

Zur Biosynthese des Sinalbins, 3. Mitt.:

Die Rolle von p-Cumarsäure und p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim

Von

H. Kindl und S. Schiefer

Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 4. Juli 1969)

Der Biosyntheseweg zu dem phenolischen C₆—C₂-Senfölglicosid Sinalbin verläuft über Shikimisäure, L-Tyrosin und p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim. Untersuchungen an *Sinapis alba* ergaben für das Oxim einen gegenüber L-Tyrosin um eine Größenordnung höheren Einbau. Phenylacetaldehydoxim wird in dieser Pflanze nur in Glucotropaeolin, nicht aber in die in p-Stellung hydroxylierte Verbindung übergeführt; der Hydroxylierungstyp ist somit bereits auf der Stufe der Aminosäure vorgegeben.

Die von der L-Tyrosin-ammoniak-lyase katalysierte Reaktion ist reversibel. Der Übergang von p-Cumarsäure in L-Tyrosin konnte sowohl in vivo als auch mit Hilfe von gereinigten Enzymen aus *Sinapis alba* und *Hordeum vulgare* nachgewiesen werden. Es werden die Übergänge von Shikimisäure und L-Phenylalanin zu L-Tyrosin verglichen und die physiologische Bedeutung der verschiedenen zum L-Tyrosin führenden Wege diskutiert.

Biosynthesis of Sinalbin, III. The Role of p-Coumaric Acid and p-Hydroxyphenylacetaldehyde Oxime

The biosynthesis of sinalbin, a phenolic mustard oil glucoside with a C₆—C₂ skeleton, proceeds via L-tyrosine and p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime. The incorporation of the oxime was found to be more than one order of magnitude higher than that of L-tyrosine. This transformation of the p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime into sinalbin and S-(β-D-glucopyranosyl)-p-hydroxyphenylacetothiohydroxamic acid could be demonstrated in 6 weeks old plants of *Sinapis alba*. The finding that phenylacetaldehyde oxime was incorporated only into glucotropaeolin but not

into sinalbin indicates that either the hydroxylation of the benzene ring occurs at the level of the amino acid or that the hydroxyl group comes from the cyclohexane precursors.

The chemical synthesis and the physical properties of the p-hydroxyphenylacetaldehyde oxime are described. p-Hydroxyphenylacetaldehyde oxime-1-¹⁴C was obtained by condensation of p-hydroxybenzaldehyde with nitromethane-¹⁴C and by reduction of the nitrostyrene with zinc—acetic acid.

The conversion of L-tyrosine into p-coumaric acid catalysed by the L-tyrosine ammonia lyase was found to be reversible. The transformation of p-coumaric acid into L-tyrosine could be shown in detached leaves of *Sinapis alba* and also with purified enzyme preparations from that plant and *Hordeum vulgare*. There are indications that three biosynthetic routes leading to L-tyrosine exist in plants. These biosynthetic pathways and their physiological significance are discussed.

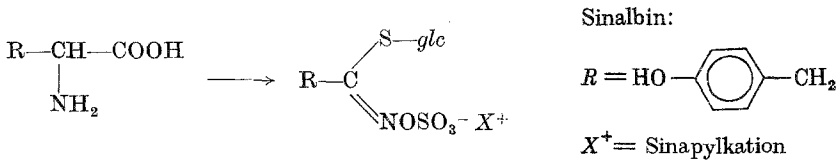
Einleitung

Der charakteristische stechende Geruch und scharfe Geschmack, die man bei zahlreichen Cruciferen und bei Genera verwandter Familien beim Zerkleinern der Pflanzen antreffen kann, rührt vorwiegend von aliphatischen und aromatischen Isothiocyanaten her. Unter den Cruciferen finden sich zahlreiche Kulturpflanzen, bei denen entweder hoher oder niedriger Senfögehalt erwünscht ist. Pflanzen, wie *Lepidium sativum* oder *Sinapis alba*, welche zum Würzen herangezogen bzw. der Senffabrikation zugeführt werden, sollen große Konzentrationen dieser Geschmacksstoffe enthalten. Dagegen sind Senföle in Futterpflanzen unerwünscht, da sie auf den Verdauungstrakt der Tiere eine schädigende Wirkung ausüben. Die Senföle, von denen man bisher mehr als 40 in der Natur gefunden hat¹, sind das Produkt einer enzymatischen Hydrolyse, für welche die in speziellen Zellkompartimenten angehäufte „Myrosinase“ verantwortlich ist. Diese β -Thioglucosidase, welche offenbar spezifisch auf Schwefelsäureester von S-(β -D-Glucopyranosyl)-thiohydroxamsäuren wirkt, initiiert eine Sextett-Umlagerung am Stickstoff, wodurch es zur Bildung der Isothiocyanate kommt.

Über die Biosynthese der Senföglucoside laufen in den letzten Jahren in mehreren Laboratorien intensive Untersuchungen, die vor kurzem von *Underhill* und *Wetter*² zusammenfassend dargestellt wurden. Auf Grund dieser Ergebnisse kann man als gesichert ansehen, daß die um ein C-Atom höhere Aminosäure eine Vorstufe und häufig auch die aus dem Intermediärstoffwechsel führende Verzweigungsstelle in der Biosynthese-sequenz zu den Senföglucosiden darstellt (Schema 1).

¹ A. Kjaer, Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe (Herausg.: L. Zechmeister) 18, 122 (1960).

² E. W. Underhill und L. R. Wetter, in: „Biosynthesis of Aromatic Compounds“ (Herausg.: G. Billek). Pergamon Press, 1966, S. 129 ff.



Schema 1

Bei früheren Untersuchungen^{3, 4} über die Biosynthese des p-Hydroxybenzylglucosinolates (Sinalbin) erschwerte der in jungen Pflanzen überaus intensive Stoffwechsel des L-Tyrosins die Beurteilung des Einbaues der Radioaktivität verschiedener Vorstufen. Dazu kam der bei der Bildung anderer Senfölglycoside bisher nicht beobachtete Einbau der entsprechenden Zimtsäure, nämlich der p-Cumarsäure. Dies ließ es wünschenswert erscheinen, die Biosynthese des Sinalbins mit Vorläufern zu untersuchen, welche nicht mehr einem so vielfältigen und überaus starken Abbau unterliegen wie L-Tyrosin. Auf Grund von Arbeiten von *Underhill*⁵ bot sich dafür als biologischer Vorläufer besonders das Oxim des gegenüber der Aminosäure nächstniedrigeren Aldehydes an, das aber im Falle des Sinalbins bisher noch nicht synthetisch zugänglich war.

Sinalbin repräsentiert in der hier untersuchten Pflanze, dem weißen Senf (*Sinapis alba*), das Hauptglucosid, wird aber im Vergleich zu anderen Senfölglycosiden, wie Glucobrassicin⁶, verhältnismäßig langsam gebildet.

Verwendete Materialien und Methoden

Radioaktive Vorstufen

L-Phenylalanin-3-¹⁴C, L-Phenylalanin-U-¹⁴C, L-Phenylalanin-(ring-4)-³H und L-Tyrosin-3-¹⁴C wurden vom Radiochemical Centre, Amersham, England, DL-Tyrosin-1-¹⁴C und Nitromethan-¹⁴C von der Intern. Chem. Nuclear Corp., City of Industry (Cal.), USA, und Shikimisäure-U-¹⁴C von der New England Nuclear Corp., Boston (Mass.), USA, bezogen. p-Cumarsäure-3-¹⁴C konnte aus p-Hydroxybenzaldehyd-(carbonyl)-¹⁴C⁷ durch Kondensation mit Malonsäure gewonnen werden. Phenylacetaldehydoxim-1-¹⁴C synthetisierten wir nach Angaben von *Underhill*⁵.

Synthese von p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim: 33 g p-Hydroxynitrostyrol⁸ wurden in 800 ml Methanol gelöst, mit 52 ml Essigsäure sowie 50 mg Platinkatalysator (10% Pt auf Aktivkohle) versetzt und auf 30° gebracht. Bei intensiver Rührung wurden innerhalb von 10 Min. 100 g Zinkstaub eingetragen, wobei die Temp. durch Kühlung auf 30—35° gehalten wurde. Nach weiteren 5 Min. bei 35° filtrierte man vom überschüssigen Zink ab und engte

³ H. Kindl, Mh. Chem. **95**, 439 (1964).

⁴ H. Kindl, Mh. Chem. **96**, 527 (1965).

⁵ E. W. Underhill, Europ. J. Biochem. **2**, 61 (1967).

⁶ H. Schraudolf und F. Bergmann, Planta [Berlin] **67**, 75 (1965).

⁷ G. Billek, H. Kindl, A. Schimpl und F. P. Schmoock, J. lab. Comp. **5**, 3 (1969).

⁸ C. B. Gairaud und G. R. Lappin, J. Organ. Chem. **18**, 1 (1953).

das Filtrat im Vak. zur Trockene ein. Der Rückstand wurde mit Essigester extrahiert und dann der Lösung — bis deutliche Trübung eintrat — Benzol zugesetzt. Die Lösung ließ sich durch Filtrieren über Kieselgel (0,05—0,20 mm Korngröße, etwa 200 ml Volumen) reinigen. Es wurde nachgewaschen und das Eluat auf ein Fünftel des Volumens eingengt; anschließend wurde wieder Benzol bis zur Trübung zugesetzt und die Reinigung über Kieselgel wiederholt. Die endgültige Isolierung erfolgte durch Chromatographie auf einer Kieselgelsäule (4 × 50 cm); als Laufmittel wurde Benzol—Essigester 3,5 : 1 (v/v) verwendet. Das in 100-ml-Fractionen aufgefangene Eluat wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten (Laufmittel: Benzol—Essigester, 5 : 1 v/v) auf seinen Gehalt an Oxim untersucht. Nach dem Eindampfen der Fractionen kristallisierten 5,2 g (= 17% bez. auf den eingesetzten p-Hydroxybenzaldehyd) Oxim aus. Längere Zeit haltbar ist nur ein mehrmals mit Essigester—Petroläther umkristallisiertes Produkt; Schmp.: 119°. Die Elementaranalyse ergab die zu erwartenden Werte für C, H und N.

Synthese von p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim-1-¹⁴C aus Nitromethan-¹⁴C

335 mg p-Hydroxybenzaldehyd, welcher vorher 3mal mit Wasser unter Verwendung von Tierkohle umkristallisiert und anschließend intensiv getrocknet wurde, ließ man mit 135 μ l Nitromethan-¹⁴C (spez. Aktivität 120 μ C/mMol), 1,4 ml Essigsäure und 140 mg Ammoniumacetat unter Rückfluß kochen. Nach 1 Stde. wurden 270 μ l einer 10proz. Lösung von Nitromethan in Essigsäure zugegeben und weitere 30 Min. erhitzt. Die Reaktionslösung wurde im Vak. zur Trockene eingedampft und der Rückstand unter Verwendung des Laufmittels Benzol—Essigester, 4 : 1 (v/v), auf einer Kieselgelsäule (1,3 × 15 cm) chromatographiert. Die unmittelbar nach der Front laufende, tiefgelbe Fraktion wurde gesammelt, eingedampft und auf ihre Radioaktivität geprüft, Ausb. 55%.

170 mg p-Hydroxynitrostyrol-1-¹⁴C wurden in 15 ml Methanol gelöst und mit 270 μ l Essigsäure sowie 20 mg Platinkatalysator (10% Pt auf Aktivkohle) versetzt. Unter Beibehaltung einer Temp. von 35° wurden innerhalb von 5 Min. 820 mg Zinkstaub eingetragen, weitere 5 Min. gerührt, filtriert und das Filtrat im Vak. zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde mehrmals mit Essigester bei Raumtemp. extrahiert, der Extrakt im Vak. zur Trockene eingengt und anschließend der in 400 μ l Methanol aufgenommene Rückstand auf zwei präparative Dünnschichtplatten (2 mm Dicke, Merck F 254) aufgetragen. Chromatographiert wurde in dem Laufmittel Benzol—Essigester, 5 : 1 (v/v). Der R_f -Wert für das Oxim, welches man mit Hilfe eines Fluoreszenzindikators im UV erkennt oder durch Sprühen mit Kupferacetat oder diazot. Sulfanilsäure lokalisieren kann, beträgt 0,20. Die Oximzone wurde mit Methanol (3mal 50 ml) extrahiert, die trübe Lösung bei 30 000 × g zentrifugiert und der Überstand im Vak. zur Trockene eingengt. Radiochem. Ausb. 15%.

Gewinnung der L-Tyrosin-ammoniak-lyase aus *Hordeum vulgare*, Nachweis der Bildung von L-Tyrosin aus p-Cumarsäure in vitro

200 g Halme von *Hordeum vulgare* (knapp vor der Reifung der Samen) wurden mit 150 ml 0,2M-Boratpuffer, pH 8,8, im Mixer zerkleinert⁹. Die nach der Zentrifugation erhaltene klare Lösung unterwarf man einer partiellen

⁹ M. R. Young, G. H. N. Towers und A. C. Neish, *Canad. J. Botany* **44**, 341 (1966).

Hitzedenaturierung (15 Min., 50°); die ausgefallenen denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 20 000 $\times g$ entfernt. Nach Totalammoniumsulfatfällung wurde der Niederschlag in 30 ml 0,05M-Boratpuffer, pH 8,8, aufgenommen und bei 40 000 $\times g$ klar zentrifugiert. 10 ml dieser Lösung wurden auf einer Säule (4 \times 60 cm), welche mit 0,05M-Boratpuffer konditionierten Sephadex G-200 enthielt, getrennt. Sowohl die Enzympräparation nach der Ammoniumsulfatfällung als auch mehrere Fraktionen nach der Säulentrennung auf Sephadex G-200 wurden mit p-Cumarsäure-3-¹⁴C (80 μ C/mMol) und NH₄Cl (Konzentration im Ansatz: 0,35M) inkubiert.

Nach 20 Min. wurde der Enzymansatz mit konz. HCl versetzt; hierauf wurden 5 mg DL-Tyrosin als Träger zugegeben, aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit Äther extrahiert. Die wäßrige Lösung versetzte man mit 50 mg L-Tyrosin, behandelte nach kurzem Erhitzen mit Tierkohle und kristallisierte das L-Tyrosin 4mal aus Wasser bis zur konstanten spezif. Aktivität um.

Nachweis der L-Tyrosin-ammoniak-lyase-aktivität in *Sinapis alba*

Aus 100 g 6 Wochen alten Pflanzen von *Sinapis alba* wurde bei -20° ein Acetonrockenpulver hergestellt, welches anschließend mit 0,2M-Boratpuffer, pH 8,8, durch Zerreiben mit Sand extrahiert wurde. Man trennte vom Unlöslichen ab und reicherte das Enzym durch partielle Hitzedenaturierung (10 Min., 55°) sowie durch partielle Säuredenaturierung (10 Min., pH 5,0) an. Schließlich wurde eine Ammoniumsulfatfällung vorgenommen und das Protein durch Chromatographie auf Sephadex G-50 von den niedermolekularen Ionen abgetrennt.

Applikation der radioaktiven Vorstufen sowie Isolierung und Identifizierung des Senfölglicosides und der Phenolcarbonsäuren

Als Untersuchungsobjekte dienten 4—6 Wochen alte Pflanzen von *S. alba* sowie 12 cm hohe Pflanzen von *Lepidium sativum*. Nach 50stdg. Infusion wurde das Pflanzenmaterial mit heißem Äthanol extrahiert, die Lipid-Inhaltsstoffe entfernt und das Senfölglicosid mit Hilfe eines Kationenaustauschers (Tetramethylammoniumform) in das Tetramethylammonium-p-hydroxybenzylglucosinolat³ übergeführt. Die weitere Reinigung erfolgte durch zweifache präparative Papierchromatographie³ auf dickem Papier¹⁰. Methodische Einzelheiten für papierchromatographische und elektrophoretische Trennung von Senfölglicosiden und Phenolcarbonsäuren wurden bereits früher beschrieben^{3, 11, 12, 13}. Zur weiteren Identifizierung der Senfölglicoside wurden diese durch 2stdg. Rückflußkochen mit 20proz. HCl hydrolysiert und die gebildeten Phenyllessigsäuren papierchromatographisch getrennt und identifiziert.

Bestimmung der Enzymaktivitäten

Die Proteinmenge wurde nach Lowry et al.¹⁴ bestimmt, wobei Eieralbumin als Standard verwendet wurde. Die Aktivitätsbestimmung der

¹⁰ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, *Phytochem.* **5**, 1091 (1966).

¹¹ G. Billek und H. Kindl, *Mh. Chem.* **93**, 85 (1962).

¹² H. Kindl und G. Billek, *Mh. Chem.* **95**, 1044 (1964).

¹³ H. Kindl, *Europ. J. Biochem.* **7**, 340 (1969).

¹⁴ O. H. Lowry, M. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Dandall, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

L-Tyrosin-ammoniak-lyase erfolgte ähnlich wie bei Young et al.⁹ mit Hilfe von L-Tyrosin-1-¹⁴C bei 40°; vor der Aufarbeitung des Inkubationsansatzes wurde inaktive p-Cumarsäure als Träger zugesetzt.

Bestimmung der Radioaktivität

Die Verteilung der Radioaktivität auf Papierchromatogrammen wurde durch Auszählen mit Hilfe von Chromatogramm „scanners“ bestimmt, welche entweder mit einem Geiger—Müller-Endfensterzählrohr oder mit zwei endfensterlosen Gasdurchflußzählrohren in 4 π -Anordnung ausgerüstet waren; die Zählhausbeute betrug für ¹⁴C in diesen Fällen 1,7 bzw. 18%. Nach präparativer oder analytischer Trennung von Gemischen auf mit Kieselgel G beschichteten Dünnschichtplatten konnte die Aktivitätsmenge in der Weise bestimmt werden, daß aliquote Teile der zu bestimmenden Zonen von den Platten geschabt wurden und die Radioaktivität des Kieselgels nach Stabilisierung durch CAB-O-SIL* im Flüssigkeits-szintillationszähler gemessen wurde. Für die Messung im Flüssigkeits-szintillationszähler (Nuclear Chicago, Serie 720) verwendeten wir je nach Beschaffenheit der Proben die folgenden Szintillatorlösungen: Kleine Mengen (unter 2 mg) schwach polarer Verbindungen wurden in einem Toluolszintillator (5,0 g Butyl-PBD** und 0,20 g POPOP*** in 1,0 l Toluol, p. A.) gelöst. Die Ausb. betrug dabei für ¹⁴C 75—85%, für ³H 30—45%. Die Radioaktivität geringer Mengen einer wässrigen Lösung (bis zu 150 μ l pro 15 ml Szintillatorlösung) ließ sich mit hoher Ausbeute (70—80% für ¹⁴C) mit Hilfe des folgenden Szintillators bestimmen: 7,0 g Butyl-PBD**, 50 g Naphthalin, 0,25 g bis-MSB†, 500 ml Dioxan p. A., 500 ml Toluol p. A. Für die Aktivitätsbestimmung größerer Mengen von wäsr. Lösungen (bis zu 1,5 ml pro 15 ml Szintillatorlösung) kam ein etwas abgewandelter Brayscher Szintillator¹⁵ zur Anwendung: 5,0 g Butyl-PBD**, 50 g Naphthalin, 20 ml Methylcellosolve, 100 ml Methanol p. A., 900 ml Dioxan p. A.

Hier betrug die Ausb. für ¹⁴C bei nicht gefärbten Proben zwischen 35 und 75%. Zur Bestimmung der Radioaktivität von Rohextrakten mit hoher Salzkonzentration wurden dem Dioxan—Toluol-Szintillator 25% Triton X-100⁺ zugesetzt. Tyrosin ließ sich gut messen, wenn es vorerst in 1,0 ml Soluene 100⁺ gelöst und dann mit Toluol-Szintillatorlösung versetzt wurde.

Die Zählhausbeute wurde mit Hilfe der Kanalverhältnismethode bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Der zur Bildung des Sinalbins führende Syntheseweg erscheint deutlich vom Intermediärstoffwechsel abgesetzt und stellt — in Anbetracht der Vielfalt der benötigten Reaktionstypen — auch bei den für die Variationsbreite ihrer Syntheseleistungen bekannten Pflanzen eine Aus-

* Packard Instrument Comp., Downers Grove, Ill., USA.

** 2-(4'-tert.-Butylphenyl)-5-(4"-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol, Ciba, CH-4000 Basel.

*** 1,4-Bis-[2-(5-phenyl)-oxazol]-benzol, Fluka, CH-9470 Buchs.

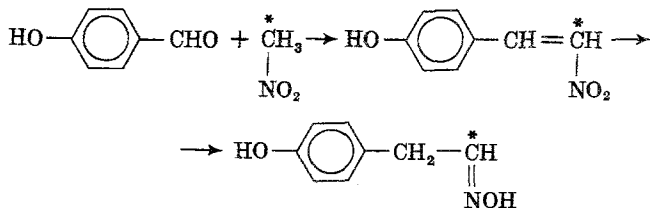
† Bis-(o-methylstyrol)-benzol, NEN-Chemicals, D-6072 Dreieichenhain, BRD.

¹⁵ C. A. Bray, *Analyt. Biochem.* **1**, 279 (1960).

nahme dar. Um zu einem tieferen Verständnis der Route und der Dynamik dieser Reaktionsfolge zu gelangen, bieten zwei methodische Gesichtspunkte die besten Erfolgsaussichten. Einmal sollten durch Vorgabe einer dem Primärstoffwechsel sehr nahestehenden Verbindung einige prinzipielle Aussagen über den physiologischen Weg erzielt werden. Dazu muß ein Vorläufer ausgewählt werden, welcher durch seine mehrfache und differenzierbare Markierung beim Einbau in das Syntheseprodukt ein Maximum an Information liefert. Zum anderen soll durch Applikation solcher Verbindungen, welche möglicherweise wichtige Verzweigungsstellen innerhalb der Stoffwechselwege repräsentieren, das mit Hilfe der vorangegangenen Versuche aufgestellte Biosyntheseschema erhärtet werden. Bei der Biosynthese des Sinalbins durfte man auf Grund eigener früherer Untersuchungen erwarten, daß das *p*-Hydroxyphenylacetaldehydoxim eine solche biologisch wichtige Verzweigungsstelle einnimmt; daher stellt die Synthese dieses Oxims in radioaktiver Form eine wesentliche Voraussetzung für die weiteren biochemischen Untersuchungen dar.

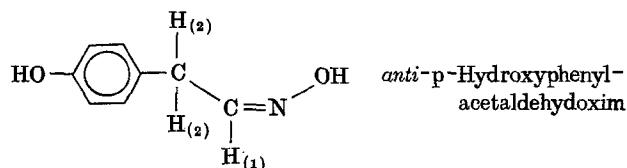
Synthese und Eigenschaften von *p*-Hydroxyphenylacetaldehydoxim

p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim-1-¹⁴C konnte in einer 2-Stufen-Reaktion aus *p*-Hydroxybenzaldehyd und Nitromethan-¹⁴C entsprechend Schema 2 hergestellt werden. Da sowohl das Oxim im Rohzustand und vor allem der Aldehyd sehr instabil sind, mußte diesem Umstande besondere Rechnung getragen werden; dies bedeutet späte Einführung der Radioaktivität und schnelle Aufarbeitung der Reaktionsgemische. Nach zahlreichen Variationen der Versuchsbedingungen gelang es, die Reduktion des *p*-Hydroxyphenylnitroäthens so zu führen, daß die gleichzeitig ablaufenden Polymerisationsreaktionen nicht überwogen. Wesentlich ist eine rasche Abtrennung der Harze mit Hilfe von Kieselgel und die unmittelbar darauffolgende Reinigung des Rohproduktes. Die Reduktion des Nitrostyrols wurde mit Zink—Essigsäure durchgeführt. Versuche, das 1-(*p*-Hydroxyphenyl)-2-nitroäthen bzw. die silylierte Verbindung mit Hilfe von Lithiumaluminiumhydrid zu reduzieren, waren ebenfalls erfolgreich, ergaben aber geringere Ausbeuten.



Schema 2: Synthese von *p*-Hydroxyphenylacetaldehydoxim-1-¹⁴C

Die Reinigung des Aldoxims erfolgte am besten mit Hilfe einer chromatographischen Trennung auf einer Kieselgel-Säule bzw. durch präparative Dünnschichtchromatographie. Das gereinigte Oxim kann leicht aus Essigester—Petroläther umkristallisiert werden, wobei die reine *anti*-Verbindung (Schmp. 119°) anfällt. Beim Umkristallisieren aus heißem Wasser wird eine Mischung von *syn*- und *anti*-Oxim erhalten, wodurch eine starke Schmelzpunktdepression auftritt; eine Trennung der *anti*-Verbindung vom *syn*-Isomeren mit Hilfe verschiedener Kristallisationsversuche gelang auch bei Gemischen von mehr als 70% *anti*-Oxim nicht. Die Zuordnung der Struktur der geometrischen Isomeren war mit Hilfe der NMR-Spektren möglich¹⁶.



Das NMR-Spektrum der schmelzpunkt reinen *anti*-Form in Deuteroaceton weist ein Dublett bei $\delta = 3,67$ auf, welches den H(2)-Atomen der Methylengruppe zuzuordnen ist. Die aromatischen Protonen erscheinen als enges (AB)₂-System ($\delta_A = 7,17$; $\delta_B = 6,83$; $J_{AB} = 8,8$ Hz) und überlagern sich mit dem triplettierten Proton H(1) ($\delta_{H(1)} = 6,83$; $J_{H(1)H(2)} = 5,5$ Hz). Die Protonen der phenolischen OH-Gruppe und der Oximgruppe ergeben ein diffuses Signal von $\delta = 7,35$ bis 10,8; die starke Verbreiterung des Signales der beiden aciden Protonen dürfte im wechselseitigen Austausch begründet sein. Das Spektrum der *syn*-Form weist abweichende Signale auf: $\delta_{H(2)} = 3,42$ und $\delta_{H(1)} = 7,53$; $J_{H(1)H(2)} = 6,5$ Hz.

Im IR-Spektrum in Chloroform erscheinen außer den typischen Aromatenbanden im niederfrequenten Bereich vor allem die Absorption bei 1515 (s), 1605 (m), 3310 (w, br), 3570 (s) und 3670 (m) charakteristisch.

Die Funktion des p-Hydroxyphenylacetaldehydoxims bei der Biosynthese des Sinalbins

Bei der Bildung des Senfölglycosides aus der Aminosäure muß das C-2 des L-Tyrosins von der Oxydationszahl 0 auf eine höhere Oxydationsstufe gebracht werden (Oxydationszahl + 3); es erscheint naheliegend, Zwischenstufen mit einer Oxydationszahl von + 1 zu postulieren. Diese Forderung erfüllen Aldoxime, welche von Underhill⁵ erstmals in *Tropaeolum majus* und von Kindl¹⁷ in *Brassica oleracea* gefunden wurden.

¹⁶ G. J. Karabatsos and R. A. Taller, Tetrahedron [London] **24**, 3347 (1968).

¹⁷ H. Kindl, Z. physiol. Chem. **349**, 519 (1968).

Ein Vergleich der Einbauraten von L-Tyrosin-3-¹⁴C und p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim-1-¹⁴C bei *S. alba* läßt die unmittelbare Vorläuferfunktion des Aldoxims als unzweifelhaft erscheinen. L-Tyrosin-3-¹⁴C wurde zu 0,3 bis 0,6% in das Sinalbin eingebaut, während der Einbau der Radioaktivität des p-Hydroxyphenylacetaldehydoxims-1-¹⁴C in den zwei vorgenommenen Applikationsversuchen 6,6 bzw. 1,1% betrug.

Ähnliche Versuche mit *Lepidium sativum* zeigten, daß diese Pflanze nicht zu einer Überführung des p-Hydroxyphenylacetaldehydoxims in das Sinalbin befähigt ist. Dies ist hinsichtlich der Spezifität des Einbaues des Aldoxims von Bedeutung.

Bei der Aufarbeitung der Senfpflanzen fanden sich interessanterweise nach der papierchromatographischen Auftrennung der hydrophilen Fraktion mehrere radioaktive Zonen. Neben dem Glucosinolat ($R_{glc} = 1,8$) und Verbindungen im Startbereich war etwa die gegenüber dem Glucosinolat dreifache Aktivität bei $R_{glc} = 4,0$ zu finden. Durch Vergleich mit inaktiver S-(β -D-Glucopyranosyl)-phenylacetothiohydroximsäure und S-(β -D-Glucopyranosyl)-p-hydroxyphenylacetothiohydroximsäure erhielten wir den Hinweis, daß es sich bei der aus dem Oxim in der Pflanze gebildeten Verbindung um das Desulfo-Sinalbin handelt, was auch durch Abbau der radioaktiven Verbindung zu markierter p-Hydroxyphenyl-essigsäure weiter erhärtet wurde. Die Phenolfraction enthielt u. a. p-Hydroxyphenylacetonitril.

Die Ergebnisse erlauben uns, auch unter Berücksichtigung der kürzlich erhobenen Befunde von *Underhill* und *Wetter*¹⁸ bei der Bildung des Glucotropaeolins, für die Biosynthese das folgende, z. T. noch hypothetische Syntheseschema aufzustellen (siehe Schema 3, S. 1782).

Das Oxim kann durch oxydative Decarboxylierung aus der N-Hydroxylaminosäure entstehen (Schritt b), wie bereits *Kindl* und *Underhill*¹⁹ zeigten; sowohl pflanzliche Peroxidasen im Verein mit Endiolen²⁰ als auch eine Flavinmononukleotid-abhängige Oxydase können diese Reaktion katalysieren¹⁹. Die Bildung der Aldoxime aus den Aminosäuren durch eine N-Hydroxylierung ließ sich in 3 Fällen, bei L-Phenylalanin, L-Tyrosin und L-Tryptophan, nachweisen^{20, 21} (Schritt a, b). Dies berechtigt uns zur Annahme, daß die Aldoxime nicht nur Vorläufer der Senfölgucoside sind, sondern auch tatsächliche Zwischenstufen darstellen. Für die weitere Reaktionsfolge vom Aldoxim zum Senfölgucosid ist das hier aufgestellte Schema insofern spekulativ, als noch keine Hinweise bekannt wurden, wie es zur Bildung der Thiohydroxamsäure

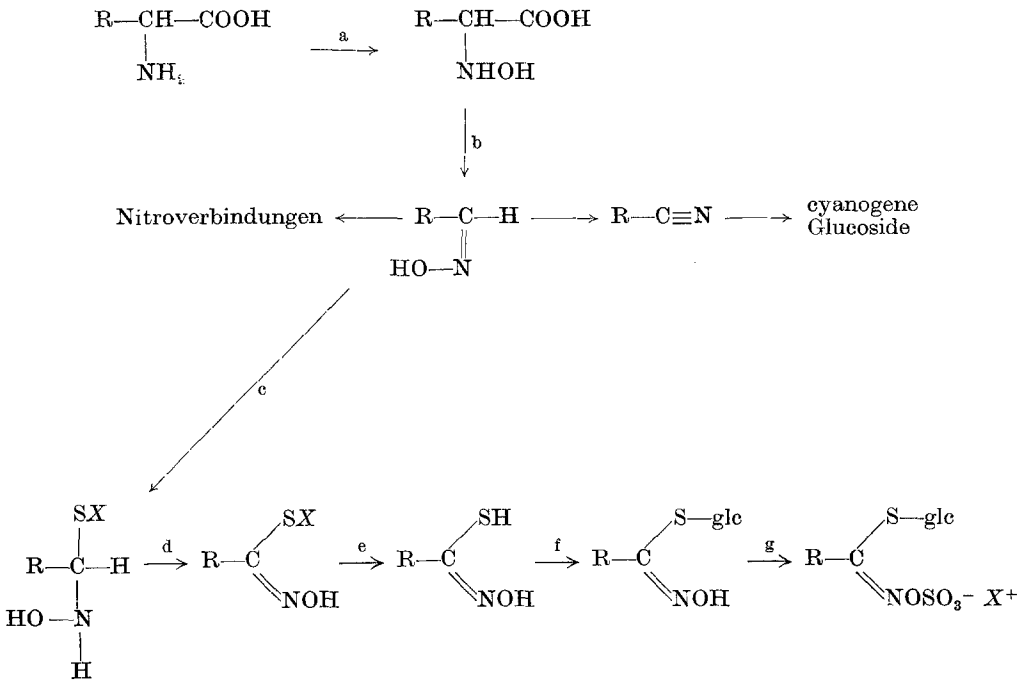
¹⁸ E. W. *Underhill* und L. R. *Wetter*, *Plant Physiol.* **44**, 584 (1969).

¹⁹ H. *Kindl* und E. W. *Underhill*, *Phytochem.* **7**, 745 (1968).

²⁰ H. *Kindl* und E. W. *Underhill*, 5th FEBS-Meeting, Prag 1968, Abstr. S. 95.

²¹ H. *Kindl*, unveröffentlicht.

kommt. In dem vorliegenden Schema (Schritt e) soll XSH eine Verbindung vom Typ des Cysteins bzw. eine enzymeigene SH-Gruppierung darstellen; später (Schritt d, e, f) könnte ein Austausch der Gruppe X erfolgen.



Schema 3: Bildung und Stoffwechsel der Aldoxime

Auch Überlegungen bezüglich der Stereochemie der hier postulierten Reaktionen erscheinen im Zusammenhang mit der Bildung und dem Stoffwechsel des p-Hydroxyphenylacetaldehydoxims angebracht. Bei einigen Aldoximen, wie z. B. dem Phenylacetaldehydoxim, wurde bei Raumtemperatur eine Umlagerung der beiden geometrischen Isomeren festgestellt; man kann daher bei Applikation derartiger Gemische erwarten, daß das biologisch aktive Isomere in genügender Menge nachgeliefert wird, auch dann, wenn nicht das richtige Isomere bei den Infusionsversuchen eingesetzt wird. Anders liegt der Fall beim p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim, welches vorwiegend in der Form der *anti*-Verbindung infundiert wurde und das auch in das Senfölglycosid eingebaut wurde. Man könnte somit annehmen, daß das *anti*-Oxim die biologische Vorstufe der Senfölglycoside ist; diese Annahme muß aber noch durch weitere Untersuchungen erhärtet werden, da über den Einfluß von Lösungsmitteln, pH und UV-Licht auf die Einstellung des Gleichgewichtes der beiden Formen der Aldoxime noch zu wenig bekannt ist.

Die Bildung der Aldoxime aus den N-Hydroxyaminosäuren — falls diese durch zwei hintereinander folgende Einelektronenübergänge vor sich geht — gibt uns keinen Hinweis, welche Form des Aldoxims bevorzugt entstehen sollte. Hingegen ist bekannt, daß das Endprodukt des Aldoxim-Stoffwechsels, das Senfölglicosid, Thiolgruppe und Hydroxylgruppe am Stickstoff in *syn*-Stellung enthält. Diese scheinbare Diskrepanz — der Gegensatz zur *anti*-Form des Aldoxims — läßt sich erklären, wenn man annimmt, daß die im Schritt d postulierte Dehydrierung durch eine *trans*-Eliminierung erfolgt.

Die Aldoxime nehmen nicht nur bei der Biosynthese der Senfölglicoside eine zentrale Stellung ein; Versuche von *Conn* und Mitarbeitern²² über die Bildung von cyanogenen Glucosiden und vor allem die Untersuchungen bei den Senfölglicosiden führen dazu, daß den Aldoximen die Funktion von wichtigen Verzweigungsstellen beim Stoffwechsel der Aminosäuren zugeschrieben werden muß. Auf Grund der hier angeführten Überlegungen könnte man annehmen, daß p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim der Vorläufer von p-Hydroxyphenylacetonitril und den cyanogenen Glucosiden Dhurrin und Taxiphyllin ist. Aldoxime sollten z. B. auch bei dem Übergang Asparaginsäure → Malonsäuresemialdehydoxim → β-Nitropropionsäure auftreten.

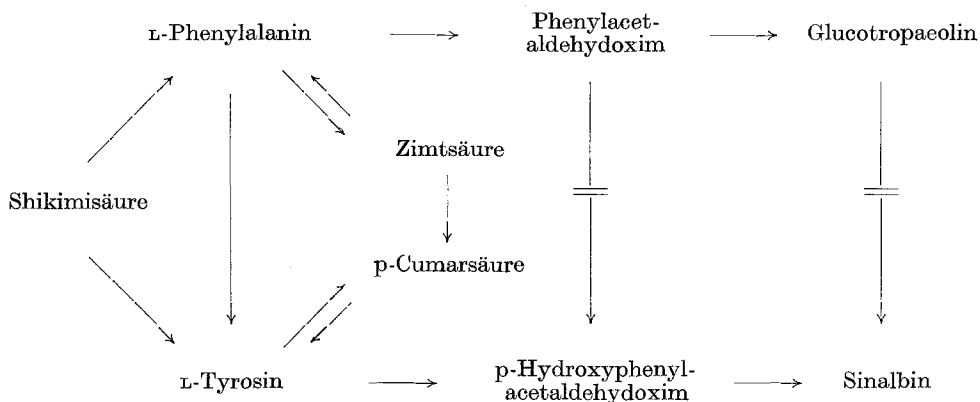
Zur Frage des Ursprungs der Hydroxylgruppe

Der „Primärhydroxylierung“ kommt beim Stoffwechsel der aromatischen Verbindungen in Pflanzen eine wesentliche regulatorische Funktion zu. Unter „Primärhydroxylierung“ soll die Einführung der ersten Hydroxylgruppe am Aromaten in o- bzw. p-Stellung zur Seitenkette verstanden werden, wie sie z. B. durch die Übergänge L-Phenylalanin → L-Tyrosin, Zimtsäure → p-Cumarsäure, Phenylbrenztraubensäure → o-Hydroxyphenylelessigsäure, Benzoesäure → Salicylsäure repräsentiert wird. Im Zusammenhang mit der Biosynthese des Sinalbins erhebt sich die Frage, auf welcher Stufe die Einführung der Hydroxylgruppe in den Aromaten erfolgt. Schema 4 gibt zur Erläuterung dieser Problemstellung eine Übersicht, in welcher die im Zusammenhang mit der Hydroxylierung am Aromaten stehenden Unterschiede hervorgehoben werden.

Durch die vorliegenden Untersuchungen mit Hilfe von Phenylacetaldehydoxim-1-¹⁴C konnte gezeigt werden, daß in *S. alba* kein Einbau in das Sinalbin zu beobachten war. Daraus muß geschlossen werden, daß bereits auf der Stufe der Aminosäuren der für das Senfölglicosid benötigte Hydroxylierungstyp vorgegeben sein muß. Phenylacetaldehydoxim kann nicht zu p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim hydroxyliert werden. Auch Glucotropaeolin (Benzylglucosinolat) kann, wie bereits früher gezeigt

²² E. E. Conn, J. Agric. Food Chem. **17**, 519 (1969).

wurde⁴, nicht zum Sinalbin hydroxyliert werden (Schema 4). Eine Primärhydroxylierung liegt somit, zumindest bei der Hauptroute der Biosynthese, im Falle der Sinalbinbildung nicht vor. Es soll hier aber noch darauf hingewiesen werden, daß nach Infusion von L-Phenylalanin-(ring-4)-³H-U-¹⁴C wohl nur ein geringer Einbau der Radioaktivität (0,025%), aber eine mehr als 80proz. Retention des Tritiums festgestellt werden konnte. Primärhydroxylierungen, welche mit einer durch Hydroxylierung induzierten Wanderung eines Substituenten (NIH-shift)²³ verbunden sind, wurden in letzter Zeit auch bei höheren Pflanzen beobachtet^{13, 24, 25, 26}.



Schema 4: Stoffwechselübergänge, die im Zusammenhang mit der Biosynthese des Sinalbins von Bedeutung sind

Der Frage, ob auf der Stufe des Aldoxims bzw. in den darauffolgenden Schritten zum Senfölgucosid noch eine Hydroxylierung — eine Primärhydroxylierung oder eine Sekundärhydroxylierung in *o*- bzw. *p*-Stellung zur Primärhydroxylgruppe am Kern bzw. Hydroxylierung in der Seitenkette nach einem ähnlichen Mechanismus — oder Eliminierung möglich ist, kommt eine allgemeine Bedeutung im Zusammenhang mit der Biosynthese von Sinigrin (Allyl-glucosinolat) bzw. Glucobarbarin (2-Phenyläthyl-2-hydroxy-glucosinolat) zu. Im Gegensatz zur Biosynthese des Sinalbins tritt vermutlich bei der Bildung dieser Verbindungen noch Sekundärhydroxylierung bzw. eine Eliminierung auf der Stufe des Aldoxims, also eine Änderung in der Seitenkette der Alkylgruppe des Glucosinolates ein; z. B. macht bei der Sinigrin-Biosynthese der Einbau von 4-Methylthiobutyraldehydoxim eine Eliminierung von Methanthiol er-

²³ G. Guroff, J. W. Daly, D. M. Jerina, J. Renson, B. Witkop und S. Udenfriend, Science [New York] **157**, 1524 (1967).

²⁴ M. H. Zenk, Z. Pflanzenphysiol. **57**, 477 (1967).

²⁵ A. Sutter und H. Grisebach, Z. physiol. Chem. **349**, 1630 (1968).

²⁶ N. Amrhein und M. H. Zenk, Phytochem. **8**, 107 (1969).

forderlich²⁷. Es wäre im Falle der Infusion von p-Hydroxyphenylacetaldehydoxim vorstellbar, daß es — da hier die Primärhydroxylierung bereits erfolgte — auch auf der Stufe des Aldoxims zu einer weiteren Hydroxylierung in o-Stellung zur bereits vorhandenen Hydroxylgruppe (also Sekundärhydroxylierung) kommen kann, da dieser Übergang durch Oxidasen vom Typ der Tyrosinase leicht erfolgen sollte. Dies wurde aber bei *S. alba* nicht beobachtet.

Die Rolle der p-Cumarsäure und die Diskussion der möglichen, zur Bildung des L-Tyrosins führenden Wege

p-Cumarsäure kann in höheren Pflanzen sowohl durch Hydroxylierung der Zimtsäure als auch durch Abspaltung von Ammoniak aus L-Tyrosin gebildet werden. Beide Reaktionen wurden bisher als irreversibel angesehen^{28, 29}. Die bereits früher berichtete Überführung von p-Cumarsäure in Sinalbin steht aber mit dieser Ansicht nicht im Einklang. Während es auch weiterhin als wahrscheinlich anzusehen ist, daß Hydroxylierungen am Aromaten irreversibel sind, sollte die von der L-Tyrosin-ammoniak-lyase katalysierte Reaktion nicht prinzipiell irreversibel sein. Besonders bei Applikation von größeren Mengen von p-Cumarsäure kommt diesem Umstand Bedeutung zu.

Vorerst gelang es uns, in vivo durch Infusion von 10 µC p-Cumarsäure-3-¹⁴C (80 µC/mMol) an 10 Senfpflanzen nach 10 Stunden 2% der vorgegebenen Radioaktivität im L-Tyrosin nachzuweisen. Umkristallisation mit inaktivem L-Tyrosin bewies, daß es sich um das L-Isomere handelte. Bei den Versuchen in vitro wurden zunächst Enzympräparationen aus *Hordeum vulgare* verwendet. Mit Hilfe des etwa 100fach angereicherten Enzyms konnten bei 0,35M-Ammoniumkonzentration etwa 10% der vorgegebenen p-Cumarsäure in Tyrosin übergeführt werden; auch hier handelte es sich um das reine L-Isomere. Vorläufige Abschätzungen deuten darauf hin, daß das Gleichgewicht ähnlich wie bei der von der L-Phenylalanin-ammoniak-lyase katalysierten Reaktion liegen dürfte.

Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der Reversibilität der Ammoniak-lyase-Reaktion für die Biosynthese des Sinalbins wurde durch die Auffindung und Anreicherung der L-Tyrosin-ammoniak-lyase aus *S. alba* gewonnen. Das Enzym aus Senfpflanzen war je nach Alter der Pflanzen, bezogen auf Frischgewicht, etwa 30–40% so aktiv wie Präparationen, welche aus den gleichen Mengen von *H. vulgare* erhalten wurden. Die Anreicherung gelang bis zu einer spezif. Aktivität von 5,7 mU (U = internat. Einheiten) pro mg Protein.

²⁷ M. Matsuo, Tetrahedron Letters 1968, 4101.

²⁸ E. E. Conn, in: „Biochemistry of Phenolic Compounds“ (Herausg.: J. B. Harborne), Acad. Press, 1964, S. 413ff.

²⁹ A. C. Neish, Phytochem. 1, 1 (1961).

Nach diesen Ergebnissen können prinzipiell drei verschiedene Biosynthesewege für die Bildung des L-Tyrosins, und damit auch von zahlreichen Stoffwechselprodukten des L-Tyrosins, wie des Sinalbins, in Erwägung gezogen werden. Der Hauptweg ist sicher die direkte Synthese aus Shikimisäure über Prephensäure und p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure. Daneben spielt — besonders im tierischen Organismus — auch die Hydroxylierung von L-Phenylalanin eine wichtige Rolle. Ein dritter Weg zum L-Tyrosin wäre auf der Route L-Phenylalanin → Zimtsäure → p-Cumarsäure → L-Tyrosin vorstellbar. Der limitierende Schritt sollte dabei die Hydroxylierung der Zimtsäure sein. In der Folge sind Versuche beschrieben, welche über das physiologische Gewicht der angedeuteten Stoffwechselübergänge eine gewisse Aufklärung geben sollten.

In drei verschiedenen Experimenten wurden 6 Wochen alten Pflanzen von *S. alba* Shikimisäure- $U-^{14}C$ (5200 $\mu C/mMol$, 10 μC) bzw. L-Phenylalanin- $U-^{14}C$ (500 $\mu C/mMol$, 50 μC) bzw. Zimtsäure- $3-^{14}C$ (680 $\mu C/mMol$, 12 μC) verfüttert. Nach 9 Std. wurden die Pflanzen auf L-Tyrosin bzw. p-Cumarsäure aufgearbeitet und dabei folgende Ergebnisse erzielt: Shikimisäure wird in dieser Zeitspanne zu 1,5% in L-Tyrosin eingebaut, während L-Phenylalanin nur zu 0,03% zu L-Tyrosin hydroxyliert wird. Die Hydroxylierung der Zimtsäure zur p-Cumarsäure erfolgt im Gegensatz zur Hydroxylierung auf der Stufe der Aminosäuren mit über 5%; daneben wurden 0,02% der Aktivität in L-Tyrosin gefunden.

Es erscheint somit evident, daß in unseren pflanzlichen Objekten die Biosynthese des für die Bildung des Sinalbins benötigten L-Tyrosins im wesentlichen direkt aus der Prephensäure erfolgt und daß die Hydroxylierung von L-Phenylalanin bzw. Zimtsäure nur eine untergeordnete Rolle spielt. Bei nicht mehr physiologischen Verhältnissen, wie sie etwa durch die Infusion größerer Mengen von p-Cumarsäure bzw. L-Phenylalanin gegeben sind, können aber auch die beiden anderen Wege zur Bildung von L-Tyrosin beitragen. So wird es auch verständlich, daß bei Infusionszeiten von etwa 5 Tagen³ das vorgegebene radioaktiv markierte L-Tyrosin in verhältnismäßig kurzer Zeit auf sehr stoffwechselaktiven Wegen abgebaut wird, während eine geringe, aber lang dauernde Bildung von L-Tyrosin aus p-Cumarsäure dazu führt, daß in Summe ein höherer Einbau der Radioaktivität von p-Cumarsäure als von L-Tyrosin gefunden wird.

Die in dieser Abhandlung nachgewiesenen Übergänge von L-Phenylalanin in L-Tyrosin bzw. Zimtsäure in p-Cumarsäure besitzen je nach Organismus und äußeren Bedingungen wechselnde Bedeutung im Stoffwechsel. Während etwa der überwiegende Teil von L-Phenylalanin in höheren Tieren und im menschlichen Organismus zu L-Tyrosin hydroxyliert und dann weiter über die Homogentisinsäure abgebaut wird, können verschiedene höhere Pflanzen die Hydroxylierung von L-Phenylalanin nicht oder nur im geringen Ausmaß durchführen¹³. Die Hydroxylierung der

Zimtsäure erfolgt, wie *Russel* und *Conn*³⁰ zeigten, in den Mikrosomen. Ob die so gebildete p-Cumarsäure, vorwiegend in glucosylierter Form, rasch in der Vakuole abgelagert wird oder längere Zeit im stoffwechselaktiven Plasma bleibt, konnte aus den Experimenten nicht entschieden werden; falls sich aber die in zahlreichen Pflanzen gefundenen hohen Konzentrationen an p-Cumarsäure nicht nur auf die Vakuolen beziehen, sollte dem Übergang von p-Cumarsäure in L-Tyrosin auch in vivo gewisse Bedeutung zukommen.

Es wird der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, für einen Förderungsbeitrag und dem Österreichischen Forschungsrat, Wien, für die Bereitstellung des Flüssigkeitsszintillationszählers gedankt.

³⁰ *D. W. Russel* und *E. E. Conn*, *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 256 (1967).