

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 20. Mitt.:

Über die Bildung von L-Bornesit in *Vinca*-Arten¹.

Von

Hilde Hofmann und **O. Hoffmann-Ostenhof**

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 6. November 1968)

Einbauversuche mit radioaktiv markiertem *myo*-Inosit und radioaktiv markierter D-Glucose an *Vinca minor* und *Vinca rosea* machen es sehr wahrscheinlich, daß L-Bornesit in diesen Pflanzen durch direkte Methylierung von *myo*-Inosit entsteht.

Studies on the Biosynthesis of Cyclitols, XX.: The Formation of L-Bornesitol in Vinca Species

Incorporation experiments with radioactively labelled *myo*-inositol and D-glucose in *Vinca minor* and *Vinca rosea* make it very probable that in these plants L-bornesitol is formed through direct methylation of *myo*-inositol.

In vorhergehenden Arbeiten dieser Serie²⁻⁴ konnte gezeigt werden, daß drei der vier in der Natur nachgewiesenen Monomethyläther des *myo*-Inosits, nämlich D-Bornesit (D-1-O-Methyl-*myo*-inosit), Sequoyit (5-O-Methyl-*myo*-inosit) und D-Ononit (D-4-O-Methyl-*myo*-inosit) in Pflanzen, in denen sie als Inhaltsstoffe vorkommen, durch direkte Methylierung von *myo*-Inosit entstehen. Es erschien uns nun von Interesse zu prüfen, ob der gleiche Bildungsweg auch für L-Bornesit (L-1-O-Methyl-*myo*-inosit), der ebenso wie seine drei zuerst genannten Isomeren ein häufiger Inhaltsstoff von Pflanzen ist, Gültigkeit besitzt.

¹ 19. Mitt.: H. Ruis, E. Molinari und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **348**, 1705 (1967).

² R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 1311 (1964).

³ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **345**, 257 (1966).

⁴ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **97**, 1771 (1966).

L-Bornesit wurde bereits 1871 von *Girard* in Kautschuk aus Borneo entdeckt⁵; Struktur und Konfiguration wurden allerdings erst viel später geklärt^{6, 7}. Eine Zusammenstellung des Vorkommens der Substanz in Pflanzenarten findet sich in einem Übersichtsreferat aus letzter Zeit⁸.

Für unsere Untersuchungen über die Bildung von L-Bornesit wurde anfangs eine Art von Immergrün, *Vinca minor* aus der Familie Apocynaceae, ausgewählt, in der die Substanz seinerzeit von *Plowier*⁹ nachgewiesen wurde. Da aber Samen dieser Art nicht erhältlich waren, ging man später auf die Gartenform *Vinca rosea* über.

Methoden und Materialien

D-Glucose-u-¹⁴C und *myo*-Inosit-u-¹⁴C wurden durch Photoassimilation in einer ¹⁴CO₂-Atmosphäre aus verschiedenen zu derartigen Synthesen befähigten Pflanzen nach bereits veröffentlichten Methoden hergestellt¹⁰. Auch die Applikation der radioaktiven Vorstufen, die Isolierung der Cyclite, die Reinheitskriterien für die Cyclite sowie die Messung der Radioaktivität in den Proben wurden ebenfalls schon an anderer Stelle beschrieben¹⁰.

Ergebnisse

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchung der Biosynthese des L-Bornesits war es erforderlich, die von uns dazu vorgesehene Pflanze *Vinca minor* auf das Vorkommen von L-Bornesit zu überprüfen. Mit Hilfe bereits beschriebener Methoden¹⁰ wurde eine größere Menge von getrockneten Blättern von *V. minor* auf die Cyclitfraktion aufgearbeitet. Die Analyse dieser Fraktion ergab tatsächlich — in Bestätigung der Angaben von *Plowier*⁹ —, daß die Hauptmenge aus L-Bornesit bestand; daneben wurde Dambonit (1,3-*O*-Dimethyl-*myo*-inosit) und *myo*-Inosit nachgewiesen. Eine Abschätzung des Mengenverhältnisses dieser Cyclite in der Fraktion, die keinen Anspruch auf Genauigkeit erhebt, ergibt, daß darin etwa 50% L-Bornesit, 30% Dambonit und 20% *myo*-Inosit enthalten sind.

Der aus dem Pflanzenmaterial isolierte L-Bornesit wurde papierchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln¹⁰ mit Testflecken authentischer Bornesit-Proben verglichen. Es ergab sich immer ein völlig gleichartiges Laufverhalten. Auch Schmelzpunkt und optische Drehung stimmten gut mit den in der Literatur angegebenen Werten überein.

⁵ M. A. Girard, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris **73**, 426 (1871).

⁶ E. R. Flint und B. Tollens, Ann. Chem. **272**, 288 (1892).

⁷ G. G. Post und L. Anderson, J. Amer. Chem. Soc. **84**, 471 (1962).

⁸ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Fortschr. Chem. Organ. Naturst. **24**, 149 (1966).

⁹ V. Plowier, C. r. hebdomad. Sé. Acad. Sci. Paris **260**, 1003 (1965).

¹⁰ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Phytochem. [London-New York] **5**, 1091 (1966).

In Analogie zu den früher durchgeführten Untersuchungen über die Biosynthese anderer Methyläther des *myo*-Inosits²⁻⁴ wurden bei den Einbauversuchen markierte D-Glucose und markierter *myo*-Inosit vorgegeben. Die Ergebnisse einiger dieser Experimente sind in Tab. 1 zusammengefaßt. Es ergibt sich daraus, daß auch bei verschiedenen Versuchsbedingungen *myo*-Inosit mit guter Ausbeute in L-Bornesit eingebaut wird. D-Glucose wird um mehr als eine Größenordnung weniger in L-Bornesit eingebaut und ist deshalb kaum als direkter Vorläufer anzusehen.

Um sicherzustellen, daß der bei Infusion von markiertem *myo*-Inosit in die Pflanze entstehende *myo*-Inositmonomethyläther tatsächlich mit L-Bornesit identisch ist, wurde eine Probe davon mehrmals mit inaktivem L-Bornesit umkristallisiert, wobei sich eine Konstanz der spezifischen Aktivität ergab.

Bei dem in der Tabelle angeführten Versuch mit markierter D-Glucose wurde außer Bornesit auch die Menge des gleichzeitig entstandenen *myo*-Inosits bestimmt. Die beiden Werte liegen in der gleichen Größenordnung; bei *myo*-Inosit ergab sich ein Einbau von 0,26%, bei L-Bornesit ein solcher von 0,10%.

Es muß erwähnt werden, daß bei Verwendung von

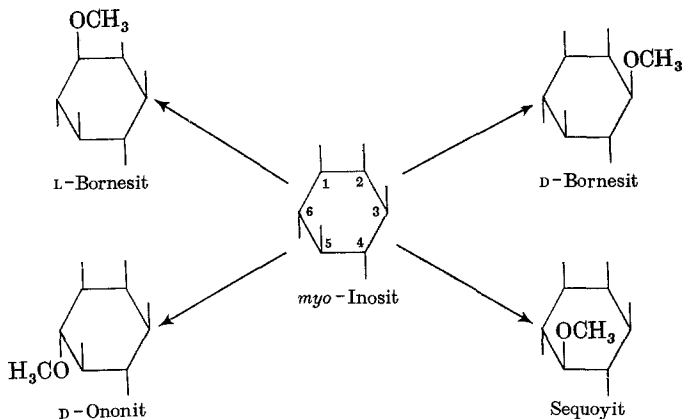
Tabelle 1. Versuche über den Einbau von *myo*-Inosit-u-¹⁴C und D-Glucose-u-¹⁴C in L-Bornesit in *Vinca*

| Versuch Nr. | Vorstufe Aktivität (μC) | spez. Aktivität ($\mu\text{C}/\text{mg}$) | Gewicht der Blätter, g | Infusionsdauer, Tage | Radiochemische Ausbeute an L-Bornesit in Prozenten der eingesetzten Aktivität | Anmerkung |
|-------------|--------------------------------------|---|------------------------|----------------------|---|--|
| 1 | 4,55 | 2,02 | 4,5 | 6 | 14,7 | |
| 2 | 4,55 | 2,02 | 0,6 | 7 | 2,5 | „leaf-disc“-Methode |
| 3 | 4,08 | 3,5 | 2,54 | 7 | 5,8 | Für die Versuche 3 und 4 wurden |
| 4 | 11,4 | 3,5 | 2,53 | 7 | 0,1 | Pflanzen gleichen Alters und gleicher Größe verwendet. |

ganz jungen Trieben der Einbau von markiertem *myo*-Inosit in L-Bornesit wesentlich geringer gefunden wurde als in den tabellierten Versuchen, die durchwegs mit älterem Pflanzenmaterial durchgeführt wurden. So wurden manchmal Einbauraten unter 0,1% beobachtet, wobei auch die Gesamtaktivität in der Neutralfraktion, die also alle Cyclite enthalten sollte, weniger als 3% war. Dies deutet auf einen sehr aktiven Abbau des *myo*-Inosits unter den genannten Bedingungen und stimmt gut mit früheren Beobachtungen an anderem Pflanzenmaterial überein, wonach in jungen Pflanzen *myo*-Inosit sehr schnell abgebaut wird⁴.

Diskussion

Die hier berichteten Versuche machen es sehr wahrscheinlich, daß L-Bornesit in den Pflanzen ebenso wie die drei anderen vorher darauf untersuchten Monomethyläther des *myo*-Inosits durch direkte Methylierung von *myo*-Inosit entsteht. Es kann somit die Existenz von vier Enzymen verschiedener Spezifität postuliert werden, die imstande sind, *myo*-Inosit in den Positionen 1, 3, 5 bzw. 6 zu methylieren, und die in denjenigen Pflanzen enthalten sind, in denen die entsprechenden Methyläther (L-Bornesit, D-Bornesit, Sequoyit und D-Ononit) vorkommen (vgl. das Formelschema).



Es soll hier erwähnt werden, daß es uns bereits vor einiger Zeit gelungen ist, in Keimlingen von *Pisum sativum* ein Enzym nachzuweisen, welches imstande ist, *myo*-Inosit zu D-Bornesit unter Verwendung von (—)-*S*-Adenosylmethionin als Methylgruppendonator zu methylieren, worüber an anderer Stelle kurz berichtet wurde¹¹.

¹¹ I. Wagner und O. Hoffmann-Ostenhof, Abstr. 4th Meeting, Fed. Eur. Biochem. Soc., Oslo 1967, S. 1.

Analoge Versuche wurden nun kürzlich an *Vinca* durchgeführt, und auch in diesem Falle gelang der Nachweis eines Enzyms, dessen Spezifität in bezug auf Donor und Akzeptor derjenigen des Enzyms aus *Pisum sativum* weitgehend analog ist, wobei aber das entstehende Produkt L-Bornesit ist. Über die bemerkenswerten Ähnlichkeiten dieser beiden Enzyme aus verschiedenen Pflanzenarten, von welchen jedes spezifisch aus denselben Ausgangsstoffen einen der beiden enantiomeren Bornesite bildet, wurde berichtet¹²; eine ausführlichere Veröffentlichung ist in Vorbereitung.

Herrn Dr. *H. Kindl* danken wir für hilfreiche Diskussion und methodische Ratschläge. Die vorliegende Arbeit wurde durch einen Förderungsbeitrag der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, und durch eine Sachbeihilfe der Hochschuljubiläumstiftung der Stadt Wien unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.

¹² *I. Wagner, H. Hofmann* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Abstr. 5th Meeting, Fed. Eur. Biochem. Soc., Prag 1968, S. 96.