

the succeeding FOURIER syntheses. All the hydrogen atoms were found in the final difference FOURIER synthesis. A final structure factor calculation including anisotropic temperature factors for the nonhydrogen atoms and  $B$  value of  $4\text{\AA}^2$  for the hydrogen atoms gave an  $R$  value of 0.089.

The structure of Tryptanthrin consists of a series of 4 condensed rings making a completely planar system. Figure 2 shows a projection of the molecule on its mean plane: the largest deviation from this plane is  $0.06\text{\AA}$ .

The planarity of tryptanthrin, confirmed by the present crystallographic analysis, agrees very well with the aforesaid spectroscopic evidence for an aromatic character of the complete molecule.

A compound of the formula I, 6,12-dihydro-6,12-dioxoindolo-[2,1-b]-quinazoline, had been known before as

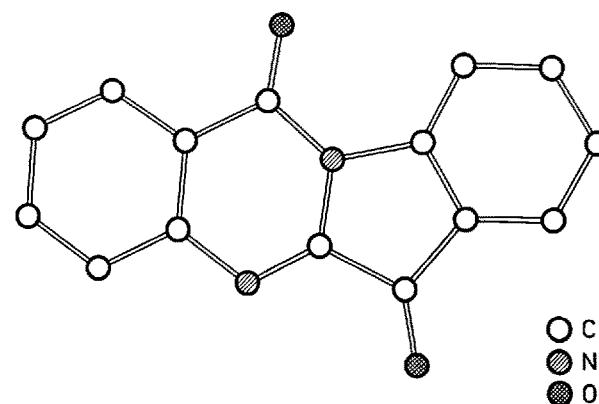


Fig. 2. A schematic drawing of the molecule projected on the mean plane.

a synthetic compound<sup>3</sup>. However, its formation in living cells and its biological activity were unknown. It is formed by the condensation of isatine methyl ether with *o*-aminobenzaldehyde, followed by the oxidation of the intermediate alcohol (BIRD) or by the condensation of isatinyl chloride with anthranilic acid (FRIEDLÄNDER and ROSCHDESWENSKY). Synthetic samples prepared according to BIRD and to FRIEDLÄNDER and ROSCHDESWENSKY<sup>3</sup> proved to be identical with the natural compound in thin-layer chromatography, melting point, and by spectroscopic methods.

**Zusammenfassung.** Eine Röntgenstrukturanalyse des Antibiotikums Tryptanthrin ergab die Strukturformel I. Tryptanthrin erwies sich als identisch mit synthetischem 6,12-Dihydro-6,12-dioxoindolo-[2,1-b]-chinazolin.

M. BRUFANI<sup>4</sup>, W. FEDELI<sup>5</sup>, F. MAZZA<sup>5</sup>  
A. GERHARD<sup>6</sup> and W. KELLER-SCHIERLEIN<sup>6</sup>

*Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi, I<sup>a</sup> Cattedra, Roma (Italy), Laboratorio di Strutturistica Chimica 'Giordano Giacomello', CNR, Città Universitaria, Roma (Italy), and Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule Zürich, CH-8006 Zürich (Schweiz), 7 July 1971.*

<sup>3</sup> C. W. BIRD, Tetrahedron 19, 901 (1963). — P. FRIEDLÄNDER and N. ROSCHDESWENSKY, Ber. dt. chem. Ges. 48, 1841 (1915).

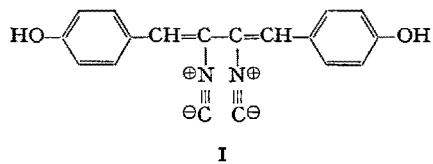
<sup>4</sup> Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica, Università degli Studi, I<sup>a</sup> Cattedra, Roma (Italy).

<sup>5</sup> Laboratorio di Strutturistica Chimica 'Giordano Giacomello', CNR, Città Universitaria, Roma (Italy).

<sup>6</sup> Organisch-chemisches Laboratorium der Eidgenössischen Technischen Hochschule, CH-8006 Zürich (Schweiz).

## Zur Biogenese des Xanthocillins, II<sup>1</sup>: Die Herkunft des Stickstoffs der Isonitril-Gruppen

Das Antibiotikum Xanthocillin X entsteht bei der Fermentation von *Penicillium notatum* Westling<sup>2</sup> und hat die Struktur des 1,4-Bis-(4-hydroxyphenyl)-2,3-diisonitrilbuta-1,3-diens (I)<sup>3</sup>. Derivate des Xanthocillins (Methyläther, m-Methoxy-methyläther) wurden auch in Kulturlösungen einer *Aspergillus*-Art und in *Dichotomomyces albus* aufgefunden<sup>4</sup>.



Wie frühere Untersuchungen zeigten, ist Tyrosin ein guter Vorläufer für das 1,4-Diphenyl-butadien-Gerüst von I, während die Kohlenstoffatome der Isonitril-Gruppen überraschenderweise nicht aus dem bekannten C<sub>1</sub>-Stoffwechsel (Methionin, Formiat) stammen<sup>1</sup>.

Die Frage nach der Herkunft der Stickstoffatome in den Isonitril-Gruppen verdient unter diesem Aspekt besonderes Interesse: Es ist denkbar, dass hier die Stickstoffatome des Tyrosins vorliegen, das decarboxyliert und als intakte C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-N-Einheit eingebaut wird. Im Laufe der Biosynthese erfolgt an den Stickstoffatomen Verknüpfung mit einem noch unbekannten C-Precursor, wobei im Zuge einer Reaktionsfolge schliesslich die Isonitril-Gruppen entstehen.

Einen alternativen Weg sehen wir im Einbau von Stickstoff in eine Xanthocillin-Vorstufe, die nur aus den Kohlenstoffatomen (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>) des Tyrosins besteht. Hier könnte der Stickstoff – etwa durch einen Transaminierungsmechanismus – gemeinsam mit dem Kohlenstoffatom der späteren Isonitril-Gruppe (aus einer Aminosäure?) übertragen werden. In beiden Fällen lässt sich die Entstehung der Isonitril-Funktion durch Dehydratisierung über Formylamino-Zwischenstufen erklären<sup>1</sup>.

Wie wir früher durch Einbauversuche mit <sup>15</sup>N-markiertem Tyrosin fanden, wird der Stickstoff aus Tyrosin zwar in I eingebaut, die Einbaurate beträgt für <sup>15</sup>N jedoch nur etwa 15% der gleichzeitig ermittelten Einbaurate des  $\alpha$ -Kohlenstoffatoms aus Tyrosin (Versuche mit Tyrosin-2-<sup>14</sup>C-<sup>15</sup>N)<sup>1</sup>.

Es lag nahe, dieses Ergebnis durch Transaminierungsreaktionen in der Kultur zu erklären: Dabei kann entweder markierter Stickstoff aus dem eingesetzten Tyrosin-2-<sup>14</sup>C-<sup>15</sup>N abgespalten und auf den eigentlichen Pre-

<sup>1</sup> 1. Mitteilung: H. ACHENBACH und H. GRISSEBACH, Z. Naturforsch. 20b, 137 (1965).

<sup>2</sup> W. ROTHE, Pharmazie 5, 190 (1950); Dt. med. Wschr. 79, 1080 (1954).

<sup>3</sup> I. HAGEDORN und H. TÖNYES, Pharmazie 12, 567 (1957).

<sup>4</sup> K. ANDO, G. TAMURA und K. ARIMA, J. Antibiot., Tokyo 21, 587 (1968). — A. TAKATSUKI, S. SUZUKI, K. ANDO, G. TAMURA und K. ARIMA, J. Antibiot., Tokyo 21, 671 (1968).

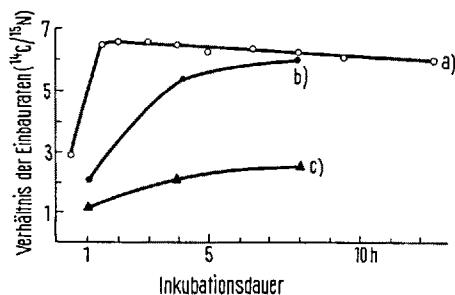
cursor übertragen werden, oder die Transaminierung führt lediglich zu einer Isotopenverdünnung im Aminstickstoff des Tyrosins, das dann als intakte  $C_6-C_2-N$ -Einheit in I eingebaut wird.

Um eine Entscheidung zwischen den eingangs aufgezeigten Alternativen zu ermöglichen, wurde der Einbau von Tyrosin-2- $^{14}C$ - $^{15}N$  in I genauer untersucht: a) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer; b) in Gegenwart von L-Alanin; c) in Gegenwart von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure. Die Zusätze in den Versuchen b) und c) sollten durch Produkthemmung die Transaminierung unterdrücken.

**Material und Methoden.** Die Fermentation von *Penicillium notatum* Westling wie auch die Isolierung des Xanthocillin erfolgte in der früher angegebenen Weise<sup>1</sup>. DL-Tyrosin-2- $^{14}C$ - $^{15}N$  erhielten wir durch Umkristallisieren einer Mischung von DL-Tyrosin-2- $^{14}C$  (The Radiochemical Centre, Amersham) mit DL-Tyrosin- $^{15}N$ <sup>5</sup>.

Die Fermentationsansätze (300 ml) wurden am 5. Tage mit jeweils 45 mg DL-Tyrosin-2- $^{14}C$ - $^{15}N$  inkubiert. Aufarbeitung erfolgte nach verschiedener Inkubationsdauer. Bei den Hemmversuchen wurden außerdem zugesetzt: 225 mg L-Alanin (Versuch b)) bzw. 135 mg 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure und 27 mg Phenylbrenztraubensäure-Na (Versuch c)).

Zur Bestimmung der Einbauraten wurde isoliertes Xanthocillin X zum Dimethyläther umgesetzt. Die Radioaktivitätsmessungen führten wir mit einem Scintillations-Spektrophotometer (Typ Tricarb) durch. Der  $^{15}N$ -Gehalt wurde massenspektrometrisch durch Peakhöhenmessung am Molekülion bei 17 eV ermittelt (Varian-MAT SM1B).



Verhältnis der Einbauraten ( $^{14}C/^{15}N$ ) im isolierten Xanthocillin nach verschiedener Inkubationsdauer. a) —○—○—○—, ohne Hemmer; b) —●—●—●—, mit Zusatz von L-Alanin; c) —▲—▲—▲—, mit Zusatz von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure.

## Carotid Occlusion and Renal Vein Free Fatty Acids

Sympathoadrenomedullary activity during emotional stress contributes to an increased mobilization of free fatty acids (FFA) from adipose tissue<sup>1</sup>. The relationship between hypertension, emotional upset and various anxiety factors to plasma FFA levels has been explored by other investigators<sup>2-4</sup> and FFA levels have been shown to increase significantly after most stressful situations. The peak increase in FFA levels has been demonstrated to occur 15–20 min<sup>3</sup> after the application of the stress factor. This increase in plasma FFA levels may be attributed to increased catecholamine production, an elevated hormonal activity or perhaps increased renin release.

BUNAG et al.<sup>5</sup> and HODGE et al.<sup>6</sup> have shown that renin release follows carotid occlusion. BRUBACHER and VANDER<sup>7</sup> have demonstrated increased renin levels in sodium depleted dogs in the resting state. NASH<sup>8</sup> has hypothesized a mechanism whereby renin release is dissociated

**Resultate und Diskussion.** Für isoliertes Xanthocillin wurde das Verhältnis der Einbauraten ( $^{14}C/^{15}N$ ) bestimmt und in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer dargestellt (Figur).

Wie die Werte zeigen, isoliert man ohne Zusatz von Hemmern (Versuch a)) 30 Minuten nach der Inkubation ein Xanthocillin, bei dem der  $\alpha$ -Kohlenstoff aus Tyrosin 3 mal besser eingebaut wird als der Stickstoff. Bereits eine Stunde später ist das Verhältnis  $^{14}C/^{15}N$  in I auf 6,5 gestiegen und ändert sich dann innerhalb der Messzeit (bis zu 13 h) nicht mehr.

Diese Ergebnisse lassen sich nur plausibel erklären, wenn Stickstoff aus Tyrosin als intakte  $C_6-C_2-N$ -Einheit in I eingebaut wird. Wir stellen uns vor, dass nach Inkubation mit Tyrosin-2- $^{14}C$ - $^{15}N$  im Fermentationsansatz sehr schnell ein Stickstoffaustausch einsetzt, der innerhalb von 1,5 h zu einer Gleichverteilung der markierten Atome führt über alle Pools, die mit Vorstufen von I in Verbindung stehen. Dabei wird der Stickstoff aus Tyrosin stärker verdünnt als der  $\alpha$ -Kohlenstoff.

Dass dieser Stickstoffaustausch über Transaminierungs-Mechanismen verläuft, legen die Ergebnisse der Einbauratenversuche in Gegenwart von Hemmern nahe: Bei kurzer Inkubationszeit unter Zusatz von inaktivem L-Alanin (Versuch b)) – als NH<sub>2</sub>-Donator zur Unterdrückung der Desaminierung des eingesetzten Tyrosins – sinkt das  $^{14}C/^{15}N$ -Verhältnis auf 2 ab.

Dieses Verhältnis nähert sich mit 1,2 dem theoretischen Wert 1, wenn durch Zusatz von 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure die intermediäre Bildung von einfach-markiertem Tyrosin-2- $^{14}C$  gehindert wird<sup>6</sup>.

**Summary.** The incorporation of tyrosine-2- $^{14}C$ - $^{15}N$  into xanthocillin X (I) by *Penicillium notatum* Westling has been investigated showing that nitrogen of the isocyanogroups originates from tyrosine, which is incorporated as  $C_6-C_2-N$ -unit.

H. ACHENBACH und F. KÖNIG

*Chemisches Laboratorium der Albert-Ludwigs-Universität, Alberstraße 21, D-78 Freiburg i. Br. (Deutschland), 15. Dezember 1970.*

<sup>5</sup> R. SCHOENHEIMER und S. RATNER, J. biol. Chem. 127, 301 (1939).

<sup>6</sup> Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie danken wir für Sachbeiträge.

from renal hemodynamics but not from the action of sodium. This suggested that the filtered load and actual sodium

<sup>1</sup> L. LEVI, *Introduction to Clinical Neurology* (Ed. E. BAJUSZ; Karger, Basel 1969), p. 78.

<sup>2</sup> A. J. COPPEN and A. G. HEGEY, J. psychosom. Res. 5, 56 (1960).

<sup>3</sup> L.A. GOTTSCHALK, J. M. CLEGHAM, G. C. GLESER and J. M. IACONO, Psychosom. Med. 27, 102 (1965).

<sup>4</sup> L. A. GOTTSCHALK, W. M. STONE, G. C. GLESER and J. M. IACONO, Life Sci. 8, 61 (1969).

<sup>5</sup> R. D. BUNAG, I. H. PAGE and J. W. McCUBBIN, Circulation Res. 19, 851 (1966).

<sup>6</sup> R. L. HODGE, R. D. LOVE and J. R. VANE, Nature, Lond. 211, 491 (1966).

<sup>7</sup> E. S. BRUBACHER and A. J. VANDER, Fedn Proc. 25, 432 (1966).

<sup>8</sup> F. D. NASH, H. H. ROSTORFER, E. G. SCHNEIDER, M. O. BAILIE and R. C. WATHAN, Am. Soc. Nephrology Oct. 18, Los Angeles (1967).