

HEINZ REMBOLD und LOTHAR BUSCHMANN

Struktur und Synthese des Neopterins

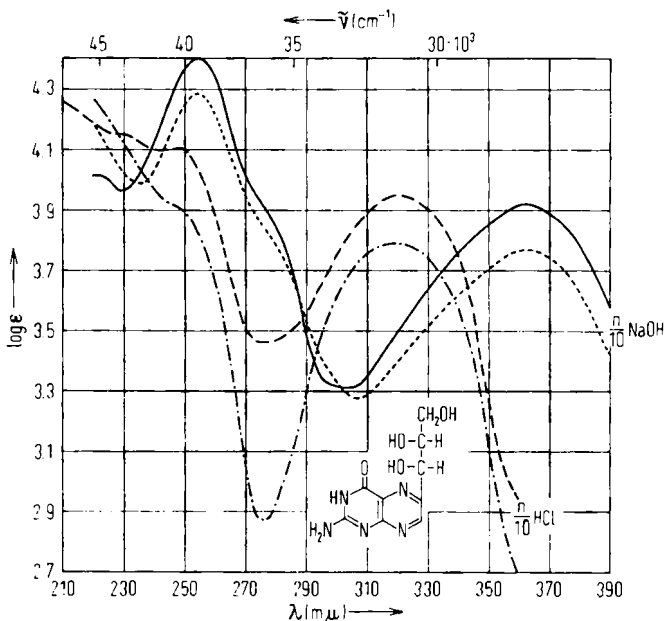
Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 17. Dezember 1962)

Neopterin hat die Konfiguration eines 2-Amino-4-hydroxy-6-[D-*erythro*-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridins. Es kommt in geringer Menge in der Flugbiene vor und ist ein charakteristischer Bestandteil des Weiselzellenfuttersaftes der Honigbiene. Für *Crithidia fasciculata* ist Neopterin kein Wachstoffsstoff. Seine mögliche Funktion als Vorstufe bei der Biosynthese des Biopterins wird diskutiert.

Bei unseren Untersuchungen über die Pteridine der Bienenpuppe¹⁾ isolierten wir aus 2000 Puppen 0.03 mg eines unbekanntes, blau fluoreszierendes Pterins, für das wir den Namen Neopterin vorgeschlagen haben. Es läßt sich durch Permanganat-oxidation zur 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) abbauen und ist papierchromatographisch identisch mit synthetischem 2-Amino-4-hydroxy-6-[1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridin.

Inzwischen haben wir Neopterin auch aus Flugbienen und aus Weiselzellenfuttersaft isoliert. Während sich in den Bienen nur Spuren von Neopterin auffinden lassen,



Vergleich der Molextinktionen von synthetischem 2-Amino-4-hydroxy-6-[D-*erythro*-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridin mit Neopterin aus Weiselzellenfuttersaft. — — — Syntheseprodukt, - - - - - Naturstoff in 0.1 N HCl; ——— Syntheseprodukt, ····· Naturstoff in 0.1 N NaOH

¹⁾ H. REMBOLD und L. BUSCHMANN, Liebigs Ann. Chem. 662, 72 [1963].

konnten wir aus 300 Gramm Weiselfutter insgesamt 0.35 mg Neopterin gewinnen. Sein UV-Spektrum entspricht dem von synthetischem 2-Amino-4-hydroxy-6-[1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridin (vgl. Abbild.). Das Molekül enthält in der Trihydroxy-propyl-Seitenkette zwei Asymmetriezentren, die vier Isomeriemöglichkeiten zulassen. Wir stellten alle vier Isomeren synthetisch dar, um durch Vergleich ihrer Eigenschaften zu einer eindeutigen Zuordnung der Neopterinstruktur zu gelangen.

Die Synthese des *L-erythro*-Trihydroxy-propyl-pterins haben wir bereits beschrieben²⁾. Analog erhielten wir die übrigen Isomeren durch Kondensation von 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin mit *D*-Ribose (*D-erythro*-Konfiguration), *L*-Xylose (*L-threo*-Konfiguration) bzw. *D*-Xylose (*D-threo*-Konfiguration). Die vier Isomeren weisen erwartungsgemäß ein identisches UV-Spektrum auf und unterscheiden sich deutlich in ihrer optischen Aktivität. Weitere Unterschiede ergeben sich bei der Papierchromatographie im System Isopropylalkohol/5-proz. wäßr. Borsäure (4:1) und im Wachstumstest bei *Crithidia fasciculata*. Die Eigenschaften der vier synthetischen Isomeren sind mit denen des Neopterins in Tab. 1 zusammengestellt.

Tab. 1. Vergleich der vier isomeren 2-Amino-4-hydroxy-6-[1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridine mit Neopterin

	R_F -Werte in Isopropylalkohol/5-proz. Borsäure (4:1)	halboptimale Wachstoffs-konz. (mg/ccm Nährlösung)	$[\alpha]_D^{25}$ in 0.1 <i>n</i> HCl (<i>c</i> = 0.3)
Neopterin	0.21	5	
<i>D-erythro</i>	0.21	10	+45 ± 3°
<i>L-erythro</i>	0.21	0.03	-44 ± 3°
<i>D-threo</i>	0.12	10	-92 ± 3°
<i>L-threo</i>	0.12	2	+97 ± 3°

Neopterin besitzt nach seinem papierchromatographischen Verhalten *erythro*-Konfiguration und ist im *Crithidia*-Test inaktiv. Damit ist seine Struktur eindeutig als 2-Amino-4-hydroxy-6-[*D-erythro*-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridin bewiesen.

Auffallend ist die niedrige Konzentration des Neopterins in dem von uns untersuchten biologischen Material (vgl. Tab. 2).

Tab. 2. Konzentration von Neopterin und Biopterin in γ pro g Bienenfuttersaft, pro Bienenpuppe und pro Biene

	Weiselzellen- futtersaft	Arbeiterinnen- futtersaft	Bienen- puppen	Bienen
Neopterin	3	0.3	0.015	0.005
Biopterin	25	4	0.2	0.2

Die biologische Bedeutung dieses Pterins bedarf noch der Klärung. Es wird von verschiedenen Autoren als erstes Folgeprodukt bei der Umwandlung der Purine (z. B. Guanosin) in die Pterine postuliert, ein Weg, der nach Arbeiten von WEYGAND und Mitarbb.³⁾ über die Biosynthese des Leukopterins wahrscheinlich gemacht ist

²⁾ H. REMBOLD und H. METZGER, Chem. Ber. 96, 1395 [1963], vorstehend.

³⁾ F. WEYGAND, H. SIMON, G. DAHMS, M. WALDSCHMIDT, H. J. SCHLIEP und H. WACKER, Angew. Chem. 73, 402 [1961].

Für die Annahme, daß Neopterin das erste stabile Produkt der Purin-Pterin-Umwandlung und eine Vorstufe bei der Biosynthese des Biopterins (2-Amino-4-hydroxy-6-[L-erythro-1.2-dihydroxy-propyl]-pteridin) ist, sprechen folgende Argumente:

1. Im Gegensatz zur L-erythro-Konfiguration des Biopterins besitzt Neopterin in der Seitenkette D-erythro-Konfiguration. Gerade dies ist aber nach den oben zitierten Vorstellungen über die Pterinbiosynthese zu erwarten. Wird nämlich bei der Umwandlung eines Purinribosids das C-8 aus dem Imidazolring eliminiert und der Ribosylrest unter Ausbildung des Pyrazinrings einkondensiert, so gelangen die C-Atome 3–5 des Ribosylrestes in die Trihydroxy-propyl-Seitenkette des Pterins. Ribose hat aber in C-3 und C-4 die D-erythro-Konfiguration des Neopterins.

2. Das Verhältnis Neopterin zu Biopterin beträgt sowohl im Weiselzellenfuttersaft als auch im Arbeiterinnenfuttersaft ziemlich genau 1:10, obwohl die beiden Pterine im Weiselfutter in bedeutend höherer Konzentration enthalten sind. Dies deutet auf einen direkten biogenetischen Zusammenhang des Neopterins speziell mit dem Biopterin hin. Wir halten es für wahrscheinlich, daß Neopterin als biologische Vorstufe zu einem geringen Teil mit dem Biopterin in das Drüsensekret gelangt.

Das Protozoon *Crithidia fasciculata* hat die Fähigkeit zur Biopterinsynthese verloren. Da Neopterin keine Wuchsstoffwirkung besitzt, muß man auf Grund der obigen Überlegungen auf einen enzymatischen Block in der Synthesekette zwischen Neopterin und Biopterin schließen. Die Wuchsstoffwirkung des in seiner Konfiguration dem Biopterin entsprechenden 2-Amino-4-hydroxy-6-[L-erythro-1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridins könnte man damit erklären, daß es ein weiteres Zwischenglied in der Synthesekette ist. Diese Verbindung konnten wir aber in dem von uns untersuchten biologischen Material nicht nachweisen. Der Syntheseweg vom Neopterin zum Biopterin soll mit Hilfe radioaktiv markierter Verbindungen weiter untersucht werden.

Herrn Professor A. BUTENANDT sind wir für die großzügige Förderung dieser Untersuchungen dankbar. Herrn Dr. K. A. FORSTER, Fa. H. MACK NACHF., haben wir wiederum für die Überlassung von Ausgangsmaterial herzlich zu danken. Ferner danken wir der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für eine Sachbeihilfe. Fräulein S. SCHÄR leistete bei der Isolierung des Neopterins aus Weiselfutter, Fräulein G. RÄDEL bei der Durchführung des *Crithidia*-Tests, Fräulein I. EHRHARDT bei der Aufnahme der UV-Spektren wertvolle Hilfe.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die chromatographischen Fraktionen wurden mit einem UV-Spektralphotometer PMQ II (Zeiss), die UV-Spektren mit einem selbstregistrierenden UV-Spektralphotometer DK 2 (Beckman) vermessen.

Isolierung von Neopterin aus Bienen: Das in 3-proz. Trichloressigsäure lösliche Material aus 2500 Flugbienen wurde, wie für die Untersuchung von Bienenpuppen beschrieben¹⁾, auf Neopterin aufgearbeitet. Die Tiere waren, unter Methanol konserviert, 3 Monate bei +4° aufbewahrt worden. Aus dem Gesamtextrakt wurden 0.013 mg (durch Fluoreszenzmessung bestimmt) Neopterin angereichert.

Bestimmung von Neopterin und Biopterin in Bienenfuttersäften: 3 g Weiselzellenfuttersaft wurden mit Wasser auf 10 ccm verdünnt und mit 5 ccm 10-proz. Trichloressigsäure versetzt.

Das ausgefallene Protein wurde abzentrifugiert, 2 mal mit 3-proz. Trichloressigsäure extrahiert und der Gesamtextrakt über Nacht mit Äther perforiert. Dann wurde i. Vak. auf die Hälfte eingengt und auf eine Ecteola-Säule (Schleicher & Schüll, $1,5 \times 25$ cm) aufgetragen. Bei Elution mit Wasser wandern Neopterin und Biopterin relativ rasch durch die Säule. Die die beiden Pterine enthaltenden Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer eingengt und auf einer Phosphor-Cellulose-Säule (Schleicher & Schüll, $1,5 \times 20$ cm) mit Wasser chromatographiert. Die Präparation der Austauschercellulosen haben wir bereits beschrieben⁴⁾. Das stark angereicherte Gemisch von Neopterin und Biopterin wurde auf 1 ccm eingengt und als 10 cm breiter Streifen auf einen Bogen Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 b) aufgetragen. Entsprechend gewannen wir einen Extrakt aus 3 g Arbeiterinnenfuttermittel, der auf den gleichen Bogen aufgetragen wurde. Eine Zone gleicher Breite wurde zur Bestimmung des Blindwertes ausgespart. Nach absteigender Entwicklung im System n-Butanol/Essigsäure/Wasser (20:3:7) wurden die Neopterin bzw. Biopterin enthaltenden Zonen und ein entsprechender Leerstreifen ausgeschnitten, die zerkleinerten Papierstreifen mit 25 ccm Wasser 3 Stdn. unter gelegentlichem Umschütteln im Dunkeln aufbewahrt, dann über eine Glasfritte abgesaugt und mit 25 ccm Wasser ausgewaschen. Von den auf 10 ccm eingengten Lösungen wurde die Fluoreszenz im Photometer Eppendorf gemessen und aus der um den Leerwert verminderten Fluoreszenzintensität durch Vergleich mit einer bekannten Konzentrationsreihe der Pteridingehalt errechnet. Alle Reinigungsoperationen wurden bei Dämmerlicht vorgenommen.

Isolierung von Neopterin aus Weiselzellenfuttermittel: Die Aufarbeitung von 300 g Weisel-futter wurde bei der Isolierung von natürlichem Biopterin beschrieben²⁾. Neopterin wandert bei der Chromatographie auf Dowex 1X8 dem Biopterin als deutlich erkennbare Fluoreszenzzone voran (vgl. l. c.²⁾, Abbild. 4). Nach Rechromatographie auf Dowex 1X8 (Formiat-form, 2×50 cm) wird bei Elution mit Wasser Biopterin vollständig von Neopterin abgetrennt. Bei der anschließenden Chromatographie an P-Cellulose ($1,5 \times 20$ cm) wird der größte Teil der UV-absorbierenden Begleitstoffe entfernt. Nach dem Spektrenvergleich mit synthetischem Material sind noch etwa 50% Begleitstoffe enthalten, die bei Chromatographie an Sulfoäthyl-Cellulose (Serva, $1,5 \times 20$ cm) entfernt wurden. Die Neopterinfraktion, deren Isolierung anschließend beschrieben ist, wurde im Rotationsverdampfer auf 20 ccm konzentriert, zur Entfernung der Ameisensäure mit Äther perforiert und dann auf 10 ccm eingengt. Die Konzentration wurde aus der Absorption bei $252 \text{ m}\mu$ ²⁾ zu 0.35 mg errechnet und den abgebildeten UV-Spektren zugrundegelegt.

Präparation der Sulfoäthyl-Cellulose: Nachdem feineres Material durch zweimaliges Aufschlammern in Wasser entfernt ist, wird die Cellulose mit Wasser als dünner Brei in ein Chromatographierohr ($1,5 \times 30$ cm) eingefüllt, das unten mit Watte und einem Hahn verschlossen ist. Nach gleichmäßiger Packung der Säulenfüllung wird nacheinander mit 100 ccm einer Lösung, enthaltend 5% Ammoniumformiat und 5% Ameisensäure, mit 100 ccm 5-proz. Ameisensäure und dann mit Wasser gewaschen, bis die ausfließende Flüssigkeit das pH des Waschwassers zeigt. Während der Präparation und bei der anschließenden Chromatographie wird die Tropfgeschwindigkeit auf 6–8 Tropfen/Min. einreguliert.

Zur Chromatographie der Neopterinfraktion wird, nachdem das Material auf die Säule aufgetragen ist (beim Anleuchten mit der UV-Lampe als scharfe Zone am Kopf der Säule erkennbar), mit 10 ccm Wasser überschichtet und sofort ein Ameisensäuregradient angelegt (Mischgefäß 500 ccm Wasser, Vorratsgefäß 500 ccm 2-proz., anschließend 500 ccm 5-proz. Ameisensäure). Neopterin hat bei dem angegebenen Säulenvolumen ein Retentionsvolumen

⁴⁾ H. REMBOLD und L. BUSCHMANN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **330**, 132 [1962].

von etwa 350 ccm. Nach Beendigung der Chromatographie wird die Austauscher-Cellulose, wie für die Präparation beschrieben, im Chromatographierohr regeneriert.

Synthese der isomeren 2-Amino-4-hydroxy-6-[1.2.3-trihydroxy-propyl]-pteridine: 2.4.5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin wurde, wie für die Synthese des L-erythro-Isomeren beschrieben²⁾, mit den entsprechenden Zuckern in 20-proz. Essigsäure kondensiert. Die Chromatographie auf P-Cellulose ist an der gleichen Stelle angegeben. Die Ausbeuten betragen nach Vakuumtrocknung bei 110°, bezogen auf eingesetztes Pyrimidin, bei Kondensation mit

	Rohprodukt	reines Pterin
D-Ribose → D-erythro	49%	5.4 mg (3.5%)
L-Xylose → L-threo	65%	4.5 mg (3%)
D-Xylose → D-threo	57%	4.4 mg (3%)

Crithidia-Wachstumstest: Das Nährmedium und die Inkubationsbedingungen sind bereits beschrieben⁵⁾. Die Tests wurden nach einer Wachstumsdauer von 8 Tagen ausgewertet.

Papierchromatographie der Isomeren: Die Substanzen wurden einzeln und als Mischflecke absteigend auf Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll 2043 b) in dem angegebenen System chromatographiert. Für eine Laufstrecke der Lösungsmittelfront von 25 cm werden etwa 24 Stdn. benötigt. Auch bei Verwendung von Isopropylalkohol/Wasser in verschiedenen Mischungsverhältnissen zeigen sich leichte Unterschiede in den R_F -Werten der erythro- und threo-Formen, jedoch werden diese durch die zugesetzte Borsäure bedeutend verstärkt.

⁵⁾ G. HANSER und H. REMBOLD, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 319, 200 [1960].