

**Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 26. Mitt.:
Bildung von Mytilit (C-Methyl-scyllo-inosit)
in *Chlorella fusca*^{1, 2}**

Von

G. Wöber und O. Hoffmann-Ostenhof

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 15. Juni 1970)

Einbauversuche mit ¹⁴C-markierten möglichen Vorläufern von Mytilit in *Chlorella fusca* machen es wahrscheinlich, daß der letzte Schritt der Mytilit-Biosynthese die Epimerisierung von Laminit (D-4-C-Methyl-*myo*-inosit) zu Mytilit ist.

Studies on the Biosynthesis of Cyclitols, XXVI: Formation of Mytilitol (C-Methyl-scyllo-inositol) in Chlorella fusca

Incorporation experiments with ¹⁴C-labelled precursors of mytilitol in *Chlorella fusca* seem to indicate that the last step in the biosynthesis of mytilitol is an epimerization of laminitol (D-4-C-methyl-*myo*-inositol) to mytilitol.

Mytilit (C-Methyl-*scyllo*-inosit) ist bereits seit längerer Zeit als Inhaltsstoff bestimmter Muscheln und einiger Arten von Rotalgen bekannt³. Seine chemische Konstitution wurde von *Ackermann*⁴ aufgeklärt.

In einer vorhergehenden Arbeit aus unserem Laboratorium⁵ wurde berichtet, daß die Grünalge *Chlorella fusca* Mytilit und daneben auch kleinere Mengen des dem Mytilit epimeren Laminit (D-4-C-Methyl-*myo*-inosit) enthält. Orientierende Versuche über die Biosynthese des Mytilits in *Chlorella* ergaben, daß die Aktivität von radioaktiv markierter D-Glucose in Mytilit eingebaut wird, während die Aktivitäten von markiertem *myo*-Inosit bzw. L-Methionin im Mytilit nicht wieder-

¹ Herrn Prof. Dr. *O. Hromatka* zu seinem 65. Geburtstag in freundschaftlicher Verehrung zugeeignet.

² 25. Mitt.: *H. Kindl* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Mh. Chem. **101**, 1704 (1970).

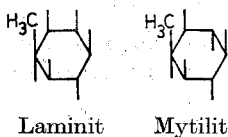
³ *B. C. P. Jansen*, Z. physiol. Chem. **85**, 231 (1913); *D. Ackermann* und *R. Janka*, Z. physiol. Chem. **296**, 283 (1954), **298**, 65 (1954); *B. Lindberg*, Acta chem. Scand. **9**, 1093, 1323 (1955); *B. Wickberg*, Acta chem. Scand. **11**, 506 (1957).

⁴ *D. Ackermann*, Ber. dtsh. chem. Ges. **54**, 1938 (1921).

⁵ *G. Wöber* und *O. Hoffmann-Ostenhof*, Mh. Chem. **100**, 369 (1969).

gefunden wurden, diese beiden Verbindungen also wahrscheinlich keine Vorläufer des Mytilits auf seinem Biosyntheseweg darstellen.

In der vorliegenden Mitteilung wird nun über weitere Versuche über die Biosynthese von Mytilit in *Chlorella fusca* berichtet. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivität von markiertem Laminit mit vergleichsweise sehr guter radiochemischer Ausbeute in Mytilit eingebaut wird. Die Alge ist somit imstande, die Epimerisierung der im Laminit axialen Hydroxylgruppe in Stellung 2 zu einer äquatorialen zu bewerkstelligen.



Materialien und Methoden

Die Kulturbedingungen für *Chlorella fusca* sowie die Herkunft des von uns verwendeten Stammes wurden bereits beschrieben⁵.

Laminit- $u\text{-}^{14}\text{C}$ wurde durch Photoassimilation von $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ in *Porphyridium sp.* [Culture Collection, Indiana University, Bloomington (Ind.), Kat.-Nr. 637] hergestellt. Die Zellen wurden vom Medium durch Zentrifugieren abgetrennt und danach mit 80proz. wäßrigem Äthanol 15 Stdn. unter Rückflußkühlung gekocht. Nach Abfiltrieren des Rückstandes wurde der Extrakt im Vak. zur Trockene eingedampft, mit wenig heißem Wasser aufgenommen und mit Hilfe von Kationenaustauscher (Dowex 50 W \times 4, H^+ -Form, 100—200 mesh) und Anionenaustauscher (Dowex 1 \times 4, OH^- -Form 100—200 mesh) in einer Säule entionisiert. Das Eluat wurde wiederum im Vak. bis fast zur Trocken eingedampft und dann papierchromatographisch gereinigt, wobei die Laufmittel Aceton—Wasser 85 : 15 (v/v) und Phenol—Wasser 4 : 1 (v/v) angewendet wurden. Durch wiederholte chromatographische Trennung im zweitgenannten Laufmittel konnte schließlich etwa 1 mg reiner Laminit- $u\text{-}^{14}\text{C}$ frei von Mytilit erhalten werden; die Präparation hatte die Aktivität von 2,5 μCi .

Eine Suspension von 60 mg Feuchtgewicht *Chlorella fusca* in 10 ml Kulturmedium aus einer Kultur am Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 1 mg Laminit- $u\text{-}^{14}\text{C}$, 2,5 μCi und 10 mg *myo*-Inosit als Hilfsträger versetzt und 48 Stdn. lang bei 20° unter kontinuierlicher Beleuchtung gerührt.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugieren abgetrennt, 10 mg inaktiver Mytilit hinzugesetzt, und aus dem Gemisch mit Hilfe der Methoden, die oben für die Isolierung von Laminit- $u\text{-}^{14}\text{C}$ aus *Porphyridium sp.* beschrieben sind, eine Neutralfraktion gewonnen und diese dann papierchromatographisch auf Mytilit- $u\text{-}^{14}\text{C}$ aufgearbeitet.

Radioaktive Zonen auf den Papierchromatogrammen wurden mit Hilfe eines 4 π -Radiogramm-Scanners (Tracerlab, Waltham, Mass.) bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Auf Grund von in diesem Laboratorium gewonnenen Erfahrungen wurde *myo*-Inosit als Hilfsträger zur Erleichterung der Aufnahme des

ihm chemisch sehr nahe verwandten Laminit in die Zelle verwendet. Eine theoretische Deutung für diesen Effekt kann allerdings noch nicht gegeben werden⁶.

Bei Vorgabe von 2,5 μ Ci Laminit konnte aus den Algen Mytilit mit einer Aktivität von $1,3 \cdot 10^5$ dpm erhalten werden, was einer radiochemischen Ausbeute von 2,3% entspricht. Wenn wir dieses Ergebnis mit demjenigen der entsprechenden Einbauversuche mit D-Glucose vergleichen, die mit einer radiochemischen Ausbeute von 0,3% in den Mytilit eingebaut wird, so legt dies nahe, daß Laminit im Biosyntheseweg des Mytilits diesem nähersteht als D-Glucose.

Wie wir in einer weiteren Mitteilung dieser Reihe⁷ berichten, ist es uns gelungen, in einer *Porphyridium*-Art einen Aufbauweg für Laminit wahrscheinlich zu machen. L-*gluco*-Heptulose, entstanden durch Transketolase-Übertragung eines C₂-Bruchstücks auf L-Arabinose, scheint dabei die Rolle eines Zwischenproduktes zu spielen. Derselbe Syntheseweg dürfte auch in *Chlorella* vorliegen; somit läge auf Grund der vorliegenden Ergebnisse Laminit auf dem Weg zwischen D-Glucose und Mytilit.

Die Umwandlung von Laminit in Mytilit ist eine Epimerisierung, ein Reaktionstypus, dem wir bei unseren Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite bereits häufig begegnet sind. In einem derartigen Fall, nämlich bei der Epimerisierung von Sequoyit zu D-Pinit in Inkarnatklée (*Trifolium incarnatum*), haben wir das für diese Epimerisierung verantwortliche Enzymsystem isoliert und charakterisiert⁸. Orientierende Versuche über die anderen Epimerisierungen in der Cyclitreihe scheinen zu zeigen, daß hier überall gleichartige Mechanismen vorliegen.

In *Chlorella* scheinen bei der Biosynthese der als Inhaltsstoff charakterisierten Cyclite zwei derartige Epimerisierungen vor sich zu gehen, nämlich die in der vorliegenden Arbeit behandelte Umwandlung von Laminit in Mytilit und die Bildung von D-*chiro*-Inosit aus *myo*-Inosit, die in der Alge, im Gegensatz zu den höheren Pflanzen, direkt, das heißt ohne vorhergehende Methylierung des *myo*-Inosits zu Sequoyit, erfolgt. Es müssen daher in *Chlorella* zwei derartige Epimerisierungssysteme vorliegen, es sei denn, daß — was auf Grund der stereochemischen Verhältnisse eher unwahrscheinlich ist — beide Epimerisierungen durch ein und dasselbe Enzymsystem verursacht werden. Eine Untersuchung zur Klärung dieser Verhältnisse ist geplant.

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

⁶ Vgl. dazu W. Hülsen und U. Prenzel, Z. Naturforsch. **22 b**, 683 (1967).

⁷ G. Wöber und O. Hoffman-Ostenhof, Europ. J. Biochem. (in Druck).

⁸ H. Ruis und O. Hoffmann-Ostenhof, Europ. J. Biochem. **7**, 442 (1969).