

## Kurze Mitteilungen

Bis am 20. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen

## Zur enzymatischen Bildung von Acyl-Steringlycosid in Pflanzen\*

### Summary

Glucose-labeled steryl glycoside (0.5 mc/mM) has been obtained biosynthetically by incubation of a lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf particulate fraction with UDP-glucose-<sup>14</sup>C. When dissolved in dimethylsulfoxide and incubated with the same particulate fraction, steryl <sup>14</sup>C-glucoside (sG) was found to be converted by acylation to esterified steryl <sup>14</sup>C-glucoside (ESG). The identity of ESG has been confirmed by deacylation and by recrystallization of the deacylated product with carrier steryl glycoside to constant specific activity. This experiment demonstrates the biosynthesis of ESG in plants by acylation of sG.

Steringlycosid (sG) und Acyl-Steringlycosid (Acyl-sG) sind in höheren Pflanzen weit verbreitet. Die hydrolytische Spaltung ergibt Gemische von Phytosterinen, Hexosen und, bei Acyl-SG, zusätzlich Fettsäuren im molaren Verhältnis 1:1:1<sup>1,2</sup>.

In letzter Zeit wurden aus Sojasamen<sup>3,4</sup>, grünen Blättern<sup>5,6</sup> und Bohnenkeimlingen<sup>7</sup> Partikelfractionen gewonnen, die die Übertragung eines Glucose-Rests von

UDP-Glucose auf freie Sterine katalysieren. Ein entsprechendes Enzym konnte, wohl infolge seiner starken Bindung an die Partikelstrukturen, bisher nicht isoliert werden. Hingegen darf aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, daß der Zusammenbau von Zucker und Sterin auch *in vivo* auf diesem Weg erfolgt.

Bei Verwendung von UDP-<sup>14</sup>C-Glucose als Vorstufe wird regelmäßig ein Teil der Radioaktivität in das Acyl-sG eingebaut. Dies bedeutet, daß dieselben Partikel auch den zur Bildung des Acyl-sG notwendigen Acylierungsschritt durchführen können.

Nach Schema 1 kann die Bildung von Acyl-sG grundsätzlich auf zwei Wegen erfolgen, die sich durch die Reihenfolge von Glycosylierung und Acylierung unterscheiden.

Die Beobachtung, daß bei der Biosynthese anderer Acyl-Lipide wie Acyl-Galactosyldiglycerid<sup>8</sup> und Acyl-Dihydroxyaceton<sup>9</sup> die Acylierung als letzter Schritt erfolgt, spricht für eine direkte Acylierung von Steringlycosid (Weg 1). Da andererseits in der Natur acylierte Glucosen gefunden worden sind<sup>10,11</sup>, wäre ebensogut

\* Eingegangen am 22. September 1969.

<sup>1</sup> W. EICHENBERGER und W. MENKE, *Z. Naturforsch.* 21b (1966) 859.

<sup>2</sup> M. LEPAGE, *J. Lipid Res.* 5 (1964) 587.

<sup>3</sup> C. T. HOU, Y. UMEMURA, M. NAKAMURA und S. FUNAHASHI, *J. Biochem.* [Tokyo] 62 (1967) 389.

<sup>4</sup> C. T. HOU, Y. UMEMURA, M. NAKAMURA und S. FUNAHASHI, *J. Biochem.* [Tokyo] 63 (1968) 351.

<sup>5</sup> W. EICHENBERGER und E. C. GROB, *Chimia* 22 (1968) 46.

<sup>6</sup> W. EICHENBERGER und D. W. NEWMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32 (1968) 366.

<sup>7</sup> H. KAUSS, *Z. Naturforsch.* 23b (1968) 1522.

<sup>8</sup> E. HEINZ, *Biochim. Biophys. Acta* 144 (1967) 321, 333.

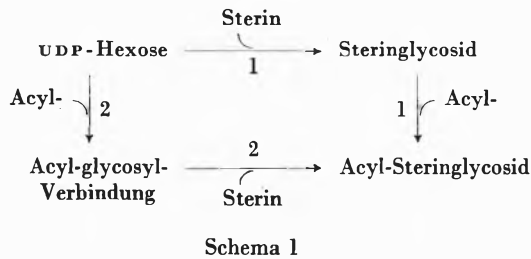
<sup>9</sup> A. K. HAJRA, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 3458.

<sup>10</sup> P. J. BRENNAN und D. P. LEHANE, *Biochim. Biophys. Acta* 176 (1969) 675.

<sup>11</sup> K. WELSH, N. SHAW und J. BADDILEY, *Biochem. J.* 107 (1968) 313.

denkbar, daß zuerst eine Acyl-glucosyl-Verbindung gebildet wird, die anschließend mit freiem Sterin kombiniert wird (Weg 2).

Es ist uns gelungen, mit einer Partikelfraktion aus Lattichblättern eine Umwandlung von Steringlycosid in das Acyl-Derivat zu erzielen. Daraus ist zu schließen, daß die Bildung von Acyl-sG in der Pflanze auf diesem Weg erfolgt.



Zur Isolierung der aktiven Partikelfraktion wurden junge Blätter von Lattich (*Lactuca sativa* L., Burpee's Ruby Red, Innenkultur) im Glashomogenisator mit Tris/HCl-Puffer (0,1M, pH 8,2) zerrieben und das Homogenat zur Entfernung grober Bestandteile 3 min bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 15 min bei 30000 g zentrifugiert und das Sediment, das die aktiven Partikel enthielt, in wenig Tris-Puffer aufgenommen. Zur Herstellung von markiertem Steringlycosid wurden 400  $\mu$ l Partikelsuspension mit 2  $\mu$ M ATP, 2  $\mu$ C UDP-<sup>14</sup>C-Glucose (u.l., 194 mc/mM) und 100  $\mu$ l Tris-Puffer enthaltend 0,2% Triton X-100, 2½ Stunden bei 30°C inkubiert.

Die mit Chloroform und Methanol extrahierten Lipide wurden auf DC-Platten (Kieselgel G, Chloroform-Methanol 6:1) getrennt und die Lage des gebildeten sG und Acyl-sG durch kurzzeitige Autoradiographie ermittelt.

Die Flecke wurden mit Methanol (sG) und Aceton (Acyl-sG) eluiert. Zusammen mit dem durch alkalische Hydrolyse aus dem Acyl-sG erhaltenen Produkt wurden 0,44 mg Glucose-markiertes Steringlycosid mit einer spezifischen Radioaktivität von 0,55 mc/mM erhalten.

Ein Teil dieses Materials (153000 cpm) wurde, in Dimethylsulfoxid gelöst, mit 2  $\mu$ M ATP und frischer Partikelsuspension in Tris-Puffer 3 Stunden bei 30°C inkubiert. Ein anderer Teil (118000 cpm) wurde unter gleichen Bedingungen mit Partikeln inkubiert, die vorher 5 min auf 90°C erhitzt worden waren. Die extrahierten Lipide wurden nebeneinander auf derselben DC-Platte chromatographiert und autoradiographiert. Nach Rückgewinnung der radioaktiven Zonen wurden die übrigen durch Sprühen mit HClO<sub>4</sub> sichtbar gemacht. Wie Abb. 1 zeigt, wurde das eingesetzte Steringlycosid durch die aktiven Partikel zu mehr als 30% in Acyl-Steringlycosid umgewandelt (50400 cpm), während die inaktivierte Partikelsuspension kein Acyl-sG zu bilden vermochte (130 cpm).

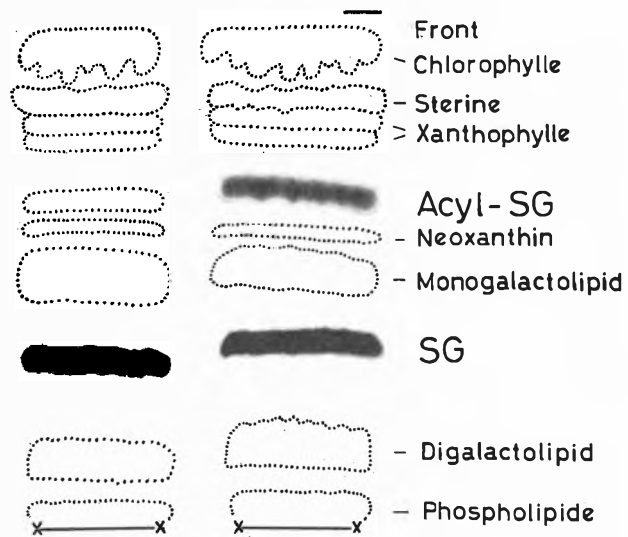


Abb. 1. Acylierung von <sup>14</sup>C-markiertem Steringlycosid durch Partikel aus Lattichblättern. DC-Autoradiogramm (Trennung auf Kieselgel G mit Chloroform-Methanol 6:1). Bahn 1: Partikel vor Inkubation 5 min auf 90°C erhitzt. Bahn 2: Partikel unbehandelt.

Ein Teil des aus Bahn 2 zurückgewonnenen Acyl-sG (40700 cpm) wurde mit 100  $\mu$ l KOH-Wasser-Äthanol 1:1:10 (g/v/v) 30 min bei 50°C deacyliert. Das Produkt, welches dieselben Laufeigenschaften wie Steringlycosid und eine Aktivität von 37500 cpm (92%) aufwies, wurde anschließend mit inaktivem Steringlycosid fünfmal aus Tetrahydrofuran umkristallisiert. Die spezifische Aktivität in den fünf aufeinanderfolgenden Fraktionen betrug 1400, 1560, 1500, 1540 und 1510 cpm/mg. Damit ist die Identität des enzymatisch gebildeten Produkts mit Acyl-sG bewiesen.

Aus diesen Ergebnissen ziehen wir den Schluß, daß das in der Natur vorkommende Acyl-Steringlycosid durch Acylierung von Steringlycosid gebildet wird, wobei die OH-Gruppe in 6-Stellung des Hexose-Rests verestert wird<sup>2</sup>.

Eine ähnliche Reaktion, bei der die OH-Gruppe in 6-Stellung von Monogalactosyldiglycerid acyliert wird, findet in homogenisierten Spinatblättern statt und wird durch ein lösliches Enzym katalysiert<sup>8,12</sup>.

Aus der Tatsache, daß auch ausgewaschene Partikel ohne Zusatz von Kofaktoren Steringlycosid acylieren können, geht hervor, daß sowohl das Enzym als auch der Acyl-Donor an die Partikelstrukturen gebunden sein müssen. Wir sind zur Zeit damit beschäftigt, die Herkunft der auf das Steringlycosid übertragenen Acyl-Gruppe näher zu studieren.

Die Arbeiten wurden mit Unterstützung des Schweizerischen Nationalfonds durchgeführt.

W. EICHENBERGER und E. C. GROB

Institut für organische Chemie der Universität Bern

<sup>12</sup> E. HEINZ und A. P. TULLOCH, *Z. physiol. Chem.* 350 (1969) 493.