

DAS AUFTREten DES "NIH-SHIFTS" BEI DER IN VIVO UND IN VITRO BILDUNG HYDROXYLIERTER ZIMTSÄUREDERIVATE IN BUCHWEIZENHYPOKOTYLEN (*FAGOPYRUM ESCULENTUM*)

N. AMRHEIN und M. H. ZENK

Institut für Pflanzenphysiologie der Ruhr-Universität, 463 Bochum (Germany)*

(Received 9 July 1968)

Abstract—4-³H-cinnamic acid ($U\text{-}^{14}\text{C}$) was supplied to segments of buckwheat hypocotyls during temporary illumination. Retention of tritium was determined in the following compounds: rutin (46.5 per cent), chlorogenic acid (50 per cent), cyanidin (40 per cent) and leucocyanidin (32 per cent). When 4-³H-cinnamic acid ($U\text{-}^{14}\text{C}$) was converted to *p*-coumaric acid by a microsome preparation from buckwheat hypocotyls, 88 per cent retention of tritium was found in the reaction product.

EINLEITUNG

UNTERSUCHUNGEN von Guroff *et al.*¹ zum Mechanismus der enzymatischen Hydroxylierung von aromatischen Substraten führten zur Entdeckung des "NIH-Shifts", unter dem man die intramolekulare Wanderung des Substituenten, der durch die Hydroxylgruppe ersetzt wird, in die *ortho*-Stellung zu der neu eingeführten Hydroxylgruppe versteht. Diese Untersuchungen, die im National Institute of Health (NIH) durchgeführt wurden, beschränkten sich auf Enzymsysteme aus Bakterien und Säugetieren. Kürzlich konnte in diesem Laboratorium² gezeigt werden, daß die bei der Applizierung von *p*-³H-Zimtsäure an Blattgewebe von *Catalpa hybrida* gebildete *p*-Cumarsäure und *p*-OH-Benzoesäure eine Tritium-Retention von 85 bzw. 83 % aufweisen, wobei die Tritium-Markierung zu über 90 % in der *meta*-Position gefunden wurde.

Von weiterem Interesse erschien die Untersuchung des "NIH-Shifts" bei der Biogenese von 3,4-dihydroxylierten Zimtsäurederivaten in höheren Pflanzen, besonders im Hinblick auf das Problem, auf welcher Stufe der Flavonoidbiosynthese die Hydroxylierung am Ring B erfolgt.³⁻⁵

Als geeignetes Objekt wählten wir Buchweizenpflanzen (*Fagopyrum esculentum* Moench), in denen Cyanidin, Leucocyanidin, Rutin (Quercetin-3-Rutinosid) sowie Chlorogensäure als Vertreter dieser Gruppe vorkommen.⁶

In der vorausgehenden Arbeit⁷ haben Grisebach *et al.* den Einbau von *p*-³H-Zimtsäure-

* z.Zt. 8 München 19, Menzinger Strasse 67.

¹ G. GUROFF, J. W. DALY, D. JERINA, J. RENSON, B. WITKOP und S. UDENFRIEND, *Science* **157**, 1524 (1967).

² M. H. ZENK, *Z. Pflanzenphysiol.* **57**, 477 (1967).

³ L. PATSCHKE, W. BARZ und H. GRISEBACH, *Z. Naturforsch.* **21b**, 45 (1966).

⁴ D. HESS, *Planta* **60**, 568 (1964).

⁵ H. MEIER und M. H. ZENK, *Z. Pflanzenphysiol.* **53**, 415 (1965).

⁶ H. SCHERF und M. H. ZENK, *Z. Pflanzenphysiol.* **57**, 401 (1967).

⁷ H. GRISEBACH, A. SUTTER und B. WITKOP, *Phytochem.*, im Druck.

$3\text{-}^{14}\text{C}$ in die Flavonole Kaempferol und Quercetin sowie in die Isoflavone Formononetin und Biochanin A mit der gleichen Zielsetzung untersucht.

Da wir kürzlich das von Russell und Conn⁸ erstmals beschriebene Enzym Zimtsäure-4-Hydroxylase in den Hypokotylen von *Fagopyrum* nachweisen konnten,⁹ lag es nahe, gleichfalls das Auftreten des "NIH"-Shifts bei dieser Reaktion, die zu *p*-Cumarsäure führt, zu untersuchen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Auftreten des "NIH-Shifts" bei der Biogenese der von der Zimtsäure abgeleiteten Pigmente

Im methanolischen Extrakt der Hypokotylsegmente wurden 50% der angebotenen ^{14}C -Aktivität aufgefunden. Das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis der im methanolischen Extrakt vorliegenden Radioaktivität war von 29,8:1 auf 25:1 gesunken, entsprechend einer Tritium-Retention von 84%.

Überraschend war die starke Erhöhung des $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses in der Inkubationslösung, das zu Ende des Versuches 60:1 betrug, entsprechend einer Tritium-Retention von 200%. Nach Gefriertrocknung der Inkubationslösung wurde festgestellt, daß über 58% der Tritium-Aktivität in Form von HTO vorlagen. Die molaren Mengen der aufgenommenen Zimtsäure ($\sim 0,75 \mu\text{Mol}$, bestimmt aus der aufgenommenen ^{14}C -Aktivität) und des HTO im Inkubationsrückstand ($\sim 0,25 \mu\text{Mol}$) verhielten sich ungefähr wie 3:1.

Der in 80%igem Alkohol aufgenommene Rückstand der Gefriertrocknung wies eine Tritium-Retention von 89% auf, was zunächst auf einen Tritium-Verlust der Zimtsäure hinzuweisen schien. Nach zweimaliger papierchromatographischer Reinigung wies die nicht aufgenommene Zimtsäure jedoch ein konstantes $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis von 30,4:1 auf, entsprechend einer Tritium-Retention von 102%.

Isolierung der Pigmente

Die Reinigung der Pigmente erfolgte im wesentlichen durch Papierchromatographie. Elutionen wurden mit 80%igem Alkohol durchgeführt. Die Reinigungsschritte mit den entsprechenden Tritium-Retentionen sind in Tabelle 1 dargestellt.

Von den drei Cyanidinderivaten, die im Buchweizen vorkommen,⁶ konnte nur das Galactose, Rhamnose und Glucose enthaltende Derivat genauer untersucht werden, da die Menge der anderen Derivate zu gering war. Als einziges Leucoanthocyan-Aglycon wurde von Scherf und Zenk⁶ Cyanidin gefunden. Leucocyanidin wurde aus den über P_2O_5 getrockneten Segmenten durch 2-stündiges Kochen am Rückfluß in 10 ml einer 3,7%igen Salzsäurelösung in 92%igem Alkohol freigesetzt. Der Überstand wurde bis zur beginnenden Trockne eingedampft und dann der Papierchromatographie unterworfen.

Um festzustellen, ob unter den Bedingungen der chromatographischen Reinigung der Pigmente (Verwendung ausschließlich saurer Laufmittel) ein Wasserstoffaustausch in der *meta*-Position der Aromaten auftritt, wurde *m*- ^3H -*p*-Cumarsäure (U- ^{14}C), die durch Einwirkung des Enzyms Zimtsäure-4-Hydroxylase auf *p*- ^3H -Zimtsäure (U- ^{14}C) gewonnen wurde (s.u.), im Laufmittel Butanol:2 *n* HCl=4:6 chromatographiert. Es zeigte sich, daß unter diesen Bedingungen kein Austausch der *meta*-Wasserstoffatome erfolgt.

⁸ D. W. RUSSELL und E. E. CONN, *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 256 (1967).

⁹ N. AMRHEIN und M. H. ZENK, *Naturwissenschaften*, **55**, 394 (1968).

TABELLE 1. TRITIUM-RETENTION BEIM AUFTREten DES NIH-SHIFTs IN PHENOLEN AUS *Fagopyrum*

| Laufmittel | Cyanidin | | | | Leucocyanidin | | | | Rutin | | | | Chlorogensäure | | | |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|
| | Cya-gal-rham-glu | | Cya-3-glu | | 3H/ ¹⁴ C | | 3H-Ret. | | 3H/ ¹⁴ C | | 3H-Ret. | | 3H/ ¹⁴ C | | 3H-Ret. | |
| | ³ H/ ¹⁴ C* | ³ H-Ret.* ² | ³ H/ ¹⁴ C | ³ H-Ret. |
| I | 12,9:1 | 43,5 | 12,9:1 | 43,5 | — | — | — | — | 16,0:1 | 54,0 | 15:1 | 50,3 | — | — | — | — |
| II | 11,5:1 | 38,6 | 11,8:1 | 39,8 | — | — | — | — | 13,7:1 | 46,3 | 15,6:1 | 52,5 | — | — | — | — |
| III | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 14,3:1 | 48,0 | — | — | — |
| IV | 11,7:1 | 39,4 | — | — | — | — | 9,55:1 | 32,0 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| V | 12,4:1 | 41,5 | — | — | — | — | — | — | — | 13,9:1 | 46,5 | — | — | — | — | — |
| Umkristallisation aus H ₂ O | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

I = *n*-Butanol: Eisessig: H₂O (4:1:5).II = *n*-Butanol: 2n HCl (4:6).III = Butan-2-ol: Eisessig: H₂O (14:5:1).

IV = Isopropanol: 2n HCl (1:1).

V = HCO₂H: HCl: H₂O (5:2:3).*¹ Ausgangsverhältnis ³H/¹⁴C = 29,8:1.*² Tritium-Retention in %.

2. Der "NIH-Shift" bei der in vitro Hydroxylierung der Zimtsäure zu p-Cumarsäure

Die enzymatische Umsetzung der Zimtsäure zu p-Cumarsäure erfolgte zu 40 %. Nach der papierchromatographischen Reinigung im Laufmittel Isopropanol:NH₃:H₂O = 8:1:1 wurde für die p-Cumarsäure eine Tritium-Retention von 87,5 %, für die nicht umgesetzte Zimtsäure 96,5 % gemessen.

Ein Teil der p-Cumarsäure wurde mit 30 mg authentischer *trans*-p-Cumarsäure aus Wasser, Äthylacetat/Petroläther und wieder Wasser bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert (Tabelle 2).

TABELLE 2

| <i>p</i> -Cumarsäure rekristallisiert aus | ¹⁴ C (dpm/mg) | ³ H (dpm/mg) | ³ H/ ¹⁴ C | ³ H-Ret. (%) |
|---|--------------------------|-------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| — | 9 300 | 241 000 | 26,0:1 | 87,5 |
| H ₂ O | 5 990 | 157 800 | 26,3:1 | 88,5 |
| Äthylacetat/Petroläther | 6 300 | 164 300 | 26,1:1 | 88,0 |
| H ₂ O | 6 350 | 165 000 | 26,0:1 | 87,5 |

(Ausgangsverhältnis ³H/¹⁴C = 29,8:1.)

Der starke Abfall der spezifischen Aktivität bei der ersten Umkristallisation aus H₂O (35,6 %) ist darauf zurückzuführen, daß die erhaltene p-Cumarsäure zu 66 % aus der *trans*- und zu 34 % aus der *cis*-Form besteht, wie durch Chromatographie in 4 %iger Ameisensäure, die eine Auf trennung dieser beiden Isomeren erlaubt, festgestellt wurde. Beim Umkristallisieren aus H₂O bleibt die leichter lösliche *cis*-p-Cumarsäure in Lösung und führt so zu einem entsprechenden Abfall der spezifischen Radioaktivität der *trans*-p-Cumarsäure.

Ein entsprechendes Auftreten der *cis*-p-Cumarsäure ist aus den mit Erbsenmikrosomen gewonnenen Daten von Russell und Conn⁸ nicht zu entnehmen.

Während für die *trans*-p-Cumarsäure eine Tritium-Retention von 87,5 % gefunden wurde, liegt der entsprechende Wert für die *cis*-p-Cumarsäure bei 90 %.

Es bleibt zu klären, ob die Umwandlung der *trans*-p-Cumarsäure in die *cis*-Form auf enzymatischem oder photochemischem Wege erfolgte.^{10, 11}

Versuche zur Bestimmung der Position der Tritium-Markierung am Ring der p-Cumarsäure nach einer von Bennett und Kirby¹² und von Kirby und Ogunkoya¹³ angegebenen Methode, die es gestattet, selektiv die zu einer phenolischen Hydroxylgruppe in *o*-Stellung stehenden Wasserstoffatome auszutauschen, zeigen, daß die Tritium-Aktivität (zu mindestens 80 %) in der *meta*-Stellung der p-Cumarsäure lokalisiert ist.

¹⁰ K. G. EDWARDS und J. R. STOKER, *Phytochem.* **6**, 655 (1967).

¹¹ G. KAINT, *Phytochem.* **6**, 755 (1967).

¹² D. J. BENNETT und G. W. KIRBY, *J. Chem. Soc.* 442 (1968).

¹³ G. W. KIRBY und I. OGUNKOYA, *J. Chem. Soc.* 6914 (1965).

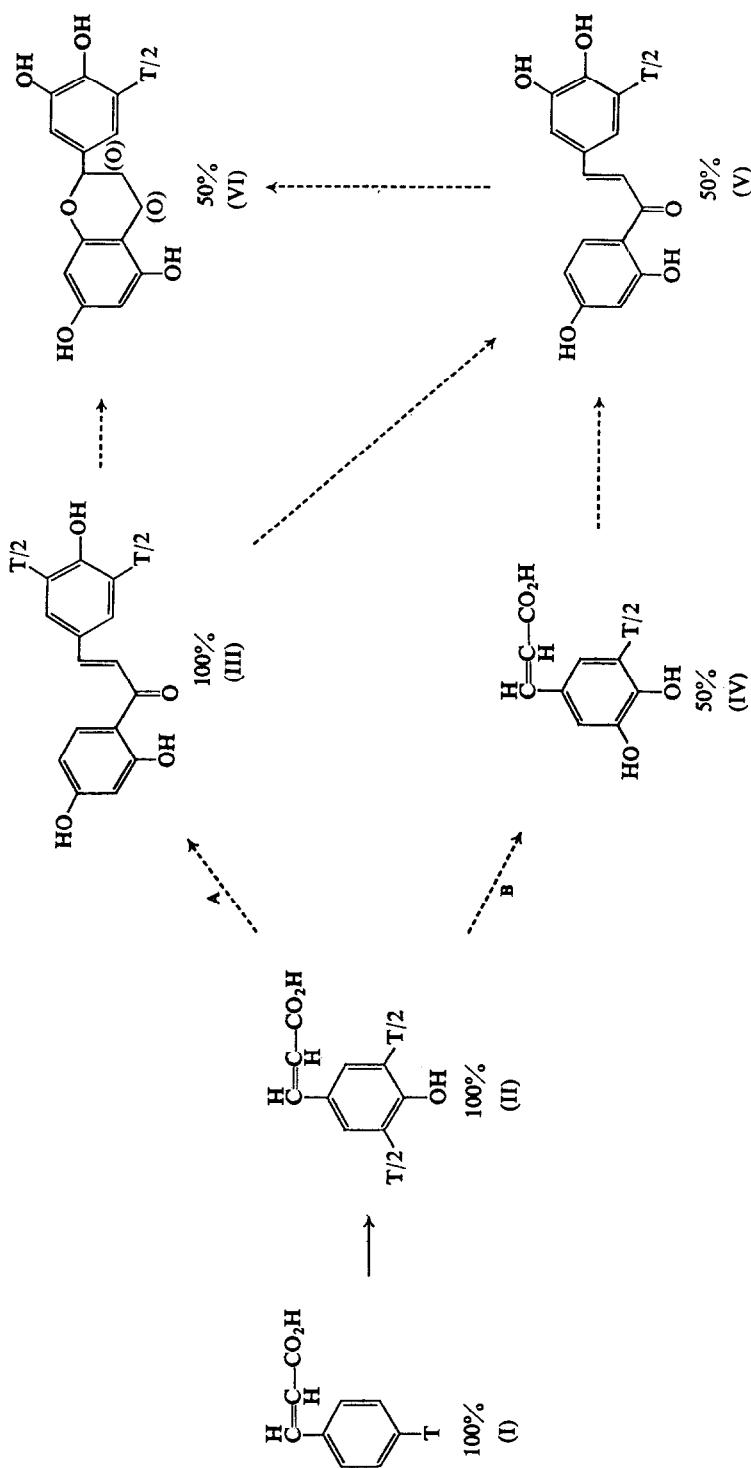


ABB.1. SCHEMA DER MÖGLICHEN HYDROXYLIERUNGSSCHRITTE BEI DER BIOSYNTHESE DER FLAVONOIDE AUSGEHENDE VON ZIMTSÄURE.
Die Prozentzahlen geben die theoretisch zu erwartenden Tritium-Retentionen bei gleichem Hydroxylierungsmechanismus an.

Unsere jetzigen Untersuchungen an *Fagopyrum* und die früheren Befunde an *Catalpa*² sowie die Ergebnisse von Grisebach *et al.*⁷ lassen keinen Zweifel daran bestehen, daß Hydroxylierungen von Aromaten in pflanzlichen sowie in tierischen und bakteriellen Systemen^{1, 14–16} nach demselben Mechanismus verlaufen. So stimmen die Befunde bei der *in vivo* und *in vitro* untersuchten Hydroxylierung der Zimtsäure zu *p*-Cumarsäure mit den Ergebnissen überein, die Guroff *et al.*¹ bei der Umsetzung von Phenylalanin zu Tyrosin mit einer aus Bakterien oder Leber gewonnenen Phenylalanin-Hydroxylase gewannen. Die *in vitro* Hydroxylierung der Zimtsäure zu *p*-Cumarsäure durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase wurde inzwischen ebenfalls mit dem Enzym aus Erbsenmikrosomen untersucht.¹⁷ Für die *p*-Cumarsäure wurden von diesen Autoren Tritium-Retentionen von 78–85 % bestimmt, was im Einklang mit unseren Ergebnissen steht.

Die für Chlorogensäure und Rutin gefundenen Tritium-Retentionswerte entsprechen den Werten, die z.B. für die Reaktion $3,5\text{-}^3\text{H-Tyrosin} \rightarrow \text{Dopa}$ (55 %) oder für die Reaktion $N\text{-acetyl-3,5-}^3\text{H-Tyramin} \rightarrow N\text{-acetyl-Dopamin}$ (44 %) bestimmt wurden.¹⁶

Die für Cyanidin und Leucocyanidin bestimmten Tritium-Retentionswerte (40 bzw. 32 %) liegen unter dem theoretisch zu erwartenden Wert. Der geringe Wert für Leucocyanidin ist wahrscheinlich auf Tritium-Verlust während der Säurebehandlung der Segmente zurückzuführen.

Es kann auf Grund unserer Ergebnisse keine Entscheidung getroffen werden, ob die Einführung der Hydroxyle bei der Flavonoidbiosynthese schon auf der Stufe der Zimtsäure (I → II → IV) oder auf der Stufe eines C₆-C₃-C₆-Körpers (III → V, bzw. III → VI), möglicherweise einem Chalkon (III), erfolgt (Abb. 1). Zumindest die Einführung der 4-Hydroxylgruppe dürfte jedoch auf der Stufe Zimtsäure erfolgen (I → II).¹⁸ Der Befund, daß sowohl bei der Bildung der Caffeesäure (II) (Chlorogensäure) wie bei der Synthese der dihydroxylierten Flavonoide (VI) (Rutin, Cyanidin) eine Tritium-Retention von 50 % gemessen wurde, weist auf den gleichen Hydroxylierungsmechanismus bei der Bildung dieser verschiedenenartigen Verbindungen hin und erlaubt daher keinen zwingenden Schluß darüber, ob bei der Synthese dieser Verbindungen Weg A oder Weg B eingeschlagen wird. Die Tatsache, daß in *Fagopyrum* alle bisher untersuchten Phenole 3,4-Dihydroxy-Struktur im B-Ring besitzen,⁶ würde eher dafür sprechen, daß auch die Einführung der zweiten Hydroxylgruppe auf der Stufe der Zimtsäure erfolgt (Weg B des Schemas).

EXPERIMENTELLES

Pflanzenmaterial

Herkunft und Anzucht der Buchweizenfrüchte wurden bereits früher beschrieben.⁶

Darstellung von *p*-³H-Zimtsäure und Zimtsäure (*U*-¹⁴C)

p-³H-Zimtsäure und Zimtsäure (*U*-¹⁴C) wurden durch Einwirken des Enzyms Phenylalanin-Ammonium-Lyase (E.C. 4.3.1.5) aus einem konzentrierten Acetonpulverextrakt von 10 Stunden belichteten Buchweizenhypokotylen (spez. Akt. 7,25 mE/mg Protein) auf *p*-³H-L-Phenylalanin bzw. L-Phenylalanin (*U*-¹⁴C) (Radiochemical Centre, Amersham) erhalten. Die Reinigung der Säure erfolgte auf papierchromatographischem Wege.

¹⁴ G. GUROFF, M. LEVITT, J. DALY und S. UDENFRIEND, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 253 (1966).

¹⁵ J. RENSON, J. DALY, H. WEISSBACH, B. WITKOP und S. UDENFRIEND, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 504 (1966).

¹⁶ J. DALY, G. GUROFF, S. UDENFRIEND und B. WITKOP, *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 218 (1967).

¹⁷ D. W. RUSSELL, A. SUTTER, E. E. CONN und H. GRISEBACH, in Vorbereitung.

¹⁸ H. GRISEBACH, in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments* (edited by T. W. GOODWIN), Academic Press, London (1965).

Inkubation von Hypokotylsegmenten mit p-³H-Zimtsäure (U-¹⁴C)

20 Hypokotyle 6 Tage alter etiolerter Buchweizenkeimlinge (Frischgewicht 2,3 g) wurden in Segmente von 1,5 cm Länge zerschnitten und in einer Petrischale in 5 ml Inkubationslösung inkubiert. Die Lösung enthielt 50 μ Mol Kaliumphosphatpuffer pH 5,0, 3,3 μ c Zimtsäure (U-¹⁴C) (25 μ c/ μ Mol), 98,5 μ c p-³H-Zimtsäure (200 μ c/ μ Mol), 1 μ Mol nicht markierter trans-Zimtsäure und H₂O. Die Konzentration der Zimtsäure betrug somit 3×10^{-4} M. Der Quotient der Tritium- und ¹⁴C-Aktivitäten betrug ³H/¹⁴C = 29,8:1.

Nach einer einstündigen Vorinkubation in Dunkeln wurde die Petrischale mit Weißlicht einer Intensität von 20 000 Lux (Osram-Glühlampe 2000 Watt) in einer Klimakammer bei $25 \pm 2^\circ$ 12 Stunden belichtet. Nach weiteren 12 Stunden im Dunkeln wurde die Inkubation abgebrochen. Die Petrischale befand sich während der gesamten Inkubationszeit auf einer Schüttelmaschine.

Extraktion der Pigmente

Die mit Wasser gewaschenen und abgetrockneten Segmente wurden zweimal mit 12,5 ml Methanol in der Siedehitze 10 min extrahiert. Anschließend wurde 10 min mit 10 ml kochendem H₂O extrahiert. Sodann wurden die extrahierten Segmente über P₂O₅ getrocknet. Die methanolischen Extrakte wurden vereinigt und schonend zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in einem geringen Volumen Methanol wieder aufgenommen und der Papierchromatographie im Laufmittel n-Butanol: Eisessig:H₂O = 4:1:5 unterworfen.

Die weitere Reinigung der Pigmente ist unter den Ergebnissen angegeben. Die papierchromatographischen Reinigungen wurden auf Schleicher und Schüll 2043b-Papier durchgeführt.

Umsetzung von p-³H-Zimtsäure (U-¹⁴C) durch die Zimtsäure-4-Hydroxylase

Hypokotyle (70 g Frischgewicht) 12 Stunden in den Anzuchtschalen belichteter Buchweizenkeimlinge wurden mit 100 ml 0,15 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 unter Zusatz von 7 g Polyclar AT und 14 g gereinigtem Seesand in einer eisgekühlten Reibschale aufgeschlossen. Zur Isolierung der Mikrosomenfraktion wurde 10 min bei 12 000 g und anschließend 70 min bei 100 000 g zentrifugiert. Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde in einem geringen Volumen des Aufschlußpuffers suspendiert und diente als Enzymquelle.

Der Ansatz enthielt in Anlehnung an Russell und Conn⁸ 330 μ Mol Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 76,5 mg Mikrosomen, 2 μ Mol THF₄, 5 μ Mol NADP⁺, 10 μ Mol G-6-P, 1,4 E G-6-P-Dehydrogenase, 1 μ c Zimtsäure (U-¹⁴C) (25 μ c/ μ Mol), 29,8 μ c p-³H-Zimtsäure (200 μ c/ μ Mol) und 2,35 μ Mol trans-Zimtsäure (d.h. insgesamt 2,5 μ Mol Zimtsäure) in einem Volumen von 3,5 ml. Die Inkubation des Ansatzes und die Isolierung der p-Cumarsäure erfolgten wie von Russell und Conn⁸ angegeben.

Messung der Radioaktivität

Die Messungen der ¹⁴C- und ³H-Aktivität wurden in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer "Unilux" der Firma Nuclear Chicago durchgeführt. Chromatogramme wurden mit dem Dünnschichtscanner FB 2720 der Firma Berthold ausgewertet.

Danksagung

Wir sind Herrn Prof. Dr. H. Grisebach für die Überlassung des unveröffentlichten Manuskriptes Nr. 7 zu Dank verpflichtet. Diese Untersuchung wurde durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie des Bundesministers für wissenschaftliche Forschung gefördert.