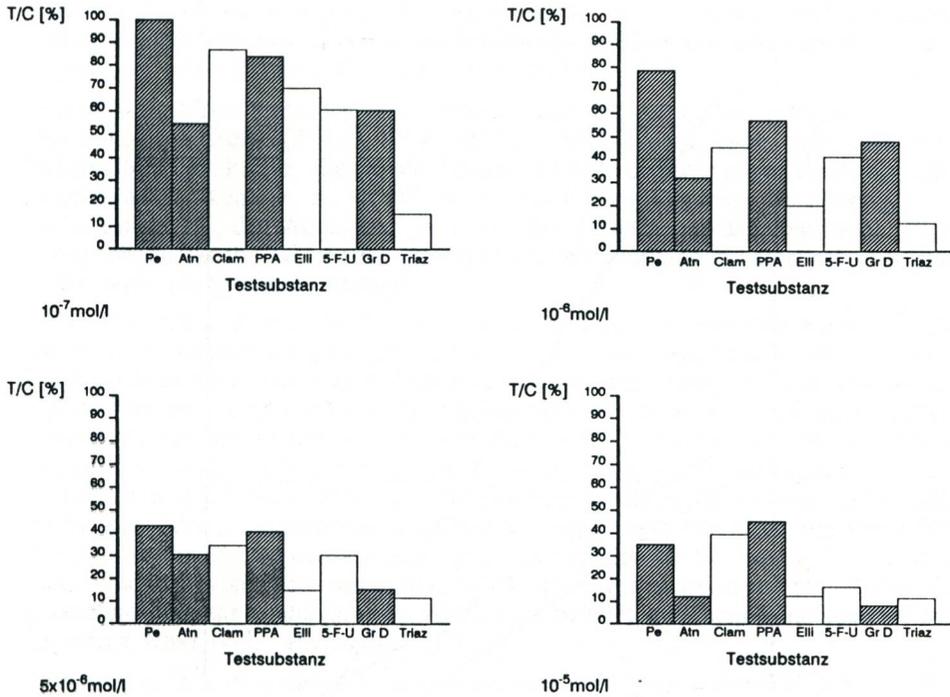


Abb. 2: In-vitro-Wirkung der Testsubstanzen an der menschlichen Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231

T = Zellmasse nach Applikation der Testsubstanz

C = Kontrolle (Zellmasse nach Einsatz des Lösungsmittels)

T/C = 100 % bedeutet keine Hemmwirkung

T/C = 0 % bedeutet maximale Hemmwirkung

Es sind jeweils die eingesetzten Konzentrationen in mol/l angegeben.

- Pe = Pilzextrakt
- Atn = Atromentin
- Clam = Chlorambuzil
- PPA = Polyporsäure
- Elli = Elliptizin
- 5-F-U = 5-Fluoruracil
- Gr D = Grevillin D
- Triaz = Triaziquon

Fig. 2: In-vitro activity of the substances tested on the human breast cancer cell line MDA-MB-231

T = cell mass after application of test substance

C = control (cell mass after application of solvent only)

T/C = 100 % indicates no inhibition

T/C = 0 % indicates maximal inhibition

The applied concentrations are given in mol/l.

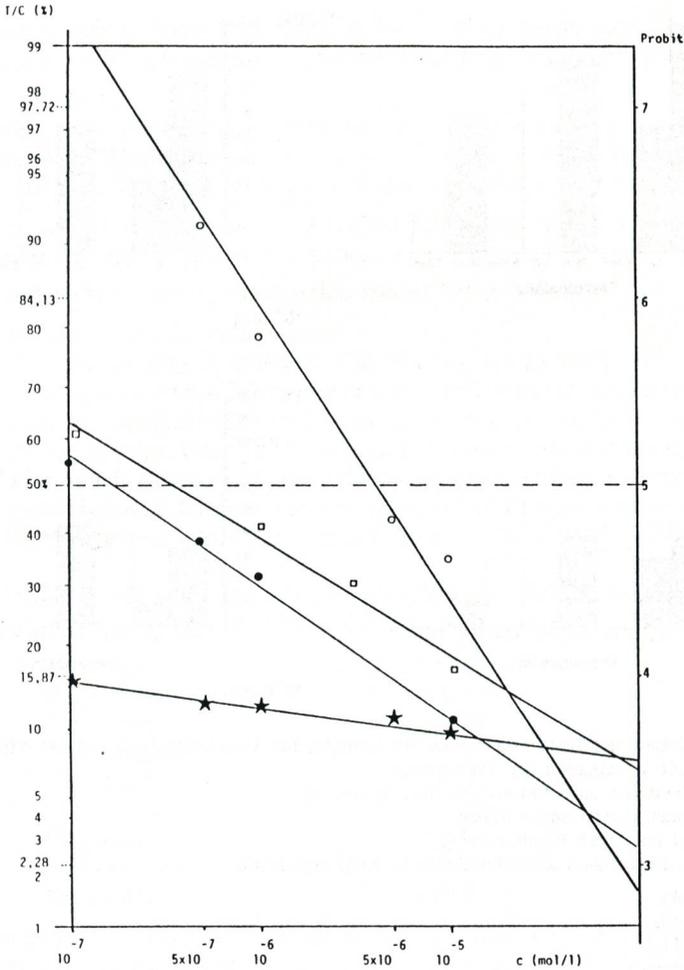


Abb. 3: Dosis-Wirkungsbeziehung einiger Testsubstanzen an der menschlichen Brustkrebs-Zelllinie MDA-MB-231.

Eine Gerade mit geringer Steigung bedeutet die Notwendigkeit einer starken Dosisänderung zum Erzielen einer signifikanten Wirkungsänderung. Eine steile Gerade zeigt starke Wirkungsänderung bei relativ geringer Dosisänderung an.

Die ED<sub>50</sub> erhält man durch Legen einer Horizontalen von Probit 5 (50 % Hemmung) zur Dosis-Wirkungsgeraden. Eine am Schnittpunkt gelegte Senkrechte schneidet die Abszisse am ED<sub>50</sub>-Punkt.

- Pilzextract
- 5-Fluoruracil
- Atromentin
- ★ Triaziquon

Fig. 3: Dose-response of some of the substances tested on the human breast cancer cell line MDA-MB-231  
 A „flat“ dose-response curve shows that a large change in dosage is required before a significant change in response will be observed. A „steep“ curve shows that a relatively small change in dosage will cause a large change in response.

The ED<sub>50</sub> can be obtained by drawing a horizontal line from probit 5 (50 % inhibition) to the dose-effect line. At the point of intersection a vertical line intersects the abscissa at the ED<sub>50</sub> point.

Von einigen Autoren (Brian /1957, Park /1967) wird die Antibiosis als Hauptmechanismus der interferierenden Konkurrenz bei Pilzen betrachtet, der es ihnen gestattet, andere Organismen von nutzbaren Ressourcen fernzuhalten.

Obwohl viele Mikrogenökologen die Ansicht vertreten, Antibiotika spielten in der Natur eine ökologische Rolle (Brian 1957, Müller 1963, Brock 1966, Alexander 1971, Baker 1980, Baker & Cook 1983), herrscht doch hierüber in der Fachwelt kein uneingeschränkter Konsens. So ist Gottlieb (1976) der Meinung, die bisherigen Daten reichten nicht aus, den Antibiotika im natürlichen Habitat eine antagonistische Wirkung zuzuschreiben. Auch Williams (1982) konstatiert, Antibiotika könnten im natürlichen Boden nicht nachgewiesen werden.

Der antibiotisch wirksame *Paxillus-atrotomentosus*-Metabolit Atromentin liegt, wie dünn-schichtchromatographisch gezeigt wurde, im natürlichen Substrat des Pilzes vor. Das vom Pilz besiedelte Holz wurde zum Zeitpunkt lebhafter Fruchtkörperbildung untersucht, so daß wohl davon auszugehen ist, daß das Mycel metabolisch aktiv war. Wenn auch über die Konzentrationen der im Holz vorliegenden Substanzen hier keine Aussage getroffen werden kann, so ist dennoch eine antibiotische Aktivität und somit eine ökologische Bedeutung anzunehmen. Darauf deutet auch das Ergebnis der Keimzahlbestimmung hin. Mögliche additive oder gar synergistische Effekte (die experimentellen Daten der Versuche mit *Penicillium*-Konidien sprechen dafür) legen eine funktionelle Bedeutung der Metaboliten nahe. Es scheint wohl auch wenig sinnvoll, daß der Organismus einen relativ hohen Stoffwechsellaufwand zur Produktion von Metaboliten betreibt, auf deren Gene keinerlei Selektionsdruck wirkt (vgl. Hopwood 1981).

Selbstverständlich muß damit gerechnet werden, daß Hemmwirkungen, wie sie sich in *in-vitro*-Tests ergeben, sich nicht in gleichem Maße unter natürlichen Bedingungen gestalten müssen (Wallhäuser 1951, Bowen & Theodorou 1979, Bowen 1980).

Wenn in den meisten Fällen *in-vitro* produzierte Antibiotika im natürlichen, oligotrophen Substrat nicht nachzuweisen sind, so mag das auch daran liegen, daß sich jeweils nur ein geringer Teil der im Boden vorhandenen Mikroorganismen in der aktiven Wachstumsphase befindet. Viele Antibiotika sind im natürlichen Boden sehr instabil und eine Anreicherung ist aufgrund der Diffusion nicht zu erwarten. Beim Atromentin handelt es sich um eine relativ stabile Verbindung und möglicherweise kommt es im Holz zu einer Anreicherung aufgrund der im Vergleich zu Erdboden verlangsamten Diffusion.

Die Ergebnisse an Bakterienstämmen stehen im Einklang mit Befunden von Benedict & Brady (1972), die für das Atromentin antibiotische Wirkung an *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* und *Candida albicans* nachwiesen, weitere Untersuchungen der antibiotischen Eigenschaften jedoch für nicht gerechtfertigt hielten.

Es ist immer wieder zu beobachten, daß Pilzarten im Kulturmycel und Fruchtkörper unterschiedliche, jedoch biogenetisch verwandte Inhaltsstoffe akkumulieren (Kämmerer & al. 1985). So fanden Besl & Blumreisinger (1983) 100%ige Mortalität von *Drosophila*-Larven bei Verfütterung von *Paxillus-atrotomentosus*-Fruchtkörpermehl, während der Einsatz des vegetativen Mycels keinen Effekt hatte (Besl & al. 1984). Allgemein ist zu sagen, daß nie vorausgesetzt werden kann, daß Pilzmycelien auf artifiziellen Medien den gleichen Metabolismus aufweisen wie im natürlichen Substrat, zumal auf künstlichen Medien immer wieder physiologische Degenerierungserscheinungen beobachtet werden. Deutlich wird jedoch, daß die Sekundärmetaboliten Höherer Pilze immer auch unter dem Aspekt ihrer ökologischen Funktion betrachtet werden müssen (Kämmerer & al. 1985).

Seit der Entdeckung des Penicillins hat sich eine große Anzahl von Untersuchungen der Auffindung neuer Antibiotika gewidmet. Hier stand in erster Linie die Nutzbarmachung für den Menschen im Vordergrund des Interesses.

Aufgrund der Befunde an Bakterien, Pilzen und Höheren Pflanzen ist hinsichtlich der Wirkweise des Atromentins an einen Eingriff in zentrale Stoffwechselprozesse der Zelle zu denken. Die antineoplastische Wirkung an menschlichen Brustkrebszellen bestätigt die Richtigkeit der Überlegungen.

Die Erkenntnis, daß Pilzmetaboliten antitumorale Wirkung aufweisen, ist keineswegs neu; eine ganze Reihe von experimentellen Arbeiten hat dies gezeigt.

Es können hier grundsätzlich zwei Gruppen unterschiedlicher Wirkungsweisen verzeichnet werden. Zum einen handelt es sich um oft nicht genau definierte, höhermolekulare Substanzen (überwiegend Polysaccharide), die in irgendeiner Weise eine Modifizierung der zellulären Immunität hervorrufen. Produzenten solcher Substanzen sind hauptsächlich Mikropilze, und hier in erster Linie Oomyceten. Es wurden aber auch Polysaccharide aus Makromyceten untersucht. Stellvertretend sei hier nur das Schizophyllan aus *Schizophyllum commune* genannt. Eine Zusammenstellung der in dieser Einsicht untersuchten Pilze findet sich bei Ceruti & Ceruti (1986).

Der zweiten Gruppe von Substanzen ist eine Wirkung auf die DNA-, RNA- oder Protein-Synthese der Tumorzellen zuzusprechen (Ceruti & Ceruti 1986).

Da die von uns getesteten Substanzen an Zellkulturen *in-vitro* bereits Wirkung zeigen, sind sie eindeutig dieser Gruppe zuzuordnen.

Auch hier gilt, daß bis auf einige Ausnahmen alle auf antineoplastische Wirkung untersuchten Pilzmetaboliten von Mikromyceten stammen.

Aus Flechten und Höheren Pilzen ist z. B. das Physcion (1,8-Dihydroxy-6-methyl-3-methoxy-9,10-anthrachinon) zu nennen. Es kann in einer ganzen Reihe von *Cortinarius*- und *Dermocybe*-Arten nachgewiesen werden (Gill & Steglich 1987). Für diese Substanz, die sie allerdings aus *Eurotium repens* de Bary isolierten, fanden Podojil & al. (1978) eine starke *in-vitro*-Hemmung von HeLa-Zellen (menschliches Cervixkarzinom). Die ED<sub>50</sub> lag bei 0,1 µg/ml (das entspricht 3,5·10<sup>-7</sup> mol/l).

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß es durchaus lohnend ist, antagonistisch wirkende Metaboliten aus Höheren Pilzen an menschlichen Tumorzellen zu testen. Die Ergebnisse belegen, daß Atromentin, aber auch Grevillin D, im Zellversuch außerordentlich gut wirken. Im Vergleich zum klinisch etablierten 5-Fluoruracil liegt die ED<sub>50</sub> des Atromentins sogar niedriger.

Die Ergebnisse des Tierversuchs sind bis zum Vorliegen von Bestätigungsversuche mit Vorbehalt zu betrachten. Man kann jedoch sicher sagen, daß das gewählte Applikationschema ein suboptimales ist und bei Optimierung durchaus noch bessere Ergebnisse zu erwarten sind. Bisher ist das Atromentin die einzige Substanz, die *in-vivo* im gewählten Modell zu einer Wachstumshemmung des Tumors führte.

Das ebenfalls von uns *in-vitro* getestete Pilzpigment Polyporsäure, das sich vom Atromentin lediglich durch das Fehlen der beiden Hydroxylgruppen an den Arylringen unterscheidet, liegt in ihrem ED<sub>50</sub>-Wert um eine Zehnerpotenz höher als das Atromentin.

Cain (1966) wies Antitumorwirkung der Polyporsäure an L 1210 Leukämiezellen nach. Er synthetisierte eine Vielzahl von Derivaten, darunter auch das Atromentin, von denen jedoch lediglich das 5-(4-Bromophenyl)-3,6-dihydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-1,4-

benzochinon gegen die L 1210 Leukämie in Mäusen eine Effizienz zeigte, die mit derjenigen der Polyporsäure zu vergleichen war. Cain geht in keiner Weise auf die Durchführung der Antitumortests selber ein und gibt weder T/C noch ED<sub>50</sub>-Werte an. Er vermutet, daß die Polyporsäure in der Maus als Steroidanalogon fungiert, da auch Kortison bei diesen Tumorzellen eine Wirkung zeigt.

Die Strukturanalogie des Atromentins zu sowohl steroidal als auch nichtsteroidal Estrogenen und Antiestrogenen läßt eine Wirkung gerade auch am estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinom erwarten.

Die Ergebnisse lassen erwarten, daß die Erkenntnisse der Chemosystematik Höherer Pilze in der experimentellen Krebschemotherapie von Nutzen sein werden.

#### Dank

Für die großzügige Unterstützung und wertvollen Hinweise sei Herrn Professor Dr. H. Schönenberger herzlich gedankt.

Herrn Professor Dr. A. Bresinsky danken wir ebenfalls für seine Unterstützung.

Herrn Dr. H. Besl gilt unser Dank für die freundliche Überlassung der Polyporsäure und des Grevillins D sowie für wertvolle Hinweise.

Herzlich verbunden sind wir Herrn Dr. med. vet. M. Riegler für die freundschaftliche Hilfe bei der *In-vivo*-Testung.

Herrn Dr. R. C. Summerbell danken wir für die Überlassung der *Trichoderma-polysporum*-Kultur.

#### Literatur

- ALEXANDER, M. (1971a) – Microbial Ecology. New York, London, Sydney, Toronto; 511 pp.  
 – (1971b) – Biochemical ecology of micro-organisms. Ann. Rev. Microbiol. 25, 361–392.
- ATCC (1982) – American Type Culture Collection, Catalogue of Strains I. 15. Aufl., Rockville.
- BAKER, K. F. (1980) – Microbial antagonism – the potential for biological control. In: D. C. Ellwood, J. N. Hedger, M. J. Latham, J. M. Lynch & J. H. Slater (eds.): Contemporary Microbial Ecology. Acad. Press, London, 327–347.
- & R. J. COOK (1983) – The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. The American Phytopathological Society, St. Paul, 539 pp.
- BENEDICT, R. G. & L. R. BRADY (1972) – Antimicrobial activity of mushroom metabolites. J. Pharm. Sci. 61, 1820–1822.
- BESL, H. & H. BLUMREISINGER (1983) – Die Eignung von *Drosophila melanogaster* zur Untersuchung der Anfälligkeit Höherer Pilze gegenüber Madenfraß. Z. Mykol. 49, 165–170.
- , A. BRESINSKY & A. KÄMMERER (1986) – Chemosystematik der *Coniophoraceae*. Z. Mykol. 52, 277–286.
- , – & CH. KRUMP (1984) – Funktion sekundärer Inhaltsstoffe bei Blätter- und Röhrenpilzen. Mitt. band Bot. Tagung Wien Sept. 1984, 89.
- BIRNBÖCK, H. (1988) – Untersuchungen zur Pharmakokinetik des Zindoxifens und zur Wirkung von Inhibitoren der Steroidsulfatase an hormonabhängigen Tumoren. Dissertation Universität Regensburg.
- BOWEN, G. D. (1980) – Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. In: D. C. Ellwood, J. N. Hedger, M. J. Latham, J. N. Lynch & J. H. Slater (eds.): Contemporary Microbial Ecology. Acad. Press, New York, 283–304.
- & C. THEODOROU (1979) – Interactions between bacteria and ectomycorrhizal fungi. Soil Biol. Biochem. 11, 119–126.
- BRIAN, P. W. (1951) – The ecological significance of antibiotic production. In: R. E. C. Williams & C. C. Spicer (eds.): Microbial Ecology. Cambridge University Press, Cambridge, 168–188.
- BROCK, T. D. (1966) – Principles of Microbial Ecology. Englewood Cliffs, New Jersey, 306 pp.
- CAILLEAU, R., R. YOUNG, M. OLIVE & W. J. REEVES Jr. (1974) – Breast tumor cell lines from pleural effusions. J. Natl. Cancer Inst. 53, 661–674.
- CAIN, B. F. (1966) – Potential anti-tumour agents. Part IV. Polyporic acid series. J. Chem. Soc. (C), 1966, 1041–1045.
- CERUTI, A. & M. CERUTI (1986) – Funghi cancerogeni e anticancerogeni dell'ambiente, degli alimenti, dei mangimi. Musumeci Editore, Quart (Aosta), 235 pp.
- GILL, M. & W. STEGLICH (1987) – Pigments of Fungi (*Macromycetes*). Springer, Wien, New York, 317 pp.
- GOTTLIEB, D. (1976) – The production and role of antibiotics in soil. J. Antibiot. 29, 987–1000.

- HOPWOOD, D. A. (1981) – Genetic studies of antibiotics and other secondary metabolites. In: S. W. Glover & D. A. Hopwood (eds.): *Genetics as a Tool in Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge, 187–218.
- JAHN, H. (1979) – Pilze die an Holz wachsen. Busse, Herford, 268 pp.
- KÄMMERER, A., H. BESL & A. BRESINSKY (1985) – *Omphalotaceae* fam. nov. und *Paxillaceae*, ein chemosystematischer Vergleich zweier Pilzfamilien der *Boletales*. *Pl. Syst. Evol.* 150, 101–117.
- KÖGL, F. & J. J. POSTOWSKI (1924) – Untersuchungen über Pilzfarbstoffe I. Über das Atromentin. *Liebigs Ann. Chem.* 440, 19–35.
- KREISEL, H. & F. SCHAUER (1987) – Methoden des mykologischen Laboratoriums. Fischer, Jena, 181 pp.
- KROPP, B. R. (1982) – Fungi from decayed wood as ectomycorrhizal symbionts of western hemlock. *Can. J. For. Res.* 12, 36–39.
- & J. M. TRAPPE (1982) – Ectomycorrhizal fungi of *Tsuga heterophylla*. *Mycologia* 74, 479–488.
- MÜLLER, L. (1963) – Untersuchungen über die Wirkung von Antibiotika und antibiotisch aktiven Aktinomyzeten und Basidiomyzeten. In: *Mykorrhiza, Internationales Mykorrhizasymposium*, Weimar 1960. G. Fischer, Jena, 85–99.
- PARK, D. (1967) – The importance of antibiotics and inhibiting substances. In: A. Burghes & F. Raw (eds.): *Soil Biology*. Acad. Press, New York, 435–447.
- PODOJIL, M., P. SEDMERA, J. VOKOUN, V. BETINA, H. BARATHOVA, Z. DURACKOVA, K. HORA-KOVA & D. NEMEC (1978) – *Eurotium (Aspergillus) repens* metabolites and their biological activity. *Folia Microbiol.* 23, 438–443.
- REILE, H., G. BERNHARDT, H. BIRNBÖCK & T. SPRUSS (1989) – Computer aided colorimetric microtiter assay for chemosensitivity evaluation based on doubling time analysis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 115 (Suppl.), 27.
- THÖRNER, W. (1878) – Über einen in einer *Agaricus*-Art vorkommenden chinonartigen Körper. *Ber. dtsh. chem. Ges.* 11, 533–535.
- WALLHÄUSER, K. H. (1951) – Untersuchungen über das antagonistische Verhalten von Mikroorganismen am natürlichen Standort. *Arch. f. Mikrobiol.* 16, 237–251.
- WILLIAMS, S. T. (1982) – Are antibiotics produced in soil? *Pedobiologia* 23, 427–435.



Deutsche Gesellschaft für Mykologie e.V.  
German Mycological Society

Dieses Werk stammt aus einer Publikation der DGfM.

[www.dgfm-ev.de](http://www.dgfm-ev.de)

Über [Zobodat](#) werden Artikel aus den Heften der pilzkundlichen Fachgesellschaft kostenfrei als PDF-Dateien zugänglich gemacht:

- **Zeitschrift für Mykologie**  
Mykologische Fachartikel (2× jährlich)
- **Zeitschrift für Pilzkunde**  
(Name der Hefreihe bis 1977)
- **DGfM-Mitteilungen**  
Neues aus dem Vereinsleben (2× jährlich)
- **Beihefte der Zeitschrift für Mykologie**  
Artikel zu Themenschwerpunkten (unregelmäßig)

Dieses Werk steht unter der [Creative Commons Namensnennung - Keine Bearbeitungen 4.0 International Lizenz](#) (CC BY-ND 4.0).



- **Teilen:** Sie dürfen das Werk bzw. den Inhalt vervielfältigen, verbreiten und öffentlich zugänglich machen, sogar kommerziell.
- **Namensnennung:** Sie müssen die Namen der Autor/innen bzw. Rechteinhaber/innen in der von ihnen festgelegten Weise nennen.
- **Keine Bearbeitungen:** Das Werk bzw. dieser Inhalt darf nicht bearbeitet, abgewandelt oder in anderer Weise verändert werden.

Es gelten die [vollständigen Lizenzbedingungen](#), wovon eine [offizielle deutsche Übersetzung](#) existiert. Freigibiger lizenzierte Teile eines Werks (z.B. CC BY-SA) bleiben hiervon unberührt.

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Zeitschrift für Mykologie - Journal of the German Mycological Society](#)

Jahr/Year: 1989

Band/Volume: [55\\_1989](#)

Autor(en)/Author(s): Kämmerer A., Bernhardt G.

Artikel/Article: [Experimentelle Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Metaboliten aus Paxillus atrotomentosus \(Batsch: Fr.\) Fr. 175-188](#)