

Isolierung, Chemie und Biochemie von Ptaquilosid, einem Carcinogen des Adlerfarns

Kiyoyuki Yamada,* Makoto Ojika und Hideo Kigoshi

Adlerfarn (*Pteridium aquilinum*) ist eine toxische aber dennoch eßbare Pflanze, die in vielen Teilen der Erde weitverbreitet ist. Die Carcinogenität des Adlerfarns ist ein seit langem bekanntes Problem. Dieser Aufsatz beschreibt die umfangreichen Untersuchungen an einem Adlerfarn-Carcinogen. Durch eine neue und milde Extraktionsmethode in Verbindung mit einem Carcinogenitäts-Test an Ratten als biologische Nachweismethode wurde Ptaquilosid entdeckt. Die biologische Aktivität dieses lange gesuchten Carcinogens wird beschrieben. Das chemisch aus Ptaquilosid erhaltene, primäre Carcinogen ist so reaktiv, daß es nicht nur wirkungsvoll schwefelhaltige Aminosäuren und DNA alkyliert, sondern auch DNA spaltet. Der molekulare Mechanismus dieser DNA-Spaltung konnte aufgeklärt werden. Darüber hinaus wurden beide Enantiomere sowie nichtnatür-

liche Analoga des primären Carcinogens hergestellt und die DNA-Spaltungs-Aktivitäten ermittelt. Weitere, mit dem Adlerfarn-Carcinogen im Zusammenhang stehende Untersuchungen werden ebenfalls kurz erörtert.

Stichwörter: Bioorganische Chemie • DNA-Spaltung • Glycoside • Strukturaufklärung • Terpenoide

1. Einleitung

Adlerfarn, *Pteridium aquilinum* (L. Kuhn), ist überall auf der Erde weit verbreitet und dient in Japan und einigen anderen Ländern als Nahrungsmittel. Die toxische Wirkung auf Lebewesen ist seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt. Tiere, die Adlerfarn gefressen hatten, zeigten das als Vieh-Farnvergiftung bekannte Krankheitsbild.^[1-3] Das Hauptmerkmal ist dabei die Abnahme der Knochenmark-Aktivität, wodurch schwere Leukopenie, Thrombozytopenie und das hämorrhagische Syndrom verursacht werden. Der erste Hinweis auf die Carcinogenität von Adlerfarn kam von Rosenberger. Er beschrieb Veränderungen in der Art von Polypentumoren in der Harnblasenschleimhaut bei gleichzeitiger Hämaturie bei Tieren, die Adlerfarn zu sich genommen hatten.^[4] Einen eindeutigen Nachweis für die Carcinogenität lieferte Evans. Er zeigte, daß Ratten, die mit Adlerfarn-haltigem Futter gefüttert wurden, multiple Darm-Adenocarcinome entwickelten.^[5] Zahlreiche Forschungsgruppen bestätigten Evans Ergebnisse. Des weiteren zeigte sich, daß die Carcinogenität von jungem Adlerfarn (Abb. 1)



Abb. 1. Junger, als Nahrungsmittel genutzter Adlerfarn.

stärker als die des ausgewachsenen Farns (Abb. 2) ist und daß sie sich erheblich verringert, wenn der Farn mit heißem Natriumhydrogencarbonat oder mit Wasser, das Holzasche enthält, behandelt wird.^[2] Obwohl viele Arbeitsgruppen große Anstrengungen unternahmen, um ein Adlerfarn-Carcinogen zu finden, gelang dessen Isolierung nicht. Sie wird durch zwei wichtige Faktoren erschwert: a) die Instabilität des Carcinogens und b) die Art des Nachweis-Systems; so wurden zahlreiche Kurzzeit-Tests für einen biologischen Nachweis erfolglos angewendet.^[2, 6]

[*] Prof. K. Yamada, Prof. M. Ojika, Prof. H. Kigoshi
Department of Chemistry, Faculty of Science
Nagoya University
Chikusa, Nagoya 464 (Japan)
Fax: (+81) 52-789-5041
E-mail: yamada@chem3.chem.nagoya-u.ac.jp



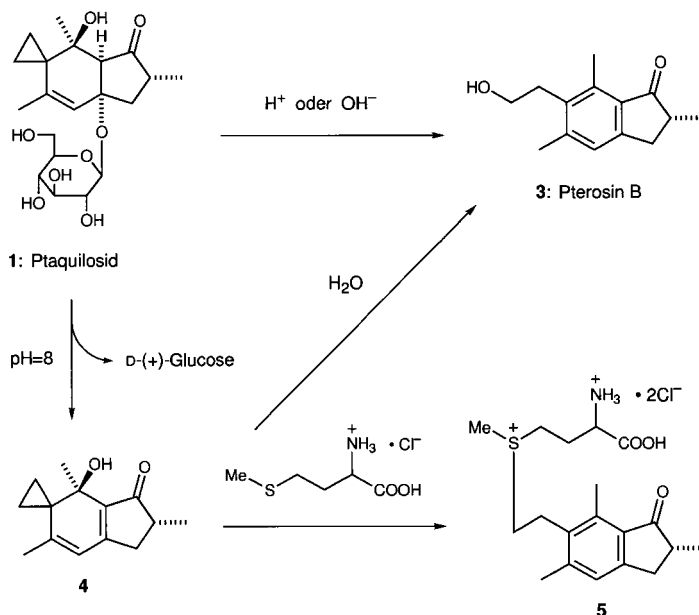
Abb. 2. Ausgewachsener Adlerfarn.

2. Isolierung und biologische Aktivität von Ptaquilosid, einem Adlerfarn-Carcinogen

1978 berichtete Hirono, daß ein wäßriger Extrakt, der durch dreiminütige Behandlung von Adlerfarn mit kochendem Wasser erhalten wurde, auf Ratten carcinogen wirkt.^[7] Dieses Ergebnis weckte unser Interesse, da es eindeutig zeigt, daß das Adlerfarn-Carcinogen mit kochendem Wasser extrahiert werden kann. Wir begannen daher, den wäßrigen Extrakt zu fraktionieren. Dabei verwendeten wir den Carcinogenitäts-Test an Ratten, obwohl dieser große Probenmengen erfordert und sehr viel Zeit beansprucht. Nach fünf Trennschritten, in denen Lösungsmittelverteilungen (Wasser/Butanol) und neutrale Ionenaustauscher (Amberlit XAD-2

und Toyopearl HW-40) eingesetzt wurden, konnte eine stark carcinogene Fraktion erhalten werden. Diese Fraktion wurde durch dreimalige Wiederholung von normaler und Reversed-phase-Chromatographie noch weiter aufgetrennt. Dadurch gelang die Isolierung einer instabilen, neuen Verbindung, die als Ptaquilosid **1** (Schema 1) bezeichnet wurde und sich später als das lange gesuchte Adlerfarn-Carcinogen erwies.^[8, 9]

Das durch den biologischen Test gesteuerte Fraktionierungsverfahren lieferte **1** nur in geringen Ausbeuten (0.2 g aus



Schema 1. Reaktionen von Ptaquilosid **1** und des primären Carcinogens **4**.

Kiyoyuki Yamada, Jahrgang 1933, promovierte 1962 an der Nagoya University bei Y. Hirata. Von 1962 bis 1964 war er als Postdoktorand an der Stanford University bei E. E. van Tamelen. Seit 1961 gehört er dem Lehrkörper der Nagoya University an und wurde dort 1966 zum Associate Professor und 1979 zum Professor ernannt. Seine wissenschaftlichen Interessen liegen auf dem Gebiet der Naturstoffchemie und der bioorganischen Chemie. 1996 erhielt er den Chemical Society of Japan Award. Seit 1997 ist er emeritierter Professor an der Nagoya University.



K. Yamada



M. Ojika



H. Kigoshi

Makoto Ojika, Jahrgang 1957, promovierte 1987 an der Nagoya University bei K. Yamada. Von 1988 bis 1989 war er Postdoktorand im Arbeitskreis von K. Nakanishi an der Columbia University. 1982 wurde er zum Assistant Professor der wissenschaftlichen Fakultät der Nagoya University ernannt. 1995 wechselte er an die agrarwissenschaftliche Fakultät derselben Universität und wurde dort Associate Professor. Seine wissenschaftlichen Interessen liegen in der Isolierung, der Strukturaufklärung und den biologischen Wirkungen bioaktiver Naturstoffe, wobei ihn besonders Enzyminhibitoren interessieren. Er erhielt 1990 den Chemical Society of Japan Award for Young Chemists.

Hideo Kigoshi, geboren 1959 in Japan, promovierte 1989 bei K. Yamada an der Nagoya University. Von 1990 bis 1991 war er als Postdoktorand bei E. J. Corey an der Harvard University. 1984 wurde er Assistant Professor an der Nagoya University und 1994 Associate Professor. Seine wissenschaftlichen Interessen liegen auf dem Gebiet der Chemie bioaktiver Naturstoffe. 1993 erhielt er den Chemical Society of Japan Award for Young Chemists.

1 kg Farn-Pulver), da sich der größte Teil bei der Fraktionierung zersetzt. Durch eine verbesserte Extraktionsmethode ließ sich **1** in erheblich höherer Ausbeute (1 g aus 1 kg Farn-Pulver) isolieren.^[10] Die Entwicklung eines neuen und milden Extraktionsverfahrens in Verbindung mit der Anwendung des Carcinogenitäts-Test an Ratten als biologische Nachweismethode lieferte den Schlüssel für die erfolgreiche Isolierung von **1**. Im selben Jahr (1983), in dem wir Ptaquilosid isolierten, berichtete auch van der Hoeven über die Isolierung und Gesamtstruktur einer als Aquilid A bezeichneten, mutagenen Verbindung aus Adlerfarn, die mit Ptaquilosid **1** identisch zu sein schien.^[11]

Die biologische Aktivität von Ptaquilosid **1** wurde detailliert bestimmt. So wurde eindeutig nachgewiesen, daß **1** carcinogen ist; bei allen Ratten, denen Futter, das **1** enthielt, verabreicht wurde, entwickelten sich Tumore im Darm und in der Harnblase, den Zielorganen der Adlerfarn-Carcinogenität.^[12, 13] Des weiteren wurde gezeigt, daß **1** die Vieh-Farnvergiftung auslöst.^[14] Ptaquilosid **1** verursacht außerdem die „bright blindness“, die progressive Retinal-Degeneration (PRD), bei Schafen.^[15]

3. Struktur und Reaktivität von Ptaquilosid

3.1. Struktur

Ptaquilosid **1** ist eine farblose, amorphe Verbindung der Summenformel $C_{20}H_{30}O_8$,^[8, 16] die in wäßriger Lösung allmählich in Pterisin B **3**^[17] und D-Glucose umgewandelt wird. Die 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren deuten auf die Teilstrukturen A–G (Abb. 3) hin, in denen alle Kohlenstoff-Atome des

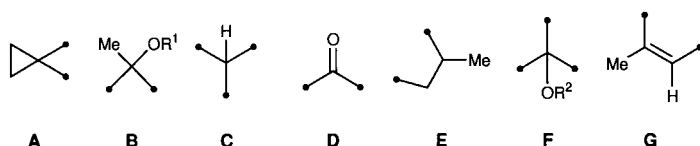
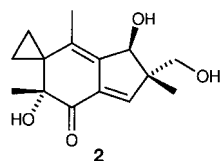


Abb. 3. Teilstrukturen von Ptaquilosid **1**.

Aglycon-Anteils von **1** enthalten sind. Die Korrelation dieser Teilstrukturen war mit den in den achtziger Jahren zur Verfügung stehenden NMR-spektroskopischen Methoden jedoch schwierig, so daß die Gesamtstruktur erst mit Hilfe von LSPD-Experimenten^[18] (LSPD = long-range selective proton decoupling) aufgeklärt wurde.^[8, 16] Die absolute Stereochemie von **1** wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse von Ptaquilosidtetraacetat ermittelt.^[19] Dabei zeigte sich, daß Ptaquilosid **1** ein Norsesquiterpenglucosid des Illudan-Typs ist und somit einer neuartigen Klasse von Carcinogenen angehört. In den siebziger Jahren wurden zahlreiche Indanon-artige Sesquiterpene, wie Pterisin B **3** als charakteristische Bestandteile des Adlerfarns isoliert.^[20] Diese entstehen wahrscheinlich durch Biosynthese aus Illudan-Vorstufen wie dem Ptaquilosid **1**. Sesquiterpene des Illudan-Typs kommen in der Natur selten vor; das als toxische Verbindung



eines biolumineszierenden Pilzes isolierte Illudin S **2** ist ein typisches Beispiel dieser Stoffklasse.^[21] Bemerkenswert ist, daß Illudin S **2** antitumorwirksam ist, während Ptaquilosid **1** stark cytotoxisch ist.

3.2. Reaktivität

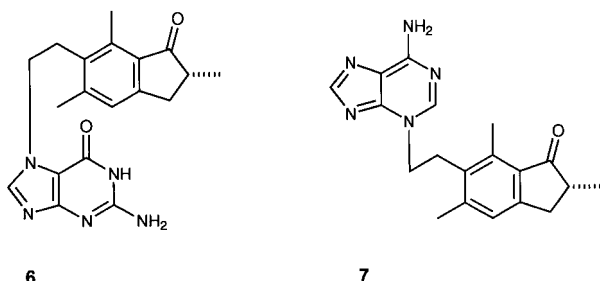
Wie bereits erwähnt, ist Ptaquilosid **1** eine instabile Verbindung. Unter der Einwirkung von Säuren und Basen entstehen leicht stabile aromatische Verbindungen mit Indanon-Gerüst wie Pterisin B **3** (siehe Schema 1).^[16] In einer schwach alkalischen, wäßrigen Lösung (pH = 8) wird Ptaquilosid **1** unter Freisetzung von D-Glucose glatt in das instabile Dienon **4** (siehe Schema 1) überführt. Dieses reagiert unter alkalischen Bedingungen langsam und unter schwach sauren Bedingungen rasch zu Pterisin B **3**. Das Dienon **4** ist ein starkes Elektrophil und wirkt gegenüber zahlreichen Nucleophilen wie Aminosäuren als starkes Alkylierungsmittel. Es wird vermutet, daß die Heteroatome der Aminosäuren (Sauerstoff, Stickstoff und Schwefel) durch **4** alkyliert werden. So wird bei Reaktion mit Methionin tatsächlich das Schwefelatom der Aminosäure selektiv alkyliert und es entsteht das S-Alkylmethionin **5**. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß das toxische Dienon **4** durch eine schwefelhaltige Aminosäure effektiv in eine nichttoxische Indanon-Verbindung überführt wird. Da Indanon-Verbindungen wie Pterisin B nicht carcinogen sind,^[20] können schwefelhaltige Aminosäuren somit möglicherweise als Entgiftungsmittel für Ptaquilosid **1** eingesetzt werden.

4. Schädigung der DNA durch das primäre Carcinogen

Die kovalente Bindung carcinogener Alkylierungsmittel an die DNA ist ein wichtiger Bestandteil des Wirkmechanismus dieser Substanzen, und es wird allgemein vermutet, daß durch derartige chemische Modifikationen (Schädigungen) der DNA die chemische Carcinogenese ausgelöst wird.^[22] Carcinogene werden unterteilt in solche, die direkt, ohne enzymatische Aktivierung mit der DNA und/oder Proteinen reagieren, und solche, die metabolisch aktiviert werden müssen, um reaktive Elektrophile, sogenannte primäre Carcinogene, zu erzeugen, die dann mit der DNA und/oder Proteinen reagieren.^[22, 23] Die chemischen Eigenschaften von Ptaquilosid **1** weisen darauf hin, daß **1** als direkt wirkendes Carcinogen einzustufen ist und daß das Dienon **4** das primäre Carcinogen, die aktivierte Form von **1**, ist. Wenn man bedenkt, daß die meisten natürlich vorkommenden Carcinogene metabolisch aktiviert werden, um primäre Carcinogene zu bilden, so ist Ptaquilosid ungewöhnlich, da es das primäre Carcinogen **4** ohne metabolische Aktivierung erzeugt. Bei Carcinogenen, die eine metabolische Aktivierung erfordern, ist es im allgemeinen schwierig, für chemische Untersuchungen notwendige Mengen der primären Carcinogene zu erhalten. Es war somit von Vorteil, daß im Falle des Adlerfarn-Carcinogens **1** die für bioorganische Untersuchungen benötigte Menge des primären Carcinogens **4** einfach verfügbar war.

4.1. DNA-Alkylierung durch das primäre Carcinogen^[24]

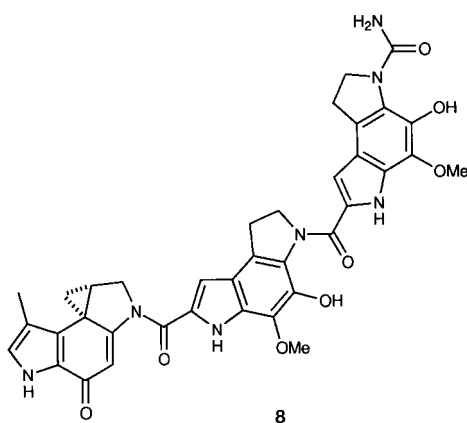
Bei der Reaktion von Lachssperma-DNA mit dem primären Carcinogen **4** unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.5, 37 °C) wurde die DNA modifiziert. Die thermische Hydrolyse der modifizierten DNA (90 °C, 30 min) lieferte *N*-7-Alkylguanin **6** (1.8% bezogen auf ein Nucleotid in DNA) und *N*-3-Alkyladenin **7** (0.61%). Diese Ergebnisse zeigen,



daß die thermisch instabilen Stellen auf der DNA durch Alkylierung mit **4** erzeugt wurden.

4.2. DNA-Spaltung durch das primäre Carcinogen^[24, 25]

Die DNA-Spaltung durch das primäre Carcinogen **4** wurde anhand der topologischen Veränderungen im Plasmid pBR322 DNA ermittelt. Mit 3'- und 5'-³²P-markierten DNA-Fragmenten konnte gezeigt werden, daß **4** die DNA an Adenin- und Guanin-Resten spaltet. Die Selektivität des DNA-Strangbruchs hängt dabei von der Inkubationszeit ab. So wurde bei Inkubation einer DNA-Probe mit **4** bei 37 °C über 25 Stunden hauptsächlich eine Spaltung der DNA an den Adenin-Resten beobachtet, während bei einer Inkubationszeit von 130 Stunden zusätzlich Schnitte an den Guanin-Stellen auftraten. Das entscheidende Strukturmerkmal des Antitumor-Wirkstoffs CC-1065 **8**^[26] ist der Cyclopropanring



in Konjugation mit der Dienonfunktion. Obwohl angenommen wird, daß die DNA-Spaltungen über einen ähnlichen Mechanismus ablaufen, existieren doch signifikante Unterschiede zwischen den durch **4** und den durch CC-1065 **8**

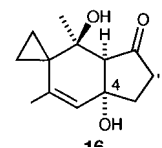
ausgelösten DNA-Schädigungen.^[27] So bildet **4** sowohl mit Adenin- als auch mit Guanin-Resten Addukte, wohingegen **8** nur mit Adenin-Resten reagiert. Des weiteren bewirkt **4** unter physiologischen Bedingungen die spontane Spaltung der DNA an den Adenin-Positionen, während mit **8** hierzu höhere Temperaturen (> 70 °C) nötig sind.

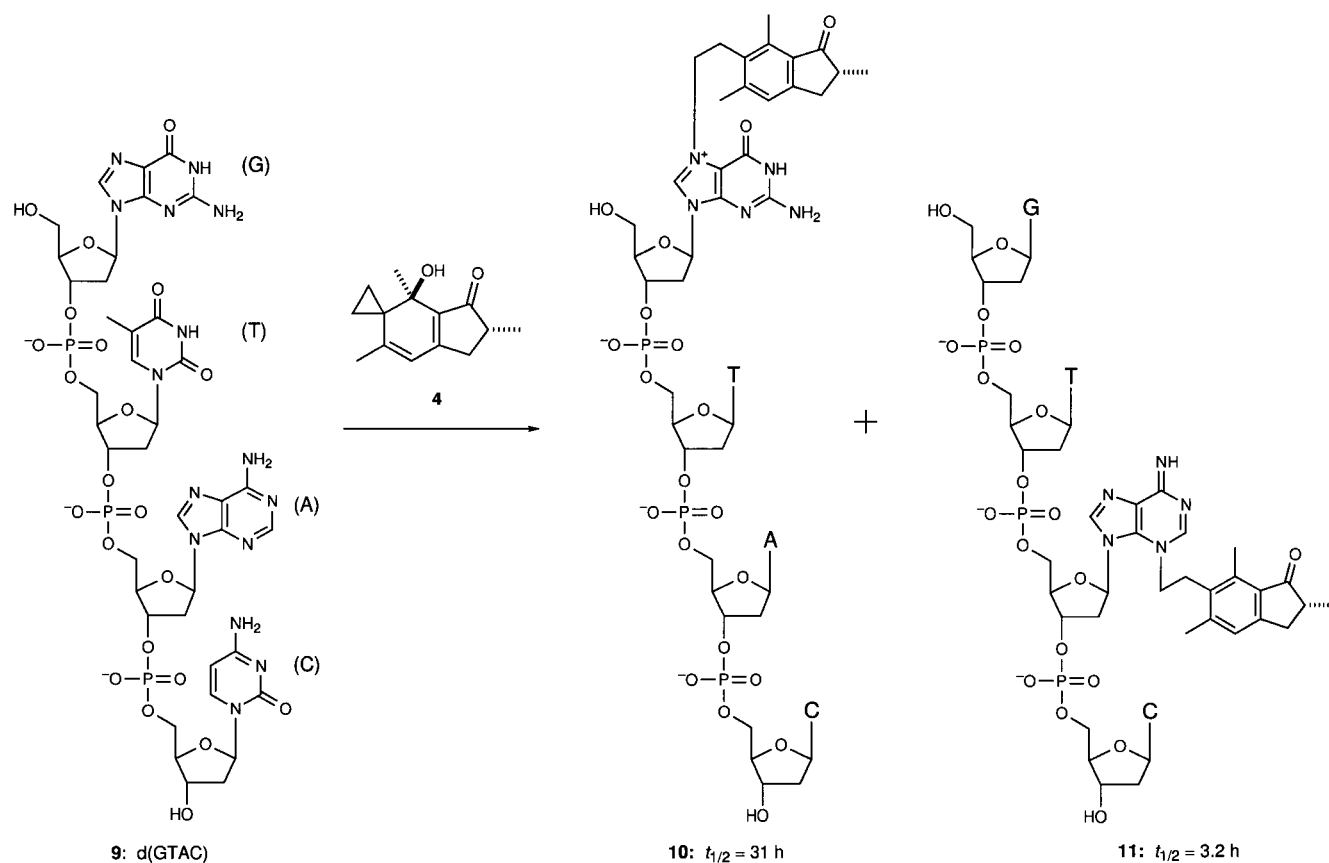
4.3. Reaktion des Desoxytetranucleotids d(GTAC) mit dem primären Carcinogen: molekularer Mechanismus der DNA-Spaltung^[25]

Für die Untersuchung des molekularen Mechanismus der DNA-Spaltung diente das Desoxytetranucleotid d(GTAC) **9** als DNA-Modellsubstrat. Die Umsetzung von **9** mit dem primären Carcinogen **4** (pH = 7.5, 0 °C, 15 h) lieferte die zwei instabilen Addukte **10** und **11** (Schema 2). Das am Adenin alkylierte Addukt **11** war etwa 10mal weniger stabil als das am Guanin alkylierte Addukt **10** ($t_{1/2}$ = 3.2 bzw. 31 h, pH = 7.5, 32 °C^[28]). Das Addukt **11** wandelte sich unter Freisetzung von *N*-3-Alkyladenin **7** in d(GT-Desoxyribose-C) **12** um (Schema 3). Anschließend wurde unter physiologischen Bedingungen (pH = 7.5, 32 °C, 29 d) der DNA-Strang gespalten, wobei Desoxycytidin-5'-phosphat **14** und ein Gemisch der Aldehyde **13** entstanden. Letztere wandelten sich durch Michael-Addition von Wasser nach und nach in ein Gemisch der Alkohole **15** um. Der molekulare Mechanismus der DNA-Spaltung durch **4** läßt sich daher wie folgt veranschaulichen: Das primäre Carcinogen **4** reagiert mit DNA zu *N*-3-Adenin- und *N*-7-Guanin-Addukten. Die anschließende spontane Spaltung der *N*-Glycosidbindung erfolgt bevorzugt an den modifizierten Adenin-Resten, wobei basenfreie Positionen entstehen, an denen das Desoxyribose-Rückgrat durch β -Eliminierung gespalten wird.

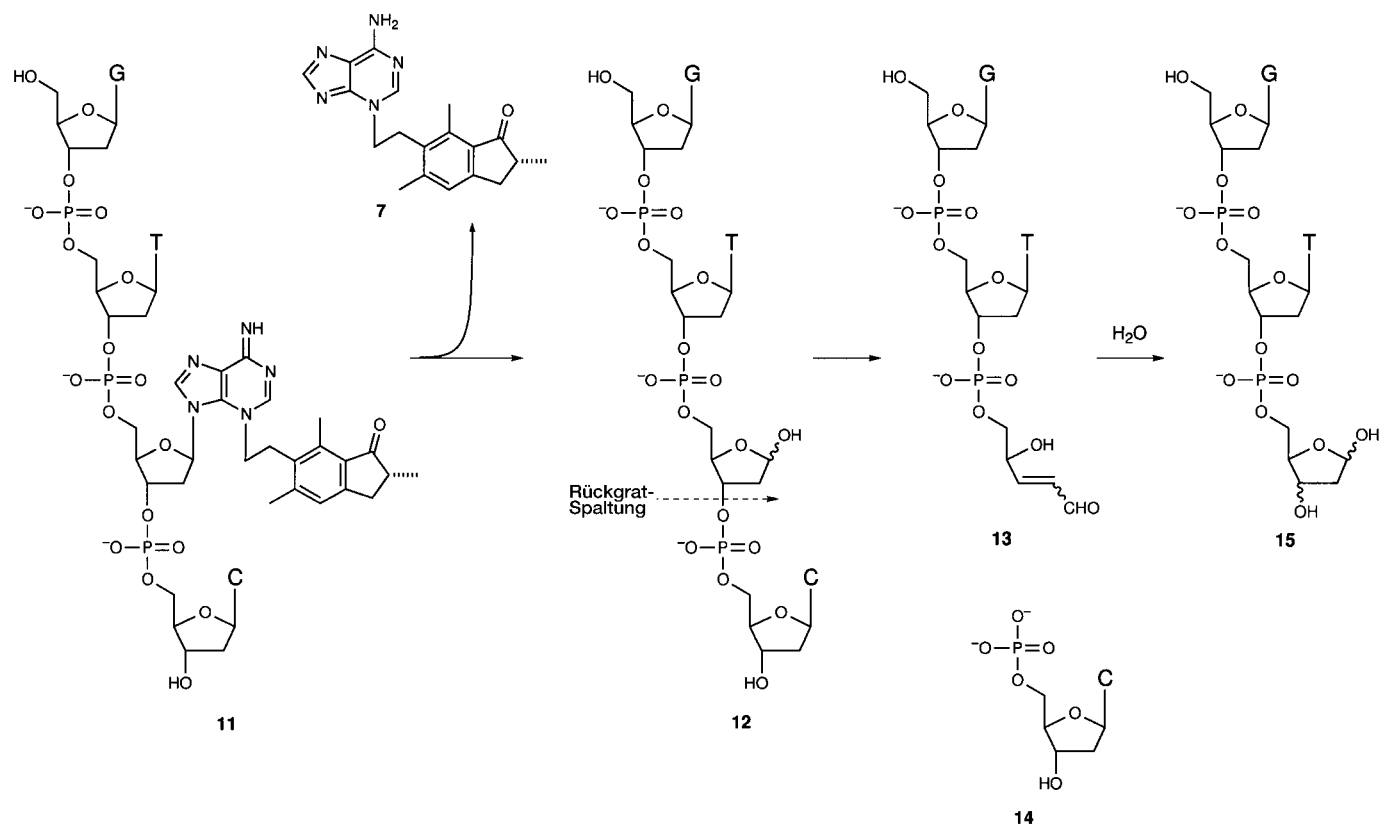
5. Synthese beider Enantiomere des primären Carcinogens und deren DNA-Spaltungsaktivität^[29]

Die Herausforderung der Synthese von Ptaquilosin **16**,^[30] dem Aglycon des Carcinogens Ptaquilosid **1**, und die DNA-Spaltungsaktivität des primären Carcinogens **4**, das durch Umsetzung mit Alkali aus **16** entsteht, veranlaßte uns, die Synthese und die Eigenschaften beider Enantiomere von **16** zu untersuchen. Um beide Enantiomere effizient zu erhalten, wurden die beiden Diastereomere **18a** und **18b** aus einer gemeinsamen chiralen Vorstufe **17** durch stereoselektive Synthese am neu entstehenden quaternären Kohlenstoffatom hergestellt (Schema 4).^[31] Die Alkylierung des Lithiumenolats von (1*R*,2*R*)-Cyclopentan-1,2-dicarbonsäure-(+)-menthylester **17** mit Methallylbromid in Gegenwart von HMPA bei -78 °C führte fast ausschließlich zum Diastereomer **18a**, wogegen die Alkylierung des Lithiumenolats von **17** mit Methallylchlorid in Abwesenheit von HMPA bei -20 °C überwiegend das andere Diastereomer **18b** lieferte, das durch Alkylierung der sterisch stärker gehinderten Seite des Enolats entstand.

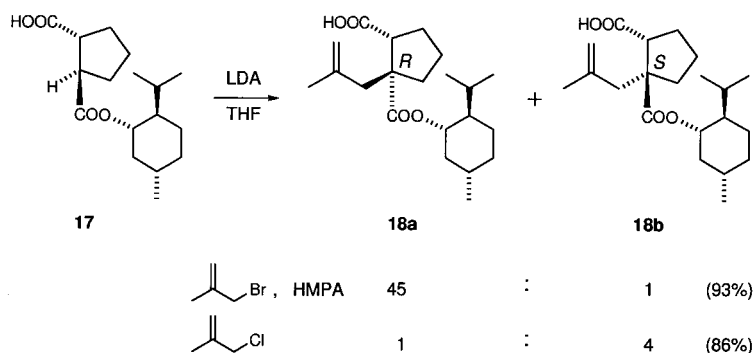




Schema 2. Spaltung des Desoxytetranucleotids d(GTAC) durch das primäre Carcinogen 4 – Teil 1.



Schema 3. Spaltung des Desoxytetranucleotids d(GTAC) durch das primäre Carcinogen 4 – Teil 2.



Schema 4. Diastereoselektive Alkylierungen der chiralen Vorstufe 17.

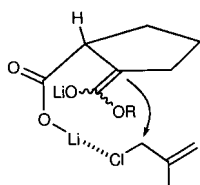


Abb. 4. Möglicher Übergangskomplex bei der contrasterischen Alkylierung. R = (+)-Menthyl.

Abbildung 4 zeigt das Zwischenprodukt, über das diese contrasterische^[32] Alkylierung erklärt werden kann.

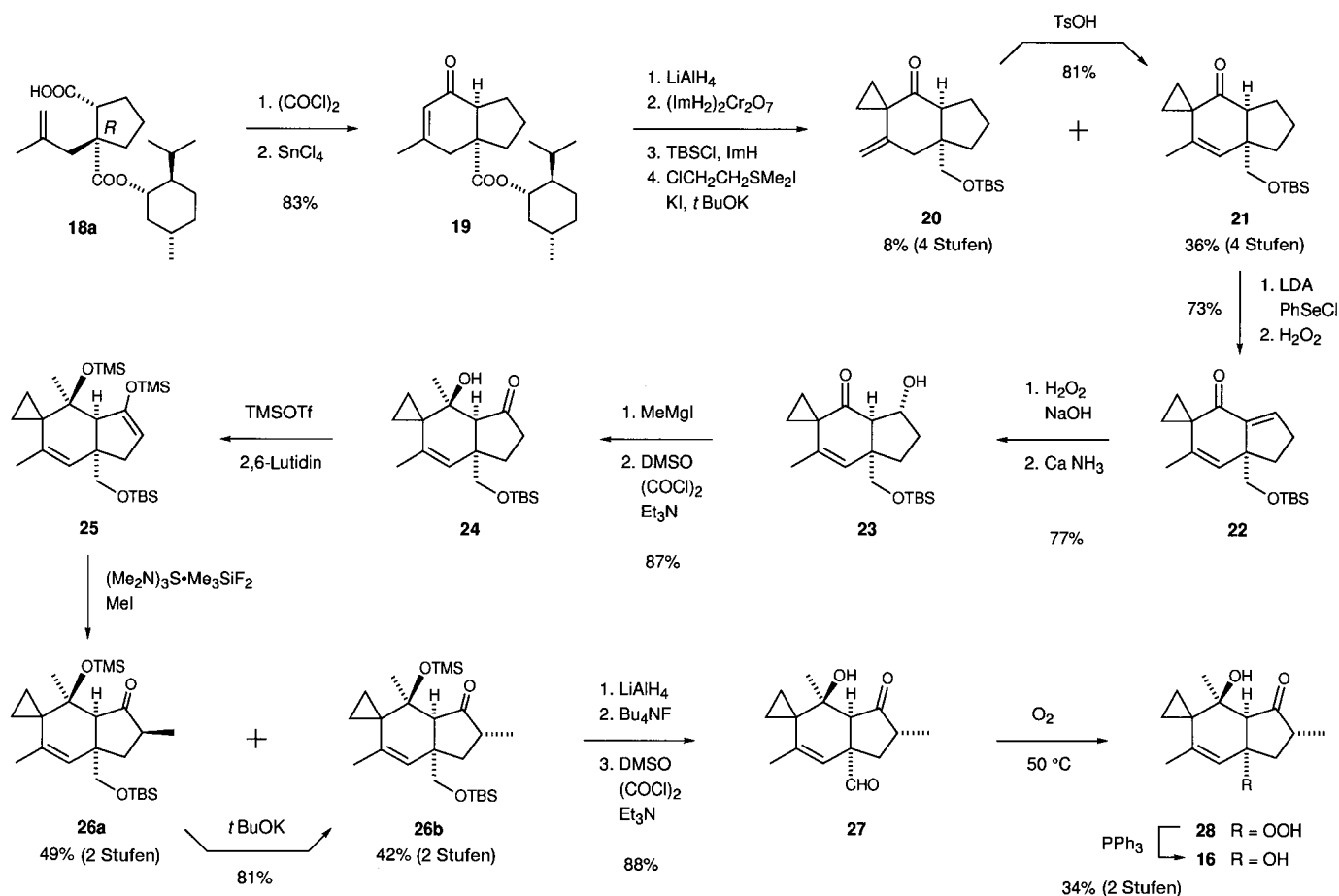
Die Instabilität des Ptaquilosins 16 verursacht zahlreiche Probleme in der Synthese. Eine der Hauptursachen dieser Instabilität ist die zur Dehydratisierung neigende Hydroxygruppe an C4. Wir wählten daher einen Syntheseweg, bei dem die anguläre Hydroxygruppe erst ganz am

Ende unter äußerst milden Bedingungen eingeführt wird. Schema 5 zeigt die Synthese des natürlich vorkommenden

Enantiomers von 16, ausgehend vom Diastereomer 18a. Der entscheidende Schritt der Synthese war die deformylierende Oxidation des Aldehyds 27, die unter ausreichend milden Bedingungen über das Hydroperoxid 28 zum Ptaquilosin 16 führt. Das nichtnatürliche Enantiomer *ent*-16 wurde aus dem Diastereomer 18b hergestellt. Als uns beide Enantiomere 16 und *ent*-16 zur Verfügung standen, überprüften wir, ob die beiden Enantiomere des primären Carcinogens, 4 und *ent*-4, gegenüber der DNA eine unterschiedliche Reaktivität aufweisen. Es zeigte sich, daß das vom natürlichen Ptaquilosin 16 abgeleitete primäre Carcinogen 4 hinsichtlich seiner DNA-Spaltungsaktivität etwa doppelt so wirksam ist wie das vom nichtnatürlichen Ptaquilosin *ent*-16 abgeleitete *ent*-4. Weitere Untersuchungen zur Synthese von 16 wurden beschrieben.^[33, 34]

6. Synthese künstlicher Analoga des primären Carcinogens

Die starke Elektrophilie des primären Carcinogens 4 wird durch den reaktiven Cyclopropanring hervorgerufen, der in Konjugation zur Ketogruppe angeordnet und Teil eines Cyclopropylcarbinol-Systems ist. Das Zusammenwirken dieser Struktur Faktoren verstärkt offenbar die Reaktivität des



Schema 5. Synthese von Ptaquilosin 16. TBS = *t*BuMe₂Si; LDA = Lithiumdiisopropylamid; TMS = Me₃Si; Tf = F₃CSO₂.

Cyclopropanrings in **4**. Unter dem Aspekt der Struktur-Wirkungs-Beziehung ist daher interessant, einfache Analoga von **4** herzustellen und deren DNA-Spaltungsaktivitäten zu vergleichen. Des weiteren ist zu erwarten, daß diese einfachen Analoga stabiler sind als das labile, primäre Carcinogen **4**. Als einfache Analoga synthetisierten wir das Keton **29**, das einen mit der Ketogruppe konjugierten Cyclopropanring enthält, und den Alkohol **30**, der ausschließlich das Cyclopropylcarbinol-System enthält^[35] (Abb. 5). Das Keton **29** war tatsäch-

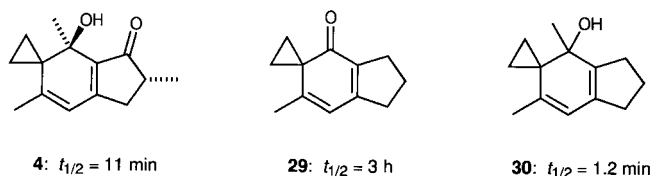


Abb. 5. Strukturen und Halbwertszeiten des primären Carcinogens **4** und der beiden künstlichen Analoga **29** und **30**.

lich viel stabiler als das primäre Carcinogen **4**; der Alkohol **30** erwies sich dagegen als deutlich instabiler ($t_{1/2} = 11 \text{ min}$, 3 h bzw. 1.2 min ; $\text{pH} = 7.5$, 26°C). Es ist bemerkenswert, daß die künstlichen Analoga **29** und **30** DNA-Spaltungsaktivitäten zeigen, die mit denen des natürlichen, primären Carcinogens **4** vergleichbar sind.

7. Weitere Untersuchungen zu Farn-Carcinogenen

Nachdem wir über die Isolierung von Ptaquilosid **1** aus Adlerfarn berichtet hatten, führten zahlreiche Arbeitsgruppen Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Analyse von **1** in Farnen durch. So berichteten Smith et al. über **1** im Felsfarn (*Cheilanthes sieberi*) in Neuseeland und Australien^[36] und Alonso-Amelot et al. beschrieben, daß Adlerfarn aus den tropischen Anden Venezuelas **1** enthält.^[37] Des weiteren wurde **1** in Farn aus England^[38] sowie in Farnen aus Costa Rica und Kanada^[39] nachgewiesen. Natori et al. konnten zeigen, daß **1** im Gegensatz zum Dienon **4** unter den Standardbedingungen des Ames-Tests keine Mutagenität zeigt. Sie entwickelten deshalb eine bequeme Methode zum Nachweis von **1** durch einen modifizierten Ames-Test.^[40, 41] Natori et al. untersuchten die mutagenen Inhaltsstoffe in Farnen der *Pteridaceae*-Familie.^[42] Sie isolierten die mutagenen Verbindungen Hypolosid A (**31**), B (**32**) und C (**33**)^[43] (Abb. 6) sowie Dennstosid A^[44] und klärten deren Strukturen auf, die der des Ptaquilosids **1** ähneln. Mehrere Arbeitsgruppen wiesen auf eine mögliche, vom Adlerfarn-Carcinogen ausgehende Gefahr für den Menschen hin. Dabei scheint

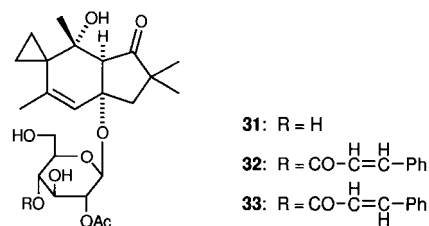


Abb. 6. Strukturen der Hypoloside A, B und C, **31**, **32** bzw. **33**.

die Übertragung des Carcinogens auf Milch eine besondere Rolle zu spielen. So wurde berichtet, daß Milch von Kühen, die mit Adlerfarn gefüttert wurden, eine carcinogene Wirkung auf Ratten und Mäuse ausübt.^[45-48] Alonso-Amelot, Smith et al. zeigten schließlich, daß die Milch von mit Farn gefütterten Kühen Ptaquilosid **1** enthält.^[49]

8. Zusammenfassung und Ausblick

Dieser Aufsatz beschreibt die Forschungsergebnisse zu einem lange gesuchten Carcinogen des Adlerfarns. Es wurde eine über die Carcinogenität gesteuerte, milde Extraktionsmethode entwickelt, die die Isolierung des instabilen, carcinogenen Ptaquilosids **1** ermöglichte. Es wurde gezeigt, daß **1** für eine Vielzahl biologischer Aktivitäten einschließlich der Carcinogenität verantwortlich ist. Ptaquilosid **1** ist ein Nor-sesquiterpenglucosid des Illudan-Typs. Unter schwach alkalischen Bedingungen wandelt sich **1** in das hoch reaktive, primäre Carcinogen **4** um, das das Schwefelatom in schwefelhaltigen Aminosäuren alkyliert. Diese Entdeckung ermöglicht es, schwefelhaltige Aminosäuren als Entgiftungsmittel für **1** einzusetzen. Es zeigte sich, daß das primäre Carcinogen **4** nicht nur die Adenin- und Guanin-Moleküle der DNA alkyliert, sondern auch die Spaltung der DNA bewirkt. Der molekulare Mechanismus dieser DNA-Spaltung wurde detailliert aufgeklärt. Beide Enantiomere von Ptaquilosin **16**, dem Aglycon des Ptaquilosids, wurden synthetisiert. Die DNA-Spaltungsaktivität des natürlichen, primären Carcinogens **4** war stärker als die des nichtnatürlichen Enantiomers *ent-4*. Des weiteren wurden zwei künstliche Analoga, **29** und **30**, mit einfacherer Struktur als das primäre Carcinogen **4** hergestellt. Deren DNA-Spaltungsaktivitäten waren mit denen von **4** vergleichbar. Ptaquilosid **1** ist ein starkes und außergewöhnliches Carcinogen, das nun in größeren Mengen aus der Pflanze erhalten werden kann. Es kann somit in Zukunft dazu genutzt werden, den detaillierten Mechanismus der chemischen Carcinogenese zu erforschen.^[50]

Einer der Autoren (K. Y.) dankt seinen talentierten Mitarbeitern, die am Adlerfarn-Carcinogen-Projekt beteiligt waren: Dr. H. Niwa, Dr. K. Wakamatsu, Dr. Y. Shizuri, K. Matsushita, H. Kuyama, K. Niiyama, Y. Uosaki, Y. Yoshida, M. Ikagawa, M. Okumura, A. Sawada, Y. Nakayama, Y. Imamura, H. Tanaka, J. Hirokawa und K. Mizuta. Der Dank dieses Autors gilt außerdem Prof. I. Hirono (Fujita Health University) für den Carcinogenitäts-Test, Dr. Y. Kono (National Institute of Animal Health) für den Test der akuten Adlerfarnvergiftung mit einem Kalb, Prof. Y. Saito und Prof. S. Ohba (Keio University) für die Röntgenstrukturanalyse sowie Prof. Y. Sugiura (Kyoto University) für die DNA-Spaltungsanalyse mit markierter DNA. Diese Arbeit wurde durch Zuschüsse des Ministeriums für Erziehung, Wissenschaft und Kultur der japanischen Regierung sowie durch die Yamada Science Foundation, die Fujisawa Foundation, die Naito Foundation, die Shorai Foundation for Science and Technology, die Asahi Glass Foundation und die Ono Pharmaceutical Company gefördert.

Eingegangen am 4. Februar 1997 [A 206]
 Übersetzt von Dr. Sabine Töteberg-Kaulen, Boffzen

- [1] I. A. Evans in *Chemical Carcinogens*, Second Edition Vol. 2 (Hrsg.: C. E. Searle), ACS Monograph 182, American Chemical Society, Washington D. C., **1984**, Kap. 18, S. 1171–1204.
- [2] I. Hirono, K. Yamada in *Naturally Occurring Carcinogens of Plant Origin* (Hrsg.: I. Hirono), Kodansha-Elsevier, Tokyo-Amsterdam, **1987**, Kap. 4, S. 87–120.
- [3] G. R. Fenwick, *J. Sci. Food Agric.* **1988**, *46*, 147–173.
- [4] G. Rosenberger, W. Heesch, *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* **1960**, *67*, 201–208.
- [5] I. A. Evans, J. Mason, *Nature* **1965**, *208*, 913–914.
- [6] I. A. Evans in *Chemical Carcinogens* (Hrsg.: C. E. Searle), ACS Monograph 173, American Chemical Society, Washington D. C., **1976**, Kap. 13, S. 690–700.
- [7] I. Hirono, Y. Ushimaru, K. Kato, H. Mori, I. Sasaoka, *Gann* **1978**, *69*, 383–388.
- [8] H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada, I. Hirono, K. Matsushita, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4117–4120.
- [9] I. Hirono, K. Yamada, H. Niwa, Y. Shizuri, M. Ojika, S. Hosaka, T. Yamaji, K. Wakamatsu, H. Kigoshi, K. Niiyama, Y. Uosaki, *Cancer Lett.* **1984**, *21*, 239–246.
- [10] M. Ojika, H. Kigoshi, H. Kuyama, H. Niwa, K. Yamada, *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 634–637.
- [11] J. C. M. van der Hoeven, W. J. Lagerweij, M. A. Posthumus, A. van Veldhuizen, H. A. J. Holterman, *Carcinogenesis* **1983**, *4*, 1587–1590.
- [12] I. Hirono, S. Aiso, T. Yamaji, H. Mori, K. Yamada, H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, H. Kigoshi, K. Niiyama, Y. Uosaki, *Gann* **1984**, *75*, 833–836.
- [13] I. Hirono, H. Ogino, M. Fujimoto, K. Yamada, Y. Yoshida, M. Ikagawa, M. Okumura, *J. Natl. Cancer Inst.* **1987**, *79*, 1143–1149.
- [14] I. Hirono, Y. Kono, K. Takahashi, K. Yamada, H. Niwa, M. Ojika, H. Kigoshi, K. Niiyama, Y. Uosaki, *Vet. Record* **1984**, *115*, 375–378.
- [15] I. Hirono, M. Ito, S. Yagyu, M. Haga, K. Wakamatsu, T. Kishikawa, O. Nishikawa, K. Yamada, M. Ojika, H. Kigoshi, *J. Vet. Med. Sci.* **1993**, *55*, 979–983.
- [16] M. Ojika, K. Wakamatsu, H. Niwa, K. Yamada, *Tetrahedron* **1987**, *43*, 5261–5274.
- [17] a) H. Hikino, T. Takahashi, S. Arihara, T. Takemoto, *Chem. Pharm. Bull.* **1970**, *18*, 1488–1489; b) K. Yoshihira, M. Fukuoka, M. Kuroyanagi, S. Natori, *ibid.* **1971**, *19*, 1491–1495.
- [18] H. Seto, T. Sasaki, H. Yonehara, J. Uzawa, *Tetrahedron Lett.* **1978**, 923–926.
- [19] a) H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada, S. Ohba, Y. Saito, I. Hirono, K. Matsushita, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5371–5372; b) S. Ohba, Y. Saito, I. Hirono, H. Niwa, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada, *Acta Crystallogr. Sect. C* **1984**, *40*, 1877–1879.
- [20] a) K. Yoshihira, M. Fukuoka, M. Kuroyanagi, S. Natori, M. Umeda, T. Morohoshi, M. Enomoto, M. Saito, *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, *26*, 2346–2364; b) M. Fukuoka, M. Kuroyanagi, K. Yoshihira, S. Natori, *ibid.* **1978**, *26*, 2365–2385.
- [21] a) T. C. McMorris, M. Anchel, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1594–1600; b) K. Nakanishi, M. Ohashi, M. Tada, Y. Yamada, *Tetrahedron* **1965**, *21*, 1231–1246; c) T. Matsumoto, H. Shirahama, A. Ichihara, Y. Fukuoka, Y. Takahashi, Y. Mori, M. Watanabe, *ibid.* **1965**, *21*, 2671–2676.
- [22] P. D. Lawley in *Chemical Carcinogens*, Second Edition Vol. 1 (Hrsg.: C. E. Searle), ACS Monograph 182, American Chemical Society, Washington D. C., **1984**, Kap. 7, S. 325–484.
- [23] B. Singer, D. Grunberger, *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum, New York, **1983**.
- [24] M. Ojika, K. Sugimoto, T. Okazaki, K. Yamada, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 1775–1777.
- [25] T. Kushida, M. Uesugi, Y. Sugiura, H. Kigoshi, H. Tanaka, J. Hirokawa, M. Ojika, K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 479–486.
- [26] a) L. J. Hanka, A. Dietz, S. A. Gerpheide, S. L. Kuentzel, D. G. Martin, *J. Antibiot.* **1978**, *31*, 1211–1217; b) D. G. Martin, C. G. Chidester, D. J. Duchamp, S. A. Mizesak, *ibid.* **1980**, *33*, 902–903; c) D. G. Martin, C. Biles, S. A. Gerpheide, L. J. Hanka, W. C. Krueger, J. P. McGovern, S. A. Mizesak, G. L. Neil, J. C. Stewart, J. Visser, *ibid.* **1981**, *34*, 1119–1125.
- [27] a) V. L. Reynolds, J. P. McGovern, L. H. Hurley, *J. Antibiot.* **1986**, *39*, 319–334; b) L. H. Hurley, D. R. Needham-VanDevanter, *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 230–237.
- [28] Die Guanin- und Adenin-Basen im Desoxytetranucleotid d(GTAC) **9** befinden sich in verschiedenen Umgebungen, was die Depurinierungsgeschwindigkeit beeinflussen könnte. Um dieses Problem zu klären, wurden die Halbwertszeiten der Depurinierung von *N*-7-Alkylguanin **6** und *N*-3-Alkyladenin **7** aus mit **4** modifizierter Kalbthymus-DNA bestimmt. Die Halbwertszeiten waren 40 bzw. 18 h, was zeigt, daß die am Adenin alkylierten Addukte schneller depuriniert werden als die am Guanin alkylierten Addukte, unabhängig vom Ort der Purinbasen auf der DNA.
- [29] a) H. Kigoshi, Y. Imamura, H. Niwa, K. Yamada, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 2302–2303; b) H. Kigoshi, K. Imamura, K. Mizuta, H. Niwa, K. Yamada, *ibid.* **1993**, *115*, 3056–3065.
- [30] H. Kigoshi, A. Sawada, Y. Imamura, H. Niwa, K. Yamada, *Tetrahedron* **1989**, *45*, 2551–2556.
- [31] H. Kigoshi, Y. Imamura, K. Yoshikawa, H. Niwa, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 4541–4544.
- [32] a) R. Naef, D. Seebach, *Angew. Chem.* **1981**, *93*, 1113; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1981**, *20*, 1030–1031; b) W. Ladner, *ibid.* **1982**, *21*, 449–450; c) W. Ladner, *Chem. Ber.* **1983**, *116*, 3413–3426; d) D. Seebach, J. D. Aebi, M. Gander-Coquez, R. Naef, *Helv. Chim. Acta.* **1987**, *70*, 1194–1216.
- [33] A. Padwa, V. P. Sandanayaka, E. A. Curtis, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 2667–2668.
- [34] J. Cossy, S. Ibhi, P. H. Kahn, L. Tacchini, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7877–7880.
- [35] H. Kigoshi, H. Tanaka, J. Hirokawa, K. Mizuta, K. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 6647–6650.
- [36] B. L. Smith, P. P. Embling, D. R. Lauren, M. P. Angew, A. D. Ross, P. L. Greentree, *Aust. Vet. J.* **1989**, *66*, 154–155.
- [37] M. E. Alonso-Amelot, M. Pérez-Mena, M. P. Calcagno, R. Jaimes-Espinoza, U. Castillo, *J. Chem. Ecol.* **1992**, *18*, 1405–1420.
- [38] G. R. Fenwick, AFRC Institute of Food Research, Norwich (Großbritannien), unveröffentlicht.
- [39] J. T. Arnason, J. Villalobos, Faculty of Science, University of Ottawa (Canada), unveröffentlicht.
- [40] M. Matoba, E. Saito, K. Koyama, S. Natori, T. Matsushima, M. Takimoto, *Mutagenesis* **1987**, *2*, 419–423.
- [41] T. Nagao, K. Saito, E. Hirayama, K. Uchikoshi, K. Koyama, S. Natori, N. Morisaki, S. Iwasaki, T. Matsushima, *Mutation Research* **1989**, *215*, 173–178.
- [42] K. Saito, T. Nagao, M. Matoba, K. Koyama, S. Natori, T. Murakami, Y. Saiki, *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1605–1611.
- [43] K. Saito, T. Nagao, S. Takatsuki, K. Koyama, S. Natori, *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1475–1479.
- [44] K. Koyama, S. Takatsuki, S. Natori, *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2080–2082.
- [45] I. A. Evans, B. Widdop, R. S. Jones, G. D. Barber, H. Leach, D. L. Jones, R. Mainwaring-Burton, *Biochem. J.* **1971**, *124*, 28–29.
- [46] I. A. Evans, R. S. Jones, R. Mainwaring-Burton, *Nature* **1972**, *237*, 107–108.
- [47] A. M. Pamukcu, E. Ertürk, S. Yalciner, U. Milli, G. T. Bryan, *Cancer Res.* **1978**, *38*, 1556–1560.
- [48] A. M. Pamukcu, G. T. Bryan in *Naturally Occurring Carcinogens-Mutagens and Modulators of Carcinogenesis* (Hrsg.: E. C. Miller, J. A. Miller, I. Hirono, T. Sugimura, S. Takayama), Japan Scientific Societies-University Park, Tokyo-Baltimore, **1979**, S. 89–99.
- [49] M. E. Alonso-Amelot, U. Castillo, B. L. Smith, D. R. Lauren, *Nature* **1996**, *382*, 587.
- [50] Neuere Ergebnisse zum Mechanismus der Adlerfarn-Carcinogenese zeigen, das sie auf einer Mutation des *H-ras*-Protooncogen beruht, indem Ptaquilosid den Adenin-Rest in Codon 61 alkyliert, gefolgt von einer Depurinierung: A. S. Prakash, T. N. Pereira, B. L. Smith, G. Shaw, A. A. Seawright, *Natural Toxins* **1996**, *4*, 221–227.