Die hier angestellten Überlegungen werden zur Zeit experimentell geprüft.

Die Acetylgruppe, die ebenfalls zur Inhibierung der Farnesoloxydation eingeführt worden war, wird vermutlich hydrolytisch entfernt. Dafür spricht, daß Farnesylacetat nur wenig stärker aktiv ist als Far-

nesol selbst und weit schwächer wirksam als der Farnesylmethyläther.

Ich danke der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit und Fräulein GISELA DREWS für ihre fleißige und selbständige Mitarbeit bei den Versuchen.

Über den Einbau von N_α -Methyltryptophan und N_ω -Methyltryptamin in Mutterkornalkaloide vom Clavin-Typ

VON HEINZ-GÜNTER FLOSS und DETLEF GRÜGER

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule München und dem Institut für Biochemie der Pflanzen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Halle (Saale)
(Z. Naturforschg. **18 b**, 519—522 [1963]; eingegangen am 17. April 1963)

Einbauversuche mit Tryptamin- ^3H und N_ω -Methyltryptamin- ^3H an *Claviceps purpurea* machen es wahrscheinlich, daß diese Verbindungen keine Zwischenprodukte der Biosynthese der Mutterkornalkaloide sind. Beide Substrate werden praktisch nicht in die Alkaloide eingebaut, während DL- N_α -Methyltryptophan etwa 3—7-mal schlechter verwertet wird als DL-Tryptophan. Die Aufnahme der methylierten Vorläufer in das Pilzmycel wird untersucht.

BAXTER und Mitarbb. fanden, daß nach Zugabe von Methionin- $[\text{CH}_3\text{-}^{14}\text{C}]$ und Formiat- ^{14}C zu Kulturen von *Claviceps purpurea* radioaktive Mutterkornalkaloide vom Peptid- und Clavin-Typ gebildet werden^{1,2} und konnten ferner zeigen, daß die Radioaktivität ausschließlich in der N -Methylgruppe lokalisiert ist³. Ihr Befund, daß ein in der CH_3 -Gruppe mit ^{14}C und Tritium markiertes Methionin Alkaloide mit unverändertem $^{14}\text{C} : ^3\text{H}$ -Verhältnis ergibt³, spricht für die Entstehung der N -Methylgruppe durch eine Transmethylierungs-Reaktion ausgehend vom Methionin.

Es ging aus diesen Versuchen aber noch nicht hervor, wann die Methylierung stattfindet, d. h. ob diese Reaktion am fertigen Ergolin-Ringsystem erfolgt oder bereits an einer Vorstufe, z. B. dem Tryptophan. Interessanterweise sind bis heute praktisch keine *Nor*-Formen der Mutterkornalkaloide gefunden worden. Die einzige Ausnahme scheint das *Nor*-Agroclavin zu sein, das nach ABE und Mitarbb.⁴ bei der Einwirkung verschiedener Streptomyces-Arten auf Agroclavin neben anderen Produkten gebildet wird.

Durch Verfütterung von N_α -Methyltryptophan- ^3H und N_ω -Methyltryptamin- ^3H allein und in Kombination mit Tryptophan sollte die Frage nach dem Zeitpunkt der Methylierung geklärt werden.

Methodik

Kultur des Pilzes

Fernbach-Kolben, die 80 ml Nährlösung enthielten, wurden mit submers gezüchtetem Mycel des Clavin-Alkaloide bildenden Stammes SD 58 beimpft. Nährlösung: Mannit 50 g; Saccharose 50 g; KH_2PO_4 0,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,3 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 4,4 mg; Hefeextrakt 3 g; Bernsteinsäure 5,4 g; Aqua dest. ad 1 l. Der pH-Wert wird mit konz. Ammoniak auf 5,4 eingestellt.

Herstellung der radioaktiven Verbindungen

DL- N_α -Methyltryptophan (DL-Abrin) wurde nach UHLE und HARRIS⁵ synthetisiert, Tryptamin-HCl nach der Vorschrift von THESING und SCHULDE⁶. Die Darstellung des N_ω -Methyltryptamin-hydrochlorids erfolgte in Analogie zu der von HOFMANN und Mitarbb.⁷ beschriebenen Synthese des 4-Benzoyloxy- ω - N,N -dimethyltrypt-

¹ R. M. BAXTER, S. I. KANDEL u. A. OKANY, 2. Arbeitstagung „Biochemie und Physiologie der Alkaloide“, Halle/S., Mai 1960, im Druck.

² R. M. BAXTER, S. I. KANDEL u. A. OKANY, Chem. u. Ind. **1961**, 1453.

³ S. I. KANDEL, R. M. BAXTER, A. OKANY u. K. L. TAM, International Symposium on Organic Chemistry of Natural Products, Brüssel, Juni 1962, im Druck.

⁴ S. YAMATODANI, Y. KOZU, S. YAMADA u. M. ABE, Ann. Rep. Takeda Res. Lab. **21**, 88 [1962].

⁵ F. C. UHLE u. L. S. HARRIS, J. Amer. chem. Soc. **78**, 381 [1956].

⁶ J. THESING u. F. SCHULDE, Chem. Ber. **85**, 324 [1952].

⁷ A. HOFMANN, R. HEIM, A. BRACK, H. KOBEL, A. FREY, H. OTT, Th. PETRILKA u. F. TROXLER, Helv. chim. Acta **42**, 1557 [1959].

amins durch Umsetzung von Indol mit Oxalylchlorid zu Indolyl-(3)-glyoxylsäurechlorid, dessen Überführung in das Methylamid und anschließende Reduktion mit LiAlH_4^* .

Die Verbindungen wurden markiert durch Austausch mit HO^3H (300 mC in 1,5 ml) und konz. HCl bei 110° ⁸ und anschließenden Rücktausch des labil gebundenen Tritiums. Im Falle des Tryptamins trat eine weitgehende Zersetzung ein, jedoch konnte nach Verdünnung mit inaktivem Material noch eine kleine Menge eines sauberen Produktes isoliert werden. Die Reinheitsprüfung ergab, daß die Verbindungen frei von radioaktiven Verunreinigungen waren (Erfassungsgrenze ca. 2,5%). Die spezif. Aktivitäten waren: DL- N_α -Methyltryptophan 5,56 mC/mMol, N_ω -Methyltryptamin·HCl 6,46 mC/mMol, Tryptamin·HCl 2,92 mC/mMol. Nach analogen Austauschversuchen mit Tryptophan und Alanin dürfte die Radioaktivität ganz überwiegend im Indol-Ringsystem lokalisiert sein.

Applikation der radioaktiven Verbindungen

1. Folgende Verbindungen wurden den Kulturen 9 Tage nach der Beimpfung zugesetzt:

1. DL-Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}] + \text{DL-}N_\alpha\text{-Methyltryptophan-}[\text{H}^3]$,
2. DL- N_α -Methyltryptophan- $[\text{H}^3]$,
3. N_ω -Methyltryptamin- $[\text{H}^3]$ ·HCl,
4. DL-Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$.

Die eingesetzten Aktivitäten sind in Tab. 1 angegeben. 20 Tage nach der Beimpfung erfolgte die Ernte.

2. Im zweiten Ansatz (Tab. 2) wurden folgende Verbindungen appliziert:

1. Tryptamin- $[\text{H}^3]$ ·HCl,
2. N_ω -Methyltryptamin- $[\text{H}^3]$ ·HCl.

Bis zum Tage der Applikation (11. Tag nach der Beimpfung) waren pro Kolben 450 γ Alkaloid gebildet worden. Nach 25-tägiger Bebrütung wurden die Kolben abgeerntet.

Aufarbeitung

Das Mycel wurde von der Nährlösung abgetrennt, mehrmals gewaschen und getrocknet. Der Alkaloidgehalt im Mycel und in der Nährlösung wurde in der üblichen Weise bestimmt.

Zur Gewinnung des Hauptalkaloids Elymoclavine wurde der größte Teil der Nährlösung mit 2-proz. Weinsäure angesäuert, mit Äther entfettet und danach bei pH 9–10 mit Chloroform:Isopropanol (3:1) ausgeschüttelt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abdestilliert und der Rückstand in 2-proz. Weinsäure aufgenommen. Diese Lösung wurde alkalisch gemacht und mit CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Der Methylenchlorid-Extrakt wurde eingengt, mit Na_2SO_4 getrocknet und an der 150-fachen Menge (bezogen auf den Alkaloidgehalt) Al_2O_3 (nach Brockmann) chromatogra-

phiert. Mit reinem Methylenchlorid wurde Agroclavin eluiert, die fortgesetzte Elution des Chromatogramms mit $\text{CH}_2\text{Cl}_2 + 1\% \text{CH}_3\text{OH}$ ergab Elymoclavine, das aus Methylenchlorid:Methanol umkristallisiert wurde.

Methyltryptophan-Bestimmung

Die quantitative Bestimmung des N_α -Methyltryptophans erfolgte in Analogie zur Tryptophan-Bestimmung nach SPIES und CHAMBERS ⁹. Die von den Alkaloiden befreite Nährlösung wurde mit Salzsäure neutralisiert und auf eine Ionenaustauscher-Säule gegeben (Dowex 50·8, 50–200 mesh, $\text{H}^\oplus$ -Form). Eluiert wurde mit 3-proz. Ammoniak. Das Eluat wurde im Vakuum eingedampft und der Rückstand in 70-proz. Alkohol aufgenommen. Diese Lösung enthielt Tryptophan und N_α -Methyltryptophan, die dünnstschichtchromatographisch an Kieselgel G (Merck) getrennt wurden (Laufmittel n-Butanol : Eisessig : Wasser 80 : 15 : 5, Laufzeit 4 Std.). N_α -Methyltryptophan hat einen R_f -Wert von 0,25, Tryptophan R_f 0,39.

Die dem Methyltryptophan entsprechende Zone wurde von der Platte abgeschabt, in einem Schliffreagenzglas mit 8 ml 23,8 n H_2SO_4 und 2 ml 2-n. H_2SO_4 , die 30 mg p-Dimethylaminobenzaldehyd enthielt, einige Min. kräftig geschüttelt und danach 1 Sde. im Dunkeln stehengelassen. Das Adsorbens wurde abzentrifugiert, zur klaren Lösung 0,1 ml einer 0,04-proz. Natriumnitritlösung hinzugefügt, umgeschüttelt und 30 Min. im Dunkeln aufbewahrt. Die entstandene Blaufärbung wurde mit dem Photometer Elko II (Filter S 57, $d = 1$ cm) gemessen. Die Eichkurve des Methyltryptophans verläuft flacher als die des Tryptophans; die Bestimmung des Methyltryptophans ist also weniger empfindlich.

Vergleich der Aufnahme der Vorläufer in das Mycel

Zu 12 Tage alten Submerskulturen (50 ml) wurden die in Tab. 3 angegebenen Mengen DL- N_α -Methyltryptophan- $[\text{H}^3]$, N_ω -Methyltryptamin- $[\text{H}^3]$ ·HCl bzw. L-Tryptophan- $[\text{H}^3]$ gegeben. Die Kulturen wurden $2\frac{1}{2}$ Std. auf der Maschine geschüttelt. Danach wurde das Mycel abgesaugt, gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das trockene Mycel wurde gewogen und auf seinen Tritiumgehalt analysiert.

Bestimmung der Radioaktivität

Zur Aktivitätsbestimmung wurden die verschiedenen Elymoclavine-Proben mit inaktivem Alkaloid verdünnt und bis zur konstanten spezif. Aktivität umkristallisiert. Bei den nach Applikation von Tryptamin und Methyltryptamin gewonnenen Proben war selbst nach wiederholter Chromatographie und viermaligem Umkristallisieren aus Methanol die spezif. Radioaktivität nicht konstant. Offenbar war das Alkaloid durch Spuren einer

* Diese Synthesen wurden ausgeführt von Herrn cand. chem. W. MOLDENHAUER, München.

⁸ D. GRÖGER, K. MOTHES, H. SIMON, H.-G. FLOSS u. F. WEYGAND, Z. Naturforsch. **16b**, 432 [1961].

⁹ J. R. SPIES u. D. C. CHAMBERS, Anal. Chem. **20**, 30 [1948].

hochaktiven Verbindung verunreinigt, die sich nur unvollständig abtrennen ließ. Die Möglichkeit, daß bei der Reinigung Tritium ausgebaut wird, konnten wir ausschließen, indem wir nachwiesen, daß die Destillation der Kristallisations-Mutterlaugen nichtradioaktives Methanol liefert. Im Falle des Tryptamins und des Methyltryptamins sind deshalb in den Tabellen die nach der letzten Reinigungsoperation gemessenen Werte angegeben.

Alle Radioaktivitäts-Bestimmungen erfolgten im Gaszählrohr nach SIMON und Mitarbeitern¹⁰.

Ergebnisse

Aus den Tab. 1 und 2 geht hervor, daß Tryptamin und *N* ω -Methyltryptamin praktisch nicht in die Mutterkornalkaloide eingebaut werden. Selbst wenn man die für Methyltryptamin ermittelte geringe Aufnahmegeschwindigkeit (Tab. 3) berücksichtigt, ergibt sich kein wesentlich günstigeres Bild. Unsere Befunde hinsichtlich des Tryptamins decken sich mit Ergebnissen von BAXTER et al.², die auch feststellten, daß Tryptamin nicht in die Clavine inkorporiert wird. Wahrscheinlich sind also weder Tryptamin selbst noch sein *N* ω -Methylderivat als Zwischenprodukte der Ergolin-Biosynthese anzusehen.

Im Gegensatz dazu wird DL-*N* α -Methyltryptophan in die Alkaloide eingebaut (Tab. 1). Es scheint jedoch nach den Zahlen der Tab. 1 keine bessere Vorstufe zu sein als Tryptophan selbst. Besonders deutlich zeigt dies der Versuch 1, bei dem DL-Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ zusammen mit DL-*N* α -Methyltryptophan- $[\text{}^3\text{H}]$ appliziert wurde. Die Einbaurate für Tryptophan liegt bei 44%, gegenüber 6,4% für *N* α -Methyltryptophan.

Die Einbauraten für das Methyltryptophan bedürfen jedoch einer Korrektur. Versuche über die Aufnahme der Vorläufer in das Mycel ergaben (Tab. 3), daß *N* α -Methyltryptophan ebenso wie *N* ω -Methyltryptamin wesentlich schlechter in die Zellen eindringt als Tryptophan. Dies zeigt, daß man dem Problem der Permeabilität bei derartigen Versuchen große Beachtung schenken muß. Um die unterschiedliche Aufnahme zu berücksichtigen, muß man die Einbaurate des *N* α -Methyltryptophans auf die in das Mycel aufgenommene Menge beziehen. Nach der Fermentation konnten in der Nährlösung von Versuch 1 0,9 mg und von Versuch 2 1,85 mg unverändertes Methyltryptophan gefunden werden, während vom Tryptophan beim Versuch 1 nur noch Spu-

Vers. Nr.	appliziert	Trock. Gew. Mycel [g]	Gesamt-Alkaloid Mycel [mg]	Nährlösung Menge [ml]	Gesamt-Alkaloid [mg]	Gesamt-Alkaloid Mycel + Nährlsg. [mg]	Gesamt-Aktivität der Alkaloide [dpm]*	Einbaurate [%]	Spezif. Einbaurate [%]
1	1,05 mg DL-Tryptophan $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ 1,2 · 10 ⁷ dpm plus 1,8 mg DL- <i>N</i> α -Methyltryptophan- $[\text{}^3\text{H}]$ 1,02 · 10 ⁸ dpm	2,1	10	62	94	104	5,3 · 10 ⁶ 6,6 · 10 ⁶	44,0 ¹⁴ C 6,4 ³ H	0,53 ¹⁴ C 0,13 ³ H
2	3,48 mg DL- <i>N</i> α -Methyltryptophan- $[\text{}^3\text{H}]$ 1,98 · 10 ⁸ dpm	2,1	10,5	62	96	106,5	1,22 · 10 ⁷	6,2 ³ H	0,23 ³ H
3	3,7 mg <i>N</i> ω -Methyltryptamin- $[\text{}^3\text{H}]$ · HCl 2,54 · 10 ⁸ dpm	2,1	10,5	62	102	112,5	4,45 · 10 ⁵	0,11 ³ H	0,07 ³ H
4	0,36 mg DL-Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ 4,1 · 10 ⁶ dpm	1,95	10	62	110	120	3,84 · 10 ⁶	93,5 ¹⁴ C	0,34 ¹⁴ C

Tab. 1. Der Einbau von DL-Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ (spez. Akt. 1,08 mC/mMol), DL-*N* α -Methyltryptophan- $[\text{}^3\text{H}]$ (spez. Akt. 5,56 mC/mMol) und *N* ω -Methyltryptamin- $[\text{}^3\text{H}]$ · HCl (spez. Akt. 6,46 mC/mMol) in Clavin-Alkaloide.

* Als dpm = Desintegrationen pro Min. bezeichnen wir die von der Zählzelle unabhängige absolute Radioaktivität. mC · 2,2 · 10⁹ = dpm.

¹⁰ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959]; H. SIMON u. F. BERTHOLD, Atomwirtschaft **7**, 498 [1962].

Vers. Nr.	appliziert	Trocken-Gewicht Mycel [g]	Nährlösung Menge [ml]	Gesamt-Alkaloid mg	Gesamt-Aktivität Alkaloide [dpm] *	Einbau-rate [%]	Spezif. Einbau-rate [%]
1	4,79 mg Tryptamin- $^{[3]}\text{H}$ · HCl $1,6 \cdot 10^8$ dpm	1,78	57	74	$1,25 \cdot 10^5$	0,08	0,007
2	4,65 mg <i>N</i> ω -Methyltryptamin- $^{[3]}\text{H}$ · HCl $3,16 \cdot 10^8$ dpm	1,8	58	70	$1,85 \cdot 10^5$	0,06	0,005

* s. Anm. zu Tab. 1.

Tab. 2. Der Einbau von Tryptamin- $^{[3]}\text{H}$ · HCl (spez. Akt. 2,92 mC/mMol) und *N* ω -Methyltryptamin- $^{[3]}\text{H}$ · HCl (spez. Akt. 6,46 mC/mMol) in Clavin-Alkaloide.

Vers. Nr.	Substanz	appliziert :		geerntetes Mycel		aufge-nommenes Substrat [m μ Mol]	Aufnahme-geschwindigkeit m μ Mol/Stde. · g Mycel
		Menge [m μ Mol]	Aktivität dpm *	Menge [g]	Aktivität dpm *		
1	DL- <i>N</i> α -Methyltryptophan- $^{[3]}\text{H}$	440	$5,4 \cdot 10^6$	0,74	$5,0 \cdot 10^4$	4,1	2,2
2	<i>N</i> ω -Methyltryptamin- $^{[3]}\text{H}$ · HCl	510	$7,3 \cdot 10^6$	0,71	$3,5 \cdot 10^4$	2,4	1,3
3	L-Tryptophan- $^{[3]}\text{H}$	560	$4,75 \cdot 10^6$	0,75	$2,1 \cdot 10^6$	244	130

* s. Anm. zu Tab. 1.

Tab. 3. Die Aufnahme von DL-*N* α -Methyltryptophan- $^{[3]}\text{H}$ (spez. Akt. 5,56 mC/mMol), *N* ω -Methyltryptamin- $^{[3]}\text{H}$ · HCl (spez. Akt. 6,46 mC/mMol) und L-Tryptophan- $^{[3]}\text{H}$ (spez. Akt. 3,85 mC/mMol) in das Mycel von *Claviceps purpurea*. Versuchsdauer 2 $\frac{1}{2}$ Stunden.

ren nachweisbar waren. Bezogen auf die vom Pilz aufgenommene Menge von 0,9 mg ergibt sich bei Versuch 1 für *N* α -Methyltryptophan eine Einbaureate von 12,8 Prozent. Das ist etwa ein Drittel des Wertes für Tryptophan.

Es ist noch nicht geklärt, ob vom Methyltryptophan beide optischen Antipoden in die Alkaloide eingebaut werden, wie dies beim Tryptophan der Fall ist^{11, 8}. Sollte nur eine enantiomorphe Form biologisch aktiv sein, so würde dies eine weitere Erhöhung der Methyltryptophan-Einbaureate um den Faktor 2 bedeuten.

BAXTER und Mitarbb.³ fanden kürzlich, daß nicht-radioaktives *N* α -Methyltryptophan die Einbaureate von Tryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ in die Clavine nicht erniedrigt. Unter der Voraussetzung einer guten Aufnahme der Verbindung schlossen sie daraus, daß die Ergolin-Biosynthese nicht über das *N* α -Methyl-

tryptophan verläuft. Wie unsere Aufnahmeversuche (Tab. 3) zeigen, ist die gemachte Voraussetzung jedoch nicht erfüllt.

In welcher Weise das *N* α -Methyltryptophan für die Synthese des Ergolins Verwendung findet, läßt sich nach diesen Versuchen noch nicht sagen. Es gibt mehrere Möglichkeiten, z. B.:

1. Einbau des gesamten Moleküls,
2. Entmethylierung und Verwendung des entstandenen Tryptophans,
3. Abspaltung der Seitenkette und Verwendung des Indols.

Durch Verwendung spezifisch markierter Verbindungen wie *N* α -Methyltryptophan- $[\text{CH}_3\text{-}^3\text{H}]$ und *N* α -Methyltryptophan- $[\beta\text{-}^{14}\text{C}]$ soll diese Frage weiter geklärt werden.

Unseren verehrten Lehrern, Herrn Professor Dr. K. MOTHES, Halle, und Herrn Professor Dr. F. WEYGAND, München, danken wir herzlich für die stete Förderung dieser Arbeit.

¹¹ W. A. TABER u. L. C. VINING, Chem. u. Ind. 1959, 1218.