

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

ABTEILUNG FÜR KLINISCHE TOXIKOLOGIE
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR INNERE MEDIZIN 2

KLINIKUM RECHTS DER ISAR
(LEITUNG: PROF. DR. FLORIAN EYER)

Inhibition der Aldehyddehydrogenase durch Extrakte des Pilzes *Echinoderma asperum in vitro*

KATRIN MARINA ROMANEK

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Florian Eyer
2. Prof. Dr. Tilo Biedermann

Die Dissertation wurde am 10.08.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät am 04.07.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Fotoverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Funktion und Vorkommen der ALDH	1
1.2. Asian Flush Syndrome	2
1.3. Hemmung der ALDH durch verschiedene Substanzen	3
1.3.1. Kalkstickstoff Krankheit	4
1.3.2. Disulfiram	4
1.3.3. Weitere Substanzen	5
1.4. Hemmung der ALDH in der Tumorthherapie	6
1.5. Hemmung der ALDH durch verschiedene Pilze	7
1.6. Fallberichte über Vergiftungen mit Echinoderma asperum	11
1.7. Fragestellung	15
1.8. Beschreibung von Echinoderma asperum	16
2. MATERIAL UND METHODIK	18
2.1. Herstellung der Pilzextrakte	19
2.2. Herstellung des Enzymassays	20
2.2.1. Wahl des Enzymassays.....	20
2.2.2. Etablierung des Enzymassays.....	23
2.2.3. Enzymassay mit Pilzextrakten	29
2.3. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des E. aspera Extraktes auf die Hemmwirkung	29
2.4. Reversibilität der Hemmwirkung des E. asperum Extraktes (Reaktivierung der ALDH) durch Hinzugabe von Mercaptoethanol	30
2.5. Gel-Permeations-Chromatographie	30

2.6. Flüssigchromatographie – Massenspektroskopie mit Elektrosprayionisation (LC-ESI-HR-MSⁿ)	32
2.7. Messungen für XAN (Fullscan/MS², positive+negativer Ionenmodus)	33
3. ERGEBNISSE	34
3.1. Inhibierung der ALDH durch Extrakt von <i>E. asperum</i>	34
3.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der ALDH durch wasserlöslichen Extrakt von <i>E. asperum</i>	36
3.1.2. Reversibilität der Hemmung von ALDH durch Extrakte von <i>E. asperum</i> durch Hinzugabe von Mercaptoethanol	37
3.1.3. Gel-Permeations-Chromatographie	39
3.1.4. Flüssigchromatographie – Massenspektroskopie (LC MS/MS) mit Elektrosprayionisation	41
3.2. Untersuchung weiterer Pilze bezüglich ihrer ALDH-Hemmung	45
3.2.1. Zuchtchampignon (<i>Agaricus bisporus</i>)	46
3.2.2. Austernseitling (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	47
3.2.3. Steinpilz (<i>Boletus edulis</i>)	48
3.2.4. Netzstieliger Hexenhöhrling (<i>Boletus luridus</i>)	49
3.2.5. Blaufleckender Purpur-Röhrling (<i>Boletus rhodopurpureus</i>)	50
3.2.6. Weinroter Purpur-Röhrling (<i>Boletus rubrosanguineus</i>)	51
3.2.7. Bräunlicher Stäubling (<i>Lycoperdon umbrinum</i>)	52
3.2.8. Keulenfußtrichterling (<i>Clitocybe clavipes</i>)	53
3.3. Einfluss des Erhitzens der Pilzextrakte auf die Hemmwirkung der ALDH	54
3.3.1. <i>Echinoderma asperum</i>	55
3.3.2. <i>Boletus luridus</i>	56
3.3.3. <i>Clitocybe clavipes</i>	57
4. DISKUSSION	58
5. LIMITATIONEN	62
6. AUSBLICK	64
Literaturverzeichnis	66
Danksagung	69

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: 3D Rekonstruktion der Aldehyddehydrogenase 2.....	1
Abb. 2: Reaktionsgleichung des Ethanol Metabolismus.....	2
Abb. 3: Tautomerengleichgewicht Cyanamid.....	4
Abb. 4: Strukturformel Disulfiram.....	5
Abb. 5: Saure Hydrolyse von Coprin.....	7
Abb. 6: Aus <i>C. clavipes</i> isolierten Fettsäuren.....	10
Abb. 7: Spitzschuppiger Schirmling (Illustration).....	17
Abb. 8: Eichkurve NADH.....	23
Abb. 9: Leerwertkurve des Assay mit Mercaptoethanol.....	25
Abb. 10: Assay mit Mercaptoethanol mit/ohne Disulfiram.....	26
Abb. 11: Leerwertkurve des Assay mit/ohne Mercaptoethanol.....	27
Abb. 12: Assay mit/ohne Mercaptoethanol mit/ohne Disulfiram.....	28
Abb. 13: Assay mit <i>E. asperum</i> Extrakt Wasser/Chloroform.....	35
Abb. 14: Verdünnungsreihe <i>E. asperum</i>	36
Abb. 15: Entstehungsgeschwindigkeiten von NADH mit verschiedenen Konzentrationen <i>E. asperum</i> Extrakt.....	37
Abb. 16: Assay mit <i>E. asperum</i> Extrakt mit Mercaptoethanol.....	38
Abb. 17: Unterbrechung des Assay mit <i>E. asperum</i> Extrakt und Hinzugabe von Mercaptoethanol.....	39
Abb. 18: Auftrennung des <i>E. asperum</i> Extraktes mittels Gel-Permeations- Chromatographie.....	40
Abb. 19: LC-MS Chromatogramm.....	41
Abb. 20: Ionenfallen-Quadrupol-MS: negativer ESI-Modus (M-H).....	42

Abb. 21: LC-Chromatogramm	43
Abb. 22: Ionenfallen-Quadrupol-MS:positiver ESI-Modus (M+H).....	44
Abb. 23: Assay mit Extrakt von <i>Agaricus bisporus</i>	46
Abb. 24: Assay mit Extrakt von <i>Pleurotus ostreatus</i>	47
Abb. 25: Assay mit Extrakt von <i>Boletus edulis</i>	48
Abb. 26: Assay mit Extrakt von <i>Boletus luridus</i>	49
Abb. 27: Assay mit Extrakt von <i>Boletus rhodopurpureus</i>	50
Abb. 28: Assay mit Extrakt von <i>Boletus rubrosanguineus</i>	51
Abb. 29: Assay mit Extrakt von <i>Lycoperdon umbrinum</i>	52
Abb. 30: Assay mit Extrakt von <i>Clitocybe clavipes</i>	53
Abb. 31: Assay mit erhitztem Extrakt von <i>E. asperum</i>	55
Abb. 32: Assay mit erhitztem Extrakt von <i>B. luridus</i>	56
Abb. 33: Assay mit erhitztem Extrakt von <i>C. clavipes</i>	57
Abb. 34: Hemmung der ALDH durch Disulfidbrücken an Cystein 302 (schematische Darstellung).....	59

Fotoverzeichnis

Foto 1: Spitzschuppiger Stachelschirmling (<i>Echinoderma asperum</i>).....	17
Foto 2: Zuchtchampignon (<i>Agaricus bisporus</i>).....	46
Foto 3: Austerseitling (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	47
Foto 4: Steinpilz (<i>Boletus edulis</i>).....	48
Foto 5: Netzstieliger Hexenröhrling (<i>Boletus luridus</i>).....	49
Foto 6: Blaufleckender Purpur-Röhrling (<i>Boletus rhodopurpureus</i>).....	50
Foto 7: Weinroter Purpur-Röhrling (<i>Boletus rubrosanguineus</i>).....	51
Foto 8: Bräunlicher Stäubling (<i>Lycoperdon umbrinum</i>).....	52
Foto 9: Keulenfußtrichterling (<i>Clitocybe clavipes</i>).....	53

Fotos 1, 3, 4, 5, 6, 8 mit freundlicher Genehmigung von Bettina Haberl

Fotos 7 und 9 mit freundlicher Genehmigung von Bernd Fellmann

Foto 2 von der Autorin

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vom Giftnotruf München gesammelte Fälle von Intoxikationen mit E. asperum und Ethanol in Deutschland.....	13
Tab. 2: Liste der Pilzsynonyme.....	18

Abkürzungsverzeichnis

ALDH	Aldehyddehydrogenase
ADH	Alkoholdehydrogenase
EtSH	Mercaptoethanol
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
A. bisporus	Agaricus bisporus
B. edulis	Boletus edulis
B. luridus	Boletus luridus
B. rhodopurpureus	Boletus rhodopurpureus
B. rubrosanguineus	Boletus rubrosanguineus
E. asperum	Echinoderma asperum
C. clavipes	Clitocybe clavipes
L. umbrinum	Lycoperdon umbrinum
P. ostreatus	Pleurotus ostreatus
RT	Retentionszeit
OD	Optische Dichte
MW	Mikrotiterwell
UV	Ultraviolett
KCL	Kaliumchlorid
HCL	Salzsäure
U	Units
LC-ESI-HR-MS	Liquid chromatographie - elektro spray ionisation - high resolution - mass spectrometry
UHPLC	Ultra high pressure liquid chromatographie

1. Einleitung

1.1. Funktion und Vorkommen der ALDH

Die Aldehyddehydrogenasen (ALDH) (Abb.1) sind eine Superfamilie von Enzymen die im Stoffwechsel vieler Lebewesen in Abhängigkeit von Coenzymen Aldehyde oxidieren (Oxidoreduktasen). Bisher sind 19 Gene im menschlichen Genom identifiziert worden, die ALDH-Isoenzyme kodieren. Die ALDH-Isoenzyme weisen teilweise deutliche Unterschiede in ihren Aminosäuresequenzen auf und sind größtenteils spezifisch für verschiedene Substrate. Sie lassen sich in mehrere Untergruppen klassifizieren (ALDH-1, -2 etc.), die entweder cytosolisch oder mitochondrial lokalisiert sind. Die Verteilung im menschlichen Gewebe ist unterschiedlich mit der höchsten Konzentration in der Leber gefolgt von Nieren, Uterus und Gehirn (Koppaka et al., 2012) (Marchitti et al., 2008).



Abb. 1: 3-dimensionale Rekonstruktion der molekularen Architektur einer menschlichen, mitochondrialen Aldehyddehydrogenase 2 bestehend aus 8 Proteinketten zu je 500 Aminosäuren (Apo Form). Aus „Protein Data Bank“ code 3N80 (www.rcsb.org)

Die ALDHs erfüllen ein breites Spektrum an physiologischen und toxikologischen Funktionen. So spielt beispielsweise die ALDH1A Subfamilie eine wichtige Rolle in der Embryogenese. ALDH1A1 (Retinol Dehydrogenase 1) und ALDH3A1 (Aldehyddehydrogenase 3A1) schützen das Auge vor UV-Strahlung und sind zentrale Enzyme der Phototransduktion. Die in den Hepatozyten mitochondrial lokalisierte ALDH2 spielt in der Verstoffwechslung von Ethanol eine entscheidende Rolle, indem es die Oxydation des Ethanol-Metaboliten Acetaldehyd zu Acetat (Essigsäure) katalysiert (Abb.2).

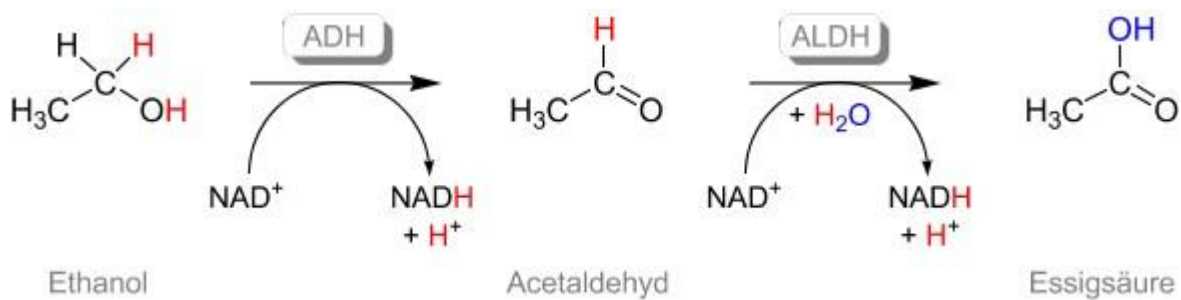


Abb. 2: Reaktionsgleichung des Ethanol Metabolismus: Ethanol wird durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) erst zu Acetaldehyd, und dann durch die Acetaldehyddehydrogenase (ALDH) zu Essigsäure metabolisiert. Dadurch wird das oxidierte Nicotinamadenindinukleotid (NAD⁺) in die reduzierte Form (NADH) überführt.

1.2. Asian Flush Syndrome

Die niedrige Alkoholtoleranz vieler Menschen asiatischer Herkunft beruht unter anderem auf einem Genpolymorphismus der ALDH2. Bei ca. 50% der ostasiatischen Bevölkerung führt eine Punktmutation im rs671 Allel auf Chromosom 12 zu einem Austausch von Glutaminsäure mit Lysin an Position 504 der ALDH2, welches in einer ineffizient arbeitenden und instabileren ALDH2 resultiert (Eng et al., 2007) (Peng et

al., 2014). Die Mutation kann heterozygot und homozygot auftreten. Nach Alkoholkonsum wird Ethanol durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) zu Acetaldehyd metabolisiert (Abb. 2). Aufgrund der geringeren ALDH2-Aktivität kann das anfallende Acetaldehyd nicht in adäquatem Ausmaß weiter zu Essigsäure abgebaut werden. Das nun angereicherte Acetaldehyd verursacht Beschwerden, die unter dem Begriff „Asian flush syndrome“ oder „Alcohol flush reaction“ zusammengefasst werden (siehe unten).

1.3. Hemmung der ALDH durch verschiedene Substanzen

Eine Reihe von Substanzen, teils natürlicher Herkunft, teils Medikamente oder Industriechemikalien, hemmen in vivo die ALDH.

Bei einer Hemmung der ALDH2 mit gleichzeitiger Einnahme von Alkohol ist die Umwandlung von Acetaldehyd in Acetat inhibiert, es kommt somit zu einer Anreicherung von Acetaldehyd im Körper (Abb. 2). Dies äußert sich in einer Reihe klinischer Symptome, die unter den Namen Acetaldehydsyndrom, Flush-Syndrom oder - wenn durch coprinhaltige Pilze ausgelöst - Coprinussyndrom bekannt sind. Die Symptome beinhalten Tachykardie, Hypertension, Schwitzen, Tremor, Kopfschmerzen, Juckreiz, Übelkeit und Erbrechen sowie eine rötlich-livide Verfärbung der Haut („flush“) mit Hitzegefühl, besonders des Gesichts, Halses und Thorax. Nicht selten wird die Symptomatik initial als akutes Koronarsyndrom fehlinterpretiert (Amuchastegui et al., 2014).

1.3.1. Kalkstickstoff Krankheit

Erstmals beschrieben wurde dieses Phänomen 1914 vom ersten bayrischen Gewerbearzt Prof. Franz Kölsch bei Arbeitern in der Kalkstickstoff Herstellung (Calciumcyanamid) welches als Düngemittel benutzt wurde. Nach Exposition gegenüber Kalkstickstoff reichten bereits geringe Mengen Alkohol, um starke Beschwerden auszulösen. Darunter Hautrötung an Kopf und Oberkörper, vertiefte Atmung, Tachykardie, Hypertonie, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen und Zittern, sogar Todesfälle wurden beschrieben (Hauschild, 1953). Auslöser dieses als „Kalkstickstoff-Krankheit“ bekannt gewordenen Syndroms ist Cyanamid (Abb. 3), welches aus Calciumcyanamid und Wasser entsteht, über Schleimhäute resorbiert werden kann und ein Inhibitor der ALDH2 ist.

Dies hat zur Anwendung von Cyanamid als Alkoholaversionsmittel geführt. Aufgrund der Lebertoxizität der Verbindung wurde die Substanz aber bald durch Disulfiram ersetzt (Tamai et al., 2000).

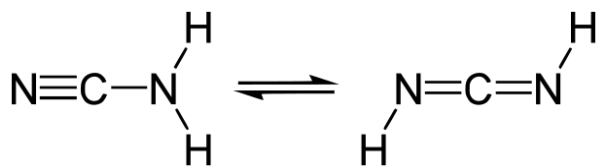


Abb. 3: Tautomerengleichgewicht Cyanamid

1.3.2. Disulfiram

Im frühen 20. Jahrhundert wurde Tetraethylthiuramdisulfid (Disulfiram) (Abb. 4) in der Gummiindustrie zum Vulkanisieren, aber auch in der Medizin als Antihelminthikum verwendet. Auch hier kam es bei Arbeitern in verarbeitenden Industrien zu den oben

beschriebenen Symptomen, wenn diese nach Exposition gegenüber Disulfiram Alkohol konsumierten. Seit 1948 macht man sich die Hemmwirkung des Disulfiram auf die ALDH2 in der Medizin bei alkoholsuchtkranken Menschen zu Nutze. Als pharmakologisches Präparat eingenommen soll es eine Alkoholabstinenz durch Aversion bewirken („Antabus®-Syndrom“). Diese Therapie ist inzwischen etabliert (Zindel and Kranzler, 2014), in ihrer Rolle zur Abstinenzhaltung aber nicht unumstritten.

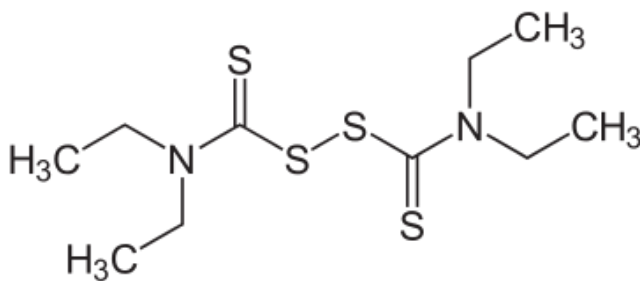


Abb. 4: Strukturformel Disulfiram

1.3.3. Weitere Substanzen

Auch für eine Reihe anderer Medikamente ist eine Hemmung der ALDH bekannt, hierunter die Antibiotika Metronidazol und die Gruppe der Cephalosporine, das Hypnotikum Chloralhydrat, orale Antidiabetika aus der Gruppe der Sulfonylharnstoffe (Koppaka et al., 2012) sowie der in der japanischen Kudzu Pflanze (*Pueraria Sp.* „Japanese arrowroot“) enthaltene Stoff Daidzin (Keung and Vallee, 1993).

2009 konnte nachgewiesen werden, dass auch die Durian-Frucht (*Durio zibethinus*; vulgo „Stinkfrucht“), die in Südostasien gerne verzehrt wird, die ALDH hemmt (Maninang et al., 2009).

ALDH-hemmende Substanzen sind nicht nur wissenschaftlich, sondern auch therapeutisch interessant:

1.4. Hemmung der ALDH in der Tumorthherapie

Eine weitere Anwendung der ALDH-Hemmung findet sich in der Tumorthherapie: ALDH-Isoenzyme sind mutmaßlich an der Entstehung von Malignomen beteiligt (Marchitti et al., 2008) (Jelski and Szmikowski, 2008). Verschiedene bösartige Tumore haben eine gesteigerte Genexpression und Aktivität von ALDHs (Ma et al., 2008) (Yao et al., 2014) oder weisen einen funktionalen Polymorphismus der ALDH auf (Moreb et al., 2008). Diese Veränderungen sind mit einer Resistenz gegenüber Bestrahlung und Chemotherapeutika assoziiert. Durch eine Hemmung der ALDH konnte in menschlichen Mammakarzinomzellen eine Resensibilisierung der Tumorzellen für Chemotherapeutika und Bestrahlung erreicht werden (Croker and Allan, 2011). Für den ALDH-Inhibitor Disulfiram (Handelsname Antabus®), der wie oben erwähnt seit Jahrzehnten in der Alkoholaversionstherapie eingesetzt wird, ist schon seit den 1970er Jahren eine antitumoröse Eigenschaft bekannt. Seine Metaboliten wirken als potente Proteasom-Inhibitoren, die bei Tumorzellen die Chemotherapeutikaresistenz, Angiogenese und Invasivität herabsetzen. Im Rahmen einer Medikamentenrepositionierung wird das für eine andere Indikation bereits zugelassene Disulfiram heute in humanklinischen Studien als Therapeutikum gegen u.a. Prostata- und Lungenkarzinome sowie Lebermetastasen verschiedener Primärtumore eingesetzt (Cvek, 2011).

Obwohl schon eine Reihe an Hemmstoffen der ALDH bekannt sind, lässt dies vermuten, dass die Entdeckung weiterer Hemmsubstanzen mit unterschiedlicher

Spezifität für Untergruppen der ALDHs auch in Zukunft durchaus von klinischem Nutzen sein könnte.

1.5. Hemmung der ALDH durch verschiedene Pilze

Das prominenteste Beispiel für eine natürlich vorkommende Substanz mit starker ALDH-Hemmung ist Coprin. Reversible, lästige Effekte des kombinierten Verzehrs von Ständerpilzen mit Alkohol sind spätestens seit 1906 für den Faltentintling (*Coprinus atramentarius*) und den Glimmertintling (*Coprinus micaceus*) beschrieben (Matthies and Laatsch, 1992) (Michelot, 1992). Es dauerte aber noch bis 1975 bis Coprin als Hemmsubstanz aus dem Faltentintling isoliert und beschrieben werden konnte (Vanhaelen et al., 1976) (Abb. 5). Der Faltentintling gilt als wohlschmeckender Speisepilz, sofern kein Alkohol zu den Mahlzeiten getrunken wird. In Kombination mit alkoholischen Getränken führt er zu den als Coprinus-Syndrom zusammengefassten Symptomen Flush, Tachykardie, Hypotonie sowie Übelkeit und Erbrechen, die teilweise als sehr bedrohlich empfunden werden. Coprin wirkt hierbei als pro-drug, der als Hemmsubstanz wirksame Metabolit ist Aminocyclopropanol (Matthies and Laatsch, 1992).

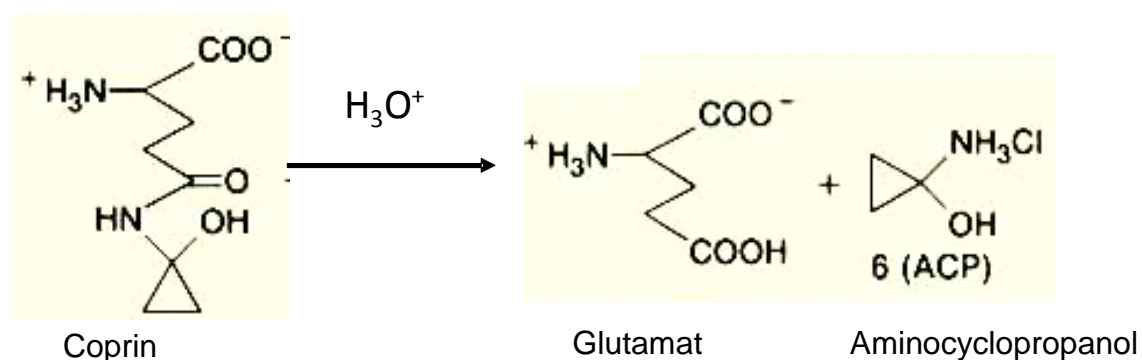


Abb. 5: Saure Hydrolyse von Coprin (Summenformel $C_8H_{14}N_2O_4$)

Weitere Tintlinge in denen Coprin nachgewiesen wurde sind z.B. der Spechtintling (*Coprinus picaceus*) oder der Glimmertintling (*Coprinus micaceus*) (Michelot, 1992). Der als Speisepilz bekannte Schopftintling (*C. comatus*) enthält hingegen keine Acetaldehyd hemmende Substanz und kann mit Alkohol verzehrt werden.

Weitere Pilze von denen ein Antabus-Syndrom berichtet wurde sind die Runzel-Verpel (*Verpa bohemica*), der Sparrige Schüppling (*Pholiota squarrosa*) oder der Gelbgrüne Ritterling (*Tricholoma flavovirens*) (Michelot, 1992).

Diese Pilze sind aber, außer evtl. *Tricholoma flavovirens*, der auch aus anderen Gründen mit Vorsicht zu konsumieren ist, keine Speisepilze. Hingegen wurden aus der Gattung *Boletus* (Röhrlinge), zu der auch viele populäre Speisepilze wie der Steinpilz (*Boletus edulis*) zählen, mehrere Pilze in Zusammenhang mit einem Antabus Syndrom nach Alkoholkonsum gebracht, darunter der Ochsenröhrling (*Boletus torosus*) und der Netzstielige Hexenröhrling (*Boletus luridus*).

1994 wurde der Nachweis von Coprin in *B. torosus* publiziert (Kiwitt and Laatsch, 1994) Dieser kann aber angezweifelt werden. *B. torosus* gilt in Frankreich als guter Speisepilz, dort wurden keine Fälle von Alkoholunverträglichkeit in Zusammenhang mit diesem Pilz beobachtet. Zudem wurde hier (Kiwitt and Laatsch, 1994) lediglich ein Extrakt von *B. torosus* über eine mit einer zur Aminosäureanalytik verwendeten Säulenchromatographiemethode aufgetrennt. Hierbei fand sich eine Bande mit gleicher Retentionszeit wie Coprin. Es wurde weder die angereicherte Substanz aufgearbeitet und mit spektroskopischen Methoden wie Kernspinresonanz-Spektroskopie und Massenspektrometrie identifiziert, noch der Aktivitätsnachweis in einem Assay zur ALDH Hemmung geführt.

Ähnlich unsicher ist die Datenlage bei dem in der Münchner Gegend häufig vorkommenden Netzstieligen Hexenröhrling (*Boletus luridus*). Er wird von der Deutschen Gesellschaft für Mykologie als „Pilz mit uneinheitlich beurteiltem Speisewert“ mit der Bemerkung “selten individuelle Unverträglichkeit mit Alkohol“ geführt (www.dgfm-ev.de). Auch in renommierten Pilzführern wird *B. luridus* fraglich mit dem Coprinus-Syndrom in Zusammenhang gebracht (Flammer and Horak, 2003) (Bresinsky and Besl, 1985). Eine sorgfältige Recherche ergibt, dass der Giftverdacht auf wenigen Fallbeispielen beruht. Die am häufigsten genannte Kasuistik ist ein Fall aus dem Jahr 1981. Hier wird das Auftreten einer Alkoholunverträglichkeit als Reaktion bei einem Ereignis, bei dem drei Betroffene ein Mischpilzgericht aus *B. luridus*, *Tricholoma terreum* (Verwandter des oben erwähnten *Tricholoma flavovirens*) und *Lycoperdon umbrinum* verzehrt hatten, beschrieben. Die zwei Männer und eine Frau, alle Mitte vierzig, tranken zu der Mahlzeit Rotwein. Nach wenigen Minuten trat bei allen drei Personen allgemeines Unwohlsein, Übelkeit, Erbrechen, Herzklopfen, Wärmegefühl im ganzen Körper, Schwitzen und Schwindel auf. Einer der Patienten führte sich zur Stärkung noch einen Cognac zu, hierunter verstärkten sich die Symptome. Bei Krankenhausaufnahme ca. eine Stunde später klagten die Patienten noch über Übelkeit und Brechreiz. Bei zwei Patienten wurde ein hypotoner Blutdruck von 90/70 mmHg erhoben. Eine Rückfrage bei der Schweizerischen Vereinigung Amtlicher Pilzkontrollorgane (VAPKO) bzw. dem Giftnotruf Zürich (Tox Info Suisse) ergab, dass man dort eher von einer Unverträglichkeit mit *Boletus luridus* ausgeht (persönliche Mitteilung von Frau Dr. K. Schenk-Jäger, Toxinfo Suisse). Unter Überwachung und symptomatischer Therapie waren die Symptome aller drei Patienten innerhalb der folgenden Stunden komplett rückläufig, sie wurden nach 12 Stunden nach Hause entlassen (Budmiger and Kocher, 1982). Da ein Mischpilzgericht verzehrt wurde, ist nicht sicher ob hierbei

überhaupt der Netzstielige Hexenröhrling der verantwortliche Pilz war. In Pilzsammlerkreisen wird die potentielle Giftigkeit kontrovers und oft emotional diskutiert. Mitarbeiter der Toxikologischen Abteilung haben auch bei eigenem, wiederholtem Konsum von *B. luridus* nie eine Alkoholunverträglichkeit bemerkt.

In Japan wird der Keulenfußtrichterling (*Clitocybe clavipes*) als Speisepilz konsumiert. *C. clavipes* wächst auch in Deutschland, wird aber hier nicht als Speisepilz gesammelt. In Japan wurde über Alkoholunverträglichkeit nach Konsum von *C. clavipes* berichtet. Daraufhin wurden aus dem Pilz ALDH-hemmende, ungesättigte C18-Fettsäuren mit Ketogruppen an C8 bzw. C9 isoliert und als ALDH-hemmende Verbindungen beschrieben (Abb.6) (Kawagishi et al., 2002). Diese Verbindungen haben keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit Coprin, Disulfiram oder anderen als ALDH-Hemmern bekannte Substanzen.

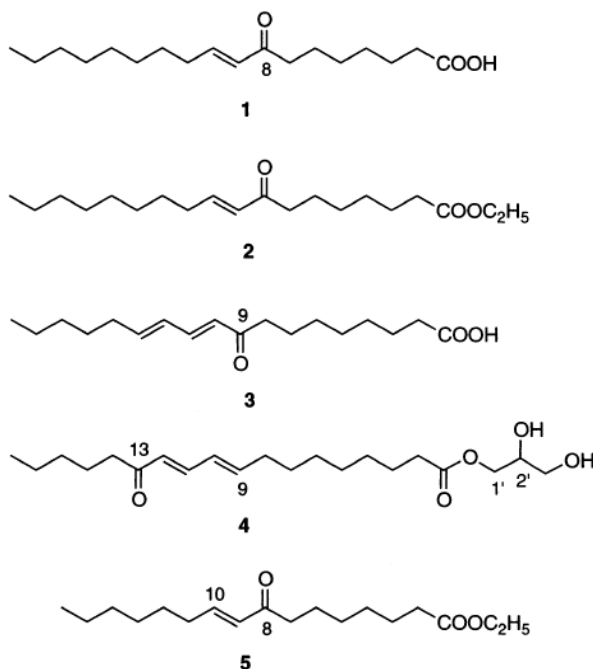


Abb 6: Aus (Kawagishi et al., 2002): Die aus *C. clavipes* isolierten, ungesättigten C-18 Fettsäuren können ALDH Inhibieren.

1.6. Fallberichte über Vergiftungen mit *Echinoderma asperum*

2008 wurde in der Toxikologischen Abteilung des Klinikums Rechts der Isar München erstmalig ein Fall von Antabus-Syndrom bei zwei Betroffenen nach Verzehr des Schirmlings *Lepiota aspera* (später *Echinoderma asperum* genannt) beobachtet. Die Pilzgattung *Lepiota* wurde bisher nicht in Zusammenhang mit Alkoholunverträglichkeit gebracht, allerdings gibt es darunter auch einige stark giftige, amatoxinhaltige Vertreter. *Lepiota aspera* gilt nicht als Speisepilz, die Ingestion beruhte auf einer Verwechslung.

Im Oktober 2008 hatte ein Ehepaar selbst gesammelte Pilze, vermeintlich Riesenchampignons (*Agaricus augustus*), zubereitet und gemeinsam gegessen. Initial traten keine Beschwerden auf, als die Ehepartner ca. 4 Stunden später jedoch beide ein Bier zu sich nahmen reagierten beide mit den Symptomen Flush, Atemnot, Kopfschmerzen, Tachykardie und Hypertonie. Der Rettungsdienst brachte die Patienten in die medizinische Nothilfe des Klinikums Rechts der Isar. Dort wurde bei Verdacht auf ein akutes Koronarsyndrom primär eine stationär kardiologische Abklärung veranlasst. Ein Myokardinfarkt konnte ausgeschlossen werden. Die Ehefrau verdächtigte die Pilze als Auslöser der Symptomatik, sodass Kontakt mit unserer toxikologischen Abteilung aufgenommen wurde. Erfreulicherweise waren Pilzreste der Aufsammlung noch vorhanden. Hier konnte dann statt der initial vermuteten *Coprinus* Spezies *Echinoderma asperum* identifiziert werden. Im weiteren Verlauf konnten über den Giftnotruf München in Deutschland zwischen 2008 und 2013 noch weitere Fälle des Acetaldehyd-Syndroms dokumentiert werden, bei denen Pilzsachverständige *E. asperum* als zuvor verzehrte Pilze identifizieren

konnten (Tab. 1). In zwei dieser Fälle löste eine erneute Alkoholigestion noch bis zu zwei Tage nach dem Pilzkonsum die Symptomatik erneut aus.

Drei dieser Ereignisse wurden als Fallserie veröffentlicht (Haberl et al., 2011).

Diese Fallserie war Anlass, im Rahmen dieser Dissertation experimentell zu untersuchen, ob *E. asperum* tatsächlich die Acetaldehyddehydrogenase hemmt.

Monat/ Jahr	Bundesland	Geschlecht	Alter in Jahren	Vorerkrankung/ Medikation	Pilz Identifikation durch Pilzsachverständigen	Anzahl Pilze / Verwechsell mit	Zubereitung	Alkoholmenge	Latenzzeit zwischen Pilz und Alkohol	Latenzzeit zwischen Alkohol und Symptomen	Symptome	Therapie und Verlauf
2009*	Berlin	m	„älteres Ehepaar“	n.B.	ja	1 Macrolepiota procera (gemeiner Riesenschirmling)	geschmort	Etwas Wein	3 h	15-20 min	Flush Kopf und Hals, Angstgefühl, Zittern	Spontan rückläufige Symptomatik über mehrere Stunden. Nach erneutem Schluck Wein am gleichen Abend erneute Symptomatik aber schwächer als zuvor. Am Folgetag wurde Wein wieder vertragen.
2009*	Berlin	w	„älteres Ehepaar“	n.B.	ja	1 Macrolepiota procera (gemeiner Riesenschirmling)	geschmort	Etwas Wein	3 h	15-20 min	Flush Kopf und Hals, Angstgefühl, Zittern	Spontan rückläufige Symptomatik über mehrere Stunden. Nach erneutem Schluck Wein am gleichen Abend erneute Symptomatik aber schwächer als zuvor.
8/2010	Bayern	m	69	Koronare Herzkrankheit, Z.n. Myokardinfarkt/ ASS, Enalapril, Bisoprolol)	ja	3-4 Macrolepiota procera (gemeiner Riesenschirmling)	20 min gebraten	0,25-0,5 Liter Bier	6 h	15 min	Gesichtsröte, Palpitationen, Kurzatmigkeit, Schwindel	Spontan komplett rückläufige Symptomatik innerhalb von 45 min. Nach erneutem Alkoholgenuss von 1 Schluck Bier 24h später erneut Gesichtsrötung und Palpitationen.
8/2010	Bayern	w	62	keine	ja	3-4 Macrolepiota procera (gemeiner Riesenschirmling)	20 min gebraten	0,25-0,5 Liter Bier	6 h	15 min	Gesichtsröte, Palpitationen, Kurzatmigkeit, Schwindel	Spontan komplett rückläufige Symptomatik nach 45 min.

10/2010	Bayern	m	47	keine	ja	7 Amanita rubescens (Perlpilz)	Gut gebraten	0,5 L Bier	4 h	5 min	Gesichtsröte, Wärmegefühl, Tachykardie (HF 110/min), Kurzatmigkeit, Schwindel, Schläfrigkeit	Spontan komplett rückläufige Symptomatik innerhalb von 90 min. Ein Schluck Bier nach ca. 24 h und nach ca. 48 h rief erneut Gesichtsroete hervor.
10/2010	Niedersachsen	m	n.B. Erwachsen	n.B.	ja	n.B. Macrolepiota procera (gemeiner Riesenschirmling)	Paniert und gebraten	1 Schluck Wein	10 h	10 min	Gesichtsroete, Atemnot, Tachykardie	Spontan komplett rückläufige Symptomatik innerhalb von 60 min.
10/2010	Niedersachsen	w	n.B. Erwachsen	Asthma bronchiale	ja	n.B. Macrolepiota procera (gemeiner Riesenschirmling)	Paniert und gebraten	1 Schluck Wein	10 h	10 min	Gesichtsroete, Kurzatmigkeit (wie Asthmaanfall beschrieben), Tachykardie (HF 105/min)	Spontan komplett rückläufige Symptomatik innerhalb von 60 min.
12/2013	Bayern	w	72	Arterielle Hypertonie	ja	1 Agaricus campestris (Wiesenchampignon)	Kürzer als 20 min gebraten	0,5 Liter Bier	4 h	Kurz darauf	Flush, Kopf- schmerzen, Atemnot hypertensive Entgleisung	Einlieferung auf die kardiologische Intensivstation bei V.a. akutes Koronarsyndrom. Ausschluss desselben. Spontan rückläufige Symptomatik, 2 Tage Krankenhausüberwachung.

* Die Fälle wurden veröffentlicht von Erhard Ludwig in „Der Tintling“ (Erhard Ludwig, 2009)

Tab. 1: Vom Giftinformationszentrum München gesammelte Fälle von Intoxikationen mit E. asperum und Ethanol in Deutschland zwischen 2008 und 2013

1.7. Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, mit einem in vitro Assay nachzuweisen, dass *E. asperum* ALDH-hemmende Eigenschaften besitzt. Zudem sollten erste Schritte zu einer eventuell späteren Isolierung und Charakterisierung der möglichen Hemmsubstanzen unternommen werden.

Hierfür musste ein in vitro Assay etabliert werden, der auch für eventuell spätere Versuche, die hemmende Substanz aus den Pilzversuchen zu isolieren und zu charakterisieren, verwendet werden kann.

Als Vorversuche in Hinblick auf eine eventuelle spätere Isolierung der potentiellen ALDH-Hemmstoffe aus *E. asperum* wurden untersucht, ob die Hemmsubstanz eher wasser- oder fettlöslich ist, und ob die potentielle Hemmsubstanz hitzeempfindlich ist. Dies war auch in Zusammenhang mit dem Verzehr als vermeintlicher Speisepilz von Interesse. Außerdem sollte untersucht werden, ob sich eine Konzentrationsabhängigkeit der eventuellen Hemmeigenschaft findet.

In einem anderen Arbeitskreis wurde versucht, im *E. asperum* Extrakt mit fortschrittlicheren und unserem Labor nicht zur Verfügung stehenden Methoden Coprin nachzuweisen.

Schließlich bot es sich an, mit dem entwickelten in vitro Assay auch andere Pilzarten die in der Gegend von München vorkommen und die mit einem Acetaldehyd-Syndrom in Zusammenhang gebracht werden, auf ALDH-Hemmung zu untersuchen. Dieses wurde damit auch Gegenstand dieser Dissertation. Untersucht wurden die Pilze:

- Netzstieliger Hexenröhrling (*Boletus luridus*),
- Blaufleckender Purpur-Röhrling (*Boletus rhodopurpureus*),
- Weinroter Purpur-Röhrling (*Boletus rubrosanguineus*)
- Bräunlicher Stäubling (*Lycoperdon umbrinum*)
- Keulenfußtrichterlig (*Clitocybe clavipes*)

Um auszuschließen, dass Pilze generell in diesem Assay die ALDH hemmen, wurden auch die im Lebensmittelhandel erhältlichen etablierte Speisepilze

- Zuchtchampignon (*Agaricus bisporus*)
- Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*) und
- Steinpilz (*Boletus edulis*)

als Kontrollen untersucht. Hierbei fanden sich überraschende Ergebnisse.

Es war nicht Ziel der Arbeit, die enzymkinetischen Eigenschaften der potentiellen Hemmsubstanz näher zu charakterisieren.

1.8. Beschreibung von *Echinoderma asperum*

E. asperum (Synonyme u.a. *Lepiota aspera*, *Lepiota acutesquamosa*, *Echinoderma acutesquamosa*, *Lepiota friesii*; Deutsch: Spitzschuppiger Stachel-Schirmling, Rauer Stachel-Schirmling, Großer Stachel-Schirmling) (www.speciesfungorum.org) gehört zur Familie der Agaricaceae (Champignonsverwandte) und zur Gattung der Schirmlinge (*Lepiota*). Er ist ein in Laub- und Nadelwäldern, Gebüsch, Wegrändern

und Gärten in den gemäßigten Breitengraden Europas, Nordamerikas und Nordafrikas relativ häufig vorkommender Pilz. Die Fruchtkörper erscheinen von Sommer bis Herbst. *E. asperum* besitzt einen Hut von 5 bis 12 cm Durchmesser, dessen cremefarbener Grund gänzlich mit konzentrisch angeordneten, dunkelbraunen Schuppen besetzt ist. Die Lamellen sind weiß bis cremefarben, der ca. 8 bis 15 cm lange Stil besitzt einen Ring sowie an der Basis meist eine gerandete Knolle (J. Breitenbach and F. Kränzlin, 1995). Das weiße Fleisch hat einen unangenehmen, leuchtgasähnlichen, stechenden Geruch und Geschmack. Der Pilz besitzt keinen Speisewert, es können allerdings Verwechslungen z.B. mit den Speisepilzen Wiesen-Champignon (*Agaricus campestris*), dem Parasolpilz (*Macrolepiota procera*) oder dem Perlpilz (*Amanita rubescens*) vorkommen.



Abb. 7:

Spitzschuppiger Schirmling

(*Echinoderma asperum*).

Illustration von Albin Schmalfuß, 1897

Foto 1: *Echinoderma asperum*

2. Material und Methodik

Es sei darauf hingewiesen, dass vor allem aufgrund nun möglicher Gensequenzierungen die Taxonomie der Pilze in den letzten Jahren einem großen Wandel unterliegt. Somit besteht eine Vielzahl von Synonymen für die einzelnen Pilze, die hier nur unvollständig aufgelistet werden können. Wir verwenden in dieser Arbeit die Nomenklatur aus den Jahren vor 2013. Die aktuell (2017) gültigen Bezeichnungen und die bei Aufnahme dieser Arbeit gültigen wissenschaftlichen Namen sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Deutscher Name	Gängiger Name zu Beginn der Arbeit	Aktuell gültiger Name 6/2017
Netzstieliger Hexenröhrling	<i>Boletus luridus</i>	<i>Suillellus luridus</i>
Blaufleckender Purpurröhrling	<i>Boletus rhodopurpureus</i>	<i>Imperator rhodopurpureus</i>
Weinroter Purpurröhrling	<i>Boletus rubrosanguineus</i>	<i>Rubroboletus rubrosanguineus</i>
Keulenfußtrichterling	<i>Clitocybe clavipes</i>	<i>Ampulloclitocybe clavipes</i>

Tabelle 2. Liste der Pilzsynonyme (www.indexfungorum.org)

2.1. Herstellung der Pilzextrakte

Die verwendeten Steinpilze, Austernseitlinge und Zuchtchampignons wurden im Lebensmittelhandel in München gekauft. Die übrigen Pilze wurden im Herbst 2013 in Wäldern in München oder im Münchner Umland gesammelt. Die Fruchtkörperreife reichte von sehr jungen Fruchtkörpern bis zu alten Fruchtkörpern. Die Fruchtkörper wurden nach dem Sammeln zwischen 0 und 2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt und dann eingefroren. Teilweise wurden die Fruchtkörper vor dem Einfrieren zerschnitten. Alle Pilze wurden von geprüften Pilzsachverständigen anhand makroskopischer und mikroskopischer Kriterien zweifelsfrei identifiziert.

Zur Herstellung der Pilzextrakte wurden jeweils 5,5 g des gefrorenen Pilzes in 20 ml destilliertem Wasser aufgetaut und mechanisch zerkleinert, danach 20 min auf den Kleinschüttler (Fa. IKA Labortechnik KS 125 basic) gestellt. Die Suspension wurde für 3 Minuten mit 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Fa. Hettich Zentrifuge Rotina 46) und im Anschluss durch Filterpapier (Schwarzband 110 mm Durchmesser) filtriert. Das Filtrat wurde auf Trennsäulen (Fa. Merk, Extrelut NT 20; Bestellnummer 1.15096.0001) gegeben und mit 40 ml Methanol-Wasser (2:1) eluiert. Das Eluat wurde im Stickstoffstrom bei 60° zur Trocknung eingedampft. Das eingedampfte Eluat (bräunlich bis tief dunkelbraun) wurde in 3 ml Tris-Kalium-Puffer (Trizma Base, Sigma prod. No. T-1503; pH 8.0) gelöst.

Bei dem Versuch zur Hitzebeständigkeit der Hemmsubstanz wurden die Pilzextrakte vor dem Aufgeben auf die Trennsäulen in Glasbehältern 20 Minuten lang bei 94°C im Wasserbad erhitzt.

Zur Untersuchung der Wasser/Fettlöslichkeit der Hemmsubstanz wurde 10 ml des Pilzextraktes mit 20 ml eines Chloroform : Wasser (1:1) Gemisches ausgeschüttelt. Die Chlorform- und Wasserphasen wurden separiert, im Stickstoffstrom eingedampft und vor Verwendung im ALDH-Hemm-Assay mit 3 ml Tris-Puffer aufgenommen.

2.2. Herstellung des Enzymassays

2.2.1. Wahl des Enzymassays

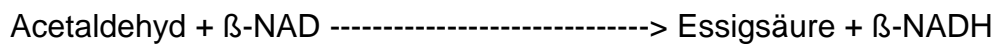
Hier wurde in der Literatur zu Veröffentlichungen zur ALDH-Hemmung durch Naturstoffe gesucht, mit der Voraussetzung, dass die dort verwendeten Assays mit den im Toxikologischen Labor zur Verfügung stehenden Mitteln angewendet werden können.¹

Am besten auf die Machbarkeit des Toxikologischen Labors übertragbar erschien der in (Maninang et al., 2009) beschriebene Assay. Dort wird über die ALDH Hemmung durch die als Stinkfrucht bekannte Durian (*Durio zibethinus*) berichtet. In dem dort beschriebenen Assay kommt kommerziell erhältliche ALDH aus Backhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Fa. Sigma-Aldrich; CAS Number: 9028-88-0) zur Anwendung. Diese besitzt eine Aminosäuresequenz die zu etwa 45% mit den menschlichen ALDHs homolog ist (Wang et al., 1996). Die Beschreibung des Assay

¹ Damit standen in der Literatur beschriebene Methoden nicht zur Verfügung, die z.B. ein temperaturstabilisiertes Küvettenphotometer erforderten. Auch auf eine Aufarbeitung, die mehrere Chromatographieschritte, eine Chromatographie mit UV Detektion oder einem Fraktionssammler bzw. mehrstufige Lösemittelextraktionen erforderten, musste verzichtet werden, da weder vakuumgestützte Einengungsmöglichkeiten wie z.B. Rotavapor oder Exsikkator noch eine geeignete Chromatographieausrüstung zur Verfügung standen. Die Fragestellung mußte deshalb, wie oben beschrieben, auf den qualitativen Nachweis bzw. den Ausschluss von Hemmaktivität beschränkt werden

in (Maninang et al., 2009) folgt im wesentlichen der Arbeitsvorschrift, die sich in der Produktbeschreibung der ALDH der Fa. Sigma befindet. Die ALDH katalysiert die Reaktion:

Aldehyddehydrogenase



Hierbei kann die Zunahme an NADH mittels Extinktionskurve bei 340 nm über die Zeit photometrisch gemessen werden.

Die in (Maninang et al., 2009) angegebene 3ml Reaktionsmischung beinhaltet:

- 103 mM Tris-HCL-Puffer, pH 8,0; 0,67 mM β -NAD⁺ (Tris-Kalium-Puffer: 90 Teile 100 mM Tris + 3 Teile 3 M Kaliumchlorid)
- 0,25-0,5 Units ALDH-Lösung (verdünnt in 100 mM Tris HCl Puffer mit 0,02% (w/v) BSA)
- 100 mM-KCl
- 10 mM 2-Mercaptoethanol (EtSH)
- 10 mM Acetaldehyd; bis zum definierten Volumen aufgefüllt mit deionisiertem Wasser.

Warum dem Assay Mercaptoethanol hinzugesetzt wurde, wurde in (Maninang et al., 2009) nicht erklärt, vermutlich sollte es der Stabilisierung des Assay dienen.

Die Reaktionen wurden gestartet, indem man 0,10 ml β -NAD⁺ (10 mmol/l) zur ansonsten fertigen Reaktionslösung hinzugab.

Die Arbeitsvorschrift verlangt eigentlich ein UV-Photometer mit thermostatisierter Küvette um, wie ursprünglich geplant, die Hemmkinetik messen zu können. Es stand allerdings nur ein Plattenphotometer (Dynatech MRX, Messung bei 340 nm über einen eingebauten optischen Filter) zur Verfügung. Die Photometerplatten (Greiner bio-one Microplate, 96 wells, PS, F-Bottom, Clear) hatten 96 Wells von je 300 µl, optische Länge 10 mm. Der Assay musste deshalb wie unten beschrieben angepasst werden.

Zur Auswertung wurde der Optische Dichte (OD)-Wert jedes Wells im Plattenphotometer bis 60 min alle 30 Sekunden gemessen. Die Messungen wurden dreifach zeitgleich in je drei Wells mit identischer Beschickung vorgenommen. Die OD-Werte wurden als .txt File mit Allokation zum jeweiligen Well ausgegeben.

Die Auswertung erfolgte mittels Excel sheet. Von den im Verlauf gemessenen OD-Werten wurde der dem jeweiligen Well zugehörige Messwert zum Zeitpunkt $t=0$ (Beginn der Messung) abgezogen. Aus den so erhaltenen, auf den Zeitpunkt $t=0$ bezogenen OD-Werten, wurden aus den je drei Wells gleicher Füllung der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Diese Werte wurden als Kurven OD über Zeit ($Y= OD$, $X= \text{Zeit [Minuten]}$) bzw. nach Umrechnung in $\text{NADH } \mu\text{mol/l vs. Zeit}$) dargestellt. Als signifikanter Unterschied zwischen zwei zu vergleichenden Well-Beschickungen wurde gewertet, wenn sich die OD-Kurven der zu vergleichenden Proben im Lauf der Messzeit um 2 Standardabweichungen unterschieden. Zu jedem Mess-Ansatz wurde auf der gleichen Photometerplatte eine eigene (wie üblich dreifach-) negative Messung ohne Zusatz von Hemmextrakt als Nullwert mit dem gleichen Enzymansatz und den gleichen Konzentrationen mitgeführt. Die zu messenden Proben wurden wie oben beschrieben mit dieser Nullwertkurve verglichen.

2.2.2. Etablierung des Enzymassays

Im Nachfolgenden sind einige Ergebnisse aufgeführt, die der Etablierung und Evaluation des schließlich eingesetzten Enzymassays dienen. Diese wurden als Vorversuche gewertet und sind deswegen in dem Abschnitt Material und Methodik, und nicht unter Ergebnisse dargestellt.

Eichkurve NADH:

Eine Eichkurve OD (340nm) vs. NADH-Konzentration wurde mit verschiedenen Einwaagen NADH (Mettler H20T Analysenwaage) erstellt (Abb. 8):

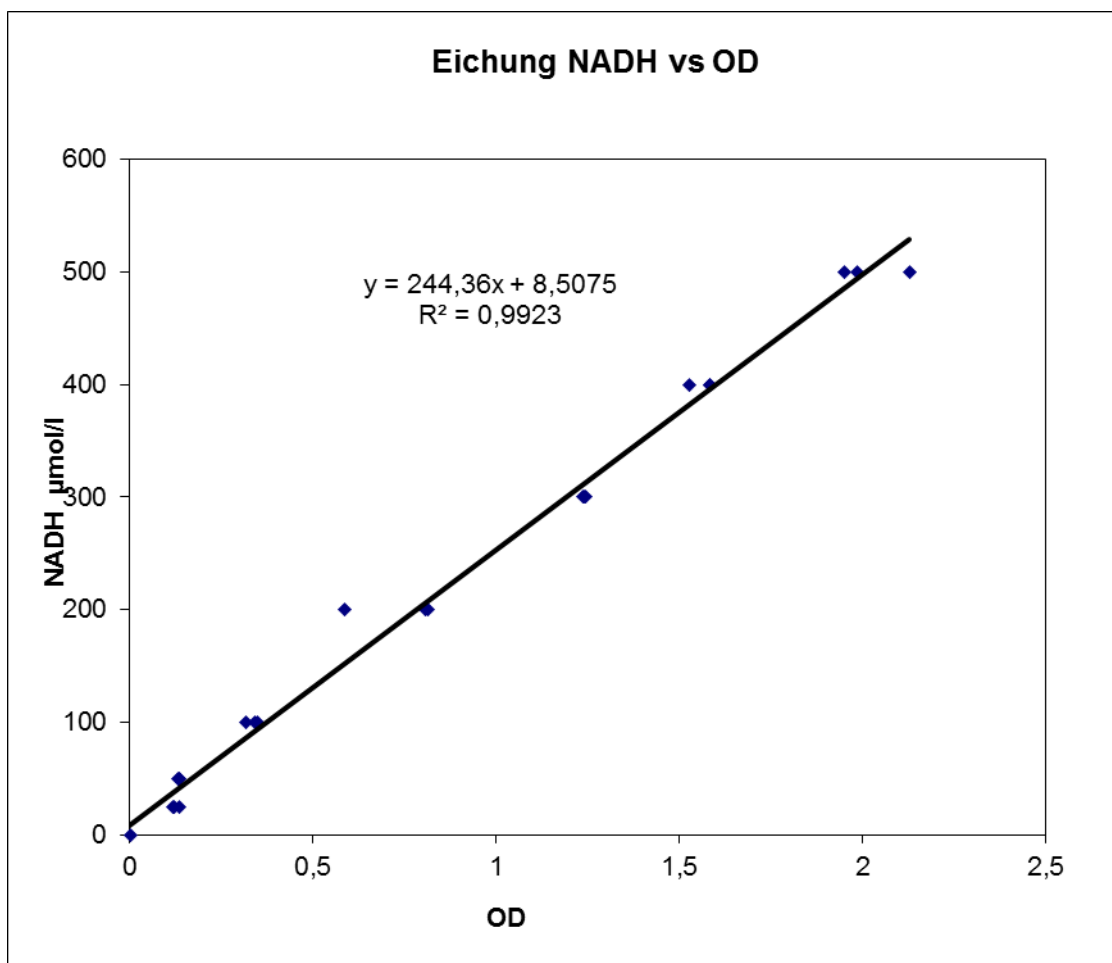


Abb. 8: Eichkurve der NADH Konzentration mit verschiedenen Einwaagen NADH

Anpassung des Ansatzes von (Maninang et al., 2009) an das Plattenphotometer:

In jedem Well wurden vorgelegt ²:

- 35 µl einer 5470 µmol/l Acetaldehyd Lösung in Tris-Puffer pH 8,0
- 10 µl NAD 20 mmol/l
- 5 µl Mercaptoethanol

Aufgefüllt mit Tris-Kalium-Puffer pH 8 bis 300 µl.

Die Enzymlösung wurde aus der tiefgefrorenen und lyophilisierten ALDH - abhängig von der durch den Hersteller angegebenen Enzymaktivität - durch Lösen in Tris-Kalium-Puffer hergestellt.

Jedes Well enthielt dann:

- | | |
|---------------|------------|
| - β-NAD | 666 µmol/l |
| - Acetaldehyd | 638 µmol/l |
| - EtSH | 3,3 mmol/l |
| - ALDH | 125 U/l |

In späteren Mess-Ansätzen wurde von den genannten Konzentrationen bezüglich Acetaldehyd, NAD und Enzymlösung geringfügig abgewichen, was aber die Kernaussage nicht berührt. Die jeweils eingesetzten Konzentrationen sind bei den einzelnen Experimenten aufgeführt.

² Pipettiert wurde mit Einfach- Dosier-Handpipetten (Eppendorf Research und Eppendorf Reference) sowie mit elektrischen Mehrfach-Dosierpipetten (Fa. Eppendorf Explorer 50-1200µl und 5-100µl) mit Pipettenspitzen (Eppendorf Pipettenspitzen).

Die Reaktion wurde gestartet, indem mittels elektronischer Mehrkanalpipette möglichst rasch alle Wells mit je 10 μl Enzymlösung beschickt wurden. Die Photometerplatte wurde vor Einlegen in das Plattenphotometer 10 Sekunden geschüttelt (Heidolph Titramax 100, Speed 10) dann unverzüglich die Messreihe gestartet. Die Zeit zwischen Beginn des Einpipettierens der Enzymlösung und Starten der Photometermessung betrug maximal 1 Minute. Damit ergab sich folgende Messkurve (Abb. 9):

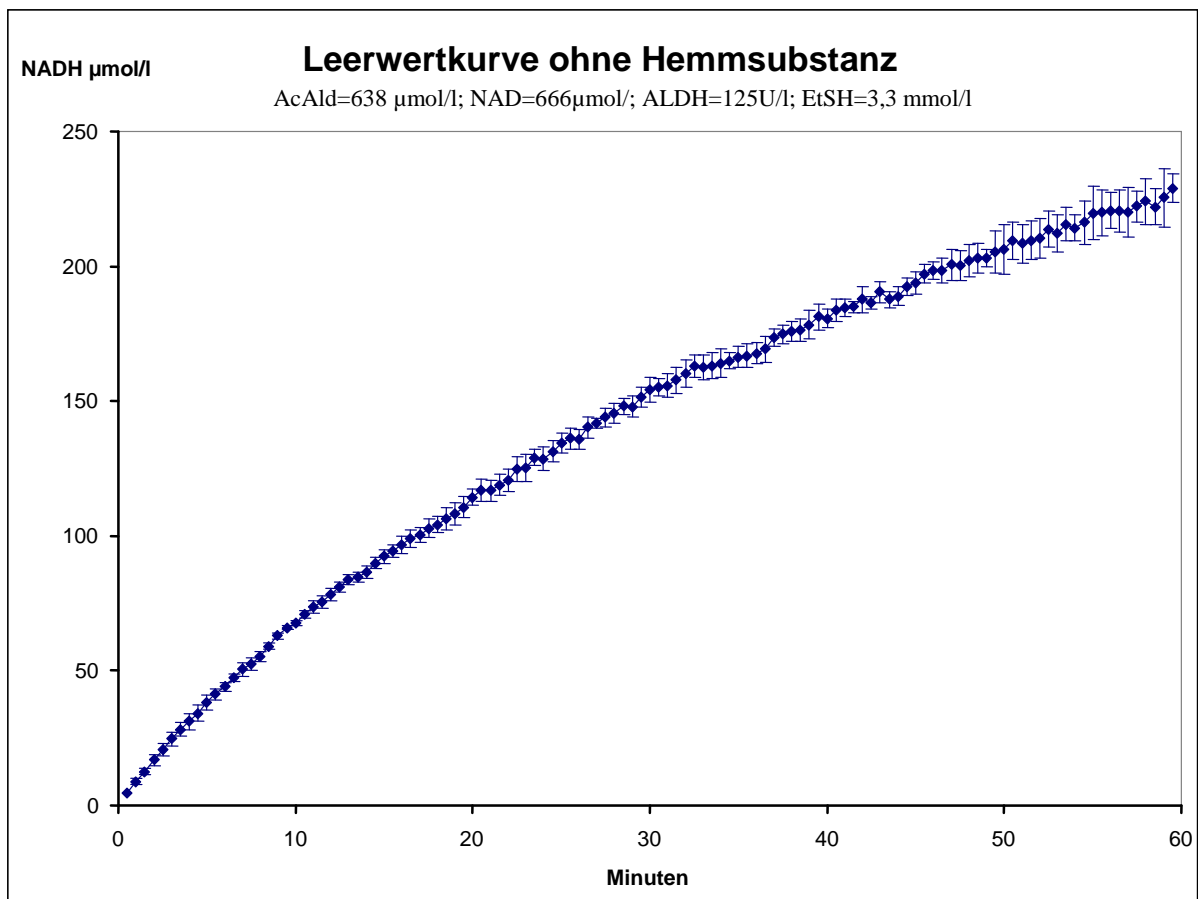


Abb. 9: Assay mit Mercaptoethanol: Leerwertkurve der Zunahme der NADH ohne Hemmextrakt

Der nächste Schritt bei der Etablierung des Assays war zu testen, ob sich durch Zugabe einer bekannten Hemmsubstanz die Reaktion von NAD zu NADH unterdrücken ließ. Hierzu wurde Disulfiram verwendet.

Disulfiram wurde aus Antabus® 400 mg Kapseln entnommen. Da Disulfiram nur sehr schwer wasserlöslich ist, wurde eine gesättigte Lösung Disulfiram in Trispuffer hergestellt, indem der Inhalt einer Antabus® Kapsel in 500 ml Puffer über 20 Stunden gerührt wurde, das nicht gelöste Disulfiram wurde abfiltriert. Bei einer Löslichkeit von 0,2 g/l enthält die gesättigte Lösung 0,6 $\mu\text{mol/l}$.

Mit den gleichen Assay-Einstellungen zeigte sich allerdings trotz Zugabe von 150 μl gesättigter Disulfiram-Lösung (= 0,3 $\mu\text{mol/l}$ im Well) nur eine geringfügige, wenngleich signifikante Hemmung der ALDH (Abb. 10).

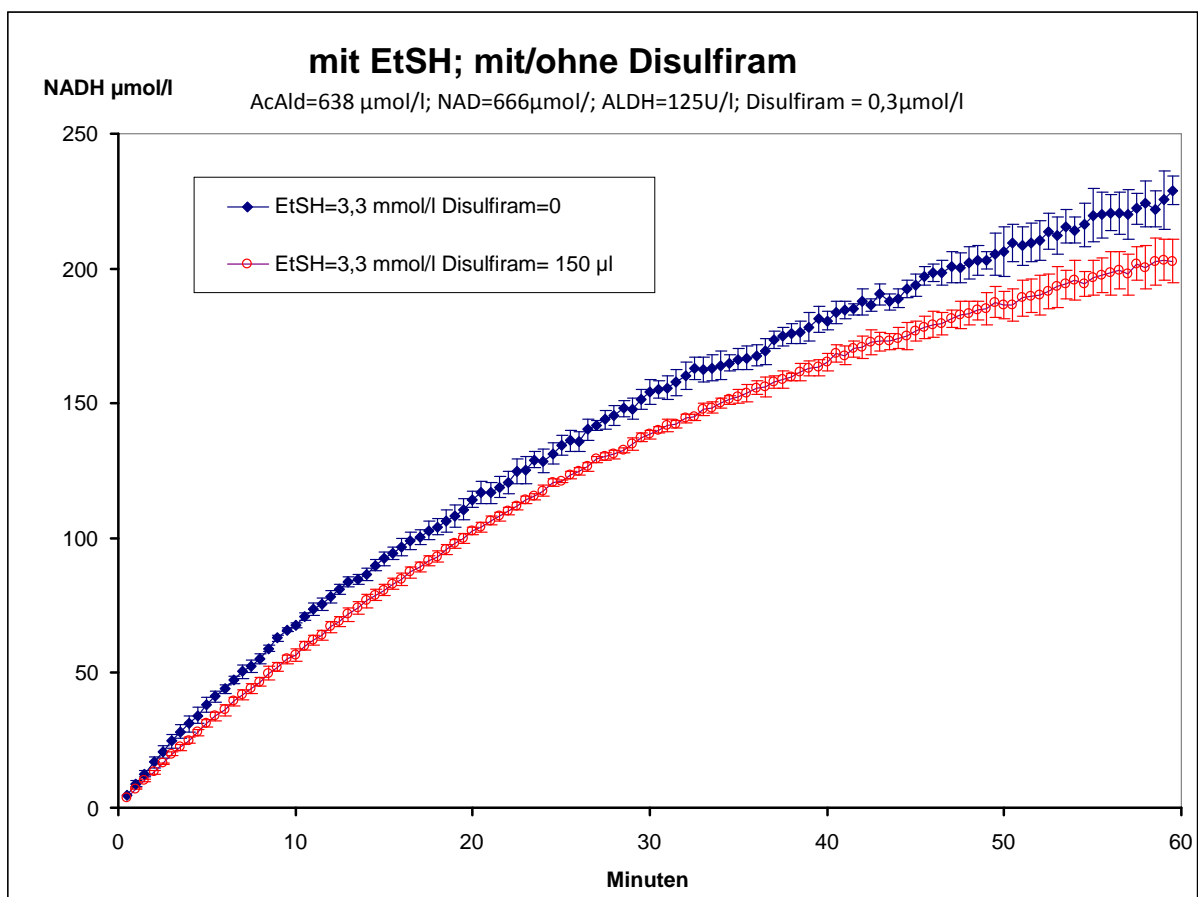


Abb. 10: Assay mit Mercaptoethanol: Leerwertkurve (blau) verglichen mit Disulfiram (rot). Es lässt sich eine signifikante, wenn auch nur leichte Hemmung der ALDH beobachten.

Das Ergebnis ließ sich in mehreren Experimenten, auch unter Variation der eingesetzten Konzentrationen bzw. Aktivitäten an Enzym und Substrat, reproduzieren.

Bei der Suche nach der Ursache der unerwartet schwachen Hemmung fiel auf, dass sowohl bei (Maninang et al., 2009) als auch in der Arbeitsanleitung der Fa. Sigma nicht erklärt wird, weshalb Mercaptoethanol zum Ansatz gegeben wird. Im nächsten Experiment zur Etablierung des Assays wurde deshalb auf Mercaptoethanol verzichtet. Tatsächlich änderte dies nichts an der Leerkurve ohne Zusatz von Hemmstoff (Abb. 11).

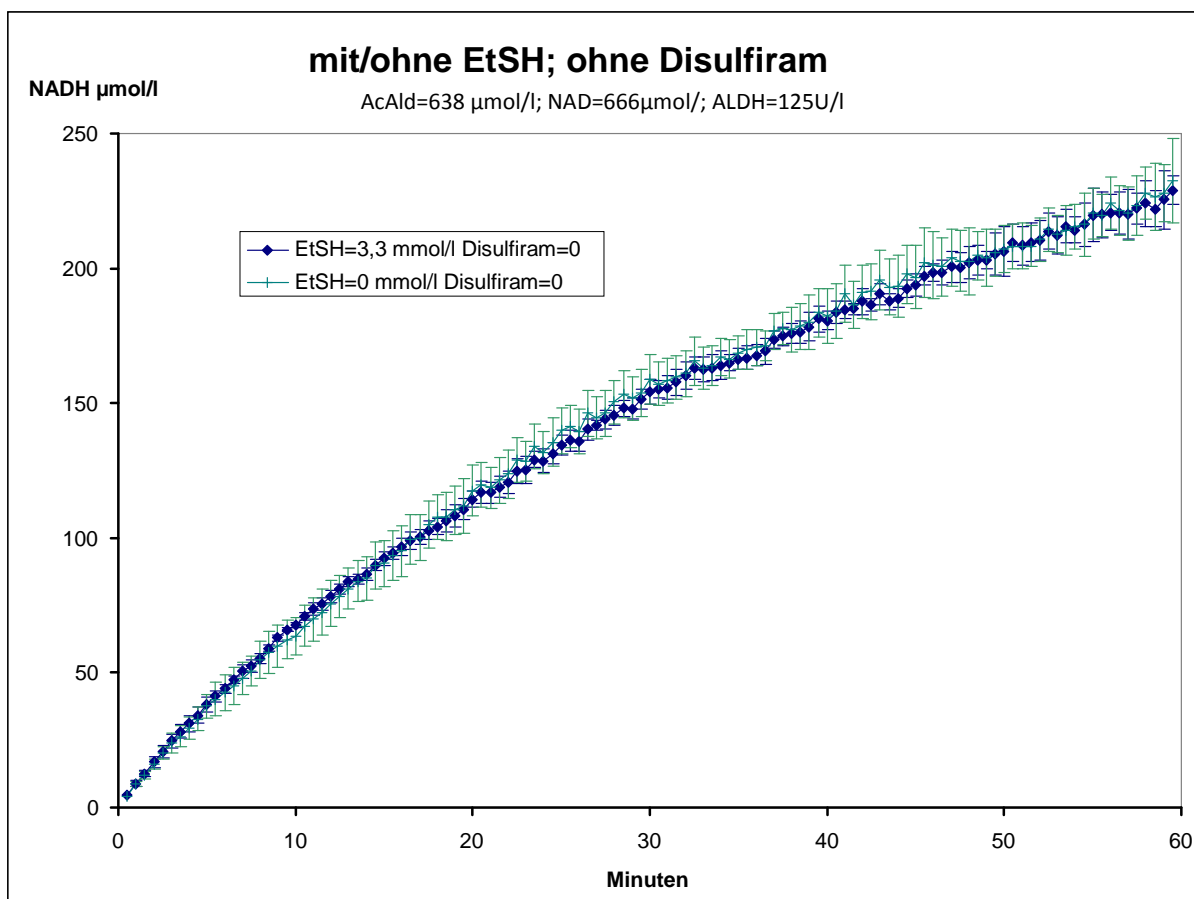


Abb. 11: Assay mit (blau) und ohne Mercaptoethanol (grün): in der Leerwertkurve zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

Mit Zusatz von Disulfiram ergab sich nun aber (ohne Mercaptoethanol) eine deutliche Hemmung der ALDH-Aktivität (Abb. 12).

Wir vermuten, dass Mercaptoethanol in der ursprünglichen Arbeitsvorschrift zur Stabilisierung des Enzyms beigelegt wurde. Tatsächlich konnte das im Assay verwendete Enzym zwei Stunden nachdem es aufgelöst und bei Raumtemperatur gelagert war nicht mehr verwendet werden. Das ist auch ein Grund dafür, dass bei jeder Versuchsreihe die Ergebnisse immer in Relation zur bei dieser Versuchsreihe mit gleichem Enzymansatz durchgeführten „Nullwert“-Messung ausgewertet werden. „Nullwertmessung“ bedeutet eine Messung ohne Zusatz von zu untersuchendem Hemmstoff.

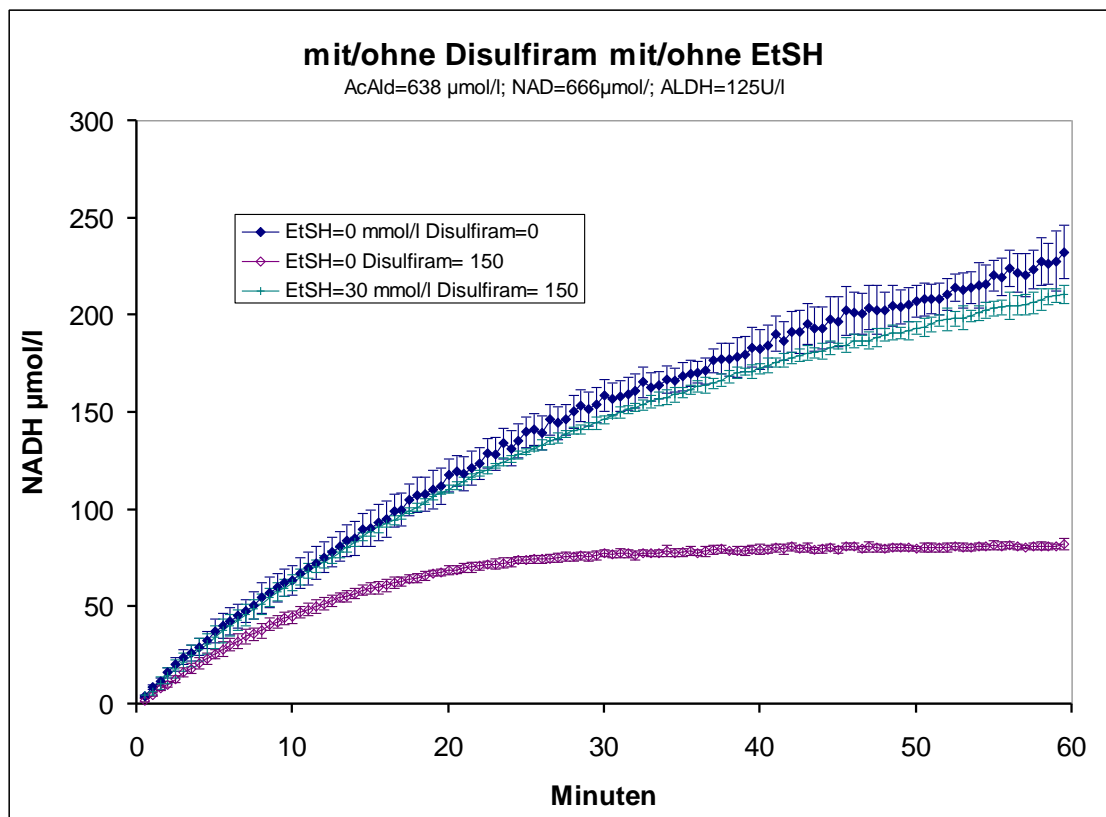


Abb. 12: Assay mit und ohne Mercaptoethanol: Im Vergleich zum Leerwert (blau) zeigt sich bei Hinzugabe von Disulfiram in Anwesenheit von Mercaptoethanol nur eine schwache Hemmung (grün). Ohne Mercaptoethanol zeigt sich durch Disulfiram eine deutlich stärkere Hemmung der ALDH (violett).

2.2.3. Enzymassay mit Pilzextrakten

Zur Testung der Hemmwirkung durch die Pilzextrakte wurde zum oben genannten Assay jeweils 10 ml des wässrigen (in Tris-Puffer gelösten) Pilzextrakts hinzugefügt. Auf diese Weise wurden folgende Pilze untersucht:

- Echinoderma asperum (Spitzschuppiger Stachelschirmling)
- Agaricus bisporus (Zuchtchampignon)
- Pleurotus ostreatus (Austernseitling)
- Boletus edulis (Steinpilz)
- Boletus luridus (Netzstielliger Hexenröhrling)
- Boletus rhodopurpureus (Blaufleckender Purpur-Röhrling)
- Boletus rubrosanguineus (Weinroter Purpur-Röhrling)
- Lycoperdon umbrinum (Bräunlicher Stäubling)
- Clitocybe clavipes (Keulenfußtrichterlig)

2.3. Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit des E. aspera Extraktes auf die Hemmwirkung

Zur Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Hemmwirkung des E. aspera Extraktes auf die ALDH wurde die Menge des zugegebenen Pilzextraktes pro well variiert. Dem Assay wurden 0,5 µl, 1 µl, 2 µl, 3 µl, 4 µl, 5 µl, 6 µl, 7 µl, 8 µl, 9 µl und 10µl Pilzextrakts hinzugefügt und bis zum Volumen der wells mit Tris-Puffer aufgefüllt. In der Abb. 14 sind der Übersicht halber nur der Leerwert ohne Pilzextrakt sowie die Werte 2 µl, 3 µl, 4 µl, 6 µl, 8 µl und 10 µl dargestellt. Die Auswertung aller Messreihen findet sich in Abb. 15.

2.4. Reversibilität der Hemmwirkung des *E. asperum* Extraktes (Reaktivierung der ALDH) durch Hinzugabe von Mercaptoethanol

Bei dem Versuch zur Reversibilität der Hemmwirkung durch Hinzugabe von Mercaptoethanol (EtSH) wurde der Enzymassay wie oben beschrieben mit je 10 µl Extrakt von *E. asperum* verwendet. Die Photometermessung wurde gestartet und bei 30 Minuten unterbrochen. Die Photometerplatte wurde aus dem Plattenphotometer entnommen und mittels Mehrkanalpipette 10µl Mercaptoethanol 3,3 mmol/l in alle Wells pipettiert, dann wurde die Platte unverzüglich wieder eingelegt und die Messung weitergeführt. Ergebnisse siehe Abb. 17.

2.5. Gel-Permeations-Chromatographie

Ziel war es, den *E. asperum* Extrakt nach Molekülgröße aufzutrennen um die Hemmsubstanz zu isolieren und vor Einsatz der LC-MS-MS (Labor Dr. Arnold, Halle) chromatographisch anzureichern. Hierzu wurde eine Trennsäule zur Gel-Permeationschromatographie mit Sephadex-Gel (GE Healthcare, Sephadex LH-20, exclusion limit 5000 Dalton (small organic), Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer) verwendet. Das Sephadex-Gel sowie die Arbeitsvorschrift wurden uns freundlicherweise von Dr. Norbert Arnold aus dem Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle zur Verfügung gestellt. In Methanol/Wasser 1:4 vorgequollenes Sephadex Pulver wurde in mit Methanol/Wasser 1:4 vorgefüllten Chromatographiesäulen (Länge 8 cm, Durchmesser 2 cm) möglichst störungsfrei sedimentieren gelassen. Danach wurden 20 ml *E. asperum*- Extrakt auf die Sephadex-Säulen gegeben und mit 100 ml 66% Methanol eluiert. Das Eluat wurde in

32 Röhrrchen à ca. 4 ml aufgefangen³. Die Fraktionen wurden im Stickstoffstrom bei 60° zur Trocknung eingedampft.

Mit dem ALDH-Assay wurde jede Fraktion auf ihre Hemmwirkung hin untersucht. Die Fraktionen bis ca. 32 ml waren aufgrund der starken Eigenfärbung nur unzureichend auswertbar und wurden verworfen. In Abb. 18 sieht man die breiten Fehlerbalken als Konsequenz der durch die Eigenfärbung starken Streubreite der Messung. Es zeigte sich ein Maximum der Hemmwirkung in den Fraktionen 96 ml und 100 ml (siehe Abb. 18) Diese Fraktionen wurden im Stickstoffstrom zur Trocknung gebracht. Es blieb eine geringfügige bräunliche Anhaftung im Auffanggefäß. Die Menge derselben wurde nicht ausgewogen, aber es kann geschätzt werden, dass es sich um eine Menge etwa im Bereich von 10 mg gehandelt hat. Diese wurde zur weiteren Untersuchung mittels Flüssigchromatographie-Massenspektroskopie mit Elektrospray-Ionisation an Dr. Arnold per LC-MS dahingehend untersucht, ob sich eine Substanz mit der Molmasse und der berechneten Summenformel von Coprin nachweisen lässt.

³ Es stand kein Fraktionensammler zur Verfügung. Die Fraktionen wurden per Augenmaß geschnitten. Daher ergibt sich eine gewisse Ungenauigkeit der Volumenangaben. Diese ist aber für die Auftrennung, die ein Einzelversuch war, nicht relevant.

2.6. Flüssigchromatographie – Massenspektroskopie mit Elektrosprayionisation (LC-ESI-HR-MSⁿ)

Diese Untersuchungen wurden von Dr. Arnold im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle durchgeführt. Dr. Arnold beschreibt sein Vorgehen folgendermaßen:

„Die UHPLC-ESI-MS und die stoßinduzierten Dissoziations-Massenspektren („collision induced dissociation“, CID) wurden im positiven und negativen Ionenmodus mit einem Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Scientific, Bremen, Germany), welches mit einem UHPLC-System (Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific) und Photodiodenarray-Detektor (PDA, Thermo Scientific) gekoppelt ist, aufgenommen. Die chromatografische Trennung der zu untersuchenden Probenlösung (Injektionsvolumen 1 µL) mittels UHPLC erfolgte mit einer RP-C18-Säule (1,9 µm; 50 x 2,1 mm; Hypersil GOLD; Thermo Scientific; Säulentemperatur: 40°C) unter Verwendung eines binären Gradientensystems mit einer Flussrate von 0.15 ml/min. Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus Wasser (Laufmittel A; Fluka Analytical, LC-MS Chromasolv®) und Acetonitril (Laufmittel B; Fluka Analytical, LC-MS Chromasolv®), jeweils mit 0.2% Ameisensäure versetzt, verwendet. Die Ionisierung erfolgte mittels Elektrosprayionisierung (HESI-Ionenquelle; Sprayspannung 4.0 kV; Vernebelungs- und Hilfsgas: Stickstoff; Verdampfungstemperatur: 250°C; Kapillartemperatur: 275°C, FTMS-Auflösung 15.000). Die Spektren wurden mit der Software Xcalibur 2.1 (Thermo Scientific) ausgewertet.“

2.7. Messungen für XAN (Fullscan/MS², positive+negativer Ionenmodus, profile/centroid)

UHPLC-Methode:

- Säule A (Ventil 1): 1,9 µm; 50 x 2,1 mm; Hypersil GOLD; Thermo Scientific
- Säulentemp.: 30°C
- Schleife: 10 µL
- Injekt. Vol.: 2 µL
- Injekt. Meth.: Partial Injection with Needle Overfill
- Laufmittel:
A1 = H₂O, 0.2 % CHOOH
B1 = ACN, 0.2 % CHOOH

- Gradient 1 (positiver Modus)

	Time	Flow [mL/min]	A1	B1
1	0.00	0.150	90	10
2	20.00	0.150	0	100
3	30.00	0.150	0	100

- Gradient 2 (negativer Modus)

	Time	Flow [mL/min]	A1	B1
1	0.00	0.150	98	2
2	2.50	0.150	98	2
3	7.50	0.150	95	5
4	12.00	0.150	5	95
5	14.00	0.150	5	95

3. Ergebnisse

3.1. Inhibierung der ALDH durch Extrakt von *E. asperum*

Wurde dem Enzymassay Extrakt von *E. asperum* zugegeben, so ließ sich ein signifikant geringerer Anstieg der NADH beobachten verglichen mit dem Enzymassay ohne Pilzextrakt (Abb. 13) Der Extrakt von *E. asperum* muss also eine Substanz enthalten die in der Lage ist, die ALDH zu inhibieren.

Die Hemmwirkung war in dem wässrigen (in Tris-Puffer gelösten) E. asperum Extrakt deutlich ausgeprägter als in dem in Chloroform gelösten Extrakt. Die Hemmsubstanz scheint also deutlich besser wasserlöslich als fettlöslich zu sein (Abb. 13).

In der Kurve mit dem wässrigen E. asperum Extrakt zeigt sich ab ca. 5 Minuten kein weiterer Anstieg der NADH Konzentration mehr.

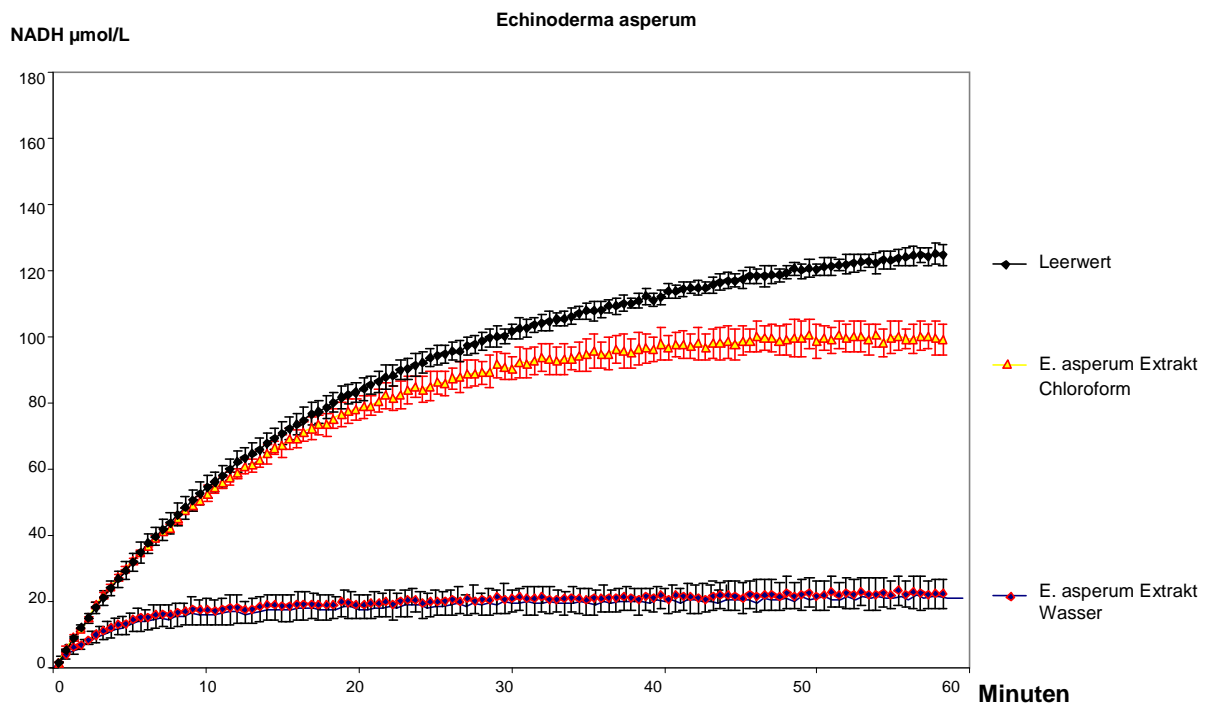


Abb. 13: Entstehung von NADH ohne-, sowie mit wässrigem- (in Tris-Puffer gelöstem und mit Tris-Puffer aufgenommenen) und durch Chloroform-Extraktion (in Chloroform gelöstem, mit Tris-Puffer aufgenommenen) gewonnenen Extrakt von E. asperum. Es ist eine deutlich stärkere Hemmung der NADH-Entstehung im wasserhaltigen Extrakt zu sehen.

3.1.1. Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der ALDH durch wasserlöslichen Extrakt von *E. asperum*

Um zu untersuchen ob die Hemmwirkung des wasserlöslichen *E. asperum* Extraktes auf die ALDH konzentrationsabhängig ist, wurde die Menge des dem Enzymassay zugegebenen Pilzextrakts variiert. In dem Versuch mit 10 μl Pilzextrakt ließ sich der geringste Anstieg der NADH-Konzentration, und somit die größte Hemmung der ALDH beobachten. In dem Assay mit 2 μl Pilzextrakt zeigte sich die geringste Hemmung der ALDH verglichen mit der Leerwertkurve (Abb. 14). Je mehr Pilzextrakt hinzugegeben wurde desto langsamer war die Anfangsgeschwindigkeit der NADH-Bildung (Abb. 15). Hiermit konnten wir eine annähernd lineare Konzentrationsabhängigkeit der Hemmreaktion nachweisen.

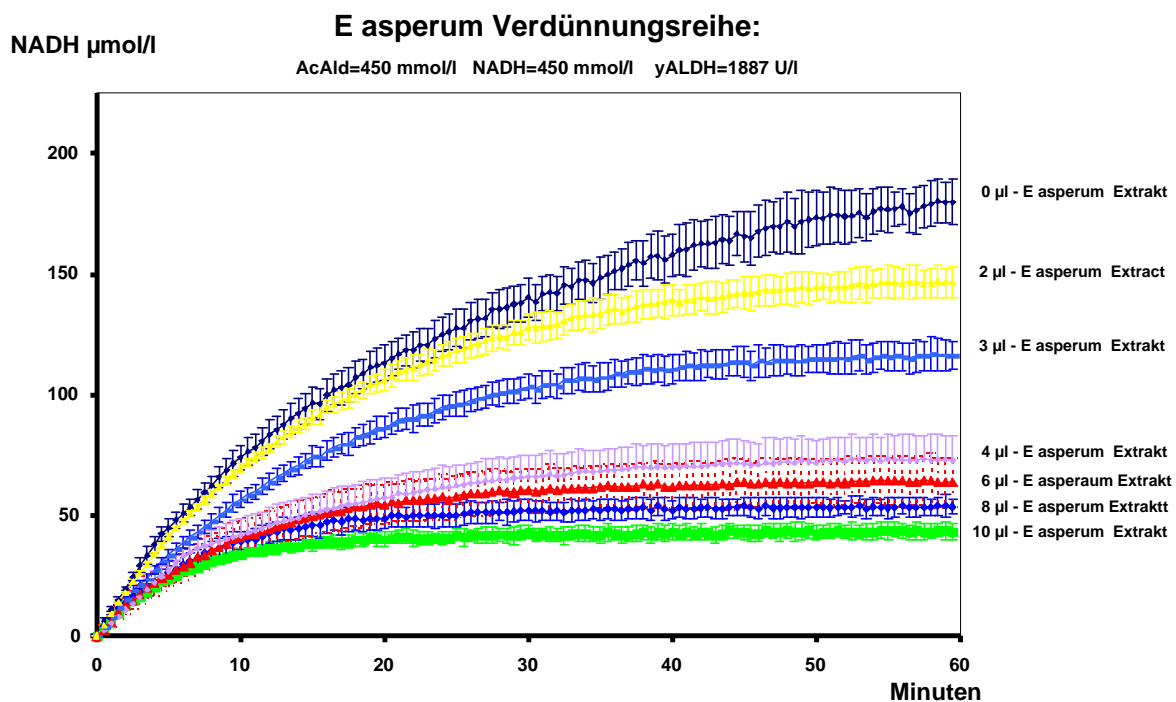


Abb. 14: Konzentrationsabhängige Inhibierung der ALDH durch Mengenvariation des wässrigen Extrakts von *E. asperum*. Je mehr Pilzextrakt zugesetzt wird desto stärker wird die ALDH gehemmt (der Übersichtlichkeit halber wurden in dieser Abbildung die Kurven von 0,5 μl , 1 μl , 5 μl , 7 μl , 9 μl nicht abgebildet. In der Auswertung wurden aber alle Messwerte berücksichtigt).

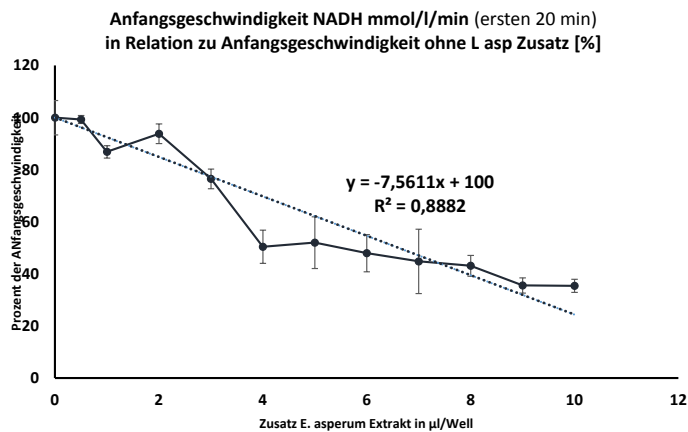


Abb. 15: Vergleich der relativen NADH Entstehungsgeschwindigkeit mit Zusatz von verschiedenen Konzentrationen Echinoderma asperum Extrakt - bezogen auf die Entstehungsgeschwindigkeit ohne Pilzextrakt - in den ersten 20 Minuten im gleichen Versuchsansatz. Je höher die Konzentration des Pilzextraktes desto weniger NADH entstand in der gleichen Zeit.

3.1.2. Reversibilität der Hemmung von ALDH durch Extrakte von E. asperum durch Hinzugabe von Mercaptoethanol

Bei der Etablierung des Enzymassays war aufgefallen, dass die Hemmung der ALDH durch den etablierten Inhibitor Disulfiram durch die Hinzugabe von Mercaptoethanol (EtSH) zum Enzymassay deutlich abgeschwächt war (siehe 2.2.2). Aus diesem Grund haben wir EtSH in den weiteren Ansätzen nicht mehr verwendet. Nun stellte sich die Frage, ob man auch die Hemmwirkung des E. aspera Extraktes auf die ALDH durch EtSH abschwächen oder aufheben kann.

Um dies zu überprüfen wurde in dem Enzymassay die Hemmwirkung von E. asperum Extrakt mit und ohne Zugabe von 10 µl bzw. 50 µl EtSH 10 mM untersucht.

Zwischen der Leerwertkurve (ohne Pilzextrakt, mit EtSH) und den Kurven mit Pilzextrakt sowie mit EtSH zeigte sich nun kein signifikanter Unterschied mehr (Abb. 16). Die Hemmwirkung des *E. aspera* Extraktes auf die ALDH konnte also durch die Hinzugabe von EtSH zum Enzymassay aufgehoben werden. Dabei zeigte sich zwischen den verwendeten Mengen von EtSH kein signifikanter Unterschied.

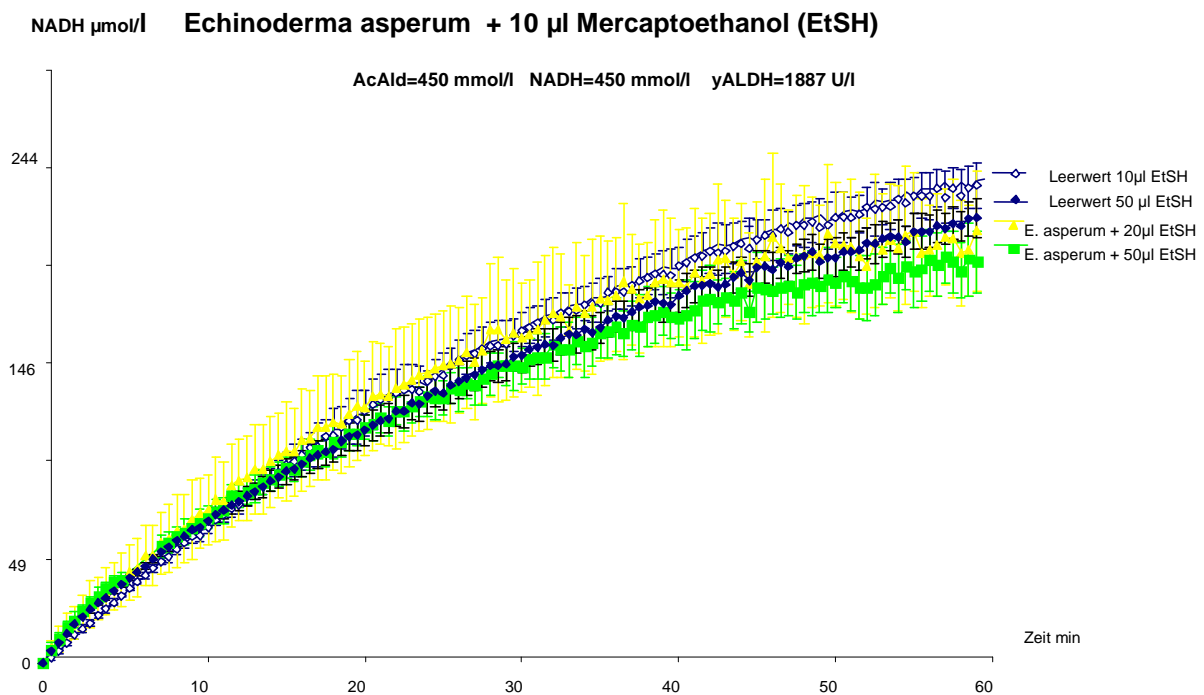


Abb. 16: Dem Enzymassay mit gleichen Mengen *E. asperum* Extrakt wurden 10 μl bzw 50 μl Mercaptoethanol hinzugefügt. Es wird keine signifikante Hemmwirkung des *E.asperum* Extraktes mehr auf die ALDH beobachtet.

Fügt man Mercaptoethanol dem Enzymassay erst nach begonnener Reaktion hinzu, so kann die bereits stattgefundenene Hemmung der ALDH wieder aufgehoben werden (Abb. 17). Die Hemmung der ALDH durch den Extrakt von *E. asperum* ist durch Hinzugabe von Mercaptoethanol also reversibel.

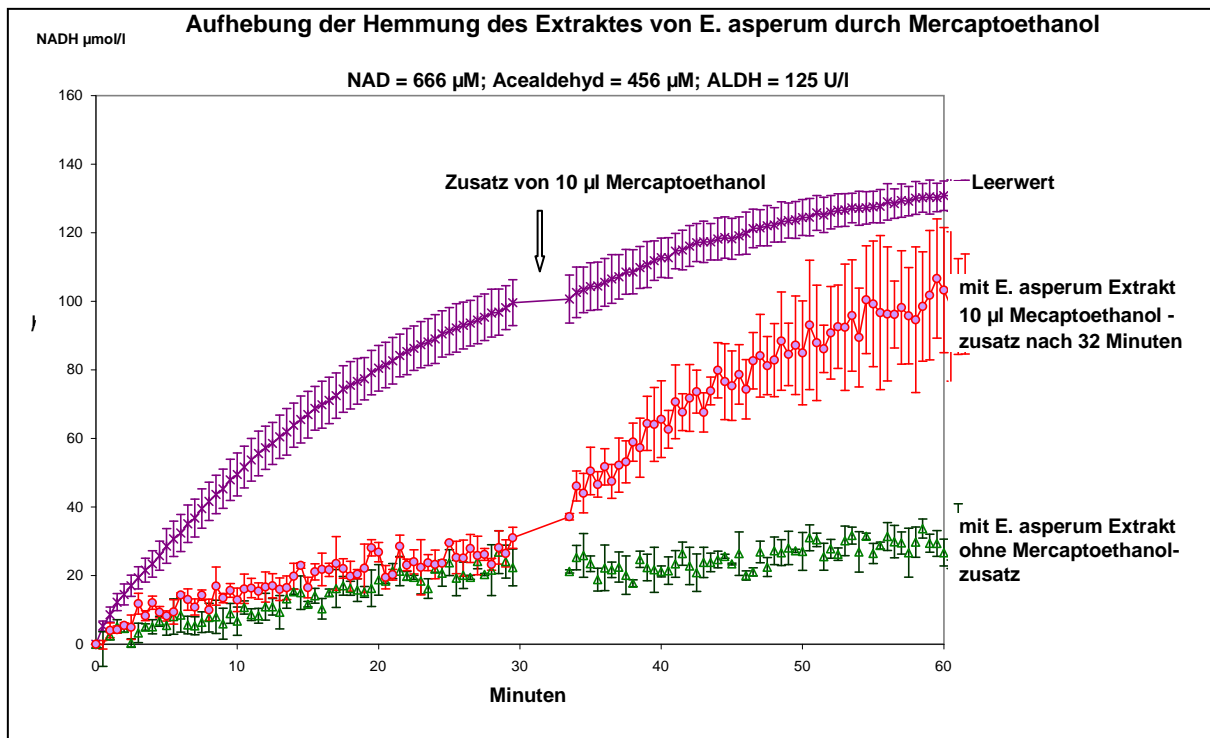


Abb. 17: Die Reaktion des Enzymassays mit Extrakt von *E. asperum* wurde nach 30 Minuten unterbrochen und Mercaptoethanol hinzugegeben. Die initial sichtbare Inhibierung der ALDH wurde durch die Hinzugabe von Mercaptoethanol wieder aufgehoben (rote Kurve). In der Vergleichskurve mit *E. asperum* Extrakt ohne Mercaptoethanol zeigte sich weiterhin eine Hemmung der ALDH (grüne Kurve) im Vergleich zum Leerwert ohne Pilzextrakt (violette Kurve).

3.1.3. Gel-Permeations-Chromatographie

Nachfolgend wurde versucht, die Hemmsubstanz im *E. asperum* Extrakt mittels Gelpermeationschromatographie anzureichern. Die Fraktionen bis etwa 32 ml zeigten aufgrund der starken Eigenfärbung eine hohe Standardabweichung und konnten nicht adäquat ausgewertet werden. Es zeigte sich bei den weiteren Fraktionen jedoch eine relevante Abnahme der OD bei den Fraktionen 96 ml und 100 ml (Abb. 18).

Diese beiden Fraktionen wurden zur weiteren Untersuchung mittels Flüssigchromatographie an das Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle zu Händen von Dr. Arnold gesandt.

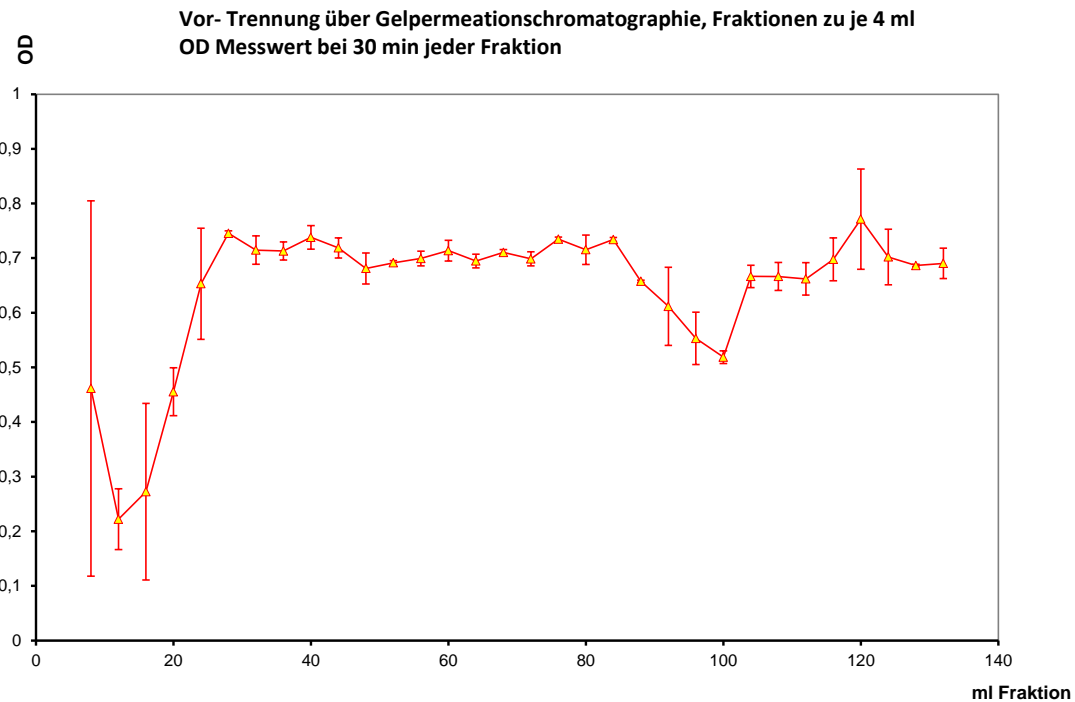


Abb. 18: Auftrennung des wässrigen *E. asperum* Extraktes nach Molekülgröße mittels Gel-Permeations-Chromatographie in 32 Fraktionen a 4 ml. Jede Fraktion wurde mittels Enzymassay auf die ALDH-Hemmung untersucht. Die Fraktionen bis ca. 32 ml waren aufgrund der starken Eigenfärbung nur unzureichend auswertbar (große Standardabweichungen) und wurden verworfen. Man sieht eine maximale Hemmung bei den Fraktionen um 96 und 100 ml. Diese wurden weiter untersucht.

3.1.4. Flüssigchromatographie – Massenspektroskopie (LC MS/MS) mit Elektrosprayionisation

Diese Untersuchungen wurden extern im Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie durch Dr. Arnold durchgeführt.

Die Probe wurde unter den genannten Bedingungen mittels LC aufgetrennt, es wurde mit dem MS Detektor nach ESI-Ionisation im negativen Modus (M-H) nach einer Substanz gleicher Molmasse wie Coprin gesucht (Molmasse Coprin: 202,21 g/mol; m/z: (M-H) rechnerisch: 201,202).

Abb. 19 zeigt das Chromatogramm und die Retentionszeiten mit den höchsten Signalraten bei m/z 201,09. Es finden sich die meisten Signalintensitäten bei den Retentionszeiten (rt) 15,7 bis 15,9 Minuten.

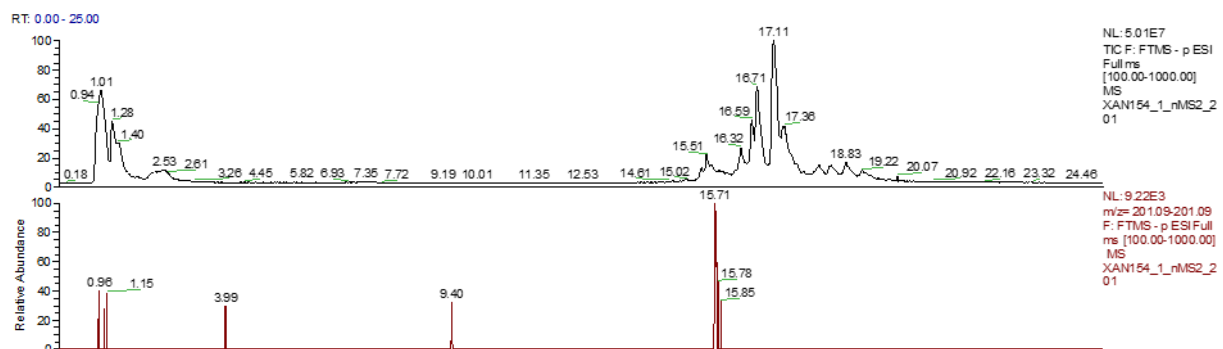


Abb. 19: LC-MS Chromatogramm mit Detektion bei m/z = ca. 201,09

Die bei diesen Retentionszeiten sich anreichernden Ionen wurden mittels Ionenfallen-Quadrupol-Massenspektrometrie („Orbitrap“ Thermo-Fischer) genauer analysiert: $rt = 15,62-15,82$ im negativen Modus (M-H). Hier findet sich ein Signal bei m/z 201,087, das mit dem Ion Coprin-H, $m/z = 201,0881$, $C_8H_{13}O_4N_2$ vereinbar ist (Abb. 20).

XAN154_1_nMS2_201 #3984-4036 RT: 15.62-15.82 AV: 18 NL: 9.26E3
 F: FTMS - p ESI Full ms [100.00-1000.00]

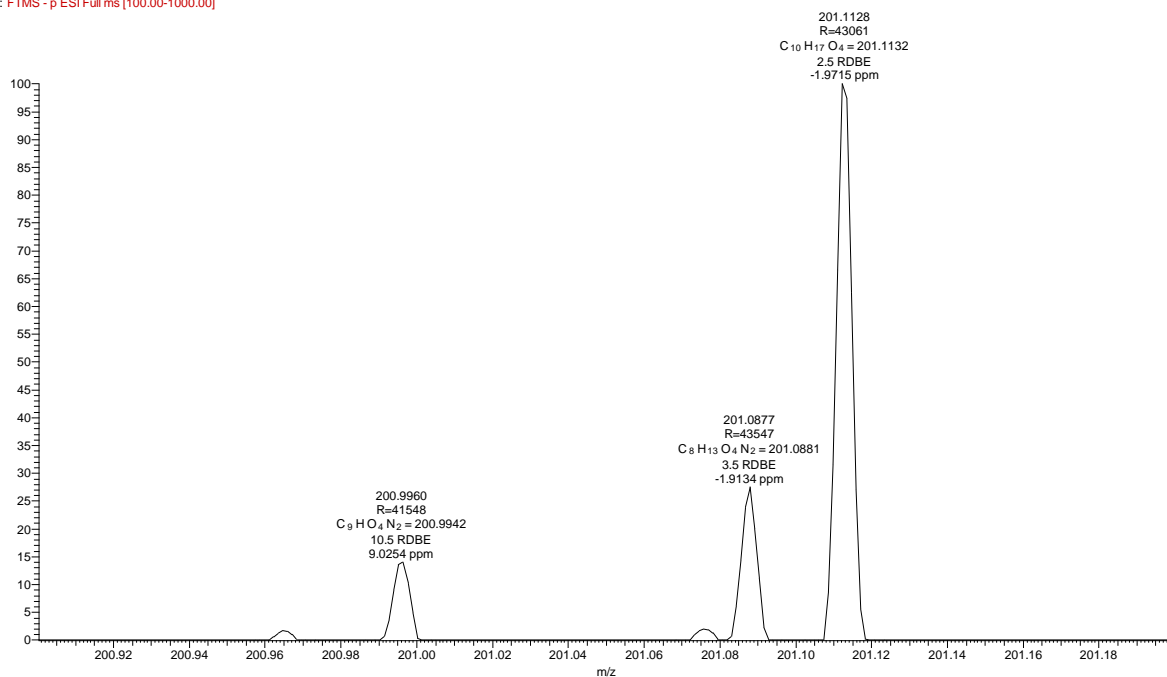


Abb. 20: Ionenfallen-Quadrupol-MS bei rt 15,62-15,82 min: negativer ESI-Modus (M-H)

Das Chromatogramm des positiven ESI-Modus ist in Abb. 21 dargestellt (die Chromatographie-Bedingungen unterscheiden sich bei den beiden Ionisations-Modi, siehe 2.7.). Hier findet sich bei $rt = 0,821 - 1,05$ min ein Signal bei $m/z=203,1$ vereinbar mit der Summenformel für Coprin+H = $C_8H_{15}O_4N_2$, $MW = 203,102$.

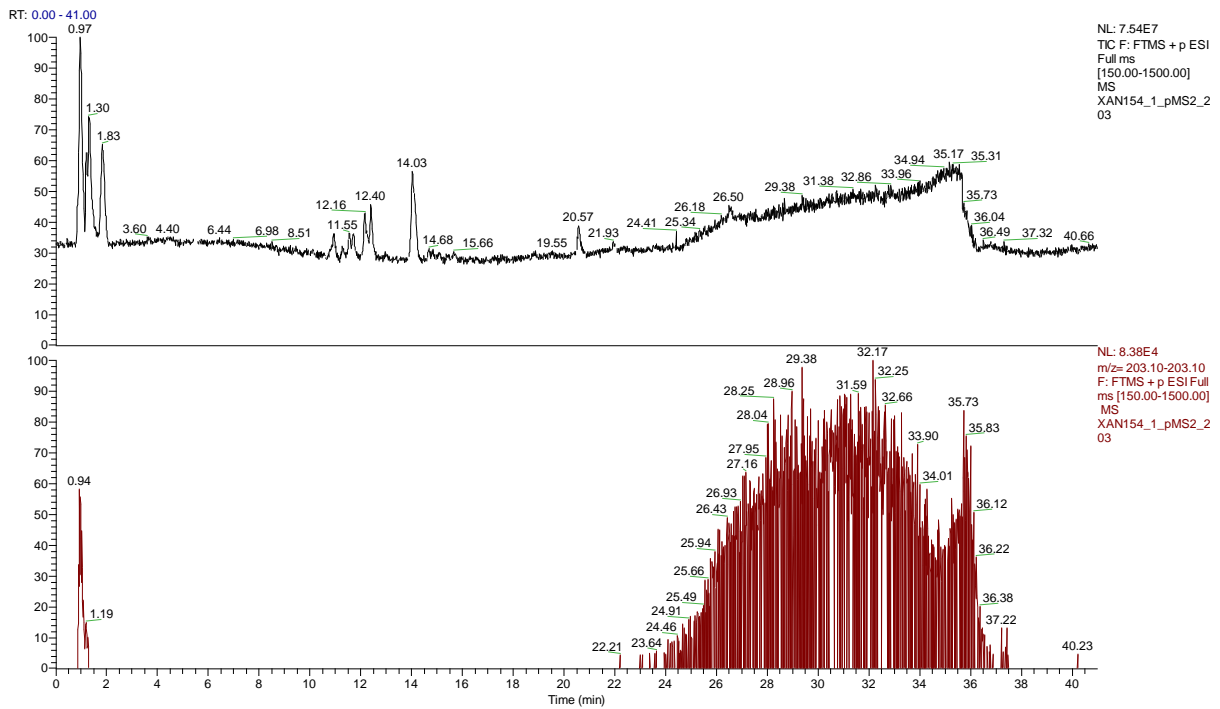


Abb. 21: LC-Chromatogramm mit MS-Detektion von $m/z = 203,1$

Die bei $rt = 0,82-1,05$ sich anreichernden Ionen wurden ebenfalls mittels Ionenfallen-Quadrupol-Massenspektrometrie („Orbitrap“ Thermo-Fischer) genauer analysiert: Hier findet sich ein Signal bei $m/z 203,1024$, das mit dem Ion Coprin+H, $m/z=203,1008$, $C_8H_{15}O_4N_2$ vereinbar ist (Abb. 22).

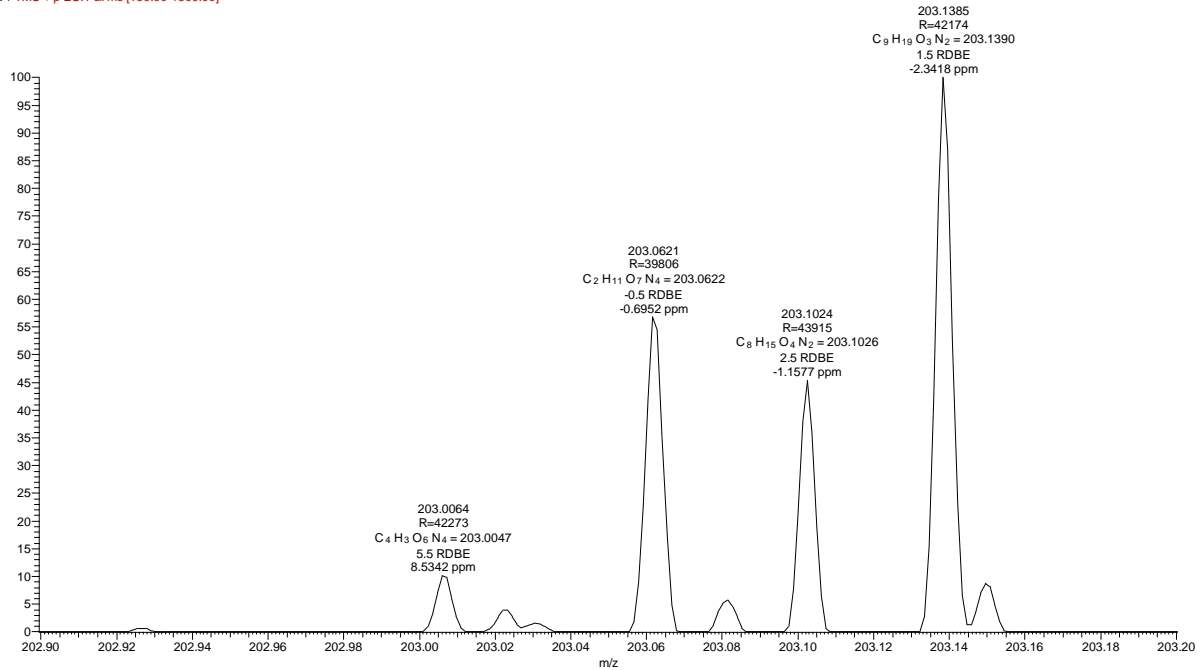


Abb. 22: Ionenfallen-Quadrupol-MS bei rt 0,82 – 1,05-15,82 min: positiver ESI-Modus (M+H)

Dieses Ergebnis kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass sich Coprin in dem Extrakt befand.

Allerdings schränkt Dr. Arnold diese Aussage selbst dahingehend ein, dass dieser Hinweis nicht als Beweis gewertet werden darf. Gründe hierfür sind dass die Auflösung sowohl in der Chromatographie als auch in der Massenspektrometrie und vor allem die Anreicherung in der Gelpermeationschromatographie nicht ausreichend war, und die Substanzmenge für weitergehende Untersuchungen zu gering war.

Vor allem fehlen strukturbeweisende Untersuchungen wie Kernspinspektroskopie und Massenspektrometrie im Fragmentierungsmodus.

3.2. Untersuchung weiterer Pilze bezüglich ihrer ALDH-Hemmung

Analog den Versuchen mit *E. asperum* wurden mit dem Enzymassay noch weitere Pilze auf mögliche ALDH Hemmung hin untersucht. Alle Pilze wurden in wässriger Phase (mit Tris-Puffer) und in fettlöslicher Phase (mit Chloroform) extrahiert und der Pilzextrakt in der Konzentration 10 µl dem Enzymassay zugesetzt. Sofern sich keine anderen Ergebnisse zeigten werden nur die Ergebnisse mit wässrigem Extrakt dargestellt.

3.2.1. Zuchtchampignon (*Agaricus bisporus*)



Foto 2: Zuchtchampignon (*Agaricus bisporus*)

Wie zu erwarten konnte bei dem kommerziell erhältlichen und beliebten Speisepilz, dem Zuchtchampignon (*Agaricus bisporus*), keine signifikante Hemmung der ALDH beobachtet werden (Abb. 23).

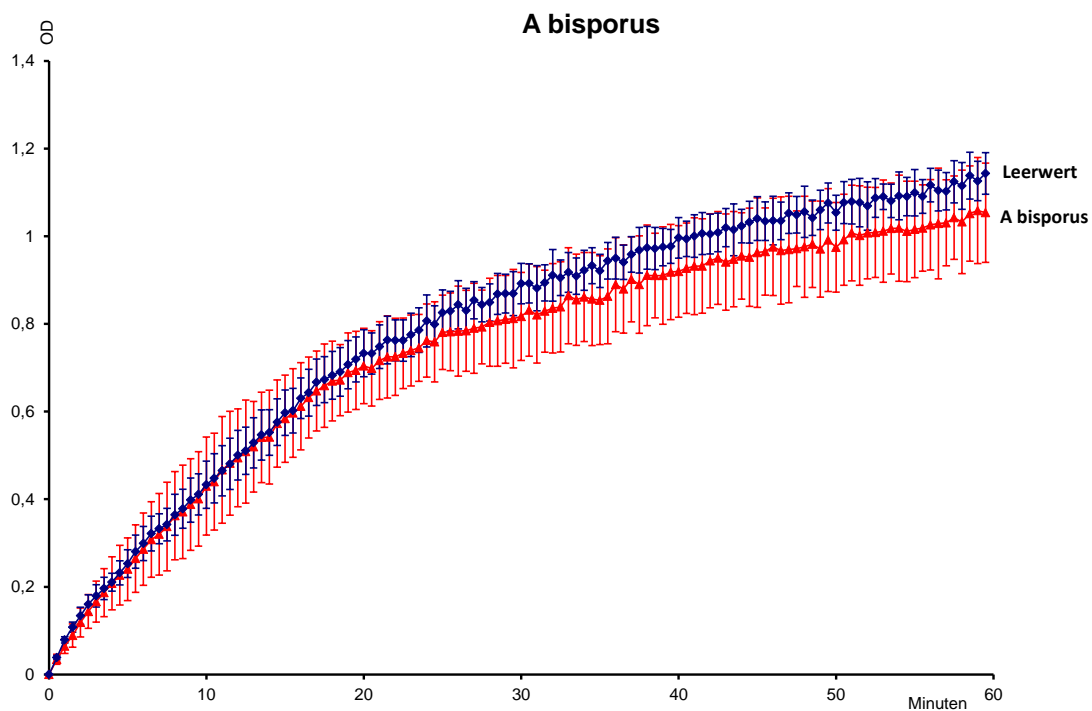


Abb. 23: Entstehung von ALDH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem Extrakt des Zuchtchampignons (*Agaricus bisporus*). Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der ALDH.

3.2.2. Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*)



Foto 3: Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*)

Auch bei dem Speisepilz Austernseitling (*Pleurotus ostreatus*) zeigte sich in unserem Enzymassay mit wässrigem Extrakt zwar eine nach unseren Kriterien signifikante, aber nur geringe Hemmung der ALDH (Abb. 24).

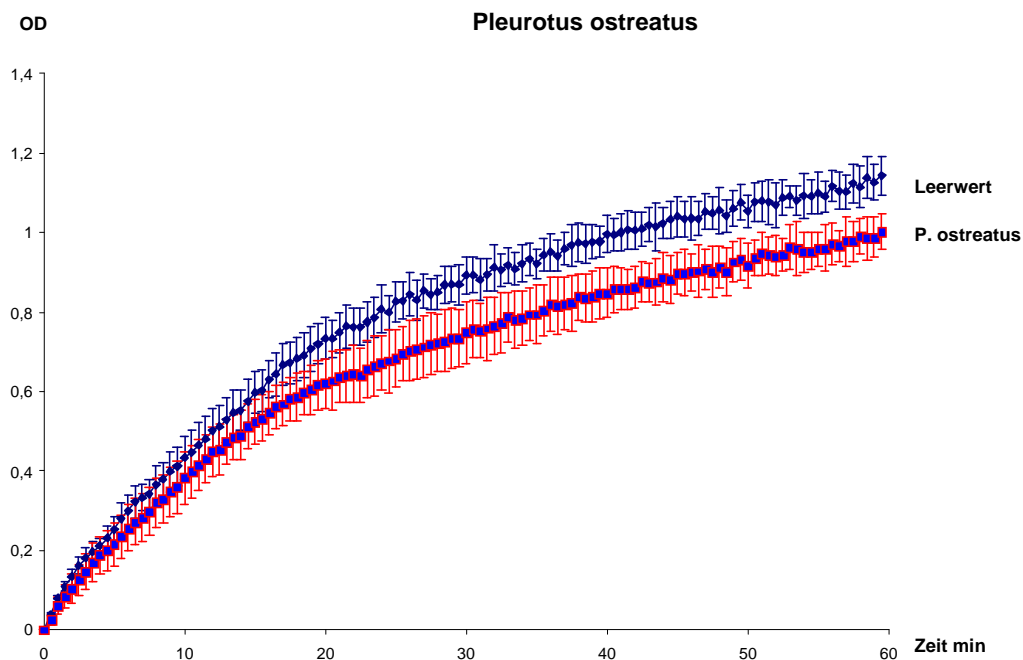


Abb. 24: Entstehung von NADH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem Extrakt des Austernseitlings (*Pleurotus ostreatus*). Es zeigt sich eine nur unwesentliche Hemmung der ALDH.

3.2.3. Steinpilz (*Boletus edulis*)



Foto 4: Steinpilz (*Boletus edulis*)

Beim als Delikatesse geltenden Steinpilz (*Boletus edulis*) ließ sich überraschenderweise eine relevante Hemmung der ALDH beobachten (Abb. 25).

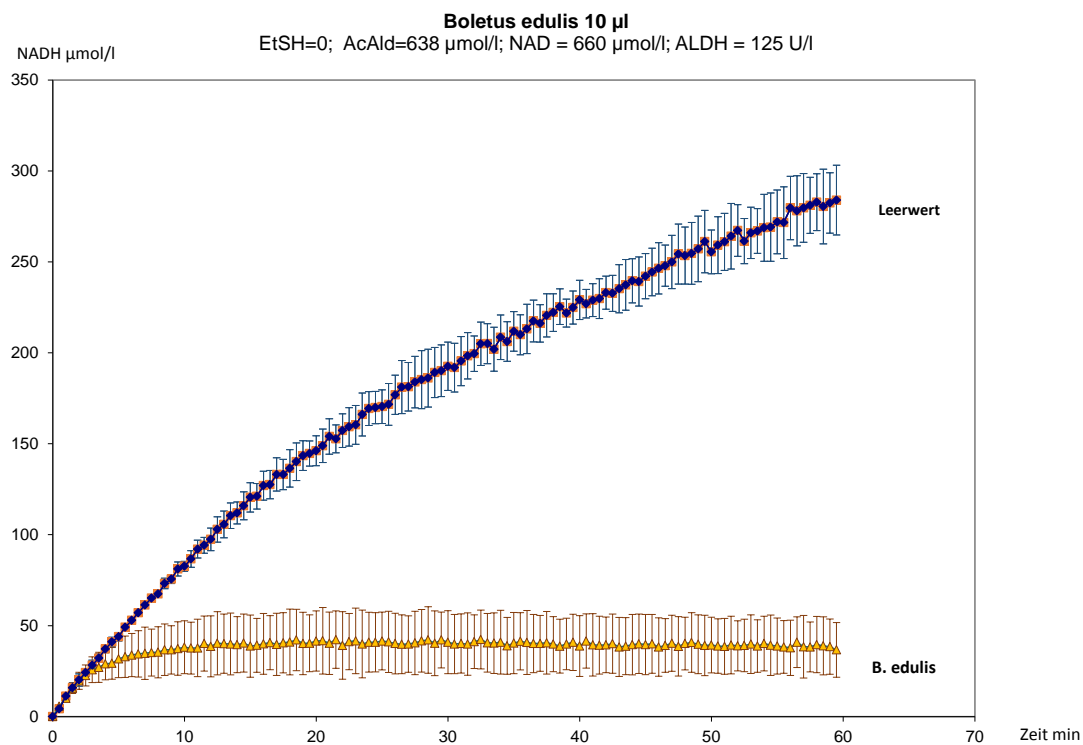


Abb. 25: Entstehung von ALDH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem Extrakt des Steinpilzes (*Boletus edulis*). Es lässt sich eine signifikante Hemmung der ALDH beobachten.

3.2.4. Netzstieler Hexenhöhrling (*Boletus luridus*)



Foto 5: Netzstieler Hexenhöhrling (*Boletus luridus*)

Bei dem als Speisepilz umstrittenen Netzstieler Hexen-Röhrling (*Boletus luridus*) konnte in unserem Versuchsaufbau bei Zugabe von 10 μl eines wässrigen Extraktes von *B. luridus* eine deutliche Hemmung der ALDH beobachtet werden (Abb. 26).

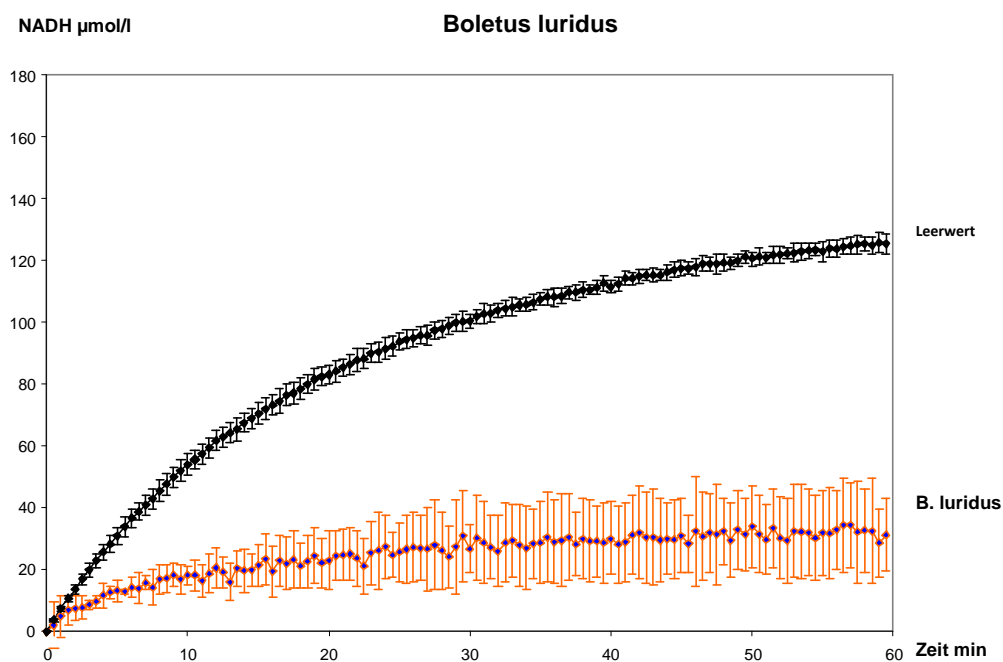


Abb. 26: Entstehung von ALDH ohne, sowie mit wässrigem Extrakt des Netzstieler Hexenröhrlings (*Boletus luridus*). Es zeigt sich eine signifikante Hemmung der ALDH.

3.2.5. Blaufleckender Purpur-Röhrling (*Boletus rhodopurpureus*)



Foto 6: Blaufleckender Purpur-Röhrling (*Boletus rhodopurpureus*)

Für den Blaufleckenden Purpur-Röhrling (*Boletus rhodopurpureus*) konnte im wässrigen Extrakt ebenfalls eine deutliche ALDH-Hemmung nachgewiesen werden (Abb. 27).

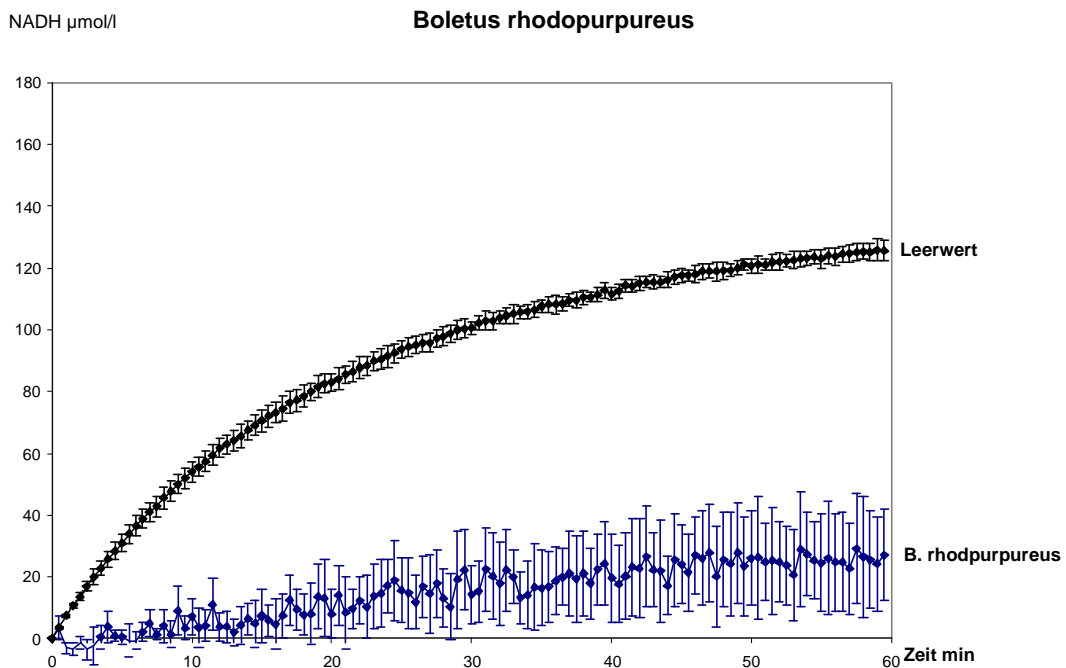


Abb. 27: Entstehung von NADH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem Extrakt des Blaufleckenden Purpur-Röhrling (*Boletus rhodopurpureus*). Es zeigt sich eine signifikante Hemmung der ALDH.

3.2.6. Weinroter Purpur-Röhrling (*Boletus rubrosanguineus*)



Foto 7: Weinroter Purpur-Röhrling (*Boletus rubrosanguineus*)

Eine Versuchsdurchführung mit dem Weinroten Purpur-Röhrling (*Boletus rubrosanguineus*) war nicht adäquat auswertbar, da es aufgrund der kräftigen Eigenfärbung des Pilzextraktes zu sehr hohen Standardabweichungen kam. Eine leichte ALDH-Hemmung ist vorstellbar, aber mit diesem Verfahren nicht verlässlich nachzuweisen (Abb 28).

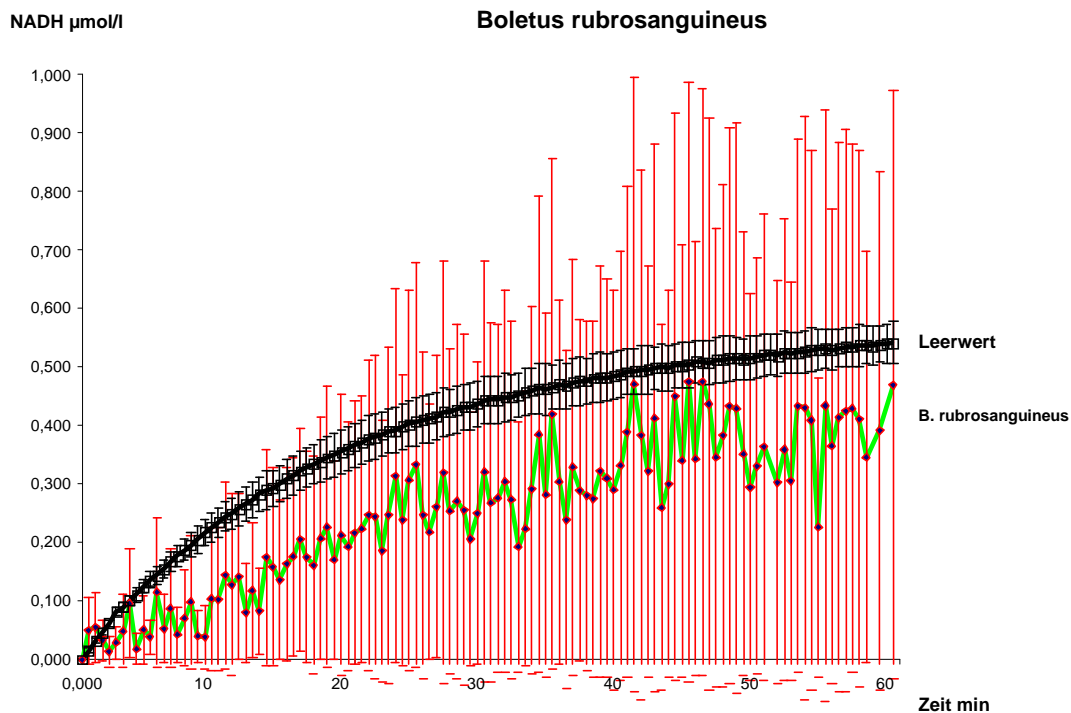


Abb 28: Entstehung von NADH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem Extrakt des Weinroten Purpur-Röhrling (*Boletus rubrosanguineus*). Die starke Eigenfärbung des Pilzextraktes bedingte große Standardabweichungen, die eine Auswertung nicht möglich machten. Eine gewisse ALDH-Hemmung scheint jedoch möglich.

3.2.7. Bräunlicher Stäubling (*Lycoperdon umbrinum*)



Foto 8: Bräunlicher Stäubling (*Lycoperdon umbrinum*)

Mit Extrakten des essbaren Bräunlichen Stäublings (*Lycoperdon umbrinum*) zeigte sich sowohl im wässrigen Extrakt als auch in der lipophilen Chloroform-Extraktion eine relevante ALDH-Inhibierung (Abb. 29), die in der lipophilen Extraktion stärker ausgeprägt war.

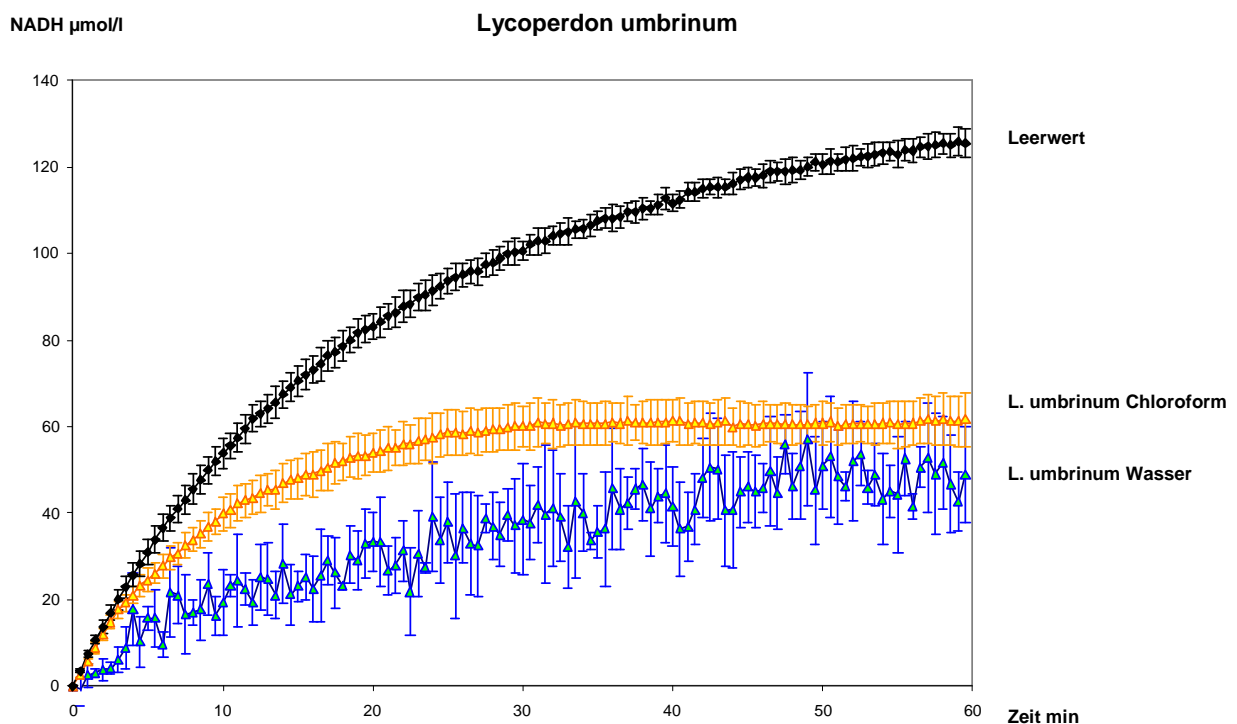


Abb 29: Entstehung von NADH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem- und in Chloroform gelöstem Extrakt des Bräunlichen Stäublings (*Lycoperdon umbrinum*). Es zeigt sich sowohl in der hydrophilen als auch in der lipophilen Phase eine signifikante Hemmung der ALDH.

3.2.8. Keulenfußtrichterling (*Clitocybe clavipes*)



Foto 9: Keulenfußtrichterling (*Clitocybe clavipes*)

Für den in Japan als Speisepilz geltenden Trichterling *Clitocybe clavipes* wurde eine ALDH hemmende Eigenschaft beschrieben und Hemmsubstanzen NMR-spektroskopisch und massenspektroskopisch identifiziert (Kawagishi et al., 2002). Auch in dem hier verwendeten Assay hemmten Extrakte von *C. clavipes* die ALDH. Hierbei war im Extraktionsvergleich die wässrige- und die Chloroform-Fraktion in etwa gleich aktiv (Abb. 30).

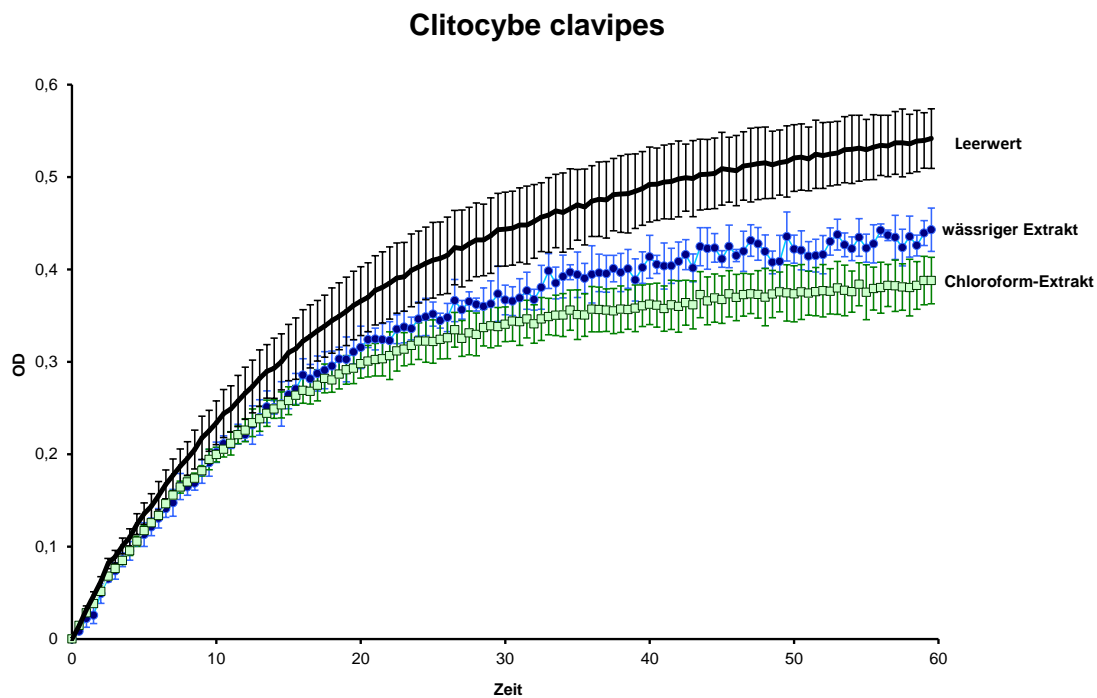


Abb. 30: Entstehung von NADH gemessen an der OD ohne, sowie mit wässrigem und mit Chloroform Extrakt des Keulenfußtrichterlings (*Clitocybe clavipes*). Es zeigt sich in beiden Extrakten eine eher gering ausgeprägte aber signifikante Hemmung der ALDH.

3.3. Einfluss des Erhitzens der Pilzextrakte auf die Hemmwirkung der ALDH

Es wird empfohlen, Pilze vor dem Verzehr gut zu erhitzen. Viele gekocht gut verträgliche Speisepilze können roh oder ungenügend erhitzt Magen-Darm-Beschwerden verursachen. Das Bundesinstitut für Risiko-Bewertung empfiehlt, eine Garzeit von mindestens 15 Minuten nicht zu unterschreiten (http://www.bfr.bund.de/cm/350/risiko_pilze.pdf).

Wir wollten daher untersuchen, ob das Erhitzen jener Pilzextrakte - für die wir eine Hemmung der ALDH zeigen konnten - selbst Einfluss auf die Hemmung der ALDH hat. Dazu haben wir die wässrigen Pilzextrakte von *E. asperum*, *B. luridus* und *C. clavipes* vor dem Einsatz im Enzymassay im Wasserbad bei 94°C für 20 Minuten erhitzt.⁴

⁴ Aufgrund einer Vielzahl von parallelen Kochvorgängen, mit dem Hauptaugenmerk auf möglichst vielen verschiedenen Exemplaren von *E. asperum*, war es aus praktisch-logistischen Gründen leider nicht möglich, *B. edulis* noch zu berücksichtigen.

3.3.1. Echinoderma asperum

Bei Extrakten des Spitzschuppigen Stachelschirmlings (*E. asperum*) zeigte sich beim erhitzten Extrakt eine signifikant geringere Hemmung der ALDH im Gegensatz zum nicht erhitzten Extrakt (Abb. 31). Die Hemmwirkung konnte durch Kochen also teilweise aufgehoben werden.

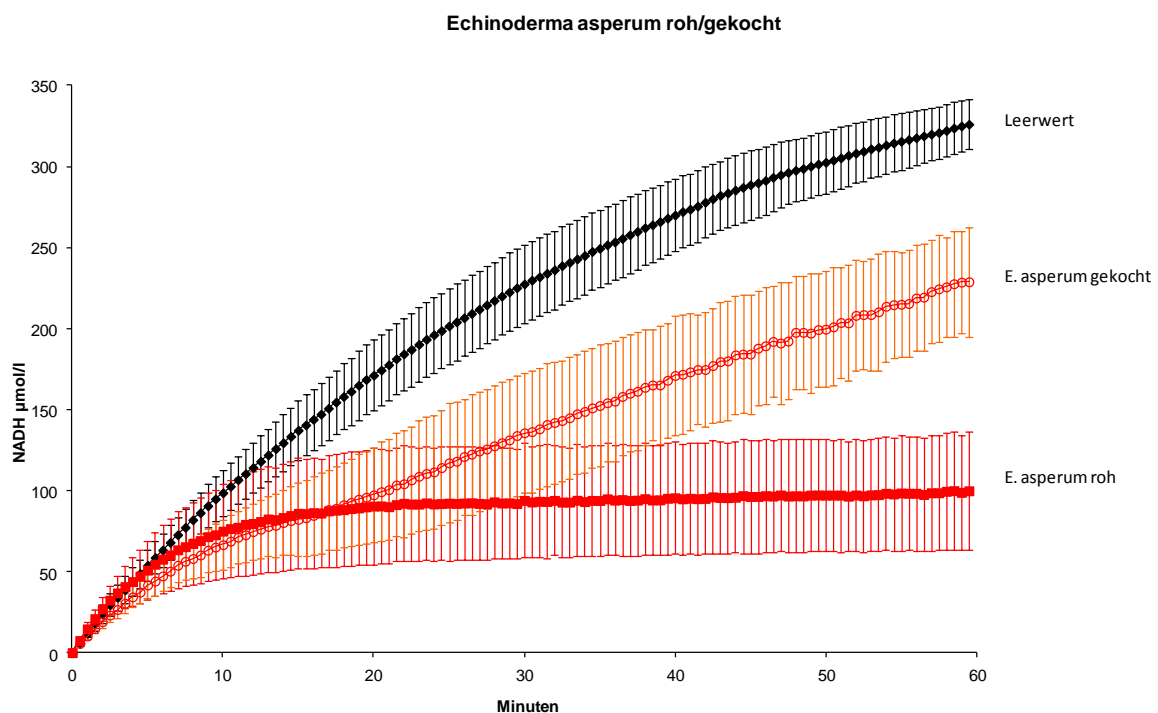


Abb. 31: Entstehung von NADH gemessen an der OD mit erhitztem Extrakt von *E. asperum* sowie mit nicht erhitztem Extrakt. Der nicht erhitzte Extrakt zeigt eine deutliche ALDH-Hemmung, diese ist beim erhitzten Extrakt signifikant schwächer.

3.3.2. Boletus luridus

Beim Netzstieligen Hexenröhrling (*B. luridus*) zeigte sich ein überraschendes Ergebnis. Der erhitzte Extrakt zeigte sogar eine noch stärkere Hemmung der ALDH als der nicht erhitzte Extrakt (Abb. 32).

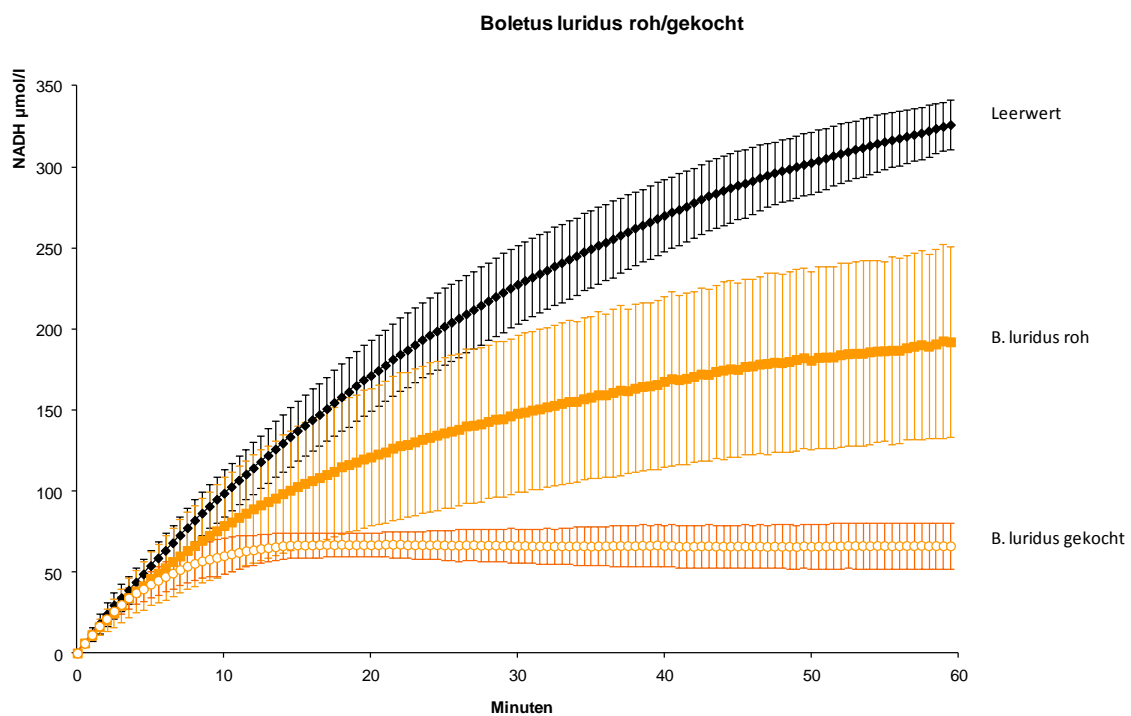


Abb. 32: Entstehung von NADH mit gekochtem Extrakt von *B. luridus* sowie mit nicht gekochtem (roh) Extrakt. Der erhitzte Extrakt führt zu einer stärkeren Hemmung der ALDH als der nicht erhitzte Extrakt.

3.3.3. Clitocybe clavipes

Bei dem Keulenfußtrichterling (*C. clavipes*) zeigte sich im erhitzten und im nicht erhitzten Extrakt eine signifikante Hemmung der ALDH. Zwischen den beiden Extrakten gab es keinen signifikanten Unterschied in der Hemmung (Abb. 33).

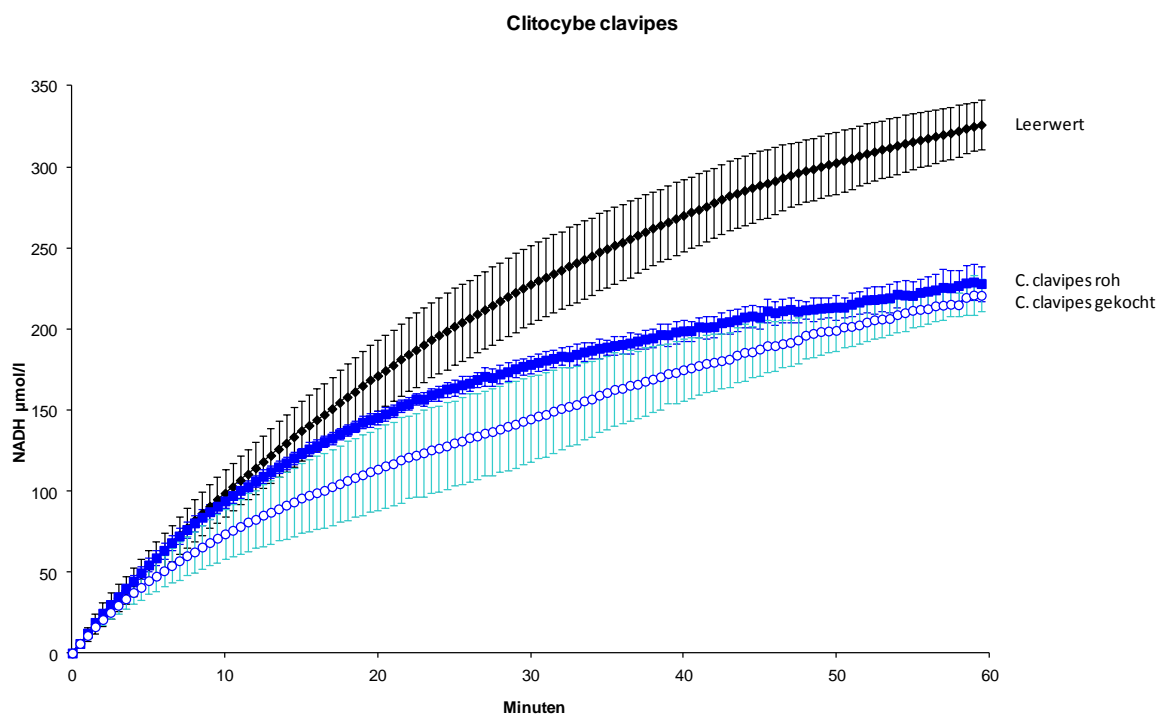


Abb. 33: Entstehung von NADH gemessen an der OD mit erhitztem Extrakt von *C. clavipes* sowie mit nicht erhitztem Extrakt. In beiden Extrakten lässt sich eine signifikante Hemmung beobachten. Zwischen den beiden Extrakten gab es keinen Unterschied in der Stärke der Hemmung.

4. Diskussion

Es ist uns in dieser Arbeit erstmals gelungen, *in vitro* eine Hemmung der ALDH durch Extrakte des Pilzes *Echinoderma asperum* nachzuweisen. Die hemmende Substanz ist wasserlöslich und die Hemmung verläuft konzentrationsabhängig.

Da in den Versuchen mit dem wässrigen *E. asperum* Extrakt ab ca. 5 Minuten kein weiterer Anstieg der NADH Konzentration mehr zu beobachten ist, muss die Aktivität der ALDH komplett gehemmt zu sein. Dies lässt auf eine nicht-kompetitive Hemmung schließen. Bei einer kompetitiven Hemmung würde man ein Gleichgewicht zwischen an ALDH gebundener und freier Hemmsubstanz erwarten mit einem Restanteil an noch funktionstüchtiger ALDH und somit einem im Vergleich zur Leerprobe abgeflachten Kurvenverlauf, jedoch mit Anstieg der NADH-Konzentration über längere Zeit.

Die Hemmung konnte durch Mercaptoethanol aufgehoben werden und war reversibel. Dadurch könnte im Hinblick auf den Hemmmechanismus vermutet werden, dass eine sulfidische Schwefelgruppe in die Hemmung involviert ist:

Es ist bekannt dass die ALDH in ihrem Pharmakophor die Aminosäure Cystein enthält (Koppaka et al., 2012). Dieses Cystein präsentiert eine freie Schwefelgruppe (SH-Gruppe) die an der Aldehydoxidation maßgeblich beteiligt ist (Abb. 34).

Mit dieser freien Schwefelgruppe des Cystein könnte auch ein Hemmstoff der ALDH eine Bindung eingehen. Hierdurch würde sich das katalytische Zentrum der ALDH strukturell so verändern, dass das Enzym inaktiviert wird.

Eine Inhibition der ALDH über Interaktion mit der SH-Gruppe des Cystein im Pharmakophor der ALDH wird für die ALDH-Hemmstoffe Chloralhydrat (Koppaka et

al., 2012) Cyanamid (Marchner and Tottmar, 1983) Disulfiram (Kitson, 1983) und Aminocyclopropanon (Wiseman and Abeles, 1979) mit enzymkinetischen Messungen begründet.

Für andere ALDH-Inhibitoren gibt es kristallographische und massenspektrometrische Befunde, die direkter die Blockade des Cystein im Pharmakophor durch Bindung an den Inhibitor nachweisen (Khanna et al., 2011).

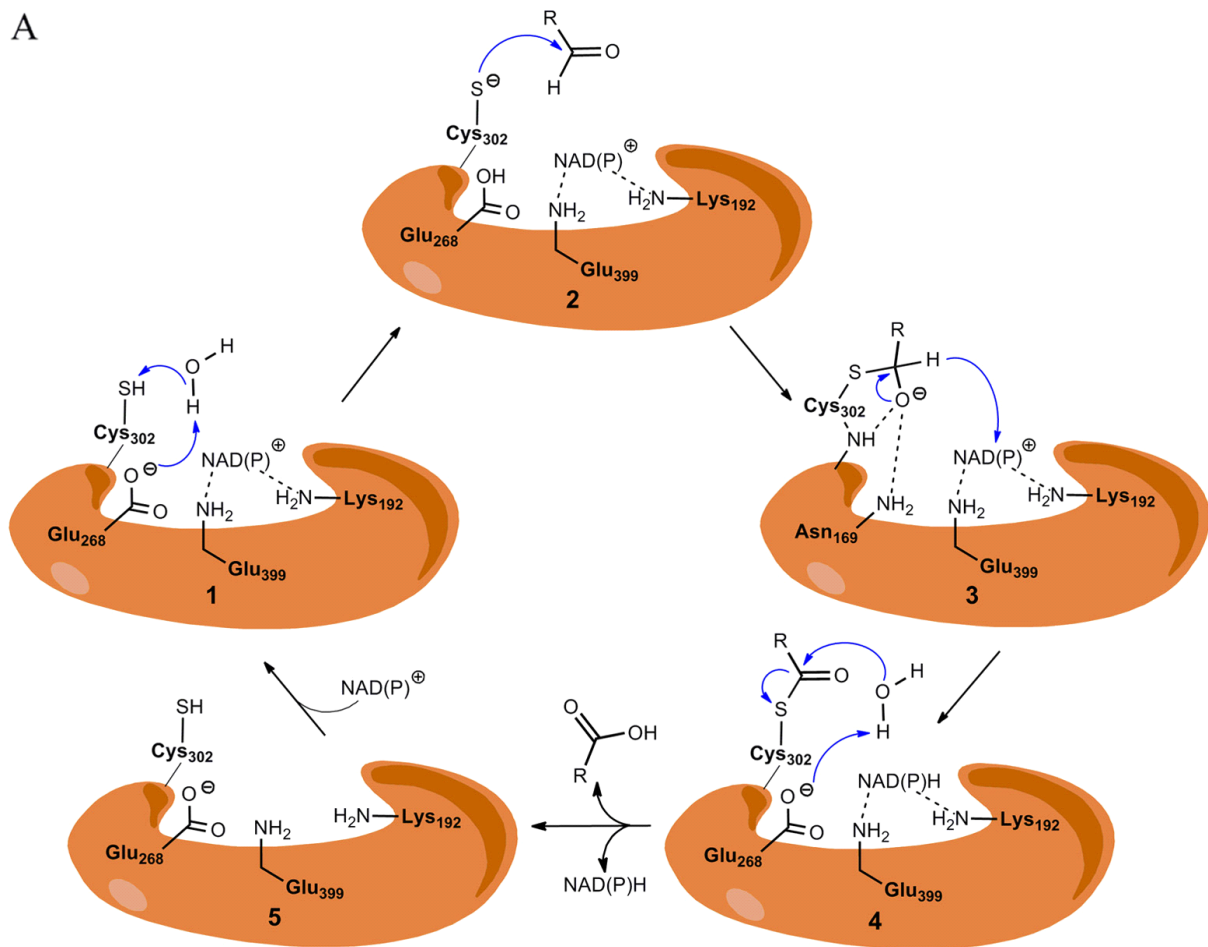


Abb. 34: aus (Koppaka et al., 2012): Mechanismus der Aldehydoxidation am Pharmakophor der ALDH. 1. Aktivierung des katalytischen Cys302 durch ein Wassermolekül und Glu268 durch Protonenabstraktion. 2. Nukleophiler Angriff auf das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe des Aldehyds durch die Thiolgruppe des katalytischen Cys302. 3. Bildung des tetraedrischen Thiohemiacetal Zwischenproduktes (Deacylierung) und Hydridtransfer vom Thiohemiacetal zum Pyridinring des NAD. 4. Hydrolyse des resultierenden Thioester Zwischenproduktes. 5. Dissoziation des reduzierten Cofaktors und anschließende Regeneration des Enzyms durch Bindung an NAD.

Mercaptoethanol wird in der Biochemie häufig eingesetzt, um Disulfidbrücken an Proteinen zu freien Thiolen zu reduzieren. Sollte der Hemmstoff aus Pilzextrakten nun mit höherer Affinität z.B. mittels Disulfidbrücke an Mercaptoethanol statt an die ALDH binden, bzw. Mercaptoethanol in höherer Konzentration im Sinne des Massenwirkungsgleichgewichts um die Bindungsstelle im Hemmstoff konkurrieren, so stünde der Hemmstoff nicht mehr in gleichem Ausmaß zur Blockade der ALDH zur Verfügung. Durch die konkurrierende Bindung von Mercaptoethanol an den Hemmstoff würde der Hemmstoff wieder von der ALDH getrennt werden und die ALDH ihre Aktivität zurückgewinnen. Das Ergebnis unseres Reaktivierungsexperiments ist in diesem Sinne interpretierbar.

Sollte diese Hypothese korrekt sein, würde das bedeuten, dass der in *E. asperum* enthaltene Hemmstoff wahrscheinlich ebenfalls über Bildung einer Disulfidbrücke mit dem Cystein des Pharmakophors der ALDH zu dessen Inhibierung führen könnte. Für Disulfiram haben wir die bereits 1963 (Deitrich and Hellerman, 1963) gemachte Beobachtung bestätigt, dass in vitro Vorbehandlung mit Sulfiden die Hemmung der ALDH verhindert. Ob analog zum *E. asperum*-Extrakt auch die mit Disulfiram in vitro gehemmte ALDH mit nachträglich zugesetztem Mercaptoethanol reaktiviert werden kann, haben wir nicht untersucht.

Mittels LC-MS-MS wurde im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle im nach Gelpermeations-Chromatographie angereicherten Extrakt aus *E. asperum* ein Signal gefunden, deren Molekülmasse und vorgeschlagene Summenformel mit der des Coprins identisch sein könnte. Diese Untersuchung wurde jedoch nicht reproduziert. Die chromatographische Anreicherung war unzureichend und die Auflösung der LC-MS-MS war nicht ausreichend, um sicher Coprin nachweisen zu können. Damit ist

das Vorhandensein von Coprin in *E. asperum* zwar vorstellbar, aber bei weitem noch nicht bewiesen.

Wir konnten mit unserem Enzymassay zudem eine relevante *in vitro* Hemmung der ALDH durch Extrakte der Pilze Netzstieliger Hexen-Röhrling (*Boletus luridus*), Bräunlicher Stäubling (*Lycoperdon umbrinum*), Blaufleckenden Purpur-Röhrling (*Boletus rhodopurpureus*) und Keulenfußtrichterling (*Clitocybe clavipes*) sowie auch durch den Steinpilz (*Boletus edulis*) nachweisen. Bei *B. luridus*, *B. edulis* und *B. rhodopurpureus* war die Hemmung bei den Pilzextrakten in wässriger Extraktion zu beobachten. Bei *C. clavipes* und *L. umbrinum* konnte eine etwa gleich starke Hemmung in wässriger und in Chloroform Extraktion gezeigt werden.

Eine Hemmung der ALDH durch *B. luridus* deckt sich mit bekannten Einzelfallberichten von aversen Reaktionen des Pilzes in Kombination mit Alkohol. Denkt man an den in der Einleitung unter 1.6. erwähnten Fall, in dem drei Personen averse Reaktionen nach Konsum eines Mischpilzgerichts aus *Boletus luridus*, *Tricholoma terreum* und *Lycoperdum umbrinum* zusammen mit Alkohol entwickelten, so konnten wir eine ALDH Hemmung *in vitro* für zwei dieser drei Pilze nachweisen.

Überraschend scheint der Nachweis einer ALDH Hemmung durch Extrakte des Steinpilzes (*B. edulis*). Über diesen häufig konsumierten Pilz existieren in der Literatur keine Fallberichte von aversen Reaktionen in Kombination mit Alkohol. Möglicherweise reicht die Konzentration der Hemmsubstanz in den gewöhnlich konsumierten Mengen Pilze nicht aus, um *in vivo* eine Hemmung der ALDH herbeizuführen. Möglich ist auch, dass die Hemmsubstanz nicht resorbierbar ist, oder während der Zubereitung oder im Verdauungstrakt inaktiviert wird.

Durch Erhitzen des *E. asperum* Extraktes auf 94°C über 20 Minuten ließ sich die Hemmwirkung auf die ALDH aufheben. Die Hemmsubstanz in *E. asperum* scheint also hitzelabil. Möglicherweise beruhen die beschriebenen aversiven Symptome bei Konsum des Pilzes in Kombination mit Alkohol also auch auf ungenügendem Erhitzen der Pilzmahlzeit bei der Zubereitung.

Nach Erhitzen der Extrakte von *B. luridus* zeigte sich erstaunlicherweise eine noch stärkere Hemmwirkung. Die Gründe hierfür sind uns nicht bekannt, hier wären weitere Versuche zur Reproduzierbarkeit mit verschiedenen Pilzexemplaren angezeigt.

Das Erhitzen der Extrakte von *C. clavipes* hatte keinen Einfluss auf die Hemmwirkung, es zeigte sich im erhitzten und im nicht-erhitzten Extrakt eine signifikante ALDH Hemmung.

5. Limitationen

Wie bei allen Naturstoffen ist davon auszugehen, dass auch in unseren untersuchten Pilzen natürliche Schwankungen der Konzentration möglicher Hemmsubstanzen auftreten. Dabei spielen die Witterungsbedingungen wie Temperatur und Niederschlag sowie der Standort der Pilze vermutlich ebenso eine Rolle wie das Alter und die Verarbeitung nach dem Sammeln. In wieweit diese Variablen Einfluss auf die ALDH Hemmung haben ist bislang nicht bekannt.

Der hier verwendete Enzymassay hat einige Limitationen:

- Exogen eingetragene Aldehyde können die Messung verfälschen.
- Die Enzymlösung hat nur eine geringe Haltbarkeit und Stabilität
- Bei den kleinen Volumina in den Reaktionsgefäßen der Mikrotiterplatte (300 µl/Well) führen schon geringe Pipettierungenauigkeiten zu großen Veränderungen der Reaktionsgeschwindigkeit.

Wegen diesen Limitationen musste auf enzymkinetische Untersuchungen verzichtet werden. Solche Untersuchungen waren aber auch nicht unser primäres Ziel. Hierfür wäre die Durchführung der Messungen in größeren, thermostatisierten Quarzküvetten notwendig gewesen. Wegen dieser Limitationen werden in der Interpretation der Versuchsergebnisse keine quantitativen Aussagen zur Hemmkinetik gemacht, die auf dem Vergleich verschiedener Messexperimente beruhen.

Diese Limitationen beeinträchtigen nicht unsere qualitativen Ergebnisse und ändern auch nicht die Aussagen zu den Ergebnissen aus den Versuchsansätzen zur Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung, zur Hitzebeständigkeit oder zur Reaktivierbarkeit der ALDH durch Mercaptoethanol.

Eine weitere Aufarbeitung der *E. asperum* Extrakte, um Coprin als Hemmstoff zu bestätigen oder auszuschließen, wäre wünschenswert gewesen, war aber mit den Mitteln unseres Labors nicht durchführbar.

Zuletzt handelt es sich um *in vitro* Untersuchungen, die die *in vivo* Bedingungen im lebenden (menschlichen) Organismus nur ungenügend abbilden:

- Die verwendete ALDH wurde aus Backhefe isoliert, diese kommt zwar in ihren Eigenschaften den menschlichen ALDHs sehr nahe, ist aber nicht identisch.
- Unklar ist, in welchem Ausmaß die ALDH – Hemmsubstanzen aus Pilzen resorbiert und metabolisiert werden. Für *E. asperum* legen die eingangs berichteten klinischen Beobachtungen nahe, dass in vivo nach Konsum von *E. asperum* ALDH-hemmende Substanzen ausreichend resorbiert und in vivo aktiv sind. Bei den Steinpilzen hingegen spricht der millionenfache Konsum mit der Mahlzeit begleitendem Alkoholgenuss ohne späteres Acetaldehydsyndrom dagegen.

6. Ausblick

Wollte man die Arbeit mit *E. asperum* weiterführen, so wäre der nächste Schritt die Verbesserung der assay-guided chromatographischen Anreicherung und Wiederholung der LC-M-MS Experimente.

Sollte sich dabei zeigen, dass möglicherweise eine andere Substanz als Coprin für die Hemmaktivität verantwortlich ist, so müsste mit weiter optimierter assay-guided Chromatographie so viel Hemmsubstanz isoliert werden, dass strukturaufklärende Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie sowie eine Elementanalyse möglich sind.

In der klassischen organischen Chemie würde sich bei ausreichendem wissenschaftlichen Interesse eine Synthese der Hemmsubstanz zur Strukturbestätigung anschließen.

Das würde aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten und erfordert ein gut ausgestattetes Labor für organische Chemie.

Mit dieser Arbeit ist es aber gelungen, mit im Sinne von „from bedside to bench“ durchgeführten Experimenten zu zeigen, dass der Pilz *Echinoderma asperum* ALDH-hemmende Eigenschaften hat, und dies die Symptome der eingangs berichteten Patienten gut erklärt.

Literaturverzeichnis

- Amuchastegui, T., Amuchastegui, M., Donohue, T., 2014. Disulfiram-alcohol reaction mimicking an acute coronary syndrome. *Conn. Med.* 78, 81–84.
- Bresinsky, A., Besl, H., 1985. Giftpilze: mit e. Einf. in d. Pilzbestimmung ; e. Handbuch für Apotheker, Ärzte u. Biologen. *Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart.*
- Budmiger, H., Kocher, F., 1982. [Boletus luridus and alcohol. Case report]. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 112, 1179–1181.
- Croker, A.K., Allan, A.L., 2011. Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDHhiCD44+ human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 75–87. doi:10.1007/s10549-011-1692-y
- Cvek, B., 2011. Targeting Malignancies with Disulfiram (Antabuse): Multidrug Resistance, Angiogenesis, and Proteasome. *Curr. Cancer Drug Targets* 11, 332–337.
- Deitrich, R.A., Hellerman, L., 1963. Diphosphopyridine nucleotide-linked aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 238, 1683–1689.
- Eng, M.Y., Luczak, S.E., Wall, T.L., 2007. ALDH2, ADH1B, and ADH1C genotypes in Asians: a literature review. *Alcohol Res. Health J. Natl. Inst. Alcohol Abuse Alcohol.* 30, 22–27.
- Erhard Ludwig, 2009. Der Tintling, Die Pilzzeitung. Enthält Große Stachel-Schirmling - Lepiota Aspera - Antabus 4/2009, 69.
- Flammer, R., Horak, E., 2003. Giftpilze - Pilzgifte: Pilzvergiftungen ; ein Nachschlagewerk für Ärzte, Apotheker, Biologen, Mykologen, Pilzexperten und Pilzsammler, Vollständig überarbeitete Neuauflage [des Buches ... "Giftpilze-Pilzgifte", Stuttgart, Frankh, 1983]. ed. Schwabe & Co. AG Verlag, Basel.
- Haberl, B., Pfab, R., Berndt, S., Greifenhagen, C., Zilker, T., 2011. Case series: Alcohol intolerance with Coprine-like syndrome after consumption of the mushroom *Lepiota aspera* (Pers.:Fr.) QuéL., 1886 (Freckled Dapperling). *Clin. Toxicol.* 49, 113–114. doi:10.3109/15563650.2011.554840
- Hauschild, F., 1953. Tödliche Kalkstickstoffvergiftung und die Frage des gestörten Alkoholabbaues. *Fühner-Wielands Samml. Von Vergiftungsfällen* 14, 311–320. doi:10.1007/BF00716070
- Index Fungorum - <http://www.indexfungorum.org/names/names.asp> (accessed 6.1.17).
- J. Breitenbach, F. Kränzlin, 1995. Pilze der Schweiz. *Mykologia Luzern*, pp. 192–193.
- Jelski, W., Szmitkowski, M., 2008. Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases. *Clin. Chim. Acta* 395, 1–5. doi:10.1016/j.cca.2008.05.001
- Kawagishi, H., Miyazawa, T., Kume, H., Arimoto, Y., Inakuma, T., 2002. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors from the Mushroom *Clitocybe clavipes*. *J. Nat. Prod.* 65, 1712–1714. doi:10.1021/np020200j
- Keung, W.-M., Vallee, B.L., 1993. Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 1247–1251.

- Khanna, M., Chen, C.-H., Kimble-Hill, A., Parajuli, B., Perez-Miller, S., Baskaran, S., Kim, J., Dria, K., Vasiliou, V., Mochly-Rosen, D., Hurley, T.D., 2011. Discovery of a Novel Class of Covalent Inhibitor for Aldehyde Dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* 286, 43486–43494. doi:10.1074/jbc.M111.293597
- Kitson, T.M., 1983. Mechanism of inactivation of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by disulfiram. *Biochem. J.* 213, 551–554. doi:10.1042/bj2130551
- Kiwitt, U., Laatsch, H., 1994. Coprin in *Boletus torosus*: Beruht die angebliche Alkoholunverträglichkeit durch den Verzehr des Netzstieligen Hexenröhrlings (*Boletus luridus*) auf einer Verwechslung. *Z Mykol.* 60, 423–430.
- Koppaka, V., Thompson, D.C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K.C., Juvonen, R.O., Petersen, D., Deitrich, R.A., Hurley, T.D., Vasiliou, V., 2012. Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacol. Rev.* 64, 520–539. doi:10.1124/pr.111.005538
- Ma, S., Chan, K.W., Lee, T.K.-W., Tang, K.H., Wo, J.Y.-H., Zheng, B.-J., Guan, X.-Y., 2008. Aldehyde Dehydrogenase Discriminates the CD133 Liver Cancer Stem Cell Populations. *Mol. Cancer Res.* 6, 1146–1153. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0035
- Maninang, J.S., Lizada, M.C.C., Gemma, H., 2009. Inhibition of aldehyde dehydrogenase enzyme by Durian (*Durio zibethinus* Murray) fruit extract. *Food Chem.* 117, 352–355. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.106
- Marchitti, S.A., Brocker, C., Stagos, D., Vasiliou, V., 2008. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4, 697–720. doi:10.1517/17425255.4.6.697
- Marchner, H., Tottmar, O., 1983. Studies in vitro on the inactivation of mitochondrial rat-liver aldehyde dehydrogenase by the alcohol-sensitizing compounds cyanamide, 1-aminocyclopropanol and disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2181–2188. doi:10.1016/0006-2952(83)90224-1
- Matthies, L., Laatsch, H., 1992. Ungewöhnliche Pilzvergiftungen: Coprin, ein Hemmstoff des Alkohol-Abbaus. *Pharm. Unserer Zeit* 21, 14–20. doi:10.1002/pauz.19920210107
- Michelot, D., 1992. Poisoning by *Coprinus atramentarius*. *Nat. Toxins* 1, 73–80.
- Moreb, J.S., Baker, H.V., Chang, L.-J., Amaya, M., Lopez, M.C., Ostmark, B., Chou, W., 2008. ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. *Mol. Cancer* 7, 87. doi:10.1186/1476-4598-7-87
- Peng, G.-S., Chen, Y.-C., Wang, M.-F., Lai, C.-L., Yin, S.-J., 2014. ALDH2*2 but not ADH1B*2 is a causative variant gene allele for Asian alcohol flushing after a low-dose challenge: correlation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic findings. *Pharmacogenet. Genomics* 24, 607–617. doi:10.1097/FPC.0000000000000096
- RCSB Protein Data Bank - <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> (accessed 6.2.17).
- Risiko Pilze - Einschätzung und Hinweise - Informationsbroschüre - risiko_pilze.pdf [WWW Document], n.d. URL http://www.bfr.bund.de/cm/350/risiko_pilze.pdf (accessed 2.12.17).

Species Fungorum - <http://www.speciesfungorum.org/GSD/GSDspecies.asp?RecordID=354364> (accessed 5.11.17).

Speisepilze - DGFM - <https://www.dgfm-ev.de/speise-und-giftpilze/speisepilze?reattachment=1b440e5644ebc893c9c7777e163b8a25> (accessed 5.8.17).

Tamai, H., Yokoyama, A., Okuyama, K., Takahashi, H., Maruyama, K., Suzuki, Y., Ishii, H., 2000. Comparison of cyanamide and disulfiram in effects on liver function. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 24, 97S–99S.

Vanhaelen, M., Vanhaelen-Fastré, R., Hoyois, J., Mardens, Y., 1976. Reinvestigation of disulfiram-like biological activity of *Coprinus atramentarius* (Bull. ex Fr.) Fr. extracts. *J. Pharm. Sci.* 65, 1774–1776.

Wang, X., Bai, Y., Ni, L., Weiner, H., 1996. *Saccharomyces cerevisiae* Aldehyde Dehydrogenases, in: Weiner, H., Lindahl, R., Crabb, D.W., Flynn, T.G. (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer US, pp. 277–280. doi:10.1007/978-1-4615-5871-2_32

Wiseman, J.S., Abeles, R.H., 1979. Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by cyclopropanone hydrate and the mushroom toxin coprine. *Biochemistry (Mosc.)* 18, 427–435.

Yao, T., Wu, Z., Liu, Y., Rao, Q., Lin, Z., 2014. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) positivity correlates with poor prognosis in cervical cancer. *J. Int. Med. Res.* 42, 1038–1042. doi:10.1177/0300060514527060

Zindel, L.R., Kranzler, H.R., 2014. Pharmacotherapy of alcohol use disorders: seventy-five years of progress. *J. Stud. Alcohol Drugs Suppl.* 75 Suppl 17, 79–88.

Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei Bettina Haberl, Rudi Pfab, Norbert Arnold und Florian Eyer bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt außerdem der toxikologischen Abteilung, insbesondere den Mitarbeiterinnen des toxikologischen Labors, sowie Bernd Fellmann und allen Pilzsachverständigen, die beim Pilze suchen geholfen haben und so diese Arbeit ermöglichten.