

and bacteria¹³ by means of some physical-chemical agents, further research and application of these agents can be considered as a promising method.

Zusammenfassung. *Pseudomonas-aeruginosa*-Phagen wurden durch UV-, X-Strahlen und Afridinorange inaktiviert und die erzielte Wirkung auf die Differenzierung der DNS oder RNS enthaltenden Bacteriophagen untersucht. Es ergaben sich eine auffallend schwache Inaktivierung durch Akridinorange im Dunkelversuch und

gegen Strahlenwirkung ausgesprochen sensible Phagen mit einfaseriger DNS und RNS.

J. PILLICH, E. JANOVSKÁ,
D. TOUFAROVÁ and A. KAZDOVÁ

*Institute of Biophysics,
Czechoslovak Academy of Sciences,
Křídlovopolská 135, Brno 12 (Czechoslovakia),
28 June 1971.*

Über den Einbau von Dipeptiden in Ergotoxin-Alkaloide

Es konnte gezeigt werden, dass Valin, Leucin und Prolin weitgehend spezifisch in den Peptidteil von Ergocornin bzw. Ergokryptin inkorporiert werden¹⁻³. Als unmittelbare Vorstufe des α -Hydroxy- α -amino-säure-Teils der Ergotoxine fungiert Valin^{2,3}. Nach AGURELL⁴ soll die Ergotaminbildung via Lysergylalanin verlaufen. In Analogie dazu sollte bei den Ergotoxin-Alkaloiden Lysergylvalin eine obligatorische Zwischenstufe sein, an welche die restlichen Aminosäuren sukzessive oder aber ein Dipeptid angefügt werden. Unter Verwendung eines zellfreien Extraktes bzw. der «Replacement»-Technik konnten ABE et al.^{5,6} nach Applikation von L-Leucyl-L-prolin-lactam-³H, L-Leucyl-D-prolin-lactam-³H sowie L-Phenylalanyl-L-prolin-lactam-³H und L-Phenylalanyl-D-prolin-lactam-³H) radioaktive Peptidalkaloide nachweisen. Ein chemischer Abbau wurde nicht durchgeführt. Bei den D-Prolin enthaltenden Lactamen müsste also beim Einbau Konfigurationsumkehr stattgefunden haben.

Wir untersuchten die gleiche Problematik mit einem *Claviceps*-Stamm, der submers Ergocornin und Ergokryptin bildet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle zusammengefasst. Falls ein spezifischer Einbau erfolgt, sollte nach Applikation von L-Valyl-L-leucin-U-¹⁴C (I) und L-Leucyl-L-prolin-U-¹⁴C-lactam (III) nur Ergokryptin und nach Fütterung von L-Valyl-L-prolin-U-¹⁴C-lactam (II) nur Ergocornin markiert sein. Die drei Peptide ergaben spezifische Einbauraten von etwa 1%. Es waren jeweils beide Alkaloide radioaktiv. Die Radioaktivitätsverteilung im Peptidteil der Ergotoxine ergab, dass die applizierten

Peptide vom Pilz gespalten wurden und die radioaktiven Aminosäuren sowohl in Ergocornin als auch in Ergokryptin inkorporiert worden sind. Nach Fütterung von I liessen sich 20% der Radioaktivität in der Proteinfraction des Mycels nachweisen. Prolin aus der Fraktion der freien Aminosäuren des Mycels nach Applikation von II besass nach rigoroser Reinigung eine Gesamtradioaktivität von $1,02 \times 10^4$ dpm. Aus diesen Befunden ergibt sich, dass in *Claviceps* Dipeptide spaltende Fermente enthalten sind und zumindest in unserem Fall Dipeptide nicht als unmittelbare Vorstufen zur Synthese des Peptidteiles der Ergotoxine verwertet werden.

Experimentelles. Es wurde eine Selektante des *Claviceps purpurea*-Stammes Pepty 695 eingesetzt, Fermentation nach³. Markierte Verbindungen: L-Valyl-L-Leucin-U-

¹ D. GRÖGER und D. ERGE, Z. Naturforsch. 25b, 196 (1970).

² H. G. FLOSS, G. BASMAJIAN, M. TSCHENG, D. GRÖGER und D. ERGE, Lloydia, in press.

³ W. MAIER, D. ERGE und D. GRÖGER, Biochem. Physiol. Pflanzen, 162, 559 (1971).

⁴ S. AGURELL, Acta pharm. suecica 3, 71 (1966).

⁵ M. ABE, 4. Internationales Symposium Biochemie und Physiologie der Alkaloide, Halle (Saale), Juni 1969, Abh. Dtsch. Akad. Wiss. Berlin, im Druck.

⁶ M. ABE, T. OHASHI, S. OHMOMO und T. TABUCHI, J. Agr. Chem. Soc. Japan 45, 6 (1971).

Einbau von Dipeptiden in Ergotoxin-Alkaloide

Versuche	Ergocornin			Ergokryptin		
	A	B	C	A	B	C
Spezifische Radioaktivität (dpm/mMol)	$1,02 \times 10^6$	$2,06 \times 10^6$	$2,13 \times 10^6$	$2,27 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$
Spezifische Einbaurate	0,5%	1,2%	1,03%	1%	0,93%	1,1%
Abbau	Radioaktivitätsverteilung (%)					
Lysergsäure	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	2,6	n.b.
Dimethylpyruvat	4	16	4,4	10	3,4	7,5
Prolin	5	72	86	8,4	91,6	90
Leucin	—	—	—	80,5	3,4	5
Valin	44	4,9	4,8	—	—	—

n.b., nicht bestimmt.

Verfüttert wurden: A) 5,8 mg L-Valyl-L-leucin-U-¹⁴C ($2,13 \times 10^6$ dpm/mMol), Dauer 17 h; B) 10,7 mg L-Leucyl-L-prolin-U-¹⁴C-lactam ($2,02 \times 10^6$ dpm/mMol), Dauer 44 h; C) 18 mg L-Valyl-L-prolin-U-¹⁴C-lactam ($2,07 \times 10^6$ dpm/mMol), Dauer 24 h.

^{14}C (I) wurde in Anlehnung an⁷ nach der Methode der gemischten Anhydride synthetisiert. Smp. 283° (Lit. 283° ⁸).

L-Valyl-L-prolin-U- ^{14}C -lactam (II): In Anlehnung an⁹ liess sich der Z-L-valin-*p*-nitrophenylester gewinnen. Smp. 63° (Lit. 63° ¹⁰). Dieser Ester wurde mit L-Prolin-U- ^{14}C -äthylesterhydrochlorid zu II umgesetzt. Smp. 188° (Lit. 187° ¹¹). III in analoger Weise wie II. Smp. 160° (Lit. 159° ¹¹); 160° ¹².

Die radioaktiven Vorstufen wurden an 5 Tage alte Kulturen appliziert. Die Trennung der Alkaloidgemische erfolgte durch präparative Schichtchromatographie, Versuch A). 1. Kieselgel PF₂₅₄ Merck, Chloroform: Äthanol (9:1). 2. Aluminiumoxid PF₂₅₄ Merck, Chloroform: Äther: Wasser (3:1:1)¹³. Versuche B) und C). 1. Kieselgel PF₂₅₄ Merck, Toluol:Aceton:Ameisensäure (85%ig) (5:4:1). 2. Kieselgel PF₂₅₄, Toluol:Aceton:Ameisensäure (85%ig) (5,5:4:0,5). Gearbeitet wurde bei einer Raumtemperatur von 15°C . 3. Alox-Trennung wie bei A). Diese Technik erwies sich als erforderlich, um eine eindeutige Abtrennung der Lactame von den Ergotoxinen zu erreichen.

Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung wurde mit inaktivem Material verdünnt, umkristallisiert und die Ergotoxine einem chemischen Abbau^{3,14} unterworfen. Nach der KOH-Spaltung wurde die Lysergsäure durch PC isoliert, das Dimethylpyruvat als Dinitrophenylhydrazon-Derivat und die Aminosäuren als die entsprechenden DNP-Derivate erfasst. Die Radioaktivitätsbestimmungen erfolgten im Tricarb-Flüssigkeitsszintillationsspektrometer Modell 3365.

Summary. L-Valyl-L-leucine-U- ^{14}C , L-valyl-L-proline-U- ^{14}C -lactam and L-leucyl-L-proline-U- ^{14}C -lactam were

administered to submerged cultures of an ergotoxine-mixture-producing strain of *Claviceps purpurea*. The added dipeptides were split by the fungus into the corresponding amino acids prior to incorporation. Apparently dipeptides are no immediate precursors for the peptide side-chain of ergotoxinealkaloids.

D. GRÖGER und S. JOHNE

*Institut für Biochemie der Pflanzen des Forschungszentrums für Molekularbiologie und Medizin der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
DDR-401 Halle/S., Weinberg,
6. August 1971*

⁷ K. LÜBKE und E. SCHRÖDER, Justus Liebigs Annl. Chem. 665, 205 (1963).

⁸ J. P. BURNETT und F. HAUROWITZ, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 331, 67 (1963).

⁹ M. BODANSKY und V. DUVIGNEAUD, J. Am. chem. Soc. 81, 5688 (1959).

¹⁰ B. ISELIN, W. RITTEL, P. SIEBER und R. SCHWYZER, Helv. chim. Acta 40, 373 (1957).

¹¹ A. BUTENANDT, P. KARLSON und W. ZILLIG, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 288, 279 (1951).

¹² E. FISCHER und G. REIF, Justus Liebigs Annl. Chem. 363, 126 (1908).

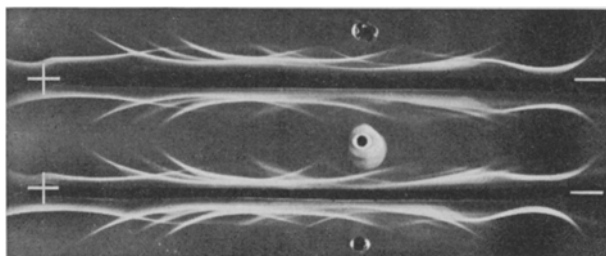
¹³ J. L. McLAUGHLIN, J. E. GOYAN und A. G. PAUL, J. pharm. Sci. 53, 306 (1964).

¹⁴ G. BASMADJIAN, Thesis, Purdue University, Lafayette, USA (1970).

Über die Funktion der Eiweissdrüse von *Helix pomatia*

Zur Funktion der sogenannten Eiweissdrüse von Schnecken, die dem Geschlechtsapparat der Tiere angeschlossen ist, ist bisher wenig bekannt¹. Daher war die Entdeckung eines blutgruppenaktiven Anti-A-Agglutinins^{2,3} in dieser Drüse bei der Weinbergschnecke *Helix pomatia* von grossem Interesse. Wie weitere Untersuchungen zeigten, reagiert dieses antikörperähnliche Prinzip nicht nur mit dem α -N-Acetyl-D-Galaktosamin von Blutzellen³, sondern auch mit dem gleichen Hexosamin an Bakterien sowie mit der β -N-Acetyl-D-Glucosamin-haltigen Struktur der bakteriellen Teichonsäure⁴. Als dritte Spezifität konnten wir kürzlich Anti-Dextran-Aktivität feststellen⁵. Aufgrund dieser Tatsachen nehmen wir eine Schutzfunktion dieser antibakteriell wirkenden Substanzen für das im Geschlechtsapparat gebildete Ei an und nannten diese auch in den Drüsen und Eiern anderer Schneckenarten vorkommenden Agglutinine Protektine⁶. Unsere Hypothese, dass die Eiweissdrüse als Schutzstoffproduzent für das Ei eine wichtige Aufgabe erfüllt, wurde weiter gestützt durch das Auffinden polyvalenter Proteinaseinhibitoren in der Eiweissdrüse und in den Eiern verschiedener Schnecken⁷.

In dieser Mitteilung soll nun mit Hilfe der Immunelektrophorese der Beweis erbracht werden, dass die Inhaltsstoffe der Eiweissdrüse mit denen des Eis identisch sind (Figur). Es ist ersichtlich, dass es sich in der Drüse und in dem Ei um die gleichen Verbindungen handelt. Dabei ist bemerkenswert, dass Antiseren gegen den Extrakt aus der Eiweissdrüse von *Helix pomatia* auch mit dem Extrakt aus den Eiweissdrüsen und Eiern anderer



Immunelektrophorese (Special Agar-Noble, DIFCO). Oberes und unteres Loch: Rohextrakt aus Eiern von *Helix pomatia*. Mittleres Loch: Rohextrakt aus der Eiweissdrüse von *Helix pomatia*. Gräben: Antiserum vom Kaninchen gegen den Rohextrakt aus der Eiweissdrüse von *Helix pomatia*.

¹ R. KILIAS, Weinbergschnecken (VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1960).

² O. PROKOP, A. RACKWITZ und D. SCHLESINGER: J. forens. Med. 12, 108 (1965).

³ Z. KIM, G. UHLENBRUCK, O. PROKOP und D. SCHLESINGER, Z. Immun. Forsch. exp. Ther. 130, 190 (1966).

⁴ E. HAMMARSTRÖM und E. A. KABAT, Biochemistry 8, 2696 (1969).

⁵ I. ISHIYAMA und G. UHLENBRUCK: Z. ImmunForsch. exp. Ther., im Druck.

⁶ O. PROKOP, G. UHLENBRUCK und W. KÖHLER, Dt. Gesundheitswes. 23, 318 (1968).

⁷ G. UHLENBRUCK, I. SPRENGER und I. ISHIYAMA: Z. klin. Chem., 9, 361 (1971).