

Kurzfassung

Amatoxine sind toxische, bicyclische Octapeptide, die hauptsächlich in Pilzen der Gattung *Amanita*, *Galerina* und *Lepiota* vorkommen. Dabei ist der Grüne Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) der bekannteste Vertreter. Heutzutage sind neun natürliche Amatoxine bekannt. Sie besitzen alle ein bicyclisches Grundgerüst, das aus acht Aminosäuren besteht. Zusätzlich besitzen sie eine Thioether-Querverknüpfung, die auch als Tryptathionin bezeichnet wird.

Ihre Toxizität beruht auf ihrer Eigenschaft eukaryotische RNA Polymerase II, hauptsächlich in Hepatocyten, zu inhibieren und somit die Transkription zu unterbinden. Dies führt letztendlich zur Hemmung der Proteinbiosynthese und somit zum Zelltod. Aufgrund dieser Eigenschaft befinden sich Amatoxine im Fokus als Wirkstoffe für verschiedene Antikörper-Wirkstoff-Konjugate, die in der Antitumortherapie eingesetzt werden.

Die Kultivierung der Pilze der Gattung *Amanita* stellt meistens ein schwieriges Unterfangen dar, da sie in einer Ektomykorrhiza mit höheren Pflanzen leben und ein langsames Mycelienwachstum bei der Kultivierung besitzen. Ein effizienter synthetischer Zugang zu Amatoxinen ist somit essenziell für eine weitere erfolgreiche Etablierung und Untersuchung von Amatoxin-basierenden Antikörper-Wirkstoff-Konjugaten.

Der bekannteste Vertreter der Amatoxine, das α -Amanitin, wurde 1941 von Wieland und Hallermayer isoliert. Es stellt eines der synthetisch anspruchsvollsten Amatoxine dar, da es in seiner Aminosäuresequenz sowohl das zur Lactonbildung neigende (2*S*,3*R*,4*R*)-Dihydroxyisoleucin als auch das reaktive L-6-Hydroxytryptophan aufweist. Eine erfolgreiche Totalsynthese würde den Zugang zu allen anderen Amatoxinen liefern.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Totalsynthese des Pilztoxins α -Amanitin. Dazu wurden zunächst die hydroxylierten Aminosäuren L-6-Hydroxytryptophan und (2*S*,3*R*,4*R*)-Dihydroxyisoleucin synthetisiert. Anschließend wurden eine lineare und eine konvergente Synthesestrategie anhand eines vereinfachten α -Amanitin-Derivats untersucht. Dabei erwies sich nur die konvergente Strategie als realisierbar. Darauffolgend wurden drei Peptidfragmente sowohl auf Fest- als auch in Flüssigphase synthetisiert. Anschließend wurden die Fragmente in einer sogenannten [2+3+3]-Synthesestrategie in Flüssigphase gekuppelt, wobei die jeweilige Zahl für die Anzahl der Aminosäuren im entsprechenden Fragmente steht. Nach finaler Cyclisierung, Entschützung und Oxidation des Thioethers zum (*R*)-konfigurierten Sulfoxid wurden 1.8 mg des synthetischen α -Amanitins erhalten. Somit konnte die erste α -Amanitin-Synthese im Milligramm-Maßstab etabliert werden.

Das synthetische α -Amanitin wurde vollständig mittels NMR-Spektroskopie, HRMS, Co-Injektion und CD-Spektroskopie charakterisiert. Durch den Vergleich mit entsprechenden Referenzspektren und Referenzchromatogrammen des kommerziell erhältlichen natürlichen α -Amanitins, konnte die Struktur des synthetischen α -Amanitins einwandfrei bestätigt werden.

Abstract

Amatoxins are toxic, bicyclic octapeptides, which are mainly found in different genera of mushrooms, most notably the death cap (*Amanita phalloides*) and several other members of the genus *Amanita*, as well as *Galerina* and *Lepiota*. Today nine natural amatoxins are known, which have a similar structure. All of them contain eight amino acids arranged in a bicyclic motif, which is bridged by a thioether moiety. This thioether is also called tryptathionine.

The toxicity of the amatoxins is based on a strong and specific inhibition of RNA Polymerase II, mainly in hepatocytes. RNA Polymerase II is an enzyme involved in the synthesis of messenger RNA (mRNA), which is the template of transcription. Without this template the protein biosynthesis is disrupted, which leads in the end to cell death. Due to this property amatoxins are currently being investigated as a payload in new antibody-drug conjugates against various cancer cell lines.

Lethal *Amanita* species are usually very difficult to be cultured, since most species in this genus are involved in ectomycorrhizal associations with higher plants. Moreover, their mycelia grow extremely slowly on culture media. It is therefore essential to establish a robust total synthesis for amatoxins, to ensure further investigations and developments on amatoxin-based antibody-drug-conjugates.

The most prominent member of the amatoxins is α -amanitin, which was isolated by Wieland and Hallermayer in 1941. Synthetically it is one of the most ambitious amatoxin, since it contains in its sequence the amino acids (2*S*,3*R*,4*R*)-dihydroxyisoleucine, which tends to lactonize, and 6-hydroxytryptophan, which shows a high reactivity. Therefore, a successful total synthesis would give access to all members of the amatoxin family.

The present work describes the total synthesis of the mushroom toxin α -amanitin. Initially, the hydroxylated amino acids L-6-hydroxytryptophan and (2*S*,3*R*,4*R*)-dihydroxyisoleucine were synthesized. Subsequently, a linear and convergent synthesis strategy were investigated using a simplified α -amanitin-derivative, whereby only the convergent strategy was achievable. Following this, three peptide fragments were synthesized in solution and on solid phase. Subsequently, the fragments were coupled in solution phase using the so called [2+3+3]-strategy, whereby each number refers to the number of amino acids in each fragment. After final cyclization, deprotection and chiral oxidation of the thioether to the (*R*)-configured sulfoxide, 1.8 mg of α -amanitin were obtained. Thus, the first α -amanitin synthesis on a milligram scale was established.

The synthetic α -amanitin was completely characterized using NMR-data, HRMS, Co-injection and CD-spectroscopy. Comparing the reference spectra and reference chromatograms from the natural occurring α -amanitin with the synthetic one, the structure of synthetic α -amanitin was undoubtedly proven.