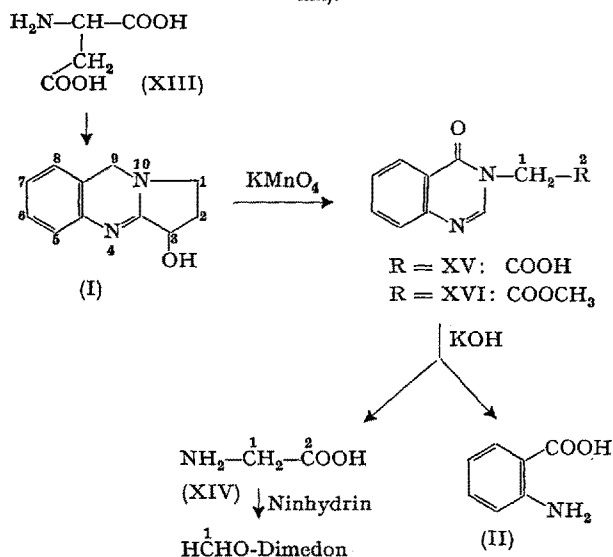


Über den Einbau von Asparaginsäure in Peganin

Der bekannteste Vertreter der Alkaloide vom Pyrrolidinochinazolin-Typ ist das Peganin (=Vasicin) (I). Dieses Alkaloid ist bisher in den Gattungen *Adhatoda* (Acanthaceae), *Peganum* (Zygophyllaceae), *Linaria* (Scrophulariaceae) und *Galega* (Papilionaceae) gefunden worden.

Kürzlich konnten wir zeigen¹, dass Anthranilsäure (II) spezifisch unter Erhaltung der Carboxylgruppe in Peganin inkorporiert wird. Über den zweiten an der Biosynthese von (I) beteiligten Baustein liegen nur wenige Untersuchungen vor^{2,3}. Nach SCHÖPF⁴ käme hierfür α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd (III) in Frage. ROBINSON⁵ postuliert Anthranilsäure und Prolin (IV) als Vorstufen. Denkbar wäre auch die Beteiligung von Putrescin (V) an der Biosynthese von (I). Putrescin kann durch Diaminoxydase in γ -Aminobutyraldehyd (VI) übergehen, welcher sich unter zellmöglichen Bedingungen mit *o*-Aminobenzaldehyd (VII) zum Desoxyvasicin (VIII) kondensiert. VIRTANEN und HIETALA⁶ konnten zeigen, daß Extrakte von *E. coli* in der Lage sind, γ -Hydroxyglutaminsäure (IX) zu α -Hydroxy- γ -aminobuttersäure (X) zu decarboxylieren. (X) ist die unmittelbare Vorstufe von α -Hydroxy- γ -aminobutyraldehyd (III), der sich in vitro leicht mit (VII) zu Peganin umsetzen lässt⁷.

Abbau von Peganin (Bezifferung der Abbauprodukte wie im Peganin).



Wir konnten nachweisen⁸, dass Desoxyvasicin in der Pflanze nicht unter Bildung von (I) hydroxyliert wird. Weitere Fütterungsversuche mit Putrescin 1,4-C¹⁴ (XI), 4-Hydroxyprolin-C¹⁴ (XII) und γ -Hydroxyglutaminsäure-2-C¹⁴ (IX) ergaben radioaktives Peganin. Der Abbau von (I) ergab, dass in jedem Fall ein erheblicher Teil der Radioaktivität in der durch Abbau erhaltenen Anthranilsäure lokalisiert war. Diese Verbindungen sind offenbar unspezifisch inkorporiert worden⁸ und scheinen nicht als direkte Vorstufen des «Nicht-Anthranilsäureteils» von (I) in Frage zu kommen. Andere Verhältnisse beobachteten wir bei der Verfütterung von Asparaginsäure-3-C¹⁴ (XIII) (Tabelle).

Ein geringer Teil der Radioaktivität erscheint auch hier in der Anthranilsäure. Dies ist bei der grossen Stoffwechselaktivität von (XIII) erklärlich. Durch gleichzeitige Gabe von nicht markiertem (II) liess sich die Radioaktivität im aromatischen Teil des Peganins zurückdrängen. Der überwiegende Teil der Radioaktivität (~80%) war im durch Abbau erhaltenen Glycin (XIV) lokalisiert, welches den C-Atomen 1 und 2 des Peganins entspricht. Spaltung von (XIV) ergab, dass etwa die Hälfte der Radioaktivität im C-2 und ein Drittel im C-1 des Alkaloids sich befand. Eine Verschmierung der Radioaktivität der Asparaginsäure-3-C¹⁴ zwischen den C-Atomen 2 und 3 ist auch bei Einbauversuchen in das Ricinin⁹ und den Pyridin-Teil des Nikotins¹⁰ beobachtet worden. Die Ergebnisse von⁹ sprechen für den Einbau einer symmetrischen Zwischenstufe in das Ricinin. JACKANICZ und BYERRUM¹⁰ postulieren die Inkorporation einer unsymmetrischen Verbindung (Asparaginsäure, Oxalacetat, Malat) bei ihrem Alkaloid, da im C-3 des

¹ D. GRÖGER, S. JOHNE und K. MOTHES, *Experientia* 21, 13 (1965).

² D. GRÖGER und S. JOHNE, *Beiträge zur Biochemie und Physiologie von Naturstoffen. Festschrift Kurt Mothes* (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena 1966), p. 205.

³ D. GRÖGER, S. JOHNE und K. MOTHES, *Abh. dt. Akad. Wiss. Berl. Kl. Chem. Geol. Biol.* 3, 581 (1966).

⁴ C. SCHÖPF und F. OECHLER, *Justus Liebig's Annln Chem.* 523, 1 (1936).

⁵ R. ROBINSON, *The Structural Relations of Natural Products* (Clarendon Press, Oxford 1955).

⁶ A. I. VIRTANEN und P. K. HIETALA, *Acta chem. scand.* 9, 549 (1955).

⁷ N. J. LEONARD und M. J. MARTELL JR., *Tetrahedron Lett.* 1960, 44.

⁸ D. GRÖGER und S. JOHNE, unveröffentlicht.

⁹ S. R. JOHNS und L. MARION, *Can. J. Chem.* 44, 23 (1966).

¹⁰ T. M. JACKANICZ und R. U. BYERRUM, *J. biol. Chem.* 241, 1296 (1966).

Einbau von Asparaginsäure-3-C¹⁴ = (XIII) in Peganin

Spez. Aktivität Peganin, Ipm/mM	Spezifische Aktivität der Abbauprodukte, Ipm/mM				
	Anthranilsäure	Glycin C-1 + C-2	C-1 als HCHO-Dimedon	C-2 durch Differenz	C-3 + C-10 nicht bestimmt
(A) 2,06 × 10 ⁵ , 100%	3,68 × 10 ⁴ , 17,9%	1,68 × 10 ⁵ , 81,5%	7 × 10 ⁴ , 34%	47,5%	0,6%
(B) 4,09 × 10 ⁵ , 100%	4,33 × 10 ⁴ , 10,6%	3,33 × 10 ⁵ , 81 %	1,23 × 10 ⁵ , 30%	51 %	8,4%
(C) 1,58 × 10 ⁵ , 100%	1,3 × 10 ⁴ , 8,2%	1,35 × 10 ⁵ , 85,5%	5,85 × 10 ⁴ , 37%	48,5%	6,3%

(A) Verfüttert 2 mg (XIII). Spez. Aktivität 2,72 × 10⁵ Ipm/mM. Versuchszeit 1 Tag (April 1966). (B) Verfüttert 2 mg (XIII). Spez. Aktivität wie (A) + 3 mg Anthranilsäure. Versuchszeit 3 Tage (April 1966). (C) Verfüttert 8,9 mg (XIII). Spez. Aktivität 2,23 × 10⁵ Ipm/mM + 4,5 mg Anthranilsäure. Versuchszeit 2 Tage (April 1967).

Pyridins stets viel mehr Radioaktivität als im C-2 lokalisiert war. Im Falle des Peganins liegen nach Fütterung von (XIII) ähnliche Verhältnisse vor wie bei ¹⁰. Wir dürfen annehmen, dass Asparaginsäure oder eine nahe verwandte Verbindung (Malat, Oxalacetat) direkt an der Biosynthese des Pyrrolidinringes vom (I) beteiligt ist.

Experimentelles. DL-Asparaginsäure-3-C¹⁴ (Calbiochem) wurde mit inaktiver (XIII) verdünnt und an Jungpflanzen (Sprosslänge 8–10 cm) von *Adhatoda vasica* Nees über die Wurzeln appliziert. Die Versuche wurden in 2 Vegetationsperioden durchgeführt. Einzelheiten sind der Tabelle zu entnehmen. Die Isolierung des Peganins sowie der Abbau des Alkaloids haben wir nach ¹ durchgeführt (Schema). Peganin wurde mit KMnO₄ zur 4-Oxo-3,4-dihydro-chinazoly-3-essigsäure (XV) oxydiert. Dessen Methylester (XVI) haben wir mit KOH gespalten, wobei Anthranilsäure (II) und Glycin (XIV) entstehen. Glycin wurde wie folgt isoliert: Zur Entsalzung haben wir die fast anthranilsäurefreie Lösung über Dowex 50 H⁺ gegeben und die Aminosäure mit 1*N* Ammoniak eluiert. Die Reinigung des Glycins erfolgte durch DC an alkalischen Kieselgel G «Merck»: 1. Laufmittel 70% Äthanol. 2. Laufmittel *n*-Butanol/Wasser/Eisessig (4:1:1). Zur Elution benutzen wir jeweils 70% Äthanol.

Glycin wurde quantitativ in Anlehnung an KRÜGER¹¹ bestimmt. Einen aliquoten Teil der Aminosäure haben wir mit Ninhydrin umgesetzt und den entstandenen Formaldehyd als Dimedon-Derivat kristallin erhalten. Die Umkristallisation erfolgte aus verdünntem Äthanol,

Smp. 189°. Zur Radioaktivitätsmessung diente der Methan-durchflusszähler der Firma Friesecke und Höpfner¹².

Summary. Aspartate-3-C¹⁴ (XIII) was administered to young plants of *Adhatoda vasica* Nees. After a feeding period of 1 or 2 days, the isolated alkaloid peganine (=vasicine) (I) was degraded. The distribution of the radioactivity in the anthranilic acid (II) and glycine (XIV) obtained has been determined (Figure). Most of the radioactivity (~80%) was localized in the glycine corresponding to the positions 1 and 2 of peganine. More radioactivity was recovered from position 2 of the alkaloid than from position 1. The labelling pattern is discussed. The results indicate either that aspartate or a closely related compound is an immediate precursor of peganine.

D. GRÖGER, S. JOHNE und K. MOTHES

Deutsche Akademie der Wissenschaften, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale), DDR.
2. Mai 1967.

¹¹ R. KRÜGER, *Helv. chim. Acta* 32, 238 (1949).

¹² Anmerkung. Die mögliche Beteiligung der Asparaginsäure an der Biosynthese des Peganins ist erstmalig im Frühjahr 1966 während eines Vortrages mit Professor Dr. H. G. FLOSS, Purdue University, Lafayette (USA), früher Org. chem. Institut der T.H. München, diskutiert worden.

Influence of Cytostatic Agents on Fibrinolytic and Proteolytic Enzymes and on Phagocytosis of Guinea-Pig Leucocytes

Several authors^{1,2} postulated that proteolytic enzymes from leucocytes are involved in phagocytosis. The purpose of this work is to investigate the effect of some cytostatic agents on fibrinolytic and proteolytic enzymes and on phagocytosis index of guinea-pig leucocytes.

25 guinea-pigs of both sexes (weight 300–400 g) were used. Peritoneal exudates were evoked by injection of 0.1% solution of glycogen. The exudates were collected 15 h after injection of glycogen. Phagocytosis index was calculated according to the DAVIES method³. Polymorphonuclear leucocytes from exudates were mixed with opsonized strain of *Staphylococcus aureus* 209 P. 100 cells were counted in each sample. Saline solutions of the drugs were injected i.p. 1 h before collection of exudate. The following doses/kg body weight were applied: endoxan 2.5 mg, trenimon 0.25 mg, 5-fluorouracil 125 mg, mitomycin C 2.5 mg and nitrogranulogen 0.25 mg. The control group comprised 9 animals and 0.9% NaCl solution was injected instead of cytostatics. The leucocyte count of all samples amounted to 10,000/mm³. Homogenate of the leucocytes were dialysed against phosphate buffer at + 4°C for 18 h. The activity of alkaline and acid leucocyte protease was determined by the caseinolytic method. The activities of both proteases were expressed as increase of optical density $\times 10^3$. The fibrinolytic enzymes: plasminogen, plasminogen activator and spontaneous fibrinolytic activity were studied, using

ASTRUP and LASSEN plate method. Details concerning preparation of leucocyte homogenate and proteolytic and fibrinolytic methods will be reported elsewhere⁴. The fibrinolytic activity was expressed as mm² of area of digested fibrin.

The Table shows that cytostatic agents rapidly induce a significant decrease of all investigated fibrinolytic and proteolytic enzymes. The activities of these enzymes in cytostatic treated leucocytes amounted on the average to about 20% of the values of control leucocytes. This decrease of enzymatic activities was statistically significant ($p < 0.01$) when 9 samples of control leucocytes were compared with 16 samples of leucocytes collected from animals treated with various cytostatic agents. A slight decrease of phagocytosis index in treated animals was observed but this is not statistically significant. No correlation between the degree of inhibition of phagocytosis index and the decrease of activities of fibrinolytic and proteolytic enzymes can be stated in particular animals. It is of interest to notice that in some leucocyte samples plasminogen disappeared while the phagocytosis index was only slightly depressed. Therefore it can be concluded that the plasminogen is not directly involved in phagocytosis. This observation is in good agreement with another finding of one of us⁴ that plasminogen is not

¹ C. DE DUVE, *Fedn Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol.* 23, 1045 (1964).

² J. G. HIRSCH and Z. A. COHN, *J. exp. Med.* 172, 1005 (1960).

³ G. E. DAVIES, *J. Path. Bact.* 63, 149 (1951).

⁴ J. PROKOPOWICZ, *Thromb. Diath. haemorrh.*, in press.