In isolierten Chloroplasten wird die cyclische Photophosphorylierung mit Menadion durch Ascorbat stimuliert. Dies ist nicht der Fall in *Anacystis*-Partikeln. Doch hebt Ascorbat die DCMU-Hemmung der Menadion-katalysierten Photophosphorylierung wieder auf.

Wir sind der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Unterstützung dankbar.

¹⁶ F. R. WHATLEY, in: *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants*, National Academy of Sciences – National Research Council, Washington 1963.

Der Einfluß der Temperatur auf die Strahlenempfindlichkeit von T₁-Bakteriophagen

KLAUS-OTTO HERMANN

Institut für Strahlenbiologie, Kernforschungszentrum Karlsruhe

(Z. Naturforschg. **21 b**, 678–682 [1966]; eingegangen am 8. März 1966)

The radiosensitivity of dry bacteriophage was determined in vacuo at temperatures varying continuously between 100 ° and 300 °K using 2 MeV protons. Moreover, the influence of added cystamine and of base substitution by 5-bromouracil was investigated in the same range of temperatures. The variation of total cross section $\sigma(T)$ with temperature is given by the expression:

$$\sigma(T) = \sigma_0 \cdot (1 + 5,3 \cdot e^{-E_a/RT}) \pm 15 \text{ per cent.}$$

The constant σ_0 is $3,3 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for normal T1 phage, $4,9 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for base substituted T1 phage, $1,3 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for T1 phage in presence of cystamine, and $1,6 \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2$ for base substituted T1 phage in presence of cystamine; E_a amounts to 1 kcal/mole in all four cases. The correlation between inactivation cross section σ and temperature T shows that two mechanisms of inactivation are present, one (σ_0) being independent of temperature, the other having an activation energy of about 1 kcal/mole. The first mechanism is ascribed to direct radiation action, while the temperature dependent component probably originates from small diffusible radicals.

Die Erkenntnis der zentralen Bedeutung der Nucleinsäuren für die gesamte Biologie führte zu einer in den letzten Jahren zunehmenden Zahl von Arbeiten über die Wirkung ionisierender Strahlung auf Nucleinsäuren, besonders auf DNS. Speziell bei Messungen an Bakteriophagen stellte man wiederholt fest, daß die Strahlenempfindlichkeit der DNS in starkem Maße von der während der Bestrahlung herrschenden Temperatur und der Konzentration der anwesenden Schutzstoffe abhängig ist. Durch genauere Untersuchungen des Temperatureinflusses sollte es möglich sein, die physikalischen und chemischen Mechanismen der biologischen Strahlenwirkung aufzuklären und dadurch auch neue Hinweise auf die Art der DNS-Schädigung zu gewinnen.

1. Experimenteller Teil

1.1. Versuchsobjekt: Die Verwendung von T1-Bakteriophagen als Untersuchungsobjekt hat folgende Gründe: T1-Phagen bestehen etwa zur Hälfte aus DNS, die Strahlenwirkung kann an ihnen ohne Störung durch physiologische Vorgänge untersucht werden, die Ergebnisse sind statistisch leicht zu sichern, die erhaltenen Dosis-Effekt-Beziehungen sind bei ionisieren-

der Strahlung meist Eintrefferkurven und außerdem wird die Aktivität der Viren durch extreme Umweltsbedingungen kaum beeinträchtigt.

1.2. Probenherstellung: Es wurden jeweils 0,01 ml Phagensuspension in Nährbouillon auf Feingoldronden (Φ 12 mm) aufgebracht und eingetrocknet. Durch das Trocknen verlieren zwischen 50–90% der Viren ihre Aktivität. Wird die Bouillonkonzentration von 0,8 auf 4% erhöht, so steigt der Prozentsatz der Überlebenden stark an. Bei Messungen mit Cystaminzusatz wurden deshalb die Phagen in 4% Difco Nährbouillon suspendiert, da eine niedrige Restaktivität die Genauigkeit der Ergebnisse beeinträchtigt.

1.3. Herkunft und Herstellung der Phagen: Der untersuchte T1-Coliphage und seine Wirtszellen rührten von Stämmen her, die uns 1958 vom Institut für Genetik der Universität Köln zur Verfügung gestellt und in unserem Institut in Passagen weitergeführt worden waren. Kulturen der Bakterienstämme wurden, ebenso wie die Lysate, nach der üblichen Methode in Difco-Nährbouillon angesetzt. Bei den Versuchen mit Schutzstoff wurde die Verdünnung der Stammsuspension in Nährbouillon durchgeführt, die außerdem 0,1 Mol/l Cystamin enthielt. Nach einer von STAHL¹ angegebenen Methode wurde bei einem Teil der Phagen 5-Bromuracil anstelle von Thymin in die Phagen-DNS eingebaut. Der Einbau des Bromuracils hat eine wesentliche Steigerung der Strahlenempfindlichkeit zur Folge, die vom Prozentsatz des ersetzten Thymins ab-

hängt. UV-Bestrahlungen an den von uns verwendeten T1-BUDR-Phagen zeigten, daß etwa 65% des normalerweise vorhandenen Thymins durch Bromuracil ersetzt worden war.

1.4. Bestrahlungseinrichtung: Die Bestrahlungen wurden mit 2-MeV-Protonen eines Van de Graaff-Beschleunigers durchgeführt. Der Protonenstrahl wurde durch einen Analysiermagneten gereinigt und durch zwei Nickelfolien derartig aufgefächert, daß eine homogene Probenausleuchtung erzielt wurde. Den Aufbau der verwendeten Bestrahlungskammer zeigt Abb. 1. Der

Abb. 1. Bestrahlungskammer. B = Eintrittsblenden, D = Probenhalter, E = Kühlmitteleinlaß, F = Absaugstutzen, K = Kühlfalle, P = Proben, R = Abdeckplatte, S = Strahlachse, T = Thermoelement.

von außen drehbare Probenhalter (D) bestand aus einer schwarzen Aluminiumscheibe mit 19 Probenpositionen. In der Kammer befand sich eine Kühlfalle (K), die es erlaubte, Bestrahlungen bei Temperaturen bis zu 100 °K durchzuführen. Die Kühlfalle war so konstruiert, daß der Probenhalter — bis auf die Öffnung für den Protonenstrahl — ringsum von gekühlten, schwarzen Flächen umgeben war. Bei Verwendung von flüssigem Stickstoff als Kühlmittel erreichte man innerhalb von drei Std. eine Abkühlung bis auf 100 °K, da sich infolge der Wärmestrahlung die Probentemperatur der Kühlmitteltemperatur anglich. Weil die Bestrahlungszeiten kurz gegen die Abkühlzeiten der Proben waren, konnte bei jeder beliebigen Zwischentemperatur bestrahlt werden.

1.5. Temperaturmessung: Da biologische Objekte sehr schlechte Wärmeleiter sind, stellt sich im Vakuum das Temperaturgleichgewicht überwiegend durch Wärmestrahlung ein. Die Temperatur des Probenhalters wurde mit einem Thermoelement gemessen, das vor jeder Bestrahlung geeicht wurde. Die Erwärmung der Proben durch die Bestrahlung berechnet sich bei einer Dosis von 1 Mrad zu 2,4 °K (bei Zimmertemperatur) und liegt daher innerhalb der Meßfehlergrenzen. Aufheizung der Proben durch den Protonenstrahl müßte zu einem experimentell nicht gefundenen Steilerwerden der Dosiseffektkurven bei höheren Dosen und Dosisleistungen führen, vorausgesetzt, daß sich das Temperaturgleichgewicht nicht in so kurzer Zeit einstellt, daß diese Erwärmung noch zu den primären Energieabsorptions-Prozessen gezählt werden muß.

1.6. Bestrahlungen: Die Proben wurden zunächst einen Tag lang im Exsikkator und anschließend weitere 15 Std. lang in der Bestrahlungskammer bei 10⁻⁵ Torr getrocknet, ehe sie auf die gewünschte Bestrahlungstemperatur gebracht wurden. Zur Dosimetrie der 2-MeV-Protonen wurde die Kammer als Faraday-Käfig ausgebildet, und die in die Kammer gelangende Ladungsmenge mittels eines Integrators gemessen. War die vorgewählte Ladung erreicht, betätigte der Integrator einen Verschuß, der den Protonenstrahl unterbrach. Nach der Bestrahlung wurden die Proben durch Entfernung des Kühlmittels wieder auf Zimmertemperatur gebracht.

1.7. Titration der Phagen: Nach der Bestrahlung wurden die Phagen in einem Reagenzglas mit 5 ml 1-proz. Trypton-Nährbouillon quantitativ von ihrer Unterlage abgelöst und ihre Konzentration nach konventionellen Methoden² bestimmt.

2. Ergebnisse

Inaktivierungsversuche an Bakteriophagen mit ionisierender Strahlung liefern unter den meisten Versuchsbedingungen Eintrefferkurven, die sich durch die Beziehung

$$N/N_0 = \exp(-D/D_{37}) = \exp(-\sigma \cdot D) \quad (1)$$

beschreiben lassen. Dabei bedeutet N die Zahl der aktiven Phagen bei der Strahlendosis D , N_0 die Zahl der ursprünglich (bei $D=0$) vorhandenen Phagen, D_{37} die Dosis, bei der die Zahl der aktiven Phagen auf den e -ten Teil der ursprünglich vorhandenen abgenommen hat, und $\sigma = 1/D_{37}$ ist der hierdurch definierte Inaktivierungs-Querschnitt. Diese Form der Dosis-Effekt-Beziehung bei T1-Bakterio-

¹ F. W. STAHL, J. M. CRASEMANN, L. OKUN, E. FOX, and C. LAIRD, *Virology* 13, 98 [1961].

² M. H. ADAMS, *Bacteriophages*, Interscience Publish Inc., New York 1959.

phagen ist wiederholt³⁻¹² und mit verschiedenen ionisierenden Strahlenarten gemessen worden. Auch unsere Messungen an normalen T1-Phagen und T1-BUDR-Phagen ergaben sowohl mit als auch ohne Cystaminzusatz gut reproduzierbare Eintrefferkurven, von denen zwei als typische Beispiele in Abb. 2 aufgetragen sind. In der Tabelle sind die unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Inaktivierungs-Querschnitte zusammengestellt. Um die Abhängigkeit der Inaktivierungs-Querschnitte von der Bestrahlungstemperatur genauer zu untersuchen, wurden die Proben mit jeweils der gleichen Dosis bestrahlt, wobei die Temperatur von Probe zu Probe in kontrollierter Weise verändert wurde. Aus dem Inaktivierungsgrad N/N_0 läßt sich nach Gl. (1) der Inaktivierungs-Querschnitt σ ermitteln. Zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit von Inaktivierungs-Querschnitten wird in letzter Zeit öfter der Ansatz $\sigma = \text{const} \cdot \exp(-E_a/RT)$ verwandt^{13, 14}, wobei R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur bedeuten; E_a ist die Summe der Aktivierungsenergien der zur Inaktivierung der Phagen führenden chemischen Reaktionen. Der Wert von E_a läßt sich bei logarithmischer Auftragung von σ über der reziproken Temperatur aus der Steigung auftretender Geraden unmittelbar bestimmen. Die Kurven I und II in Abb. 3 geben eine solche Darstellung der

Abb. 2. Inaktivierung von T1-Bakteriophagen durch 2-MeV-Protonen bei 101° und 293° K.

an T1-Bakteriophagen gemessenen Inaktivierungs-Querschnitte wieder. Da die Kurven nicht linear sind, bedeutet dies, daß wahrscheinlich mehrere Prozesse mit unterschiedlicher Aktivierungsenergie wirksam sind. Nach Abzug eines Temperatur-unabhängigen Anteils mit einer Aktivierungsenergie $E_a = 0$ (unterbrochene Geraden in Abb. 3) ergeben sich eindeutig Arrhenius-Geraden (Kurven I_a und II_a in Abb. 3), deren Steigung einer Aktivierungsenergie von 1 kcal/Mol entspricht. Bei den Ver-

Material	Temperatur [°K]	Wirkungs- querschnitt [10 ⁻¹² cm ²]	Inaktivierungsdosis D_{37} [p·cm ⁻² · 10 ¹¹] [krad]		Fehler- grenzen [%]
T1	293	5,41	1,85	494	± 11
T1	101	3,16	3,17	845	± 20
T1 + Cy	293	2,44	4,09	1079	± 14
T1 + Cy	117	1,76	5,67	1513	± 9
T1 - BUDR	293	8,40	1,19	316	± 12
T1 - BUDR	104	4,74	2,11	559	± 5
T1 - BUDR + Cy	293	4,10	2,44	650	± 12
T1 - BUDR + Cy	129	2,00	5,00	1335	± 6

Tab. 1. Wirkungsquerschnitt σ und D_{37} für die Inaktivierung von T1-Bakteriophagen mit 2-MeV-Protonen. Die angegebenen Werte wurden aus der Steigung der Ausgleichsgeraden durch die Meßpunkte bestimmt. Dabei wurden die Werte der ersten Dekade ($N/N_0 > 0,1$) wegen ihrer offensichtlichen Ungenauigkeit verworfen. Die angegebenen Fehlergrenzen sind die mit dem sog. t -Faktor für 5% multiplizierten Standardabweichungen dieser Regressionsanalysen.

³ W. R. ADAMS and E. POLLARD, Arch. Biochem. Biophysics **36**, 311 [1952].

⁴ C. S. BACHOFER, C. F. EHRET, S. MAYER, and E. L. POWERS, Bacteriology **36**, 744 [1953].

⁵ T. BRUSTAD, Rad. Res. **15**, 139 [1961].

⁶ M. DAVIS, Arch. Biochem. Biophysics **49**, 417 [1954].

⁷ D. J. FLUKE, T. BRUSTAD, and A. BIRGE, Rad. Res. **13**, 788 [1960].

⁸ D. J. FLUKE and F. FORRO, Rad. Res. **13**, 305 [1960].

⁹ G. HOTZ and K. G. ZIMMER, Int. J. Rad. Biology **7**, 75 [1963].

¹⁰ PH. SCHAMBRA and F. HUTCHINSON, Rad. Res. **23**, 514 [1964].

¹¹ G. HOTZ, Habilitationsschrift, Technische Hochschule Karlsruhe (1965).

¹² G. HOTZ, Z. Naturforsch. **17b**, 37 [1962].

¹³ L. G. AUGENSTEIN, Advances in Enzymol. **24**, 360 [1962].

¹⁴ L. G. AUGENSTEIN, T. BRUSTAD, and R. MASON, Advances in Rad. Biol. **1**, 228 [1964].

Abb. 3. Verlauf des Inaktivierungs-Querschnitts von T₁-Bakteriophagen mit der Temperatur, gemessen mit 2-MeV-Protonen. I bei normalen T₁-Phagen, Ia nach Abzug eines konstanten Anteils σ_0 (T₁), II bei schweren T₁-BUDR-Phagen, IIa nach Abzug eines konstanten Anteils σ_0 (T₁-BUDR).

suchen mit Cystamin zeigen die gemessenen Inaktivierungs-Querschnitte das gleiche Verhalten; auch hier findet man zwei Komponenten, von denen die eine Temperatur-unabhängig ist ($E_a = 0$), während die andere eine Aktivierungsenergie von 1 kcal/Mol besitzt. Die Abhängigkeit der unter verschiedenen Versuchsbedingungen ermittelten Inaktivierungs-Querschnitte $\sigma(T)$ von der Temperatur läßt sich durch folgende Ausdrücke beschreiben:

$$\left. \begin{aligned} \sigma_1 &= 3,3 \cdot (1 + 4,2 \cdot e^{-E_a/RT}) \\ \sigma_2 &= 4,9 \cdot (1 + 5,3 \cdot e^{-E_a/RT}) \\ \sigma_3 &= 1,3 \cdot (1 + 5,8 \cdot e^{-E_a/RT}) \\ \sigma_4 &= 1,6 \cdot (1 + 5,9 \cdot e^{-E_a/RT}) \end{aligned} \right\} \cdot 10^{-12} \text{ cm}^2 \quad (2)$$

mit $E_a = 1$ kcal/Mol.

σ_1 gilt für normale T₁-Phagen, σ_2 für T₁-BUDR-Phagen, σ_3 für normale T₁-Phagen mit Cystamin-zusatz und σ_4 für T₁-BUDR-Phagen mit Cystamin-zusatz. Bemerkenswert ist, daß die Klammerausdrücke, die den Einfluß der Temperatur wiedergeben, in allen vier Gleichungen innerhalb der Fehlergrenzen etwa gleich sind. Der Schutzeffekt durch Cystamin ist bei normalen wie bei Basen-substituierten T₁-Phagen gleich; das zeigt sich darin, daß die Verhältnisse σ_1/σ_3 und σ_2/σ_4 in beiden Fäl-

Abb. 4. Verlauf des Inaktivierungs-Querschnitts für T₁-Bakteriophagen mit der Temperatur, gemessen mit 2-MeV-Protonen. Die durchgezogenen Kurven geben den Verlauf nach Gl. (2) wieder.

len etwa 2,5 betragen. Die bei verschiedenen Temperaturen gemessenen Wirkungsquerschnitte sind in Abb. 4 über der Temperatur aufgetragen, wobei die durch die Meßpunkte gelegten Kurven Gl. (2) entsprechen. Die Abb. 4 zeigt, wie genau im Temperaturintervall zwischen 100 und 300 °K der Verlauf des Wirkungsquerschnitts durch Gl. (2) beschrieben wird.

3. Diskussion

Die als Versuchsergebnis gewonnenen Gln. (2) zeigen, daß sich die beobachtete biologische Wirkung der Protonen aus zwei Komponenten zusammensetzt, von denen eine nicht von der Bestrahlungstemperatur, sondern nur von der Basenzusammensetzung und der Cystaminzugabe abhängt, während die andere durch die Temperatur zu beeinflussen ist. Bemerkenswert ist, daß die Temperaturabhängigkeit in allen vier Fällen ($\sigma_1, \sigma_2, \sigma_3, \sigma_4$) durch Ausdrücke mit einer einheitlichen Aktivierungsenergie beschrieben wird. Auch bei Inaktivierungsversuchen an anderen biologischen Objekten, bei denen der Temperatureinfluß untersucht wurde, fand man Aktivierungsenergien dieser Größe. Aus-

fürliche Messungen an Bakteriensporen¹⁵⁻¹⁷ zeigen, daß der Inaktivierungs-Querschnitt zwischen 5 und 80 °K praktisch konstant verläuft ($E_a = 0$) und nach höheren Temperaturen hin wie bei den vorliegenden Messungen ansteigt. Unser Auswertungsverfahren ergibt auch hier¹⁵ eine Aktivierungsenergie von etwa 1 kcal/Mol. An Enzymen sind Messungen des Temperaturverlaufs von Inaktivierungs-Querschnitten häufig durchgeführt worden. BRUSTAD¹⁸ hat die Inaktivierung von Trypsin mit schweren Ionen, FLUKE¹⁹ die Inaktivierung von Ribonuclease und Lysozym mit 3-MeV-Elektronen gemessen. Die Inaktivierung von Ribonuclease mit 2-MeV-Protonen und Deuteronen wurde außerdem von GÜNTHER²⁰ untersucht. HENRIKSEN²¹ hat die mit der Temperatur zunehmende Radikalausbeute in Ribonuclease, Trypsin und Lysozym bei Bestrahlung mit Elektronen und schweren Ionen gemessen. In allen Fällen wurde ein konstanter ($E_a = 0$) und ein Temperatur-abhängiger Anteil mit einer Aktivierungsenergie von etwa 1 kcal/Mol ($\pm 40\%$) ermittelt.

Die Experimente werden durch die folgende Hypothese gedeutet: Wenn außer der Ionisierungsenergie genügend Energie in Form thermischer Anregung auf ein Molekül übertragen wird, kann es nach PLATZMAN²² zu einer Dissoziation des getroffenen Moleküls in zwei Molekülfragmente kommen. Unter Umständen führt dieser primäre Prozeß schon zu einer beobachtbaren biologischen Wirkung. Der dadurch bewirkte Anteil des Inaktivierungs-Querschnitts ist unabhängig von der Bestrahlungstemperatur, da Ionisationen und Molekülanregungen Temperatur-unabhängig sind. Viele Dissoziationen, bei denen sich kleine Radikale, zumeist wahrscheinlich Wasserstoffatome²³, bilden, sind aber zunächst biologisch irrelevant. Die kurz nach ihrer Entstehung im thermischen Gleichgewicht mit ihrer Umgebung stehenden Wasserstoffradikale können verschwinden, indem sie mit anderen rekombinieren, ein neues Radikal durch Reaktion mit einem unbeschädigten Nucleotid bilden oder ohne Reaktion entweichen. Wasserstoffradikale können aber nach einer Hypo-

these von BRAAMS²⁴ den Temperatur-abhängigen Anteil des Inaktivierungs-Querschnitts bewirken, da sie im Festkörper selbst bei tiefen Temperaturen diffundieren. Je nach Temperatur treten die schädigenden oder die harmlosen Reaktionen in den Vordergrund. Bei tiefen Temperaturen überwiegt wegen der geringen Energie der Wasserstoffradikale die Rekombination und das Entweichen, so daß wir nur die primären Effekte bemerken. Damit die Radikale aber eine Austausch- oder Anlagerungsreaktion durchführen können, ist ein Mindestmaß thermischer Energie, die Aktivierungsenergie, erforderlich, die für Radikalreaktionen nicht besonders groß ist. So gehen z.B. die exothermen Anlagerungsreaktionen des Wasserstoffatoms an Olefine oder andere Verbindungen mit Mehrfachbindungen (selbst bei 80 °K) mit Aktivierungsenergien zwischen 1 bis 4 kcal/Mol vor sich²⁵. Mit zunehmender Temperatur wächst die Zahl der Radikale ausreichender Energie exponentiell an, weshalb wir für den Inaktivierungs-Querschnitt Ausdrücke wie Gl. (2) erhalten.

Da durch Cystaminzugabe sowohl der Temperatur-abhängige als auch der Temperatur-unabhängige Anteil um den gleichen Faktor von etwa 0,4 abnehmen, wird offenbar durch das Cystamin die Zahl der primären Dissoziationen herabgesetzt, wodurch die Zahl der diffusiblen Radikale im gleichen Maße verringert wird.

Auf Grund unserer Experimente konnte eine Aussage über die physikalischen und chemischen Prozesse, die für die Schutzwirkung des Cystamins und den beobachteten Temperatureffekt verantwortlich sind, gemacht werden. Unsere Interpretation liefert zwanglos eine Erklärung dafür, daß der Verlauf der Inaktivierungs-Querschnitte mit der Temperatur von der Art der untersuchten biologischen Objekte weitgehend unabhängig ist.

Herrn Prof. K. G. ZIMMER danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und sein stets förderndes Interesse, den Herren Priv. Doz. Dr. G. HOTZ, Dr. H. JUNG und Priv. Doz. Dr. A. MÜLLER für Unterstützung bei der mikrobiologischen Technik und nützliche Ratschläge. Herrn P. KINDERMANN bin ich für seine Hilfe bei den Bestrahlungen zu großem Dank verpflichtet.

¹⁵ R. B. WEBB, C. F. EHRET, and E. L. POWERS, *Experientia* [Basel] **14**, 324 [1958].

¹⁶ E. L. POWERS, R. B. WEBB, and C. F. EHRET, in: *Progress in Nuclear Energy, Series VI, Vol. 2* (eds. BUGHER, COURSALET, and LOUTIT), Pergamon Press, New York 1959, p. 189.

¹⁷ E. L. POWERS, B. F. KALETA, and R. B. WEBB, *Rad. Res.* **11**, 461 [1959].

¹⁸ T. BRUSTAD, in: *The Biological Effects of Neutron Irradiations*, Intern. Atomic Energy Agency, Wien 1964.

¹⁹ D. J. FLUKE, *Rad. Res.* **25**, 18 [1965].

²⁰ W. GÜNTHER, Dissertation, Heidelberg 1965.

²¹ T. HENRIKSEN, University of California Radiation Laboratory Report, UCRL-16358 (1965).

²² R. L. PLATZMAN, in: *Radiation Biology and Medicine* (ed. W. D. CLAUS), Addison-Wesley Publishing Co., Reading, Mass. 1958.

²³ K. G. ZIMMER, *Rad. Res. Suppl.* **1**, 519 [1959].

²⁴ R. R. BRAAMS, *Nature* [London] **200**, 752 [1963].

²⁵ N. N. SEMJONOW, *Einige Probleme der chemischen Kinetik und Reaktionsfähigkeit*, Akademie Verlag, Berlin 1961.

Darstellung und Eigenschaften von Coenzym A-Thiolester substituerter Zimtsäuren

G. G. GROSS und M. H. ZENK

Botanisches Institut der Universität München *

(Z. Naturforschg. **21 b**, 683—690 [1966]; eingegangen am 2. April 1966)

CoA-thiolesters of substituted cinnamic acids probably occupy a central role in plant metabolism, e.g. in the biosynthesis of lignin, flavonoids, alkaloids, and many other plant products. This paper describes the preparation and some properties of a number of cinnamoyl-CoA-esters. The thiolesters were prepared by the action of acyl-CoA-synthetase (E C 6.2.1.2) on the corresponding cinnamic acids, CoA, and ATP; the procedure is especially useful in preparing labelled esters. Cinnamoyl-CoA, *p*-cumaroyl-CoA, and feruloyl-CoA were prepared in pure form by preparative chromatography from the incubation mixtures in 10–25% yield. Their R_f-values, absorption spectra, difference spectra, and hydrolysis constants were determined. Furthermore, a sensitive optical test is described for following the activation of cinnamic acids; for instance, the activation of 1 mM of *p*-methoxy-cinnamic acid still can be measured with accuracy. The molar extinction coefficient, $\lambda_{\max}$ values of the difference spectra, and the rate of activation for eleven different cinnamic acids are given. The formation of conjugates between glycine and cinnamic acids proceeds via the CoA-thiolesters of these cinnamic acids.

Im Text werden folgende Abkürzungen gebraucht: Adenosin-triphosphat = ATP; Coenzym A = CoA; Cytidin-triphosphat = CTP; Guanosindiphosphat = GDP; reduziertes Glutathion = GSH; Guanosin-triphosphat = GTP; Inosin-triphosphat = ITP; anorganisches Phosphat = P_i; Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan = Tris; Uridin-triphosphat = UTP.

Bei der Biosynthese einer Reihe von Pflanzeninhaltsstoffen, an denen Zimtsäuren als Vorstufen beteiligt sind, müssen intermediär „aktivierte“ Zimtsäure-Derivate gebildet werden. Auf Grund vergleichend biochemischer Überlegungen erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß diese aktivierten Zwischenprodukte in höheren Pflanzen Coenzym A-Thiolester der Phenylacrylsäuren sind. Als wohl wichtigster Schritt, für den die Teilnahme von Zimtsäure-CoA-Estern postuliert wird, dürfte die stark endergonische Reduktion der Zimtsäuren zu den Ligninvorstufen, den Zimtalkoholen, gelten^{1,2}. Auch für die Flavonoidbiosynthese wird seit langem die Kondensation von Zimtsäure-CoA-Thiolester mit 3 Mole-

külen Acetyl-CoA³ oder Malonyl-CoA⁴ gefordert. Dieser Mechanismus der Seitenketten-Verlängerung dürfte ebenso für die Biosynthese der Stilbene⁵ und Aurone, sowie für Piperinsäure, Cortisalin u. a. zutreffen. Die Biosynthese gewisser Amide wie Cinnamoylhistamin⁶, *p*-Cumaroylagmatin⁷, Feruloyl-putrescin⁸, Adenocarpin⁹ oder Estern wie Chlorogensäure und Sinapin (Cholinester der Sinapinsäure) muß ebenfalls über energiereiche Stufen der Zimtsäuren erfolgen.

Einen klaren Hinweis für das Auftreten von Zimtsäure-CoA-Thiolester im pflanzlichen Stoffwechsel ergaben die Untersuchungen über den Abbau von Zimtsäuren zu Benzoesäuren¹⁰, Benzaldehyden¹¹ und Benzalkoholen². Dabei konnte gezeigt werden, daß die Seitenkette der Zimtsäuren um zwei Kohlenstoffatome verkürzt wird und dieses C₂-Bruchstück als Acetat oder Acetyl-CoA frei wird^{12,2}. Der Abbau der Seitenkette der Zimtsäuren folgt also formal,

* Adresse: 8 München 19, Menzinger Straße 67.

¹ A. C. NEISH, in: The Formation of Wood in Forest Trees (Hrsg.: M. H. ZIMMERMANN), S. 219, Academic Press, New York-London 1964; P. HIGUCHI u. S. A. BROWN, Can. J. Biochem. Physiol. **41**, 621 [1963].

² M. H. ZENK, 2nd Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, im Druck [1965].

³ A. J. BIRCH u. F. W. DONOVAN, Austral. J. Chem. **6**, 360 [1953].

⁴ H. GRIEBACH, in: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (Hrsg.: T. W. GOODWIN), S. 279, Academic Press, London-New York 1965.

⁵ G. BILLEK u. H. KINDL, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 273 [1962].

⁶ J. S. FITZGERALD, Austral. J. Chem. **17**, 375 [1964].

⁷ A. STOESSL, Phytochemistry **4**, 973 [1965].

⁸ T. A. WHEATON u. J. STEWART, Nature [London] **206**, 620 [1965].

⁹ H. R. SCHÜTTE, K. L. KELLING, D. KNÖFEL u. K. MOTHES, Phytochemistry **3**, 249 [1964].

¹⁰ H. KINDL u. G. BILLEK, Mh. Chem. **95**, 1044 [1964]; H. GRIEBACH u. K. O. VOLLMER, Z. Naturforschg. **18 b**, 753 [1963]; S. Z. EL-BASYOUNI, D. CHEN, R. K. IBRAHIM, A. C. NEISH u. G. H. N. TOWERS, Phytochemistry **3**, 485 [1964]; M. H. ZENK u. G. MÜLLER, Z. Naturforschg. **19 b**, 398 [1964].

¹¹ M. H. ZENK, Z. Pflanzenphysiol. **53**, 404 [1965].

¹² K. O. VOLLMER, H. J. REISENER u. H. GRIEBACH, Biochem. biophysic. Res. Commun. **21**, 221 [1965].

soweit aus den in vivo-Versuchen geschlossen werden kann, dem klassischen Schema der β -Oxydation.

Das Auftreten von Konjugaten zwischen Glycin und verschiedenen Zimtsäuren im Urin¹³ läßt in Analogie zur Biosynthese der Hippur-¹⁴ und Indolacetursäure¹⁵ auf die Existenz von Zimtsäure-CoA-Thiolesteren auch im Tier schließen.

In dieser Arbeit sollten nun die CoA-Ester verschieden substituierter Zimtsäuren dargestellt, charakterisiert und ein optischer Test zum Nachweis ihrer Aktivierung ausgearbeitet werden. Eine chemische Synthese war dabei nicht durchführbar, da für die freien phenolischen OH-Gruppen hydroxylierter Zimtsäuren geeignete Schutzgruppen fehlen, bei deren Abspaltung nicht auch gleichzeitig die empfindliche Thiolesterbindung zerstört wird. Die gesuchten Verbindungen sollten deshalb enzymatisch dargestellt werden, was bei der Spezifität einer derartigen Reaktion und der im Ansatz enthaltenen geringen Konzentration an Sulfhydrylverbindungen auch eine Thioladdition an die Doppelbindung der Phenylacrylsäuren vermeiden läßt. Dieses Verfahren hat zudem den Vorteil, daß die Zimtsäure-CoA-Ester ohne großen experimentellen Aufwand radioaktiv mit hoher spezifischer Aktivität dargestellt werden können.

Einen Hinweis auf ein die Aktivierung von Zimtsäuren bewirkendes Enzym enthielt eine Arbeit von SCHACHTER und TAGGART¹⁶. Die Autoren fanden, daß Zimtsäure durch Acyl-CoA-Synthetase (E. C. 6.2.1.2) aus Lebermitochondrien in den CoA-Thiolester überführt wird, wie die Abspaltung von Pyrophosphat aus ATP während der Reaktion erkennen ließ. Eigene Versuche zeigten nun, daß dieses Enzym alle von uns untersuchten Zimtsäuren, welche die verschiedensten Substitutionsmuster aufwiesen, in CoA-Ester überführte. Wir bedienten uns daher dieses Enzyms zur Darstellung der aktivierten Zimtsäuren. Ein entsprechendes Enzym pflanzlichen Ursprungs ist bisher noch nicht bekannt.

Experimenteller Teil

Darstellung der Acyl-CoA-Synthetase

Das Enzym wurde nach MAHLER et al.¹⁷ aus Rinderlebermitochondrien dargestellt. In Abänderung der Originalvorschrift refraktionierten wir jedoch in den Stufen 20–24, 24–31 und 31–35 g Ammoniumsulfat/100 ml, da ein Teil des aktiven Proteins erst zwischen 31 und 35 g gefällt wird. Verwendet wurde die Fraktion 24–31 g Ammoniumsulfat, der noch die durch nochmaliges Refraktionieren der Seitenfraktionen gewonnene Fällung dieses Bereiches zugesetzt wurde. Da sich die anschließende Gelfällung mit $\text{Al}(\text{OH})_3$ nur schlecht reproduzieren ließ, wurde die Anreicherung nach diesen Schritten abgebrochen. Wir erhielten so ein zur Zimtsäureaktivierung genügend reines Enzympräparat, das von Acyl-CoA-Thiolase frei ist und sich – wenn nötig – nach der Methode von ROSSI et al.¹⁸ weiter anreichern läßt. Als Aktivitätstest bedienten wir uns der optisch verfolgbaren Aktivierung von Sorbinsäure nach MICHAL und BERGMAYER¹⁹; die für die Versuche verwendete Enzymlösung besaß eine spezifische Aktivität von 17 mE/mg Protein bei 15 m μ Mol CoA/ml Ansatz.

Hydroxamsäuretest

Die Aktivierung der Zimtsäuren wurde mittels des Hydroxamsäuretestes²⁰ bestimmt. Dazu befanden sich in einem Reaktionsvolumen von 1 ml in μ Mol: 100 Tris-HCl, p_H 7,6; 2,5 Kaliumsalz der betreffenden Säure; 10 MgCl_2 ; 750 Hydroxylamin; 20 GSH; 10 ATP; 0,25 CoA; 3 mg Protein (spez. Aktivität abweichend von obiger Angabe 11 mE/mg Protein).

Die Reaktion wurde nach 60 Min. bei 37° durch Zugabe von 2,0 ml Eisen-III-chlorid-Reagens²¹ abgestoppt und die Extinktion des Eisenkomplexes der betreffenden Hydroxamsäure photometrisch bei 540 m μ bestimmt. Als Blindwert wurde jeweils eine Probe ohne Enzym und CoA mitgeführt. Dieses Verfahren war auf Kaffee- und Sinapinsäure nicht anwendbar, da Eisen-III-chlorid bereits mit der freien Säure eine tief gefärbte Verbindung ergibt.

Darstellung von Zimthydroxamsäure

Zimthydroxamsäure wurde nach einer entsprechenden Vorschrift für Benzohydroxamsäure²² dargestellt; als Ausgangsmaterial diente Zimtsäureäthylester. Das Produkt wurde durch zweimaliges Umkristallisieren aus

¹³ M. D. ARMSTRONG, K. N. F. SHAW u. P. E. WALL, J. biol. Chemistry **218**, 293 [1956].

¹⁴ D. SCHACHTER u. J. V. TAGGART, J. biol. Chemistry **203**, 925 [1953].

¹⁵ M. H. ZENK, Z. Naturforschg. **15b**, 436 [1960].

¹⁶ D. SCHACHTER u. J. V. TAGGART, J. biol. Chemistry **208**, 263 [1954].

¹⁷ H. R. MAHLER, S. J. WAKIL u. R. M. BOCK, J. biol. Chemistry **204**, 453 [1953].

¹⁸ C. R. ROSSI u. D. M. GIBSON, J. biol. Chemistry **239**, 1694 [1964].

¹⁹ G. MICHAL u. H. U. BERGMAYER, in: Methoden der enzymatischen Analyse (Hrsg.: H. U. BERGMAYER), S. 512, Verlag Chemie, Weinheim 1962.

²⁰ F. LIPMANN u. L. C. TUTTLE, J. biol. Chemistry **159**, 21 [1945].

²¹ P. BERG, in: Methods in Enzymology (Hrsg.: S. P. COLOWICK u. N. O. KAPLAN), **5**, S. 461, Academic Press, New York-London 1962.

²² C. R. HAUSER u. W. B. RENFROW, in: Organic Syntheses (Hrsg.: A. H. BLATT), Coll. Vol. 2, S. 67, John Wiley and Sons, New York 1959.

7,5-proz. Essigsäure und anschließendes Umkristallisieren aus Chloroform gereinigt. Schmp.: 118°.

Unter den Bedingungen des obigen Hydroxamsäuretests ermittelten wir einen Extinktionskoeffizienten ϵ_{540} von $1,54 \cdot 10^6$ [cm²/Mol], d. h., 1 μ Mol Zimthydroxamsäure besitzt in einem Reaktionsvolumen von 3,0 ml bei 540 m μ eine Extinktion von 0,513; dieser Wert ist beträchtlich höher als derjenige für Acetylhydroxamsäure ($E=0,325$). Das Maximum der Farbtintensität des Eisenchloridkomplexes der Zimthydroxamsäure liegt zwischen 530 und 550 m μ .

Die übrigen Zimthydroxamsäuren wurden über den entsprechenden Methylester dargestellt. Dazu wurden 20 mg der betreffenden Zimtsäure in 4 ml Methanol + 1 Tropfen konz. Schwefelsäure 4 Stdn. am Rückflußkühler erhitzt. Das Methanol wurde abgedampft, der Rückstand in Äther aufgenommen und die nicht umgesetzte Säure mit 0,5-m. Bikarbonatlösung extrahiert. Nach Waschen mit Wasser wurde die ätherische Lösung eingeeengt und der zurückbleibende Methylester mit 1 ml salzfreier Hydroxylaminlösung²² versetzt. Nach einer Reaktionsdauer von 60 Min. wurde das Produkt angesäuert und durch präparative Chromatographie unter Verwendung der in Tab. 2 aufgeführten Lösungsmittel gereinigt. Zur quantitativen Bestimmung der substituierten Zimtsäurehydroxamate wurde der für Zimthydroxamsäure ermittelte Extinktionskoeffizient verwendet.

Präparative Darstellung der Zimtsäure-CoA-Thiolester

In einem Reaktionsansatz von 3 ml wurden inkubiert in μ Mol: 7,5–30 Kaliumsalz der betreffenden Zimtsäure; 300 Tris-HCl, pH 7,6; 40 MgCl₂; 60 ATP; 2,75 CoA; 20 mg Acyl-CoA-Synthetase; Inkubationszeit: 2 Stdn. bei 30°.

Nach Abkühlen des Ansatzes auf 0° und Abstoppen der Reaktion mit 0,3 ml 2-n. HCl wurde das denaturierte Protein abzentrifugiert und der Überstand zur Entfernung der nicht umgesetzten Säure mit 3–4 ml Äther extrahiert. Zur Isolierung der CoA-Ester wurde nun entweder die gesamte wäßrige Phase auf Whatman-3-Papier übertragen und chromatographiert oder mit 4–3 ml eines Phenol-Benzylalkoholgemisches = 3 : 1 (g : g) extrahiert, die phenolische Phase mit dem 4-fachen Volumen Chloroform versetzt und die entstehende weiße Trübung mit 5–0,4 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wäßrigen Extrakte wurden nach Gefriertrocknung präparativ chromatographisch bei 2–4° in folgenden Laufmitteln gereinigt (Tab. 1; Whatman-3-Papier, aufsteigend).

Gute Trennungen ergaben sich auch mit Äthanol : 1-m. Ammoniumacetat = 5 : 2²³ und Isopropanol : Essigsäure : H₂O : NH₃ = 50 : 28 : 20 : 2²⁵.

	I	II	III
Cinnamoyl-CoA	—	0,55	0,71
p-Cumaroyl-CoA	0,52	0,50	0,75
Feruloyl-CoA	0,40	0,48	0,70
CoA	0,18	0,42	0,62

Tab. 1. R_f -Werte von Zimtsäure-CoA-Estern. I: *n*-Butanol : Eisessig : H₂O = 5 : 2 : 3²³, II: Isobuttersäure : NH₃ : H₂O = 66 : 1 : 33²⁴, III: C₂H₅OH : 0,1-n. Na-Acetat, pH 4,5 = 1 : 1²⁴.

Zur Lokalisierung und Identifizierung der Thiolester wurde das Nitroprussidreagens nach STADTMAN²⁴ verwendet; die Esterspaltung erfolgte nach l. c.²⁶ in Ammoniakatmosphäre. CoA-Ester von Säuren mit freien phenolischen OH-Gruppen ergaben eine sich bei Hydrolyse verstärkende Gelbfärbung, während sonst die übliche „verzögerte“ Rotfärbung auftrat. Der Nachweis der phenolischen OH-Gruppen erfolgte durch Sprühen mit diazotierter Sulfanilsäure.

Die Ausbeute an reinem Thiolester betrug 10 bis 25% des eingesetzten CoA-SH. Zur Synthese radioaktiv markierter Zimtsäure-CoA-Thiolester wird das Verhältnis von Zimtsäure-[¹⁴C] zu CoA vorteilhaft auf 1 : 1 verringert. Auf diese experimentell einfache Weise lassen sich Thiolester aromatischer Säuren mit hoher spezifischer Aktivität gewinnen (vgl. ZENK und GROSS²⁷).

Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten der Zimtsäure-CoA-Thiolester

Das UV-Spektrum der Zimtsäure-CoA-Ester zeigt außer dem typischen Absorptionsmaximum bei 260 m μ noch einen auf die Thiolestergruppierung zurückgehenden charakteristischen Gipfel im langwelligen UV-Bereich. Die spezifische Extinktion bei dieser Wellenlänge ist wichtig für die Mengenbestimmung und wurde durch Vergleich mit dem von MICHAL und BERGMAYER¹⁹ angegebenen exakten Extinktionskoeffizienten von Sorbyl-CoA ($\epsilon_{300} = 23,53 \cdot 10^6$ [cm²/Mol]) ermittelt. Dazu wurde einem Versuchsansatz, der folgende Verbindungen in μ Mol enthielt: 10 MgCl₂; 7,5–15 Kaliumsalz der betreffenden Säuren; 15 ATP; 0,75 CoA; 1,25 mg Acyl-CoA-Synthetase; 0,1-m. Tris-HCl-Puffer, pH 7,6 ad 3 ml Gesamtvolumen; eine exakt mit Thiokinase und Phosphotransacetylase nach l. c.¹⁹ bestimmte Menge an freiem CoA-SH zugesetzt. Die Extinktionszunahme im Absorptionsmaximum der Thiolesterbindung wurde bestimmt und die Reaktion bis zum Stillstand verfolgt. Aus diesen Werten wurde der molare Extinktionskoeffizient nach der Gleichung $\epsilon = \frac{\Delta E \cdot V}{d \cdot C}$ (ΔE = Extinktionsdifferenz; V = Testvolumen in ml; d = Lichtweg in cm; C = eingesetzte CoA-Menge in Mol) errechnet. Bei quantitativer Reaktion, die bei den ange-

²³ A. M. MICHELSON, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **93**, 71 [1964].

²⁴ E. R. STADTMAN, in: Methods in Enzymology (Hrsg.: S. P. COLOWICK u. N. O. KAPLAN), **3**, S. 931, Academic Press, New York 1957.

²⁵ R. D. LANE, K. C. ROMINGER, D. L. YOUNG u. F. LYNEN, J. biol. Chemistry **239**, 2865 [1964].

²⁶ W. SEUBERT, Dissertation, München 1955.

²⁷ M. H. ZENK u. G. G. GROSS, Z. Pflanzenphysiol. **53**, 356 [1965].

gebenen Konzentrationen der Reaktanden erfolgt¹⁹, ist die eingesetzte CoA-Menge der gebildeten Menge an Thiolester gleichzusetzen. Die Ausbildung eines Gleichgewichts zwischen den Reaktionspartnern wurde mit Sicherheit durch Zusatz einer definierten Menge an Cinnamoyl-CoA zum kompletten Ansatz ausgeschlossen; es konnte keine Verringerung der Thiolester-Konzentration festgestellt werden. Darüber hinaus wurde bei sehr langsam reagierenden Säuren eine etwa noch nicht umgesetzte Menge an CoA-SH quantitativ nach STADTMAN²⁴ bestimmt und dieser Wert in die Berechnung der spezifischen Extinktion mit einbezogen; der dabei auftretende Bestimmungsfehler mußte in Kauf genommen werden.

Bestimmung der Hydrolysenkonstanten

Die Hydrolysenkonstanten der gereinigten Zimtsäure-CoA-Ester wurden nach EGGERER und LYNEN²⁸ optisch bestimmt. Dabei zeigte sich, daß besonders bei Säuren mit freien OH-Gruppen bei alkalischer Hydrolyse gefärbte Polymerisationsprodukte auftreten, wodurch die optische Bestimmung der Hydrolysenkonstanten und des Hydrolysenpektrums unmöglich werden. In diesen Fällen (z. B. *p*-Cumaroyle-CoA) wurde die Spaltung der Thiolesterbindung durch Hydroxylaminolyse bei pH 7,5 verfolgt.

Konjugierung von Zimtsäuren mit Glycin

Zum Nachweis der Konjugierung der Zimtsäuren mit Glycin im zellfreien System wurden diese mit Glycin [$1,2-^{14}C$] und einer Proteinfraction aus Rinderlebermitochondrien (21–35 g Ammoniumsulfat/100 ml Rohextrakt) inkubiert, die neben Acyl-CoA-Synthetase auch Acyl-CoA: Glycin *N*-Acyl-transferase (E C 2.3.1.13)¹⁶ enthielt. Unter den in Tab. 5 erwähnten Bedingungen wurde inkubiert; nach Beendigung der Reaktion wurde das Protein mit 0,2 ml 3-*m*. $HClO_4$ ausgefällt, abzentrifugiert und der Ansatz mit 4·1,5 ml Äther:Äthylacetat=6:1 extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte mit dem Zimtsäure-Glycin-Konjugat wurden mit 2·1 ml Wasser gewaschen, der Äther abgedampft, der Rückstand in 1 ml abs. Methanol aufgenommen und an einem Aliquot im Methandurchflußzähler die Radioaktivität bestimmt. Durch Dünnschichtchromatographie (Kieselgel GF₂₅₄) in verschiedenen Laufmitteln wurde nachgewiesen, daß der Extrakt frei von mitgeschlepptem Glycin war, so daß aus der spezifischen Aktivität des eingesetzten Glycins die Menge des gebildeten Acyl-*N*-Glycins berechnet werden konnte.

Ergebnisse

1. Nachweis der Aktivierung von Zimtsäuren durch Acyl-CoA-Synthetase

Das von uns verwendete Enzym Acyl-CoA-Synthetase besitzt einen weiten Substratbereich. So werden neben einer großen Anzahl aliphatischer

Säuren¹⁷ auch aromatische Säuren wie Benzoe-, Phenylessig-, Nicotin-, Phenylpropion- und Zimtsäure¹⁶ sowie Indoleessig-, Naphtylessig- und verschieden substituierte Phenoxyessigsäuren¹⁵ aktiviert. Es war jedoch bisher unbekannt, ob die in der Natur mit verschiedenem Substitutionsmuster auftretenden Zimtsäuren ebenfalls von diesem Enzym in die CoA-Thiolester übergeführt werden. Den Nachweis der Aktivierung konnten wir mit dem Hydroxamsäuretest führen, obwohl das zugesetzte Hydroxylamin das Enzym teilweise hemmt¹⁷. Tab. 2 zeigt die Aktivierung der verschiedenen Zimtsäuren, sowie die R_f -Werte der Zimthydroxamsäuren in

Säure	gebildete Hydroxamsäure [µMol]	[%]	R_f -Werte der Hydroxamsäuren		
			I	II	III
Zimtsäure	268	100	0,64	0,79	0,56
<i>o</i> -Cumarsäure	244	91	0,50	0,73	0,29
<i>m</i> -Cumarsäure	159	59	—	—	—
<i>p</i> -Cumarsäure	120	45	0,42	0,66	0,21
<i>p</i> -Methoxyzimtsäure	136	51	0,47	0,75	0,46
Ferulasäure	97	36	0,33	0,57	0,12
Isoferulasäure	133	50	0,34	0,55	0,17
3,4-Dimethoxyzimtsäure	120	45	0,38	0,61	0,32
3,4-Methylenedioxyzimtsäure	220	82	0,43	0,70	0,39
3,4,5-Trimethoxyzimtsäure	97	36	0,53	0,67	0,43

Tab. 2. Nachweis der Aktivierung verschiedener Zimtsäuren mit dem Hydroxamsäuretest. Reaktionsbedingungen wie im experimentellen Teil angegeben. Laufmittel: I 5-proz. Ameisensäure; II Butanol: Eisessig: H_2O = 20:1:4; III Isoopropanol: NH_3 : H_2O = 8:1:1 (Schleicher & Schüll 2043 b, aufsteigend).

I: Butanol: Eisessig = 8:2; II: Benzol: Eisessig = 8:2; III: Toluol: Äthylformiat: Ameisensäure = 5:4:1.

3 Laufmitteln. Unter den angegebenen Bedingungen ist Zimtsäure die reaktivste Säure. Es folgt *o*-Cumarsäure, während Ferula- und 3,4,5-Trimethoxyzimtsäure in relativ geringem Maße umgesetzt werden. Es steht jedoch fest, daß alle untersuchten Zimtsäuren Coenzym A-Thiolester bilden. In den Kontrollen ohne CoA oder ATP fand keine Aktivierung statt.

2. Präparative Darstellung einiger Zimtsäure-Coenzym A-Thiolester

Die für die Ligninbiosynthese wichtigsten Zimtsäuren sind *p*-Cumarsäure und Ferulasäure. Diese

²⁸ H. EGGERER u. F. LYNEN, Biochem. Z. 335, 540 [1962].

beiden Säuren sowie Zimtsäure sollten in ihre CoA-Ester überführt und präparativ gewonnen werden. Die Ansätze wurden, wie im experimentellen Teil angegeben, inkubiert und aufgearbeitet. Die Absorptionsspektren der papierchromatographisch in mindestens 2 Laufmitteln gereinigten Thiolester

Abb. 1. UV-Spektrum von Cinnamoyl-CoA (34 mμMol/ml) in 0,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,0 (I), Spektrum nach Hydrolyse in 0,1-m. NaOH (II) und Differenzspektrum (III).

Abb. 2. UV-Spektrum von *p*-Cumaroyl-CoA (30 mμMol/ml) in 0,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,0 (I), Spektrum nach Hydroxylaminolyse in 1-m. NH₂OH, pH 7,5 (II) und Differenzspektrum (III).

Abb. 3. UV-Spektrum von Feruloyl-CoA (41 mμMol/ml) in 0,1-m. Phosphatpuffer, pH 7,0 (I), Spektrum nach Hydrolyse in 0,1-m. NaOH (II) und Differenzspektrum (III).

wurden in 0,1-m. K-Phosphatpuffer, pH 7,0 ermittelt. In den Abb. 1, 2, 3 sind die Absorptions-, Hydrolysen- und Differenzspektren der CoA-Verbindungen dieser drei Säuren dargestellt. Wie sich aus dem Absorptionsspektrum der gereinigten Zimtsäure-CoA-Thiolester ergab, zeigen diese Verbindungen im langwelligen UV-Bereich eine charakteristische Absorption, die bei Hydrolyse verschwindet. Im Gegensatz zu aliphatischen CoA-Estern liegt das Maximum des Differenzspektrums der Zimtsäure-CoA-Verbindungen nicht bei 230–240 mμ, sondern je nach Substitutionsmuster der Zimtsäure zwischen 310–365 mμ; ein ähnliches Verhalten wurde auch schon für Benzoyl-CoA (ΔE 272 mμ¹⁴) und für Veratryl-CoA (ΔE 345 mμ²⁷) nachgewiesen. Zur weiteren Charakterisierung der Zimtsäure-CoA-Ester wurde die Hydrolysegeschwindigkeit von Cinnamoyl-CoA in 0,1-m. NaOH, die Geschwindigkeit der Hydroxylaminolyse von Cinnamoyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA in 1-m. NH₂OH, pH 7,5 sowie die zugehörigen Halbwertszeiten der Esterspaltung bestimmt. Im einzelnen ergaben sich folgende Werte:

Cinnamoyl-CoA: $K_{\text{NaOH}} = 0,44$ [Min.⁻¹]; $t_{\frac{1}{2}} = 75$ Sek., Cinnamoyl-CoA: $K_{\text{NH}_2\text{OH}} = 0,38$ [Min.⁻¹]; $t_{\frac{1}{2}} = 120$ Sek., *p*-Cumaroyl-CoA: $K_{\text{NH}_2\text{OH}} = 0,18$ [Min.⁻¹]; $t_{\frac{1}{2}} = 240$ Sekunden.

Die graphische Darstellung der nach l. c.²⁸ errechneten Meßwerte zeigt Abb. 4.

Abb. 4. Graphische Darstellung der Thiolesterspaltung. (○-○) Hydrolyse von Cinnamoyl-CoA in 0,1-m. NaOH; (●-●) Hydroxylaminolyse von Cinnamoyl-CoA; (+-+) Hydroxylaminolyse von *p*-Cumaroyl-CoA, beide in 1-m. NH_2OH , pH 7,5; E_0 = Anfangsextinktion, E_t = Extinktion nach t Min. Hydrolyse; E_∞ = Extinktion nach vollständiger Hydrolyse.

3. Optischer Test zum Nachweis der Aktivierung der Zimtsäuren

Die Absorption der Thiolesterbande der verschiedenen substituierten Zimtsäuren zwischen 310 und 365 $\text{m}\mu$ ermöglicht einen empfindlichen optischen Test zum Nachweis ihrer Aktivierung. Dazu wird in Quarzküvetten mit den im experimentellen Teil erwähnten Reagenzien die Reaktion durch Zugabe von 1,25 mg Acyl-CoA-Synthetase gestartet. Die Extinktionszunahme bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums des Differenzspektrums wird bis zum Stillstand verfolgt, was je nach Säure zwischen 15 Min. (Zimtsäure) und 80 Min. (Ferulasäure) dauern kann. Als Vergleichsküvette dient ein Ansatz, der lediglich die Säure enthält, da keine andere Komponente des Inkubationsgemischs im fraglichen UV-Bereich absorbiert. Die Auswertung kann nun entweder nach der Endwertmethode oder auf kinetischer Basis erfolgen. Die Reaktion ist, nach beiden Methoden ausgewertet und mit 3,4-Methyldioxyzimtsäure als Substrat, für CoA-Mengen in einem von uns untersuchten Bereich zwischen 8 und 150 $\text{m}\mu\text{Mol/ml}$ und für Proteinmengen zwischen 9 und 500 $\mu\text{g/ml}$ linear. Die Thiolesterbildung steigt linear mit dem pH -Wert an (untersuchter Bereich pH 7,4–9,0; Tris-HCl-Puffer); jedoch ist bei pH -

Werten über 8 mit der Oxydation der freien -SH-Gruppe des CoA zu rechnen.

Von starkem Einfluß auf die Reaktionsgeschwindigkeit ist die gewählte Säurekonzentration. 10 μMol pro ml Testansatz ergeben – mit Ausnahme von *m*-Cumarsäure und 3,4-Methyldioxyzimtsäure – deutliche Substrathemmung, die im Falle der Ferulasäure bis zu 80% beträgt. Abb. 5 zeigt die Konzentrations-Abhängigkeit der Umsatzgeschwindigkeit für 3,4-Methyldioxyzimtsäure und *p*-Cumarsäure. Die Optima liegen bei allen untersuchten Säuren bei ca. 2,5 $\mu\text{Mol/ml}$.

Abb. 5. Abhängigkeit der Bildungsgeschwindigkeit der Cinnamoyl-CoA-Ester von der Substratkonzentration. (●-●) 3,4-Methyldioxyzimtsäure; (○-○) *p*-Cumarsäure.

Wie Rossi et al.¹⁸ gezeigt haben, findet in Leber-mitochondrien-Extrakten auch eine GTP-abhängige Aktivierung von Fettsäuren statt, wobei als Endprodukt die Acyl-CoA-Thiolester sowie GDP und P_i auftreten. Daher wurde die Aktivierung von Zimtsäure und 3,4-Methyldioxyzimtsäure in Abhängigkeit von verschiedenen Nucleotidtriphosphaten untersucht. ATP erwies sich als das bei weitem wirksamste Coenzym (Tab. 3).

Der optische Test mit ATP ist so empfindlich, daß z. B. noch die Bildung von 0,96 μMol *p*-Methoxy-

Nucleotid-triphosphat	Cinnamoyl-CoA [$\mu\text{Mol} \cdot \text{Min.}^{-1}$]	[%]	3,4-Methylen-dioxy-cinnamoyl-CoA [$\mu\text{Mol} \cdot \text{Min.}^{-1}$]	[%]
ATP	13,5	100	9,2	100
CTP	0,2	1	0	0
GTP	1,6	12	0	0
ITP	2,7	20	0,7	8
UTP	1,0	7	0,6	7

Tab. 3. Nucleotid-Abhängigkeit der Thiolesterbildung im optischen Test. Ansatz in μMol : 10 MgCl_2 ; 30 Kaliumsalz der betr. Säure; 15 Nucleotid; 0,25 CoA; 1,25 mg Acyl-CoA-Synthetase; 0,1-m. Tris-HCl, pH 7,6 ad 3 ml Gesamtvolumen.

cinnamoyl-CoA, entsprechend einer Extinktionszunahme von $E = 0,025$ verlässlich gemessen werden kann. In Tab. 4 sind die von uns nach der im experimentellen Teil beschriebenen Methode gewonnenen molaren Extinktionskoeffizienten und die $\lambda_{\max}$ -Werte der Thiolesterbande der Zimtsäuren zusammengestellt. Es fällt auf, daß die Absorption der Thiolesterbande bei zunehmender Kernsubstitution weiter in den langwelligen UV-Bereich verschoben

wir wohl isolieren, aber noch nicht identifizieren konnten; es handelt sich bei dieser Substanz nicht um Cumarin.

4. Konjugierung von Zimtsäuren mit Glycin

Das Auftreten von Glycin-Derivaten der Zimtsäuren im Urin läßt, wie bereits in der Einleitung erwähnt, auf das intermediäre Auftreten von Zimtsäure-CoA-Estern schließen. Dabei dürften die so aktivierten Zimtsäuren enzymatisch mittels Acyl-CoA : Glycin *N*-Acyltransferase auf Glycin übertragen werden.

Eine Inkubation von Zimtsäuren unter den im experimentellen Teil dargestellten Bedingungen bewies nun, daß in vitro die aktivierten Zimtsäuren mit Glycin konjugiert werden können. In Tab. 5 sind die Umsatzraten der einzelnen Zimtsäuren mit Glycin, wie auch die R_f -Werte der so markiert gewonnenen *N*-Glycin-Derivate dargestellt.

CoA-Ester der	Kernsubstitution	$\lambda_{\max}$ [m μ]	$\epsilon \lambda_{\max}$ [$\frac{\text{cm}^2}{\text{Mol}}$] $\cdot 10^6$	Umsatzgeschwindigkeit [m μ Mol $\cdot$ Min. $^{-1}$]
Zimtsäure	—	311	22	13,5
<i>o</i> -Cumarsäure	2-OH	351	—	—
<i>m</i> -Cumarsäure	3-OH	330	11	5,5
<i>p</i> -Cumarsäure	4-OH	333	23	1,0
<i>p</i> -Methoxyzimtsäure	4-OCH ₃	339	27	11,2
Kaffeesäure	3,4-OH	363	13	1,9
Ferulasäure	4-OH	345	19	0,1
	3-OCH ₃			
Isoferulasäure	3-OH	351	18	3,7
	4-OCH ₃			
3,4-Dimethoxyzimtsäure	3,4-OCH ₃	346	24	1,1
3,4-Methylen-dioxyzimtsäure	3,4-O ₂ CH ₂	355	21	9,9
3,4,5-Trimethoxyzimtsäure	3,4,5-OCH ₃	342	9	0,5

Tab. 4. Absorptionsmaxima, molare Extinktionskoeffizienten und Bildungsgeschwindigkeiten von Zimtsäure-CoA-Thioestern.

wird (Zimtsäure $\rightarrow$ *p*-Cumarsäure $\rightarrow$ Kaffeesäure). Durch *p*-Hydroxylierung wird die Umsatzgeschwindigkeit der Substrate gegenüber dem unsubstituierten Ring erheblich herabgesetzt. Ist die *p*-ständige phenolische Gruppe jedoch methyliert, steigt die Umsatzgeschwindigkeit wieder stark an. Ein ähnliches Verhalten zeigen die Isomeren Ferula- und Isoferulasäure. Hier wird die Verbindung mit methoxylierter *p*-Stellung mindestens 35mal schneller umgesetzt.

Noch stärkere Hemmwirkung zeigen trisubstituierte Zimtsäuren. Sinapinsäure wird z. B. so langsam umgesetzt, daß eine Bestimmung des molaren Extinktionskoeffizienten nicht möglich war. Abweichend verhält sich *o*-Cumarsäure, die zwar, wie auch schon aus dem Hydroxamsäuretest hervorgeht, sehr gut umgesetzt wird, deren CoA-Thiolester jedoch enzymatisch zu einer Verbindung weiterreagiert, die

Säure	gebildetes Acyl- <i>N</i> - Glycin [m μ Mol]	[%]	R_f -Werte der Glycin-Derivate		
			I	II	III
Zimtsäure	570	100	0,78	0,25	0,48
<i>o</i> -Cumarsäure	10	2	0,72	0,63	0,67
<i>p</i> -Cumarsäure	120	21	0,86	0,17	0,27
<i>p</i> -Methoxyzimtsäure	124	22	0,83	0,65	0,49
Kaffeesäure	170	30	0,17	0,26	0,31
Ferulasäure	20	4	0,79	0,11	0,29
Isoferulasäure	10	2	—	0,43	—
3,4-Dimethoxyzimtsäure	12	2	0,09	0,57	0,98
3,4-Methylen-dioxyzimtsäure	216	40	0,80	0,70	0,50
Sinapinsäure	6	1	—	—	—
3,4,5-Trimethoxyzimtsäure	18	3	0,80	0,27	0,41

Tab. 5. Bildung von Zimtsäure-*N*-Glycin-Konjugaten. Ansatz in μ Mol: 100 Tris-HCl, pH 8,0; 10 Kaliumsalz der betr. Säure; 50 Glycin-[1,2-¹⁴C] = 2 μ C; 3 MgCl₂; 10 GSH; 10 ATP; 0,33 CoA; 5 mg Protein; Vol. 1 ml; Inkubation 2 Stdn. bei 38 °C.

Kontrollen ohne CoA oder ATP ergeben im Ätherextrakt des Inkubationsansatzes keine Radioaktivität. Es wird auch hier wieder die Zimtsäure ohne Kernsubstitution am besten umgesetzt. Erstaunlich ist die hohe Umsatzrate der Kaffeesäure in diesem System. Auch Sinapinsäure wird in ein Glycin-Derivat überführt, allerdings etwa 100-mal geringer als Zimtsäure; die R_f -Werte dieses Sinapinoylglycins konnten wegen der geringen Radioaktivität nicht ermittelt werden. Aus diesem Ver-

such kann geschlossen werden, daß sich auch die Konjugierung der Zimtsäuren nach dem Schema der Hippursäure-Biosynthese vollzieht. Es ist somit gesichert, daß in vivo — zumindest im tierischen Organismus — Zimtsäure-CoA-Thiolester als energiereiche Zwischenprodukte auftreten.

Durch die Möglichkeit, die CoA-Thiolester substituierter Zimtsäuren darzustellen oder sie mit einem enzymatischen Hilffsystem zu erzeugen, kann nun geprüft werden, ob durch Pflanzenhomogenate die in der Einleitung erwähnten Biosyntheseschritte katalysiert werden können. Insbesondere ist dies von Interesse bei Untersuchungen zur Frage der mög-

lichen Reduktion dieser energiereichen Verbindungen zu den Ligninvorstufen, den Zimtaldehyden und -alkoholen. Weiterhin kann mit Hilfe des beschriebenen optischen Tests entschieden werden, ob Zimtsäuren auch in höheren Pflanzen nach dem beschriebenen Reaktionsmechanismus aktiviert werden, oder ob dies möglicherweise auf dem von uns bei Basidiomyceten gefundenen Wege²⁷ geschieht.

Fräulein C. KALTEIS danken wir sehr herzlich für ihre sorgfältige Mitarbeit und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Über die osmiophilen globulären Lipideinschlüsse der Chloroplasten

HARTMUT K. LICHTENTHALER und BENNO SPREY

Botanisches Institut der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

(Z. Naturforschg. 21 b, 690—697 [1966]; eingegangen am 6. April 1966)

The electromicroscopical structure and quinone composition of the osmiophilic, globular, lipid-rich plastid inclusions were investigated in several plants. The localisation of the osmiophilic globuli in the plastid stroma and their behaviour toward fixation agents are described. The isolated globuli — here termed plastoglobuli — contain high amounts of lipophilic chloroplast quinones and apparently no chlorophylls or carotenoids. There exist considerable differences in the relative quinone concentrations of chloroplasts and isolated plastoglobuli. The possible function of plastoglobuli is discussed.

Funktionstüchtige Chloroplasten normalgrüner Blätter enthalten eine lamellare Phase, bestehend aus Thylakoiden¹, die in eine chlorophyllfreie Phase, dem proteinhaltigen Stromaplasma, eingebettet ist und gegen das umgebende Cytoplasma durch die doppelte Chloroplastenmembran (aus zwei „unit membranes“ im Sinne ROBERTSON² bestehend) begrenzt wird. Das Thylakoid-freie Stromaplasma gibt nach OsO₄-Fixation globuläre, stark Elektronenstreuende Einschlüsse — allgemein als osmiophile Globuli bezeichnet — zu erkennen. Diese treten solitär im Stroma auf, sind aber häufig auch in Gruppen mit hexagonaler Anordnung³ anzutreffen. Die globulären osmiophilen Einschlüsse stellen eine natürliche Chloroplastenkomponente dar. Sie kom-

men in den Chromatophoren der Eukaryonten verschiedener taxonomischer Stellung sowie in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Chloro-, Chromo- und Leukoplasten vor. Bisher wurden sie aus den Chloroplasten nur weniger Pflanzen isoliert⁴⁻⁷. Sie besitzen einen hohen Lipidgehalt und enthalten u. a. die lipophilen Plastidenchinone und sehr wahrscheinlich auch Carotinoide^{4,7}. Ihre genaue chemische Zusammensetzung, Genese und mögliche Funktion im Chloroplasten ist noch nicht bekannt. Hier berichten wir über Größe, Struktur und Chinonzusammensetzung der osmiophilen Globuli aus Chloroplasten normalgrüner Blätter verschiedener Pflanzen. Ihre mögliche Funktion im Zuge der Thylakoidsynthese wird diskutiert.

¹ W. MENKE, Z. Naturforschg. 16 b, 334 [1961].

² J. D. ROBERTSON, in: Cellular Membranes in Development, M. LOCKE ed., Academic Press, New York and London 1964, p. 1.

³ P. SITTE, Protoplasma 56, 197 [1963].

⁴ S. MURAKAMI and A. TAKAMIYA, in: Electron Microscopy, 5th International Congress for Electron Microscopy, Philadelphia, S. BREESE ed., Academic Press, New York and London 1962, Vol. 2, XX 12.

⁵ A. D. GREENWOOD, R. M. LEECH, and J. P. WILLIAMS, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 78, 148 [1963].

⁶ J. L. BAILEY and A. G. WHYBORN, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 78, 163 [1963].

⁷ H. K. LICHTENTHALER, Ber. dtsch. bot. Ges. 77, 398 [1964].