

CHEMISCHE BERICHTE,

81. Jahrg. Nr. 5

S. 363—466

Oktober

60. Richard Kuhn und Irmentraut Löw: Über die Isolierung von krystallisiertem Rutin, Quercetin, Isorhamnetin und *trans*-Crocetindimethylester aus Gameten von *Chlamydomonas*-Mutanten.

[Aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizinische Forschung Heidelberg, Institut für Chemie.]

(Eingegangen am 7. Juni 1948.)

Für die Isolierung gameten-wirksamer Stoffe haben sich gewisse Mutanten von *Chlamydomonas* als besonders geeignet erwiesen. Die Nomenklatur der Gene und die genetischen Formeln der präparativ aufgearbeiteten Klone werden kurz erläutert. Als kopulationsverhindrernder Wirkstoff, den die kopulationsunfähigen ru^+ -Zellen (Mutante Nr. 1) ausscheiden, wurde Quercetin-3-rutinosid (Rutin) isoliert. Eine Vorstufe dieses Flavonolglykosids, die von ru^0 -Zellen (Mutante Nr. 2) gebildet wird, hat sich als Quercetin erwiesen. Als Gynoteronon der $irha^+$ -Zellen (Mutante Nr. 3) gelang es Quercetin-3'-methyläther (Isorhamnetin) krystallisiert zu gewinnen. Der Geißelwuchsstoff, den sowohl ♂ wie ♀ Gameten der *cro⁺*-Rassen (Mutanten Nr. 5 und 6) produzieren, konnte durch Umesterung in krystallisierten *trans*-Crocetindimethylester (0.5% des Trockengewichts der Gameten) vom Schmp. und Misch-Schmp. 215° verwandelt werden.

Die Gameten von *Chlamydomonas eugametos* scheiden Wirkstoffe aus, die durch krystallisierte Stoffe aus den Sexualorganen einer Blütenpflanze, nämlich durch Crocin, *cis*- und *trans*-Crocetindimethylester, 4-Oxy-2.6.6-trimethyl- Δ^1 -tetrahydrobenzaldehyd und Isorhamnetin aus den Narben bzw. Pollen von *Crocus (sativus)* und *Sir John Bright*) ersetzt werden konnten¹⁻⁷⁾. Die Aussicht, diese hochwirksamen Stoffe aus den Gameten der Grünalge selbst zu isolieren, erschien gering angesichts der äußerst kleinen ausgeschiedenen Mengen.

Ein vor 10 Jahren unternommener Versuch¹⁾ hat aus 117 l Kulturfiltrat der Wildform von *Chlamydomonas eugametos* zu einem Konzentrat geführt, in dem etwa 0.3 mg eines Carotinoids colorimetrisch nachweisbar waren, das durch Einwirkung von Alkali auf die methanolische Lösung⁷⁾ in einen chloroformlöslichen Farbstoff mit den Absorptionsbanden des *trans*-Crocetindimethylesters verwandelt werden konnte.

Nomenklatur der Gene und Mutanten.

Im Lauf der letzten Jahre ist es F. Moewus gelungen in den Besitz von *Chlamydomonas*-Mutanten zu gelangen, von denen einzelne auf Grund der bio-

¹⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. D. Jerchel, B. 71, 1541 [1938].

²⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. G. Wendt, B. 72, 2187 [1939].

³⁾ R. Kuhn u. F. Moewus, B. 73, 547, 559 [1940].

⁴⁾ R. Kuhn u. I. Löw, B. 74, 219 [1941].

⁵⁾ R. Kuhn u. I. Löw, B. 77, 196, 202, 211 [1944].

⁶⁾ R. Kuhn, F. Moewus u. I. Löw, B. 77, 219 [1944].

⁷⁾ P. Karrer u. A. Helfenstein, Helv. chim. Acta 13, 392 [1930].

logischen Teste solche Stoffe anscheinend in erheblichen Mengen bilden und ausscheiden. Von diesen Mutanten hat F. Moewus bishe die folgenden in größeren Mengen herangezüchtet und uns zur präparativen Aufarbeitung übergeben:

Mutante Nr. 1	♀	irha ^o	mot ^o	cro ⁺	gathe ⁺	ru ⁺	py ^o
Mutante Nr. 2	♀	irha ^o	mot ^o	cro ⁺	gathe ⁺	ru ^o	py ^o
Mutante Nr. 3	♀	irha ⁺	mot ⁺	cro ^o	gathe ⁺	ru ^o	py ⁺
Mutante Nr. 5	♀	irha ^o	mot ⁺	cro ⁺	gathe ^o	ru ^o	py ⁺
Mutante Nr. 6	♂	irha ^o	mot ⁺	cro ⁺	gathe ^o	ru ^o	py ⁺

Zur Erläuterung der genetischen Symbole sei der folgende Auszug aus einer Tabelle von F. Moewus, die sich auf 60 festgestellte und lokalisierte Gene bezieht, hier wiedergegeben:

Bezeichnung der Gene bei *Chlamydomonas* nach F. Moewus.

F = Realisator für ♀ Geschlecht, M = Realisator für ♂ Geschlecht.

Symbol*)	Die Zelle bildet
mot ⁺	Gamone und Termone
cro ⁺	Geißelwuchsstoff
gathe ⁺	Gamone
M _D ⁺	pikrocrocinsspaltendes Ferment u. Androtermon I
irha ⁺	Gynotemon
pae ⁺	Androtermon II
ru ⁺	kopulationsverhindernden Wirkstoff
py ⁺	Pyrenoid
s ⁺	Augenfleck

Chlamydomonas eugametos f. typica (Wildform von 1928⁸⁾:

♂ M	irha ^o	M _D ⁺	mot ⁺	cro ⁺	gathe ⁺	pae ⁺	ru ^o	py ⁺	s ⁺
♀ F	irha ⁺	M _D ^o	mot ⁺	cro ⁺	gathe ⁺	pae ^o	ru ^o	py ⁺	s ⁺

*) Die gleichen Symbole mit dem Index ^o (also z.B. mot^o) bedeuten, daß das betreffende genetische Merkmal bzw. der von diesem Merkmal abhängige Stoff nicht vorkommt.

Der kopulations-verhindernde Wirkstoff.

Die Mutante Nr. 1 ist hervorgegangen aus der kopulationsunfähigen *Chlamydomonas eugametos f. agametos*, die in Portugal 1934 aufgefunden und bereits kurz beschrieben wurde⁹⁾. So wie die Wildform *Chl. eugametos f. agametos* scheidet auch die Mutante Nr. 1 in die Kulturlösungen einen Stoff ab, der kopulationsfähige Gameten von *Chl. eugametos f. typica* daran verhindert, Kopulationspaare und Zygoten zu bilden. Es war bekannt⁶⁾, daß Rutin kopulations-verhindernd wirkt und daß unter den Standardbedingungen ~50000 Moleküle Rutin pro Zelle erforderlich sind. Die weitere Feststellung⁶⁾, daß von 30 geprüften Flavonol-, Flavanon- und Chalkon-glykosiden einzig und allein Rutin wirksam war, ließ bereits die Vermutung zu, daß *Chl. f. agametos* dieses oder ein sehr ähnliches Glykosid des Quercetins bildet.

Es ist jetzt gelungen, aus der Mutante Nr. 1 Rutin in krystallisierter Form zu gewinnen¹⁰⁾. Der aus den Gameten gewonnene Stoff stimmt nicht nur im Schmelzpunkt, in der elementaren Zusammensetzung und krystallographisch

⁸⁾ F. Moewus, Arch. Protistenkunde 75, 284 [1931].

⁹⁾ F. Moewus, Naturwiss. 34, 282 [1947]; in dieser Mitteilung erscheint die Mutante Nr. 1 unter der Bezeichnung ru⁺ mot^o.

¹⁰⁾ Vorläufige Mitteil.: Naturwiss. 34, 283 [1947].

(Debye-Scherrer-Aufnahmen) mit einem Vergleichspräparat aus Buchweizen überein, sondern auch in der Wirksamkeit gegenüber kopulationsfähigen *Chlamydomonas*-Gameten (~ 50000 Mol. pro Zelle). Erstaunlich hoch war die Ausbeute (7—8% vom Trockengewicht der Zellen). Die Ausbeute an Rutin scheint allerdings von noch unbekannten Faktoren bei der Züchtung, Isolierung und Trocknung der Klone abzuhängen.

Vorstufe des kopulationsverhindernden Wirkstoffs.

Die Mutante Nr. 2 scheidet keinen kopulationsverhindernden Wirkstoff aus, obwohl sie aus der kopulationsunfähigen Mutante Nr. 1 hervorgegangen ist. In Übereinstimmung damit hat die präparative Aufarbeitung von Klonen der Mutante Nr. 2 kein Rutin ergeben. Dafür konnten wir daraus Quercetin (2% vom Trockengewicht der Zellen) krystallisiert erhalten. Dieses wurde durch Elementaranalyse und durch den Misch-Schmp. (192—193°) der Pentaacetyl-Verbindungen mit einem durch Hydrolyse von Quercitrin gewonnenen Quercetin-Präparat identifiziert. Will man die Ausbeute mit derjenigen von Rutin aus der Mutante Nr. 1 vergleichen, so ist zu berücksichtigen, daß sich die Mol.-Gewichte von Quercetin und Rutin wie 302 : 610 verhalten.

Eine Wirkung von Quercetin auf *Chlamydomonas*-Gameten ist bisher nicht bekannt. Als chemischer Grundstoff des Rutins und des Isorhamnetins kommt jedoch das Quercetin auch biogenetisch als Vorstufe dieser beiden Wirkstoffe in Betracht.

Gynotermön von *Chlamydomonas*.

Die Mutante Nr. 3, ein weibliches Klon mit pyrenoidhaltigen Zellen, stammt von der Wildform *Chl. f. eugametos* ab und zeichnet sich durch starke Termonwirkung gegenüber Zwitterzellen aus. Die im Versuchsteil beschriebene präparative Aufarbeitung hat zu krystallisiertem Isorhamnetin (1.4% des Trockengewichts) geführt. Die daraus dargestellte Acetylverbindung ergab mit totalsynthetischem Tetraacetyl-isorhamnetin¹¹⁾ keine Erniedrigung des Schmelzpunkts (205—207°). Während bis jetzt lediglich nachgewiesen war, daß Isorhamnetin als Gynotermön auf Zwitterzellen von *Chlamydomonas* zu wirken vermag^{4,6)}, ist nunmehr erwiesen¹²⁾, daß dieser bisher nur in Blütenpflanzen nachgewiesene Flavonol-Farbstoff in unserem Phytoflagellaten tatsächlich vorkommt und hier die physiologische Rolle eines phänotypisch geschlechts-determinierenden Stoffs spielt. Das aus den Gameten der Mutante Nr. 3 isolierte Isorhamnetin hat F. Moewus im Termon-Test nicht von synthetischem Quercetin-3'-methyläther unterscheiden können.

Für das Vorliegen von Quercetin, Rutin oder anderen Flavonol-Farbstoffen hat sich bei der Verarbeitung von Mutante Nr. 3 kein Anhaltspunkt ergeben. Hervorzuheben ist, daß im Methanolauszug auch kein Crocin chemisch nachgewiesen werden konnte, was damit übereinstimmt, daß Nr. 3 keinen Geißelwuchsstoff¹³⁾ abgibt und eine cro^o-Mutante darstellt.

¹¹⁾ T. Heap u. R. Robinson, Journ. chem. Soc. London 1926, 2336; R. Kuhn u. I. Löw, B. 77, 196 [1944].

¹²⁾ Vorläufige Mitteil.: Naturwiss. 34, 374 [1947].

¹³⁾ In früheren Mitteilungen als Beweglichkeitsteststoff bezeichnet.

Der Geißelwuchsstoff.

Für Versuche zur Isolierung des Geißelwuchsstoffs (Beweglichkeitsstoffs), der nicht geschlechts-spezifisch ist, standen die Mutanten Nr. 5 und Nr. 6 zur Verfügung. Mit Ausnahme des Geschlechts (Nr. 5 ist ♀, Nr. 6 ist ♂) stimmen diese beiden Mutanten genetisch überein; die Farbe der getrockneten Zellen war schon für das freie Auge von derjenigen der bisher beschriebenen Klone erheblich verschieden, nämlich nicht grün, sondern mehr olivbraun.

Nach Extraktion der Chlorophylle durch Benzol und Äther erhält man mit 70-proz. Methanol aus Nr. 5 und aus Nr. 6 tief orangefarbene Lösungen, die nach dem Verdünnen mit Wasser keinen Farbstoff an Chloroform abgeben. Versetzt man jedoch die Methanolauszüge mit etwas Kalilauge, so läßt sich fast aller Farbstoff nach Zusatz von Wasser mit Chloroform ausschütteln. Es war noch nicht möglich, den wasserlöslichen orangeroten Farbstoff, der sich im Umesterungsversuch wie Crocin aus Safran verhält, krystallisiert zu gewinnen. Der durch alkalische Umesterung daraus hervorgegangene chloroformlösliche Farbstoff wurde jedoch nach chromatographischer Reinigung sofort in schönen ziegelroten Rhomben erhalten, die nach dem Umkristallisieren aus Chloroform + Methanol mit *trans*-Crocetindimethylester aus Safran keine Erniedrigung des Schmelzpunkts (215°) gaben und mit diesem auch spektroskopisch genau übereinstimmten. Die Ausbeute betrug 0.5% vom Trockengewicht der Gameten (Nr. 5); der wahre Gehalt dürfte in Anbetracht des glatten Verlaufs der Umesterung und der Krystallisation nur wenig höher liegen.

Das Vorkommen eines crocinähnlichen Crocetin-Derivats hat sich somit für *Chlamydomonas*-Gameten präparativ sicherstellen lassen.

Beschreibung der Versuche.

1.) Rutin aus *ru⁺*-Zellen (Mutante Nr. 1): 4.2 g bei 50° getrocknete Zellen der Mutante Nr. 1 wurden 2 mal mit je 500 ccm Methanol je 1 Stde. unter Rückfluß ausgekocht. Die vereinigten tiefgrünen Auszüge haben wir i. Vak. auf 45 ccm eingedampft, mit 90 ccm Wasser verdünnt und durch eine 2 cm hohe Talkschicht (Glas-Sinternsche 303 von 4 cm Durchmesser) vollkommen klar filtriert. Es wurde so lange Methanol + Wasser (1 : 2) auf die Nutsche gegeben, bis die ablaufende Flüssigkeit nicht mehr gelb war (~150 ccm). Wäscht man zu lang, so geht Chlorophyll in das Filtrat, und man muß nochmals durch Talk filtrieren.

Nach dem Einengen des gelben Filtrats auf etwa 100 ccm fielen über Nacht 280 mg hellgelbe, glitzernde Nadeln aus, deren Menge beim Einengen der Mutterlauge auf 50 ccm nur noch um 10 mg zunahm. Ausb. 7% des Trockengewichts. Zur Analyse wurde aus Wasser umkristallisiert und bei 110° i. Vak. getrocknet.

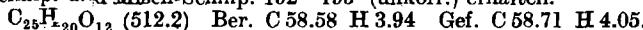
$C_{27}H_{30}O_{16}$ (610.3) Ber. C 53.13 H 4.96 Gef. C 53.17, 52.97 H 5.24, 5.13.

Die methoxylfreie Substanz schmolz bei 189—190° (unkorr.) und zersetzte sich bei etwa 200° so wie aus Buchweizenblättern gewonnenes Rutin. Auch die Debye-Scherrer-Aufnahmen beider Präparate waren identisch.

In weiteren Versuchen wurden aus 4.0 g Trockenzellen 90 mg und aus 1.7 g Trockenzellen 12 mg Rutin erhalten.

2.) Quercetin aus *ru⁰*-Zellen (Mutante Nr. 2): 5.0 g bei 50° getrocknete Zellen der Mutante Nr. 2 wurden 2 mal mit je 250 ccm trockenem Äther ausgekocht. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels hinterblieb ein gelbgrüner, wachsartiger Rückstand, der mit 50 ccm Benzin + Benzol (1 : 1) digeriert wurde. Das dabei nicht in Lösung gegangene rohe Quercetin (100 mg) haben wir bei 130° i. Vak. getrocknet und mit 10 ccm Essigsäure-anhydrid + 4 Tropfen Pyridin 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach dem Zersetzen mit

Eiswasser usw. wurde aus 96-proz. Alkohol Pentaacetyl-quercetin in farblosen Nadeln vom Schmp. und Misch-Schmp. 192—193° (unkorr.) erhalten.



Die Substanz erwies sich als methoxylfrei. Anschließend an die Ätherextraktion wurden die ru° -Zellen noch mit Methanol ausgekocht. Dieser Methanolaustrag wurde mit Lauge nicht gelb, und es ließ sich daraus weder Quercetin noch Rutin isolieren. Selbst die empfindliche Fluoreszenzreaktion mit Borsäure-Citronensäure auf Flavonole fiel negativ aus.

3.) Isohamnetin aus *irha*⁺-Zellen (Mutante Nr. 3): 5.0 g bei 50° getrocknete Zellen der Mutante Nr. 3 wurden 2 mal mit 500 ccm Benzol je 1 Stde. ausgekocht und die vereinigten Auszüge zur Trockne eingeengt. Beim Anreiben mit 25 ccm Benzol hinterblieben etwa 15 mg krystalliner Flavonol-Farbstoff. Die Hauptmenge ging in Lösung, als das mit Benzol erschöpfte Zellmaterial mit Äther (2 mal je 500 ccm, trocken) ausgekocht wurde. Der Äther hinterließ ein grünlich gelbes Krystallisiert, nach dem Waschen mit wenig Methanol 70 mg. Hiervom haben wir 60 mg mit 5 ccm Essigsäureanhydrid + 3 Tropfen Pyridin 2 Stdn. gekocht. Nach der üblichen Aufarbeitung krystallisierte aus 20 ccm Methanol Tetraacetyl-isohamnetin in farblosen Nadeln vom Schmp. und Misch-Schmp. 205—207° (unkorr.). Zur Analyse wurde bei 80° i. Vak. getrocknet.

$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$ (484.2)	Ber. C 59.48	H 4.16	OCH_3 8.40
	Gef. „ 60.02, 60.12	“ 4.45, 4.55	“ 6.30 (natürl. Präparat)
	„ „ 59.36	“ 4.25	“ 6.60 (synthet. Vergleichs-präparat).

4.) *trans*-Crocetindimethylester aus *cro*⁺-Zellen (Mutante Nr. 5): 8.5 g bei 50° getrocknete ♀-diözische Zellen der Mutante Nr. 5 wurden 2 mal mit je 750 ccm Benzol unter gelegentlichem Umschütteln 24 Stdn. bei etwa 20° stehengelassen und hierauf 2 mal mit je 750 ccm trockenem Äther in gleicher Weise extrahiert. Anschließend erfolgte die Extraktion des Crocins mit 70-proz. Methanol. Der 1. Auszug (mit 60 ccm 70-proz. Methanol, 3 Stdn. bei etwa 20°) ergab 50 ccm einer tief orangefarbenen Lösung, von der eine Probe nach Zusatz von Wasser gar keinen Farbstoff an Chloroform abgab. Diesen Auszug haben wir mit 5 ccm 10-proz. Kalilauge versetzt, wobei ein hellgelber flockiger Niederschlag ausfiel, der mit ziegelroten Krystallchen durchsetzt war. Ein zweiter und ein dritter Auszug mit 70-proz. Methanol (je 50 ccm) wurden in gleicher Weise verarbeitet. Die abzentrifugierten Fällungen wurden mit Methanol + Wasser (1 : 1) in einen Scheidetrichter gespült und 2 mal mit Chloroform, insgesamt 50 ccm, ausgeschüttelt. Die tief orangefarbene Chloroformschicht haben wir sehr gründlich mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat kurz getrocknet und i. Vak. verdampft. Der rote krystallin. Rückstand wurde in 50 ccm Benzol warm gelöst, mit 50 ccm Benzin (Sdp. 80—110°) verdünnt und an Aluminiumoxyd (Brockmann, Höhe der Säule 15 cm, Durchmesser 2 cm) chromatographiert. Entwickelt wurde mit 180 ccm reinem Benzol, wobei zuerst in der Säule nur wenig Verunreinigungen hängen blieben und der *trans*-Ester in breiter orangefarbener Zone bis gegen das untere Ende der Säule wanderte. Eluiert wurde mit Benzol unter Zusatz von etwas Methanol und das Eluat i. Vak. zur Trockne eingeengt. Es hinterblieben 40 mg schön krystallisierter *trans*-Crocetindimethylester (0.5% vom Trockengew. der Game-ten), die zur Analyse aus Chloroform + Methanol 2 mal umkrystallisiert wurden. Schmp. und Misch-Schmp. mit einem aus Safran gewonnenen, gleichfalls chromatographisch gereinigten und umkrystallisierten Präparat 215° (unkorr.).

$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$ (356.2)	Ber. C 74.12	H 7.92
	Gef. „ 73.65, 73.48, 73.53	“ 7.98, 7.85, 7.83.

Beide Präparate stimmten auch krystallographisch (ziegelrote Rhomben) und im Absorptionspektrum (Gittermeßspektroskop nach Löwe-Schumm) überein:

Lösungsmittel: Benzin vom Sdp. 80—110°; *trans*-Ester aus *Chlamydomonas* 450.5 425 m μ , *trans*-Ester aus Safran 450.5 425 m μ .