

Die Umwandlung von Tropin in Pseudotropin durch Synergismus zweier Bakterienstämme II¹

NIKOLAUS SEILER und GOTTFRIED WERNER

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie
(Leiter: Priv.-Doz. Dr. G. WERNER), Frankfurt/Main

(Z. Naturforschg. 20 b, 451—453 [1965]; eingegangen am 10. Februar 1965)

Herrn Prof. Dr. KURT MOTHES zum 65. Geburtstag gewidmet

An der Umwandlung von Tritium-markiertem Tropin-(3β -T) zu Pseudotropin-(3α -T) in Hirnhomogenat, unter der synergistischen Wirkung eines Sporenbildners und eines Enterococccen-Stammes, konnte bewiesen werden, daß diese *trans-cis*-Umlagerung durch Abspaltung und Wiederanlagerung von Wasser erfolgt. Die Abspaltung von Wasser aus 3α -Tropanol zu Tropen-(2) ist reversibel, wie aus dem Einbau von Tritiumwasser in das Tropin hervorgeht.

Für die Umwandlung von Tropin (3α -Tropanol) in Pseudotropin (3β -Tropanol) durch Synergismus eines Sporenbildners (NCIB 9632 * oder *Bacillus alvei* NCTC ** 7583) und eines Enterococccen-Stammes (NCIB 9633) haben wir in der vorigen Mitteilung¹ die potentiellen Reaktionswege diskutiert. Eine Entscheidung zugunsten einer der beiden Möglichkeiten, nämlich der Oxydation des Tropins zu Tropinon und dessen Reduktion zu Pseudotropin, bzw. der Abspaltung von Wasser aus Tropin zu Tropen-(2) *** und seiner Wiederanlagerung zu Pseudotropin, sollte mit folgender Untersuchungsmethodik erfolgen.

Methoden und Ergebnisse

Durch Hydrierung von Tropinon mit $^3\text{H}_2$ (T_2) unter dem katalytischen Einfluß von R a n e y -Nickel erhielten wir 3α -Tropanol-(3β -T) (I), das allerdings nicht völlig frei von dem isomeren 3β -Tropanol-(3α -T) (II) war. Die Abtrennung des Pseudotropins erübrigte sich, da dessen Beimengung unsere Untersuchung nicht störte. Tropin-(3β -T) wurde, wie für inaktives Tropin beschrieben¹, in Hirnhomogenaten mit den beiden Bakterienstämmen gemeinsam sowie mit den einzelnen Stämmen getrennt beimpft und bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten entnahmen wir den Reaktionsansätzen Proben und trugen diese auf Papierchromatogramme auf. Die entwickelten

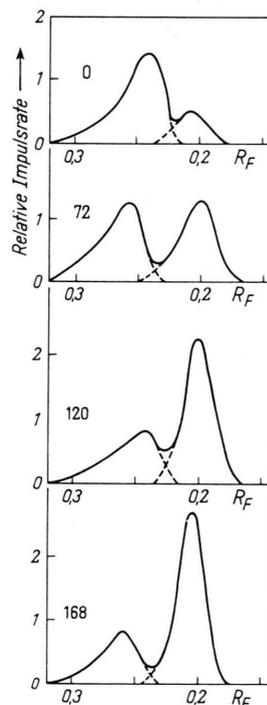


Abb. 1. Radio-Papierchromatogramme von Inkubationsansätzen mit Tropin-(3β -T) in Hirnhomogenaten, welche gleichzeitig mit dem Sporenbildner und dem Enterococccen-Stamm (s. Text) beimpft wurden. (Inkubationszeit in Stdn.; Laufmittel: n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5). Man ersieht aus der Abb. die allmähliche Umwandlung von Tropin in Pseudotropin, bei konstanter Gesamtaktivität der Alkaloide.

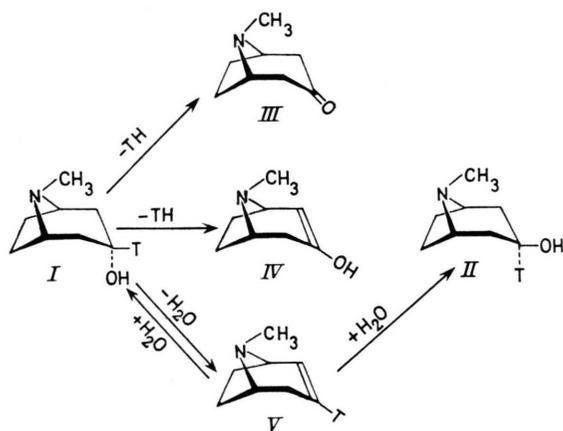
¹ 1. Mitt.: N. SEILER u. G. WERNER, Z. Naturforschg. 19 b, 572 [1964].

* The National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen.

** NCTC = The National Collection of Type Cultures, London.

*** Versehentlich ist in der 1. Mitt.¹ Tropen-(1) anstatt Tropen-(2) geschrieben worden.

Chromatogramme werteten wir mit einem Radio-Papierchromatographen aus. Die Abb. 1 zeigt das Ergebnis einer Versuchsreihe mit Homogenaten, die mit beiden Bakterien-Stämmen beimpft worden waren. Man erkennt auf den Chromatogrammen die Umwandlung von Tropin in Pseudotropin, wobei aus den Alkaloiden kein Tritium ausgetauscht wurde; denn die Gesamtaktivität in beiden Alkaloiden zusammen blieb konstant. Wäre die Umlagerung von Tropin (I) in Pseudotropin (II) durch eine Redox-Reaktion über das Tropinon (III) oder ein Enol (IV) als Zwischenprodukt verlaufen, so hätte man eine stark verringerte Radioaktivität im entstehenden Pseudotropin beobachten müssen. Die Abspaltung eines Moleküls Wasser unter Bildung von Tropen-(2) (V) und seine Wiederanlagerung an die entstandene Doppelbindung erklärt den experimentellen Befund jedoch zwanglos.



I Tropin-(3 β -T), II Pseudotropin-(3 α -T), III Tropinon, IV Tropinon (Enolform), V 3-T-Tropen-(2).

Es wurde große Mühe darauf verwendet, Tropen-(2) als Zwischenprodukt der Reaktion nachzuweisen. Dies gelang weder nach Inkubieren mit den einzelnen Bakterien-Stämmen, noch während der Tropin-Umwandlung durch das Bakteriengemisch. Die einzelnen Stämme verursachten keine merkliche Veränderung des Tropins, wie schon mit inaktivem Tropin festgestellt worden war und wie jetzt mit tritiiertem Tropin als Substrat in weitaus empfindlicherer Weise wieder gezeigt werden konnte.

Die Funktion der einzelnen Bakterien-Stämme während der synergistischen Epimerisierung des Tropins ist also nach wie vor unklar. Tropen-(2) wirkt, den Homogenaten in Konzentrationen höher als $2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l zugesetzt, als Hemmer der Tropin-

Pseudotropin-Umwandlung. Unter den Reaktionsbedingungen kann es somit in freier Form, wenn überhaupt, im Reaktionsansatz nur in einer Konzentration kleiner als 10^{-5} Mol/l auftreten, wie aus der Empfindlichkeit der Meßmethodik abgeschätzt werden kann.

Um zu prüfen, ob der 1. Reaktionsschritt der Tropin-Epimerisierung (I \rightarrow V) reversibel verläuft, ließen wir die bakterielle Umwandlung von Tropin in Hirnhomogenaten ablaufen, die anstatt H₂O Tritiumwasser (HTO) einer Aktivität von 200 mC/cm³ enthielten. Die Reaktion wurde nach Epimerisierung von etwa 70% Tropin unterbrochen. Da unter den Reaktionsbedingungen im Homogenat mehrere T-markierte Substanzen entstehen und die zu erwartende Aktivität von Tropin und Pseudotropin gering ist, ließen sich durch Radiopapier- und Dünnschichtchromatographie keine Ergebnisse erzielen. Daher trennten wir das Tropin und Pseudotropin der Reaktionsansätze papierchromatographisch und isolierten die beiden Substanzen nach Zugabe inaktiven Materials als Pikrate. Sowohl das isolierte Tropin als auch das Pseudotropin war radioaktiv. Aus dem Einbau von Tritiumwasser in das Tropin kann man schließen, daß die Wasserabspaltung zu Tropen-(2) (I \rightarrow V) reversibel verläuft. Lediglich für den zweiten Reaktionsschritt (V \rightarrow II) scheint das Gleichgewicht stark auf der Pseudotropin-Seite zu liegen, weil die Umwandlung Tropin \rightarrow Pseudotropin praktisch vollständig abläuft. Versuche dazu, ob dieser Schritt völlig irreversibel ist – etwa durch das Studium des Einbaues von Tritiumwasser in Pseudotropin unter den beschriebenen Inkubationsbedingungen – haben wir noch nicht unternommen. Durch den Einbau von Tritiumwasser in Tropin und Pseudotropin kann die an sich unwahrscheinliche „direkte Umklappung“ der OH-Gruppe des Tropins als Reaktionsmechanismus ebenfalls ausgeschlossen werden.

Frl. MEIKE SCHMIDT sowie Herrn Ing. K. H. SCHMIDT danken wir für gewissenhafte experimentelle Mitarbeit.

Methodischer Teil

Hydrierung von Tropinon zu 3 α -Tropanol-(3 β -T). 110 mg frisch sublimiertes Tropinon hydrierten wir in 3 cm³ Äthanol in Gegenwart von 150 mg Raney-Nickel als Katalysator mit einem Tritium-Wasserstoff-Gemisch unbekannter Aktivität 24 Std. bei Raumtemperatur und Normaldruck. Das Reaktionsprodukt (84 mg) wurde durch Sublimieren gereinigt (Aktivität: 12 mC/mMol).

Das so erhaltene tritiierte Produkt enthielt hauptsächlich 3α -Tropanol-(3β -T) und etwa 15% 3β -Tropanol-(3α -T) (bestimmt durch Radio-Papierchromatographie; vgl. Abb. 1) sowie geringe Mengen andere Tritium-markierte Verbindungen, die jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht störten.

Reaktionsansatz mit 3α -Tropanol-(3β -T). Zu je 3 cm³ Rinderhirn-Homogenat (1 g Hirn + 2 cm³ Wasser + 1 cm³ m/15-Phosphatpuffer, p_H 7) wurden 5 mg tritiiertes Tropin [spez. Akt. 0,6 mC/mMol; verunreinigt mit Pseudotropin-(3α -T)] gegeben. Das Homogenat (Tropinkonz. $1,1 \cdot 10^{-2}$ Mol/l) teilten wir in 0,5-cm³-Portionen auf und beimpften diese nach dem Sterilisieren. Inkubation bei 37 °C; ca. 4–8 Tage.

Reaktionsansatz mit Tritiumwasser. Das Homogenat wurde wie oben beschrieben hergestellt; anstatt Wasser verwendeten wir jedoch THO der Aktivität 200 mC/cm³; das eingesetzte Tropin war inaktiv. Der Inhalt von 20 Röhrchen mit je 0,5 cm³ Homogenat wurde am Ende der Inkubationszeit, nach etwa 70-proz. Umwandlung des Tropins in Pseudotropin, lyophilisiert, der Rückstand mit etwa 200 cm³ Methanol extrahiert und der eingeeengte Extrakt auf Bögen von Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) mit n-Butanol + Eisessig + Wasser = 4 + 1 + 5 entwickelt. Die Tropin- und Pseudotropin-Zonen extrahierten wir

mit Methanol, versetzten mit je 200 mg Tropin·HCl bzw. Pseudotropin·HCl und fällten dann die Alkaloide als Pikrate. Durch mehrfaches Umkristallisieren, Chromatographie an einer Al₂O₃-Säule (2,5 cm ϕ , 60 cm lang; Benzol + Methanol = 90 + 10) und abermalige Pikratfällung reinigten wir die Präparate bis zur konstanten Radioaktivität. Die Radioaktivitäts-Messungen wurden nach der Kolbenverbrennung^{2–5} von 20 mg-Proben im Triearb-Flüssigkeits-Szintillationspektrometer (Fa. Packard, Modell 314 E) ausgeführt.

Folgende Aktivitäten wurden gefunden: Tropin-Pikrat: $2,6 \cdot 10^3$ Imp/Min./mg Pikrat; Pseudotropin-Pikrat: $6,4 \cdot 10^3$ Imp/Min./mg Pikrat.

Papierchromatographie. Die Chromatogramme färbten wir mit Dragendorff-Reagens⁶ an. Zur Messung der Radioaktivität verwendeten wir ein fensterloses Methan-Durchflußzählrohr in Verbindung mit dem Radio-Papierchromatographen FH 452 der Fa. Frieske u. Hoepfner, Erlangen.

Das für die Hemmversuche verwendete Tropen-(2) stellten wir nach LADENBURG⁷ her und reinigten es dünnschichtchromatographisch mit dem früher¹ beschriebenen Laufmittelsystem. Die Abbauehemmung beurteilten wir auf Grund der Größe der Pseudotropin-Flecke auf den Papierchromatogrammen.

² H. GÖTTE, R. KRETZ u. H. BADDENHAUSEN, *Angew. Chem.* **69**, 561 [1957].

³ F. KALBERER u. J. RUTSCHMANN, *Helv. chim. Acta* **44**, 1956 [1961].

⁴ J. F. EASTHAM, H. L. WESTBROCK u. D. GONZALES, „IAEA Symposium on the Detection and Use of Tritium in the Physical and Biological Sciences“, Wien 1961, TTS/127.

⁵ D. A. BUYSKE, R. KELLY, J. FLORINI, S. GORDON u. E. PEETS, ebenda, S. 185.

⁶ I. M. HAIS u. K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie* Bd. I S. 758; Gustav Fischer Verlag, Jena 1958.

⁷ A. LADENBURG, *Liebigs Ann. Chem.* **217**, 74 [1883].