

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 7. Mitt.:

Der Mechanismus der Umwandlung von meso-Inosit in Methyläther des L-Inosits in Blättchen von *Artemisia vulgaris* und *Artemisia dracunculus*¹

Von

R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 30. Juni 1964)

Zum Studium der Biosynthese von L-Quebrachit in *Artemisia vulgaris* und L-Pinit in *Artemisia dracunculus* wurden Einbauversuche mit markiertem L-Inosit an Blättchen dieser Pflanzen vorgenommen. L-Inosit wird in beide Methyläther mit guter radiochemischer Ausbeute eingebaut. Im Gegensatz dazu wird Sequoyit (der 5-Methyläther des meso-Inosits) nicht in L-Pinit eingebaut. Es wird daraus geschlossen, daß bei der Umwandlung von meso-Inosit in die beiden Methyläther die Epimerisierung der Primärschritt ist, welchem die Methylierung an den entsprechenden Positionen folgt. Die Verhältnisse sind hier also grundlegend verschieden von denjenigen, die bei der Biosynthese des D-Pinit in *Trifolium incarnatum* gefunden wurden.

The biosynthesis of L-quebrachitol and of L-pinitol was studied in leaflets of *Artemisia vulgaris* and of *Artemisia dracunculus*, respectively. Isotopically labelled L-inositol was found to be incorporated in good yield into both methyl ethers. Sequoyitol (the 5-methyl ether of meso-inositol), on the other hand, is not incorporated into L-pinitol. From this, it is concluded that in the conversion of meso-inositol into either of the two methyl ethers an epimerisation is the primary step, which is then followed by a methylation in the respective positions. Thus, the situation here is fundamentally different from those previously found in studies of the biosynthesis of D-pinitol in *Trifolium incarnatum*.

¹ 6. Mitt.: R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. (im Druck).

In der 3. Mitt. dieser Reihe² berichteten wir, daß meso-Inosit in Blättchen von *Artemisia vulgaris* und *A. dracuncululus* mit guter Ausbeute in L-Inosit und dessen Methyläther L-Quebrachit bzw. L-Pinit eingebaut wird. Es wurde daraus geschlossen, daß meso-Inosit oder eine aus ihm leicht entstehende Verbindung ein Zwischenprodukt beim Aufbau der genannten Cyclite ist.

Die Ergebnisse ließen aber noch die Frage offen, auf welchem Weg die Umwandlung des meso-Inosits in die beiden Methyläther des L-Inosits vorsichgeht. Die von uns bei einem analogen Problem, der Biosynthese des D-Pinit (des 5-Methyläthers des D-Inosits), erhobenen Befunde^{3, 4} ließen eher erwarten, daß auch bei der Bildung der Methyläther des L-Inosits der erste Schritt die Methylierung von meso-Inosit zu (—)-Bornesit bzw. Sequoyit sei, auf den dann Epimerisierung der OH-Gruppe in der 1-Stellung des methylierten Inositmoleküls folgt. Als zweite Möglichkeit mußte natürlich auch in Betracht gezogen werden, daß zuerst die Epimerisierung erfolgt, die dann von der Methylierung in den entsprechenden Positionen des L-Inosits gefolgt sein müßte.

Die hier berichteten Versuche, die zur Klärung dieser Probleme unternommen wurden, zeigen eindeutig, daß die Bildung der Methyläther des L-Inosits nach dem zweiten genannten Weg erfolgt, d. h. daß L-Inosit ein Zwischenprodukt bei der Entstehung seiner Methyläther ist.

Experimenteller Teil

1. Herstellung von L-Quebrachit-(G)-¹⁴C, L-Inosit-(G)-¹⁴C und Sequoyit-(G)-¹⁴C durch Photosynthese

Es wurde weitgehend analog zu den von uns bereits beschriebenen Methoden zur Herstellung von radioaktiv markiertem meso-Inosit^{3, 5} und von D-Pinit³ vorgegangen. Verwendet wurde der untere Teil eines Blattes von *Artemisia vulgaris*, das an einer Stelle, wo durch bis zum Mittelnerv reichende Einkerbungen zwei kleine Fiederblättchen entstanden waren, so zerschnitten wurde, daß man an dem Fiederblättchen ein 1 cm langes Stück des Mittelnervs beließ. Während des Assimilationsversuchs tauchte dieses Stück des Mittelnervs in Wasser.

Die Isolierung der Cyclite erfolgte nach dem bereits beschriebenen Verfahren², nur mußte für die zu isolierenden kleineren Mengen der Maßstab etwas verkleinert werden. Vor der Fällung mit basischem Bleiacetat wurden 10 mg inaktive reine Cyclitfraktion aus *Artemisia vulgaris* hinzugegeben.

² R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 541 (1964).

³ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **337**, 277 (1964).

⁴ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 1311 (1964).

⁵ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **335**, 180 (1964).

Bei manchen Versuchen enthielt die nach Durchlaufen durch die Austauschersäulen erhaltene Neutralfraktion so große Mengen Glucose, daß die Isolierung der Cyclite erschwert war. In diesem Falle wurde die Glucose durch Verwendung eines pilzlichen Enzympräparats, das Glucose-Oxydase (EC 1.1.3.4) und Katalase (EC 1.11.1.6) enthielt, zu Gluconsäure oxydiert und darauf die Lösung wieder mit Hilfe der Austauschersäulen ionenfrei gemacht. Der nach Einengen der neutralen Lösung erhaltene Rückstand wurde, wie bereits beschrieben², papierchromatographisch aufgetrennt. Ein 5 cm breiter Streifen des Chromatogramms wurde nach dem Trocknen im Chromatogramm-„scanner“ gemessen. Die einzelnen Zonen, die durch Testflecke kenntlich gemacht worden waren, wurden eluiert. Die zur Trockene eingedampften und mit inaktivem Material verdünnten Rückstände der Eluate wurden anschließend durch Sublimation im liegenden Rohr bei 170° (L-Quebrachit) bzw. 220° (L-Inosit, meso-Inosit) und 0,001 Torr gereinigt.

Im Folgenden sind die Daten eines derartigen Photosyntheseversuchs angegeben: Eingesetzte Aktivität (als $^{14}\text{CO}_2$) 1,36 mC, davon assimiliert 98,5%; isoliert wurden in L-Quebrachit 6300000 dpm, das sind 0,209% der aufgenommenen Aktivität, in L-Inosit 408000 dpm (0,013%) und in meso-Inosit 1510000 dpm (0,05%).

Da für die Einbauversuche vor allem größere Aktivitäten von markiertem -Inosit benötigt wurden, stellten wir diesen durch Entmethylierung des photosynthetisch erhaltenen L-Quebrachit-(G)- ^{14}C her; dabei wurde analog zur Entmethylierung des D-Pinitis³ vorgegangen, d. h. 20 Stdn. lang mit 25proz. HCl zum Sieden erhitzt.

Der für die Einbauversuche benötigte Sequoyit wurde im Prinzip nach einer bereits beschriebenen Methode³ hergestellt.

In der zitierten Arbeit wird wohl über einen Photosyntheseversuch berichtet, in dem kein markierter Sequoyit erhalten wurde. In späteren analogen Experimenten konnte aber regelmäßig ein Einbau der Aktivität in Sequoyit beobachtet werden. Die radiochemische Ausbeute schwankte allerdings sehr; das beste Resultat war 0,017%.

2. Infusion der Vorstufen in die Blättchen von *Artemisia vulgaris* und *A. dracuncululus*, Isolierung der Cyclitfraktionen daraus und Aufarbeitung auf die einzelnen Cyclite

Sowohl die Infusion als auch die Isolierung der Cyclitfraktionen und die Auftrennung in ihre Bestandteile wurden nach den bereits beschriebenen Verfahren² vorgenommen.

Ergebnisse

Wie in Tab. 1 gezeigt wird, ist *Artemisia vulgaris* imstande, L-Inosit in L-Quebrachit überzuführen. Die beiden tabellierten Versuche, die unter sonst gleichartigen Bedingungen durchgeführt wurden, könnten annehmen lassen, daß die Fähigkeit der Pflanze zur Methylierung von L-Inosit im Herbst geringer ist als im Frühjahr. Diese Unterschiede können aber auch durch andere Faktoren (Witterung, Auswahl und Standort der Pflanzen) bedingt sein.

Zwei Versuche, bei welchen L-Quebrachit in die Blättchen von *A. vulgaris* infundiert wurde, ergaben, daß diese Substanz nicht verändert und insbesondere nicht zu L-Inosit entmethyliert wird.

Tabelle 1. Versuche über den Einbau von L-Inosit-(G)-¹⁴C in Blättchen von *Artemisia vulgaris*

Versuch Nr.	Infundierter L-Inosit		Isolierter L-Quebrachit			Bemerkungen
	Gesamtaktivität, dpm	spez. Aktivität, dpm/mg	Gesamtaktivität, dpm	spez. Aktivität, dpm/mg	Radiochem. Ausb.	
1	213000	106500	16460	2300	7,7%	Versuch wurde im Herbst durchgeführt. Infusionsdauer 2 Wochen. 24,4% des eingesetzten L-Inosits wurden unverändert wiedergewonnen.
2	87400	16800	10800	1700	12,4%	Versuch wurde im Frühjahr durchgeführt. Infusionsdauer 1 Woche. 50,7% des eingesetzten L-Inosits wurden unverändert wiedergewonnen.

Tabelle 2. Versuche über den Einbau von L-Inosit-(G)-¹⁴C und Sequoyit-(G)-¹⁴C in Blättchen von *Artemisia dracunculus*; Infusionsdauer 1 Woche

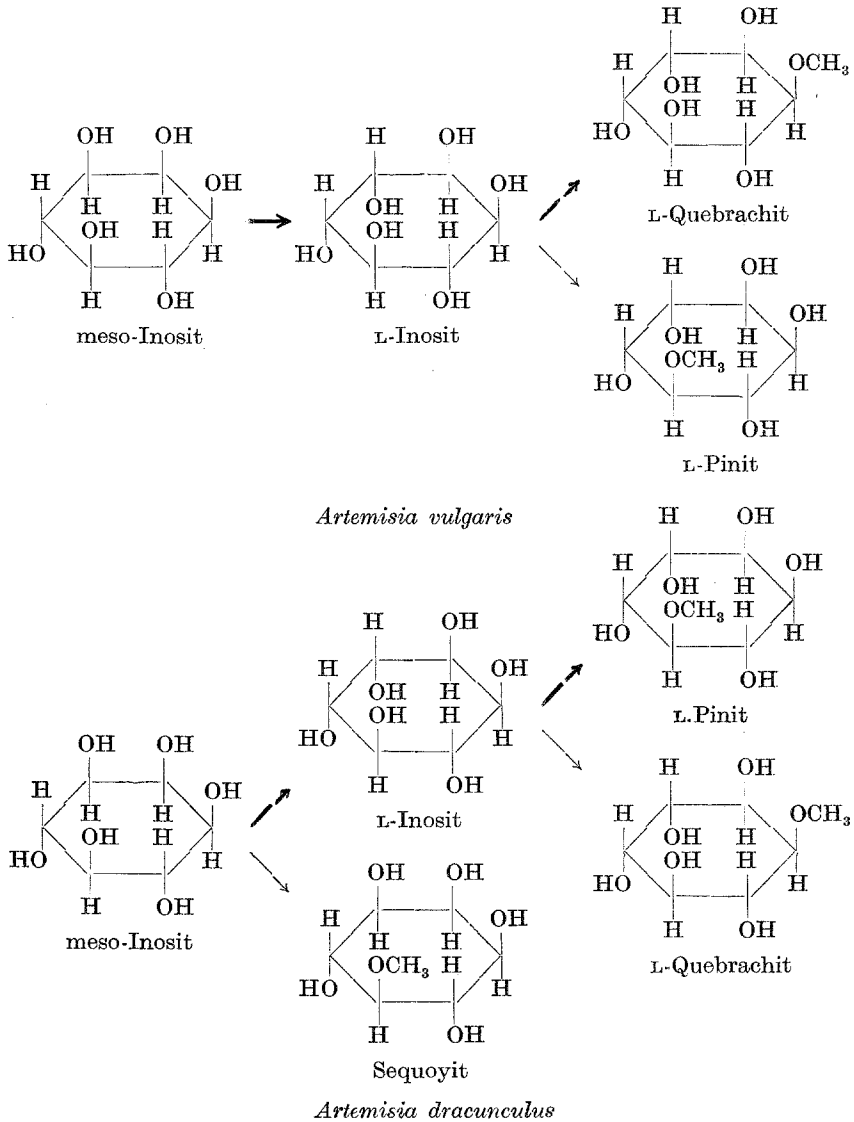
Infundierte Substanz	Gesamtaktivität, dpm	spez. Aktivität, dpm/mg	Isolierter L-Pinit			Bemerkungen
			Gesamtaktivität, dpm	spez. Aktivität dpm/mg	Radiochem. Ausb.	
L-Inosit	87400	16800	7050	3200	8,04%	Fast 60% des eingesetzten L-Inosits wurden unverändert wiedergewonnen; kein Einbau in Sequoyit und meso-Inosit.
Sequoyit	1320000	1320000	< 600	—	< 0,05%	

Die Ergebnisse der Einbauversuche mit den beiden möglichen Vorstufen von L-Pinit in *Artemisia dracunculus*, L-Inosit und Sequoyit, sind in Tab. 2 dargestellt. Es zeigt sich, daß L-Inosit mit guter radiochemischer Ausbeute in L-Pinit eingebaut wird, während bei Sequoyit kein meßbarer Einbau beobachtet wurde.

Diskussion

Die vorgelegten Ergebnisse lassen zusammen mit den seinerzeit berichteten Resultaten der Einbauversuche mit meso-Inosit in den beiden *Artemisia*-Arten² den Schluß zu, daß diese Pflanzen über einen Mechanismus verfügen, der die Epimerisierung von meso-Inosit zu L-Inosit bewirkt. Als zweiter Schritt erfolgt die Methylierung, die in *Artemisia*

vulgaris zu L-Quebrachit und in *A. dracunculus* zu L-Pinit führt. Es muß hier allerdings festgestellt werden, daß wir in *A. vulgaris* immer auch kleinere Mengen L-Pinit und entsprechend in *A. dracunculus* immer etwas L-Quebrachit gefunden haben.



Schema 1: Die biogenetischen Beziehungen der Cyclite in *Artemisia vulgaris* und *A. dracunculus*; die Wege zu den Hauptcycliten in den beiden Pflanzen sind mit **dicken** Pfeilen bezeichnet.

Das für die Epimerisierung verantwortliche Enzym oder Enzym-system scheint beiden Pflanzen, die ja der gleichen Familie angehören, gemeinsam zu sein. Die Frage, ob die beiden Pflanzen eine Methyltransferase besitzen, die je nach den speziellen Bedingungen mehr L-Quebrachit oder mehr L-Pinit erzeugt, oder ob zwei spezifische Methyltransferasen existieren, von denen die eine die 3-Stellung und die andere die 5-Stellung des L-Inosits methyliert und welche in beiden Pflanzen in verschiedenen Konzentrationen vorliegen, wird erst durch enzymologische Studien geklärt werden können. Die Verhältnisse werden noch dadurch kompliziert, daß wir in *Artemisia dracunculus* immer beträchtliche Mengen von Sequoyit vorgefunden haben, was darauf schließen läßt, daß eine Methyltransferase auch die 5-Stellung von meso-Inosit methylieren kann.

Die biogenetischen Beziehungen zwischen den Cycliten der beiden Pflanzen sind im Schema dargestellt. Die Verhältnisse stehen in einem gewissen Gegensatz zu denjenigen, die wir bei der Biosynthese von D-Pinit, dem einzigen bekannten natürlichen Methyläther des D-Inosits, in *Trifolium incarnatum* gefunden haben^{3, 4}. Dort ist die Methylierung des meso-Inosits zum Sequoyit der Primärschritt, dem die Epimerisierung folgt. Die Entstehung freien D-Inosits erfolgt in *Trifolium* zumindest zum größten Teil durch Entmethylierung des Methyläthers, während in *Artemisia vulgaris* L-Quebrachit überhaupt nicht entmethyliert wird.

Herrn Dr. H. Kindl danken wir für hilfreiche Diskussion. Die Durchführung der vorliegenden Untersuchungen wurde durch einen Förderungsbeitrag der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.