

Diss. ETH Nr. 10072

**Beiträge zur Strukturaufklärung
und Studien zur Biosynthese der Metaboliten
von *Periconia circinata***

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
Doktor der Naturwissenschaften
der

EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
ROLF BEAT BÄNTELI
dipl. Chem. ETH
geboren am 20. Februar 1963
von Buch am Irchel/ZH

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. D. Arigoni, Referent
PD. Dr. B. Jaun, Korreferent

Zürich 1993
Zentralstelle der Studentenschaft

ZUSAMMENFASSUNG

Der auf gewissen Hirsesorten parasitierende Pilz *Periconia circinata* produziert die beiden wirtsspezifischen Toxine Peritoxin A und Peritoxin B. Daneben können aus dem Kulturfiltrat auch die nicht toxischen Metaboliten Periconin A, Periconin B, Circinatin und Chlorcincinatin isoliert werden. Im Zusammenhang mit der Strukturbestimmung und der Aufklärung der Biosynthese dieser Metaboliten wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

1) Die Behandlung von Circinatin mit Brom lieferte das Bromolacton **32**, was belegte, dass Circinatin die Sequenz cycloLys-Asp-C₁₀ aufweist. Aus dieser Reaktion konnte auch das Bruchstück cycloLys-Asp isoliert werden. Zur Abklärung der Art der Verknüpfung der Lysineinheit mit der Asparaginsäure wurden die beiden isomeren Dipeptide (S,S)-**33** und (S,S)-**34** hergestellt und mit dem Abbauprodukt verglichen. Dies lieferte eine Bestätigung der Konstitution von Circinatin und führte zum Schluss, dass die beiden Aminosäuren in Circinatin die unnatürliche (R)-Konfiguration aufweisen.

2) Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration des chiralen Zentrums in der C₁₀-Einheit von Circinatin wurden die beiden möglichen diastereomeren Dimethylester (R,R,R)-**47** und (R,R,S)-**47** ausgehend von (R)-Lysinlactam, (R)-Asparaginsäure und den enantiomeren Halbestern (R)- und (S)-**46** hergestellt. Die Schlüsselschritte in der Synthese von (R)- und (S)-**46** bestehen in der Reduktion des Alkinons **70** mit dem chiralen Reduktionsmittel **69**, sowie in der Claisenumlagerung der Allylalkohole (R)-**63** und (R)-**61**. Die (R)-Konfiguration des in der asymmetrischen Reduktion erhaltenen Alkinols **62** wurde durch chemische Korrelation mit dem Naturstoff (R)-Norvalin bestimmt. Ein Vergleich der spektroskopischen Daten der Dimethylester (R,R,R)-**47** und (R,R,S)-**47** mit Circinatindimethylester belegte, dass Circinatin in der C₁₀-Einheit die (S)-Konfiguration aufweist. Die Totalsynthese des Naturstoffes Circinatin wurde durch eine enzymatische Hydrolyse des Diesters (R,R,S)-**47** vervollständigt.

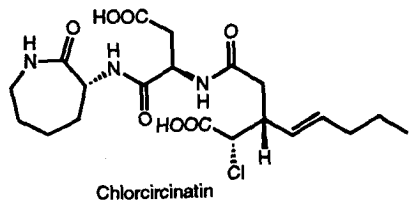
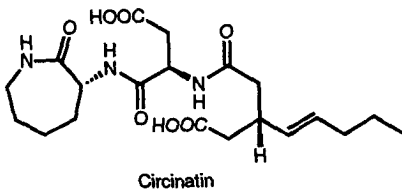
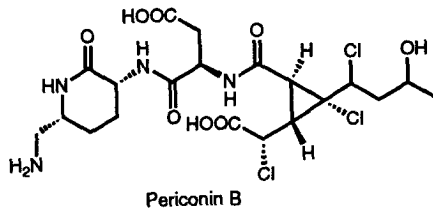
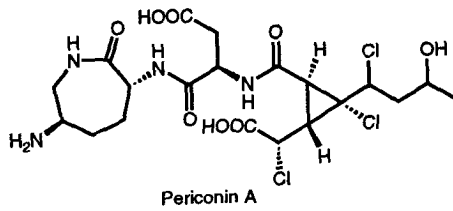
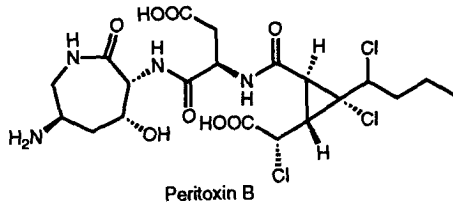
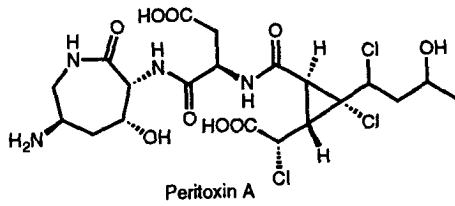
3) Reduktion von Chlorcincinatin mit Zink in Eisessig lieferte Circinatin. Die Reduktion in deuterierter Essigsäure lieferte eine deuterierte Probe von Circinatin. Ein NMR-spektroskopischer Vergleich erlaubte die Festlegung der

Lage des Chloratoms in Chlorcircinatin. Zur Bestimmung der Konfiguration am chlorierten Zentrum wurde die Verbindung in einer stereospezifischen Substitutionsreaktion in die Hydroxyverbindung **105** übergeführt. Der stereochemische Verlauf der Überführung von 2-Chlor-carbonsäuren in die entsprechenden Hydroxysäuren wurde am Beispiel der (S)-2-Chlor-propionsäure untersucht. Ein Abbau der Hydroxyverbindung **105** lieferte ein Lacton mit der Konstitutionsformel **89**. Aus einem Vergleich mit den synthetisierten Referenzverbindungen (\pm)-cis-**89** und (\pm)-trans-**89** folgte, dass das erhaltene Lacton trans-konfiguriert ist. Zusammen mit der bekannten absoluten Konfiguration am Pentyl-substituierten Zentrum erlaubte dies die Bestimmung der absoluten Konfiguration am Chlor-tragenden Zentrum.

4) Durch NMR-spektroskopische Messungen konnte die früher abgeleitete Konstitution von Peritoxin A bestätigt und die relative Konfiguration der Substituenten am Dreiring bestimmt werden.

5) Im Zusammenhang mit der Abklärung der Biosynthese der C₁₀-Polyketideinheit von Circinatin wurden [2-¹³C]-Diethylmalonat und [2-¹³C]-Natriumacetat an *P. circinata* verfüttert. Die Interpretation der erhaltenen Einbaumuster liess jedoch keinen Schluss bezüglich des Verlaufs einer präformierten C₈-Kette innerhalb der C₁₀-Einheit zu. Die Verfütterung der ²H- und ¹³C-markierten C₈-Carbonsäurederivate [2-²H]-**121**, [2-²H]-**122**, [1-¹³C]-**121** und [1-¹³C]-**122** führte in keinem Fall zu einem Einbau des intakten Vorläufers in Circinatin, vielmehr belegen die Resultate, dass die Verbindungen vor dem Einbau durch β -Oxidation zu Acetat abgebaut wurden. In Anlehnung an die Synthese von Circinatin wurden die Verbindungen **9** und **58** in dideuterierter Form hergestellt und an *P. circinata* verfüttert. Es konnte jedoch kein Einbau beobachtet werden.

6) Für die Biosynthese der Peritoxine wird ein plausibles mechanistisches Schema ausgehend von Circinatin postuliert. Um dieses zu überprüfen, wurde eine durch Verfütterung von [1-¹⁴C]-Natriumacetat an *P. circinata* gewonnene, mit ¹⁴C-indizierte Probe von Circinatin an *P. circinata* verfüttert. Anhand der gemessenen Radioaktivitäten der isolierten Proben von Peritoxin A und der Periconine konnte bestimmt werden, dass, falls ein Einbau stattgefunden hat, die spezifische Einbauraten kleiner als 0.1% ist. Wie immer bei negativen Resultaten, kann daraus kein verbindlicher Schluss gezogen werden.



SUMMARY

The fungus *Periconia circinata* which is causing disease symptoms on susceptible cultivars of sorghum produces the two host-specific toxins peritoxin A and peritoxin B, as well as the four non-toxic metabolites periconin A, periconin B, circinatin and chlorocircinatin. The following contributions to the structure elucidation and investigations on the biosynthesis of these metabolites were made:

1) Treating circinatin with bromine yielded a bromolacton **32**, the formation of which provided chemical proof for the proposed sequence cyclolys-asp-C₁₀ of circinatin. From this reaction mixture a second compound, the dipeptide cyclolys-asp, could be isolated. To determine the connectivity between the lysine moiety and the aspartic acid portion the isomeric dipeptides (S,S)-**33** and (S,S)-**34** were synthesised and compared with the cyclolys-asp fragment obtained before. This comparison confirmed the constitution of circinatin and revealed that the two amino acid constituents possess the unnatural (R)-configuration.

2) To determine the unknown configuration of the chiral centre in the C₁₀-moiety of circinatin the diastereomeric dimethylesters (R,R,R)-**47** and (R,R,S)-**47** were synthesised from (R)-lysinelactam, (R)-aspartic acid and the enantiomeric esters (R)- and (S)-**46** respectively. Key steps in the synthesis of the esters (R)- and (S)-**46** were the reduction of the alkinone **70** with the asymmetric reducing agent **69**, as well as the Claisen rearrangement of the allylic alcohols (R)-**63** and (R)-**61**. The (R)-configuration of the reduction product was deduced from a chemical correlation with (R)-norvaline. From the comparison of the spectroscopic data of the dimethylesters (R,R,R)-**47**, (R,R,S)-**47** with circinatin dimethylester it was concluded, that the chiral centre in the C₁₀-moiety of circinatin has the (S)-configuration. The total synthesis of circinatin was completed by way of an enzymatic hydrolysis of the diester (R,R,S)-**47**.

3) Chlorocircinatin could be reduced to circinatin by treatment with zinc in acetic acid. Performing this reduction in deuterated acetic acid provided a deuterated sample of circinatin, in which the position of the deuterium atom

could be determined by NMR-comparison. To determine the absolute configuration at the chlorinated centre, chlorocircinatin was transformed to the hydroxy compound **105** in a stereospecific reaction. The stereochemical course of the transformation of 2-chloro- into 2-hydroxy-carbonic acids was investigated for the case of the (S)-2-chloro-propanoic acid. Degradation of the hydroxy compound **105** provided a lactone. The trans stereochemistry of which was eventually established by comparison with synthetic (\pm)-cis-**89** and (\pm)-trans-**89**. This result together with the known absolute configuration at the pentyl substituted centre made it possible to determine the absolute configuration.

4) NMR-spectroscopic measurements confirmed the proposed formula of peritoxin A and revealed the relative stereochemistry of the substituents at the three membered ring.

5) To investigate the biosynthesis of the C₁₀ polyketide moiety of circinatin, feeding experiments using [2-¹³C]-diethyl malonate and [2-¹³C]-sodium acetate were performed with *P. circinata*. The incorporation pattern was not conclusive with respect to the question of the location of a preformed C₈ chain within the C₁₀ unit. None of the ²H- and ¹³C-labelled C₈-carbonic acid derivatives [2-²H]-**121**, [2-²H]-**122**, [1-¹³C]-**121** and [1-¹³C]-**122** was incorporated into circinatin as a complete entity. From the observed ¹³C-pattern it was concluded that the derivatives were degraded to acetate prior to incorporation. The dideuterated compounds **9** and **58** were prepared in analogy to the reaction sequence applied in the synthesis of circinatin and used in feeding experiments which, however, gave no incorporation into circinatin.

6) A plausible mechanistic scheme for the biosynthesis of the peritoxins starting from circinatin is offered. To test the precursor role of circinatin, a sample of ¹⁴C-labelled circinatin, obtained from an incorporation experiment with [1-¹⁴C]-sodium acetate, was fed to *P. circinata*. From radioactivity measurements on the isolated samples of peritoxin A and the periconins it was concluded that, if an incorporation of circinatin had taken place at all, the specific incorporation rate was below 0.1%. As usual in the case of negative results of incorporation studies no clearcut conclusions can be drawn.

