

## Subcellular Distribution of *p*-Hydroxybenzoic Acid Formation in Castor Bean Endosperm

HELMUT KINDL and HELMUT RUIS

Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

(Z. Naturforsch. 26 b, 1379—1380 [1971]; received August 2, 1971, revised September 23, 1971)

Glyoxysomes, L-Tyrosine, *p*-Coumaric Acid, Acetic Acid

In higher plants C<sub>6</sub>—C<sub>1</sub> compounds, e. g. *p*-hydroxybenzoic acid, are formed from C<sub>6</sub>—C<sub>3</sub> units<sup>1</sup>. The metabolism of L-phenylalanine and L-tyrosine in isolated glyoxysomes from castor bean endosperm has, however, not been described until recently<sup>2</sup>. This paper presents further details of the conversion of L-tyrosine to *p*-hydroxybenzoic acid in that tissue and especially of the ability of various subcellular fractions to catalyze this conversion. The paper shows that at least the major part of the chain shortening reaction from *p*-coumaric acid to *p*-hydroxybenzoic acid takes place in the glyoxysomes.

Subcellular fraction	<i>p</i> -Coumaric acid	<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid
Mitochondria	7,500	45,000
Proplastids	7,500	60,000
Glyoxysomes	36,000	180,000
Glyoxysomes (— CoA)	30,000	195,000
10,000 g supernatant	1,400,000	<9,000

Table 1. Formation of *p*-coumaric acid and *p*-hydroxybenzoic acid from L-tyrosine. Subcellular fractions were isolated from the endosperm of surface sterilized castor beans (*Ricinus communis* L.) (30 g), which were germinated for 5 days at 25 °C, as described previously<sup>3</sup>. The incubation mixture contained, in a total volume of 300 μl: 64 nmoles (U-<sup>14</sup>C) L-tyrosine (30 μCi), 1 μmole CoA, 3 μmoles ATP, and protein from the various fractions, in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5. Incubations were carried out at 25 °C for 1.5 hours. After addition of 5 mg *p*-coumaric acid and *p*-hydroxybenzoic acid products were first purified by preparative thin-layer chromatography (benzene-acetic acid, 4:1, by vol.). This was followed by paper chromatography in benzene-acetic acid-water (4:2:1, by vol.), and *n*-butanol-ammonia-ethanol-benzene (5:3:2:1, by vol.). The compounds were further purified by recrystallization to constant specific activity<sup>2</sup>. Yields of compounds are given as dpm.

Table 1 presents the results of experiments with fractions obtained by differential and isopycnic sucrose gradient centrifugations. It shows that both *p*-coumaric acid and *p*-hydroxybenzoic acid can be formed from

L-tyrosine in the glyoxysomes. The distribution of L-tyrosine ammonia-lyase, the enzyme which is responsible for the first reaction, in subcellular fractions obtained from castor bean endosperm was studied previously<sup>3</sup>. The Table shows that the major part of the ammonia-lyase activity is found in the soluble fraction. Assuming, however, that the *p*-hydroxybenzoic acid formed during the incubation is derived from *p*-coumaric acid, we may calculate that 19% of the total L-tyrosine ammonia-lyase is particle-bound. 64% of this particle-bound activity is located in the glyoxysomes. The chain shortening reaction, the second step in the reaction sequence, is, above all, catalyzed by enzymes in particulate fractions. There we find 97% of this enzyme activity, 62% of which are located in the glyoxysomes. Comparatively high activities are also found in the mitochondria and the proplastids. It is not clear yet whether such activity can actually be attributed to these organelles, as it might also be caused by the presence of damaged glyoxysomes in these fractions. *p*-Hydroxybenzoic acid formation was not found to be CoA-dependent. This result does not rule out the involvement of CoA in the reaction sequence, as the organelles may contain sufficient amounts of CoA. Recently, COOPER and BEEVERS<sup>4</sup> observed that fatty acid β-oxidation by isolated glyoxysomes was only weakly stimulated by CoA. RANGANATHAN and RAMASARMA<sup>5</sup> could not detect any effect of CoA on the conversion of *p*-coumaric acid to *p*-hydroxybenzoic acid catalyzed by rat liver mitochondria.

On the basis of experiments *in vivo*<sup>6</sup>, acetic acid was expected to be the second reaction product. Therefore after the incubation 500 mg acetic acid were added as a carrier to an equivalent of the incubation mixture containing glyoxysomes. The acetic acid was then characterized and counted for radioactivity as the *p*-bromophenacyl derivative. It was found that approximately equimolar amounts of acetic acid and *p*-hydroxybenzoic acid had been formed.

In a further experiment 3.7 μmoles (3,5-<sup>3</sup>H)*p*-coumaric acid (30 μCi) in 2.5 ml buffer were incubated with particles of a 10 000 g fraction obtained from 8 g of endosperm by differential centrifugation; conditions were analogous to those given in Table 1. Identical amounts of *p*-hydroxybenzoic acid (390 000 dpm, 22 nmoles) were formed with and without addition of CoA.

This paper shows that *p*-hydroxybenzoic acid can be formed from L-tyrosine via *p*-coumaric acid by isolated glyoxysomes. The chain-shortening reaction, which takes place with the formation of acetic acid, was mainly catalyzed by these organelles. Although it has

Requests for reprints should be sent to Dr. H. RUIS, Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien, Währingerstraße 38, A-1090 Wien, Austria.

<sup>1</sup> M. H. ZENK, in: G. BILLET, Biosynthesis of Aromatic Compounds, p. 45, Pergamon Press, Oxford 1966.

<sup>2</sup> H. KINDL and H. RUIS, Phytochem., in the press.

<sup>3</sup> H. RUIS and H. KINDL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351, 1425 [1970].

<sup>4</sup> T. G. COOPER and H. BEEVERS, J. biol. Chemistry 244, 3514 [1969].

<sup>5</sup> S. RANGANATHAN and T. RAMASARMA, Biochem. J. 122, 487 [1971].

<sup>6</sup> K. O. VOLLMER, H. J. REISENER, and H. GRISEBACH, Biochem. biophys. Res. Commun. 21, 221 [1965].

not yet been demonstrated that CoA is required for the reaction, it seems quite probable that the process is analogous to the  $\beta$ -oxidation of fatty acids. In the endosperm of germinating castor beans this metabolic pathway is exclusively located in the glyoxysomes<sup>4</sup>. It

seems remarkable that these two reaction sequences take place in the same subcellular compartment.

Financial support of this work by the Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Vienna, is gratefully acknowledged.

## Isolierung von Oxindol aus Urin von Kindern

Isolation of Oxindole from Children's Urine

W. VOELTLER, G. JUNG, E. BREITMAIER und W. KÖNIG  
Chemisches Institut der Universität Tübingen

D. GUPTA und G. BREITMAIER

Abteilung für Diagnostische Endokrinologie der Universitäts-  
Kinderklinik Tübingen

(Z. Naturforsch. 26 b, 1380—1381 [1971]; eingegangen am 19. August 1971)

Bei der papierchromatographischen Trennung von Steroidgemischen aus Kinderurin ist seit einiger Zeit mehreren Autoren<sup>1-5</sup> eine Substanz aufgefallen, die im modifizierten Bush-B-3-System<sup>6</sup> ähnliche  $R_f$ -Werte wie  $11\beta$ -Hydroxyandrosteron zeigt. Bei einer Reihe der in der Steroidanalytik üblichen Mikroreaktionen verhält sich die Verbindung wie ein Steroid.

Interessant ist außerdem die Beobachtung<sup>1,2</sup>, daß diese Substanz bei bestimmten Krankheiten — Progeria, Lipodystrophie, leucinabhängige Hypoglykämie — von Kindern in erhöhtem Maße ausgeschieden wird.

Die Strukturklärung ist uns mittels der Lichtabsorptions(UV)-, Infrarot(IR)- und Massen-Spektrometrie sowie des Circulardichroismus (CD) gelungen. Dazu standen etwa 0,5 mg Substanz zur Verfügung,

die aus 19 l Urin isoliert und mehrfach papierchromatographisch gereinigt worden waren.

Das Lichtabsorptionsspektrum der Substanz in Äthanol zeigt zwei Maxima bei 204 nm und 249 nm. Eine Schulter liegt bei 280 nm. Zur Bestimmung der molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten reichte das vorhandene Material nicht aus. Zum Nachweis optisch aktiver Zentren wird von derselben äthanolischen Lösung ein CD-Spektrum aufgenommen. Im Bereich der Absorptionsmaxima beträgt die Extinktion ungefähr 1,1. Von 350 bis 180 nm können keinerlei COTTON-Effekte festgestellt werden. Eine Steroidstruktur ist somit auszuschließen.

Das IR-Spektrum in Tetrachlorkohlenstoff zeigt eine konzentrationsabhängige Bande bei  $3450\text{ cm}^{-1}$ , die der freien NH-Valenzschwingung entspricht. Ebenfalls konzentrationsabhängig sind zwei Banden bei  $3200\text{ cm}^{-1}$  und  $3100\text{ cm}^{-1}$ , die auf Wasserstoffbrücken-Bindungen schließen lassen<sup>7</sup> sowie eine Carbonyl-Absorptionsbande bei  $1710\text{ cm}^{-1}$  mit Schultern bei  $1730$  und  $1745\text{ cm}^{-1}$ . Schwache Banden bei  $1945$  und  $1885\text{ cm}^{-1}$  könnten durch Ober- und Kombinationsschwingungen eines Aromatenrestes verursacht werden. Ein intensiver Peak bei  $1620\text{ cm}^{-1}$  und eine gut getrennte Bande bei  $712\text{ cm}^{-1}$  lassen ebenfalls auf einen Arylrest schließen. Die Bande bei  $672\text{ cm}^{-1}$  ist für Lactame<sup>8</sup> charakteristisch.

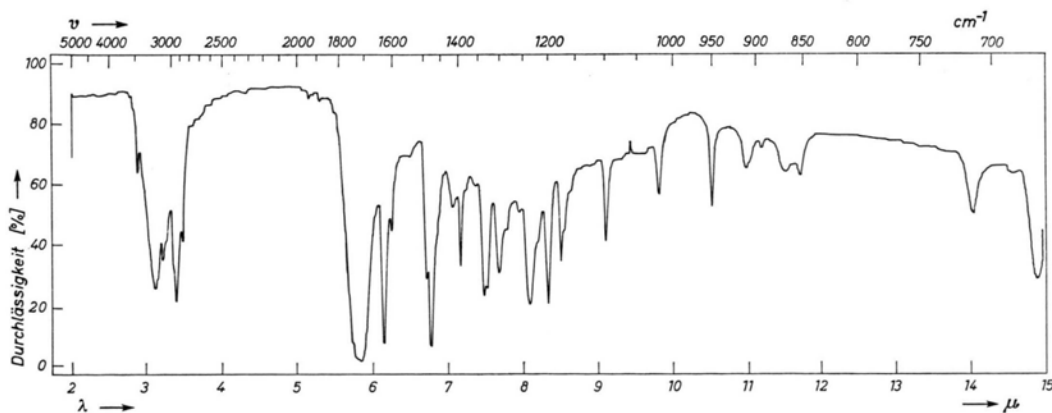


Abb. 1. IR-Spektrum des aus Urin isolierten Oxindols.

Sonderdruckanforderungen an Univ.-Doz. Dr. WOLFGANG VOELTLER, Chem. Institut der Univ., D-7400 Tübingen, Wilhelmstr. 33.

<sup>1</sup> D. GUPTA u. J. M. TANNER, Nature [London] 203, 187 [1964].

<sup>2</sup> D. GUPTA, Dissertation, Faculty of Science, University of London, London 1965.

<sup>3</sup> D. GUPTA u. J. GOODWIN, Steroids 8, 195 [1966].

<sup>4</sup> J. M. TANNER u. D. GUPTA, J. Endocrinology 41, 139 [1968].

<sup>5</sup> D. M. CATHRO, K. BIRCHALL, F. L. MITCHELL u. C. C. FORSYTH, J. Endocrinology 27, 53 [1963].

<sup>6</sup> I. E. BUSH, Biochem. J. 50, 370 [1952].

<sup>7</sup> A. H. BECKETT, R. W. DAISLEY u. J. WALKER, Tetrahedron [London] 24, 6093 [1968].

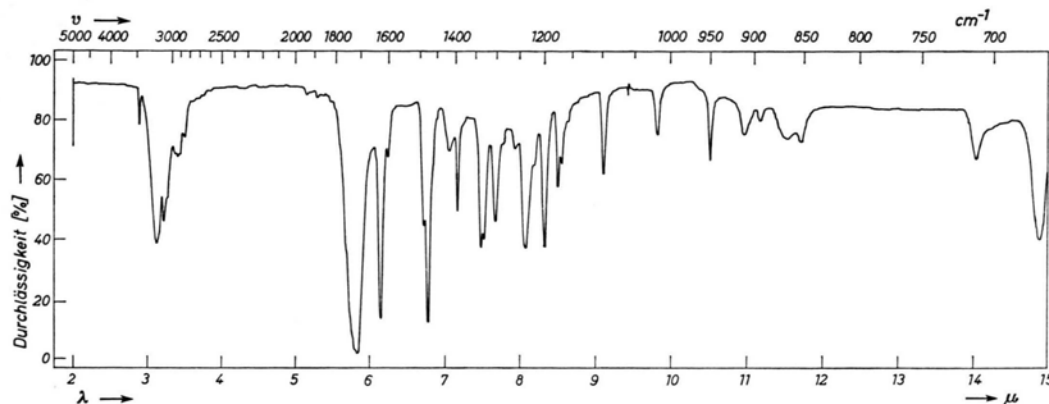


Abb. 2. IR-Spektrum des synthetischen Oxindols.

Das Massenspektrum zeigt folgende Hauptfragmentierungen:

$m/e$	Rel. Int. [%]	Interpretation
133	100	$M^{\oplus}$
132	6	$M-1$ —H
105	62	$M-28$ —CO
104	95	$M-29$ —(H+CO)
78	53	$M-55$ —(CO+HCN)
77	26	$M-56$ —(CO+HCN+H)
52	20	$M-81$ —(CO+HCN+C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )
51	25	$M-82$ —(CO+HCN+C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> +H)

Metastabile Peaks liegen bei:

$m/e$	Interpretation
103	105 → 104 $m'-1$ —H
83	133 → 105 $m'-28$ —CO
58,5	104 → 78 $m'-26$ —CN, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
57	104 → 77 $m'-27$ —HCN
33,8	77 → 51 $m'-26$ —C <sub>2</sub> H <sub>2</sub>

Die intensive Spitze bei  $m/e$  77 und der durch einen metastabilen Peak belegte Verlust von Äthylen des Fragments  $m/e$  77 sind weitere Hinweise für eine Arylstruktur. Der Molekülpeak zeigt die relative Intensität 100; daraus folgt das Molekulargewicht der Substanz zu 133.

Aufgrund der Ergebnisse dieser physikalisch-chemischen Untersuchungen vermuteten wir, daß der aus Urin isolierte Naturstoff mit Oxindol identisch ist. Von synthetischem Oxindol wurden unter denselben Bedingungen UV-, IR- und Massen-Spektren aufgenommen, und es wurde das Verhalten bei der papierchromatographischen Trennung von Steroidgemischen<sup>1,2</sup> untersucht. Das Syntheseprodukt zeigt hierbei dieselben Eigenschaften und liefert dieselben Spektren wie die aus Urin isolierte Substanz.

In der Literatur gibt es bis jetzt noch keinen Hinweis für das Vorkommen von Oxindol im Humanurin. Die Entstehung von Oxindol im menschlichen Organismus und seine mögliche physiologische Bedeutung sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

<sup>8</sup> J. E. KATON, W. R. FAIRHELLER, JR., u. J. V. PUSTINGER, JR., *Analytic. Chem.* **36**, 2126 [1964].

<sup>9</sup> D. GUPTA, *Nature* [London] **200**, 574 [1963].

### Experimenteller Teil

#### A) Isolierung von Oxindol

Da die hier als Oxindol identifizierte Substanz bei der Untersuchung von Urin präpubertärer Kinder auf Steroidchromatogrammen auffiel, wurde die Isolierung nach GUPTA<sup>2-4</sup> durchgeführt. Ausgangsmaterial waren 19 l 24-Stdn.-Urin. Die Anreicherung der Steroidkonjugate und daher auch des Oxindolkonjugates erfolgte entweder mit Sephadex<sup>3</sup> oder durch Extraktion mit Äther-Isopropanol aus mit Ammoniumsulfat gesättigtem Urin bei pH 2. Nach enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucuronidase bei pH 4,3 wurden die freigesetzten Substanzen mit Äther-Äthylacetat extrahiert und durch absteigende Papierchromatographie auf Whatman Nr. 3MM getrennt. Nach Elution der entsprechenden Zone konnte Oxindol entweder durch absteigende Papierchromatographie auf Whatman Nr. 2 in einem langsameren Fließmittelsystem oder durch Gelfiltration<sup>9</sup> an Sephadex G 50 bzw. Sephadex LH 20 gereinigt werden. Charakteristisch für Oxindol war sein Verhalten auf zweidimensionalen Papierchromatogrammen, seine Absorption im UV-Licht (254 nm) und seine Blaufärbung mit Zimmermanns Reagens, das aus gleichen Teilen einer 2-proz. Lösung von *m*-Dinitrobenzol in absolutem Äthanol und einer absolut-äthanolischen 2,5 N Kaliumhydroxid-Lösung besteht.

#### B) Physikalisch-chemische Methoden

Äthanolische Lösungen dienen zur Messung der UV-Spektren mit einem Cary 15-UV-Spektrometer und der CD-Spektren mit einem Dichrograph CD 185 der Fa. Roussel-Jouan. Die IR-Spektren der in Tetrachlorkohlenstoff gelösten Substanzen wurden mit einem Perkin-Elmer-021-IR-Spektrometer aufgenommen. Die Massenspektren wurden mit einem LKB 9000 Gaschromatograph-Mass-Spektrometer der Fa. LK-Produkte AB Stockholm gemessen. Die Proben wurden durch das direkte Einlaßsystem eingeführt. Die Ionisierungsenergie betrug 70 eV.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.