

auf Hormon aufgearbeitet. Der Rückstand der Dialyse, reine Kerne, wurde mit 200 g feinen Glasperlen in 1 l 0,1-m. Natriumphosphatpuffer, p_H 7,5, zerschlagen. Die abgegossene Suspension wurde 20 Stdn. mit 250 mg Pronase bei 40° inkubiert, 10 min auf 80–90° erhitzt, dann wieder 20 Stdn. lang mit 500 mg Hydrolasengemisch (Boehringer) bei 37° inkubiert. Nach erneutem Erhitzen auf 90° wurde die Lösung mit HCl auf p_H 5 eingestellt und mit 500 mg saurer Phosphatase inkubiert. Die weit-

gehend eingedampfte Lösung wurde auf den Hormongehalt aufgearbeitet. In gleicher Reihenfolge haben wir auch den Überstand der 1500 g Zentrifugation behandelt. Nach der Extraktion mit Butanol wurde der Rückstand mit den einzelnen Enzymen inkubiert und nochmals extrahiert auf Häutungshormon-Aktivität.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Nichtverwertung von 4-Hydroxytryptophan bei der Biosynthese der Mutterkornalkaloide. Eine Überprüfung

H.-G. FLOSS, U. MOTHES, D. ONDERKA und U. HORNE-MANN

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München

Mit einem Addendum von E. RAMSTAD und J. BELIVEAU,
Purdue University, School of Pharmacy, Lafayette, Indiana, U.S.A.

(Z. Naturforsch. 20 b, 133–136 [1965]; eingegangen am 21. November 1964)

New experiments strengthen our earlier findings that 4-hydroxytryptophan is not a precursor of ergot alkaloids.

Wir berichteten vor einiger Zeit über Versuche zur Klärung der Frage, ob bei der Biosynthese der Mutterkornalkaloide¹ eine Aktivierung der 4-Stellung des Indolringes durch Einführung einer Hydroxylgruppe stattfindet. Aus den sehr niedrigen Einbauraten von tritiiertem 4-Hydroxytryptophan in das Elymoclavin (max. 0,02–0,04%) schlossen wir, daß dies nicht der Fall ist². Etwa zur gleichen Zeit berichteten dagegen WONG, AGURELL und RAMSTAD³ über einen sehr guten Einbau von 4-Hydroxytryptophan-[³H] in Mutterkornalkaloide (bis zu 15%). Die Diskrepanz zwischen diesen experimentellen Ergebnissen veranlaßte uns zu einer erneuten Untersuchung des Problems. Wir prüften, ob ein uns von Prof. RAMSTAD zur Verfügung gestelltes 4-Hydroxytryptophan-[³H]-Präparat unter unseren Versuchsbedingungen Einbau zeigt. Zum anderen haben wir unsere eigenen früheren Versuche wiederholt und erweitert.

Methodik

4-Hydroxytryptophan-[indol-³H] (spez. Akt. $2,16 \cdot 10^5$ dpm/mg) war das in unseren früheren Versuchen² verwendete Material. 4-Hydroxytryptophan-[G-³H] (spez. Akt. 0,97 mC/mg) wurde uns von Prof. RAMSTAD zur Verfügung gestellt⁴. Dieses Präparat war ungereinigt; es war nicht identisch mit dem von WONG et al.³ früher verwendeten Material, jedoch war es in der gleichen Weise, durch platinkatalysierten Austausch mit tritierter Essigsäure, markiert worden wie das Originalpräparat.

Zur Chromatographie von 4-Hydroxytryptophan dienten (1) 96-proz. Äthanol/konz. Ammoniak 7:3 auf Kieselgel G und (2) n-Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 auf Papier (Schleicher und Schüll 2043 b).

Als biologisches Material dienten Oberflächenkulturen des *Claviceps*-Stammes SD 58. Kultur des Pilzes und Isolierung des Elymoclavins erfolgten wie früher beschrieben⁵. Zur Dünnschichtchromatographie des Elymoclavins verwendeten wir (3) Essigester/Äthanol/Dimethylformamid 85:10:10 auf Kieselgel G und (4) Methylenchlorid/Methanol 98:2 auf Aluminiumoxyd G.

¹ Übersichten siehe a) K. WINKLER u. D. GRÖGER, Pharmazie 17, 658 [1962], b) F. WEYGAND u. H.-G. FLOSS, Angew. Chem. 75, 783 [1963]; Angew. Chem. Intern. Ed. in English, 2, 243 [1963].

² H.-G. FLOSS u. U. MOTHES, Z. Naturforsch. 18 b, 866 [1963].

³ S. WONG, S. AGURELL u. E. RAMSTAD, Chem. and Ind. 1963, 1762.

Im Versuch M 85 wurde von 2 25-ml-Oberflächenkulturen das Medium ohne Zerstörung der Myceldecke mit einer Injektionsspritze entfernt. Nach 2-maligem Waschen des Mycels mit steriler Pufferlösung wurden die Vorläufer als Lösung in 20 ml *m*/150-Phosphatpuffer p_H 7,4 unter die Myceldecke injiziert.

Alle Radioaktivitätsanalysen erfolgten durch Gasphasenmessung nach Simon et al.⁶

Ergebnisse

Im Versuch M 77 haben wir die Verwertung des von RAMSTAD zur Verfügung gestellten 4-Hydroxytryptophan-[G-³H] unter folgenden Bedingungen untersucht:

- M 77 A: Die ungereinigte Verbindung wurde zusammen mit 5 mg nichtmarkiertem 4-Hydroxytryptophan appliziert.
- M 77 B: Die Verbindung wurde in System 1 chromatographiert, die 4-Hydroxytryptophan-Zone eluiert und zusammen mit 5 mg Träger appliziert.
- M 77 C: 0,17 mg der markierten Verbindung wurden mit 30 mg Trägermaterial aus Eisessig umkristallisiert. 5,08 mg des erhaltenen Produktes wurden appliziert.

Wie die Tab. 1 zeigt, sind die Einbauraten durchwegs sehr niedrig. Tryptophan gibt unter diesen Bedingungen im allgemeinen Einbauraten von 10 bis 25 Prozent. Die Werte sind jedoch signifikant, da die Elymoclavinproben zur konstanten spezif. Radioaktivität gereinigt werden konnten.

Wir überprüften ferner die Reinheit des verwendeten 4-Hydroxytryptophan-[G-³H]. Eine Probe wurde mit Träger-4-Hydroxytryptophan aus Eisessig umkristallisiert, eine zweite nur mit Trägermaterial

gemischt. Beide Proben wurden sodann im System 2 unter Stickstoff chromatographiert, die Radioaktivität auf den Chromatogrammen wurde mit einem Scanner lokalisiert und 4-Hydroxytryptophan danach durch Besprühen mit van Urk's Reagenz nachgewiesen. Im Chromatogramm der umkristallisierten Verbindung fand sich die gesamte Radioaktivität am Start, während im Chromatogramm der nicht umkristallisierten Verbindung 6,7% der Radioaktivität mit dem 4-Hydroxytryptophan-Fleck korrespondierten, der Rest fand sich am Start.

Diese Versuche zeigen, daß das 4-Hydroxytryptophan-[G-³H] nur einen kleinen Teil seiner Radioaktivität in der chemischen Form von 4-Hydroxytryptophan enthalten kann und legen darüber hinaus den Verdacht nahe, daß auch dieser Teil der Radioaktivität nicht als 4-Hydroxytryptophan, sondern in Form einer anderen Verbindung von gleichem R_f -Wert vorliegt. Es ist daher möglich, daß die in den Versuchen M 77 gefundenen geringen Einbauraten nicht von 4-Hydroxytryptophan, sondern von einer anderen Verbindung herrühren.

Eine Überprüfung des in unseren früheren Versuchen verwendeten 4-Hydroxytryptophan-[indol-³H] bestätigte zwar den Befund², daß die Verbindung bei der Chromatographie nur einen mit 4-Hydroxytryptophan identischen Fleck gibt, jedoch enthält dieser Fleck nur ca. 40% der Aktivität. Der Rest erscheint bei einem etwas höheren R_f -Wert (System 2). An dieser Stelle läßt sich mit Sprühreagenzien kein Fleck nachweisen, so daß es sich offenbar um eine Verunreinigung von sehr hoher spezif. Aktivität handelt, die wahrscheinlich bei der Austauschtritierung durch Zersetzung entstanden ist. Dieser Befund ändert nichts an unseren früheren Ergebnis-

Versuch Nr.	applizierte Verbindung	applizierte Akt. [dpm]	gebildet. Alkaloid [mg]	Ges. Akt. i. Elymoclavin [dpm]	Einbaurate [%]
M 77 A	5 mg 4-Hydroxytryptophan-[G- ³ H] (ungereinigt)	$7,31 \cdot 10^6$	95	$3,15 \cdot 10^4$	0,43
M 77 B	5 mg 4-Hydroxytryptophan-[G- ³ H] (chromatographiert)	$1,83 \cdot 10^5$	72	$2,52 \cdot 10^3$	1,4
M 77 C	5,08 mg 4-Hydroxytryptophan-[G- ³ H] (umkristallisiert)	$4,14 \cdot 10^6$	69	$1,05 \cdot 10^4$	0,25

Tab. 1. Einbau von 4-Hydroxytryptophan-[G-³H] in Elymoclavin durch Oberflächenkulturen von *Claviceps spec.*, Stamm SD 58 (Versuchsdauer 23 Tage).

⁴ Wir danken Herrn Professor RAMSTAD für die Überlassung dieses Präparates.

⁵ H.-G. FLOSS u. D. GRÖGER, Z. Naturforschg. **18 b**, 519 [1963].

⁶ H. SIMON, H. DANIEL u. J. F. KLEBE, Angew. Chem. **71**, 303 [1959]; H. SIMON u. F. BERTHOLD, Atomwirtschaft **7**, 498 [1962].

sen. Wir haben dennoch das 4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H] im System 2 chromatographisch gereinigt — es zeigte danach nur noch ein Radioaktivitätspeak beim R_f -Wert des 4-Hydroxytryptophans — und zusammen mit Tryptophan-[β - ^{14}C] im Versuch M 84 appliziert. Tab. 2 zeigt, daß das Tryptophan mindestens 300-mal besser verwertet wird als das 4-Hydroxytryptophan. Dieses Verhältnis ist ein Mindestwert, da das Elymoclavin nicht bis zur konstanten Tritiumaktivität umkristallisiert werden konnte. Damit ist gezeigt, daß während der Versuchszeit alle Voraussetzungen für den Einbau eines Vorläufers erfüllt sind.

Eine letzte Fehlermöglichkeit, die es auszuschließen galt, bestand in der Instabilität von 4-Hydroxytryptophan in wäßriger Lösung. Wir konnten nach unseren Versuchen, die über 15–25 Tage liefen, im Medium kein 4-Hydroxytryptophan mehr nachweisen. Es mußte daher damit gerechnet werden, daß

Applizierte Verbindungen	
DL-Tryptophan-[β - ^{14}C]	2 mg = $1,40 \cdot 10^5$ dpm ^{14}C
DL-4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H]	3 mg = $1,74 \cdot 10^5$ dpm ^3H
gebildetes Alkaloid	32 mg
Gesamtaktivität im Elymoclavin (1. Kristallisation)	$1,97 \cdot 10^4$ dpm ^{14}C + $1,44 \cdot 10^2$ dpm ^3H
Gesamtaktivität im Elymoclavin (2. Kristallisation)	$1,99 \cdot 10^4$ dpm ^{14}C + $8,1 \cdot 10^1$ dpm ^3H
Einbauraten	^{14}C : 14,2% ^3H : 0,047% (max.)
Verhältnis der Einbauraten (Tryptophan: 4-Hydroxytryptophan)	304

Tab. 2. Einbau von 4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H] und Tryptophan-[β - ^{14}C] in Elymoclavin durch eine Oberflächenkultur von *Claviceps spec.*, SD 58 (Versuch M 84, Dauer 20 Tage).

sich die Verbindung bereits während der ersten Stdn. vollständig zersetzt und aus diesem Grunde nicht eingebaut wird. Diese Möglichkeit konnten wir im Versuch M 85 ausschließen. Hier wurde das Medium einer Oberflächenkultur unter sterilen Bedingungen durch eine Lösung der Vorläufer in Phosphatpuffer, 4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H] + Tryptophan-[β - ^{14}C] im Versuch M 85 A und 4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H] allein im Versuch M 85 B, ersetzt. Beide Kulturen wurden 8 Stdn. inkubiert. Aus Versuch M 85 A wurde Elymoclavin isoliert und

nacheinander in den Systemen 3 und 4 chromatographiert. Eine weitere Reinigung war wegen der geringen Alkaloidmenge nicht möglich. Dennoch zeigte sich bereits nach diesen Reinigungsschritten, daß auch in diesem Falle Tryptophan wesentlich besser verwertet wurde als 4-Hydroxytryptophan. Die Pufferlösung von Versuch M 85 B wurde gefriergetrocknet, der Rückstand in Äthanol aufgenommen und im System 2 chromatographiert. Alle diese Operationen erfolgten unter Stickstoff. Das Chromatogramm zeigte genau die gleiche Radioaktivitäts-Verteilung wie das des Ausgangsmaterials. In der Versuchszeit von 8 Stdn. tritt also keine nennenswerte Zersetzung des 4-Hydroxytryptophans ein; dennoch wird in dieser Zeit Tryptophan in die Alkaloide eingebaut, 4-Hydroxytryptophan dagegen praktisch nicht.

Applizierte Verbindungen	
5 mg DL-Tryptophan, spez. Akt.	$3,99 \cdot 10^6$ dpm/mM ^{14}C
+ 5 mg DL-4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H], spez. Akt.	$4,75 \cdot 10^7$ dpm/mM ^3H
gebildetes Alkaloid	432 γ
spez. Akt. des isolierten Elymoclavins	$7,6 \cdot 10^4$ dpm/mM ^{14}C + $6,7 \cdot 10^4$ dpm/mM ^3H
spez. Einbauraten	^{14}C : 1,9%, ^3H : 0,14% (max.)
Verhältnis der spez. Einbauraten (Tryptophan: 4-Hydroxytryptophan):	13,5

Tab. 3. Einbau von 4-Hydroxytryptophan-[indol- ^3H] und Tryptophan-[β - ^{14}C] in Elymoclavin durch eine Replacementkultur von *Claviceps spec.*, SD 58 (Versuch M 85 A, Dauer 8 Stdn.).

Die geschilderten Versuche stützen und erweitern unsere früheren Ergebnisse über den Nichteinbau von 4-Hydroxytryptophan und erhärten unsere Ansicht, daß bei der Biosynthese der Mutterkornalkaloide keine Aktivierung der 4-Stellung des Indolringes durch Hydroxylierung erfolgt. Wie uns Prof. RAMSTAD und Dr. AGURELL mitteilten⁷, sind sie bei einer erneuten Untersuchung des Problems zu dem gleichen Ergebnis gekommen.

Wir danken Herrn Professor WEYGAND für seine Unterstützung, Frl. PFLAUMER und Frl. WOLF für die Ausführung der Radioaktivitätsanalysen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Mitteln.

⁷ E. RAMSTAD u. S. AGURELL, Privatmitteilungen.

Addendum by E. RAMSTAD and J. BELIVEAU
Purdue University *

Investigations of the possibility of 4-hydroxytryptophan serving as a precursor of ergot alkaloids¹ were initiated by Dr. AGURELL and carried out as a thesis work in this laboratory^{2, 3}. Contrary findings of FLOSS and MOTHES⁴ prompted us to retest the data².

DL-4-Hydroxytryptophan, tritiated by Tracer Laboratory, Boston, by the Pt-catalyst method, contained some dark-colored impurities and some tryptophan formed during the tritiation process. The impurities were eliminated in a double paper-chromatographic purification process under nitrogen: 20-hour descending chromatography in ethyl acetate-acetic acid-water (11:2:2) and in butanol-acetic acid-water (4:1:1), in which systems complete separation is achieved. Before each chromatographic run, non-labeled tryptophan was added as a carrier of this radioactive impurity. Identity and radiochemical purity was tested by co-chromatography with 4-hydroxytryptophan, color tests and strip scanning.

Incorporation experiments (methods: l. c.⁵) with the highly purified material, using ergot strain 47 A and a growth medium of maltose, glucose and yeast extract (2%:2%:1%) gave incorporations not exceeding 0.2% in the purified alkaloid fractions, while similar experiments with tryptophan-2-C-14 gave incorporations from 9.8 to 13.4% during 24 hours.

Similar results have been obtained by AGURELL (personal communication). A typical experiment carried out by AGURELL, comparing the efficiency of DL-tryptophan-G-H³ and DL-4-hydroxytryptophan-G-H³ as precursors under the same conditions, is shown in Fig. 1.

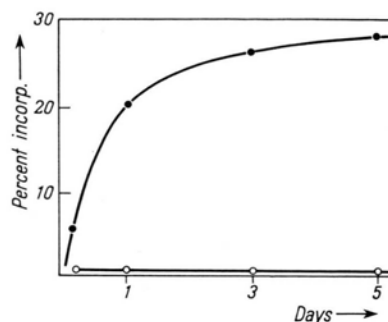


Fig. 1. Incorporation of H³ into alkaloid fraction. Medium: maltose (2%), glucose (2%), yeast extract (1%). 30 ml medium/flask. 2.6 μ C/flask. Homogenized inoculum. Cultures at start: 17 days old. Temp.: 25 °C. ● — from DL-tryptophan-G-H³, ○ — from DL-4-hydroxytryptophan-G-H³.

Thus, we have not been able to obtain the high incorporation figures given in WONG's thesis², but instead found incorporation percentages of a magnitude that makes 4-hydroxytryptophan an unlikely precursor, especially when one compares the efficient utilization of tryptophan for alkaloid formation under same conditions.

¹ A. BRACK, A. HOFMANN, F. KALBERER, H. KOBEL, and J. RUTSCHMANN, *Arch. Pharm.* **294**, 230 [1961].

² S. WONG, Formation of Ring C in the Biogenesis of Ergot Alkaloids, Thesis, Purdue University, Dec. 1963.

³ S. WONG, S. AGURELL, and E. RAMSTAD, *Chem. Ind.* **1963**, 1762.

⁴ H.-G. FLOSS and U. MOTHES, *Z. Naturforsch.* **13b**, 866 [1963].

⁵ S. AGURELL and E. RAMSTAD, *Arch. Biochem. Biophysics* **98**, 457 [1962].

* Supported by National Institutes of Health grant GM-11245.