

## Untersuchungen über die Biosynthese der Cyclite, 27. Mitt.<sup>1,2</sup>:

Ein Dehydrogenase-System, das die Epimerisierung von *myo*-Inosit zu *D-chiro*-Inosit in *Chlorella fusca* katalysieren kann

Von

**G. Wöber, H. Ruis und O. Hoffmann-Ostenhof\***

Aus der Lehrkanzel für Biochemie der Universität Wien

(Eingegangen am 9. September 1970)

*Studies on the Biosynthesis of Cyclitols, XXVII: A Dehydrogenase System That Can Catalyze the Epimerization of myo-Inositol to D-chiro-Inositol*

An enzyme system that probably catalyzes the epimerization of *myo*-inositol to *D-chiro*-inositol has been found in *Chlorella fusca*; *D*-2.3.5/4.6-pentahydroxycyclohexanone is an intermediate in this reaction. *NAD*<sup>+</sup> and *NADPH* are required for the epimerization reaction.

In *Chlorella fusca* konnte ein Enzymsystem nachgewiesen werden, das wahrscheinlich die Epimerisierung von *myo*-Inosit zu *D-chiro*-Inosit katalysiert, wobei *D*-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon als Zwischenprodukt der Reaktion auftritt. Für die Epimerisierung sind *NAD*<sup>+</sup> und *NADPH* erforderlich.

In einer früheren Untersuchung aus diesem Laboratorium<sup>3</sup> war berichtet worden, daß *Chlorella fusca* neben anderen Cycliten auch *D-chiro*-Inosit enthält. Dieser Cyclit wird aber nicht auf die gleiche Weise gebildet wie in höheren Pflanzen, wo seinerzeit ein Aufbauweg für *D-chiro*-Inosit nachgewiesen werden konnte, der über zwei methylierte Produkte, Sequoyit (5-O-Methyl-*myo*-inosit) und *D*-Pinit (4-O-Methyl-

---

\* Herrn Professor Dr. G. Mothes zu seinem 70. Geburtstag in Verehrung zugeeignet.

<sup>1</sup> 26. Mitt.: G. Wöber und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **101**, 1861 (1970).

<sup>2</sup> Teilergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden von H. Ruis beim 6th Meeting, Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Madrid, 1969, vorgetragen (Abstract 363).

<sup>3</sup> G. Wöber und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **100**, 369 (1969).

D-*chiro*-inosit) führt<sup>4</sup>; die Epimerisierung erfolgt dort somit nicht direkt, sondern auf der Stufe der Methyläther. Im Gegensatz dazu ergaben unsere Versuche an *Chlorella*, daß in diesen Algen *myo*-Inosit direkt zu D-*chiro*-Inosit epimerisiert wird und daß methylierte Zwischenprodukte sicher nicht vorliegen<sup>3</sup>.

Die Frage, inwieweit die Umwandlung von *myo*-Inosit in D-*chiro*-Inosit in *Chlorella* ebenso wie andere analoge Epimerisierungen in der Cyclitreihe<sup>5</sup> nach dem Schema einer intramolekularen stereospezifischen Redoxreaktion verläuft, erschien uns von einigem Interesse. Wir haben deshalb versucht, das für diese Umwandlung verantwortliche Enzym-system aus *Chlorella* zu isolieren und zu charakterisieren, worüber in dieser Mitteilung berichtet werden soll.

### Materialien und Methoden

Die Herstellung der Substrate, D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon und D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon- $u\text{-}^{14}\text{C}$ , ist in einer vorhergehenden Mitteilung<sup>5</sup> beschrieben. *NADH* und *NADPH* wurden von C. F. Boehringer und Söhne, Mannheim, bezogen, eine teilweise gereinigte Cellulase-Präparation, die bei der Herstellung der Enzympräparationen Verwendung fand, von Worthington, Freehold (N. J.), USA.

Die Kulturbedingungen für *Chlorella fusca* sowie die Herkunft des von uns verwendeten Stammes wurden bereits berichtet<sup>3</sup>. Zum Aufbrechen der Zellen für die Herstellung von Enzympräparationen wurden verschiedene Verfahren verwendet; Ultraschallbehandlung mit der „MSE-Ultrasonic Power Unit“ sowie die Behandlung im Homogenisator nach *Merkenschlager* und Mitarb.<sup>6</sup> erwiesen sich als die am besten geeigneten Methoden. Zur Messung der Proteinkonzentration in farblosen Lösungen wurde nach *Warburg* und *Christian*<sup>7</sup> verfahren; bei gefärbten Präparationen bedienten wir uns der Methode von *Folin* und *Ciocalteu*<sup>8</sup>.

Die Aktivität der Enzympräparationen wurde durch Messung der Extinktion des reduzierten Coenzym (*NADH* bzw. *NADPH*) bei 340 nm im Spektralphotometer bestimmt. Die Inkubationsansätze enthielten Enzym (0.1 bis 0.5 mg Protein, 0.36  $\mu\text{Mol}$  Coenzym (*NADH* oder *NADPH*), 2.6  $\mu\text{Mol}$  D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon und 150  $\mu\text{Mol}$  Phosphatpuffer (pH 7.0) in 3 ml Gesamtvolumen.

Zur Isolierung der Produkte wurde mit folgenden Laufmitteln im absteigenden Verfahren papierchromatographisch aufgetrennt: (A): Aceton—Wasser 85 : 15 (v/v); (B): Benzol—Dimethylformamid—Wasser 10 : 10 : 1 (v/v/v); (C): Phenol—Wasser 4 : 1 (v/v).

<sup>4</sup> R. Scholda, G. Billek und O. Hoffmann-Ostenhof, Mh. Chem. **95**, 1311 (1964).

<sup>5</sup> H. Ruis und O. Hoffmann-Ostenhof, Europ. J. Biochem. **7**, 442 (1969).

<sup>6</sup> H. Merckenschlager, K. Schlossmann und W. Kurz, Biochem. Z. **329**, 332 (1957).

<sup>7</sup> O. Warburg und W. Christian, Biochem. Z. **310**, 384 (1941).

<sup>8</sup> O. Folin und V. Ciocalteu, J. biol. Chem. **73**, 672 (1927).

Die Chromatogramme wurden mit acetone,  $\text{AgNO}_3$  und äthanol.  $\text{NaOH}$  entwickelt<sup>9</sup>.

Zur Lokalisierung von radioaktiv markierten Produkten auf Papierchromatogrammen verwendeten wir einen „Chromatogramscanner“ (Tracerlab, Waltham, Mass.); zur quantitat. Bestimmung wurde mit dem Toluol-Szintillator im Nuclear-Chicago-Szintillationszähler gemessen.

## Ergebnisse

### *Herstellung enzymaktiver Präparationen*

Nachdem einige Versuche, mit Hilfe verschiedener Methoden zu aktiven Enzympräparationen zu kommen, keinen Erfolg gebracht hatten, konnten schließlich zwei Verfahren des Zellaufbrechens gefunden werden, die beide zu aktiven Extrakten führten.

8 g (Feuchtwicht) gewaschene Zellen, suspendiert in 0.2M-Phosphatpuffer, pH 7.0, werden portionsweise unter Kühlung mit Ultraschall behandelt. Nach Abzentrifugieren der Zellbruchstücke wird ein hellgrün gefärbter Extrakt erhalten, der die gewünschte Enzymaktivität zeigt.

Ein Extrakt ähnlich hoher Enzymaktivität wurde auch mit Hilfe des Homogenisators nach *Merkenschlager*<sup>6</sup> erhalten. Dabei wurde meist folgendermaßen vorgegangen: 25 g Zellen (Feuchtwicht) wurden durch wiederholtes Aufschlännen in 0.02M-Phosphatpuffer, pH 7.0, und Zentrifugieren gewaschen, dann in 0.2M-Phosphatpuffer, pH 7.0, suspendiert und in 3 Portionen je 5 Min. unter Kühlung im Homogenisator geschüttelt. Die vereinigten Homogenate wurden  $\frac{1}{2}$  Stde. bei  $30\,000 \times g$  zentrifugiert. Die mit Hilfe einer der beiden Methoden erhaltene Lösung wurde mit festem Ammoniumsulfat bis zur halben Sättigung versetzt und der Niederschlag verworfen. Dabei und bei allen folgenden Arbeitsvorgängen wurde eine Temperatur von  $+4^\circ\text{C}$  nicht überschritten. Dann wurde mit weiterem festen Ammoniumsulfat bis zur völligen Sättigung versetzt und der nunmehr entstandene Niederschlag nach Abzentrifugieren in einigen ml 0.05M-Phosphatpuffer, pH 7.0, aufgelöst; diese Lösung wurde anschließend auf eine Säule ( $2.5 \times 50$  cm) von Sephadex G-100 aufgebracht. Es wurde dann mit der gleichen Pufferlösung eluiert und die einzelnen Fraktionen auf Protein und auf Enzymaktivität untersucht.

Die spezif. Aktivität der so erhaltenen Präparationen war verhältnismäßig gering; sowohl mit *NADH* als auch mit *NADPH* wurden Werte von etwa  $3 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{Mol/Min. mg Protein}$  gemessen.

*Spezifität der Enzympräparationen.* In Anwesenheit von D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon werden sowohl *NADH* als auch *NADPH* dehydriert; eine Trennung der Enzympräparationen in Anteile, die ausschließlich oder bevorzugt eines der beiden Coenzyme oxydieren, konnte niemals erreicht werden. Im Gegensatz zu dem Enzymsystem aus *Trifolium incarnatum*, welches das in 5-Stellung methylierte Pentahydroxycyclohexanon zu Sequoyit bzw. D-Pinit reduziert<sup>5, 10</sup>, konnte kein Einfluß von SH-Verbindungen auf die Enzymaktivität gefunden werden.

<sup>9</sup> W. E. Trevelyan, D. P. Procter und J. S. Harrison, *Nature* **166**, 444 (1950).

<sup>10</sup> G. J. Kremlicka und O. Hoffmann-Ostenhof, *Z. physiol. Chem.* **344**, 261 (1966).

Vorläufige Versuche zeigten, daß nicht nur D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon, sondern auch andere analoge Verbindungen unter den Bedingungen unseres Enzymtestes reduziert werden. So wird das Substrat des Enzymsystems aus *Trifolium incarnatum*, D-5-O-Methyl-2.3.5/4.6-pentahydroxycyclohexanon, sowohl in Anwesenheit von *NADH* als auch von *NADPH* vom Enzymsystem hydrogeniert; die Reaktionsgeschwindigkeit ist hier kaum geringer als mit D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon als Substrat.

*Produkte der Reduktion von D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon mit NADH bzw. NADPH.* In analoger Weise, wie das bei dem Enzymsystem aus *Trifolium incarnatum* beschrieben wurde, bestimmten wir die Produkte der Reduktion von u-<sup>14</sup>C-D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon, indem wir die radioaktiv markierten Produkte nach Entionisierung des Inkubationsgemisches mit Hilfe der Laufmittel A und B papierchromatographisch auftrennten. Dabei wurde, wenn *NADPH* als Coenzym fungierte, in einem bei weitem überwiegenden Ausmaß D-*chiro*-Inosit erhalten, während Inkubation mit *NADH* vorwiegend *myo*-Inosit ergab. Das Verhältnis der entstandenen Produkte *myo*-Inosit zu D-*chiro*-Inosit schwankte allerdings ziemlich stark von Versuch zu Versuch, was möglicherweise durch die noch relativ geringe Reinigung unserer Enzympräparationen bedingt war.

*pH-Optima der Enzymwirkung.* Bei Verwendung von *NADH* als Wasserstoffdonor wird ein relativ breites pH-Optimum um pH 7.5 gefunden; mit *NADPH* als Coenzym ist das Optimum etwas ins Alkalische verschoben und das Maximum liegt bei pH 7.8.

*Michaelis-Konstanten.* Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den Konzentrationen des Substrats und der Coenzyme entspricht der *Michaelis-Menten*-Kinetik. Bei Bestimmung der *Michaelis*-Konstanten mit Hilfe von *Lineweaver-Burk*-Diagrammen ergaben sich für D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon mit gleichbleibenden Konzentrationen von *NADH* als Coenzym  $K_M = 9 \cdot 10^{-4}M$ , sowie von *NADPH* als Coenzym  $K_M = 8 \cdot 10^{-4}M$ . Bei gleichbleibender Konzentration des Substrates wurde für *NADH*  $K_M = 2.2 \cdot 10^{-4}$  und für *NADPH*  $K_M = 1.4 \cdot 10^{-4}M$  bestimmt.

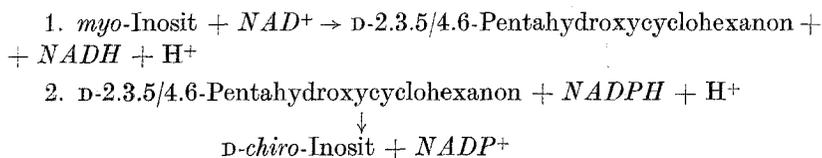
## Diskussion

Das hier beschriebene Enzymsystem aus *Chlorella fusca* weist große Ähnlichkeiten mit demjenigen auf, das wir seinerzeit aus *Trifolium incarnatum* isolieren konnten<sup>5, 10</sup>. Ein markanter Unterschied scheint darin zu bestehen, daß beim System aus Algen Sulfhydrylgruppen offensichtlich keine Rolle spielen, während das Enzymsystem aus höheren Pflanzen bei der Reaktion mit *NADH* — nicht aber bei derjenigen mit *NADPH* — gegenüber SH-Reagentien sehr empfindlich ist.

Ohne Zweifel sind die physiologischen Substrate der beiden Enzymsysteme voneinander verschieden; während in *Trifolium* Sequoyit, ein in 5-Stellung methylierter *myo*-Inosit, mit größter Wahrscheinlichkeit als physiologisches Substrat fungiert, dürfte es bei *Chlorella*, die nach früheren Ergebnissen zur Methylierung von Inositen nicht imstande ist, *myo*-Inosit selbst sein. Dementsprechend sind auch andere Produkte zu erwarten, nämlich in der höheren Pflanze D-Pinit und in der Alge

D-*chiro*-Inosit; diese werden auch in den entsprechenden Organismen als Hauptbestandteile der Cyclitfraktion gefunden.

Unsere hier berichteten Versuche können noch nicht als absoluter Beweis dafür gewertet werden, daß das beschriebene Enzymsystem tatsächlich zur Überführung von *myo*-Inosit in D-*chiro*-Inosit imstande ist, da wir bisher noch nicht versucht haben, eine solche Überführung direkt nachzuweisen und auch aus Gründen der bekannten Gleichgewichtslage die Teilreaktion der Oxydation von *myo*-Inosit zu D-2.3.5/4.6-Pentahydroxycyclohexanon mit  $NAD^+$  (oder  $NADP^+$ ) als Wasserstoffakzeptor nicht in dieser Reaktionsrichtung untersucht haben. Vor allem aus Analogiegründen, wobei wir uns auf das sehr eingehend untersuchte Enzymsystem der Sequoyit-Epimerisierung aus *Trifolium incarnatum*<sup>6</sup> beziehen, können wir es doch als sehr wahrscheinlich annehmen, daß unser Enzym tatsächlich zur Epimerisierung von *myo*-Inosit zu D-*chiro*-Inosit imstande ist. Diese würde in zwei Teilreaktionen vor sich gehen:



Unsere bisherigen Ergebnisse lassen noch keine Aussage zu, ob diese beiden Teilreaktionen durch zwei verschiedene Enzyme oder durch ein Enzymprotein, das zwei aktive Zentren besitzt, katalysiert werden. Bei unseren, allerdings noch nicht sehr weit gediehenen Reinigungsversuchen konnte niemals eine Separation der beiden Aktivitäten beobachtet werden.

Abschließend soll hier festgestellt werden, daß die bisher bekannten Epimerisierungen in der Cyclitreihe, die beim Stoffwechsel und der Biosynthese dieser Substanzen eine wesentliche Rolle spielen, in allen Fällen, wo eine eingehendere enzymologische Untersuchung vorgenommen wurde, als Dehydrogenase-Systeme des hier beschriebenen Typus erkannt wurden. Dies gilt für das System der Epimerisierung von *myo*-Inosit zu *scyllo*-Inosit in der Wanderheuschrecke *Schistocerca gregaria*<sup>11</sup>, das hier bereits mehrfach erwähnte System der Epimerisierung von Sequoyit zu D-Pinit in höheren Pflanzen<sup>5, 10</sup> sowie das hier beschriebene System; diese drei Systeme sind im Schema I wiedergegeben.

Obwohl die Cyclitepimerisierungen in den genannten Fällen auf sehr ähnliche Weise ablaufen, sind die dafür verantwortlichen Enzyme keinesfalls identisch. So unterscheidet sich das System aus *Chlorella* von dem aus *Trifolium* recht deutlich in bezug auf verschiedene Eigenschaften, wie *Michaelis*-Konstanten, pH-Optima und Verhalten gegenüber Sulphydrylreagentien.

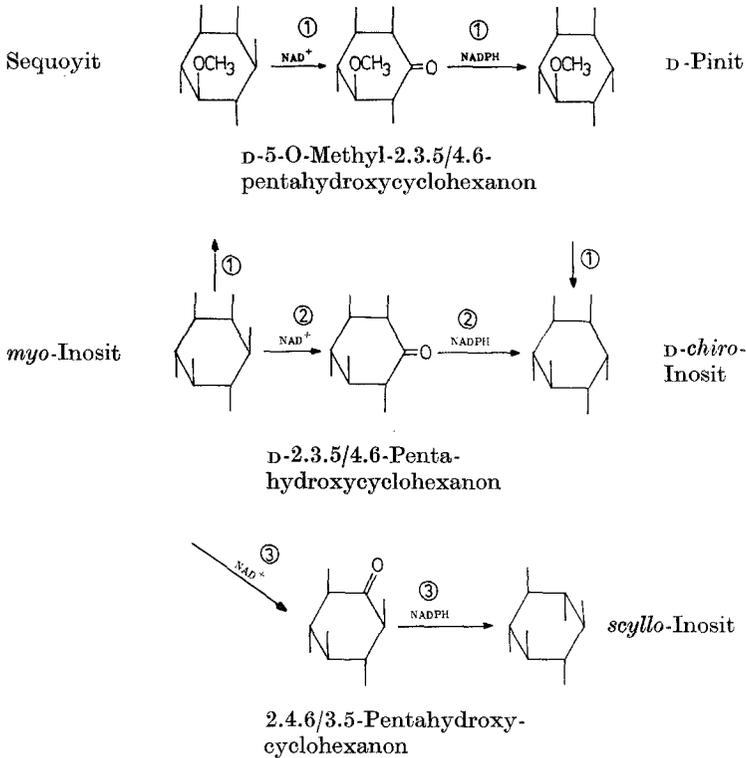
<sup>11</sup> D. J. Candy, Biochem. J. **103**, 666 (1967).

Schema I. Die drei nachweislich durch Dehydrogenase-Systeme bewirkten Epimerisierungen in der Inositreihe

① : *Trifolium incarnatum*

② : *Chlorella fusca*

③ : *Schistocerca gregaria*



Vom physiologischen Standpunkt ist interessant, daß in der Alge ein direkter Weg von *myo*-Inosit zu D-*chiro*-Inosit führt, während die höhere Pflanze diese Reaktion nur auf dem Umweg über die Methyläther Sequoyit und D-Pinit bewerkstelligen kann.

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