

Zur Kenntnis der *myo*-Inosit-Oxygenase aus höheren Pflanzen

Von

Käthe Maria Gruhner und O. Hoffmann-Ostenhof*

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 14. Mai 1968)

Wie bereits berichtet wurde¹, findet sich in Haferkeimlingen (*Avena sativa*) und in unreifen Erdbeerfrüchten (*Fragaria*) ein Enzym, das *myo*-Inosit, in gleicher Weise wie früher beschriebene Enzyme aus Rattennieren² und aus der Hefe *Schwanniomyces occidentalis*³ zu D-Glucuronsäure abbaut. Eine nähere Untersuchung des Enzyms aus Haferkeimlingen ergab allerdings gewisse Unterschiede gegenüber den gleichspezifischen Enzymen anderer Herkunft. Die Affinität des Haferenzym gegenüber *myo*-Inosit ist um eine Zehnerpotenz höher als diejenige der anderen Enzyme, das Enzym aus Hafer ist weniger empfindlich gegenüber manchen Inhibitoren und es zeigt eine viel breitere Spezifität. Es greift sämtliche in der Natur vorkommenden isomeren Inosite, eine Anzahl von Inositmono- und -dimethyläthern sowie verschiedene isomere Pentahydroxycyclohexanone an, wobei in allen Fällen Uronsäuren entstehen.

It has been reported previously¹ that oats seedlings (*Avena sativa*) and immature strawberries (*Fragaria*) contain an enzyme catalyzing the degradation of *myo*-inositol to D-glucuronic acid in the same manner as known enzymes from rat kidney² and the yeast *Schwanniomyces occidentalis*³. A closer investigation of the enzyme from oats showed, however, that it is somewhat different from the enzymes of other origin catalyzing the same

* Herrn Professor Dr. J. W. Breitenbach zu seinem 60. Geburtstag in freundschaftlicher Verehrung gewidmet.

¹ K. M. Gruhner und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **347**, 278 (1966).

² F. C. Charalampous und C. Lyras, J. Biol. Chem. **228**, 1 (1957); F. C. Charalampous, J. Biol. Chem. **234**, 220 (1959); **235**, 1286 (1960).

³ E. Thonet und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **97**, 107 (1966).

reaction. The affinity of the oats enzyme towards *myo*-inositol is about one order of magnitude higher than that of the other enzymes, it is less sensitive to inhibitors, and it shows a broader specificity, attacking all naturally occurring inositol isomers, several mono- and dimethyl ethers of inositols, and several pentahydroxy-cyclohexanone isomers. All these compounds are degraded to uronic acids.

Vor einiger Zeit berichteten wir in einer Kurzz Mitteilung¹ über die Auffindung einer *myo*-Inosit-Oxygenase (EC 1.13.1.11; Systematischer Name: *myo*-Inosit : Sauerstoff-Oxydoreductase) in Haferkeimlingen und in unreifen Erdbeerfrüchten. Das Enzym katalysiert dieselbe Reaktion wie die Enzyme gleichen Namens, die seinerzeit aus Rattennieren² bzw. aus der Hefeart *Schwanniomycetes occidentalis*³ erhalten wurden. Auch in seinen sonstigen Eigenschaften schien das Enzym aus höheren Pflanzen unseren ersten Versuchen entsprechend weitgehende Ähnlichkeiten mit den analogen Enzymen aus tierischem Gewebe und aus dem Sproßpilz aufzuweisen.

Es erschien uns aber von Interesse, das pflanzliche Enzym näher zu charakterisieren und mit den anderen Enzymen ähnlicher Spezifität zu vergleichen. Über die Ergebnisse wird in der vorliegenden Mitteilung berichtet.

Materialien und Methoden

Substrate und Vergleichssubstanzen. Von den eingesetzten Substraten wurde *myo*-Inosit als Handelsprodukt bezogen. Scyllit wurde aus *Calycanthus occidentalis* isoliert; *D-chiro*-Inosit wurde aus *D*-Pinit durch Entmethylierung mit 25proz. HCl gewonnen, *L-chiro*-Inosit auf gleiche Weise aus *L*-Quebrachit hergestellt; *D*-Pinit und Sequoyit wurden aus *Trifolium incarnatum*, *L*-Quebrachit aus *Artemisia vulgaris*, *D*-Bornesit und Dambonit aus *Nerium oleander* und *D*-Ononit aus *Ononis spinosa* isoliert. Die Isolierungsmethoden sind in früheren Arbeiten aus unserem Laboratorium beschrieben⁴. *D,L*-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon [(±)-*epi*-,*meso*-Inosose] und 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon (*myo*-Inosose-2) wurden durch verschieden gelenkte Oxydation von *myo*-Inosit hergestellt⁵. *L*-2,3,5/4,6-Pentahydroxycyclohexanon (*myo*-Inosose-1) wurde durch katalytische Oxydation von *L-chiro*-Inosit gewonnen⁶.

Die als Vergleichssubstanzen eingesetzten Produkte *D*-Glucuronsäure, *D*-Gluconolacton, *D*-Galakturonsäure und *L*-Gulonsäure wurden käuflich erhalten. *D*-Glucarsäure wurde nach *Kiliani*⁷ hergestellt; 4-O-Methyl-*D*-glucuronsäure wurde uns freundlicherweise von *F. A. Loewus* (Buffalo, N. Y.) zur Verfügung gestellt.

⁴ Bezüglich einer Literaturzusammenstellung, vgl. *H. Kindl* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **24**, 149 (1966).

⁵ *T. Posternak*, Biochem. Prep. **2**, 57 (1952).

⁶ *L. Anderson* und *G. Post*, Abstr. 134th Meeting Amer. Chem. Soc., S. 12 D, 1958.

⁷ *H. Kiliani*, Ber. dtsh. chem. Ges. **58**, 2344 (1925).

Herstellung der Enzympräparation. Die Isolierung und teilweise Reinigung des Enzyms wurde bereits in der vorhergehenden Mitteilung¹ beschrieben. Für die hier beschriebenen Versuche wurde ausschließlich die Präparation aus Haferkeimlingen verwendet.

Bestimmung der Enzymaktivität. Die Messung der Enzymwirkung wurde entweder mit Hilfe einer kolorimetrischen Bestimmung der entstandenen Uronsäure nach *Mejbaum*⁸ in der Modifikation von *Charalampous*⁹ oder durch Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in der *Warburg*-Apparatur durchgeführt. Das Inkubationsgemisch enthielt routinemäßig 10 μ Mole *myo*-Inosit oder ein anderes verwendetes Substrat, 50 μ Mole *Tris*-Pufferlösung, pH 7,2, und Enzymlösung in einem Gesamtvolumen von 3 ml.

Papierchromatographische Methoden. Die als Produkte anfallenden Uronsäuren wurden mit Hilfe der Lösungsmittelgemische Äthanol—Essigester—Wasser, 8 : 1 : 1, und Aceton—Äthanol—Isopropylalkohol—Boratpuffer (pH 10,0; 0,5*m*), 3 : 1 : 1 : 2, papierchromatographisch aufgetrennt. Es wurde mit der absteigenden Methode auf Papier 2043 b (Schleicher & Schüll) gearbeitet. Die Chromatogramme wurden nach *Trevelyan*, *Procter* und *Harrison*¹⁰ behandelt.

Ergebnisse

Obwohl zahlreiche Versuche gemacht wurden, das Enzym über die seinerzeit erreichte Aktivität¹ hinaus anzureichern, scheiterten diese vor allem an der sehr geringen Stabilität des Enzyms, das in teilweise gereinigter Form bereits innerhalb von 24 Stdn. seine Aktivität um mehr als 30% verliert und nach 75 Stdn. völlig inaktiv wird. Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, die eine Stabilisierung des Enzyms ermöglicht hätten.

pH-Optimum. Das Enzym zeigt ein scharfes pH-Optimum seiner Wirkung zwischen pH 7,1 und 7,2 (Abb. 1); es besteht kein Unterschied bei Messungen in *Tris*-Pufferlösungen oder in Phosphat-Pufferlösungen.

Michaelis-Konstante. Die *Michaelis*-Konstante wurde nach der Methode von *Lineweaver* und *Burk*¹¹ bestimmt; ihr Wert ist 3,2 millimolar (Abb. 2).

Verhalten gegen Inhibitoren. Es wurden verschiedene Inhibitoren, welche gegenüber den analogen Enzymen aus anderen Quellen wirksam waren, geprüft; die Ergebnisse finden sich in Tab. 1.

Spezifität. Es wurde die Fähigkeit des Enzyms, andere, dem *myo*-Inosit nahe verwandte Substrate anzugreifen, untersucht. Dabei wurde — im Gegensatz zu den Verhältnissen bei den analogen Enzymen anderer Herkunft — gefunden, daß das Enzym imstande ist, neben *myo*-Inosit sämtliche eingesetzten natürlich vorkommenden Inosite (*Scyllit*, *D-chiro*-Inosit

⁸ *W. Mejbaum*, Z. physiol. Chem. **258**, 117 (1939).

⁹ *F. C. Charalampous*, J. Biol. Chem. **234**, 220 (1959).

¹⁰ *W. E. Trevelyan*, *D. P. Procter* und *J. S. Harrison*, Nature [London] **166**, 444 (1950).

¹¹ *H. Lineweaver* und *D. Burk*, J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).

und *L-chiro*-Inosit), weiters die zur Verfügung stehenden O-Methyläther des *myo*-Inosits sowie der beiden optisch aktiven Inosite und schließlich die drei erwähnten Inososen oxydativ zu spalten, wobei nur geringe Unterschiede in der Angreifbarkeit dieser Substrate beobachtet wurden. So

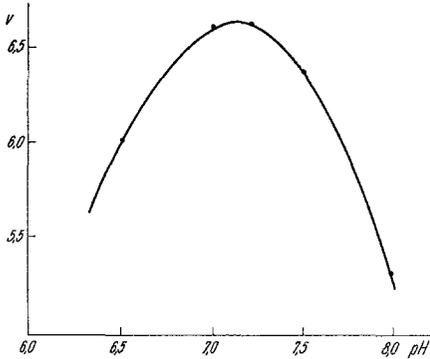


Abb. 1

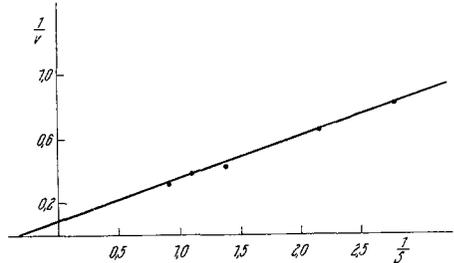


Abb. 2

Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Aktivität des Enzyms gegenüber *myo*-Inosit bei Substratsättigung. Die Aktivität ist auf der Ordinate in $1/100 \mu\text{Molen}$ entstandener D-Glucuronsäure pro Minute angegeben

Abb. 2. Diagramm nach *Lineweaver* und *Burk*¹¹ zur Bestimmung der *Michaelis*-Konstante des Enzyms mit *myo*-Inosit als Substrat. Ordinate: Reziproker Wert der Aktivität (vgl. Abb. 1). Abszisse: Reziproker Wert der *myo*-Inosit-Konzentration in $\mu\text{Molen pro ml}$

Tabelle 1. Vergleich der Hemmbarkeit von *myo*-Inosit-Oxygenasen aus verschiedenen Organismen durch Inhibitoren

Inhibitor	Molare Konzentration im Versuchsansatz	Perzentuelle Hemmung		
		Enzym aus Rattenniere	Enzym aus <i>Schwanniomycetes occidentalis</i>	Enzym aus Hafer
CN ⁻	$4 \cdot 10^{-3}$	88	41	44
8-Hydroxychinolin	$2 \cdot 10^{-3}$			66
	$1 \cdot 10^{-3}$		84	50
α, α' -Bipyridyl	$1 \cdot 10^{-3}$	0	48	0
p-Chlormercuribenzoat	$1 \cdot 10^{-3}$			85
	$1 \cdot 10^{-4}$			40
	$2 \cdot 10^{-4}$	83		11

betrug z. B. die Aktivität des Enzyms gegenüber D-Ononit 65%, gegenüber DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon 78%, gegenüber L-Quebrachit 83% und gegenüber *L-chiro*-Inosit 90% derjenigen, welches das Enzym gegenüber *myo*-Inosit aufweist.

Produkte. Wie bereits berichtet¹, oxydiert das Enzym *myo*-Inosit zu D-Glucuronsäure. Dasselbe Produkt entsteht auch offenbar beim Angriff des Enzyms auf L-*chiro*-Inosit und L-2,3,5/4,6-Pentahydroxycyclohexanon. Das aus D-*chiro*-Inosit entstehende Produkt dürfte nach den bisher vorliegenden Befunden mit D-Galakturonsäure identisch sein, was allerdings noch weiterer Beweise bedarf. Die aus den anderen eingesetzten Substraten entstehenden Produkte konnten bisher noch nicht im einzelnen identifiziert werden. Es handelt sich aber jedenfalls um anionische Substanzen, die sich mit Hilfe eines Anionenaustauschers von den neutralen Substanzen abtrennen lassen. Der positive Orcintest macht es in allen Fällen wahrscheinlich, daß wir O-methylierte oder nicht methylierte Uronsäuren vor uns haben.

Diskussion

Die hier durchgeführte genauere Untersuchung zeigt, daß sich die Eigenschaften der *myo*-Inosit-Oxygenase aus höheren Pflanzen doch deutlicher als ursprünglich angenommen von denen der bisher bekannten Enzyme ähnlicher Spezifität unterscheiden. Hier ist vor allem die bedeutend höhere Affinität des Enzyms zum Substrat *myo*-Inosit zu betonen; die *Michaelis*-Konstante des pflanzlichen Enzyms ist um etwa eine Zehnerpotenz kleiner als die entsprechenden Werte für die beiden bisher bekannten Enzyme ähnlicher Spezifität. Ebenso unterscheidet sich das pflanzliche Enzym von den analogen Enzymen anderer Herkunft durch eine etwas geringere Empfindlichkeit gegenüber manchen der untersuchten Inhibitoren; leider zeigt es aber trotzdem die gleiche Unbeständigkeit im teilweise gereinigten Zustand wie die anderen genannten Enzyme.

Der wesentlichste Unterschied scheint aber in der beträchtlich geringeren Spezifität zu liegen. Hier ist allerdings insoweit mit Vorsicht zu urteilen, weil wir nicht wissen, wie rein unsere Enzympräparation ist. Es wäre immerhin vorstellbar, daß die Fähigkeit unserer Präparation, sämtliche von uns eingesetzten Cyclite und Inososen anzugreifen, nicht einem einzigen, sondern mehreren Enzymen zuzuschreiben ist. Unsere Versuche geben aber keinerlei Hinweis für die Existenz mehrerer Enzyme in den Präparationen.

In diesem Zusammenhang ist die chemische Natur der Produkte, die aus den verschiedenen Cycliten entstehen, von einigem Interesse. So müßten die methylierten Inosite methylierte Uronsäuren ergeben, die zum größten Teil unbekannt sind und jedenfalls in der Natur noch niemals aufgefunden wurden. Andererseits deuten zahlreiche in unserem Laboratorium erhobene Befunde dahin, daß methylierte Inosite tatsächlich in den Pflanzen einem oxydativen Abbau unterliegen¹². Eine weitere Unter-

¹² Vgl. z. B. H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **97**, 1771, 1778 (1966).

suchung der aus den *O*-Methylinositen entstehenden Methyluronsäuren ist im Gange.

Wie bereits in der ersten Mitteilung über dieses Enzym¹ hervorgehoben wurde, kommt ihm eine gewisse biologische Bedeutung insoweit zu, als es bei der seinerzeit von *Albersheim*¹³ und von *Loewus* und *Kelly*¹⁴ nachgewiesenen Umwandlung von *myo*-Inosit in Pectine und Hemicellulosen beteiligt sein sollte. Mit der Auffindung des hier beschriebenen Enzyms wurde der letzte enzymologisch nicht untersuchte Schritt dieser Umwandlung geklärt.

Seinerzeit wurde von *Loewus*¹⁵ postuliert, daß die durch ein solches Enzym, das damals noch unbekannt war, entstehenden Methyluronsäuren möglicherweise die Vorläufer der methylierten Galakturonsäurereste im Pectin wären; spätere Versuche desselben Autors¹⁶ scheinen aber diese Vorstellung nicht zu bestätigen, da er keinen Einbau von DL-Bornesit in Zellwandpolysaccharide bei Mais beobachten konnte. In diesem Zusammenhang wäre eine eingehendere Untersuchung des Schicksals der Abbauprodukte der Methylinosite in den Pflanzen von großem Interesse und ist für die nächste Zeit geplant.

Die vorliegende Arbeit wurde durch Förderungsbeiträge der *Ludwig Boltzmann*-Gesellschaft, Wien, in großzügiger Weise unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.

¹³ *P. Albersheim*, J. Biol. Chem. **238**, 1608 (1963).

¹⁴ *F. A. Loewus*, *S. Kelly* und *E. F. Neufeld*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **48**, 421 (1962); *F. A. Loewus* und *S. Kelly*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **7**, 204 (1962).

¹⁵ *R. M. Roberts*, *R. Shah* und *F. A. Loewus*, Federation Proc. **26**, 453 (1967).