

SHORT COMMUNICATION

'CHOLESTEROL SIDE-CHAIN CLEAVING ENZYME' AKTIVITÄT IN KEIMLINGEN UND *IN VITRO* KULTIVIERTEN GEWEBEN VON *DIGITALIS PURPUREA*

H. PILGRIM

Sektion Pharmazie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, DDR

(Eingegangen 28 Oktober 1971)

Abstract—Experiments with cholesterol-26-¹⁴C gave evidence for the occurrence of cholesterol side-chain cleaving enzyme in seedlings of *Digitalis purpurea*. Tissue cultures of *D. purpurea* failed to show cholesterol side-chain cleaving activity, which may be the reason why tissue cultures are unable to biosynthesize cardenolide glycosides.

Zusammenfassung—Unter Verwendung von Cholesterin-26-¹⁴C wurde in *Digitaliskeimlingen* ein 'Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme' nachgewiesen. In isolierten und emers sowie submers kultivierten *Digitalis*-geweben konnte keine 'Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme' Aktivität nachgewiesen werden. Diese Tatsache wird als eine Ursache des Ausbleibens der Cardenolidbiosynthese in den untersuchten Gewebekulturen angesehen.

EINLEITUNG

Die Umsetzung von Cholesterin zu Cardenoliden durch Pflanzen ist eindeutig bewiesen.¹ Caspi u. Mit. zeigten, daß Cholesterin in *Digitalis purpurea* zunächst zu Pregnenolon abgebaut wird.² Pregnenolon wiederum kann als Vorstufe der Cardenolide dienen.³ Folgender Biosyntheseweg der Cardenolide ist wahrscheinlich: Cholesterin → 20α-Hydroxycholesterin → Δ⁵-Pregnenol-3β-on-20 → Progesteron → 5β-H-Pregnanol-3β-on-20 → 5β-H-Pregnandiol-3β, 14β-on-20 → 5β-H-Pregnatriol-3β, 14β, 21-on-20 → Digitoxigenin.⁴ Durch die Untersuchungen von Wickramasinghe u. Mit. wurde bestätigt, daß bei der Biosynthese von Cardenoliden die Spaltung der Seitenkette des Cholesterins zwischen C-20 und C-22 ein notwendiger Schritt darstellt.⁵ Diese Reaktion macht ein Cholesterinabbauendes Enzym notwendig. Ein entsprechendes 'Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzyme' wurde in verschiedenen Organen tierischer und menschlicher Herkunft gefunden und seine regulatorische Funktion für die Steroidhormonbiogenese nachgewiesen.⁶

Da die von uns im Dunkeln kultivierten Gewebe von *D. purpurea* keine oder nur Spuren

¹ J. A. F. WICKRAMASINGHE, P. C. HIRSCH, S. M. MUNAVALLI und E. CASPI, *Biochem.* **7**, 3248 (1968).

² E. CASPI, P. O. LEWIS, D. M. PIATAK, K. V. THIMANN und A. WINTER, *Experientia* **22**, 506 (1966).

³ R. TSCHESCHE und G. LILLENWEISS, *Z. Naturforsch.* **19b**, 265 (1964); R. TSCHESCHE und B. BRASSAT, *Z. Naturforsch.* **21b**, 894 (1966); E. CASPI und D. O. LEWIS, *Science* **156**, 519 (1967); H. H. SAUER, R. D. BENNETT und E. HEFTMANN, *Phytochem.* **6**, 1521 (1967).

⁴ R. TSCHESCHE, R. HOMBACH, H. SCHOLTEN und M. PETERS, *Phytochem.* **9**, 1505 (1970).

⁵ J. A. F. WICKRAMASINGHE, E. P. BURROWS, R. K. SHARMA, J. B. GREIG und E. CASPI, *Phytochem.* **8**, 1433 (1969).

⁶ S. L. SULIMOVICI und G. S. BOYD, in *Hormones, Advances in Research and Applications* (edited by R. S. HARRISS), Vol. 27, 190 (1969).

von Cardenoliden bilden,⁷ ergab sich die Frage, ob diese Gewebekulturen überhaupt in der Lage sind, Cholesterin enzymatisch zu Pregnenolon oder anderen 21C-Steroiden abzubauen. Ziel unserer Untersuchungen war es, Calluskulturen, Submerskulturen sowie Keimlinge hinsichtlich des Vorkommens des 'Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzyme' zu vergleichen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die in der Tabelle aufgeführten Ergebnisse zeigen, daß die durch Zentrifugation bei 10 000 g erhaltene Fraktion (10 000 g Fraktion) der im Licht unter sterilen Bedingungen angezogenen Keimlinge im Gegensatz zu den Präparaten aus submers kultivierten Zellen von *D. purpurea* und von Calluskulturen in der Lage sind, Cholesterin-26-¹⁴C unter den Versuchsbedingungen abzubauen.

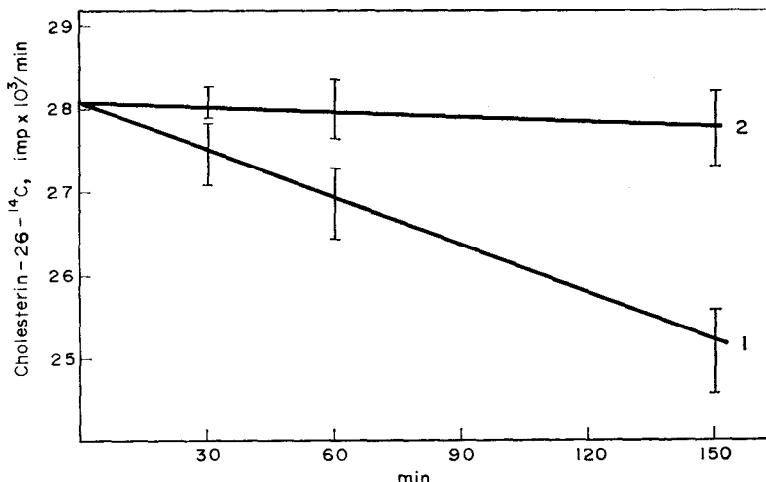
	1	2	3	4	5	6
Cholesterin-26- ¹⁴ C Imp./min.xo.1 ml	28 899	28 680	28 049	24 286	28 470	28 896

Cholesterin-26-¹⁴C-Abbau durch Acetonpulver von Keimlingen und *in-vitro* kultivierten Geweben von *D. purpurea* L.: (1) Ohne Enzympräparat; (2) Acetonpulver von submers kultivierten Digitalisgeweben (Lichtkultur), Proteingehalt 0,6 mg/Ansatz; (3) wie (2), jedoch das in Puffer suspendierte Acetonpulver 30 min. auf 90° erhitzt; (4) durch Zentrifugation bei 10 000 g erhaltene Fraktion der Keimlinge von *D. purpurea*, Proteingehalt 0,1 mg/Ansatz; (5) wie (4), jedoch in Puffer suspendiert 30 min auf 90° erhitzt; (6) durch Zentrifugation bei 10 000 g erhaltene Fraktion der submerskultivierten Digitalisgewebe (Dunkelkultur); Inkubationszeit: 180 min; Inkubationstemperatur: 25°; Schüttelfrequenz: 120/min.

Zur Bestimmung des Cholesterinabbaus wurde die Methode von Kimura, Satoh und Tchen benutzt.⁸ Hierbei werden nach bestimmten Inkubationszeiten Proben entnommen und diese unter Zusatz von inaktivem Cholesterin und einigen Tropfen Ameisensäure 30 min bei 130° erhitzt, um die freigesetzte Isocapronsäure zu entfernen. Die Restaktivität wurde gemessen. Die Ansätze enthielten NADPH₂, Glucose-6-phosphat, Phosphatpuffer pH 7,5, Cholesterin-26-¹⁴C sowie die entsprechenden Enzympräparate bzw. Vergleiche. Die eingesetzte Suspension des Acetontrockenpulvers der submers kultivierten Digitalisgewebe enthielt 0,4–0,6 mg Protein, die der 10 000 g Fraktion der Keimlinge bzw. der submers kultivierten Digitalisgewebe 0,1–0,2 mg Protein. Die durch Zentrifugation bei 10 000 g erhaltene Fraktion setzten wir ein, da in einigen Arbeiten berichtet wird, daß die Hauptaktivität der Cholesterollyase in den Mitochondrien lokalisiert ist. Der Abbau des Cholesterin-26-¹⁴C durch diese Fraktion der Keimlinge verlief im untersuchten Bereich bis 150 min linear. Der Cholesterinabbau beträgt nach 2,5 Stunden rund 9% der eingesetzten Menge. Auf Grund zahlreicher Untersuchungen muß der Abbau des Cholesterins zu 21C-Steroiden als eine Voraussetzung für die Biosynthese der Cardenolide gewertet werden.⁵ Eine entsprechende Enzymaktivität konnte hiermit in Digitaliskeimlingen nachgewiesen werden. Das Fehlen des 'Cholesterol Side-Chain Cleaving Enzyme' im Acetontrockenpulver der durch Zentrifugation bei 10 000 g erhaltenen Fraktion der kultivierten Digitalis-

⁷ H. PILGRIM, unveröffentlicht.

⁸ T. KIMURA, P. S. SATOH und T. T. TCHEN, *Anal. Biochem.* **16**, 355 (1966).

ABB. 1. CHOLESTERIN-26-¹⁴C-ABBAU IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZEIT.

- (1) Aceton-trockenpulver der durch Zentrifugation bei 10 000 g erhaltenen Fraktion der Keimlinge.
 (2) 30 Min auf 90°C erhitze Suspension von 1.

gewebe bzw. in den frischen Geweben müssen als eine Ursache des Versagens der Cardenolidbiosynthese angesehen werden. Diesem Enzym kommt bei der Cardenolidbiogenese in der Pflanze und Gewebekultur wahrscheinlich eine ähnliche regulatorische Funktion zu wie bei der Biogenese von Steroidhormonen.

EXPERIMENTELLES

Untersuchungsobjekte. Die Samen von *D. purpurea* L. wurden mit Chloramin-T (10%ig wäßrige Lösung) 45 min sterilisiert, 4 mal mit steriles Wasser gewaschen und in sterilen Petrischalen auf Fließpapier zur Keimung gebracht. 10 Tage alte Keimlinge wurden für die Versuche eingesetzt. Die *in-vitro* kultivierten Gewebe von *Digitalis purpurea* wurden vor 3,5 Jahren aus den Keimlingen steril gekeimter Samen auf einem Nährbogen nach Lin und Staba⁹ unter Zusatz von 1 ppm 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure im Tageslicht isoliert und dann im Dunkeln bei 26° kultiviert. Die Passagen wurden im Abstand von 6 Wochen ausgeführt. Submerskulturen wurden durch Einbringen von Calluskulturen in das Nährmedium nach Lin und Staba, jedoch mit nur 0,1% Agar und 0,1 ppm 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure angelegt und auf einem Fanal-Rundschütteltisch im Dunkeln bei 26° kultiviert. Die Passagen wurden im Abstand von 4 Wochen ausgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses des Lichtes wurden vor dem Versuchseinsatz die Submerskulturen über 2 Passagen im Dauerlicht kultiviert.

Gewinnung der Enzympräparate. *Aceton-trockenpulver der Callus- und Submerskulturen.* Die durch Zentrifugation von der Nährlösung getrennten und mit Phosphatpuffer (0,05 M, pH 7) gewaschenen Zellen der Submerskulturen bzw. die Calluskulturen wurden mit der 100 fachen Menge Aceton (-22°) homogenisiert und auf einer gekühlten Fritte schnell abgesaugt. Mehrmals wurde mit gekühltem Aceton und dann mit gekühltem peroxid- und wasserfreiem Aether gewaschen. Das Produkt wurde im Vacuum über P₂O₅ getrocknet und bei -22° bis zum Einsatz (maximal 7 Tage) aufbewahrt. 30 Min vor Beginn des Versuches wurden eine entsprechende Menge Aceton-trockenpulver in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 suspendiert und unter mehrmaligem Umschütteln bis zum Einsatz bei +4° aufbewahrt. Der Eiweißgehalt betrug 2,5-3,5 mg/ml Suspension.

Aceton-trockenpulver der durch Zentrifugation bei 10 000 g gewonnenen Fraktion von Keimlingen und Gewebekultur. Die Keimlinge bzw. kultivierten Gewebe wurden mit Quarzsand und 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 der 0,25 M Saccharose enthielt bei +4° im Mörser gut homogenisiert. Der Quarzsand und die groben Zellpartikel wurden durch Zentrifugation (5 Min) bei 800-1000 g in einer Kühlzentrifuge entfernt. Der Überstand wurde 60 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert und nach dem Verwerfen des Überstandes das Sediment mit gekühltem Aceton sowie peroxid- und wasserfreiem Aether gewaschen. Das gewaschene Produkt wurde nach Zentrifugation im Vacuum über P₂O₅ getrocknet und bei -22° bis zum Einsatz

⁹ M.-L. LIN und E. J. STABA, *Lloydia* 24, 139 (1961).

(maximal 7 Tage) aufbewahrt. Das Acetonpulver der 10 000 g Fraktion wurde 30 Min vor dem Einsatz in einer entsprechenden Menge 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,5 suspendiert (Eiweißgehalt 0,5–0,8 mg/ml) und unter mehrmaligem Umschütteln bei +4° aufbewahrt.

Eiweißbestimmung. Bei der Eiweißbestimmung wurde nach der Methode von Lowry, Rosebrough, Farr und Randall mit Albumin als Standard gearbeitet.¹⁰

Enzymbestimmung. Das Inkubationsgemisch enthielt in 1 ml 4,5 nmol Cholesterin 26-¹⁴C suspendiert in 50 µg Tween 80, 1 µmol NADPH₂, 20 µmol Glucose-6-phosphat, maximal 20 µmol Phosphatpuffer pH 7,5, Acetontrockenpulver mit 0,4–0,6 mg Protein bzw. Acetontrockenpulver der 10 000 g Fraktion der Keimlinge oder der *in-vitro* kultivierten Gewebe mit 0,1–0,2 mg Protein. Die Reaktion wurde nach der Temperierung durch Zugabe des Cholesterin-26-¹⁴C ($2,9 \times 10^5$ Imp./Min) gestartet. Die Inkubationstemperatur betrug 25°. Die Ansätze wurden zur besseren Sauerstoffversorgung während der Versuchszeit bei einer Frequenz von 120 geschüttelt. Nach 30, 60, 150 bzw. 180 Min wurden 0,1 ml entnommen und in einem Scintillationsgefäß, welches 500 µg Cholesterin und 4 Tropfen Ameisensäure enthielt, 30 Min bei 130° erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 5 ml Scintillationsflüssigkeit (5,0 g PPO, 0,1 g POPOP in 1000 ml Toluol) zugesetzt, die Proben in Lösung gebracht bzw. suspendiert und nach Temperierung in einem Packard-Scintillations-Spektrometer 'TriCarb 3320' die Aktivität bestimmt.

Anerkennungen—Herrn Professor Dr. Teuscher danke ich für die stete Förderung und Unterstützung, Frau Dr. Teuscher für die Proteinbestimmung sowie Frau Bandemer für ihre sorgfältige technische Assistenz

¹⁰ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

Key Word Index—*Digitalis purpurea*; Scrophulariaceae; biosynthesis; cardenolides; cholesterol; side-chain cleaving enzyme.