

Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 22. Mitt.:

Cyclite in *Chlorella fusca*¹

Von

G. Wöber und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus der Lehrkanzel für Biochemie an der Universität Wien

(Eingegangen am 23. Dezember 1968)

Das Vorkommen von Cycliten in *Chlorella fusca* wurde mit Hilfe der Methode der Photoassimilation in einer Atmosphäre von ¹⁴CO₂ untersucht. Außer dem bereits als Bestandteil dieser Algenart bekannten *myo*-Inosit konnten auch andere Cyclite, nämlich *D-chiro*-Inosit, Mytilit, Laminit und *L*-Leucanthemit nachgewiesen werden. Einbauversuche mit markierten Vorstufen ergaben, daß *myo*-Inosit höchstwahrscheinlich auf dem schon in vielen Organismen nachgewiesenen Weg aus *D*-Glucose entsteht und *D-chiro*-Inosit das Produkt einer direkten Epimerisierung von *myo*-Inosit ist. Hingegen besteht keine biogenetische Beziehung zwischen *myo*-Inosit und den beiden *C*-Methylinsiten Mytilit und Laminit; die Methylgruppe von *L*-Methionin wird nicht in diese beiden Verbindungen eingebaut.

Studies on the Biosynthesis of the Cyclitols, XXII: Cyclites in Chlorella fusca

The occurrence of cyclitols in *Chlorella fusca* has been studied, using the method of photoassimilation in an atmosphere of ¹⁴CO₂. Besides *myo*-inositol which is known to be a constituent of this algal species, other cyclitols were detected, namely *D-chiro*-inositol, mytilitol, laminitol, and *L*-leucanthemitol. Incorporation experiments with labelled precursors make it most probable that *myo*-inositol is formed from *D*-glucose through a pathway already established in many organisms, whereas *D-chiro*-inositol is the product of a direct epimerization of *myo*-inositol. No biogenetic relation exists between *myo*-inositol and the two *C*-methylinositols; the methyl group of *L*-methionine is not incorporated into these compounds.

¹ 21. Mitt.: E. Molinari und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **349**, 1797 (1968).

Es ist schon seit einiger Zeit bekannt, daß Grünalgen der Familie *Chlorella myo*-Inosit als Inhaltsstoff enthalten². Quantitative Angaben über die Konzentration von *myo*-Inosit in den Organismen schwanken zwischen 1,6 und 3,8 mg/g Trockengewicht^{3, 4}. Im Rahmen unserer Untersuchungen zur Biosynthese der Cyclite erschien es uns von Interesse, Vorkommen und Entstehung von Cycliten in *Chlorella* und anderen Algen zu untersuchen.

Mit Hilfe der Methode der Photoassimilation in einer Atmosphäre von ¹⁴CO₂ gelang es uns, in *Chlorella fusca* außer *myo*-Inosit auch noch andere Cyclite, nämlich *D-chiro*-Inosit, Mytilit, Laminit und *L*-Leucanthemit nachzuweisen. Einbauversuche mit radioaktiv markierten Vorstufen ergaben einigen Aufschluß über die Bildungsweise dieser Verbindungen.

Materialien und Methoden

Züchtung der Organismen. Der von uns verwendete Stamm von *Chlorella*, der uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Broda überlassen wurde, stammte aus der Sammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts der Universität Göttingen, Kat.-Nr. 211/8b; nach *Shihira* und *Krauss*⁵ handelt es sich dabei um *Chlorella fusca* var. *vacuolata* S. und K. Die Flüssigkeitskultur wurde in Roux-Kolben mit Einleitrohr für die Gasmischung (5 Vol.% CO₂ in Luft) entsprechend den Angaben von *Tamiya*⁶ durchgeführt. Es wurde das Kulturmedium von *Walker*⁷ mit Harnstoff als Stickstoffquelle verwendet. Für Vorratskulturen wurden dem Medium zusätzlich 1% *D*-Glucose und zur Verfestigung 2% Agar hinzugefügt. Als kontinuierliche Lichtquelle dienten 6 Leuchtstoffröhren Philips TL 20 W/55, die in 10 cm Abstand von beiden Seiten des Kulturkolbens angeordnet waren (Beleuchtungsintensität 8000 Lux).

Chemikalien. NaHCO₃-¹⁴C und *L*-Methionin-¹⁴CH₃ wurden von Radiochemical Centre, Amersham, England, bezogen. *D*-Glucose-*u*-¹⁴C, *myo*-Inosit-*u*-¹⁴C und *D*-Pinit-*u*-¹⁴C wurden in unserem Laboratorium nach beschriebenen Methoden^{8, 9, 10} hergestellt. Mytilit wurde nach einer Vorschrift von *Posternak*¹¹ synthetisiert; für die Überlassung von Proben von Laminit sind wir den Herren Prof. B. Lindberg (Stockholm) und Dr. R. G. Schweiger (Muscatine,

² B. Lindberg, Acta Chem. Scand. **9**, 169 (1955).

³ Y. Morimura, Plant Cell Physiol. **1**, 63 (1959).

⁴ M. Ikawa, P. T. Borowski und A. Chakravarti, Appl. Microbiol. **16**, 620 (1968).

⁵ I. Shihira und R. W. Krauss, „Chlorella. Physiology and Taxonomy of Fourty-one-Isolates“, Port City Press, Baltimore 1966.

⁶ H. Tamiya, T. Iwamura, K. Shibata, E. Hase und T. Nihei, Biochim. Biophys. Acta **12**, 23 (1953).

⁷ J. B. Walker, Arch. Biochem. Biophys. **46**, 1 (1953).

⁸ G. Billek und H. Kindl, Atompraxis **8**, 167 (1962).

⁹ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, Phytochem. **6**, 77 (1967).

¹⁰ R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **337**, 277 (1964).

¹¹ T. Posternak, Helv. Chim. Acta **27**, 457 (1944).

Iowa), für D-1,4/2,5-Tetrahydroxycyclohexan Herrn Dr. J. S. Craigie (Halifax, N. S.) zu Dank verpflichtet.

Photoassimilationsexperimente. 50 ml einer Flüssigkultur von *Chlorella* in der postlogarithmischen Phase wurden 5 Min. bei 2000 Upm zentrifugiert, die im Rückstand befindlichen Algen in 2 bis 3 ml Medium suspendiert, 1 mg NaHCO_3 und 1 mC NaHCO_3 - ^{14}C hinzugefügt und die Mischung in einem verschlossenen 5-ml-Erlenmeyer-Kolben unter ständiger Belichtung 48 Stdn. gerührt.

Einbauxperimente. Zur Untersuchung des Einbaus von Aktivität aus D-Glucose- u - ^{14}C , *myo*-Inosit- u - ^{14}C und L-Methionin- $^{14}\text{CCH}_3$ wurden 3 ml der wie oben hergestellten Algensuspension mit der radioaktiven Substanz versetzt, 5 mg derselben Substanz in inaktiver Form als Träger hinzugefügt und unter dauernder Belichtung und Durchleiten des Gasgemisches 5 Vol. % CO_2 in Luft 15 Stdn. (D-Glucose) bzw. 48 Stdn. (*myo*-Inosit und L-Methionin) inkubiert.

Aufarbeitung der Versuche. Nach Beendigung der Versuche wurden die Algen abzentrifugiert und nach Zugabe von 5 mg inaktivem *myo*-Inosit durch 15stdg. Kochen mit 50 ml 3proz. HCl extrahiert. Danach wurde das Unlösliche abfiltriert und das Filtrat zur Entfernung des größten Teils der HCl mehrmals zur Trockene eingengt und wieder mit Wasser aufgenommen. Anschließend wurden der Pflanzenextrakt und das Medium getrennt mit Hilfe einer $1,5 \times 25$ cm Säule, die mit Dowex 1×4 , 100—200 mesh, und Dowex 50 W $\times 4$, 100—200 mesh, gefüllt war, entionisiert. Dann engte man Eluat und Waschwasser im Vak. zur Trockene ein und trennte die vorliegenden Neutralfraktionen mit Hilfe der präparativen Papierchromatographie (Laufmittel Aceton—Wasser, 85:15, v/v, absteigend). Die Radioaktivität der einzelnen Zonen wurde auf einem Papierchromatogramm-„scanner“ lokalisiert.

Zur weiteren Reinigung wurden diese Zonen eluiert, 10 mg inaktiver *myo*-Inosit als Träger hinzugesetzt, die Mischung im liegenden Rohr bei 10^{-3} Torr und 220° sublimiert und das Sublimat wieder nach Aufnehmen in Wasser der Papierchromatographie (Phenol—Wasser, 4:1, v/v, absteigend) unterzogen.

Zur Identifizierung der einzelnen Cyclite wurde mit authentischen Proben der Substanzen bis zur konstanten Aktivität umkristallisiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte hier in unendlich dünner Schicht auf Al-Plättchen mit einem Endfensterzählrohr.

Getrennt von der oben beschriebenen Gewinnung der radioaktiv markierten Neutralfraktion wurden die Versuche zum Nachweis von Phytinsäure durchgeführt. Nach beendeter Photoassimilation wurden die Algen 1 Stde. lang in 80proz. Aceton mit Ultraschall behandelt. Anschließend filtrierte man von den Zellbruchstücken ab, dampfte zur Trockene ein und nahm den Rückstand in 50 ml 0,5*n*-HCl auf. Nach Abfiltrieren des Unlöslichen wurde das Filtrat eingengt und in Oxalsäure—Oxalatpuffer, pH 3,6, bei 28 V/cm der Hochspannungselektrophorese unterworfen; dabei fand Pikrinsäure als Bezugssubstanz Verwendung. Die der Phytinsäure entsprechende Zone wurde durch eine weitere Elektrophorese in Ammoniumacetatpuffer, pH 3,8, bei 42 V/cm gereinigt. Der der Phytinsäure zugeordnete Bereich wurde mit 1 mg Natriumphytat verdünnt und die wäßr. Lösung (pH 4) fünf Tage bei Zimmertemp. belassen. Anschließend wurde der entstandene *myo*-Inosit durch Papierchromatographie isoliert und seine Aktivität gemessen.

Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erlaubte die Methode der Photoassimilation in einer $^{14}\text{CO}_2$ -Atmosphäre in Verbindung mit den geschilderten analytischen Verfahren die Feststellung, daß *Chlorella fusca* neben dem bereits als Inhaltsstoff bekannten *myo*-Inosit andere Cyclite in nicht unbeträchtlichen Konzentrationen enthält. Tab. 1 enthält eine Aufstellung über die in den einzelnen Cycliten nachweisbare Aktivität, die bei den oben geschilderten Photoassimilationsexperimenten in diese Substanzen eingebaut wurde. Diese radiochemische Ausbeute stimmt im Falle des *myo*-Inosits numerisch fast exakt mit der seinerzeitigen Angabe von *Ikawa*⁴ über den Gehalt der Algen an diesem Cyclit überein.

Es wurde weiters untersucht, ob unser Organismus andere als die in Tab. 1 genannten Cyclite enthält. Auf Grund einer noch unveröffentlichten Beobachtung über ein Vorkommen von *scyllo*-Inosit in einer *Porphyridium*-Art wurde auch *Chlorella fusca* auf *scyllo*-Inosit untersucht. Es ergab sich, daß, falls dieser Cyclit zugegen sein sollte, seine Konzentration jedenfalls unter der Nachweisgrenze unserer Methoden lag.

Das Vorkommen von *D-chiro*-Inosit in *Chlorella fusca* veranlaßte uns, auf Sequoyit und *D*-Pinit zu prüfen, da diese beiden Methyläther in höheren Pflanzen als Zwischenprodukte der Bildung von *D-chiro*-Inosit aus *myo*-Inosit fungieren¹². Es konnte aber kein Hinweis auf ein Vorkommen dieser beiden Substanzen erhalten werden.

In höheren Pflanzen ist Phytinsäure, der Hexaphosphorsäureester des *myo*-Inosits, ein sehr häufiger Bestandteil, der oft in hohen Konzentrationen nachweisbar ist. In der Alge konnte diese Substanz nicht nachgewiesen werden.

Erst vor kurzem wurde *D*-1,4/2,5-Tetrahydroxycyclohexan in zwei Chrysophyceen-Arten und in *Porphyridium* nachgewiesen^{13, 14}. Aber auch dieser Cyclit scheint in *C. fusca* nicht vorzukommen.

Die Ergebnisse der Einbauversuche mit universal ^{14}C -markierter *D*-Glucose und *myo*-Inosit sowie mit ^{14}C -methyl-markiertem *L*-Methionin sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Diskussion

Die Ergebnisse über das Vorkommen mehrerer Cyclite in *C. fusca*, über die wir hier berichten, zeigen wieder, wie wertvoll die Methode

¹² R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 1311 (1964).

¹³ J. D. Ramanathan, J. S. Craigie, J. McLachlan, D. G. Smith und A. G. McInnes, Tetrahedron Letters **14**, 1527 (1966).

¹⁴ J. S. Craigie, J. McLachlan und R. D. Tochter, Canad. J. Bot. **46**, 605 (1968).

Tabelle 1. Einbau der Aktivität von $^{14}\text{CO}_2$ in verschiedene Cyclite unter den Bedingungen der Photoassimilationsversuche an *Chlorella*

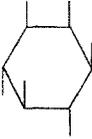
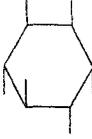
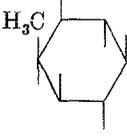
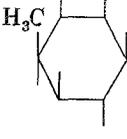
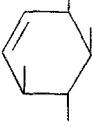
Produkt	Chemische Formel	Prozent der eingesetzten Aktivität
<i>myo</i> -Inosit		3×10^{-1}
<i>D-chiro</i> -Inosit		5×10^{-2}
Mytilit		2×10^{-2}
Laminit		7×10^{-4}
L-Leucanthemit		4×10^{-4}
Phytinsäure	Hexaphosphat des <i>myo</i> -Inosits	$< 10^{-4}$

Tabelle 2. Einbau der Aktivität aus verschiedenen möglichen markierten Vorstufen in *myo*-Inosit, Mytilit und *D-chiro*-Inosit in *Chlorella*

Vorstufe	applizierte Aktivität, (μC)	Einbau (radiochem. Ausb. in %)		
		<i>myo</i> -Inosit	Mytilit	<i>D-chiro</i> -Inosit
D-Glucose- $u\text{-}^{14}\text{C}$	25	0,8	0,3	0,4
<i>myo</i> -Inosit- $u\text{-}^{14}\text{C}$	4,5	—	$< 0,02$	2,8
L-Methionin- $^{14}\text{CH}_3$	10	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$
D-Pinit- $u\text{-}^{14}\text{C}$	2,5	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$

der Photoassimilation von $^{14}\text{CO}_2$ für den Nachweis von geringen Konzentrationen von Inhaltsstoffen in photosynthetisierenden Pflanzen ist.

Der Nachweis von *D-chiro*-Inosit in *Chlorella* ist einigermaßen überraschend, da bisher ein Vorkommen dieses Inosits in Algen nicht bekannt war.

Im Gegensatz dazu wurden Laminit und Mytilit bisher vorwiegend in Algen gefunden. *Lindberg*¹⁵ isolierte Laminit als erster aus *Laminaria Cloustoni* und konnte auch später seine Struktur aufklären¹⁶. Die Auffindung der Substanz in zahlreichen anderen Rot- und Braunalgen führte zur Annahme, daß diese Organismen allgemein Laminit enthalten¹⁷. Im Falle des Mytilits war es *Ackermann*¹⁸, der diese Substanz erstmalig in der Miesmuschel entdeckte; später wurde sie aber auch in Rotalgen nachgewiesen¹⁹. Unser Befund ist der erste Bericht über das Vorkommen dieser beiden C-Methylinosite in einer Chlorophyceen-Art.

Die Auffindung von Leucanthemit in *Chlorella* ist ebenfalls nicht ohne Interesse. Leucanthemit ist erst seit 1962 bekannt; Versuche aus unserem Laboratorium²⁰ machen es wahrscheinlich, daß er in höheren Pflanzen sehr allgemein verbreitet ist. Allerdings kommt die Substanz in den Organismen nur in sehr geringer Konzentration vor, wie das auch bei *Chlorella* der Fall ist (*H. Kindl* und *G. Wöber*, unveröffentlichte Versuche).

Die Einbauversuche mit markierten Substanzen, die als Vorläufer der in den Algen gefundenen Cyclite in Frage kommen, wurden durchgeführt, um einen groben Überblick über die Verhältnisse zu erhalten. Dabei beschränkten wir uns darauf, den Einbau der Aktivität in die drei Cyclite, die in etwas höherer Konzentration in *Chlorella* vorliegen, nämlich *myo*-Inosit, *D-chiro*-Inosit und Mytilit, zu untersuchen. Die in Tab. 2 angeführten Resultate lassen sich in der Weise deuten, daß die Aktivität von *D*-Glucose in alle drei Cyclite eingebaut wird; für den *D-chiro*-Inosit ist aber offenbar *myo*-Inosit ein näherer Vorläufer, da der Einbau daraus 7mal höher ist als derjenige aus *D*-Glucose. Mytilit scheint nicht aus *myo*-Inosit zu entstehen; die C-Methylgruppe des Mytilits stammt nicht aus *L*-Methionin, obwohl C-Methylierungen mit *L*-Methionin als Methylquelle in Algen bekannt sind²¹.

Der Befund, daß die Aktivität von *D*-Pinit nicht in *D-chiro*-Inosit eingebaut wird, läßt darauf schließen, daß der in den höheren Pflanzen

¹⁵ *B. Lindberg* und *J. McPherson*, Acta Chem. Scand. **8**, 1875 (1954).

¹⁶ *B. Lindberg* und *B. Wickberg*, Ark. Kemi **13**, 447 (1959).

¹⁷ *R. G. Schweiger*, Arch. Biochem. Biophys. **118**, 383 (1967).

¹⁸ *D. Ackermann*, Ber. dtsh. chem. Ges. **54**, 1938 (1921).

¹⁹ *B. Wickberg*, Acta Chem. Scand. **11**, 506 (1957).

²⁰ *H. Kindl*, *G. J. Kremlicka* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Mh. Chem. **97**, 1783 (1966).

²¹ *I. D. Frantz* und *G. J. Schröpfer*, Ann. Rev. Biochem. **36**, 656 (1967).

funktionierende Biosyntheseweg von *myo*-Inosit über Sequoyit und D-Pinit zum D-*chiro*-Inosit in *Chlorella* nicht beschrieben wird. Dies wird auch dadurch gestützt, daß weder Sequoyit noch D-Pinit in den Algen nachgewiesen werden können. Es muß somit ein anderer Weg vom *myo*-Inosit zum D-*chiro*-Inosit existieren, wobei die Annahme naheliegt, daß hier eine direkte Epimerisierung ohne Methylierung über D-2,3,5/4,6-Pentahydroxycyclohexanon stattfindet. Vorversuche mit dem Ziele, ein Epimerasesystem in Analogie zu demjenigen, das in *Trifolium incarnatum* die Epimerisierung von Sequoyit zu D-Pinit katalysiert^{22, 23} zu finden, wurden in Zusammenarbeit mit Dr. H. Ruis in diesem Laboratorium unternommen. Die vorliegenden, noch unvollständigen Resultate lassen die Existenz eines solchen Epimerasesystems, bei dem NAD⁺ bzw. NADP⁺ als Coenzyme beteiligt sind, als wahrscheinlich annehmen. Die Arbeiten werden fortgesetzt.

Die Beobachtung, daß weder die Aktivität von *myo*-Inosit noch die von L-Methionin in Mytilit eingebaut wird, deutet dahin, daß Mytilit — und wahrscheinlich auch Laminit, der ein Epimeres des Mytilits ist — nicht durch einfache C-Methylierung eines Inosits entsteht. Weitere Untersuchungen zur Aufklärung der Biosynthese dieser C-Methylinosite sind im Gange.

Die vorliegende Arbeit wurde durch einen Förderungsbeitrag der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, und durch eine Sachbeihilfe der Hochschuljubiläumsstiftung der Stadt Wien unterstützt, wofür wir unseren Dank aussprechen.

²² G. J. Kremlicka und O. Hoffmann-Ostenhof, Z. physiol. Chem. **344**, 261 (1966).

²³ H. Ruis und O. Hoffmann-Ostenhof, Europ. J. Biochem. **7**, 442 (1969).