

Chemische Kriegsführung zwischen Pilzen: ein Arsenal an bioaktiven Molekülen

Stéphanie Schürch¹, Katia Gindro¹, Olivier Schumpp¹, Michel Monod², Julie Verrier², Nadine Bohni³ und Jean-Luc Wolfender³

¹Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, 1260 Nyon

²Service de dermatologie et vénéréologie, Universitätsspital Lausanne CHUV, 1011 Lausanne

³Phytochemie und natürliche bioaktive Produkte, Pharmazieschule Genf-Lausanne, Universität Genf, Universität Lausanne, 1211 Genf

Auskünfte: Katia Gindro, E-Mail: katia.gindro@acw.admin.ch, Tel. +41 22 363 43 74



Foto: ACW

Pilze der Gattung *Fusarium* sind für zahlreiche Krankheiten bei Pflanzen wie auch für schwerwiegende Mykosen beim Menschen verantwortlich.

Die Pilze der Gattung *Fusarium* sind gefährliche Krankheitserreger für Pflanzen und Menschen. Die Infektionen, die sie hervorrufen, sprechen schlecht auf herkömmliche Behandlungen an. In einem innovativen Ansatz prüfen Forschende Möglichkeiten, die chemischen Substanzen, die in der Kriegsführung zwischen Pilzen zum Einsatz kommen, zur Pilzbekämpfung in der

Medizin wie auch in der Agronomie zu nutzen. Dieses vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung (SNF) unterstützte, interdisziplinäre Projekt vereinigt drei Institutionen der Genferseeregion: die Forschungsanstalt Agroscope Changins-Wädenswil ACW, das Universitätsspital Lausanne CHUV und die Universität Genf.

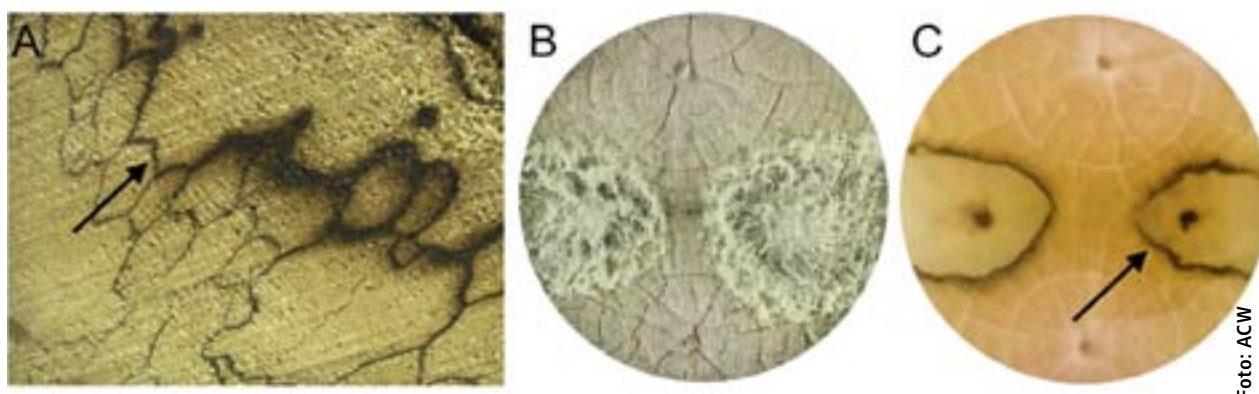


Foto: ACW

Abb. 1 | Reproduktion auf künstlichem Substrat der natürlich gebildeten Konfrontationszonen zwischen Pilzen im Holz. A: Schwarze Linien auf dem Holz. B und C: Co-Kultur von zwei holzabbauenden Pilzarten (*Eutypa lata* und *Botryosphaeria obtusa*) auf künstlichem Substrat, Sicht von oben (B) und unten (C).

Die Gattung *Fusarium*: Krankheitserreger für Menschen und Pflanzen

In Europa leiden 3 bis 10 % der Bevölkerung unter Nagelpilzkrankungen (Onychomykosen). Die meisten der isolierten Pilze der befallenen Nägel gehören zwei Dermatophytenarten an, der *Trichophyton rubrum* und *T. interdigitale*. Es werden jedoch häufig andere Arten aus den Onychomykosen isoliert. So waren 4 % der zwischen 2002 und 2005 vom CHUV untersuchten Infektionen auf *Fusarium* spp., hauptsächlich *F. oxysporum* und *F. solani* (Monod et al. 2006; Ninet et al. 2005), zurückzuführen. Während die Dermatophyten gut auf die heutigen Fungizidbehandlungen ansprechen, ist dies bei *Fusarium* kaum oder überhaupt nicht der Fall (Baudraz-Rosselet et al. Garcia-Effron et al. 2004). Im Übrigen verursachen *F. oxysporum*, *F. solani* und *F. proliferatum* bei immungeschwächten Patienten invasive Infektionen. Es ist deshalb wichtig, die Nägel der Patienten sorgfältig zu untersuchen, bevor eine Behandlung mit Immunsuppressiva erfolgt. Invasive Infektionen sind sehr schwer behandelbar und ihr Ausgang ist oft tödlich. Es ist deshalb unerlässlich, über ein wirksames Fungizid zu verfügen.

Parallel dazu sind in der Landwirtschaft zahlreiche Pflanzenkrankheiten durch *Fusarium* verursacht und führen zu erheblichen wirtschaftlichen Verlusten (Agrios 2005). Ein bekanntes Beispiel dafür ist *F. graminearum*, einer der Erreger der Ährenfusariose von Weizen und Mais. Dieser Krankheitserreger beeinträchtigt die Kornfüllung massiv, produziert aber auch Toxine, welche die Ernte verseuchen und sowohl der Gesundheit des Konsumenten als auch des gefütterten Viehs schaden. Die aus menschlichem Gewebe isolierten Arten sind auch als Pathogene in der Agronomie bekannt: *F. oxysporum* ist mit Gefässerkrankungen bei

verschiedenen Wirten wie beispielsweise Tomate, Erbse oder Rübe verknüpft. *F. solani* ist der ätiologische Erreger zahlreicher Krankheiten wie der Trockenfäule der Kartoffel oder einer Wurzelkrankheit der Erbse. Die Bekämpfung der Fusariosen mittels Fungiziden erweist sich allgemein als schwierig.

Verteidigung des Territoriums

Die Entdeckung neuer Behandlungsmöglichkeiten von Pilzkrankungen ist demzufolge sowohl für die Medizin als auch für die Agronomie von zentraler Bedeutung. Grundsätzlich stellen die Pilze eine wichtige Quelle natürlicher Substanzen dar, so zum Beispiel für die Pharmaindustrie (Antibiotika und Immunsuppressiva) oder für den Agrar- und Lebensmittelsektor (Aromen, Fermente).

Sie erzeugen auch extrem giftige Moleküle wie Amanitin, Aflatoxine oder Trichothecene, die alle durch Schimmelpilze produziert werden, welche Lebensmittel befallen. Treffen sich zudem mehrere Pilzarten im gleichen Substrat, können sie interagieren und sich gegenseitig durch Bildung von Toxinen, sogenannten Mykoalexinen (Glaser et al. 2009), bekämpfen. Besonders gut sichtbar ist dieses Phänomen auf Substraten wie Holz, wo das Territorium jedes Pilzes durch ein deutlich sichtbares, schwarzes Band abgegrenzt wird (Abb. 1A). Diese Interaktionszonen konnten auf künstlichen Substraten reproduziert werden, indem zwei holzabbauende Pilzstämmen in einem gewissen Abstand zueinander platziert und deren Wachstum beobachtet wurde (Abb. 1B und C). Ganz allgemein können die Interaktionen zwischen zwei Kolonien je nach morphologischem Aussehen der Kolonien und deren Kontaktzone (Schumpp et al. 2010) in vier Typen gegliedert werden: >

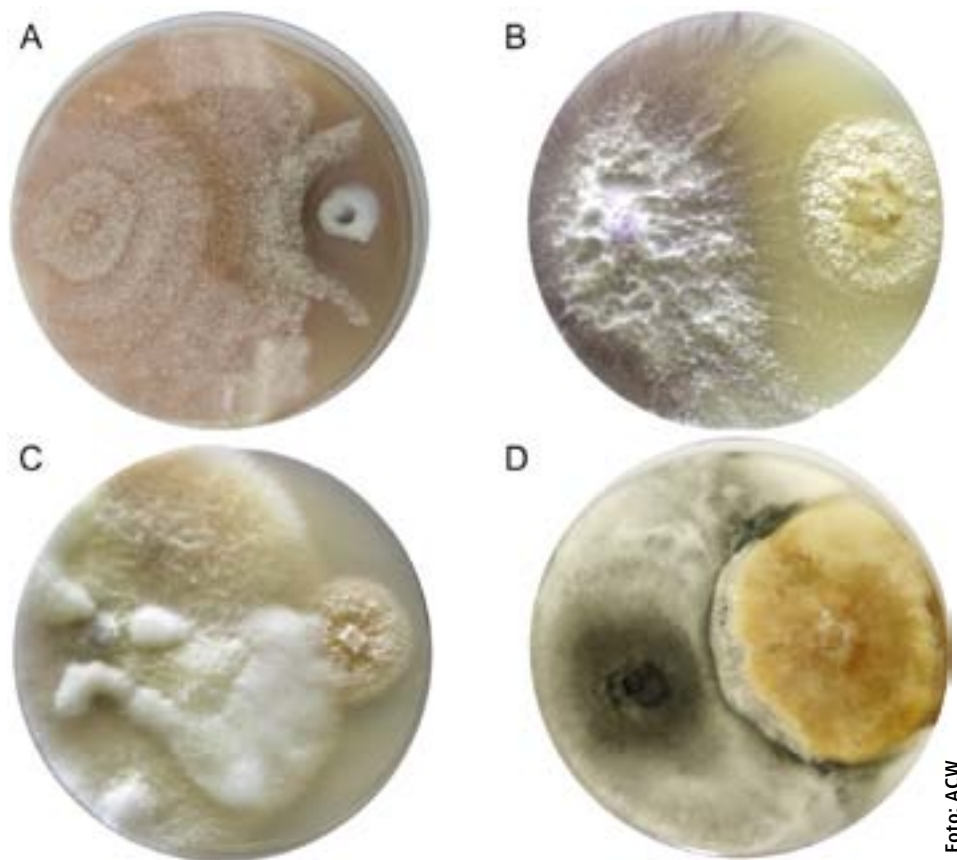


Foto: ACW

Abb. 2 | Die vier Interaktionstypen zwischen Pilzen: A: Wachstumshemmung auf Distanz. B: Wachstumshemmung durch Kontakt. C: Überlappung. D: Bildung einer Sperrzone.

- **Wachstumshemmung auf Distanz:** Zwischen den beiden Partnern bleibt eine pilzmycelfreie Zone bestehen (Abb. 2A).
- **Wachstumshemmung durch Kontakt:** Das Wachstum wird gestoppt, sobald sich die Pilzfäden berühren (Abb. 2B).
- **Überlappung:** Ein Pilzmycel wächst über das andere hinweg (Abb. 2C).
- **Bildung von «Sperrzonen»:** Am Berührungspunkt der Kolonien bildet sich eine undurchdringliche, dunkelbraune Zone (Abb. 2D).

Chemische Bedrohung: die Mykoalexine

Zur Ermittlung der aufgrund dieser Interaktionen induzierten Substanzen wurden die Metabolitenprofile der reinen Kulturen und die Profile der Konfrontationszonen durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (UHPLC) gekoppelt mit Flugzeit-Massenspektrometrie (TOFMS) untersucht. Konfrontationen zwischen holzabbauenden Pilzen zeigten, dass zahlreiche sekundäre Stoffwechselprodukte *de novo* in der Interaktionszone gebildet werden (Glaser *et al.* 2009). Die Erstellung des

metabolischen Profils durch UHPLC und TOFMS erlaubt es, die Molekularformeln der Mykoalexine direkt zu bestimmen. Die chemische Struktur des O-Methylmelains, eines von den am stärksten induzierten Metaboliten, wurde durch Kernmagnetresonanz (CapNMR) bestimmt. Anschliessend wurde die biologische Aktivität dieser Substanz beurteilt, insbesondere ihre fungiziden, antibiotischen, phytotoxischen und auch zytotoxischen (= krebshemmend; Abb. 3) Eigenschaften. Es zeigt sich, dass in den Konfrontationszonen grosse metabolische Veränderungen stattfinden können und dadurch ein Reservoir an bioaktiven Substanzen entstehen kann. Zurzeit sind *Fusarium*-Konfrontationen aus *Onychomyces* im Gange. Die Bestimmung der neu synthetisierten Moleküle (Wolfender *et al.* 2009) und die Ermittlung der biologischen Aktivität dieser Mykoalexine lassen darauf hoffen, dass für die Pharmaindustrie und Agronomie wertvolle Fungizide entdeckt werden. Dies umso mehr, als eine der Stärken dieses Projekts in der Zusammenarbeit von Spezialistinnen und Spezialisten verschiedenster Gebiete besteht. ■

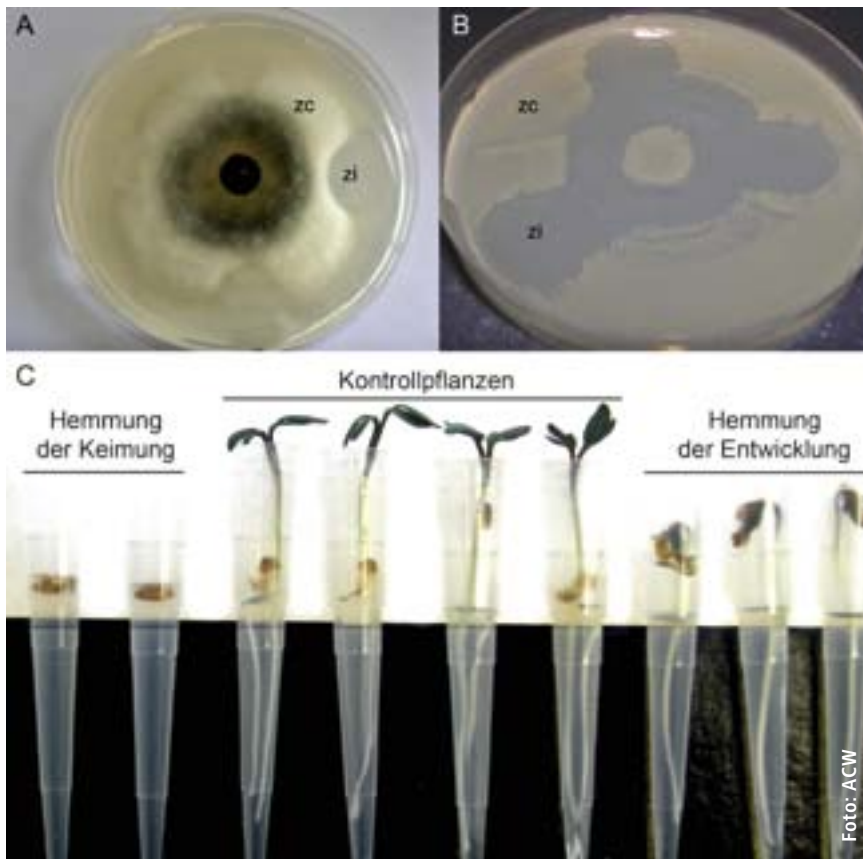


Abb. 3 | Biologische Aktivitätstests auf Rohextrakten der Konfrontationszonen sowie auf gereinigtem O-Methylmellein. A: Fungizide Aktivität, sichtbar durch Wachstumshemmung von *Botryosphaeria obtusa* (zc: Wachstumszone; zi: Wachstumshemmungszone). B: Durch Hemmung des bakteriellen Wachstums im Beisein von O-Methylmellein nachgewiesene bakterizide Aktivität. C: Phytotoxische Aktivität des O-Methylmelleins, das bei starker Konzentration die Keimung der Kressesamen hemmt und bei geringerer Konzentration die Entwicklung der Keimlinge stört.

Literatur

- Agrios G. N., 2005. *Plant pathology*. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 922 p.
- Baudraz-Rosset F., Ruffieux C., Lurati M., Bontems O. & Monod M., 2010. Onychomycosis Insensitive to Systemic Terbinafine and Azole Treatments Reveals Non-Dermatophyte Moulds as Infectious Agents. *Dermatology* 220 (2),164–168.
- Garcia-Effron G., Gomez-Lopez A., Mellado E., Monzon A., Rodriguez-Tudela J. L. & Cuenca-Estrella M., 2004. In vitro activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53 (6),1086–1089.
- Glauser G., Gindro K., Fringeli J., De Jeffrey J.-P., Rudaz S. & Wolfender J.-L., 2009. Differential analysis of mycoalexins in confrontation zones of grapevine fungal pathogens by ultrahigh pressure liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and capillary nuclear magnetic resonance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 1127–1134.
- Monod M., Bontems O., Zaugg C., Lechenne B., Fratti M. & Panizzon R., 2006. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *Journal of Medical Microbiology* 55,1211–1216.
- Ninet B., Jan I., Bontems O., Lechenne B., Jousson O., Lew D., Schrenzel J., Panizzon R. & Monod M., 2005. Molecular identification of Fusarium species in onychomycoses. *Dermatology* 210, 21–25.
- Schumpp O., Bohni N., Bujard A., Wolfender J. L., Monod M., Schürch S. & Gindro K., 2010. Competitive interactions between fungi induce the production of a large diversity of new metabolites. 9th International Mycological Congress, 1–6 August 2010, Edinburgh, UK.
- Wolfender J. L., Glauser G., Boccard J. & Rudaz S., 2009. MS-based Plant Metabolomic Approaches for Biomarker Discovery. *Natural Product Communications* 4 (10),1417–1430.