

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 17. Mitt.: Bildung von D-Bornesit und Dambonit in *Nerium oleander*¹

Von

H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 26. September 1966)

Dambonit (1,3-Di-O-methyl-*myo*-inosit) entsteht in *Nerium oleander*, wie durch Einbauversuche mit radioaktiv markiertem *myo*-Inosit und D-Bornesit sowie durch Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Bildung der Cyclite bei Assimilation von ¹⁴CO₂ nachgewiesen wurde, aus *myo*-Inosit über D-Bornesit als Zwischenprodukt. Neben Dambonit finden sich in der Cyclitfraktion von *N. oleander* auch D-Bornesit, *myo*-Inosit sowie L-Leucanthemit. *myo*-Inosit unterliegt in der Pflanze — besonders im Winter — einem sehr intensiven Stoffwechsel, der zu nichtzyklischen Verbindungen führt.

In *Nerium oleander* dambonitol (1,3-Di-O-methyl-*myo*-inositol) is formed from *myo*-inositol with D-bornesitol as intermediate, as could be shown with the help of incorporation experiments with radioactively labelled *myo*-inositol and D-bornesitol and also by the determination of the time dependence of the formation of the cyclitols from ¹⁴CO₂ in photoassimilation experiments. Besides dambonitol the cyclitol fraction of *N. oleander* contains also D-bornesitol, *myo*-inositol and L-leucanthemitol. Especially in winter *myo*-inositol undergoes a very active catabolism in the plant which leads to the formation of non-cyclic compounds.

Wie bereits 1908 von *de Jong*² festgestellt wurde, enthält der gewöhnliche Oleander (*Nerium oleander*) verhältnismäßig große Mengen von Dambonit, dem 1,3-Di-O-methyl-*myo*-inosit, einem der beiden bisher in der Natur vorgefundenen Dimethyläther des *myo*-Inosits.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Entstehung der Methyläther der Cyclite (vgl. z. B. die vorhergehende Mitt.¹) erschien es uns von

¹ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **97**, 1771 (1966).

² A. K. W. de Jong, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **27**, 257 (1908).

Interesse, auch die Biosynthese des Dambonits in *Nerium oleander* zu untersuchen.

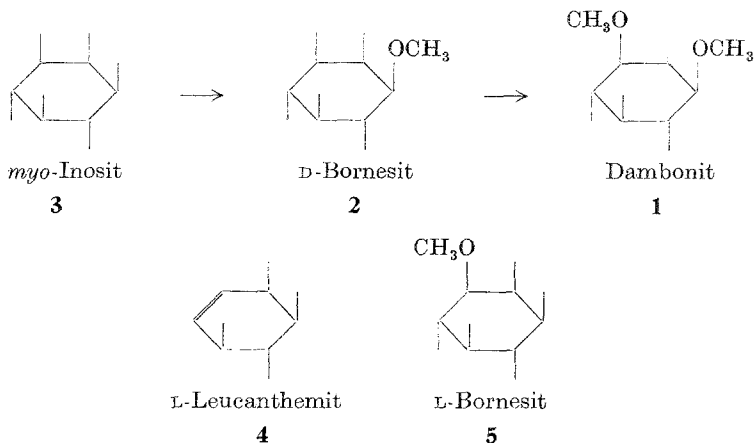
Materialien und Methoden

Die Herstellung radioaktiv markierter Cyclite und ihre Trennung wurden von uns bereits an anderer Stelle ausführlich beschrieben³. Dambonit läßt sich durch Umkristallisieren aus Methanol und Hochvakuumsublimation gut reinigen. Das Tetraacetat kann auch mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie auf Reinheit geprüft werden. Die angewandten Methoden für die Applikation der radioaktiven Vorstufen, für die Isolierung und Charakterisierung der Cyclite und für die Bestimmung der Aktivität wurden von uns ebenfalls bereits zusammengefaßt³.

Ergebnisse

Eine genaue Untersuchung der Cyclitfraktion aus *Nerium oleander* ergab, daß diese zu etwa 60% aus Dambonit (1), zu 10% aus *myo*-Inosit (3), zu 20% aus Bornesit und zu 5% aus L-Leucanthemit (4) besteht (vgl. Formelschema).

Formelschema



Der Bornesit (Schmp. 205°; $\alpha_D^{20} = -32,5^\circ$ [Wasser]; Pentaacetat: Schmp. 157°) ist nach diesen Daten D-(—)-Bornesit, dem nach *Post* und *Anderson* die Formel 2 zukommt⁴.

Die Auffindung von D-Bornesit und *myo*-Inosit als Inhaltsstoffe von *N. oleander* veranlaßte uns, die naheliegende Funktion dieser Substanzen als Zwischenprodukte bei der Biosynthese von Dambonit zu überprüfen. Zu diesem Zweck wurden Präparate von radioaktiv markiertem *myo*-

³ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, *Phytochem.* **5**, 1091 (1966).

⁴ G. Post und L. Anderson, *J. Amer. Chem. Soc.* **84**, 471, 478 (1962).

Inosit und D-Bornesit der Pflanze appliziert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 1 wiedergegeben; sie zeigen deutlich den Übergang von *myo*-Inosit in D-Bornesit und Dambonit. Ein Einbau der Aktivität in andere Inositmethyläther oder in L-Leucanthemit konnte nicht beobachtet werden. Bei 2tägiger Applikation von *myo*-Inosit- u - ^{14}C -2- ^3H blieb das Verhältnis $^3\text{H} : ^{14}\text{C}$ (1,5 : 1) in isoliertem Dambonit und D-Bornesit innerhalb der Fehlergrenze (etwa 10%) konstant.

Ein weiterer Hinweis auf die Zwischenproduktfunktion von D-Bornesit bei der Bildung von Dambonit konnte durch eine andere Versuchsordnung erhalten werden. Nach Photoassimilation von $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Cyclite nach verschiedenen Zeitabschnitten aus den Pflanzen isoliert und ihre spezifische Aktivität gemessen. Dabei ergab sich ein ständig steigendes Verhältnis zwischen den spezifischen Aktivitäten von Dambonit und D-Bornesit (Tab. 2).

Als weiteres Ergebnis soll hier angemerkt werden, daß *myo*-Inosit in *N. oleander* einem Abbau unterliegt, der besonders in den Wintermonaten sehr stark ist. 50 mg *myo*-Inosit wurden im Februar von einer Pflanze mit etwa 20 g Frischgewicht in 10 Tagen zu 99% abgebaut; gleichzeitig war nur eine sehr geringe Bildung von Methyläthern zu beobachten. Aber auch im Mai, zu welcher Zeit beträchtliche Mengen von Methyläthern entstehen, werden unter sonst gleichen Verhältnissen in 5 Tagen 80% des eingesetzten *myo*-Inosits zu nichtzyklischen Substanzen abgebaut.

Diskussion

Auf Grund unserer vorhergehenden Arbeiten über die Entstehung von Methyläthern des *myo*-Inosits^{1, 5, 6} schien es von vornherein wahrscheinlich, daß Dambonit aus *myo*-Inosit gebildet wird, wobei ein Monomethyläther des *myo*-Inosits als Zwischenprodukt fungieren sollte. Von den vier in der Natur aufgefundenen Monomethyläthern des *myo*-Inosits kommen dabei auf Grund ihrer Struktur nur D-Bornesit (2) und L-Bornesit (5) ernstlich in Frage.

Die Apocynaceae, zu welcher Klasse *N. oleander* zu zählen ist, enthalten nach bisherigen Untersuchungen fast ausschließlich den rechtsdrehenden L-Bornesit⁷. Es war somit für uns eine gewisse Überraschung, daß gerade in *N. oleander* der optische Antipode dieser Substanz, der linksdrehende D-Bornesit als einziger *myo*-Inositmonomethyläther vorkommt. Der gemessene Wert der optischen Drehung und auch der Schmelzpunkt

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

⁶ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **345**, 257 (1966).

⁷ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Fortschr. Chem. organ. Naturst. **24**, 149, (1966).

Tabelle 1. Versuche über den Einbau der Aktivität von markiertem *myo*-Inosit in D-Bornesit und Dambonit sowie von markiertem D-Bornesit in Dambonit mit Angaben über den Abbau der markierten Vorstufen in *Nerium oleander* (etwa 20 g Frischgewicht)

Versuch Nr.	Vorstufe	Menge (mg)	Aktivität (μC)	Zeit	Dauer des Stoffwechsels (Tage)	Prozenteller Einbau in		Zurückgewonnene Vorstufe (in Prozenten der eingesetzten Aktivität)
						D-Bornesit	Dambonit	
1	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - ^{14}C	5	2	Februar	14	0,01	0,001	0,5
2	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - ^{14}C	50	4	Februar	10	0,07	0,01	1,1
3	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - ^{14}C	10	2	Mai	7	0,65	0,22	10
4	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - ^{14}C	2	8	Mai	5	0,95	0,30	15
5	<i>myo</i> -Inosit-2- ^3H	2	8	Mai	5	0,97	0,32	13
6	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - ^{14}C + D-Bornesit	2	8	Mai	5	0,40	0,05	30
7	<i>myo</i> -Inosit- <i>u</i> - ^{14}C + D-Bornesit	2	8	Mai	10	0,52	0,08	12
8	D-Bornesit- <i>u</i> - ^{14}C	10	2	Mai	5	—	0,60	80
9	D-Bornesit- <i>u</i> - ^{14}C	10	2	Mai	10	—	0,95	60

Tabelle 2. Zeitabhängigkeit des Einbaues von ^{14}C in *myo*-Inosit, D-Bornesit und Dambonit in *Nerium oleander*. Pflanzen von *N. oleander* (Frischgewicht 25 g) wurden in einer ^{14}C O₂-Atmosphäre (aus 20 mg Ba¹⁴CO₃, 50 μC /mg) verschiedenen lange Zeit unter Leuchtstoffröhren photoassimilieren gelassen. Danach wurden die Cyclite aus den Pflanzen isoliert, papier-chromatographisch getrennt und auf Reinheit untersucht

Dauer der Photosimulation (Tage)	<i>myo</i> -Inosit		D-Bornesit		Dambonit		Verhältnis der spezif. Akt. D-Bornesit : Dambonit
	Einbau (%)	spezif. Akt. (μC /mMol)	Einbau (%)	spezif. Akt. (μC /mMol)	Einbau (%)	spezif. Akt. (μC /mMol)	
1	0,2	70	0,02	3	0,0015	0,1	1:0,03
3	0,6	190	0,06	8	0,02	1	1:0,12
5	0,9	300	0,10	12	0,06	3	1:0,25
10	1,8	610	0,22	28	0,24	14	1:0,50
20	2,0	660	0,32	41	0,59	32	1:0,78

des isolierten Produktes lassen aber keinen Zweifel darüber offen, daß es sich dabei um D-Bornesit handelt.

Die hier berichteten Versuche zeigen deutlich, daß die Biosynthese in *N. oleander* über D-Bornesit erfolgt. Die Aktivität aus *myo*-Inosit wird, wenn wir von den Versuchen an der ruhenden Pflanze im Februar absehen, zu 0,6 — 1% in D-Bornesit und zu 0,2 — 0,3% in Dambonit eingebaut, während D-Bornesit in Dambonit übergeführt wird. Die Konstanz des Verhältnisses zwischen ^3H und ^{14}C in isoliertem D-Bornesit und Dambonit bei Applikation von *myo*-Inosit- u - ^{14}C -2- ^3H ist ein Beweis für den direkten Einbau von *myo*-Inosit in D-Bornesit und Dambonit.

Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die Existenz der Reaktionskette von *myo*-Inosit über D-Bornesit zu Dambonit wird durch die Zeitabhängigkeit des Verhältnisses von entstandenem D-Bornesit zu Dambonit (Tab.2) gegeben. Aus $^{14}\text{CO}_2$ entsteht nach einem Tag wesentlich mehr D-Bornesit als Dambonit; das Verhältnis erreicht nach 20 Tagen fast 1 und in älteren Pflanzen findet man 6mal mehr Dambonit als D-Bornesit.

Der demnach zu postulierende Mechanismus der Bildung von Dambonit in *N. oleander* ist im Schema wiedergegeben. Die wahrscheinlichste Deutung für einen derartigen Mechanismus ist, daß *Nerium oleander* zwei Methyltransferasen besitzt, von welchen die erste die Methylierung von *myo*-Inosit zu D-Bornesit katalysiert; die Existenz eines Enzyms gleicher Spezifität in Boraginaceae und Leguminosae ist auf Grund unserer in der vorhergehenden Mitteilung¹ berichteten Versuche anzunehmen. Das zweite methylierende Enzym sollte für die Methylierung von D-Bornesit zu Dambonit streng spezifisch sein; es kann nicht imstande sein, *myo*-Inosit selbst an der entsprechenden Hydroxylgruppe zu methylieren, da wir sonst mit dem Auftreten von zumindest geringeren Mengen von L-Bornesit rechnen müßten, was, wie die Messung der optischen Drehung des isolierten D-Bornesits zeigt, absolut nicht der Fall ist. Versuche zur Isolierung und Charakterisierung dieser Methyltransferasen sind bei uns im Gange.

Der besonders im Winter bemerkenswert starke Abbau von *myo*-Inosit zu nichtzyklischen Verbindungen in *N. oleander* entspricht unseren Beobachtungen bei zahlreichen anderen Arten höherer Pflanzen¹.

Die vorliegende Untersuchung wurde durch einen Förderungsbeitrag der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.