

UEBER DEN ABBAU VON RIBOFLAVIN IN PFLANZLICHEN ZELLSUSPENSIONSKULTUREN

WERNER KOOP und WOLFGANG BARZ

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen der Universität, 44 Münster/Westf., Deutschland

(Eingegangen 5 March 1976)

Key Word Index—Plant cell suspension cultures; catabolism; riboflavin; lumichrome; flavin coenzymes.

Abstract—The degradation of ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-riboflavin was investigated in plant cell suspension cultures of *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Phaseolus aureus*, *Nicotiana glauca*, *Petroselinum crispum* und *Triticum aestivum*. All cultures showed degradation of the isoalloxazine system with decreasing magnitude in the order shown above. Riboflavin is not degraded via lumichrome. ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-lumichrome was not degraded but rather excreted from the cells into the nutrient medium after conversion to a water soluble compound. Riboflavin, but not lumichrome, was incorporated into the coenzymes FMN and FAD.

EINLEITUNG

In den bisherigen Untersuchungen über den pflanzlichen Abbau aromatischer [1-4] und heterocyclischer [5-8] Verbindungen haben sich Zellsuspensionskulturen als geeignete experimentelle Systeme erwiesen. Aufgrund ihrer hohen Substrataufnahmeraten, dem verlässlichen Ausschluss von Mikroorganismen sowie ihrer exogenen Beeinflussbarkeit sollten Zellsuspensionskulturen auch Untersuchungen über den Katabolismus empfindlicher Substanzen, wie z.B. des Riboflavins (RF) ermöglichen. Wegen der bekannten Photolabilität des RF (Bildung von Lumichrom in saurer und neutraler Lösung und von Lumiflavin im alkalischen Bereich) müssen zusätzlich alle Untersuchungen, auch mit dem Pflanzenmaterial, in völliger Dunkelheit ausgeführt werden, was aufgrund der heterotrophen Lebensweise der Zellkulturen gut möglich ist.

Wir besitzen heute umfangreiche Kenntnisse über den mikrobiologischen Riboflavinabbau. Hier kann entweder nur die Ribitseitenkette des Riboflavins teilweise oder vollständig entfernt werden [9-12] oder es wird zusätzlich das Isoalloxazingerüst schrittweise abgebaut [11, 13]. In Tieren wird R_f offensichtlich nicht abgebaut, sondern ausgeschieden [14]; vermeintliche Abbauprodukte des tierischen Organismus wie Lumichrom, Lumiflavin, 6,7-Dimethyl-9-hydroxyäthylisoalloxazin oder 6,7-Dimethyl-9-formylmethylisoalloxazin konnten stets als Produkte intestinaler Mikroorganismen erkannt werden [12, 14]. Ein Riboflavinabbau in Pflanzen ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden. Man kennt nur eine Riboflavinhydrolase (Bildung von Lumichrom und Ribitol) und die Isolierung von Lumichrom aus *Crinum longifolium* [15] sowie einen Bericht [16] über die Isolierung von 1-Ribityl-2,3-diketo-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethylchinoxalin aus Pflanzengewebe. Hierbei muss jedoch auf die mangelnden aseptischen Bedingungen wie auch auf die nicht beachteten Lichtbedingungen kritisch hingewiesen werden.

Wir berichten im folgenden über erste Ergebnisse zum Abbau von Riboflavin und Lumichrom durch Zellsus-

pensionskulturen höherer Pflanzen sowie über die gleichzeitige Umwandlung von Riboflavin in Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD).

Ergebnisse

Zellsuspensionskulturen von *Cicer arietinum* L., *Phaseolus aureus* Roxb., *Petroselinum crispum*, *Glycine max*, *Nicotiana glauca* und *Triticum aestivum* wurden in mehreren Parallelansätzen mit ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Riboflavin ($2 \times 10^{-5} \text{ M}$) unter aseptischen Bedingungen und in strikter Dunkelheit versetzt. Das gebildete $^{14}\text{CO}_2$ wurde über einen längeren Zeitraum gemessen. Die Kurven der $^{14}\text{CO}_2$ -Entwicklung in Abb. 1 zeigen, dass die Kulturen von Petersilie und Weizen nur geringe Mengen an $^{14}\text{CO}_2$

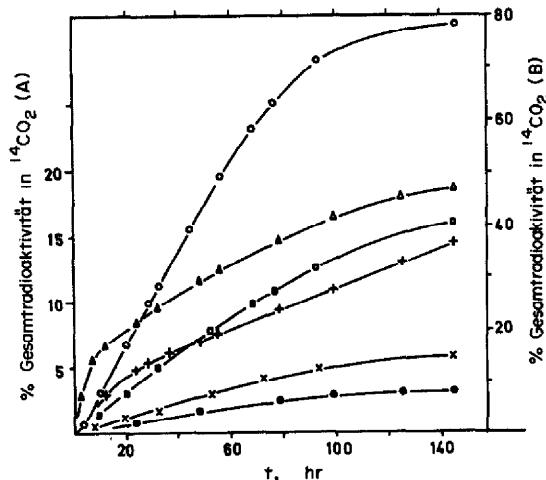


Abb. 1. Prozentuale Gesamtradioaktivität in $^{14}\text{CO}_2$ nach Applikation von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Riboflavin an Zellkulturen von *Cicer arietinum* (○—○), *Phaseolus aureus* (Δ—Δ), *Petroselinum crispum* (×—×), *Glycine max* (□—□), *Nicotiana glauca* (+—+), und *Triticum aestivum* (●—●). Für die Zellkultur von *Cicer arietinum* gilt der Ordinatenmaßstab B, für alle anderen Kulturen der Ordinatenmaßstab A.

(4–6%) entwickelten, diejenigen der Mungbohne, Sojabohne und von Tabak mit ca 15–18% der Gesamt-radioaktivität relativ stark und die Zellkultur von *Cicer arietinum* mit mehr als 75% der applizierten Gesamt-radioaktivität in $^{14}\text{CO}_2$ äusserst intensiv das angebotene Substrat oxidierten. Mit der Kichererbsenkultur ist damit ein sehr gutes pflanzliches System gefunden worden, das zu einem langfristig konstanten Riboflavinabbau fähig ist. Anschliessende Messungen der Radioaktivitätsverteilung im Nährmedium und den Zellen (entsprechend 17) sowie dünnenschichtchromatographische Analysen (Laufmittel L₁, L₂, L₃) ergaben, dass die Radioaktivität der alkoholunlöslichen Zellrückstände unbedeutend klein (0,1–0,6%) war, 6,7-Dimethyl-9-formylmethylisoalloxazin und Lumichrom bei Versuchsdurchführung in strikter Dunkelheit in keiner der Zellkulturen gefunden werden konnten und neben nicht umgesetztem Riboflavin nur noch jeweils ein zusätzlicher radioaktiver Metabolit in den Zellen auftrat. Bei diesen Verbindungen (a) bei *Phaseolus aureus* und (b) bei *P. crispum* handelt es sich aufgrund der gelben Fluoreszenz wohl um Isoalloxazinderivate. Die Menge an nicht umgesetztem, aber von den Zellen aufgenommenen Riboflavin war bei den Petersiliekulturen mit ca 60% besonders hoch und den Kulturen der Kichererbse mit ca 5% besonders niedrig. Die Umwandlung von Riboflavin in die z.Zt. noch unbekannten Verbindungen a und b (Anionen bei pH 7) erfolgt langfristig konstant bis zu 30% der Gesamtmenge an Substrat. Ausscheidung der Verbindungen a und b in das Medium findet nicht statt.

Verschiedene Kontrollexperimente mit ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Riboflavin unter normaler Laborbeleuchtung ergaben, dass dann auch Zellen und Nährmedien bei allen 6 Zellsuspensionskulturen grössere Mengen (bis zu 30% der applizierten Riboflavinmenge) an Lumichrom (Nachweis durch Chromatographie in L₁, L₂, L₃ und UV-Spektroskopie) isoliert werden konnten, die aber durch photochemische Destruktion von Riboflavin entstanden waren.

Applikation von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Lumichrom (hergestellt durch Riboflavin-Photolyse) an Zellsuspensionskulturen von *Cicer arietinum*, *Phaseolus aureus* und *Petroselinum crispum* in 10^{-5} molare Konzentration führte nur zu sehr geringen $^{14}\text{CO}_2$ -Ausbeuten (Abb. 2) zwischen 1–2,7%, die ganz wesentlich unter denen von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Riboflavin lagen

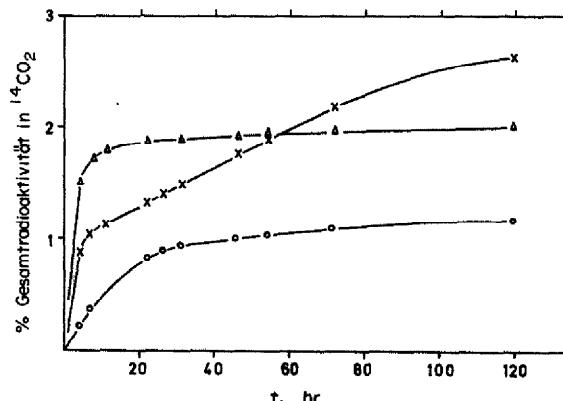


Abb. 2. Prozentuale Gesamtradioaktivität in $^{14}\text{CO}_2$ nach Applikation von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Lumichrom an Zellkulturen von *Cicer arietinum* (○—○), *Phaseolus aureus* (Δ—Δ) und *Petroselinum crispum* (×—×).

(vgl. Abb. 1). Messungen der Radioaktivitätsverteilung nach 120 Stunden Versuchsdauer ergaben, dass in den Zellen sehr wenig, im Nährmedium dagegen sehr viel (60–80%) der Radioaktivität vorhanden war. Es handelte sich hierbei im wesentlichen um eine Verbindung g mit unverändertem Isoalloxazingerüst (UV-Spektroskopie, Fluoreszenzverhalten), die nicht mit den Verbindungen a und b identisch war und offensichtlich ein zelluläres Entgiftungsprodukt von Lumichrom darstellt. Dies ergibt sich durch die Beobachtung, dass Verbindung g nach saurer Hydrolyse wieder Lumichrom ergab. Verbindung g war hitzebeständig (120°/1 Std.), photolytisch stabil und in Aether schlecht löslich.

Bei Untersuchungen über die Umwandlung von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Riboflavin in die Coenzyme FMN und FAD wurden wässrige Zellextrakte von Zellkulturen der Mungbohne, Kichererbse und Petersilie elektrophoretisch (Phosphatpuffer; 0,05 M; pH 7) mit Referenzsubstanz aufgetrennt und die entsprechenden Coenzymbanden auf ihre Radioaktivität vermessen. Nach 24 Stunden liess sich bei der Kichererbse aktives FMN nachweisen, während FAD erst nach 48 Stunden eindeutig markiert war. Nach 80 Stunden hatte sich ein relativ konstantes Aktivitätsniveau eingestellt mit einem Aktivitätsverhältnis von FAD zu FMN wie 8 zu 5 und mit ca 4% der Gesamtradioaktivität in FAD. Bei Gabe von ($2\text{-}^{14}\text{C}$)-Lumichrom liess sich markiertes FMN und FAD nicht nachweisen.

DISKUSSION

Unsere Ergebnisse beweisen, dass pflanzliche Zellen ähnlich wie zahlreiche Mikroorganismen zum Abbau des Isoalloxazingerüsts befähigt sind. Dieser Abbau setzt jedoch die Ribitylseitenkette an Position 9 voraus, da Lumichrom praktisch nicht verwertet wurde. Aufgrund der verwendeten ^{14}C -Markierung in Position 2 von Riboflavin kann zwar nur über den C-Ring eine Aussage gemacht werden, doch ist nach unseren bisherigen Erfahrungen über katabole Stoffwechselwege in Pflanzen [1, 2, 5, 18] eine permanente Akkumulation von Zwischenprodukten des Abbaus nicht sehr wahrscheinlich. Die Untersuchungen werden unter Verwendung anderer, positionsspezifisch markierter Riboflavinproben fortgeführt. Vergleichende Experimente in strikter Dunkelheit bzw. unter Licht haben eindeutig gezeigt, dass Lumichrom kein enzymatisches, sondern ausschliesslich ein Photolyseprodukt darstellt. Der beobachtete Riboflavinabbau kann daher nicht über Lumichrom führen. Dies wird auch durch die so sehr unterschiedliche Behandlung des Lumichroms im Vergleich zu Riboflavin deutlich, da dieses praktisch nicht abgebaut, sondern als wasserlösliches Derivat von den Zellen exkretiert wird. Nach unseren Ergebnissen sollte man daher die Isolierung von Lumichrom aus pflanzlichem Gewebe [z.B. 15] nicht als Beweis für einen pflanzeneigenen Abbau ansehen.

Bemerkenswert ist die Exkretion des wasserlöslichen Lumichromderivates g (möglicherweise ein Glykosid) durch die Zellen in das Medium, da nach unseren Erfahrungen mit sehr vielen unterschiedlichen Substanzen [2, 5, 18] die metabolische Exkretion exogen applizierter Verbindungen in Zellen aus Zellkulturen in die Vakuole und nicht in das Medium gerichtet ist. Weitere Untersuchungen werden zeigen, warum die Metabolite a und b von Riboflavin in diesem Aspekt völlig

anders behandelt werden. Im Gegensatz zu Polyphenolen [5,18], aber übereinstimmend mit anderen Heterocyclen [6] werden von Riboflavin und Lumichrom praktisch keine Metabolite in alkohol-unlösliche, polymere Zellkulturen überführt.

Die Umwandlung von Riboflavin in die Coenzyme FMN und FAD ist in Uebereinstimmung mit der auch für Pflanzen gut untersuchten Biosynthese der Coenzyme aus Riboflavin durch ATP-abhängige Phosphorylierungsreaktionen [19,20].

Wir haben bei Abbauuntersuchungen mit sehr unterschiedlichen Substraten [1-3,5,18] mehrfach beachtliche Unterschiede in der Abbauleistung zwischen den verwendeten Zellkulturen gefunden. Trotzdem überrascht die so wesentlich höhere Abbauleistung der Zellsuspensionskulturen von *Cicer arietinum* (vgl. Abb. 1). Wir glauben mit dieser Kultur ein für weitere Untersuchungen über den Riboflavinabbau besonders geeignetes System gefunden zu haben.

EXPERIMENTELLES

Zellsuspensionskulturen. Die Anzucht von und die Versuchsausführung mit den pflanzlichen Zellsuspensionskulturen unter aseptischen Bedingungen erfolgte nach früheren Angaben [7,17,21], ebenso die Prüfung der Zellkulturen auf Abwesenheit von Mikroorganismen vor und nach den Versuchen [21]. Die Aufarbeitung von Zellkulturen und Nährmedien ist bereits beschrieben worden [17,21,23], ebenso die Radioaktivitätsmessung löslicher und unlöslicher Produkte [22]. Alle Arbeiten mit Riboflavin wurden in Dunkelheit oder mit einer schwachen Dunkelrotlampe ausgeführt.

Chemikalien. (2^{-14}C)-Riboflavin (spez. Akt. 26,1 mCi/mMol) wurde vom Radiochemical Centre, Amersham bezogen. Das (2^{-14}C)-Lumichrom wurde durch Photolyse (48 Stdin., 400 W Weisslicht, 30 cm Abstand) von $10 \mu\text{Ci}$ (2^{-14}C)-Riboflavin in 2×10^{-4} mol. wässriger Lösung bei pH 5,5 hergestellt, durch Aetherextraktion gewonnen und dünnenschichtchromatographisch auf Reinheit untersucht. Die Synthese von 6,7-Dimethyl-9-formylmethylisoalloxazin erfolgte nach [44].

Chromatographiesysteme. Kieselgeldünnenschichtchromatographie erfolgte mit den Laufmittelsystemen: L₁ MeOH-C₆H₆-Me₂CO-HOAc (4:14:1:1); L₂ n-BuOH-EtOH-H₂O (5:2:3); L₃ n-BuOH-HoAc-H₂O (4:1:5).

Elektrophorese. Wässrige Zellextrakte oder Anteile der Nährmedien wurden papierelektrophoretisch in Natriumphosphatpuffer (0,05 M, pH 7) bei 1600 V und 80 mA 5 Stunden getrennt. Elektropheroprogramme wie auch Chromatogramme wurden unter UV-Licht bei 254 und 366 nm ausgewertet.

Photometrie. Photometrische Messungen erfolgten in einem Unicam SP 8000 Spektralphotometer.

Anerkennungen—Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie.

LITERATUR

1. Barz, W. (1975) *Planta Med. Suppl.* 117.
2. Berlin, J. und Barz, W. (1975) *Planta Med. Suppl.* 134.
3. Meyer, E. und Barz, W. (1975) *Planta Med. Suppl.* 140.
4. Ellis, B. E. (1973) *Planta* **111**, 113.
5. Barz, W. (1975) *Ber. Beut. Bot. Ges.* **88**, 71.
6. Leienbach, K. W., Heeger, V., Neumann, H. und Barz, W. (1975) *Planta Med. Suppl.* 148.
7. Berlin, J., Kiss, P., Müller-Enoch, D., Gierse, D., Barz, W. und Janistyn, B. (1974) *Z. Naturforsch.* **29c**, 374.
8. Durand, R. und Zenk, M. H. (1974) *FEBS Letters*, **39**, 218.
9. Yanagita, T. und Foster, J. W. (1956) *J. Biol. Chem.* **221**, 593.
10. Yang, C. S. und McCormick, D. B. (1971) *Methods in Enzymology*, Vol. XVIII, Part B, S. 571 ff. Academic Press, New York.
11. Tsai, L. und Stadtman, E. R. (1971) *Methods in Enzymol.* Vol. XVIII, Part B, S. 557 ff. Academic Press, New York.
12. Owen E. C. und West, D. W. (1971) *Methods in Enzymol.* Vol. XVIII, Part B, S. 574 ff. Academic Press, New York.
13. Barz, W. und Stadtman, E. R. (1969) *Arch. Mikrobiol.* **67**, 128.
14. Yang, C. S. und McCormick, D. B. (1967) *J. Nutrition* **93**, 445.
15. Kumar, S. A. und Vaidyanathan, C. S. (1964) *Biochim. biophys. Acta*, **89**, 127.
16. Hotta, K. und Ando, O. (1961) *J. Vitaminol.* **7**, 196.
17. Hösel, W., Shaw, P. D. und Barz, W. (1972) *Z. Naturforsch.* **27b**, 946.
18. Barz, W. und Hösel, W. (1975) In: *The Flavonoids* Ch. 17, (J. B. Harborne, T. J. Mabry, H. Mabry, eds.). Chapman & Hall, London.
19. Goodwin, T. W. (1970) In: *Metabolic Pathways*, Vol. IV, S. 353 ff. Academic Press, New York, London.
20. Schlee, D. (1969) *Biol. Rdsch.* **7**, 17.
21. Berlin, J. und Barz, W. (1971) *Planta* **98**, 300.
22. Barz, W., Adamek, Ch. und Berlin, J. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1735.
23. Koop, W. (1975) Staatsexamensarbeit, Universität Münster.
24. Fall, H. H. und Petering, H. G. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 377.