

ZUR FRAGE DER BIOSYNTHESE DES CHANOCLAVINS

K. Mothes und K. Winkler

Institut für Biochemie der Pflanzen der

Deutschen Akademie der Wissenschaften

zu Berlin, Halle a.d. Saale

(Received 1 September 1962)

DIE japanischen Autoren Abe und Yamatodani<sup>1</sup> konnten 1954 erstmalig aus Sklerotien und saprophytischen Kulturen verschiedener Mutterkornpilze ein von ihnen als Alkaloid X bzw. Secaclavin bezeichnetes Alkaloid isolieren. Von Hofmann und Mitarb.<sup>2</sup> wurde die Substanz aus saprophytischen Kulturen eines Mutterkornpilzes der afrikanischen Kolbenhirse gewonnen und in seiner Struktur aufgeklärt. Spätere Arbeiten<sup>3,4</sup> haben die Identität von Secaclavin und Chanoclavin bewiesen.

Von allen uns bekannten Mutterkornalkaloiden ist das Chanoclavin durch einen besonderen strukturellen Aufbau unterschieden. Das für die Mutterkornalkaloide charakteristische tetracyclische Ringsystem des Ergolins ist beim Chanoclavin nicht vollständig ausgebildet, da der Ring D zwischen dem N-Atom 6 und dem C-Atom 7 nicht geschlossen ist. Chanoclavin ist ebenso wie Elymoclavin und andere Clavinalkaloide konfigurativ der Dihydrolysergsäure (I)-Reihe zuzuordnen<sup>2,5,6</sup>.

<sup>1</sup> M. Abe und S. Yamatodani, J. agr. chem. Soc. Japan **28**, 501 (1954)

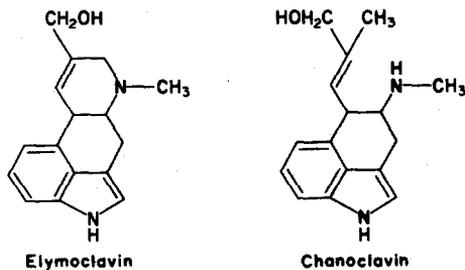
<sup>2</sup> A. Hofmann, R. Brunner, H. Kobel und A. Brack, Helv. chim. Acta **40**, 1358 (1957)

<sup>3</sup> M. Abe, T. Yamano, S. Yamatodani, Y. Kozu, M. Kusumoto, H. Komatsu und S. Yamada, Bull. agric. chem. Soc. Japan **23**, 246 (1959).

<sup>4</sup> R. Voigt, Naturwissenschaften **46**, 401 (1959).

<sup>5</sup> S. Yamatodani und M. Abe, Bull. agric. chem. Soc. Japan **19**, 94 (1955).

<sup>6</sup> E. Schreier, Helv. chim. Acta **41**, 1984 (1958).



Es ist nicht bekannt, wie die Bildung des Chanoclavins im Mutterkorn erfolgt. Es wäre denkbar, dass es in völlig selbständiger Weise gebildet wird und zu anderen Mutterkornalkaloiden keine biogenetischen Beziehungen aufweist. Es könnte weiterhin Vorstufe der Clavin- und Peptidalkaloide sein und bei deren Bildung als Zwischenprodukt auftreten. Es kann aber auch als Umwandlungsprodukt anderer Mutterkornalkaloide aufgefasst werden. Für diese Auffassungen gibt es in der Literatur Hinweise<sup>7-11</sup>.

Wir haben unsere kürzlich mitgeteilten Versuche<sup>12</sup> zur Umwandlung von Elymoclavin in Lysergsäurederivate an einer grösseren Anzahl Sklerotien wiederholt und dabei mit Hilfe unserer Methodik<sup>13</sup> die Synthese des Chanoclavins überprüft.

<sup>7</sup> M. Abe, A Consideration the Biosynthesis of the Ergot Alkaloids, 2. Arbeitstagung "Biochemie und Physiologie der Alkaloide" Halle/Saale, 21.-25. Mai 1960.

<sup>8</sup> H. Rochelmeyer, Pharmaz. Ztg. **103**, 1269 (1958).

<sup>9</sup> D. Gröger, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. **292/64**, 389 (1959).

<sup>10</sup> K. Mothes, Pharmazie **14**, 121 (1959).

<sup>11</sup> R. Voigt, Pharmazie **17**, 156 (1962).

<sup>12</sup> K. Mothes, K. Winkler, D. Gröger, H.-G. Floss, U. Mothes und F. Weygand, Tetrahedron Letters (London) **1962**, im Druck.

<sup>13</sup> K. Winkler und K. Mothes, Planta med. (Stuttgart) **10**, 208 (1962).

Im Freiland angebauter Roggen wurde mit dem bulgarischen Ergotaminstamm Ei 1982 beimpft. Beginnend am 18. Tag nach der Impfung entnahmen wir im Abstand von 2 - 4 Tagen 3 Sklerotien gleicher Grösse und Entwicklungszustandes. Wir verabreichten an je eines der Sklerotien:

- 1) 20  $\mu\text{g}$  Elymoclavin- $^{14}\text{C}$  (spezifische Aktivität  $5,09 \times 10^8$  Ipm/mM)
- 2) 35  $\mu\text{g}$  Elymoclavin- $^3\text{H}$  (spezifische Aktivität  $2,8 \times 10^8$  Ipm/mM)

Das 3. Sklerotium wurde als Kontrolle mit der entsprechenden Menge Wasser behandelt. Die Zugabe der radioaktiven Substanzen erfolgte am Tage der Entnahme des Sklerotiums vom Roggen, die Aufarbeitung des Materials nach einer Einwirkungszeit von 2 Tagen. Chanoclavin isolierten wir mit der für Elymoclavin angegebenen Methode<sup>12</sup>. Die Dünnschichtchromatographie an einem Gemisch von Kieselsäure, Aluminiumoxyd und wasserfreiem Kalziumsulfat ermöglicht die vollständige Abtrennung des Chanoclavins von Lysergsäure und den Clavinen. Das eluierte Chanoclavin ist frei von Elymoclavin. Das ebenfalls nach Dünnschichtchromatographie isolierte Ergotamin war bei sich anschliessender Papierchromatographie<sup>14</sup> rein und enthielt kein Elymoclavin.

Die Ergebnisse des Versuches sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Es ist ersichtlich, dass Chanoclavin erst am 38. Tag gefunden wurde. Es kann nichts darüber ausgesagt werden, ob es zu einem früheren Zeitpunkt bereits in geringen Mengen im Sklerotium vorhanden ist. Da zur Analyse jeweils der Alkaloidextrakt nur eines Sklerotiums gelangte, kann sich Chanoclavin bei geringem Alkaloidgehalt unreifer Sklerotien dem Nachweis entziehen.

Die erneute Zunahme der Einbauraten des Ergotamins am 38. Tag ist dadurch zu erklären, dass zu diesem Zeitpunkt die Sklerotien bereits verhärtet und biosynthetisch inaktiv und die Elymoclavinlösungen nur nach erneutem Aufweichen und nach Wiederaktivierung des Sklerotiums zu applizieren waren.

<sup>14</sup> K. Macek, A. Černý und M. Semonský, Pharmazie 9, 388 (1954).

TABELLE 1

Einbau von Elymoclavin in Ergotamin und Chanoclavin im Sklerotium

| Tage<br>nach<br>Impf. | $^3\text{H}$ - Markierung |                                    |                            | $^{14}\text{C}$ - Markierung |                                    |                            |
|-----------------------|---------------------------|------------------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
|                       | Ergotamin                 |                                    |                            | Ergotamin                    |                                    |                            |
|                       | Einbau-<br>rate<br>%      | spezifische<br>Aktivität<br>Ipm/mM | spez.<br>Einbau-<br>rate % | Einbau-<br>rate<br>%         | spezifische<br>Aktivität<br>Ipm/mM | spez.<br>Einbau-<br>rate % |
| 18                    | 2,0                       | $1,32 \times 10^7$                 | 4,7                        | 5,5                          | $2,25 \times 10^7$                 | 4,4                        |
| 21                    | 4,3                       | $1,71 \times 10^7$                 | 6,1                        | 12,6                         | $2,99 \times 10^7$                 | 5,8                        |
| 24                    | 77,0                      | $7,63 \times 10^7$                 | 27,2                       | 71,0                         | $4,46 \times 10^7$                 | 8,7                        |
| 26                    | 57,0                      | $2,37 \times 10^7$                 | 8,4                        | 22,3                         | $8,6 \times 10^6$                  | 1,7                        |
| 29                    | 41,0                      | $1,75 \times 10^7$                 | 6,2                        | 11,1                         | $6,35 \times 10^6$                 | 1,2                        |
| 32                    | 28,8                      | $1,07 \times 10^7$                 | 3,8                        | 4,5                          | $1,75 \times 10^6$                 | 0,3                        |
| 35                    | 2,8                       | $1,04 \times 10^6$                 | 0,3                        | 1,3                          | $5,88 \times 10^5$                 | 0,1                        |
| 38                    | 17,5                      | $3,24 \times 10^6$                 | 1,1                        | 11,9                         | $2,9 \times 10^6$                  | 0,5                        |
| 41                    | 6,9                       | $1,58 \times 10^6$                 | 0,5                        | 8,7                          | $3,48 \times 10^6$                 | 0,6                        |
| 45                    | 5,1                       | $3,61 \times 10^6$                 | 1,3                        | 3,0                          | $2,98 \times 10^6$                 | 0,5                        |
|                       | Chanoclavin               |                                    |                            | Chanoclavin                  |                                    |                            |
| 38                    | 0,5                       | $3,0 \times 10^6$                  | 1,0                        | 0,8                          | $6,3 \times 10^6$                  | 1,2                        |
| 41                    | 1,7                       | $1,24 \times 10^7$                 | 4,4                        | 1,0                          | $1,38 \times 10^7$                 | 2,7                        |
| 45                    | 2,2                       | $1,17 \times 10^7$                 | 4,1                        | 1,5                          | $1,25 \times 10^7$                 | 2,4                        |

TABELLE 2  
 Einbau von Elymoclavin-<sup>14</sup>C in Ergotamin und  
 Chanoclavin in 32 Tage alten Sklerotien

| Tage n.<br>Applik. | Ergotamin         |                      |                       | Chanoclavin       |                      |                       |
|--------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
|                    | Einbau-<br>rate % | spez. Akt.<br>Ipm/mM | spez. Ein-<br>baur. % | Einbau-<br>rate % | spez. Akt.<br>Ipm/mM | spez. Ein-<br>baur. % |
| 1                  | 5,5               | $1,9 \times 10^6$    | 0,3                   |                   |                      |                       |
| 2                  | 5,8               | $2,03 \times 10^6$   | 0,4                   |                   |                      |                       |
| 3                  | 6,0               | $2,23 \times 10^6$   | 0,4                   |                   |                      |                       |
| 5                  | 6,4               | $2,89 \times 10^6$   | 0,5                   |                   |                      |                       |
| 6                  | 6,2               | $2,84 \times 10^6$   | 0,5                   |                   |                      |                       |
| 7                  | 6,8               | $2,9 \times 10^6$    | 0,5                   |                   |                      |                       |
| 8                  | 15,5              | $6,45 \times 10^6$   | 1,2                   |                   |                      |                       |
| 9                  | 8,8               | $4,58 \times 10^6$   | 0,9                   |                   |                      |                       |
| 10                 | 3,5               | $2,17 \times 10^6$   | 0,4                   |                   |                      |                       |
| 12                 | 3,1               | $1,53 \times 10^6$   | 0,3                   |                   |                      |                       |
| 13                 | 2,4               | $1,57 \times 10^6$   | 0,3                   | 0,1               | $1,79 \times 10^7$   | 3,5                   |
| 14                 | 2,2               | $1,57 \times 10^6$   | 0,3                   | 0,3               | $1,07 \times 10^7$   | 2,1                   |
| 15                 | 16,2              | $2,06 \times 10^7$   | 4,0                   | 1,5               | $7,68 \times 10^7$   | 15,0                  |
| 16                 | 10,7              | $5,07 \times 10^6$   | 0,9                   | 2,0               | $2,08 \times 10^8$   | 40,7                  |
| 17                 | 5,0               | $4,6 \times 10^6$    | 0,9                   | 1,5               | $3,84 \times 10^7$   | 7,5                   |
| 19                 | 12,5              | $1,28 \times 10^7$   | 2,5                   | 1,2               | $4,1 \times 10^7$    | 8,0                   |
| 20                 | 5,1               | $3,23 \times 10^6$   | 0,6                   | 2,1               | $7,4 \times 10^7$    | 14,5                  |
| 21                 | 4,5               | $3,45 \times 10^6$   | 0,6                   | 2,4               | $6,3 \times 10^7$    | 12,5                  |
| 22                 | 5,0               | $2,74 \times 10^6$   | 0,5                   | 1,7               | $8,97 \times 10^7$   | 17,6                  |
| 23                 | 8,5               | $4,98 \times 10^6$   | 0,9                   | 1,6               | $3,43 \times 10^7$   | 6,7                   |

In einem weiteren Versuch erhielten 20 Sklerotien 32 Tage nach der Impfung isoliert vom Roggen je 20  $\mu\text{g}$  Elymoclavin- $^{14}\text{C}$  angegebener spezifischer Aktivität. Die Aufarbeitung erfolgte beginnend nach 1-tägiger Einwirkung im Abstand von 1 - 2 Tagen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Chanoclavin konnte in den ersten 12 Tagen nach der Zugabe des Elymo-clavin- $^{14}\text{C}$  nicht nachgewiesen werden.

Die Versuche bestätigen zunächst unsere bisherigen Ergebnisse<sup>13,12</sup>, nach denen eine direkte Umwandlung von Elymoclavin in Ergotamin im Sklerotium angenommen werden konnte. Es ist nun sicher, dass diese Umwandlung vom Reifezustand des Sklerotiums abhängig ist. Unter den gewählten Versuchsbedingungen sind die Einbauraten weiterhin durch den Trocknungszustand beeinflusst.

Nach Verabreichung von markiertem Elymoclavin an reifende Sklerotien wurde aber auch markiertes Chanoclavin isoliert. Da es in hohem Masse unwahrscheinlich ist, dass aus Elymoclavin Methyltryptamin oder Acetat entsteht und dass daraus Chanoclavin resynthetisiert wird, deuten die Versuche darauf hin, dass Chanoclavin aus Elymoclavin eventuell über Ergotamin durch Ringöffnung entstehen kann.

Damit ist bewiesen, dass Chanoclavin als Folgeprodukt der Synthese von Clavinen oder Peptidalkaloiden anzusehen ist. Ob es ausserdem als ein Vorläufer dieser Alkaloide mit geschlossenem Ergolinsystem fungieren kann, wird durch Verfütterung von radioaktivem Chanoclavin geprüft.