

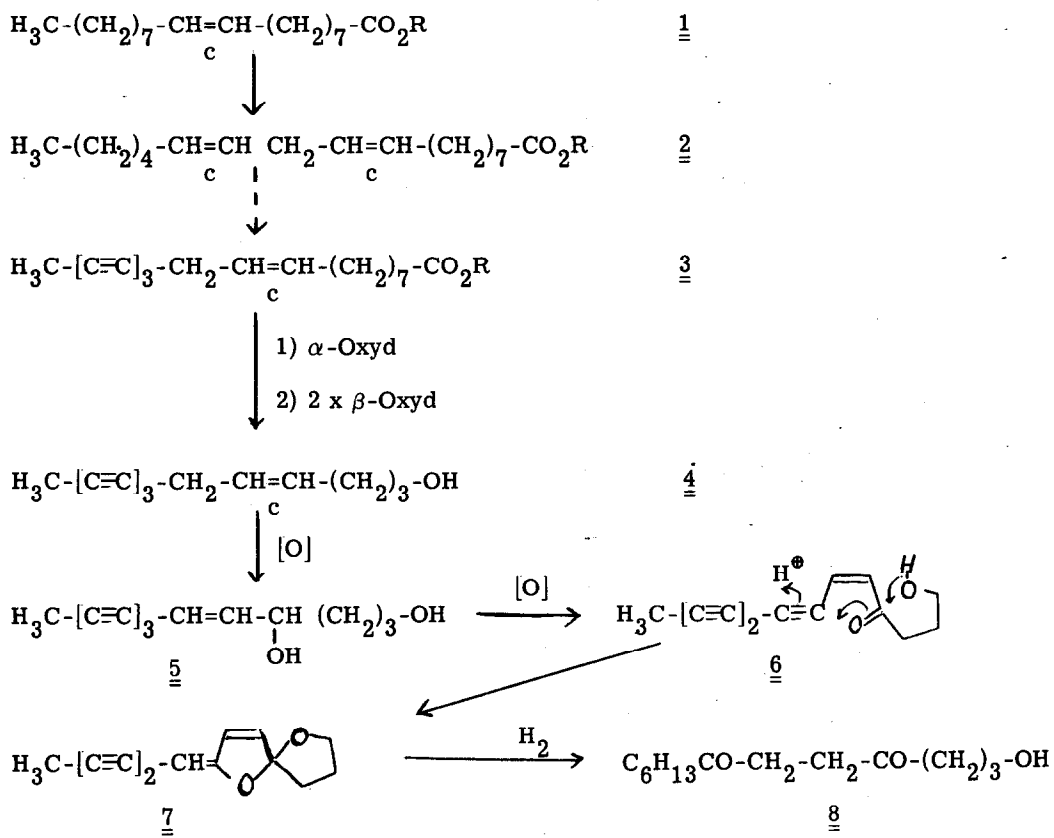
ÜBER DIE BILDUNG VON POLYINEN MIT ZELLFREIEN HOMOGENATEN

F. Bohlmann und H. Schulz

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Universität Berlin

(Received in Germany 6 August 1968; received in UK for publication 15 August 1968)

In mehreren Arbeiten haben wir bereits zahlreiche Reaktionsschritte bei der Biogenese pflanzlicher Acetylenverbindungen durch Verfütterung markierter, wahrscheinlicher Zwischenstufen klären können (1). Für die Biogenese des Enolätherpolyins 7 ist z. B. folgendes Schema gesichert (2):



Die offene Frage, wie 2 in 3 übergeführt wird, lässt sich zweifellos nur nach Isolierung der dafür notwendigen Enzym-Systeme klären. Erste orientierende Versuche sollten daher die Frage beantworten, ob die Biogenese von 7 auch mit zellfreien Homogenaten möglich ist.

Besonders geeignet für diese Untersuchung ist *Chrysanthemum flosculosum* L., das in den oberirdischen Teilen in relativ hoher Konzentration nur 7 (cis und trans) enthält. Um den Biogeneseort einzuengen, haben wir zunächst getrennt Blatt- und Stengelabschnitte in isotonischer Zuckerlösung mit  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Acetat inkubiert. Dabei zeigt sich, dass nur die Blätter aktives 7 ergeben, dessen Aktivitätskonstanz in allen Fällen durch Hydrierung zu 8 überprüft wurde. Wir haben daher frische Blätter homogenisiert und mit  $9.10\text{-}^3\text{H-1}$  inkubiert. Auf diese Weise erhält man aktives 7, allerdings nur mit einer Einbaurrate von etwa  $10\text{-}^4\%$ . Bereits nach 2 - 3 Stdn. ist die Hauptmenge der Aktivität inkorporiert. Zentrifugiert man das Homogenat bei 1800 g, so beobachtet man bereits in der Chloroplasten- bzw. Plastiden-Fraktion einen etwa doppelt so hohen Einbau in 7 wie in dem Überstehenden. Zentrifugiert man bei 12700 g, ist praktisch nur noch das Zentrifugat in der Lage 1 in 7 zu überführen, während das Überstehende kaum noch die Umwandlung ausführt (Aktivitätsverhältnis im isolierten 7 für Zentrifugat Überstehendem 95 : 5). Da jedoch die Einbaurrate nach wie vor relativ gering ist, haben wir versucht, den Einfluss verschiedener Kofaktoren zu untersuchen, die für die Dehydrierung von Ölsäure zu Linolsäure notwendig sind (3). Es zeigt sich jedoch, dass weder NADPH noch ATP, Coenzym A oder Sauerstoff eine nennenswerte Erhöhung der Einbaurrate bewirken. Auch Coenzym-A-oleat bringt keine Steigerung. Die in zellfreien Präparationen sehr geringe Umwandlung von 1 in 7 kann durch die Inhibierung nur einer Enzymreaktion aus der sicherlich grossen Zahl von Enzymschritten verursacht werden. Eine solche Inhibierung, nämlich die Umwandlung von 1 in 2, ist bei Untersuchungen zur Biogenese polyungesättigter Fettsäuren in höheren Pflanzen bei Verwendung von zellfreien Homogenaten beobachtet worden (3, 4).

Um zu prüfen, ob alle Enzyme, die für die Bildung von 1 notwendig sind, in den Chloroplasten bzw. Plastiden lokalisiert sind, haben wir auch die Inkubation mit dem 7 sehr viel näher stehenden Alkohol 4 durchgeführt. Dabei haben wir wiederum getrennt das Gesamthomogenat, die Chloroplasten bzw. Plastiden-Fraktion und das beim Zentrifugieren erhaltene Überstehende untersucht. Es zeigt sich, dass in allen Fällen 4 in 7 übergeführt wird, und zwar ca. 10 bis 20 mal besser als Ölsäure. Die Einbauraten in den drei Versuchen sind nur geringfügig verschieden, so dass man annehmen darf, dass die letzten Biogeneseschritte nicht mehr an Enzyme gebunden sind, die nur in den Chloroplasten lokalisiert sind, während die dehydrierenden Enzyme, die offenbar für die Einführung der Dreifachbindungen notwendig sind, an die Chloroplasten gebunden sind. Weitere Versuche müssen zeigen, ob es möglich ist, die eigentlichen wirksamen Enzym-Systeme zu isolieren.

#### Allgemeine Vorschrift für die Inkubation

27 g frische Blätter von *Chrysanthemum flosculosum* L. wurden bei 2<sup>0</sup> in 20 ccm Pufferlösung (0.5 m Saccharose, 0.01 m Phosphat, 0.001 m EDTA, 1.5  $\mu$ mol reduziertes Gluthathion und PH 7.25) mit Seesand zerrieben. Man zentrifugierte bei 200 g und inkubierte das erhaltene Homogenat entweder direkt oder nach erneuter Zentrifugation bei 1800 oder 12700 g. Die dabei erhaltene Chloroplasten- bzw. Plastiden-Fraktion wurde nach erneutem Suspendieren nochmals zentrifugiert. Die so erhaltene Fraktion wurde unter Zusatz von 0.5  $\mu$ mol Coenzym A, 0.8  $\mu$ mol NADPH und 20  $\mu$ mol ATP mit dem in Pufferlösung befindlichen Substrat (Gesamtvolumen 40 ccm) inkubiert. Nach 16 Stdn. extrahierte man mit Äther und isolierte aus dem Extrakt 7 durch Dünnschichtchromatographie. Nach Verdünnen mit inaktivem 7 kristallisierte man bis zur konstanten Aktivität (Aktivitätsmessung im Beckman-Szintillationszähler).

---

Literatur

1. F. Bohlmann, Fortschr. d. Chemie org. Naturstoffe, Bd. XXV, 1 (1967)
2. F. Bohlmann und G. Florentz, Chem. Ber. 99, 990 (1966);  
F. Bohlmann, R. Jente, W. Lucas, J. Laser und H. Schulz, Chem. Ber. 100, 3183 (1967)  
F. Bohlmann und H. Schulz, Tetrahedron Letters 1968, 1801.
3. R.V. Harris und A.T. James, Biochim. Biophys. Acta [Amsterdam] 106, 456 (1965).
- 4a. J.L. Brooks und P.K. Stumpf, Arch. Biochem. Biophys. 116, 108 (1966).  
b. J. Nagai und K. Bloch, J. Biol. Chem. 242, 357 (1967).