

Zur Biosynthese des Sinalbins, 2. Mitt.:
Die Bildung von Sinalbin in Senfpflanzen
verschiedenen Alters

Von

H. Kindl

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

Mit 3 Abbildungen

(Eingegangen am 27. Oktober 1964)

1. Junge Pflanzen von *Sinapis alba* bauten L-Tyrosin-2-¹⁴C sehr stark ab, wodurch sich beim Einbau in das Sinalbin eine merkliche Verteilung der Aktivität innerhalb des Moleküls ergab. Demgegenüber zeigten ältere Pflanzen einen höheren Einbau und eine geringere Verschmierung der Aktivität.

2. Der Einbau von ³⁵S-Cystein und ³⁵SO₄²⁻ wurde genauer untersucht.

3. Es konnte weiters mit Hilfe von Kalium-glucotropaeolat-U-¹⁴C-thio-³⁵S nachgewiesen werden, daß Glucotropaeolin keine Vorstufe des Sinalbins ist.

1. Young plants of *Sinapis alba* strongly catabolize L-tyrosine-2-¹⁴C. Therefore, in the course of the incorporation of L-tyrosine-2-¹⁴C into sinalbin, a randomization of the activity within the molecule takes place. Older plants show a higher incorporation of L-tyrosine-2-¹⁴C and less randomization of the activity in sinalbin.

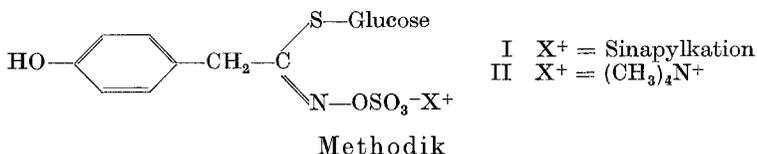
2. The incorporation of cysteine-³⁵S and ³⁵SO₄²⁻ has been further investigated.

3. By the use of potassium glucotropaeolate-U-¹⁴C-thio-³⁵S it could be shown that glucotropaeolin is not a precursor of sinalbin.

Samen von *Sinapis alba* enthalten große Mengen des Senfölglicosids Sinalbin (I). Wie in der 1. Mitt. dieser Reihe¹ gezeigt wurde, erwiesen sich p-Cumarsäure und D-Glucose in jungen Senfpflänzchen als die besten Vorstufen beim biologischen Aufbau des Sinalbins. Weiters ergaben diese Untersuchungen, daß überraschenderweise L-Tyrosin nur zu einem geringen Prozentsatz eingebaut wurde. Demgegenüber stehen Befunde von

¹ H. Kindl, Mh. Chem. **95**, 339 (1964).

Underhill und *Chisholm*², die erst kürzlich nachweisen konnten, daß L-Phenylalanin-¹⁴C-¹⁵N ohne Änderung des Verhältnisses ¹⁴C/¹⁵N in das Glucotropaeolin eingebaut wird und daß auch aliphatische Senfölglicoside³ direkt aus den entsprechenden L-Aminosäuren gebildet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die Frage zu klären, ob die Biosynthese des Sinalbins von dem von diesen Autoren postulierten Aufbauschema der Senfölglicoside abweicht.

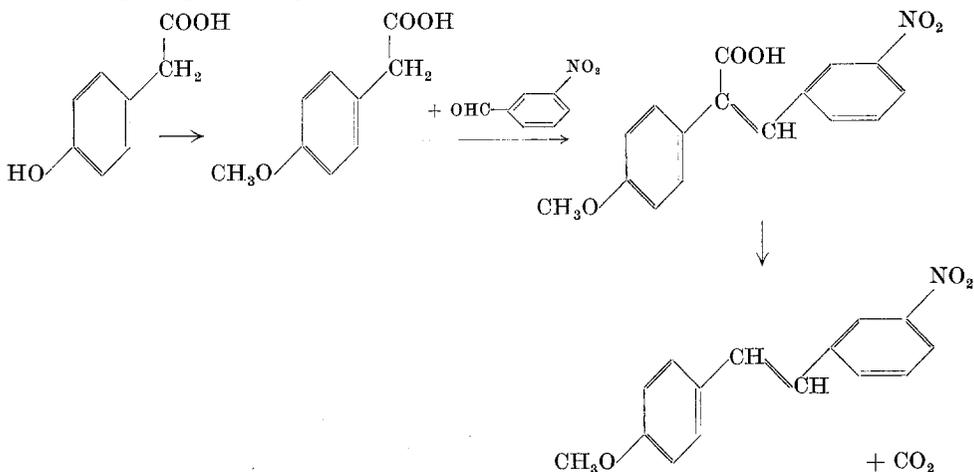


Applikation der radioaktiven Vorstufen und Isolierung des Tetramethylammoniumglucosinalbats.

Die radioaktiven Vorstufen wurden in Form von 10⁻⁴m-wäßrigen Lösungen während eines Zeitraumes von 3 Tagen den Senfpflanzen eines bestimmten Alters appliziert. Nach Extraktion und Anreicherung der glucosidischen Inhaltsstoffe wurde das Sinalbin im Form des Tetramethylammoniumglucosinalbats (II, abgekürzt als TAGS) isoliert.

Abbau des TAGS.

Während für die Lokalisierung der Aktivität der S-Atome ein bereits beschriebener Abbau¹ verwendet wurde, diente zur Abtrennung der Carboxylgruppe der aus TAGS durch saure Hydrolyse gebildeten p-Hydroxyphenylessigsäure folgende Reaktionsfolge:



² *E. W. Underhill* und *M. D. Chisholm*, *Biochem. biophys. Res. Comm.* **14**, 425 (1964).

³ *E. W. Underhill*, persönl. Mitt.

Die Aktivität der Carboxylgruppe der p-Hydroxyphenylessigsäure konnte aus der Differenz der spezifischen Aktivitäten der Methoxyphenylessigsäure und des Stilbens bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion

Der im Vergleich zu p-Cumarsäure geringe Einbau des L-Tyrosins war Anlaß, den Stoffwechsel des L-Tyrosins mit dessen Übergang in das

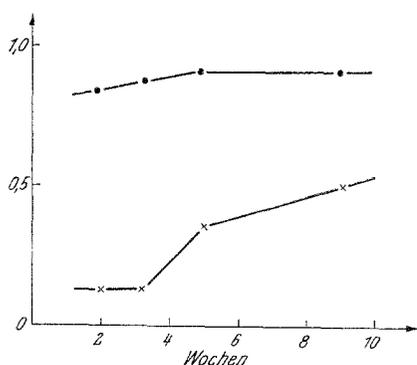


Abb. 1

Abb. 1. Einbau (in %) von p-Cumarsäure-2-¹⁴C (—•—•—) und L-Tyrosin-2-¹⁴C (—×—×—) in TAGS in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen (in Wochen)

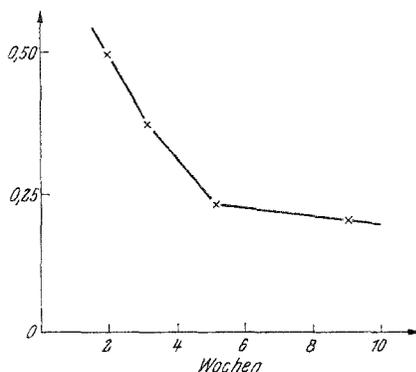


Abb. 2

Abb. 2. Das Verhältnis der Aktivitäten von $\frac{C-(1 \text{ bis } 6) + C-\alpha}{C-(\text{Carboxyl})}$ der aus TAGS erhaltenen p-Hydroxyphenylessigsäure nach Applikation von L-Tyrosin-2-¹⁴C, aufgetragen gegen das Alter der jeweils verwendeten Pflanzen

Sinalbin zu vergleichen und genauer zu untersuchen. Hierbei wurden p-Cumarsäure-2-¹⁴C und L-Tyrosin-2-¹⁴C unter konstanten Bedingungen verschieden alten, aber aus der gleichen Zucht stammenden Pflanzen von *S. alba* infundiert. Abb. 1 enthält in einer übersichtlichen Form die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Während der Einbau von p-Cumarsäure, als Vergleichswert dienend, innerhalb der Fehlergrenzen kaum differiert, wird L-Tyrosin in älteren Pflanzen wesentlich besser eingebaut.

Völlig parallel mit diesen Ergebnissen läuft der folgende, in Abb. 2 zusammengefaßte Befund. Nach Gabe von L-Tyrosin-2-¹⁴C sollte nach den bisherigen Ergebnissen die gesamte Aktivität im endständigen C-Atom der Phenyläthan-Seitenkette des TAGS bzw. im Carboxyl-C-Atom der daraus gebildeten p-Hydroxyphenylessigsäure lokalisiert sein. Im α-C-Atom und in den Kern-C-Atomen der p-Hydroxyphenylessigsäure sollte, wenn keine katabolischen Übergänge stattfinden, auch keine Aktivität gefunden werden. Im folgenden wird das Verhältnis der Aktivitäten der C-Atome der p-Hydroxyphenylessigsäure $\frac{C-(1 \text{ bis } 6) + C-\alpha}{C-\text{Carboxyl}}$ als Maß für den bio-

logischen Abbau des L-Tyrosins verwendet. Es zeigt sich, daß die, vermutlich über die Homogentisinsäure, die aliphatischen C₄-Dicarbonsäuren und den Citronensäurecyclus verlaufenden Stoffwechselübergänge und die darauffolgende Neogenese des Aromaten bei älteren Pflanzen viel langsamer vor sich gehen und somit in einem wesentlich geringeren Maße zur Verschmierung der Aktivität innerhalb des Sinalbin-Moleküls führen.

Ein extrem starker Abbau des L-Tyrosins mit anschließender Neogenese zu Kohlehydraten wurde bei verschiedenen Angiospermen gefunden⁴. Ähnliche Befunde erhielt man bei Untersuchungen über die Bildung der p-Hydroxybenzoesäure in höheren Pflanzen; während p-Cumarsäure hohe Einbauraten ergab, wurde L-Tyrosin nicht eingebaut, sondern in Kohlehydrate übergeführt^{5, 1}. Ausnahmen bilden Gräser und die von *Zenk*⁶ zur Biosynthese der p-Hydroxybenzoesäure verwendete *Catalpa*-Gattung, bei denen eine starke „Tyrase“-Aktivität (L-Tyrosin-ammoniaklyase) festgestellt wurde.

Auf Grund der in dieser Arbeit enthaltenen Resultate und der angeführten Überlegungen ist schwer zu entscheiden, ob L-Tyrosin nur deshalb schlecht in das Sinalbin eingebaut wird, weil es einem starken Abbau unterliegt, ob verschiedene Teilschritte der Synthese in räumlich getrennten Zellelementen vor sich gehen und dadurch Permeabilitätsfaktoren eine Rolle spielen oder ob L-Tyrosin als eine gegenüber der p-Cumarsäure biogenetisch ferner liegende Vorstufe angesehen werden muß. Hierüber können erst Einbauversuche mit ¹⁴C-¹⁵N-doppeltmarkiertem L-Tyrosin Auskunft geben, wobei auch eine kleine Einbaurate in das Sinalbin bei konstant bleibendem Verhältnis ¹⁴C/¹⁵N den Beweis für die Vorläuferfunktion des L-Tyrosins liefern kann.

Ähnlich dem in Abhängigkeit vom Alter der Pflanzen stehenden Einbau des L-Tyrosins steigt auch die Einbaurate ³⁵SO₄²⁻ in das Sinalbin (Abb. 3). Hingegen ändert sich die Verteilung der ³⁵S-Aktivität, die, wie bereits berichtet, mit einem Verhältnis $\frac{\text{S-thio}}{\text{S-SO}_4} = 0,47$ gefunden wurde, kaum innerhalb der Fehlergrenzen. Es ist interessant, daß auch kürzlich *Wetter*⁷ bei der Biosynthese des Glucotropaeolins einen Faktor von $\frac{\text{S-thio}}{\text{S-SO}_4} = 0,49$ (bei 18 Stdn. Stoffwechsel bzw. 0,56 bei 7täg. Stoffwechsel) nach Gabe von ³⁵SO₄²⁻ gefunden hat.

Während also, wie soeben gezeigt wurde, das S-Atom des Sulfats nicht nur in die Hydroxylaminosulfat-Gruppe eingebaut wurde, führte die

⁴ R. K. Ibrahim, S. G. Lawson und G. H. N. Towers, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **39**, 837 (1961).

⁵ R. K. Ibrahim, *Flora* [Jena] **154**, 481 (1964).

⁶ M. H. Zenk und G. Müller, *Z. Naturforsch.* **19b**, 398 (1964).

Applikation von ^{35}S -Cysteinhydrochlorid (28,4 mC/mM, 0,5 mC) nach 2täg. Stoffwechsel bei einer Einbaurrate von ca. 30% zu einem markierten Sinalbin, in dem praktisch (innerhalb der Fehlergrenzen) die gesamte Aktivität im Thio-S-Atom lokalisiert war. Cystein dürfte sich als S-Donator völlig gleich verhalten wie Methionin, da Wetter⁷ bei der Biosynthese des Glucotropaeolins nach Gabe von ^{35}S -Methionin 91% der Aktivität des Senfölglicosids im Thio-S-Atom finden konnte.

Nachdem nach wiederholten Versuchen feststand, daß p-Cumarsäure gut (0,8—1,0% Einbau), L-Phenylalanin nur zu einem geringen Prozentsatz (0,1—0,3% und L-Tyrosin mit sehr schwankenden Werten in das Sinalbin eingebaut wird, erschien es als sehr wahrscheinlich, daß der in das C₆—C₂-Skelett des Sinalbins übergehende C₆—C₃-Körper bereits eine Hydroxylgruppe in p-Stellung trägt. Trotzdem konnte nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob nicht Glucotropaeolin (III) als unmittelbare Vorstufe des Sinalbins fungiert. Außerdem sollte ein Einbauversuch mit markiertem Glucotropaeolin darüber Aufschluß geben, wie weit eventuell abgespaltene Bruchstücke des Glucotropaeolins zum Aufbau des Sinalbins führen können.

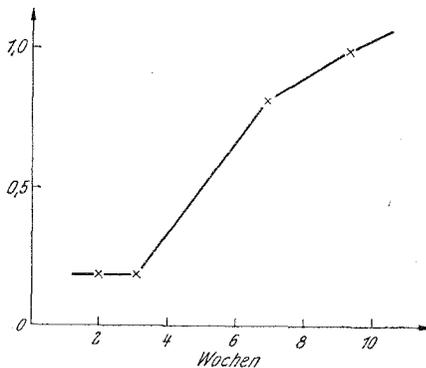
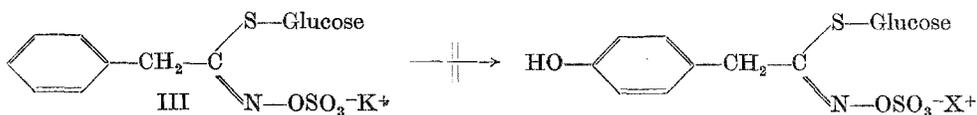


Abb. 3. Einbau (in%) von $^{35}\text{SO}_4^{2-}$ in Sinalbin bei verschieden alten Pflanzen



Zu diesem Zweck wurde ein ^{14}C - ^{35}S -doppeltmarkiertes Kaliumglucotropaeolat mit einem bekannten Verhältnis der Aktivitäten $^{14}\text{C}/^{35}\text{S}$ biosynthetisch hergestellt. Nach Applikation dieses aus *Tropaeolum majus* hergestellten Präparates (5,4 μC) an 9 Wochen alte Senfpflänzchen wurde das TAGS isoliert. Es konnte kein Einbau festgestellt werden. Dies macht eine Funktion von Glucotropaeolin als Vorstufe des Sinalbins sehr unwahrscheinlich und ist gleichzeitig ein Hinweis dafür, daß das vorgegebene Senfölglicosid zu keinem merklichen Prozentsatz zu Fragmenten abgebaut wird, die zum Wiederaufbau verwendet werden könnten.

⁷ L. R. Wetter, Phytochem. 3, 57 (1964).

Die vorliegende Arbeit wurde durch Förderungsbeiträge der *Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft*, Wien, sowie der Sektion IV des Bundeskanzleramtes der Republik Österreich unterstützt, wofür ich danke.

Experimenteller Teil

Den Pflänzchen von *Sinapis alba* (gleiche Zucht, 50 g Frischgewicht je Versuch) wurden nach definierten Wachstumsperioden die radioaktiven Vorstufen in $10^{-4}m$ -Lösung appliziert. Die Aufarbeitung, Isolierung und Reinheitsprüfung des gebildeten Sinalbins wurde bereits in der 1. Mitt.¹ eingehend beschrieben. Das gleiche gilt für den Abbau des TAGS und die Durchführung der Aktivitätsbestimmungen.

Herstellung des ^{14}C - ^{35}S -markierten Glucotropaeolins

3 Blätter einer 2 Monate alten Kapuzinerkresse (*Tropaeolum majus*) wurden in einer 150 ml fassenden Photosynthesekammer in einer 10proz. CO_2 -Atmosphäre dem Licht zweier Leuchtröhren ausgesetzt. Nach 4 Tagen wurde das restliche CO_2 zurückgemessen, die Blätter mit siedendem Alkohol getötet und extrahiert. Den Rückstand, der nach dem Einengen des Extraktes verblieb, verteilte man zwischen Wasser und Äther. Die wäfr. Lösung wurde nach Entfernung des Äthers über Celite geklärt und mit Hilfe einer Säule von Al_2O_3 (Woelm, sauer, Aktivitätsstufe I) die Anionen abgetrennt. Mit 0,2 *m*- K_2SO_4 -Lösung konnte das Glucotropaeolat eluiert werden. Die K_2SO_4 -hältige Lösung wurde im Vak. zur Trockene eingedampft und der Rückstand 2mal mit warmem Methanol extrahiert. Anschließend konnte das Glucotropaeolin durch 2malige Papierchromatographie gereinigt werden. Als Vergleichssubstanz diente ein aus größeren Mengen Samen von *T. majus* hergestelltes Präparat.

Analog hiezu wurden Blätter von *T. majus* aufgearbeitet, die vorher 4 Tage in eine Lösung von ^{35}S -Cysteinhydrochlorid gestellt worden waren. Sowohl von Glucotropaeolin- U - ^{14}C (8 mg) als auch von Glucotropaeolin-thio- ^{35}S (10 mg) wurden die spezif. Aktivitäten bestimmt (230 bzw. 59 $\mu C/mM$). Das Verhältnis der Aktivitäten $^{14}C/^{35}S$ im Glucotropaeolin- U - ^{14}C -thio- ^{35}S war 3,1.