

1. Kurzzusammenfassung

Metaboliten der Schimmelpilzgattung *Alternaria* sind bislang noch unzureichend untersucht. Diese Pilze sind weltweit verbreitet und stellen ein nicht einzuschätzendes Risiko für Mensch und Tier dar. Um Metabolismustudien oder toxikologische Tests mit einzelnen Metaboliten durchführen zu können, ist ein synthetischer Zugang zu diesen Molekülen von großem Vorteil. Von *Alternaria ssp.* werden diese Metaboliten in wechselnder Zusammensetzung und geringen Mengen produziert. Die strukturverwandten Graphislactone und Ulocladol werden von Schriftflechten oder endophytischen Pilzen produziert und ihr Metabolismus scheint mit dem der *Alternaria*-Metabolite eng verwandt zu sein.

In dieser Arbeit sollte ein effizienter, flexibler Zugang zu diesen Verbindungen erarbeitet werden. Alle Substanzen weisen als Grundgerüst ein Resorcylsäurelacton auf, welches sich retrosynthetisch in zwei Fragmente spalten lässt. Als Schlüsselschritt der Synthesen wurde eine Suzuki-Miyaura-Kreuzkupplung vorgesehen, für den ein aromatischer Boronsäureester als Kupplungspartner entwickelt wurde. Die Reaktionsbedingungen konnten auf dieses sterisch anspruchsvolle, *ortho*-substituierte System optimiert werden.

Für die Darstellung von Altenuen, Isoaltenuen, Neoaltenuen und 4-*epi*-Neoaltenuen wurden als Kupplungspartner diastereomerenreine, iodierte Cyclohexenole benötigt, die ausgehend von (–)-Chinasäure synthetisiert werden konnten. Durch diese erste Totalsynthese von Altenuen und Isoaltenuen war es möglich, mit Hilfe einer Kristallstruktur, Drehwerten und CD-Spektren die absolute Konfiguration der beiden Naturstoffe aufzuklären. Mit nur einer weiteren Umsetzung wie Hydrierung oder selektive Oxidation, konnten weitere Isomere des Altenuens dargestellt werden. Auf diesem Weg konnte die literaturbekannte Struktur für Dihydroaltenuen B korrigiert werden.

Die hochsubstituierten aromatischen Vorläufer, welche für die Totalsynthese der Graphislactone C-F und Ulocladol benötigt wurden, konnten mit einer kurzen Synthesesequenz in vier bis fünf Stufen aus Vanillin erhalten werden. Während die Graphislactone C, D und Ulocladol mit den publizierten analytischen Daten übereinstimmten, war dies bei den Graphislactonen E und F nicht der Fall. Durch die flexible Syntheseroute war es möglich in wenigen Schritten die vermuteten korrigierten Strukturen dieser Graphislactone aufzubauen. Die Korrektur der Strukturen konnte durch NOESY-Experimente und Vergleich der analytischen Daten bestätigt werden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit zehn Naturstoffe, zwei korrigierte Strukturen und drei bislang nicht bekannte Epimere dargestellt werden

2. Einleitung

2.1 Mykotoxine

Der Begriff Mykotoxin („myco“ Pilz, und Toxin) stammt aus dem Jahr 1962, in dem ein Massensterben von Puten die Veterinäre vor ein großes Problem stellte. Als Ursache wurden schließlich mit Aflatoxinen kontaminierte Erdnüsse ermittelt, die als Futter dienten.^[1] Dies gab Grund zu der Annahme, dass auch andere Schimmelpilzmetaboliten über toxische Eigenschaften verfügen. Als „mycotoxin gold rush“ wird die Zeit von 1960 bis 1975 bezeichnet, in der sich viele Wissenschaftler mit der finanziell geförderten Suche nach den toxischen Naturstoffen beschäftigten. Auch schon länger bekannte Pilzgifte (z.B. Ergotamine) wurden unter dem Begriff Mykotoxin zusammengefasst.

Eine Definition für Mykotoxine zu geben ist nicht ganz einfach. Es handelt sich um nicht flüchtige sekundäre Stoffwechselmetaboliten mit einem für Naturstoffe geringem Molekulargewicht und sehr verschiedenen chemischen Strukturen und Wirkungsweisen. Mykotoxine können Wirbeltiere und höhere Tiere auf unterschiedlichen Wegen befallen. Metaboliten (außer Penicillinen), die hauptsächlich Auswirkungen auf Prokaryonten und andere Eukaryonten haben, werden nicht als Mykotoxine klassifiziert.^[2] Mittlerweile werden mehr als 400 Mykotoxine, die von über 350 Pilzarten produziert werden, unter diesem Begriff zusammengefasst.^[3,4]

Warum Mykotoxine gebildet werden, ist bislang nicht geklärt. Als sekundäre Stoffwechselmetaboliten sind sie nicht notwendig für das Wachstum des Pilzes und stellen ein Produkt des primären Metabolismus dar. Diskutiert werden der Nutzen als chemisches Abwehrsystem gegenüber Insekten, anderen Mikroorganismen und höheren Tieren. Manche Toxine spielen eine Rolle bei der Infektion des befallenen Gewebes.^[5]

Werden Tiere von parasitären Pilzen als Wirt genutzt, so werden die ausgelösten Krankheiten als Mykosen bezeichnet. Unter Mykotoxikosen versteht man dagegen Krankheitsbilder, die durch Exposition der Haut, der Atemwege oder durch orale Aufnahme entstehen.^[6] Hier wird zwischen primärer Mykotoxikose, die durch direkten Konsum befallener Lebensmittel hervorgerufen werden und sekundärer Mykotoxikose, welche durch den Genuß von beispielsweise Milch oder Fleisch von infizierten Tieren auftreten, unterschieden.^[2] Die Auswirkungen einer Mykotoxikose sind abhängig von der Art des Mykotoxins, der Dauer und Stärke der Exposition, vom Alter, Geschlecht und der körperlichen Verfassung der betroffenen Person. Viele bisher wenig untersuchte synergistische Effekte, wie genetische

oder vom Ernährungsstand abhängige, sowie Interaktionen mit anderen toxischen Einflüssen spielen ebenfalls eine große Rolle.

Die älteste beschriebene Mykotoxikose, das St. Antonius-Feuer oder auch Ergotismus, beruht auf der Aufnahme der Sklerotien von *Claviceps purpurea*. Diese produzieren eine Vielzahl von Alkaloiden, welche zur Verengung von Gefäßen und zu Krämpfen führen. Eine erhöhte Aufnahme dieser Mykotoxine kann zu Fehlgeburten, zu Gangränen (Gewebenekrose) und zum Verlust ganzer Gliedmaßen führen. Die Grenze zwischen Gift und Arzneimittel ist oft fließend. So wird diese Wirkungsweise mittlerweile zur Therapie von Migräne und zur Blutstillung nach der Geburt eingesetzt. Ein weiteres Gebiet, auf dem sie Anwendung finden sind biologische Waffen.^[1]

Mykotoxine sind weltweit verbreitet; zu ihren wichtigsten und am besten untersuchten Vertretern gehören die Aflatoxine.

Es gibt bislang nur unzureichende Studien und Untersuchungen über die Exposition und Toxikologie vieler Mykotoxinbildner. Die Analytik gestaltet sich als schwierig, da meistens verschiedene Mykotoxine in unterschiedlicher Zusammensetzung pro Schimmelpilz gebildet werden. Außerdem sind diese Toxine schon in sehr geringen Mengen wirksam. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und der nicht ausreichenden Datenlage, ist es oft nicht möglich, eine Risikoabschätzung für Mensch und Tier zu treffen.^[7] Mit Hilfe interdisziplinärer Zusammenarbeit können die unzureichenden Informationen erweitert werden. Durch Totalsynthesen der Mykotoxine können neben der Strukturaufklärung auch Erkenntnisse über die chemischen Eigenschaften der Moleküle gewonnen werden. Zudem wird durch einen synthetischen Zugang die Durchführung mikrobiologischer und analytischer Untersuchungen erleichtert. So können Fortschritte in der Detektion, Prävention und eventuell Detoxifikation von Mykotoxinen gemacht werden.

2.2 *Alternaria*-Metaboliten

2.2.1 Vorkommen

Die Schimmelpilzgattung *Alternaria* ist sehr weit verbreitet. Sie gehören zu den Schwärzepilzen innerhalb der Deuteromyceten und damit auch zu den *funghi imperfecti*. Die *Alternaria* vermehren sich ungeschlechtlich über Sporen oder vegetativ. Die charakteristische dunkle Farbe ihrer Sporen ist auf die Einlagerung von Melanin zurückzuführen, durch das sie vor UV-Strahlen geschützt werden.^[8]

Alternaria sind Pflanzenparasiten, die bei vielen wichtigen landwirtschaftlichen Produkten, sowohl vor der Ernte als auch bei eingelagerten Früchten, große Schäden hervorruft. Einige Beispiele hierfür sind: Tabak („brown spot“, *Alternaria tenuis* und *Alternaria longipes*), Tomaten und Kartoffeln („early blight“, *Alternaria solanis*),^[9] Reis („rice blast disease“),^[10] Zitrusfrüchte,^[11] Äpfel,^[12] Sonnenblumen,^[13] Weizen,^[14] Weintrauben und Wein.^[15] Lange Kälteperioden oder Überreife führen zu einer geschwächten Gewebeoberfläche und erleichtern eine *Alternaria*-Kontamination. Als Pflanzenpathogene können sie aber auch gesunde Pflanzen während des Wachstums infizieren. So wird beispielsweise Getreide während der Milchreife angegriffen, da die Wasseraktivität dann besonders hoch ist.^[16,17] Die thermische Stabilität von *Alternaria*-Metaboliten wurde an Sonnenblumen^[13] und Wein^[18] nachgewiesen.

Alternaria kommen aber auch in geschlossenen Räumen vor. Sie wachsen auf Mauerwerk, Textilien, Anstrichen und Tapeten und gehören zu den typischen Vertretern von Wandschimmel.^[17,19] Die Auswirkung auf die Qualität der Raumluft wurde von Singh^[20] in einem Übersichtsartikel untersucht.

2.2.2 Strukturen

Von den über 40 verschiedenen *Alternaria*-Spezies ist *Alternaria alternata* der häufigste Vertreter. Von dieser Art werden über 30 bekannte Mykotoxine gebildet.^[21] Diese Metaboliten lassen sich in unterschiedliche Strukturklassen unterteilen. Dazu gehören Dibenzopyrone, Anthrachinone, stickstoffhaltige Metaboliten und noch einige andere.^[10] Außerdem ist der *Alternaria alternata* in der Lage auch Fuminsine, u.a. das potenteste, Fuminsin B₁, zu produzieren.^[22] Die am häufigsten auftretenden Metaboliten Alternariol (**1**), Alternariolmonomethylether (**2**) (Abb. 1) und auch Dehydroaltenusin (**4a/b**), Altenusin (**3**), Altenuen (**6**), Isoaltenuen (**5**), Neoaltenuen (**7**), und 5'-Epialtenuen (**8**) sind Resorcylsäure-lactone.

Alternariol und Alternariolmonomethylether (Abb. 1) unterscheiden sich strukturell nur durch die Methoxygruppe an C-9 und wurden zum ersten Mal 1953 von Thomas *et al.*^[23] isoliert. Sie werden sowohl von *Alternaria alternata* als auch von anderen *Alternaria*-Spezies produziert. Aufgrund ihrer aromatischen Struktur fluoreszieren die beiden farblosen, kristallinen Verbindungen unter UV-Einstrahlung blau.

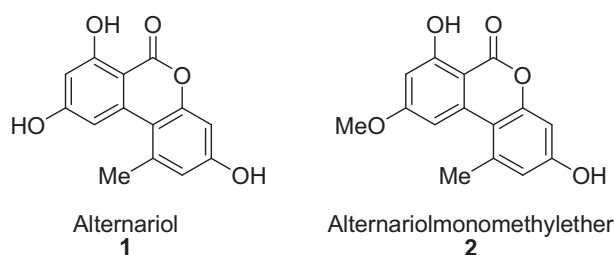
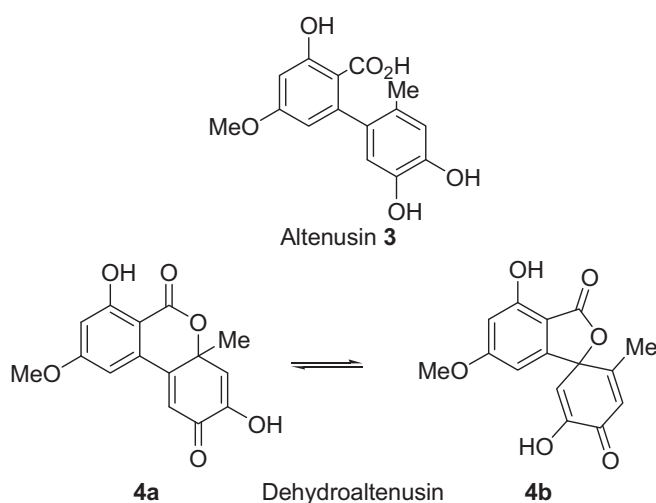


Abbildung 1: Alternariol (**1**) und der Monomethylether (**2**)

Zwei weitere Metaboliten, die von *Alternaria alternata* produziert werden, sind Altenusin **3** und Dehydroaltenusin (**4a/b**) (Schema 1), wurden erstmals von Rosett *et al.*^[24] erwähnt. Von Coombe *et al.*^[25] wurde 1970 für Altenusin die Struktur **3** und für Dehydroaltenusin das Resorcylsäurelacton **4a** vorgeschlagen. Ein Jahr später wurde durch eine Kristallstruktur^[26] die Struktur **4b** postuliert, die von Fuska *et al.*^[27] in der flüssigen Phase bestätigt wurde. 2004 wurde von Kamisuki *et al.*^[28] durch NMR-Analysen in verschiedenen Lösungsmitteln festgestellt, dass Dehydroaltenusin in polaren Lösungsmitteln als Gleichgewicht der beiden Konstitutionsisomere **4a** und **4b** vorliegt.



Schema 1: Strukturen von Altenusin **3** und Dehydroaltenusin **4a/b**

Altenusin (**5**) konnte 1971 erstmals von Pero *et al.*^[29] aus Kulturen von *Alternaria tenuis* isoliert werden, es wird aber auch von *Alternaria alternata* produziert. Nach Aufreinigung durch Chromatographie an Kieselgel und Umkristallisation aus Aceton/Hexan-Gemischen, erhielten die Autoren farblose Nadeln mit einem Schmelzpunkt von 190-191 °C. Durch Feinmassenbestimmung wurde ein Molekulargewicht von 292.09 g/mol ermittelt. Die erste Strukturvermutung basiert neben IR-, Protonen-NMR- und UV-VIS-Spektren auf der empirischen Formel. Durch eine Röntgenstrukturanalyse wurde diese Struktur korrigiert,

allerdings war es nicht möglich, die absolute Konfiguration zu bestimmen.^[30] Bisher sind noch drei weitere Isomere von Altenuen (**5**) bekannt (Abb. 2), die ebenfalls von *Alternaria alternata* produziert werden. Palmisano *et al.*^[31] publizierten 1989 einen Metaboliten der durch semipräparative HPLC isoliert werden konnte. Es handelte sich um ein Diastereomer von Altenuen (**5**), das den Namen Isoaltenuen (**6**) erhielt. Die Struktur wurde durch spektroskopische Methoden ermittelt und unterscheidet sich von Altenuen (**5**) nur durch die Stereochemie an C-2' (Nummerierung entspricht den Literaturangaben).

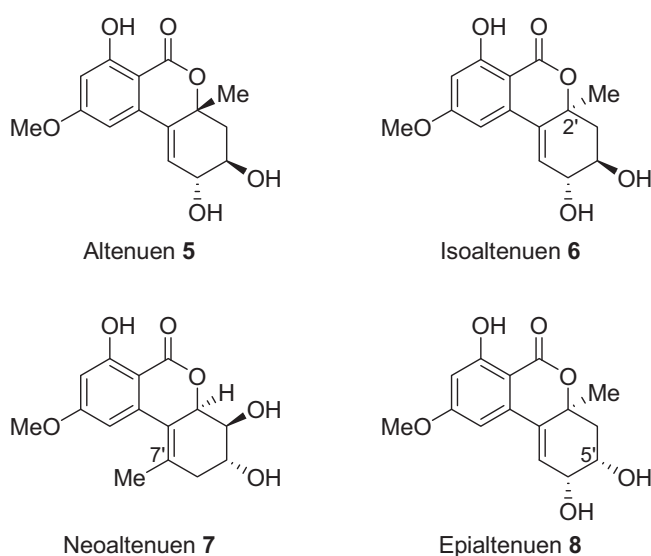


Abbildung 2: Altenuen (**5**) und seine Isomere

Zwei weitere Isomere wurden von Blunden und Turner 1994 aus *Alternaria alternata* isoliert.^[32] Das 5'-Epialtenuen (**8**) unterscheidet sich durch die Stereochemie an C-5' von Altenuen (**5**). Neoaltenuen (**7**) besitzt wie Altenuen (**5**) zwei vicinale trans-ständige Hydroxyfunktionen, die sich jedoch an C-3 und C-4 befinden und einen Methylsubstituenten, der in C-7' Position an der Doppelbindung positioniert ist (Abb. 2). Auch von diesen drei Isomeren ist die absolute Konfiguration nicht geklärt.

Vier weitere Derivate von Altenuen (**5**) und Isoaltenuen (**6**) wurden erst 2006 von Gloer *et al.* aus einem unidentifizierten Wasserpilz, der zur Familie der *Tubeufiaceae* gehört, isoliert.^[33] Die Strukturen der vier Substrate (Abb. 3) wurden durch spektroskopische Methoden und Vergleich mit der Struktur von Altenuen (**5**) und Isoaltenuen (**6**) aufgeklärt. Allerdings sind die Autoren hierbei von dem falschen Enantiomer des Altenuens (**5**) ausgegangen. Einige der Strukturen konnten mit der vorliegenden Arbeit korrigiert werden (s. Abschnitt 4.7.3).