

1. Kurzzusammenfassung

Weltweit sind Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* auf Nutzpflanzen nachzuweisen und tragen auf diesen zum Verderben der Früchte und Pflanzen bei.^[1] Diese Schimmelpilze sind in der Lage, eine ganze Reihe an Mykotoxinen zu produzieren. Welche gesundheitlichen Gefahren dabei von diesen Mykotoxinen ausgehen lässt sich zurzeit nicht abschließend beurteilen.^[2, 3] Um ausreichend Material für toxikologische Untersuchungen zu bekommen, ist das Interesse an einem totalsynthetischen Zugang zu diesen Mykotoxinen groß. Auch für die Pharmazie bietet die Totalsynthese dieser Stoffe Vorteile, denn einige *Alternaria*-Toxine zeigen antibakterielle, anti-HIV-Aktivität^[4] zudem könnten sie in der Krebstherapie eingesetzt werden.^[5] Zu den bekanntesten Vertretern der *Alternaria*-Schimmelpilze gehören die Resorcylsäurelactone Alternariol (**1**) und Alternariolmethylether (**2**), zu denen bereits Totalsynthesen existieren.^[6] Eine weitere große aber bisher weniger gut erforschte Gruppe sind die Mykotoxine mit Perylenchinongrundgerüst.^[7]

Im Zuge dieser Arbeit wurden ausgehend von den Vorarbeiten von Pfaff^[8] Funktionalisierungsversuche an Perylenderivaten des Biphenyltyps durchgeführt. Ziel war es, die Substitutionsmuster von *Alternaria*-Toxinen, beispielsweise des Altertoxins I (**9**), in das Grundgerüst einzuführen. Zudem konnten einige Synthesen optimiert und Probleme mit der Löslichkeit verschiedener Substrate verbessert werden.

Des Weiteren wurden verschiedene Synthesestrategien zum Aufbau vorfunktionalisierter Tetralon-Bausteine für die Perylenchinonsynthese untersucht. Ausgehend von Bromanisol (**69**) und Bernsteinsäurederivaten war es gelungen, ein geeignetes Tetralon darzustellen, mit dem erste Kupplungsversuche durchgeführt wurden.

2. Einleitung

2.1. Definition von Schimmelpilzen

Die Bezeichnung „Schimmelpilz“ lässt sich nicht genau wissenschaftlich definieren, da der Begriff historisch gewachsen ist. Umgangssprachlich werden unter dem Begriff „Schimmelpilze“ aber jene Pilze zusammengefasst, die durch die Bildung asexueller Sporen charakterisiert sind. Als Nahrungsquelle nutzen sie abgestorbene organische Substanzen, wachsen also saprophytisch. Zudem handelt es sich bei ihnen ausschließlich um mehrzellige Pilze (Hyphenpilze). Weitere Kriterien, die in ihrer Gesamtheit den Begriff „Schimmelpilz“ definieren können, sind unter anderem ihr ubiquitäres Vorkommen (sie kommen weltweit in der Erde, der Luft und selbst im Wasser vor) und der für eine Art spezifische und umfangreiche Sekundärmetabolismus.^[9]

2.2. Schimmelpilzmetaboliten

Der Stoffwechsel der Schimmelpilze lässt sich in zwei Bereiche einteilen: einen Primär- und einen Sekundärmetabolismus. Der Primärstoffwechsel sichert das Überleben und sorgt für das Wachstum des Pilzes. Zu ihm gehören sowohl Prozesse, die für den Abbau komplexer Moleküle (Proteine, Kohlenhydrate, Fette) verantwortlich sind, als auch solche, die lebenswichtige Stoffe (Zucker, Aminosäuren, Malonyl-CoA, etc.) produzieren. Dieser Primärmetabolismus verläuft bei allen Pilzen in ähnlicher Weise. Im Gegensatz dazu zeigt der Sekundärstoffwechsel bei Schimmelpilzen individuelle Merkmale. Die hier produzierten Substanzen sind nicht essentiell für das Überleben des Schimmelpilzes, sondern sind eher die Folge eines „verschwenderischen“ Stoffwechsels. Das bedeutet, dass diese Metaboliten nur unter idealen Wachstumsbedingungen gebildet werden. Allerdings können beide Stoffwechselbereiche nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Ausgangsstoffe für den Sekundärmetabolismus sind häufig Endprodukte des Primärstoffwechsels, so beginnt zum Beispiel die Polyketidsynthese beim Malonyl-CoA. Sekundärmetabolite sind charakteristische Produkte eines Stammes, einer Art oder Gattung. Bekannt sind diverse Mykotoxine, zum Beispiel die hochtoxischen Aflatoxine oder die Mutterkorn-Alkaloide, aber auch Pharmazeutika wie die Penicillin.^[9]

Mykotoxine sind toxische Substanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht. Diese geringe Molekülgröße sorgt bei Exposition für das Ausbleiben einer direkten Immunreaktion bei Säugtieren und Menschen.^[11] Allerdings ist die genaue biologische Aufgabe der Mykotoxine bis heute nicht ausreichend geklärt. Bei der Besetzung neuer Lebensräume könnten sie dem Schimmelpilz durch die Abwehr anderer Mikroorganismen einen Vorteil verschaffen.^[10]

In der Europäischen Union lassen sich in etwa 20% der Getreideernte deutliche Mykotoxinnengen nachweisen. Prinzipiell gibt es drei Wege, über die Mykotoxine in Lebensmittel gelangen können:

- Primärkontamination: Schimmelbefall von Rohstoffen (z.B. Getreide)
- Sekundärkontamination: Schimmelbefall von lagernden und prozessierten Lebensmitteln
- „carry over“-Effekt: Nutztiere fressen verschimmelte Futtermittel und lagern die Toxine im Körper und in Organen ab (Toxinbelastung von beispielsweise Eiern, Milch und Fleisch)^[9]

Vergiftungen mit Mykotoxinen werden als Mykotoxikosen bezeichnet, wobei sich die Symptome abhängig vom Mykotoxintyp und dem Gesundheitszustand, Alter und Geschlecht des Betroffenen äußern.^[11]

Zu den am längsten bekannten Mykotoxikosen gehört der durch Mutterkorn-Alkaloide ausgelöste Ergotismus, welcher im Mittelalter unter dem Namen *St. Antonius-Feuer* bekannt war.^[12, 13] Allein in Frankreich fielen der Krankheit, die sich hier durch Anschwellen und Verlust von Armen und Beinen zeigte, Zehntausende zum Opfer. In Deutschland trat der Ergotismus etwa zur selben Zeit mit anderen Symptomen auf (hauptsächlich Delirien, Halluzinationen, Krämpfe und Durchfall).^[14] Dies zeigt deutlich die zuvor beschriebene Tatsache, dass die Mykotoxinproduktion der Pilze von den äußeren Bedingungen abhängig ist.

Auch heutzutage geht von den Mykotoxinen noch eine große Gefahr aus. Beispielhaft dafür ist die „Turkey-X-Disease“, an der etwa 100.000 Truthähne verendeten. Ursache dafür war mit Aflatoxinen kontaminiertes Tierfutter.^[12] Aflatoxin B₁ ist eines der stärksten bekannten Karzinogene und ist zudem akut toxisch.

2.3. Schimmelpilze der Gattung *Alternaria*

Von den Pilzen der Gattung *Alternaria* wurden etwa 300 Arten beschrieben. Sie gehören zu den Ascomyceten (Schlauchpilzen)^[9] und zählen zur Familie der Schwärzepilze.^[12] Viele der

Alternaria-Pilze befallen geschwächtes oder abgestorbenes Pflanzenmaterial. Allerdings können auch gesunde Pflanzen befallen werden. Zum Teil sind die Pilze auch Verursacher von Fäulnis an Nutzpflanzen wie Tomaten,^[15] Zitrusfrüchten,^[16] Weizen,^[17] Kartoffeln^[18] und Äpfeln.^[19] Zu den häufigsten Vertretern gehört *Alternaria alternata* (früher auch als *Alternaria tenuis* bezeichnet^[20])

Das optimale Wachstum erreicht *Alternaria alternata* bei etwa 25 °C, wobei sich der Temperaturbereich, in dem ein Wachstum zu beobachten ist, von –5 °C bis etwa 36 °C erstreckt.^[21] Somit ist es dem Schimmelpilz möglich auch gekühlte Lebensmittel zu befallen.

Um das mögliche Gefahrenpotenzial der *Alternaria*-Pilze auch unter dem Gesichtspunkt des Klimawandels zu beurteilen, wurde sowohl das Wachstum des Pilzes als auch die Mykotoxinproduktion bei reduzierter Wasserverfügbarkeit und erhöhter Temperatur untersucht. Studien konnten zeigen, dass das Wachstum der *Alternaria*-Pilze unter Wasser- und Temperaturstress verlangsamt wird. In den meisten Fällen bleibt dabei die Menge der produzierten Toxine gleich oder geht zurück. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass in manchen Fällen, wie beispielsweise bei *Alternaria tenuissima*, die Produktion von Alvertoxin II sogar zunimmt.^[22]

2.4. *Alternaria*-Mykotoxine und strukturverwandte Metabolite

Aus Extrakten der Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* wurden in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Sekundärmetabolite isoliert. Diese lassen sich auf zwei Arten unterteilen. Zum einen ist eine Einteilung in wirtsspezifische Toxine, zu denen Maculosin (**7**) gehört, und wirtsunspezifische Toxine, zu denen unter anderem Alternariol (AOH) (**1**), Tenuazonsäure (**5**) sowie die Alvertoxine I – III (**9**, **10** und **11**) gehören, möglich.^[23] Zum anderen besteht die Möglichkeit der Einteilung auf Grundlage der Struktur. So lassen sich hier die Perylenchinone (z.B. die Alvertoxine), die Benzopyrone beziehungsweise Resorcylsäurelactone [z.B. AOH (**1**)] oder die Tetramsäurederivate [z.B. die Tenazonsäure (**5**)] unterscheiden.^[21]

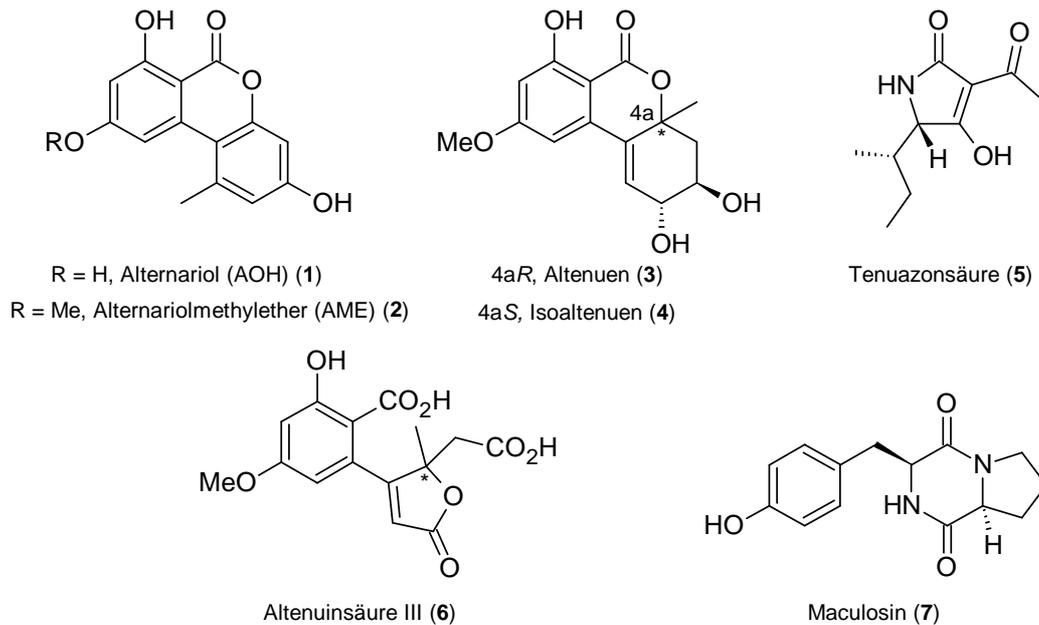


Abbildung 2-1: Ausgewählte *Alternaria*-Mykotoxine.

Die beiden häufigsten Resorcylsäurelactone AOH (1) und AME (2) konnten 1953 erstmals von *Raistrick et al.* aus *Alternaria alternata* isoliert^[24] und unter anderem 2005 von *Koch et al.* totalsynthetisch dargestellt werden.^[6] Auch für Altenuen (3) und Isoaltenuen (4) konnten bereits Totalsynthesen entwickelt werden.^[25]

Die Gruppe, deren Struktur das Perylenchinon (8) zugrunde liegt, lässt sich weiter unterteilen in die Perylenchinone vom Biphenyltyp und die vom Typ des Dihydroanthracens (Abbildung 2-2).^[26]

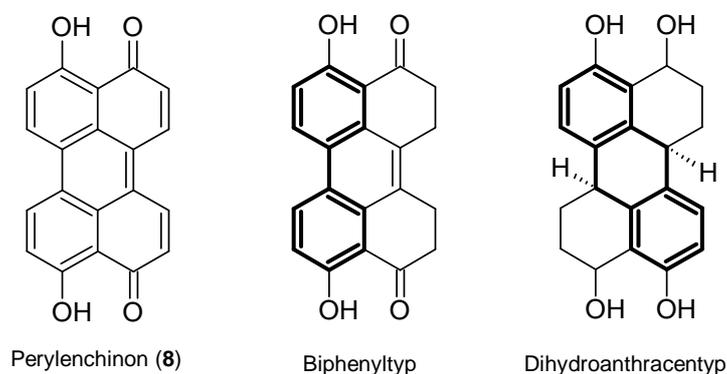


Abbildung 2-2: Struktur motive der Perylenchinon-Metaboliten.

Eine Auswahl an Schimmelpilz-Metaboliten mit Perylenchinon-Struktur wird in Abbildung 2-3 gezeigt. 1973 wurden die Alvertoxine (ATX) I und II (9 und 10) von *Pero et al.* ent-

deckt.^[7] Die Struktur von ATX I konnte 1983 zwar von *Okuno et al.*^[27] aufgeklärt werden, jedoch wurde sie zunächst einem neuen Metaboliten zugeordnet. Der korrekte Zusammenhang wurde kurze Zeit später hergestellt und damit konnte die Struktur von ATX I bestätigt werden. Kurz darauf gelang es ebenfalls, die Struktur von ATX II und III (**10** und **11**) aufzuklären.^[28] Erst vor kurzer Zeit wurde das Alvertoxin IV (ATX IV) (**21**) aus einer *Alternaria*-Kultur, die auf den Blättern von *Broussonetia papyrifera* gezüchtet wurde, isoliert und dessen Struktur aufgeklärt.^[5] Erwähnenswert ist, dass beim ATX IV eine der beiden Carbonylgruppen zum Alkohol reduziert ist. Ebenfalls aus *Alternaria alternata* extrahiert werden konnten die Alterlosine (ALS) I und II (**14** und **15**).^[29]

Aus dem morphologisch eng mit *Alternaria* verwandten Pilz *Stemphylium botryosum* konnten die Stemphylotoxine I – IV (STTX I – IV) (**12**, **10**, **13**, **17**) sowie das Stemphyperlylenol (STPOL) (**16**) gewonnen werden.^[30] Es ist anzumerken, dass es sich bei ATX II und STTX II um dieselbe Verbindung handelt.

Es darf angenommen werden, dass es noch weitere bisher unentdeckte Mykotoxine mit einem Perylenchinon-Grundkörper gibt. So wurden die beiden Perylenchinone **18** und **19** erst 2016 aus einem *Alternaria*-Extrakt isoliert.^[31]

Das weitgehend unfunktionalisierte Perylenchinon **20** kann als Grundgerüst der Perylenchinonmetaboliten vom Biphenyltyp angesehen werden. Es wurde aus dem Schlauchpilz *Bulgaria inquinans* isoliert.^[32]

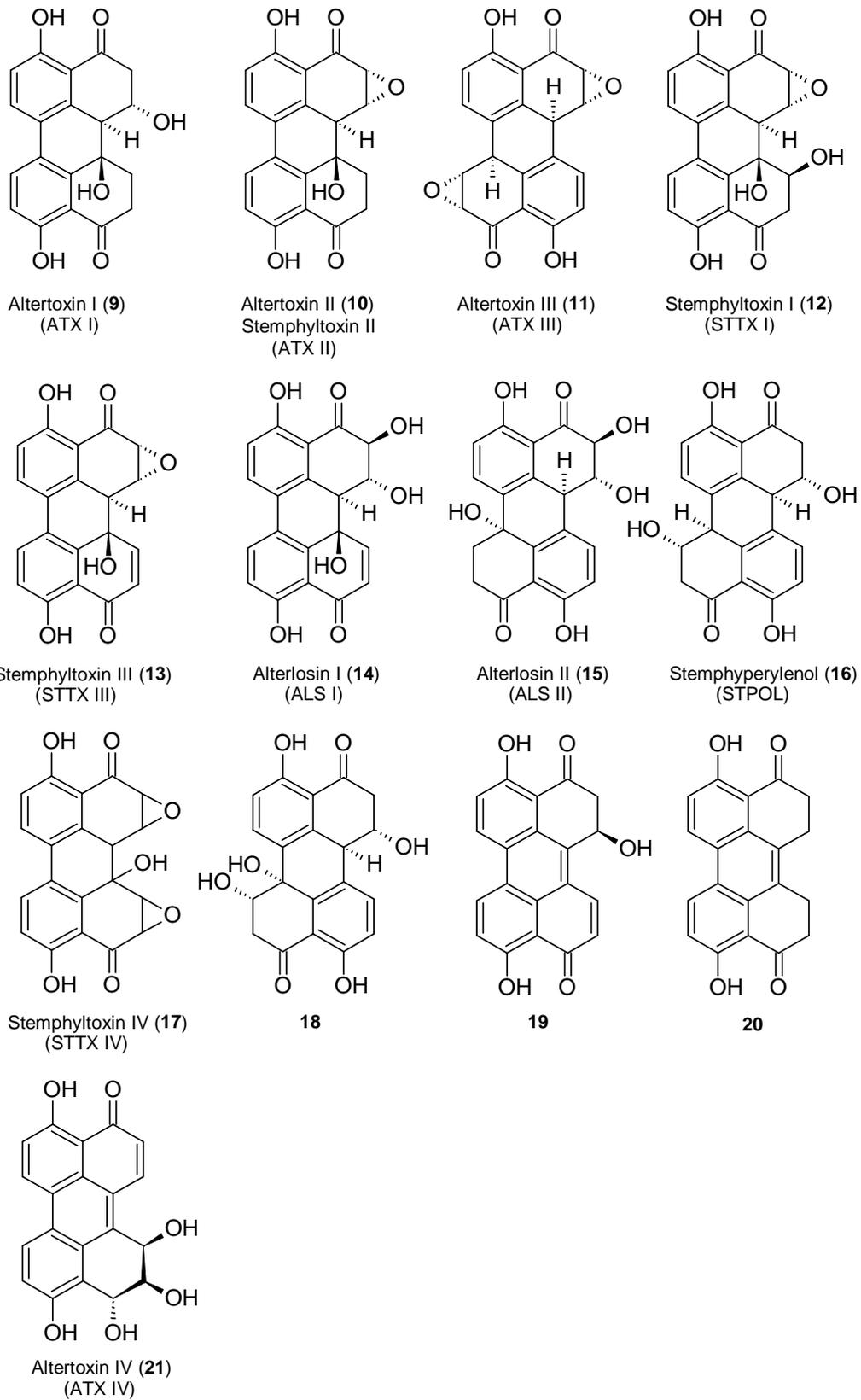


Abbildung 2-3: Ausgewählte Schimmelpilz-Metaboliten mit Perylenstruktur.

2.5. Toxikologie von *Alternaria*-Toxinen mit Perylenchinon-Grundgerüst

Die Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* produzieren mehr als 70 verschiedene Sekundärmetabolite. Jedoch konnten bisher nur einige dieser Metabolite chemisch charakterisiert und den Mykotoxinen zugeordnet werden. Auch wenn die *Alternaria*-Mykotoxine eine deutlich geringere Toxizität als die gut untersuchten Aflatoxine aufweisen, ist die von ihnen ausgehende Gefahr dennoch nicht zu unterschätzen. Da *Alternaria*-Toxine auf vielen Nutzpflanzen nachzuweisen sind, ist die Wahrscheinlichkeit einer Exposition mit diesen deutlich größer. Um daraus allerdings ein Gesundheitsrisiko abzuleiten und Grenzwerte festlegen zu können, liegen zu wenige toxikologische Daten vor. Zu dieser Einschätzung kamen 2003 das *Bundesamt für Risikobewertung* (BfR) und 2011 die *European Food Safety Authority* (EFSA).^[2, 3]

Daher sind *Alternaria*-Toxine in der Toxikologie von hohem Interesse und gehören zur Gruppe der sogenannten „emerging mycotoxins“. Dieser Begriff hat sich für Pilzmetabolite entwickelt, die nachgewiesene toxikologische Effekte haben, aber aufgrund der unzureichenden Datenlage zu Vorkommen und Toxizität noch nicht von Behörden mit Grenzwerten versehen wurden. *Alternaria*-Kontaminationen besitzen ein komplexes toxikologisches Profil, das wegen der hohen chemischen Vielfalt der produzierten Toxine bis heute längst nicht vollständig aufgeklärt ist.^[33]

Die am besten untersuchte Gruppe unter den *Alternaria*-Toxinen sind die Benzopyrone mit den beiden Hauptvertretern AOH (**1**) und AME (**2**). Im Gegensatz dazu sind die Perylenchinonderivate ATX I – III (**9**, **10** und **11**), die in geringerem Umfang von den Pilzen produziert werden, deutlich schlechter untersucht. Dies ist kritisch, da Studien gezeigt haben, dass die Alternatoxine starke Mutagene sind und bei Mäusen eine höhere akute Toxizität als AOH (**1**) und AME (**2**) zeigen.^[34] Weiterhin wurde nachgewiesen, dass ATX II (**10**) und STTX III (**12**) in der Lage sind, DNA-Strangbrüche zu verursachen. Erklärt wurde das mit der Anwesenheit der Epoxidfunktion, die wahrscheinlich mit der DNA reagieren kann.^[23, 33]

Auch wenn ATX II (**10**) zu den stärksten genotoxischen Inhaltsstoffen in Extrakten aus *Alternaria alternata*-kontaminierten Lebensmitteln gehört,^[35] konnte es bisher nicht in prozessierten Lebensmitteln nachgewiesen werden. Dies könnte auf die hohe Reaktivität gegenüber anderen Lebensmittelinhaltsstoffen zurückgeführt werden.^[33]

2.6. Biosynthese von *Alternaria*-Mykotoxinen mit Perylenchinonstruktur

Die Biosynthese der *Alternaria*-Mykotoxine mit Perylenchinon-Struktur ist bisher wenig erforscht. Durch ^{13}C -isotopenmarkierte Acetateinheiten konnten *Okuno et al.*^[27] nachweisen, dass Perylenchinone auf Polyketide zurückzuführen sind. In Abbildung 2-4 ist ein von *Okuno et al.* vorgeschlagener Biosynthesepfad mit Ergänzungen von *Chagas et al.*^[31] dargestellt.

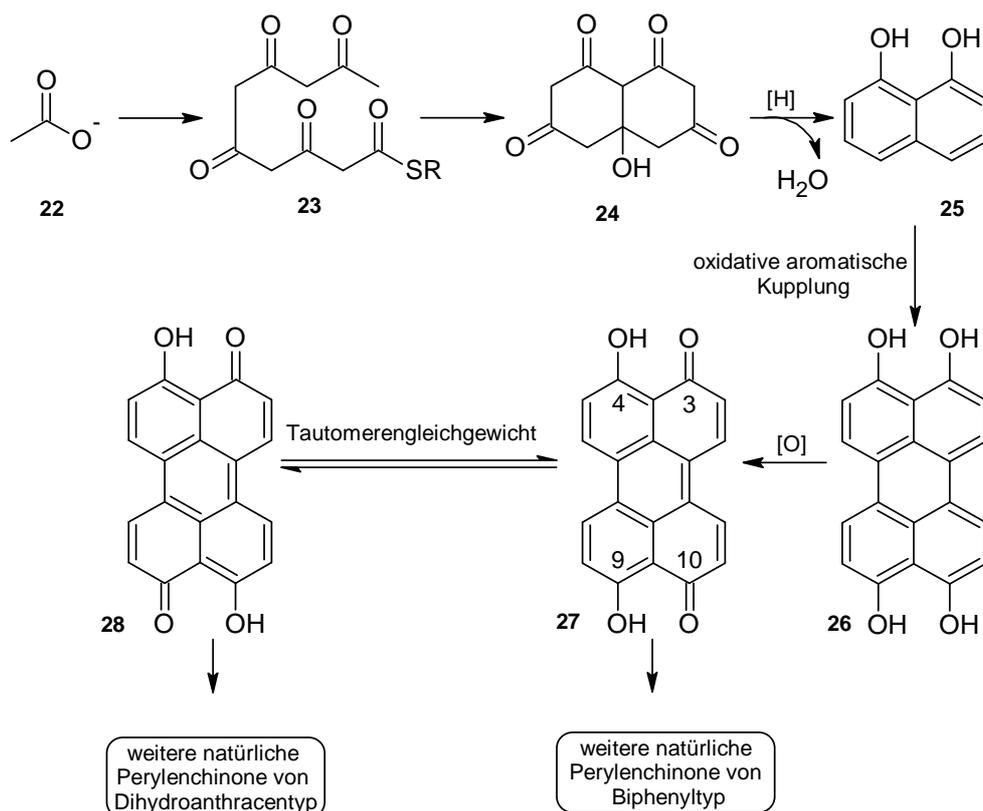


Abbildung 2-4: Von *Okuno et al.*^[27] vorgeschlagene Biosynthese von Perylenchinonmetaboliten mit Ergänzungen von *Chagas et al.*^[31]

Zunächst werden Acetateinheiten zum Pentaketid **24** zusammengesetzt. Eliminierung von Wasser führt unter gleichzeitiger Reduktion zum 1,8-Dihydroxynaphthalin **25**. Dieses dimerisiert nun oxidativ zum Vorläufer der Perylenchinone.

Untersuchungen zum Nachweis dafür, dass sich alle Sauerstoffatome von den Acetatprecursoren ableiten lassen, wurden nie durchgeführt. *Chagas et al.* vermuten auf Grundlage ihrer Studien, dass die Sauerstoffatome an den Ringpositionen 3, 4, 9 und 10 aus den Polyketidbausteinen stammen. Alle weiteren Sauerstoffatome werden demnach zu einem späteren Zeitpunkt durch Oxygenasen eingefügt. Des Weiteren stellten *Chagas et al.* die Hypothese auf, dass es bei der Biosynthese ein frühes Intermediat gibt, in dem zwei Tautomere im

Gleichgewicht miteinander stehen. Anschließend folgen dann spezielle Reaktionen wie Reduktionen, Hydroxylierungen und / oder Epoxidierungen an verschiedenen Positionen der Perylenchinone. In dieser Hypothese stellt das Tautomer **27** den Precursor für alle Perylenchinone vom Biphenyltyp und das Tautomer **28** entsprechend den Precursor für alle Derivate vom Dihydroanthracentyp dar.^[31]

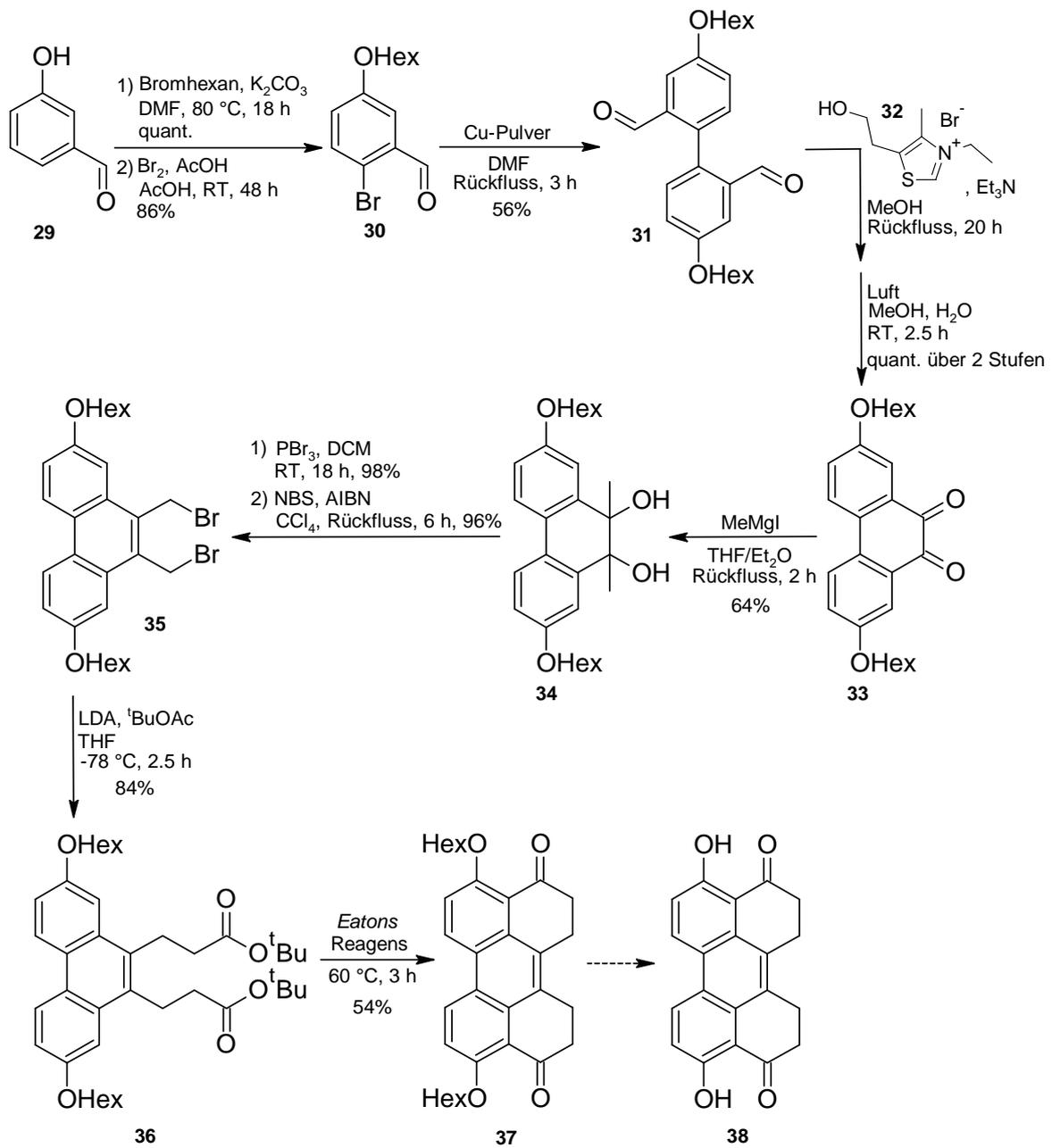
Zum jetzigen Zeitpunkt sind deutlich mehr Perylenchinone bekannt, die ein Biphenylgerüst besitzen als jene mit einem Dihydroanthracengerüst. Berechnungen von *Chagas* et al. ergaben, dass das Tautomer **27** etwas stabiler als das Tautomer **28** ist. Dieses Ergebnis könnte die natürlich vorkommende Ungleichverteilung der beiden Perylenchinontypen erklären.^[31]

2.7. Synthetische Vorarbeiten von *Pfaff* zu Perylenchinon-Metaboliten

Pfaff leistete bereits einige Vorarbeiten zur Synthese des Grundgerüsts der Perylenchinone vom Biphenyltyp. Zudem führte er verschiedene Versuche zur Funktionalisierung der Perylen- und Perylenchinongerüste durch.

In Schema **2-1** ist der Syntheseweg zur Darstellung des geschützten Perylenchinon-Grundgerüsts **37** von *Pfaff*^[8] gezeigt. Als Ausgangsstoff diente 3-Hydroxybenzaldehyd (**29**), wobei die Hydroxygruppe als Hexyloxygruppe geschützt und in *para*-Position zu dieser Gruppe bromiert wurde (Verbindung **30**). Eine anschließende *Ullmann*-Kupplung lieferte das Biaryl **31**. Der mittlere Ring des späteren Pentacyclus konnte durch eine Thiazoliumsalz-vermittelte Benzoinkondensation geschlossen werden. Die vollständige Oxidation zum Phenanthrenchinon **33** konnte durch starken Luftstrom erzielt werden. Es folgte die Umsetzung mit einem *Grignard*-Reagenz zum Diol **34**. Nach Dehydratisierung mit PBr_3 und radikalischer Bromierung mit *N*-Bromsuccinimid (NBS) wurde das Dibromid **35** erhalten. Dieses konnte mit dem Lithiumenolat von Essigsäure-*tert*-butylester zum Diester **36** umgesetzt werden. Als nächstes folgte der Schlüsselschritt in der Syntheseroute von *Pfaff*: der doppelte Ringschluss in einer *Eatons*-Reagenz-vermittelten *Friedel-Crafts*-artigen Reaktion. Das hierbei verwendete *Eatons*-Reagenz (eine Lösung aus Phosphorpentoxid in Methansulfonsäure) ließ sich besser handhaben und lieferte höhere Ausbeuten als die ebenfalls getestete Polyphosphorsäure. Das so erhaltene geschützte Perylenchinon **37** konnte in insgesamt neun Stufen mit einer Gesamtausbeute von 13% dargestellt werden.

Die Entschützung zum Perylenchinon **38** konnte allerdings nicht vollzogen werden, da entweder kein Umsatz oder die Zersetzung des Moleküls zu beobachten war.



Schema 2-1: Synthese des geschützten Perylenchinongrundgerüsts nach Pfaff.^[81]

3. Aufgabenstellung

Von Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria* geht ein praktisch nicht einschätzbares Risiko aus. Weltweit werden Früchte, Nutzpflanzen und Getreide von ihnen befallen. *Alternaria*-Schimmelpilze produzieren toxische Metaboliten, von denen nur wenige bereits untersucht sind. Eine große Gruppe von Sekundärmetaboliten, die aus *Alternaria* isoliert werden konnten, basiert auf einem Perylenchinon-Grundgerüst. Da die Pilze diese Metaboliten nur unter bestimmten Umgebungsbedingungen produzieren, ist ihre Extraktion schwierig und nur selten in größeren Mengen möglich. Daraus ergibt sich die Problematik, dass nicht immer eine hinreichend große Menge dieser Mykotoxine für toxikologische und biologische Untersuchungen vorhanden ist. Daher existiert ein starkes Interesse an der Totalsynthese der Perylenchinon-Metaboliten.

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit unterteilt sich in zwei Teilvorhaben:

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung von Synthesestrategien zur Funktionalisierung von Perylenchinon-Grundgerüsten vom Biphenyl-Typ. Basierend auf den Vorarbeiten von Pfaff^[8] zur Synthese des Grundgerüstes sollten Verfahren zu dessen Funktionalisierung entwickelt werden. Dies sollte an der einfacher zugänglichen, dem Zielmolekül ähnlichen Verbindung **39** realisiert werden (Abbildung 3-1).

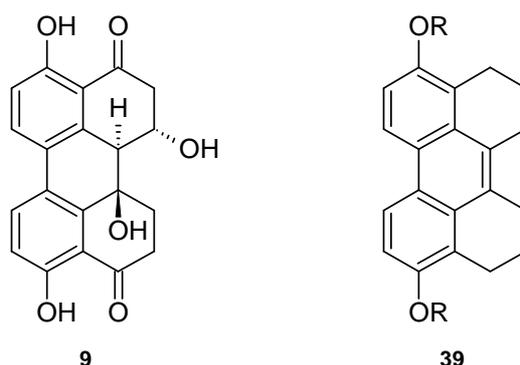


Abbildung 3-1: Alvertoxin I (**9**) und Testverbindung **39** zur Erprobung der Einführung von Substitutionsmustern von Perylenchinon-Naturstoffen.

Ferner sollen im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit Strategien zur Synthese bereits funktionalisierter Perylenchinon-Grundkörper erprobt werden. Ziel war es daher, passende Vorläufermoleküle darzustellen und Möglichkeiten zu finden, diese dann zu koppeln.