

Über die Biogenese des Leucopterins

Von Prof. Dr. F. WEYGAND, Doz. Dr. H. SIMON, Dr. G. DAHMS*), Dr. MARIANNE WALDSCHMIDT**), Dr. H. J. SCHLIEP und Dipl.-Chem. H. WACKER***)
Organisch-chemisches Institut der T.H. München

Durch Applikation ^{14}C -markierter Vorläufer an die Raupen oder Puppen von *Pieris brassicae* L. (Kohlweißling) und Abbau des von den Schmetterlingsflügeln isolierten Leucopterins wurde die Herkunft der Kohlenstoff-Atome des Pterins ermittelt. Die C-Atome 2, 4, 5 und 6 werden aus denselben Vorläufern wie die entspr. C-Atome des Guanins gebildet. Die C-Atome 8 und 9 stammen aus einer Pentose. Durch Vergleich der ^{14}C -Verteilung und der spez. Aktivität von Guanin und Leucopterin wird der Übergang von Guanin in Leucopterin sehr wahrscheinlich gemacht.

C. Schöpf und E. Becker¹⁾ definierten 1936 die Pterine, deren Konstitutionsaufklärung damals noch nicht abgeschlossen war, als weiße oder farbige, stickstoff-reiche, in Chitin eingelagerte Insektenpigmente. Bereits Ende der dreißiger Jahre stellte man jedoch fest, daß sie nicht nur im Insektenreich vorkommen, sondern wesentlich weiter verbreitet sind. In dieser Zeitschrift hat dann R. Purrmann²⁾ einen zusammenfassenden Überblick über Pterine gegeben, nachdem nach 18-jähriger Bearbeitungszeit in den Instituten von H. Wieland in München und C. Schöpf in Darmstadt ein gewisser Abschluß erreicht war. Ein weiteres Übersichtsreferat stammt ebenfalls von Purrmann³⁾. In den darauf folgenden Jahren fand man weitere Pterine in der Natur, und es zeigte sich auch bald, daß einigen von ihnen (Folsäuregruppe) wichtige biochemische Funktionen im gesamten Lebensbereich zukommen^{4, 5)}.

Nachdem wir uns ab 1947 viel mit der Chemie und der Biochemie der Folsäure beschäftigt hatten, begannen wir 1953 uns für das Problem der Biogenese der Pterine zu interessieren. Man wußte damals über die Biogenese verwandter Naturstoffe, wie die der Purine⁶⁾ und Flavine⁷⁾, schon recht gut Bescheid, über die Entstehungsweise des Pteridin-Systems war aber noch nichts bekannt. Mit Hilfe ^{14}C -markierter Verbindungen hofften wir, soweit das mit der Isotopentechnik überhaupt möglich ist, die Biogenese der Pterine aufzuklären zu können.

Wahl des Studienobjektes

Obwohl die Pterine in der Natur sehr weit verbreitet sind^{4, 8, 9)}, war die Wahl eines biologischen Objektes nicht einfach. Leicht zu züchtende Mikroorganismen oder Pflanzen enthalten Pterine nur in solch geringen Konzentrationen, daß die Isolierung der notwendigen Substanzmengen aufwendig und umständlich ist. Da der Schmetterling *Pieris brassicae* L. (Kohlweißling) etwa 0,5 mg Leucopterin als Pigment auf seinen Flügeln hat, schien er uns ein geeignetes Studienobjekt zu sein. Das Leucopterin wird 2 bis 3 Tage vor dem Ausschlüpfen der Falter abgelagert³⁾, worauf die

leucopterin-haltigen Zellen bei der Imago verkümmern und keine Verbindung mehr mit dem Stoffwechsel haben¹⁰⁾.

Obwohl das Leucopterin im Kohlweißling in reichlicher Menge gebildet wird und leicht zu isolieren ist, war es jahrelang ein schwerwiegender Nachteil, daß jeweils nur 2 bis 3 Wochen im Sommer für die Arbeit am biologischen Objekt zur Verfügung standen und daß in manchen Jahren, bedingt durch ungünstige Witterung, nur wenige Schmetterlinge schlüpften. Erst seit dem letzten Jahr konnten diese Schwierigkeiten überwunden werden, nachdem es gelungen ist, den Kohlweißling im Laboratorium das ganze Jahr hindurch kontinuierlich zu züchten¹¹⁻¹³⁾. Im allgemeinen zogen wir die Raupen aus den Eiern, da die aus dem Freiland stammenden Raupen häufig durch Schlupfwespenbefall eingingen.

Applikation ^{14}C -markierter Verbindungen

Zunächst wurde festgestellt, inwieweit die Schmetterlingsraupen die einzelnen markierten Verbindungen aufnehmen und wie lange die Zeit zwischen Applikation und Pterin-Bildung sein darf, ohne daß die Radioaktivität zu weit allgemein verteilt wird. Anfänglich pinselten wir die Lösungen der ^{14}C -markierten Verbindungen auf Kohlblätter auf. Obwohl diese Applikationstechnik nicht befriedigte, zeigte sie doch, daß aus gewissen Vorläufern Leucopterin mit einer Radioaktivität gebildet wird, die nicht der Gleichverteilung in den Schmetterlingen entspricht. Später injizierten wir die Verbindungen während des Vorpuppenstadiums in den Ringmuskel der Scheinfüße. Am besten hat sich jedoch folgende Technik bewährt:

3-4 Tage alte Puppen erhalten aus einer Agla-Mikrometerspritze durch eine Injektionsnadel Nr. 21 0,01 ml wäßrige Lösung des markierten Vorläufers. Dazu wird der vordere Ringmuskel des Hinterleibs mit der Nadel zur Schwanzspitze hin durchstochen. Nachdem das zu injizierende Volumen aus der Spitze herausgedrückt ist, muß zum Druckausgleich in der Puppe mit dem Herausziehen der Nadel noch einige Sekunden gewartet werden. Einer Puppe werden meist 0,2 bis 0,6 μMol der Vorläufer mit einer spezif. Aktivität von 1 bis 3 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ appliziert. Die geschlüpften Falter wurden, sobald die Flügel trocken waren, mit Äther getötet, worauf die Extraktion des Flügelpigmentes, im wesentlichen nach Wieland und Schöpf¹⁴⁾ bzw. nach Schöpf und Becker¹⁾, folgte. Anschließend wurde bis zur konstanten Radioaktivität und chromatographischen Reinheit umgefällt.

¹⁰⁾ F. Süffert, Biol. Zbl. 57, 615 [1937].

¹¹⁾ W. A. L. David, Z. Pflanzenkrankheiten u. Schutz 64, 572 [1957].

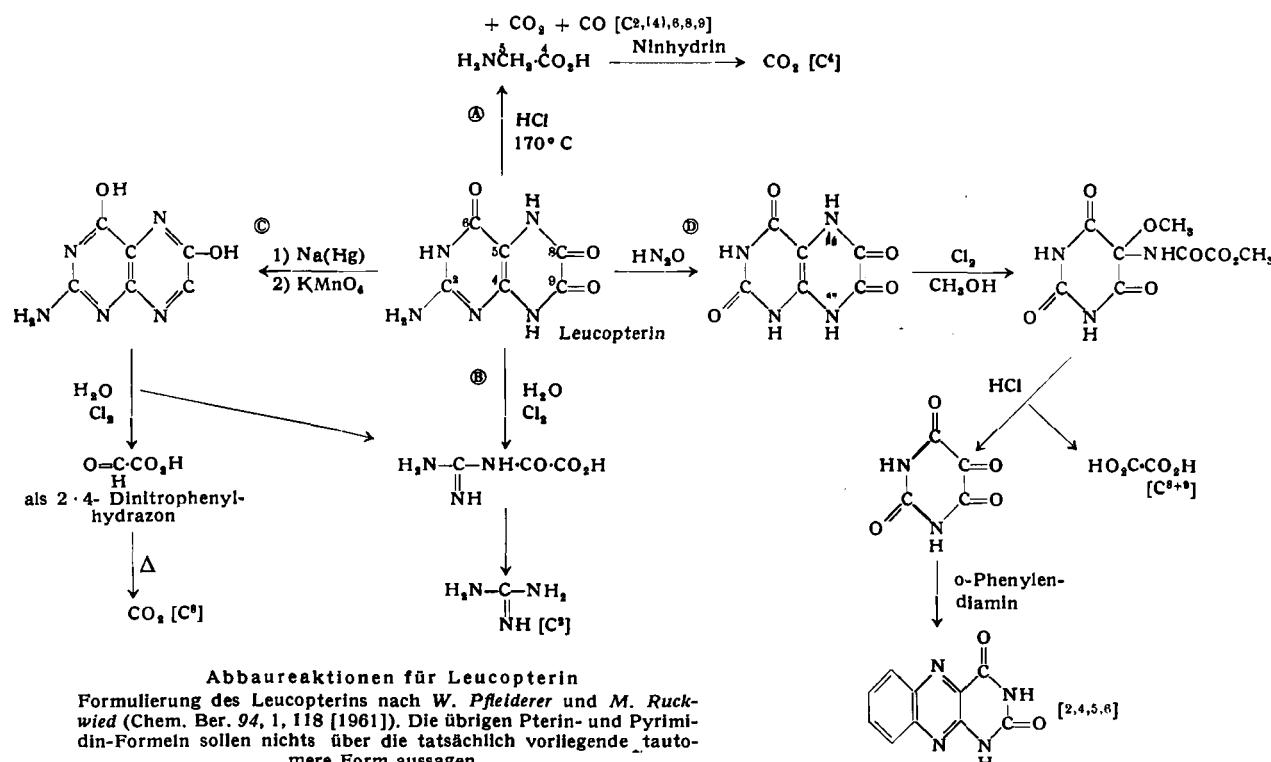
¹²⁾ E. Bünning u. G. Joerrens, Z. Naturforsch. 15b, 205 [1960].

¹³⁾ Auch an dieser Stelle möchten wir Prof. Dr. E. Bünning und Fr. Dr. G. Joerrens, Botan. Inst. der Univers. Tübingen, herzlich danken, daß sie uns häufig Gelege von Kohlweißlingseltern zur Verfügung stellten und uns bei der kontinuierlichen Zucht des Kohlweißlings berieten.

¹⁴⁾ H. Wieland u. C. Schöpf, Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 2178 [1925]; H. Wieland, H. Metzger, C. Schöpf u. M. Bülow, Liebigs Ann. Chem. 507, 226 [1933].

Abbaumethoden

Zur Bestimmung der Radioaktivität der einzelnen Kohlenstoffatome mußte das Leucopterin auf verschiedene Weisen abgebaut werden. Im Formelschema sind die verwendeten Reaktionen, die hauptsächlich auf H. Wieland und Mitarb.^{15,16)} zurückgehen, aufgeführt. Die Reaktionen wurden den beim Arbeiten mit radioaktiven Isotopen zu



beachtenden Gesichtspunkten angepaßt. Wo es notwendig schien, wurde mit positionsmarkierten, speziell synthetisierten Verbindungen die Eindeutigkeit der Abbaureaktionen überprüft.

Zu den vier Abbauwegen ist folgendes festzustellen:

Während die Salzsäure-Spaltung von Guanin zu Glycin eindeutig ablaufen soll¹⁷⁾, zeigte die von Leucopterin-[6-¹⁴C] (Abbauweg A), daß die Carboxyl-Gruppe des Glycins zu ca. 75% aus C⁴ und zu ca. 25% aus C⁶ stammt¹⁸⁾. Glycin wurde stets in Form des Kupferkomplexes isoliert¹⁹⁾.

Der Oxalyl-Rest im Oxalyl-guanidin (Abbauweg B) wird zu 50% aus C⁵⁺⁶ und zu 50% aus C⁴⁺⁵ gebildet. Die bei der Chlor-Spaltung in Wasser anfallende freie Oxalsäure stammt nicht nur aus den C-Atomen 8 und 9. Dagegen ergibt das Guanidin aus Oxalylguanidin sehr gute Werte für die Radioaktivität von C².

Besondere Schwierigkeiten machte im Mikromäßigstab die von Albert²⁰⁾ angegebene Verwandlung von Leucopterin in Xanthopterin, das völlig frei von Iso-xanthopterin sein mußte (Abbauweg C). Es zeigte sich, daß es von der Konzentration der Reduktionslösung und der Rührgeschwindigkeit (unter anderem) abhängt, ob neben Dihydro-xanthopterin auch Dihydro-isoxanthopterin entsteht. Ent-

¹⁶⁾ H. Wieland u. A. Tartter, Liebigs Ann. Chem. 543, 287 [1940].

¹⁷⁾ H. Wieland u. P. Decker, ebenda 547, 180 [1942].

¹⁸⁾ S. Aronoff: Techniques of Radiobiochemistry, The Iowa State College Press, Iowa (USA) 1958, S. 159.

¹⁹⁾ Dieses Verhältnis scheint trotz Einhaltung möglichst gleicher Versuchsbedingungen zu variieren. Daher sind die Werte (Tabelle 1) für C² nach Applikation von Glycin-[1-¹⁴C] zu hoch und nach Applikation von Brenztraubensäure-[1-¹⁴C] zu tief. Für C⁴ gilt das umgekehrte.

²⁰⁾ M. R. Heinrich u. D. Wilson, J. biol. Chemistry 186, 450 [1950].

²¹⁾ A. Albert u. H. C. S. Wood, J. appl. Chem. 2, 591 [1952].

scheidend für die Gewinnung von Glyoxylsäure aus Xanthopterin mit Chlor in Wasser ist eine möglichst feine Verteilung des Xanthopterins, da die freie Glyoxylsäure auch durch Chlor oxydiert wird. Die Reaktion soll möglichst schnell beendet sein und das nichtverbrauchte Chlor muß durch einen Stickstoff-Strom rasch vertrieben werden. Bei der Decarboxylierung des 2,4-Dinitrophenylhydrazons von

Glyoxylsäure-[1-¹⁴C] ist die molare Aktivität des isolierten Kohlendioxys um ca. 5% zu klein. Versuche mit Glyoxylsäure-[2-¹⁴C]-2,4-dinitrophenylhydrazen zeigten, daß bei der Decarboxylierung 5% des gebildeten Kohlendioxys aus C² der Glyoxylsäure stammen.

Der ursprünglich verwendete weitere Abbau des durch Kondensation von Alloxan und o-Phenyldiamin erhältlichen Alloxazins durch alkalische Hydrolyse zur Hydroxy-chinoxalin-carbonsäure und deren Decarboxylierung befriedigte nicht (Abbauweg D).

Für den weiter unten zu besprechenden Vergleich der ¹⁴C-Verteilung in Guanin und Leucopterin mußte auch Guanin abgebaut werden. Hierfür wurden ebenfalls die Salzsäure-Hydrolyse zu Glycin und die Chlor-Spaltung zu Guanidin verwendet.

Anfänglich wurden alle Verbindungen naßverbrannt, und die Radioaktivität wurde durch Ausmessen von Bariumcarbonat bestimmt. Später geschah die Radioaktivitätsmessung nach der in dieser Zeitschrift beschriebenen Methode²¹⁾ im Proportionalzählrohr.

Ergebnisse

Da wir von vornehmerein eine weitgehende Parallelität zwischen der Biogenese von Purinen und Pterinen sowie einen Übergang von Purinen in Pterine vermuteten, wurden zunächst ¹⁴C-markierte Purine, ein Pyrimidin, ferner Ameisensäure und Glycin-[1-¹⁴C] angeboten^{22,23)}. Bereits die ersten Versuche zeigten, daß Ameisensäure ein spezifischer Vorläufer für C² und Glycin ein solcher für C⁴⁺⁵ ist.

²¹⁾ H. Simon, H. Daniel u. J. F. Klebe, Angew. Chem. 71, 303 [1959].

²²⁾ F. Weygand u. M. Waldschmidt, ebenda 67, 328 [1955].

²³⁾ F. Weygand, H. J. Schliep, H. Simon u. G. Dahms, Angew. Chem. 71, 522 [1959].

Tabelle 1 enthält die Abbauergebnisse und die Einbauraten nach Applikation von Formiat-[¹⁴C], Glycin-[1-¹⁴C], Glycin-[2-¹⁴C], Acetat-[2-¹⁴C], Acetat-[1-¹⁴C] und von Pyruvat-[1-¹⁴C], das zur Klärung der Herkunft von C⁸ gegeben wurde. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die molare Radioaktivität des Leucopterins = 100 %.

Die Fütterung von Hypoxanthin-[2-¹⁴C] und 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin²³⁾ führte ebenfalls zu radioaktivem Leucopterin. Dabei wurde das Pyrimidin-Derivat etwa in gleichem Maße (1:250) eingebaut wie Glycin-[1-¹⁴C], während das nach der Hypoxanthin-Verfütterung isolierte Leucopterin nur $\frac{1}{4}$ dieser Aktivität hatte.

Da wir, wie bereits erwähnt, ursprünglich die markierten Substanzen den Raupen zum Fressen gaben, später Lösungen den Raupen im Vorpuppenstadium und schließlich den Puppen injizierten, war die Klärung der Frage wichtig, inwieweit die prozentuale Verteilung der Radioaktivität und die Einbaurate vom Zeitpunkt der Applikation abhängt. Außerdem war die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in verschiedenen Jahren zu prüfen. Hierüber gegen die Spalten 5-7 in Tab. 1 Auskunft.

Im Zusammenhang mit den Einbauraten war auch die Stoffwechselaktivität der Puppen von Interesse. Daher wurde der Sauerstoff-Verbrauch von Puppen während einiger Tage bei 24 °C im Warburg-Apparat manometrisch verfolgt. Der mittlere Sauerstoff-Verbrauch einer Puppe beträgt ca. 80 μMol pro Tag. Die an einem Tag der Puppenruhe aufgenommene Sauerstoff-Menge würde die bereits ausreichen, um die 100fache Menge der Essigsäure bzw. der anderen Vorläufer zu oxydieren, die einer Raupe oder Puppe injiziert wurden. Die Menge der angebotenen Vorläufer kann daher den Stoffwechsel nicht nachhaltig beeinflussen.

1 Erfaßte C-Atome des Leucop- terins	2 Formiat-[¹⁴ C] ¹⁾	3 Glycin- [1- ¹⁴ C] ¹⁾	4 Glycin- [2- ¹⁴ C] ²⁾	5 Essigsäure- [2- ¹⁴ C] ^{**}	6 Puppen Essigsäure- [2- ¹⁴ C] [*]	7 Raupen Essigsäure- [1- ¹⁴ C] ²⁾	8 Brenztraubensäure-[1- ¹⁴ C] ³⁾
2	82	12	15,3				5,2
4	1,4	42	2,0	16,3	12,6	11,6	
5	4,7	0	81,2	14,8	17,6	19,2	
6	1,4	31	1,5				47
2,6			15	46,8			
4,5			83,2	31,1	30,2	30,8	53,7
8,9	1,5	5	0	16,6	12,8	15,6	35,1
2,4,5,6			100,4	77,5	82,2	82,0	36
2,6,8,9				63,7			7,1
Einbauraten	1:140	1:204	1:42	1:460	1:500	1:1100	1:320
							1:1230

Tabelle 1. Prozentuale Verteilung der Radioaktivität im Leucopterin nach Gaben verschiedener ¹⁴C markierter Verbindungen.

*) 1956 ausgeführt. 1) An Raupen appliziert.
**) 1957 ausgeführt. 2) An Puppen appliziert.

Aus den in Tabelle 1 niedergelegten Ergebnissen folgt, daß die Kohlenstoffatome 2, 4, 5 und 6 von denselben Vorläufern stammen wie die entsprechenden C-Atome der Purine, d. h. für C⁸ ist ein Einkohlenstoff-Baustein, wie Ameisensäure, der Vorläufer, C⁴ und C⁵ kommen vom Glycin her und C⁸ stammt aus Kohlendioxyd. Für die Herkunft der C-Atome 8 und 9 ergibt sich kein Anhaltspunkt.

Es mag zunächst erstaunlich sein, daß sich die Einbauraten von Essigsäure-[2-¹⁴C] in Leucopterin nach der Applikation an die Raupen bzw. Puppen nur um den Faktor 2 unterscheiden (Tabelle 1, Spalte 6). Gemessen an der Stoffwechselaktivität der Puppen, die von der der Raupen sicherlich noch um ein Vielfaches übertroffen wird, ist dieser Unterschied als sehr gering zu bezeichnen. Daher ist es äußerst unwahrscheinlich, daß die markierten Verbindungen bis gegen Ende der Puppenruhe für eine *de novo*-Synthese von Leucopterin aufgespart werden. Zum gleichen Schluß führt auch die hohe Einbaurate für Formiat (1:140 Tabelle 1 Spalte 2). Man muß vielmehr annehmen daß die angebotenen Substanzen Substrate für Verbindungen dar-

stellen die die Raupe bzw. Puppe aufbaut und erst gegen Ende der Puppenruhe teilweise in Leucopterin umbaut. Es liegt daher die Vermutung nahe, daß die angebotenen Verbindungen zunächst in Purine überführt werden und daß diese später z. T. in Pterine umgewandelt werden.

Nach diesen Ergebnissen wandten wir uns zwei Fragestellungen zu: Welches sind die Vorläufer für die C-Atome 8 und 9 und läßt sich der Übergang von Purin in Pterin beweisen?

Vorläufer von C⁸ und C⁹

Erstmals erhielten wir eine hohe Einbaurate in die Kohlenstoffatome 8 und 9 des Pyrazin-Ringes nach Applikation von Glucose-[1-¹⁴C]²³⁾. Mit einem Verdünnungsfaktor von 1:235 befanden sich 50 % der Gesamtaktivität des Leucopterins in diesen beiden C-Atomen. Es konnte also die Glucose selbst oder eine mit ihr in direktem biochemischen Zusammenhang stehende Verbindung der gesuchte Vorläufer sein. Um dies zu klären, wurden Versuche mit verschiedenen positionsmarkierten Zuckern ausgeführt und zwar mit Glucose-[2-¹⁴C], Glucose-[6-¹⁴C] und Ribose-[1-¹⁴C]. Es wurde jeweils die gleiche Aktivität in je 35 μg Zucker in die 3-4 Tage alten Puppen injiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt²⁴⁾.

Erfaßte C-Atome des Leucopterins	Glucose-[1- ¹⁴ C]	Glucose-[2- ¹⁴ C]	Glucose-[6- ¹⁴ C]	Ribose-[1- ¹⁴ C]
2	24	4,1	72,3	14,0
6	16,7	8,1	9,7	
4,5	9,7	11,9	9,6	
4,5,6		16,5		
8,9	50,7	78,1	9,7	63,8
Einbauraten	1:235	1:110	1:290	1:90

Tabelle 2. Prozentuale Radioaktivitätsverteilung im Leucopterin nach der Applikation ¹⁴C-markierter Zucker und Einbauraten

Die hohen Einbauraten zwingen zu dem Schluß, daß Zucker oder ihre unmittelbaren Folgeprodukte die Vorläufer für C⁸⁺⁹ sind. Vergleicht man die Einbauraten der vier Zucker, speziell in die Stellung 8 und 9, so ergeben sich folgende Verhältniszahlen:

$$\text{Ribose-[1-}^{14}\text{C}]:\text{Glucose-[2-}^{14}\text{C}]:\text{Glucose-[1-}^{14}\text{C}]:\text{Glucose-[6-}^{14}\text{C}] = 19:15:10:1$$

Gegen den direkten Einbau von Triosen in C⁸⁺⁹ spricht der Vergleich der Einbauraten von Glucose-[1-¹⁴C] bzw. Glucose-[2-¹⁴C] mit der Einbaurate von Glucose-[6-¹⁴C].

Weitere Aussagen über die Herkunft der beiden C-Atome im Pyrazin-Ring waren nach der Bestimmung der Einzelaktivitäten von C⁸ und C⁹ zu erhoffen. Leucopterin wurde daher in Xanthopterin überführt und dem oben beschriebenen Abbau (Abbauschema C) unterworfen. In C⁸ sind von der Summe der Radioaktivität in C⁸⁺⁹ enthalten:

$$\begin{array}{ll} \text{Nach Gabe von Glucose-[1-}^{14}\text{C} & 23 \% \\ \text{Nach Gabe von Glucose-[2-}^{14}\text{C]} & 34 \% \\ \text{Nach Gabe von Ribose-[1-}^{14}\text{C]} & 41,5 \% \end{array}$$

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen deuten: Falls eine Hexose, eine Triose oder ein Zweierstück aus Hexosen (aktiver Glykolaldehyd) direkte Vorläufer wären, sollte C⁹ nicht in jedem Falle eine beträchtlich höhere Radioaktivität als C⁸ haben. Die Verhältnisse müßten sich bei den Ver-

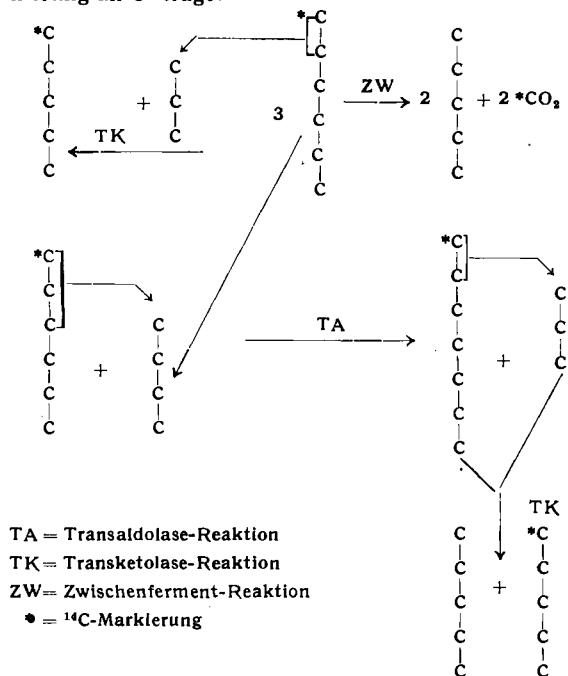
²⁴⁾ Vortrag von F. Weygand auf der Tagung der Ges. f. Physiol. Chem., Berlin 23.-26. Sept. 1959, Referat Angew. Chem. 71, 746 [1959]. Über den spez. Einbau von Glucose-¹⁴C in Drosopterin und Isoxanthopterin wurde etwas später auch von O. Brenner-Holzach u. F. Leuthardt (Helv. chim. Acta 42, 2254 [1959]) berichtet.

suchen mit Glucose-[1-¹⁴C] und Glucose-[2-¹⁴C] umkehren. Außerdem zeigt Ribose-[1-¹⁴C] die höchste Einbaurate für C⁸⁺⁹. Dies ist nicht zu erklären, falls man zunächst eine Umwandlung der Pentose in Hexose annimmt. Die Einbaurate müßte zumindest auf die nach Gabe von Glucose-[2-¹⁴C] beobachtete abfallen.

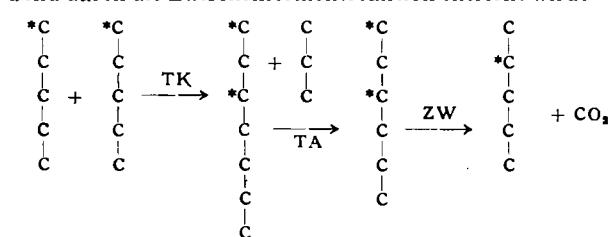
Nachdem die Triosen und Hexosen als direkte Vorläufer für C⁸ und C⁹ sehr wahrscheinlich ausscheiden, kann man die Pentosen als mögliche Vorläufer diskutieren. Wie man weiß, spielen auch im tierischen Organismus die nichtglykolytischen Kohlenhydratumbildungen, wie die direkte Oxydation von Glucose-6-phosphat zu CO₂ + Pentose-5-phosphat und die nichtoxydative Umwandlung der sog. Pentosephosphat-Cyclus, eine große Rolle^{25, 26}.

Vergleicht man die Radioaktivitätsverteilung in den C-Atomen 8 und 9 der einzelnen Versuchsreihen miteinander, so fällt der bevorzugte Einbau der Aktivität in das C-Atom 9 nach Applikation von Glucose-[1-¹⁴C] auf. Diese Spezifität nimmt über Glucose-[2-¹⁴C] zur Ribose-[1-¹⁴C] hin ab.

Geht man von der Annahme aus, daß etwa die Hälfte der Hexose, die nichtglykolytisch abgebaut wird, auf dem Wege der Zwischenfermentreaktion²⁵ zur Pentose oxydiert wird (vgl. die Einbauraten von Glucose-[1-¹⁴C] und Glucose-[2-¹⁴C], die sich wie 1:2 verhalten) und die andere Hälfte auf nichtoxydativem Wege in Pentosen überführt wird²⁶), so sollte nur eine Pentose entstehen, die die Markierung an C¹ trägt:



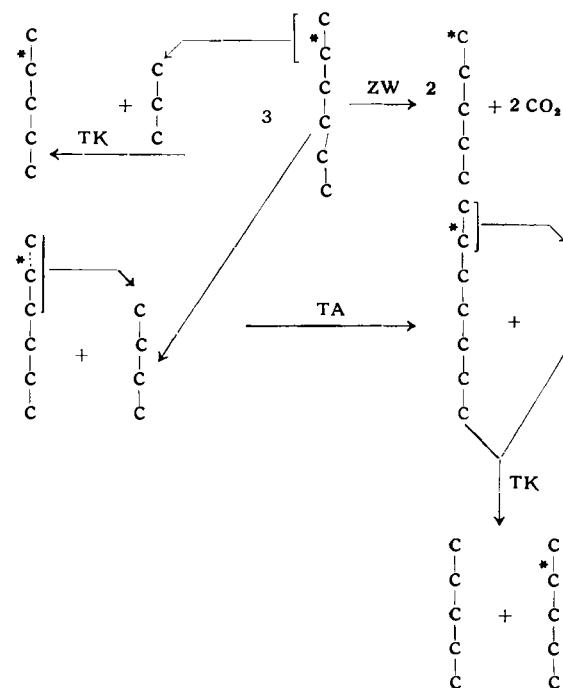
Ein gewisser Teil der ¹⁴C-Markierung kann jedoch dadurch nach C² kommen, daß aus einer in 1- und 3-Stellung markierten Sedoheptulose (Rückreaktion) und einer Triose eine in 1,3-Stellung markierte Hexose entsteht, deren C¹ anschließend durch die Zwischenfermentreaktion entfernt wird:



²⁵⁾ E. Racker, Adv. Enzymol. 15, 153 [1954].

²⁶⁾ B. L. Horecker u. A. H. Mehler, Ann. Rev. Biochemistry 24, 229 [1955]; F. Dickens, Conference et Rapports, 3^{me} Congrès International de Biochimie, Bruxelles 1955, S. 170; I. A. Bernstein, J. biol. Chemistry 205, 317 [1953].

Macht man die entsprechenden Annahmen für die Umwandlung von Glucose-[2-¹⁴C] in Pentosen, so ergibt sich:



Nach diesem Schema entsteht also aus Glucose-[2-¹⁴C] sowohl in C¹ wie in C² markierte Pentose. Stehen die beiden Reaktionsketten im Verhältnis 1:1, so bildet sich Pentose-[1,2-¹⁴C] im Aktivitätsverhältnis 5:4, denn aus 10 Hexosen entstehen 5 Pentosen-[1-¹⁴C] via Zwischenferment und 6 Pentosen via Transketolase, von denen 4 in C² markiert sind.

Bei gleichen Verhältnissen entsteht also aus Glucose-[1-¹⁴C] Pentose-[1-¹⁴C], aus Glucose-[2-¹⁴C] jedoch Pentose-[1,2-¹⁴C]. Während bei Glucose-[1-¹⁴C] durch die Zwischenfermentreaktion ein großer Teil der Radioaktivität verloren geht, ist das bei der Glucose-[2-¹⁴C] nicht der Fall. Die spezif. Einbaurate ist deshalb bei der Glucose-[2-¹⁴C] größer.

Das Verhältnis der Radioaktivität von C⁸ und C⁹ im Leucopterin nach der Injektion von Glucose-[2-¹⁴C] sollte das Verhältnis von Zwischenfermentreaktion zu Pentose-Cyclus wiedergeben. Da durch dieses Verhältnis gleichzeitig auch der Einbau von Glucose-[1-¹⁴C] und Glucose-[2-¹⁴C] bestimmt wird, müssen auch die Einbauraten etwa im Verhältnis der Radioaktivitätsverteilung von C⁸ und C⁹ bei der Glucose-[2-¹⁴C] stehen. Durch die Rückreaktionen, die nach dem Einbau von Glucose-[1-¹⁴C] in C⁸ des Leucopterins ca. 23% betragen, wird dieses Verhältnis nur angenähert erreicht.

Zur Erklärung der im Vergleich zur Glucose-[1-¹⁴C] und Glucose-[2-¹⁴C] weitergehenden Gleichverteilung der Aktivität bei der Gabe von Ribose-[1-¹⁴C] in den C-Atomen 8 und 9 muß man berücksichtigen, daß die applizierte Ribose-Menge von 35 µg pro Puppe, verglichen mit dem Pool freier Pentose, sicherlich zu hoch war. Daher wird der Pentose-Cyclus teilweise umgekehrt verlaufen sein, wodurch Hexosen entstanden, die in 1,3-Stellung markiert waren. Aus diesen bildete sich durch die Zwischenfermentreaktion Pentose-[2-¹⁴C].

Die Zwischenfermentreaktion läßt sich auch durch die Betrachtung des Radioaktivitätsanteils der restlichen C-Atome des Leucopterins beweisen. Nach der Gabe von Glucose-[1-¹⁴C] zeigt sich doppelt so viel Radioaktivität in C⁸ des Leucopterins wie nach der Gabe von Glucose-[6-¹⁴C].

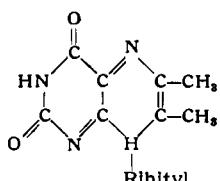
Nach der Gabe von Glucose-[2-¹⁴C] sind in den C-Atomen 4, 5 und 6 nur 16,5% der Gesamtradioaktivität, wovon der überwiegende Teil in C⁵ lokalisiert sein muß (Bildung von Glycin aus Serin²⁷). Es muß also in erheblichem Maße eine Überführung von C¹ der Hexose in CO₂ eintreten.

Zu diesem Ergebnis führt auch folgende Überlegung. Falls in den Puppen nur der glykolytische Abbau vor sich ginge, müßte die Einbaurate in C² des Leucopterins nach Gabe von Glucose-[1-¹⁴C] und Glucose-[6-¹⁴C] gleich sein, da sich bekanntlich die Kohlenstoffkette des Serins von den C₃-Körpern des Kohlenhydratstoffwechsels ableitet²⁸) und das C³ des Serins, das als Einkohlenstoffverbindung übertragen wird, von C¹ und C⁶ der Hexosen stammt. Nach Gabe von Glucose-[1-¹⁴C] ist die Einbaurate in C² des Leucopterins jedoch nur 40% von der durch Glucose-[6-¹⁴C] bewirkten.

Alle diese Überlegungen machen es sehr wahrscheinlich, daß C⁹ des Leucopterins vom C¹ und C⁶ einer Pentose stammt.

Umwandlung von Purin in Pterin

Über die Umwandlung von Purinen in Pterine wurde verschiedentlich, meist jedoch nur andeutungsweise berichtet. McNutt und Forrest²⁹) isolierten aus *Eremothecium ashbyii*, dem Adenin angeboten worden war, 2,6-Dihydroxy-pteridin. Die Verwertung von Purin bei der Biosynthese von Riboflavin durch *E. ashbyii* ist von McNutt³⁰) bewiesen worden und Masuda und Mitarb.^{30a)} isolierten das Zwischenprodukt 8,9-Dimethyl-10-ribityl-lumazin, das mit dem synthetischen und aus *Ashbya gossypii* isolierten Produkt von Maley und Plaut³¹) identisch ist.



Eine Beziehung der Purine zu dem Pteridin-Gerüst der Folsäure wurde an *Gaffkya homari* gezeigt³²). Dieser Mikroorganismus benötigt entweder ein Purin- oder Pterin-Derivat, das mit der Folsäure verwandt ist. Da Folsäure-Verbindungen entstehen, wenn nur Purine angeboten werden, sollten Purine Vorläufer der Pterine sein.

Ein weiterer Übergang Purin in Pterin wurde in den Larven von *Xenopus* in unserem Arbeitskreis wahrscheinlich gemacht³³.

Zur Untersuchung einer Umwandlung von Purin in Pterin wurde von uns die Einbaurate verschiedener Vorläufer in Guanin und Leucopterin sowie die Verteilung der ¹⁴C-Aktivität in den einzelnen C-Atomen ermittelt. Weiterhin bestimmen wir den Guanin-Gehalt zu verschiedenen Zeiten des Entwicklungsstadiums des Kohlweißlings mit der Leucopterin-Menge.

²⁷⁾ F. M. Hueneckens, M. J. Osborn u. H. R. Whiteley, Science [Washington] 128, 120 [1958].

²⁸⁾ M. L. Minthorn Jr., G. A. Mourkides u. R. E. Koeppe, J. biol. Chemistry 234, 3205 [1959].

²⁹⁾ W. S. McNutt u. H. S. Forrest, J. Amer. chem. Soc. 80, 739 [1958].

³⁰⁾ W. S. McNutt, J. biol. Chemistry 219, 365 [1956].

^{30a)} T. Kishi, M. Asai, T. Masuda u. S. Kuwada, Chem. a. Pharmaz. Bull. [Japan] 7, Nr. 4 [1959].

³¹⁾ G. F. Maley u. G. W. Plaut, J. biol. Chemistry 234, 641 [1959].

³²⁾ S. Aaronson u. E. Rodriguez, J. Bacteriol. 75, 660 [1958].

³³⁾ I. Ziegler-Günther, H. Simon u. A. Wacker, Z. Naturforschg. 11b, 82 [1956].

Appliziert	isoliert	spezif. Aktivität ipm/mMol	relat. Aktivität	C ¹	C ⁴⁺⁵	C ⁹ absolut
Glucose-[2- ¹⁴ C]	Guanin	6,18·10 ⁶	100 %			
	Leucopterin	5,25·10 ⁶	84 % *)			
Glycin-[2- ¹⁴ C]	Guanin	8,02·10 ⁶	100 %	15,2	71,4	
	Leucopterin	6,71·10 ⁶	84 %	20,1	78,4	
Formiat- ¹⁴ C	Guanin	5,72·10 ⁶	100 %	47,2	4,6	2,7·10 ⁶ ipm/mAtom
	Leucopterin	3,15·10 ⁶	55 %	88,3	4,2	2,8·10 ⁶ ipm/mAtom

Tabelle 3. Vergleich der spezif. Aktivität von Guanin und Leucopterin und die Verteilung von ¹⁴C in den C-Atomen 2 sowie 4 + 5

*) Berechnet aus der Gesamtaktivität (vgl. Tabelle 2) abzüglich der Aktivität in C⁸⁺⁹.

Zur Isolierung der Purine wurden die Schmetterlinge mit Perchlorsäure hydrolysiert³⁴), die Purine als Silbersalze gefällt³⁵) und durch Ionenaustauschchromatographie³⁶) voneinander getrennt. Die erhaltene Guanin-Menge wurde bei 260 m μ spektrometrisch bestimmt.

In Tabelle 3 sind die spezif. Aktivitäten von Guanin und Leucopterin sowie die Verteilung von ¹⁴C in den C-Atomen 2 sowie 4 und 5 aufgeführt.

Wie die Ergebnisse zeigen, ist die spezif. Aktivität von Guanin und Leucopterin bei der Gabe von Glycin-[2-¹⁴C] und Glucose-[2-¹⁴C] praktisch gleich. Sie ist in beiden Fällen für das Leucopterin nur um 16% geringer. Bei der Rechnung der Werte für Leucopterin nach Gabe von Glucose-[2-¹⁴C] sind selbstverständlich die C-Atome 8 + 9, die 78% der Gesamtaktivität besitzen, nicht berücksichtigt worden.

Beim Vergleich der spezif. Aktivitäten von Guanin und Leucopterin nach Gabe von Formiat-¹⁴C muß man berücksichtigen, daß C⁸ des Guanins etwa 50% der Gesamtaktivität besitzen muß. Zum Vergleich der Aktivitäten in C² hat man daher die Absolutaktivitäten heranzuziehen. Sie sind für das Guanin 2,7·10⁶ ipm/mAtom und 2,8·10⁶ ipm/mAtom für das Leucopterin.

Diese Gleichheit der Absolutbeträge der Aktivität und ihrer Verteilung nach der Gabe von drei verschiedenen Vorfätern beweist, daß das Leucopterin nicht das Produkt einer unabhängigen *de novo*-Synthese sein kann, sondern daß eine sehr enge Beziehungen zwischen Guanin und Leucopterin bestehen muß. Es erhebt sich nun die Frage, ob eine direkte Umwandlung von Guanin in Pterin eintritt oder ob von einem zunächst gemeinsamen Biosyntheseweg aus eine Gabelung folgt.

Gabelungspunkte, von denen aus sich die Biosynthese³⁷) differenzieren könnte, wären Glycin-ribotid, Amino-imidazol-ribotid oder das Amino-imidazol-carboxamid-ribotid. Dabei müßte man folgende, an sich möglichen Reaktionen annehmen: Das Glycinamid-ribotid oder bereits das Glycinamid cyclisiert mit einer Pentose zu einem Piperazin-Derivat, oder aus einem Imidazol-Derivat entsteht unter Verlust von C² ein Piperazin-Ring.

Aus dem beispielsweise entstehenden Amino-piperazin-carboxamid könnte dann durch einen Einkohlenstoff-Donor der Ringschluß zum Pterin folgen. Will man unter diesen Voraussetzungen noch die Gleichheit der spezif. Aktivitäten der dem Guanin und Leucopterin entsprechenden

³⁴⁾ A. Wacker, A. Trebst u. H. Simon, Z. Naturforschg. 14b, 707 [1959].

³⁵⁾ H. S. Loring, J. L. Fairley, H. W. Bortner u. H. L. Seagran, J. biol. Chemistry 197, 809 [1952].

³⁶⁾ W. E. Cohn, Science [Washington] 109, 377 [1949].

³⁷⁾ P. Reichard in E. Chargaff u. J. N. Davidson: The Nucleic Acids, Bd. 2, Academic Press New York 1955; B. Magasanik, Ann. Rev. Microbiol. 11, 221 [1957].

C-Atome erklären, so muß man aber folgende, äußerst unwahrscheinliche Annahmen machen:

1. Der Einbau in C⁸, das von einem Pankohlenstoff-Donator stammt, in das Imidazol-carboxamid und das Aminopiperazin-carboxamid erfolgt gleichzeitig aus dem C₁-Donator-Pool.

2. Da das Guanin, das aus den markierten Vorläufern stammt, durch bereits vorhandenes Guanin stark verdünnt wird, müßte die Pterin-Bildung, da sie nicht das Guanin durchläuft, praktisch dieselbe Verdünnung erleiden.

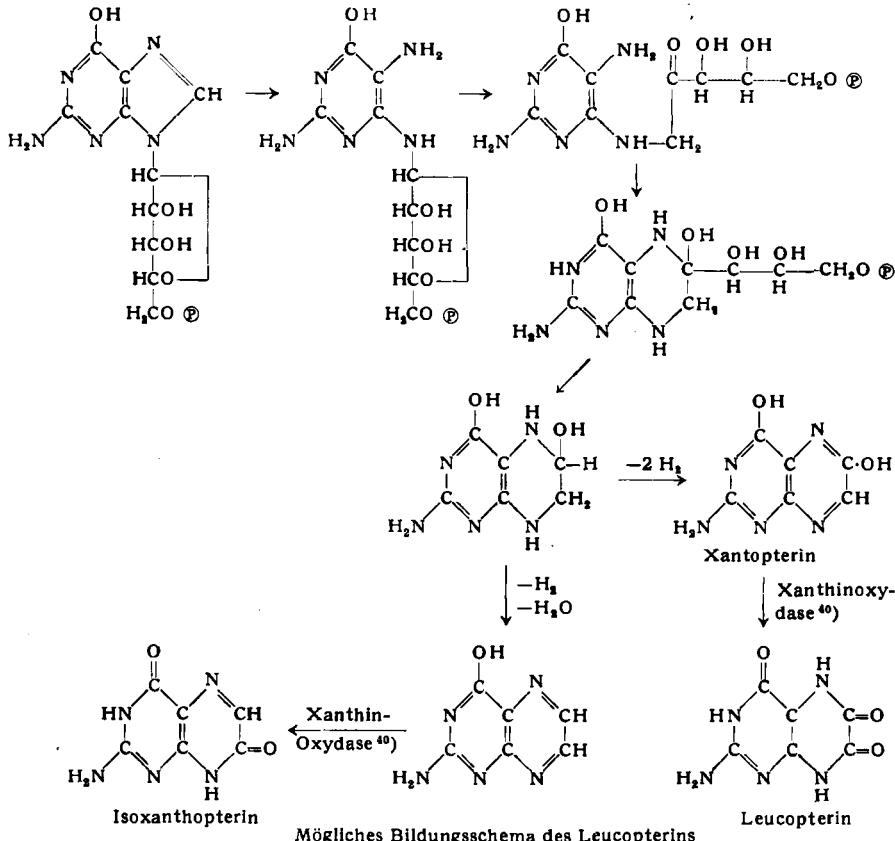
Die Ergebnisse zwingen daher zu der Annahme, daß das Leucopterin aus dem Guanin hervorgeht.

Die Annahme der direkten Umwandlung von Purin in Leucopterin wird gestützt durch den Befund, daß eine Raupe ca. 200 bis 250 µg mehr Guanin besitzt als ein Schmetterling. Durch Verdünnungsanalyse mit Hilfe von Guanin-[2-¹⁴C] wurde zu drei verschiedenen Zeiten der Guanin-Gehalt bestimmt. Im Vorpuppenstadium besitzt der Kohlweißling ca. 360 µg Guanin, in der Mitte des Puppenstadiums ca. 230 µg und als Schmetterling nur noch ca. 125 µg. Es verschwindet also Guanin, und es bildet sich Leucopterin. Die Menge und die spezif. Aktivität von Adenin im Schmetterling ist etwa von der gleichen Größe wie die des Guanins. Nimmt man noch an, daß sich Guanin und Adenin im Kohlweißling gegenseitig ineinander umwandeln, wie dies für tierische Organismen seit längerer Zeit bekannt ist³⁸⁾, und etwa genau so viel Adenin während der Entwicklung der Rauen zu Schmetterlingen verschwindet, so hat man eine nahezu aufgehende Bilanz. Ein Schmetterling besitzt im allgemeinen 500–750 µg Leucopterin.

Schlußbetrachtung

Nachdem einerseits die Herkunft der C-Atome 8 und 9 des Leucopterins aus einer Pentose und andererseits die Umwandlung von Purin in Pterin sehr wahrscheinlich gemacht wurde, kann man folgendes Bildungsschema diskutieren:

Aus dem Guanosin oder der Guanylsäure wird C⁸ eliminiert und der Ribosyl-Rest wird unter Ausbildung des Pyrazin-Ringes, vermutlich nach einer *Amadori-Umlagerung* direkt einkondensiert. Anschließend wird die C₈-Kette vom C⁸ des Pteridin-Gerüstes abgespalten, der sich eine Dehydrierung und Hydroxylierung anschließt. In dem Formelschema ist außerdem die mögliche Entstehungsweise von Xanthopterin und Isoxanthopterin, Begleitern des Leucopterins, sowie die von 2-Amino-6-hydroxy-pyrimidin, das ebenfalls in der Natur vorkommt³⁹⁾, skizziert.



Als weitere Möglichkeit kann man diskutieren, daß aus dem Guanosin bzw. der Guanylsäure zunächst sowohl C⁸ wie auch der Zuckerrest eliminiert werden, worauf

- a) entweder ein Zweierbruchstück aus Pentose oder
- b) eine Pentose bzw. ihr Phosphat unter Ausbildung des Pyrazin-Ringes reagiert. Zwischenprodukt wäre hierbei 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin.

Unsere alten Befunde sowie die neuen von Nathan et al.⁴¹⁾, nach denen 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin zur Pterin-Synthese verwertet wird, lassen keine Entscheidung zwischen den hier diskutierten Bildungsmöglichkeiten zu, da das Pyrimidin-Derivat mit einer Pentose glykosidiert werden könnte.

In Übereinstimmung mit dem Übergang Guanosin(phosphat) in Pterine steht die Tatsache, daß fast alle in der Natur bisher gefundenen Pterine wie das Guanin in der 2-Stellung eine Amino- und in der 6-Stellung eine Hydroxyl-Gruppe tragen. Ferner steht, soweit vorhanden, eine Seitenkette ebenfalls fast stets in der 8-Stellung.

Unsere Untersuchungen, die Anregungen zu vielen weiteren Versuchen bieten, werden fortgesetzt.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Bundesministerium für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft danken wir für finanzielle Unterstützung, Frl. H. Pflaumer und Herrn G. Biebalski für sorgfältige ¹⁴C-Analysen.

Eingegangen am 4. April 1961 [A 144]

³⁸⁾ G. B. Brown, Ann. Rev. Biochemistry 22, 150 [1953].

³⁹⁾ M. Viscontini, M. Schoeller, E. Loeser, P. Karrer u. E. Hadorn, Helv. chim. Acta 38, 3972 [1955]; H. S. Forrest u. H. K. Mitchell, J. Amer. chem. Soc. 77, 4865 [1955]; M. Viscontini, A. Kühn u. A. Egelhaaf, Z. Naturforsch. 11b, 501 [1956].

⁴⁰⁾ O. H. Lowry, O. A. Bessey u. E. J. Grawford, J. biol. Chemistry 180, 389, 399 [1949].

⁴¹⁾ H. A. Nathan u. H. B. Funk, Amer. J. Clin. Nutr. 7, 375 [1959]; H. A. Nathan, H. Baker u. O. Frank, Nature [London] 188, 35 [1960].