

Zum Vorkommen von Thiothreonin im Pflanzenmaterial

Thiothreonin (α -Amino- β -Thio-Buttersäure) konnte bis heute in verschiedenen Organismen gefunden werden: Im Antibiotikum Subtilin kommt es als S-L-2-Amino-2-Carboxyäthyl-Derivat vor¹. Bei der Erforschung der Biosynthese des β -Laktamrings von Penicillin stellte sich heraus, dass L-Cystin als Vorstufe dienen kann, während das leicht veränderte Derivat β -Methyl-Cystin (oxidierte Form von Thiothreonin) die Bildung von Penicillin nicht auslösen kann². Auch wurde Thiothreonin als Zwischenstufe der Umwandlung von Methionin zu Cystin postuliert³.

Bei Arbeiten über die Schwefelwasserstoffaufnahme durch die Primärblätter von Bohnenkeimlingen wurden viele nicht identifizierbare Schwefelverbindungen in der Aminosäurenfraktion (basisches Eluat eines sauren Kationenaustauschers) gefunden^{4,5}.

Die meisten Reaktionen des Aminosäurenstoffwechsels benötigen Pyridoxalphosphat als Co-Enzym. Der Mechanismus der Pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktionen wurde in den Arbeiten von METZLER, IKAWA und SNELL⁶ und BRAUNSTEIN⁷ studiert. FLAVIN⁸ hat vor allem die Eliminations- und «Replacement»-Reaktionen untersucht, zu denen auch die Transsulfurationsreaktionen zählen. Mit $H_2^{18}O$ -Experimenten stellt er fest, dass bei der Biosynthese von Threonin der Sauerstoff in der funktionellen Hydroxygruppe aus der wässrigen Lösung stammt⁹. GRANT und VOELKERT¹⁰ stellten durch Isotopenkompetition fest, dass auch in Erbsenkeimlingen Homoserin die Vorstufe von Threonin ist. Nach BRÄNDLE und MARTI¹¹ kann H_2S teilweise anstelle von H_2O die bei der Carboxylierung von Ribulosediphosphat entstehende instabile Zwischenverbindung des Calvinzyklus spalten.

Nach den Versuchen von FLAVIN und KONO⁹ über die Biosynthese von Threonin erscheint es nicht ausgeschlossen, dass eine Anlagerung von H_2S anstelle von H_2O an die biologische, aktive Zwischenverbindung, das Enamin des Pyridoxalphosphat-Homoserin-Komplexes, möglich ist und auf diese Weise Thiothreonin synthetisiert wird. In der vorliegenden Arbeit wird deshalb geprüft, ob nach Fütterung von radioaktivem Schwefelwasserstoff in Erbsenkeimlingen die Bildung von neuen Thioverbindungen ausgelöst wird.

Die chemische Synthese von Thiothreonin zur Co-Chromatographie wurde nach der Methode von ARNSTEIN¹² durchgeführt, die Vorsynthese von Carboxy-Methyl-Dithiobenzoat nach den «Organic Syntheses»¹³. Das Produkt wurde auf der Dowex-Säule gereinigt, die Aminosäuren-, Schwefel¹⁴ und Thiol¹⁵-positiven Fraktionen gesammelt und eingeengt. NMR- und Massenspektren sowie quantitative Elementaranalysen zeigten,

dass Thiothreonin synthetisiert wurde (Verunreinigung durch anorganisches Material 1,3–2%)¹⁶.

10 Tage alte Erbsenkeimlinge wurden wie früher⁴ in einer Küvette mit radioaktivem Schwefelwasserstoff begast. Nach 1–7 stündiger Inkubation wurden die Pflanzen mit flüssiger Luft abgetötet, das synthetisierte Thiothreonin hinzugegeben (Isotopenverdünnungsmethode), mit Methanol-Wasser extrahiert und die vereinigten Lösungen nach Einengen mit Perameisensäure¹⁷ oxidiert, um definierte Abbauprodukte zu erhalten. Kleinste Mengen wurden mittels Dünnschichtchromatographie mit den Laufmittelsystemen von MARGOLIS und MANDL^{18,19} und mit denen von VON ARX und NEHER²⁰ im multidimensionalen Verfahren aufgetrennt. Die Aktivität von Thiothreonin und von je 3 Schichtproben als «Background»-kontrollen wurden mit dem Scintillationszähler bestimmt (Tabelle).

Die Werte zeigen, dass eine markierte Verbindung sich chromatographisch gleich verhält wie das synthetisierte Thiothreonin. Der kleinen, in vivo gebildeten Mengen wegen lassen sich weitere Methoden zur Identifizierung kaum anwenden. Zur Überprüfung des vorgeschlagenen Biosyntheseweges von Thiothronin werden deshalb in vitro Versuche mit Pyridoxalphosphat und einem Metall als Katalysator²¹ und mit Enzympräparaten durchgeführt²².

Summary. In extracts of $H_2^{35}S$ gased pea seedlings, a radioactive substance has been revealed by thin layer chromatography which showed the same chromatographic properties as thiothreonine.

J. SCHNYDER und K. H. ERISMANN

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Bern,
Altenbergrain 21, CH-3013 Bern (Schweiz),
21. September 1972.*

- ¹ G. ALDERTON, J. Am. chem. Soc. 75, 2391 (1953).
- ² H. R. V. ARNSTEIN und P. T. GRANT, Biochem. J. 57, 360 (1954).
- ³ H. TARVER und C. L. A. SCHMIDT, J. biol. Chem. 130, 67 (1939).
- ⁴ R. BRÄNDLE, U. FELLER und J. SCHNYDER, Verh. schweiz. naturf. Ges. 68, 122 (1968).
- ⁵ R. BRÄNDLE und J. SCHNYDER, Experientia 26, 1395 (1970).
- ⁶ D. E. METZLER, M. IKAWA und E. SNELL, J. Am. chem. Soc. 76, 648 (1954).
- ⁷ A. E. BRAUNSTEIN, in *The Enzymes* (Eds. P. D. BOYER, H. LARDY und K. MYRBACH; Academic Press Inc., New York 1960), vol. 2, p. 113.
- ⁸ M. FLAVIN, International Union of Biochemistry Conference on Pyridoxal Catalysis, Symposium volume 30, 377 (1962).
- ⁹ M. FLAVIN und T. KONO, J. biol. Chem. 235, 1109 (1960).
- ¹⁰ D. R. GRANT und E. VOELKERT, Phytochemistry 11, 911 (1972).
- ¹¹ R. BRÄNDLE und J. MARTI, Experientia 27, 513 (1971).
- ¹² H. R. V. ARNSTEIN, Biochem. J. 68, 333 (1958).
- ¹³ *Organic Syntheses* (Wiley and Sons, Inc., New York, London 1962), vol. 42, p. 100.
- ¹⁴ L. R. NJAA, Acta chem. scand. 17, 1163 (1963).
- ¹⁵ C. B. GLASER, H. MAEDA und J. MEIENHOFER, J. Chromat. 50, 151 (1970).
- ¹⁶ Den Herren Privatdozenten Dr. M. NEUENSCHWANDER und Dr. U. SCHLUNEGGER und Herrn Dr. W. HUNKELER (Universität Bern) sei für die Mithilfe gedankt.
- ¹⁷ S. MOORE, J. biol. Chem. 238, 235 (1963).
- ¹⁸ D. MARGOLIS und R. MANDL, Contr. Boyce-Thompson Inst. Pl. Res. 19, 509 (1958).
- ¹⁹ Das Verfahren wurde von PC auf DC erweitert.
- ²⁰ E. VON ARX und R. NEHER, J. Chromat. 12, 329 (1963).
- ²¹ O. RATISALOVANINA, F. CHAPEVILLE und P. FROMAGEOT, Biochim. biophys. Acta 49, 322 (1961).
- ²² Die Arbeit wurde durch den Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

Aktivität des oxidierten Thiothreonin und der drei Schichtproben

Extraktmenge	Nach MARGOLIS und MANDL ¹⁸		Nach VON ARX und NEHER ²⁰	
	3 μ l	7 μ l	3 μ l	7 μ l
Thiothreonin	479	1217	386	892
Schichtprobe 1	187	267	221	218
Schichtprobe 2	200	279	276	265
Schichtprobe 3	231	214	221	279

Angegeben in counts/10 min. Zählausbeute: Schichtwerte 75–77%, Thiothreonin < 74 %