

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BIOSYNTHESE DER CYCLITE—XIV.¹

DIE BILDUNG VON L-VIBURNIT IN *CHRYSANTHEMUM LEUCANTHEMUM*

H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF

Organisch-Chemisches Institut der Universität Wien, Österreich

(Received 25 May 1966)

Zusammenfassung—Versuche über den Einbau radioaktiv markierter möglicher Vorstufen in L-Viburnit an Blättern von *Chrysanthemum leucanthemum* ergaben, daß einzig D-Glucose mit nennenswerter radiochemischer Ausbeute in L-Viburnit eingebaut wird. Bei Verwendung von markiertem meso-Inositol, L-Inositol, L(-)-Quercit und L-Leucanthesmitol konnte kein meßbarem Einbau der Aktivität festgestellt werden, so daß diese Cyclite kaum als Vorläufer im Biosyntheseweg des L-Viburnits in Frage kommen. D-Glucose-6-³H wurde in der Pflanze in L-Viburnit-4-³H überführt, während nach Gabe von D-Glucose-1-¹⁴C etwa 60% der Aktivität im C-3 des L-Viburnits wiedergefunden wurden.

Abstract—In experiments on the incorporation of labelled possible precursors into L-viburnitol in *Chrysanthemum leucanthemum* it was found that only D-glucose is incorporated into the cyclitol with an appreciable radiochemical yield. With labelled meso-inositol, L-inositol, L(-)-quercitol and L-leucanthesitol no measurable incorporation of the activity could be detected; these cyclitols are obviously not functioning as precursors in the biosynthetic pathway for L-viburnitol. D-Glucose-6-³H was transformed to L-viburnitol-4-³H in the plant, whereas after application of D-glucose-1-¹⁴C about 60% of the activity could be recovered in C-4 of L-viburnitol.

IN HÖHEREN Pflanzen konnten bisher drei Cyclohexanpentole nachgewiesen werden, es sind dies L-Viburnit, L(-)-Quercit und D(+)-Quercit. Über die Bildung dieser Substanzen in den Pflanzen war bisher noch nichts bekannt. In den letzten Jahren ist es nun gelungen, die Biosynthese der Cyclohexanhexole, der sog. Inosite, weitgehend aufzuklären. Es scheint einen Aufbauweg für meso-Inositol zu geben, der eine Cyclisierung von D-Glucose-6-phosphat zu meso-Inositol-1-phosphat als charakteristischen Schritt enthält und der sowohl in höheren Pflanzen² als auch in tierischem Gewebe³ und in Mikroorganismen⁴ nachgewiesen wurde. Die übrigen in der Natur vorgefundenen Inosite scheinen allgemein durch Epimerisierungsreaktionen aus meso-Inositol zu entstehen; direkte Epimerisierungen dieser Art sind für die Bildung von Scyllit in tierischem Gewebe⁵ und in höheren Pflanzen,⁶ sowie für die Entstehung von L-Inositol in höheren Pflanzen⁷ verantwortlich, während die Umwandlung von meso-Inositol

¹ XIII. Mitteilung: H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Phytochem.* 5, 1091 (1966).

² F. A. LOEWUS und S. KELLY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7, 204 (1962); H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Biochem. Z.* 339, 374 (1964); H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Monatsh. Chem.* 95, 548 (1964).

³ F. EISENBERG, Jr. und A. H. BOLDEN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 72 (1963); F. EISENBERG, A. H. BOLDEN und F. A. LOEWUS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 419 (1964).

⁴ J. NEUBACHER, H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Biochem. J.* 92, 56P (1964); H. KINDL, J. BIEDL-NEUBACHER und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Biochem. Z.* 341, 157 (1965); J. W. CHEN und F. C. CHARALAMPOU, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 17, 521 (1964).

⁵ T. POSTERNAK, W. H. SCHOPFER, B. KAUFMANN-BOETSCH und S. EDWARDS, *Helv. Chim. Acta* 46, 2676 (1963).

⁶ R. SCHOLDA, G. BILLEK und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Z. Physiol. Chem.* 339, 28 (1964).

⁷ R. SCHOLDA, G. BILLEK und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Monatsh. Chem.* 95, 541, 1305 (1964).

in D-Inosit über einen Methyläther, den Sequoyit, erfolgt, welcher der Epimerisierung zum entsprechenden Methyläther des D-Inosits, dem D-Pinit, unterliegt; die letztgenannte Substanz kann dann von der Pflanze zu D-Inosit entmethyliert werden.⁸

Es erschien uns nun naheliegend und von Interesse, die Wege der Biosynthese der Cyclohexanpentole zu untersuchen. In der vorliegenden Mitteilung beschäftigen wir uns mit dem Aufbauweg des L-Viburnits, eines Inhaltsstoffes zahlreicher höherer Pflanzen; als Versuchssubjekt wurde *Chrysanthemum leucanthemum* verwendet, eine Pflanze, welche Cyclohexanhexole, Cyclohexanpentole und ein Cyclohexentetrol enthält und somit zum Vergleich der Biosynthese verschieden stark hydroxylierter Cyclohexanverbindungen besonders geeignet ist.

ERGEBNISSE

1. Analyse der Cyclitfraktion von Chrysanthemum leucanthemum

Mit den in der vorhergehenden Mitteilung¹ beschriebenen Methoden konnten in der Pflanze neben L-Viburnit (I), meso-Inosit (II), L-Inosit (III), L(-)-Quercit (IV) und L-Leucanthemit (V)⁹ nachgewiesen werden (Abb. 1). Dabei werden etwa gleiche Mengen von meso-Inosit und L-Viburnit gefunden, welche die Hauptcyclite der Pflanze darstellen; die anderen genannten Cyclite kommen in wesentlich geringeren Mengen vor.

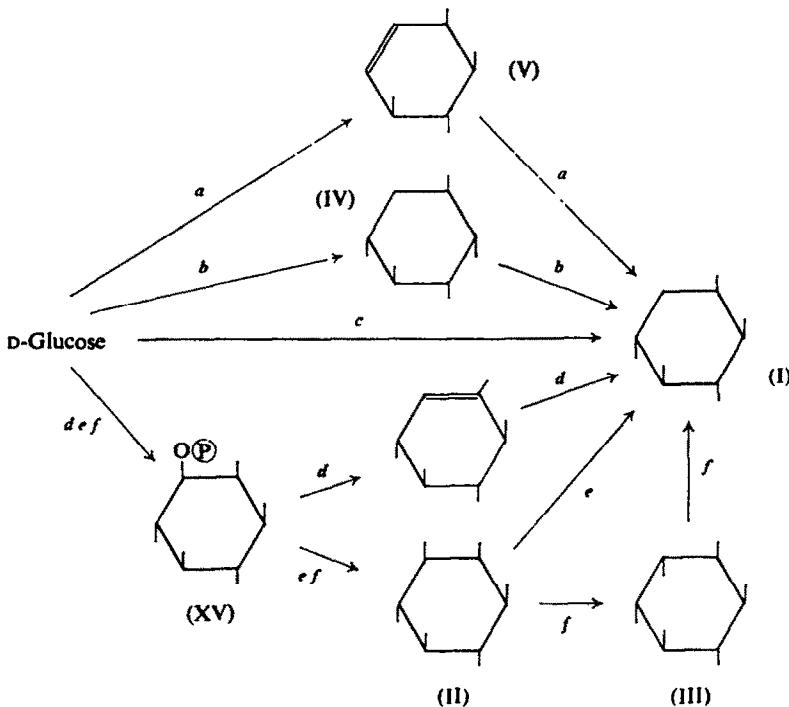


ABB. 1. EINIGE MÖGLICHE ÜBERGÄNGE VON D-GLUCOSE IN L-VIBURNIT.

⁸ R. SCHOLDA, G. BILLEK und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Z. Physiol. Chem.* 335, 180 (1964); *Monatsh. Chem.* 95, 1311 (1964).

⁹ V. PLOUVIER, *Compt. rend.* 255, 360 (1962).

2. Applikation radioaktiv markierter Vorstufen

Vorversuche zeigten, daß das Verhältnis von entstandenem meso-Inosit zu L-Viburnit bei kurzdauernder Photoassimilation in $^{14}\text{CO}_2$ und bei Applikation von D-Glucose-u- ^{14}C etwa gleich ist.

Die Ergebnisse der Einbauversuche mit verschiedenen möglichen Vorläufern des L-Viburnits sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Daraus läßt sich entnehmen, daß einzig allein markierte D-Glucose zu einem gut meßbaren Aktivitätseinbau in L-Viburnit führt; die radioaktive Ausbeute ist je nach Stoffwechselzeit verschieden und erreicht maximal 0,85%.

Nur bei sehr langer Stoffwechselzeit, in der bereits ein weitgehender Abbau der angewandten Substanzmenge zu erwarten ist, kann bei Applikation von markiertem meso-Inosit ein minimaler Einbau der Aktivität in L-Viburnit beobachtet werden.

TABELLE 1. VERSUCHE ÜBER DEN EINBAU VERSCHIEDENER MÖGLICHER VORSTUFEN IN L-VIBURNIT IN BLÄTTERN VON *Chrysanthemum leucanthemum*

Vorstufe	Menge mg	Aktivität μc	Menge (g) an Pflanzenmaterial	Einwirkungszeit in Tagen	Einbau in L-Viburnit in Prozenten
meso-Inosit-u- ^{14}C	10	2,5	20	10	<0,1
meso-Inosit-u- ^{14}C	1,5	2,5	20	5	<0,05
meso-Inosit-u- ^{14}C	0,5	2,5	20	5	<0,05
meso-Inosit-u- ^{14}C	20	2,5	20	10	<0,1
D-Glucose-u- ^{14}C	10	10	5	10	0,85
D-Glucose-u- ^{14}C	5	10	5	5	0,65
D-Glucose-1- ^{14}C	5	100	10	3,5	0,40
D-Glucose-6- ^3H	7	400	10	1,5	0,25
L(-)-Quercit-u- ^{14}C	5	4	20	5	<0,05
L-Inositol-u- ^{14}C	15	1	10	10	<0,1
L-Inositol-u- ^{14}C	5	1	10	5	<0,1
L-Leucanthemol-u- ^{14}C	5	0,5	10	5	<0,1

3. Selektiver Abbau des L-Viburnits

Zur Aufklärung des Übergangs von D-Glucose in L-Viburnit war es notwendig, einen Abbauweg zu entwickeln, der es ermöglicht, die Aktivität in den einzelnen Positionen des L-Viburnit-Moleküls zu lokalisieren. Eine solche, rein chemische Abbaumethode konnte unter Ausnutzung der günstigen Asymmetrieverhältnisse gefunden werden (Abb. 2).

L-Viburnit wird nach Posternak¹⁰ in 1,2-O-Isopropyliden-3,4,5-O-triacetyl-L-viburnit (VI) überführt, der nach Behandlung mit Natriummethylat 1,2-O-Isopropyliden-L-viburnit ergibt. Der Cyclohexanring wird dann mit Hilfe von Perjodat oxydativ aufgespalten, wobei Ameisensäure und 2-Desoxy-3,4-O-isopropyliden-L-erythro-pentodialdose entstehen. Man reduziert mit Natriumborhydrid und spaltet die Isopropylidengruppe ab. Der resultierende 2-Desoxy-L-ribit (VII) wird nach papierchromatographischer Reinigung weiter mit Perjodat abgebaut, wobei β -Hydroxypropionaldehyd, Ameisensäure und Formaldehyd entstehen. Beim Ausäthern verbleibt vorwiegend β -Hydroxypropionaldehyd im Äther, während Formaldehyd und Ameisensäure sich in der wäßrigen Phase finden. Formaldehyd wird als Methylendimedon (VIII) gefällt und die Ameisensäure aus dem Filtrat als p-Bromphenylacylformiat (IX) erhalten.¹¹ β -Hydroxypropionaldehyd wird mit Bromwasser zu β -Hydroxy-

¹⁰ T. POSTERNAK, *Helv. Chim. Acta* 33, 350 (1950).

¹¹ O. GABRIEL, *Anal. Biochem.* 10, 143 (1965).

propionsäure (X) oxydiert und diese nach Unrau und Canvin¹² oxydativ decarboxyliert. Die entstehende Essigsäure kann man schließlich nach Phares¹³ zu CO_2 und Methylamin abbauen.

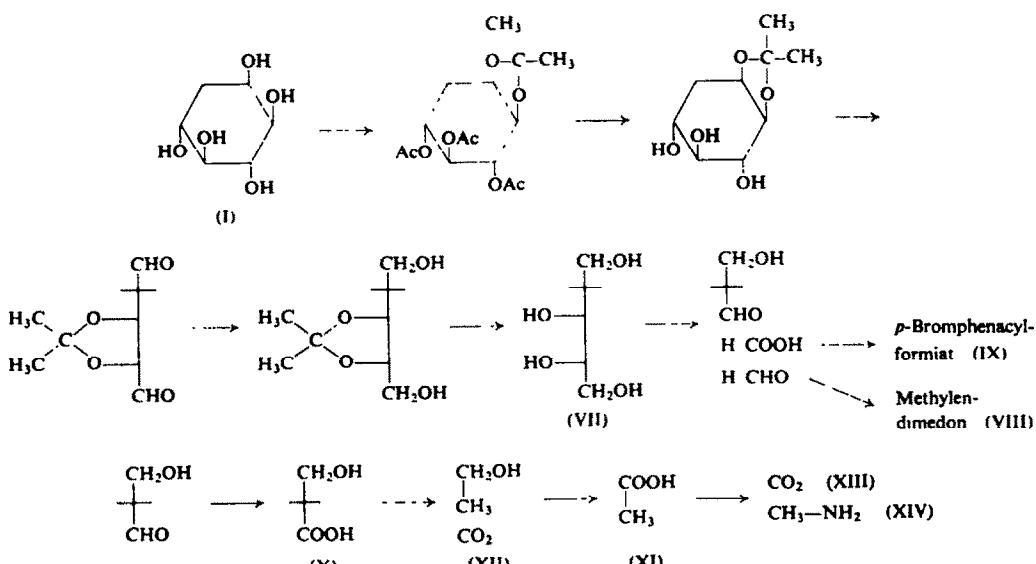


ABB. 2. SELEKTIVER ABBAU VON L-VIBURNIT.

4. Anwendung des Abbaus auf biosynthetisch erhaltenen L-Viburnit

Der aus spezifisch markierter D-Glucose entstandene L-Viburnit wurde primär in Triacetyl-isopropyliden-L-viburnin überführt; dieses Derivat wurde über eine Kieselgelsäule gereinigt und mit inaktivem Material verdünnt. In den folgenden Schritten bei der Aufspaltung des Cyclohexanrings wurde dann nicht mehr weiter mit inaktiver Substanz verdünnt.

Die Ergebnisse der Abbauversuche mit L-Viburnit, der in der Pflanze aus D-Glucose-1-¹⁴C gebildet wurde, sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Daraus ersieht man, daß der Großteil der Aktivität im L-Viburnit-Molekül, nahezu 60 %, im C-3 lokalisiert war.

Der aus D-Glucose-6-³H in *Chrysanthemum leucanthemum* bei besonders kurz dauerndem Stoffwechsel (36 hr) erhaltene L-Viburnit enthielt die gesamte Aktivität—über 98 %—am C-4. Dies läßt sich aus der Tatsache schließen, daß der nach Abbau von Triacetyl-isopropyliden-L-viburnit erhaltene 2-Desoxy-L-ribit (VII) praktisch inaktiv war.

DISKUSSION

Wie eingangs erwähnt, liegen über die Biosynthese des L-Viburnits bisher noch keine experimentellen Befunde vor. Eine Vermutung von Plouvier,¹⁴ wonach L-Inositol eine Vorstufe von L-Viburnit sein könnte, beruht vor allem auf der Ähnlichkeit der Konfiguration der beiden Cyclite sowie darauf, daß ein gemeinsames Vorkommen in der Natur manchmal beobachtet wird.

Daneben sind aber natürlich zahlreiche weitere Biosynthesewege vorstellbar, wobei auch

¹² A. M. UNRAU und D. T. CANVIN, *Can. J. Chem.* 41, 607 (1963).

¹³ E. F. PHARES, *Arch. Biochem. Biophys.* 33, 176 (1951).

¹⁴ V. PLOUVIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 45, 1079 (1963).

die anderen neben L-Viburnit in der Pflanze vorkommenden Cyclite als Vorläufer in Frage kommen, da sie alle in wenigen biologisch möglichen Reaktionsschritten in L-Viburnit übergehen könnten.

In Abb. 1 ist eine Anzahl von solchen vorstellbaren Wegen der Umwandlung von D-Glucose in L-Viburnet (I) dargestellt. Weg *a* führt über L-Leucanthemit (V) zu L-Viburnit; hier ist nur eine einfache Hydratisierung des Cyclohexentetrols erforderlich, um zum L-Viburnit zu gelangen. Die in Weg *b* gezeigte Epimerisierung des L(−)-Quercit (IV) zu L-Viburnit wäre der in diesem Laboratorium eingehend studierten Epimerisierung von Sequoyit zu D-Pinit⁸ völlig analog. Weg *c* repräsentiert eine Überführung von D-Glucose in L-Viburnit, wobei kein bekannter Cyclit als Zwischenprodukt fungiert. Ferner könnte das Zwischenprodukt der Biosynthese des meso-Inosits, meso-Inositol-phosphat (XV), durch Phosphatelimination und folgender Hydrierung der entstandenen Ketoverbindung in L-Viburnit übergehen, wie das in Weg *d* gezeigt wird. Die Reduktion derartiger Cyclohexanone wird in der Natur häufig beobachtet. Schließlich wäre eine Enthydroxylierung von meso-Inositol (II) und L-Inositol (III) vorstellbar (*e* und *f*).

TABELLE 2. SELEKTIVER ABBAU DES IN BLÄTTERN VON *Chrysanthemum leucanthemum*
AUS D-GLUCOSE-1-¹⁴C ENTSTANDENEN L-VIBURNITS

Verbindung	Spez. Akt. dpm/mMol	Repräsentiert die folgenden C-Atome von L-Viburnit	Prozent der Aktivität bezogen auf Triacetyl- isopropyliden-L-viburnit (VI)
Triacetyl-isopropyliden-L-viburnit (VI)	67,500	C-1, C-2, C-3 C-4, C-5, C-6	100
Desoxy-L-ribit (VII)	62,700	C-1, C-2, C-3 C-5, C-6	92
Methylendimedon (VIII)	40,000	C-3	59
p-Bromphenacylformiat (IX)	6,700	C-2	10
β-Hydroxypropionsäure (X)	17,000	C-1, C-5, C-6	25
Essigsäure (XI)	6,750	C-5, C-6	10
CO ₂ (XII)	9,450	C-1	14
CO ₂ (XIII)	2,700	C-5	4
Methylamin (XIV)	4,700	C-6	7

Die Ergebnisse unserer Einbauversuche (Tabelle 1) schließen bereits die Wege *a*, *b*, *e* und *f* weitgehend aus, denn die Aktivität der darin postulierten Vorläufer wird nicht in L-Viburnit eingebaut. Eine Unterscheidung zwischen den Wegen *c* und *d* lässt sich allerdings auf Grund der berichteten Einbauversuche nicht vornehmen. Eine solche ist aber möglich, wenn wir die Ergebnisse derjenigen Experimente betrachten, bei denen selektiv markierte D-Glucose in L-Viburnit eingebaut wurde und dieser dann einem spezifischen Abbau zur Lokalisierung der Aktivität unterzogen wurde.

Wie verschiedene Vorversuche ergaben, ist L-Viburnit ebenso wie übrigens auch D-Quercit in *C. leucanthemum* einem starken Stoffwechsel unterworfen. Dies macht verständlich, warum bei Gabe von D-Glucose-1-¹⁴C bereits nach vergleichsweise kurzer Stoffwechselzeit eine deutliche Verschmierung ("randomization") der Aktivität über alle Kohlenstoffatome des Cyclohexanskeletts zu beobachten ist (Tabelle 2). Wir können allerdings einen deutlichen Schwerpunkt der Aktivität im C-3 des L-Viburnits erkennen. Bei der Aufarbeitung des aus D-Glucose-6-³H nach kürzerer Stoffwechselzeit entstandenen L-Viburnits wurde aber nur am

C-4 ^3H -Aktivität vorgefunden. Für diesen Effekt könnte außer der kurzen Einwirkungszeit auch eine Labilisierung aller anderer Positionen durch Verschiebungs- und Austauschreaktionen verantwortlich sein.

Diese beiden Versuche erlauben nun, mit Sicherheit den Syntheseweg *d* auszuschließen; wenn meso-Inositol-phosphat ein Zwischenprodukt darstellen sollte, müßte bei Applikation von D-Glucose-1- ^{14}C die Aktivität vorwiegend im C-5 des L-Viburnits lokalisiert sein, während nach Gabe von D-Glucose-6- ^3H ein L-Viburnit mit der Markierung am C-6 entstehen müßte.

Die vorliegenden Ergebnisse legen die Vorstellung nahe, daß der Übergang von D-Glucose vermutlich ohne vorhergehende Fragmentierung des Kohlenstoffskeletts in L-Viburnit in der in Abb. 3 gezeigten Art erfolgt. Diese Art des Ringschlusses würde mehrere Epimerisierungsreaktionen verlangen, wobei auch intramolekulare Hydridverschiebungen nicht auszuschließen sind. Anscheinend erfolgt dabei aber keine Verteilung der am C-6 der Hexose gebundenen ^3H -Aktivität. Analoge Verhältnisse sind z.B. bei der Biosynthese von L-Rhamnose in Mikroorganismen vorgefunden.¹⁵

Weitere Versuche, die vor allem die Fragen klären sollen, ob D-Glucose tatsächlich ohne Fragmentierung des Kohlenstoffskeletts in L-Viburnit übergeht und ob hier wie bei der Bildung von L-Rhamnose Zuckernucleotide als Zwischenprodukte beteiligt sind, sind zur Zeit im Gange.

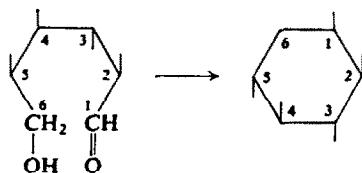


ABB. 3.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Herstellung der radioaktiven Vorstufen, ihre Applikation, die Isolierung des biosynthetisch gewonnenen L-Viburnits sowie die Messung der Radioaktivität wurden nach Methoden durchgeführt, die in der vorhergehenden Mitteilung¹ beschrieben sind.

Überführung von L-Viburnit in Triacetyl-isopropyliden-L-viburnit

300 mg sublimierter L-Viburnit werden mit 5 ml Essigsäure, 30 ml Aceton und 2 g frisch geschmolzenem ZnCl_2 versetzt und 5 hr unter Röhren am Rückfluß erhitzt. Dann läßt man das Gemisch erkalten und gießt unter Kühlung zu 25 ml Pyridin. Die so erhaltene Mischung wird noch weitere 30 min gerührt und dann durch Absaugen vom Ausgefallenen befreit. Man wäscht mit Aceton nach und engt das Filtrat etwas ein. Dann wird dieses mit einer Mischung von 5 ml Essigsäureanhydrid und 2 ml Pyridin versetzt und 1 Tag bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Nach Filtrieren engt man das Filtrat im Vakuum ein und nimmt den so erhaltenen Rückstand in Chloroform auf. Die Chloroformlösung wird 1mal mit Eiswasser und 2mal mit NaHCO_3 -Lösung gewaschen, dann mit Tierkohle und wenig Na_2SO_4 behandelt, eingeengt und schließlich auf eine Kieselgel-Säule ($1,6 \times 25 \text{ cm}$) aufgebracht. Als Elutionsmittel dient eine Mischung von Benzol und Essigester (3:1, v/v). Die

¹⁵ O. GABRIEL, *J. Biol. Chem.* 241, 924 (1966).

Fraktion zwischen 60 und 120 ml enthält Triacetyl-isopropyliden-L-viburnit; sie wird mit inaktivem Material verdünnt, eingeengt und mehrere Stunden im Hochvakuum getrocknet. Die Reinheit der so erhaltenen Verbindung wird durch Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-G-Schichten mit dem Laufmittel Benzol-Essigester (3:1, v/v) überprüft. Zur Sichtbarmachung wird mit schwefelsaurer 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung gesprührt und kurz auf 120° erhitzt.

Abbau von Triacetyl-isopropyliden-L-viburnit zu 2-Desoxy-L-ribit

600 mg Triacetyl-isopropyliden-L-viburnit werden in 2 ml Methanol gelöst und nach Zugabe von 20 ml 0,1 M Natriummethylatlösung in Methanol 10 min am Rückfluß erhitzt. Nach Einengen der Lösung wird diese in 10 ml Wasser aufgenommen, auf pH 5,5 gebracht und unter Röhren mit 950 mg gepulvertem NaIO₄ versetzt. Die Mischung wird 4 hr bei Zimmertemperatur gerührt, dann werden 100 mg Natriumarsenit hinzugegeben, kurz weitergerührt und darauf durch Zusatz von 500 mg NaBH₄—wiederum unter Röhren—reduziert. Man lässt 30 min stehen, erwärmt etwas und bringt die Lösung langsam mit 2 N HCl auf pH 1,0. Hierauf setzt man 15 ml konz. HCl hinzu und röhrt die Lösung 1 hr bei 80°. Nach Abkühlen, filtriert man und entionisiert die mehrmals eingeengte Lösung sorgfältig; die freigewordene Borsäure wird als Methylester abdestilliert. Der so erhaltene 2-Desoxy-L-ribit wird papierchromatographisch gereinigt¹ und nach Elution und Eindampfen zur Trockene gewogen.

Abbau des 2-Desoxy-L-ribits

136 mg 2-Desoxy-L-ribit werden in 15 ml Wasser gelöst und die Lösung auf pH 5,0 eingestellt. Nach Zugabe von 620 mg feinst gepulvertem NaIO₄ wird 30 min bei Zimmertemperatur gerührt. Der Überschuß des Oxydationsmittels wird mit Natriumarsenit zerstört und die Lösung auf pH 7,0 eingestellt, worauf sofort 4mal mit je 10 ml Äther extrahiert wird. Die ätherische Lösung wird eingeengt und dann mit Bromwasser oxydiert. Die dabei entstehende β-Hydroxypropionsäure wird papierchromatographisch (n-Butanol/konz. NH₃/Äthanol/Benzol, 5:3:2:1) gereinigt.

Die nach der Ätherextraktion verbleibende wäßrige Lösung wird mit 420 g Dimedon versetzt und auf 60° erhitzt. Das dabei ausfallende Methylendimedon wird abgesaugt und 2mal aus Methanol-Wasser umkristallisiert.

Aus der nach der Dimedonfällung übrigbleibenden Mutterlauge wird die Ameisensäure als *p*-Bromphenacylderivat gewonnen und dieses durch mehrmaliges Umkristallisieren gereinigt.

Abbau der β-Hydroxypropionsäure

Die mit inaktivem Material verdünnte β-Hydroxypropionsäure wird mit alkalischem Permanganat nach Unrau und Canvin¹¹ oxydativ decarboxyliert. Das dabei entstandene CO₂ wird nach dem Ansäuern im N₂-Strom übergetrieben und in methanolischer Äthanolaminlösung aufgefangen. Die Essigsäure wird abdestilliert, mit Natronlauge titriert und dann eingeengt. Das Natriumacetat wird im Vakuum bei 200° getrocknet und nach Phares¹² weiter abgebaut.

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