

äther¹⁰⁾ aus und filtrierte jeweils vom schwerlöslichen 2,3-Dimethyl-hydrochinon ab. Die kombinierten Filtrate wurden zur Trockne eingedampft, der braune, ölige Rückstand in 50 ml Äther gelöst und mit 2 g Silberoxyd 1 Std. bei Zimmertemperatur geschüttelt, filtriert und das Lösungsmittel abgedampft. Das dunkelgelbe Rohprodukt (1,6 g) wurde an 50 g Silicagel chromatographiert. Dabei eluierten 1,5 l Petroläther 204 mg farbloses Öl, das verworfen wurde. Mit 2,5 l 10-proz. Benzol-Petroläther erhielt man 110 mg eines dunkelgelben Öles. Weitere 500 ml 10-proz. Benzol-Petroläther gaben 301 mg eines gelben Öles mit einem UV.-Absorptionsmaximum bei 254 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 180$). Davon wurden 85 mg an 10 g Polyäthylenpulver (Hostalen W¹¹⁾) mit den folgenden Lösungsmittelgemischen chromatographiert und Fraktionen à 6 ml genommen: 100 ml 80-proz., 100 ml 85-proz. und 100 ml 90-proz. wässriges Aceton. Die Fraktionen 1–32 wurden verworfen. Das Chinon fiel aus den Fraktionen 33–42 in hellgelben Blättchen vom Smp. 45–47° an (20 mg), UV.-Absorptionsmaximum 254 m μ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 245$). Mit dem aus natürlichen Quellen isolierten pflanzlichen Chinon ergab sich keine Smp.-Erniedrigung. Auch die Laufstrecken im Papierchromatogramm waren bei beiden Präparaten gleich.

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung Dr. A. DIRSCHERL) ausgeführt.

SUMMARY

A quinone from leaves, previously investigated by the authors, has been prepared by partial synthesis from solanesol. The latter is shown to have the empirical formula $C_{45}H_{74}O$. Consequently, the quinone from leaves has the structure of a 2,3-dimethylbenzoquinone with a side-chain of 9 isoprene units.

Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

¹⁰⁾ Wenn nicht anders vermerkt, wurde Petroläther vom Siedebereich 40–45° verwendet.

¹¹⁾ FARBERWERKE HOECHST AG., Frankfurt a. M./Hochst.

244. Untersuchungen zur Biosynthese der Pterine bei *Drosophila melanogaster*

Kurze Mitteilung

O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

(12. IX. 59)

Die Bildung der Pterine bei *Drosophila melanogaster*, sowohl bei der Wildform als auch bei verschiedenen Mutanten, ist hauptsächlich von HADORN und seiner Schule¹⁾ eingehend untersucht worden. VISCONTINI u. Mitarb.^{2) 3)} haben eine Reihe dieser Farbstoffe isoliert und ihre Struktur z. T. aufgeklärt. Die *Drosophila* schien uns daher ein geeignetes Objekt für Untersuchungen über die Biosynthese des Pteridingerüsts zu sein. Versuche von WEYGAND u. Mitarb.⁴⁾, welche verschiedene radioaktive Verbindungen in Kohlweisslingspuppen injizierten, haben früher schon gezeigt, dass

1) E. HADORN & H. K. MITCHELL, Proc. Nat. Acad. Sc. US **37**, 650 (1951); E. HADORN, Proc. X, Int. Congr. Genetics, Vol. I; 337 (1959).

2) M. VISCONTINI, E. HADORN & P. KARRER, Helv. **40**, 579 (1957).

3) M. VISCONTINI, E. LOESER & P. KARRER, Helv. **41**, 440 (1958); M. VISCONTINI, Helv. **41**, 1299 (1958); M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, Helv. **42**, 836 (1959).

4) F. WEYGAND & M. WALDSCHMIDT, Angew. Chem. **67**, 328 (1955).

Glykokoll und Formiat Bausteine der Pterine sind. Man kann also annehmen, dass das Pteridingerüst in ähnlicher Weise aufgebaut wird wie das Puringerüst. Nach einer Hypothese von FORREST & MITCHELL⁵⁾ soll überhaupt Harnsäure ein direkter Vorläufer der Pterine sein.

Wir fütterten Larven der *Drosophila* mit verschiedenen radioaktiven Verbindungen und verglichen nach Auftrennung im Papierchromatogramm die spezifischen Aktivitäten der Harnsäure und der verschiedenen Pterine. Als radioaktive Vorstufen wurden Glykokoll-[2-¹⁴C], Formiat-¹⁴C, homogen markierte ¹⁴C-Glucose und Glucose-[1-¹⁴C] untersucht. Als Versuchstiere dienten die Wildform und die Mutante *Sepia*, welche nicht mehr fähig ist, die roten Augenfarbstoffe (Drosopterine) zu bilden, und statt ihrer die gelben Sepiapterine anhäuft. Beim Wildtyp wurde die Harnsäure mit dem Drosopterin und dem Isoxanthopterin verglichen; bei der *Sepia*-Mutante stellten wir der Harnsäure das Sepiapterin und das Isoxanthopterin gegenüber. Die quantitative Bestimmung der Pterine erfolgte durch Absorptionsmessung, wobei wir der Berechnung die von VISCONTINI⁶⁾ und FORREST & MITCHELL⁷⁾ ermittelten Absorptionskoeffizienten zugrunde legten. Die Menge der Harnsäure wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 290 m μ , sowie kolorimetrisch nach BENEDICT & FRANKE⁸⁾ bestimmt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte im Proportionalzählrohr nach feuchter Veraschung der Substanz, im wesentlichen nach RUTSCHMANN⁹⁾.

Bei unseren ersten Versuchen bestimmten wir die spezifische Aktivität von Pterinen und Harnsäure an je 4–6 parallel angesetzten Chromatogrammen. Da sich aber die Menge der Pterine auf einem Chromatogramm von 35–50 Fliegen immer an der unteren Grenze der exakten Bestimmbarkeit bewegt, verwendeten wir bei späteren Versuchen die gemischten Eluate aus je 3 Chromatogrammen. Die Tabelle enthält die Resultate von je einer mit dem Wildtyp (Reihe I) und der *Sepia*-Mutante (Reihe II) ausgeführten Versuchsreihe.

Versuche mit Wildtyp und mit Mutante Sepia

Spez. Aktivitäten in Impulsen pro μ Mol pro Min. Für Drosopterin wurde ein Molekulargewicht von 237 angenommen und für Sepiapterin 240. Es sind jeweils die Zahlen von 2 Parallelversuchen angegeben, bei welchen für jede Bestimmung die Eluate aus je 3 Chromatogrammen zusammengekommen wurden.

Versuchsreihe	Substanz	Glykokoll-[2- ¹⁴ C] x 10 ³	Formiat-[¹⁴ C] x 10 ³	Glucose-[¹⁴ C] x 10 ³
I Wildtyp	Harnsäure	2440; 2520	1350; 1410	280; 225
	Drosopterin	2350; 2410	910; 845	645; 700
	Isoxanthopterin	1630; 1645	700; 845	480; 420
II Mutante <i>Sepia</i>	Harnsäure	1450; 1490	3860; 3910	170; 160
	Sepiapterin	550; 390	510; 530	300; 250
	Isoxanthopterin	930; 800	1950; 1560	240; 190

⁵⁾ H. S. FORREST & H. K. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. **77**, 4865 (1955).

⁶⁾ M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, Helv. **38**, 397 (1955).

⁷⁾ H. S. FORREST & H. K. MITCHELL, Chemistry and Biology of Pteridins, Ciba Found. Symp. **1954**, 143.

⁸⁾ S. R. BENEDICT & E. FRANKE in: PETERS & VAN SLYKE, Quantitative Clinical Chemistry II, London 1932, p. 590.

⁹⁾ J. RUTSCHMANN, Helv. **40**, 428 (1957).

Aus Versuchsreihe I ist ersichtlich, dass die spezifische Radioaktivität der Harnsäure nach Verfütterung von ^{14}C -Glykokoll oder ^{14}C -Formiat höher als diejenige der Pterine ist. Nach Verabreichung von homogen markierter Glucose ist die Aktivität der Harnsäure jedoch wesentlich niedriger als diejenige der Pterine. (Dasselbe Ergebnis wurde in einem Versuch mit $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glucose erhalten, der aber nicht exakt bestimmt, sondern nur mittels Autoradiographie geschätzt wurde.)

Die Versuchsreihe II zeigt, dass bei der *Sepia*-Mutante die Harnsäure in den Ansätzen mit Glykokoll und Formiat ebenfalls viel mehr Radioaktivität aufgenommen hat als die Pterine, und auch hier war nach Verabreichung homogen markierter ^{14}C -Glucose die spezifische Aktivität der Pterine höher als diejenige der Harnsäure.

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, dass am Aufbau des Pteridingerüsts Kohlenstoffatome, die sich aus der Glucose oder einem der Glucose sehr nahestehenden Körper ableiten, in spezifischer Weise beteiligt sind. Wenn die Synthese der Pterine in gleicher Weise vor sich geht wie die Purinsynthese, so wird das N-Atom, das Stellung 8 des Pteridingerüsts liefert, auf einer frühen Stufe der Synthese mit einem Ribosyl-5-Phosphat-Rest verbunden. Man kann sich vorstellen, dass die Ribose direkt in die Bildung des Pyrazinrings einbezogen wird, wobei die C-Atome 1 und 2 der Ribose die C-Atome 6 und 7 des Pteridingerüsts, und die restlichen C-Atome der Ribose die bei verschiedenen Pterinen vorhandene C_3 -Seitenkette am C-6 liefern würden. Als analoger Vorgang kann hier die Bildung des Imidazolrings im Histidin erwähnt werden, bei welchem ebenfalls die C-Atome 1 und 2 der Ribose einbezogen werden¹⁰). Es wäre auch denkbar, dass zuerst eine Substitution am N-5 durch eine unmittelbar aus der Glucose sich ableitende Verbindung erfolgt, analog der Formylierung des entsprechenden C-Atoms bei der Purinsynthese.

Bei Verwendung von Glucose-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] ist die Aktivität der gebildeten Pterine ungefähr gleich gross wie bei Zufuhr von homogen markierter Glucose. Beim Übergang der Glucose in Ribose geht nun aber das C-Atom in Stellung 1 verloren, und man würde in diesem Fall keinen Einbau von Radioaktivität in das Pteridingerüst erwarten. Es ist jedoch zu bedenken, dass während der Verpuppung ein sehr weitgehender Umbau der gesamten Körpersubstanz stattfindet, wie sich z. B. auch aus dem Einbau des C-Isotops in die verschiedenen Aminosäuren ergibt. Unter diesen Bedingungen ist es sehr wahrscheinlich, dass das Isotop in C-1 auf andere Stellungen der Glucosemolekel verteilt wird, so dass der obige Befund mit der Glucose-[$1\text{-}^{14}\text{C}$] die unmittelbare Beteiligung der Ribose oder eines andern Glucosederivats an der Ringbildung nicht ausschliesst. Der Vergleich verschiedener Versuche zeigt, dass das Verhältnis zwischen den spezifischen Aktivitäten der Harnsäure und der gleichzeitig mitgebildeten Pterine beträchtlich schwankt. Man muss daraus schliessen (was auch auf Grund der Lokalisation der Purin- und der Pterin-Synthese in verschiedenen Organen gut verständlich ist), dass kein einheitlicher «Pool» der verschiedenen Bausteine existiert. Unsere Befunde sprechen auch nicht für die oben erwähnte Hypothese von FORREST & MITCHELL, wonach die Pterine aus der fertig gebildeten Harnsäure hervorgehen. Letztere ist wohl als Ausscheidungsprodukt zu betrachten. Wahrscheinlicher scheint uns, dass auf der Stufe, auf der bei der Purinsynthese der Imidazolring geschlossen wird, bei der Pteridinsynthese in der oben skizzierten Weise sich der

¹⁰) B. N. AMES, H. K. MITCHELL & M. B. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1015 (1953).

Pyrazinring bildet. Doch lassen sich noch andere Möglichkeiten zur Zeit nicht ausschliessen.

Wir möchten Herrn Prof. HADORN für sein Interesse an unserer Arbeit sowie für die Lieferung der Versuchstiere bestens danken. Auch Frl. HAEMMERLI und Frl. BLANKART sei für ihren uner-müddlichen Einsatz bei der Aufzucht der Fliegen, sowie Herrn A. SCHMID für seine wertvolle Mit-hilfe bei der Durchführung der Versuche herzlich gedankt. Herrn Prof. VISCONTINI sind wir für die Überlassung von Vergleichssubstanzen sehr verbunden.

Die Arbeit wurde mit Hilfe des *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaft-lichen Forschung* ausgeführt, dem wir an dieser Stelle ebenfalls unsern besten Dank aussprechen.

Experimentelles. — 1. *Ernährung der Versuchstiere.* Die Larven der *Drosophila melano-gaster* (Wildtyp und Mutanten) wurden uns vom Zoologischen Institut der Universität (Prof. HADORN) zur Verfügung gestellt. Wir brachten die Larven am dritten Larventag in Halbrund-schalen, in denen pro 100 Tiere 20 mg Trockenhefe und 0,35 mC radioaktive Substanz in 0,15 ml Wasser suspendiert waren. Die Hefesuspension wurde so bemessen, dass sie von den Larven möglichst vollständig aufgenommen wurde.

2. *Fliegenextrakte.* Je 35 frisch geschlüpfte Fliegen wurden in narkotisiertem Zustand homo-genisiert. Zum Homogenat wurden 0,4–0,5 ml Wasser gegeben. Durch sorgfältiges Erhitzen über freier Flamme während 1–2 Min. wurden die Proteine gefällt. Die klare Lösung wurde auf ca. 0,1 ml eingedampft.

3. *Die Chromatographie* erfolgte auf WHATMAN-Papier Nr. 1. Zuerst wurden die Aminosäuren, deren Radioaktivität bei gewöhnlicher zweidimensionaler Chromatographie die Beurteilung der Pterine erschwerte, in der ersten Dimension mit Wasser gegen die Front gewaschen. Die Pterine wurden dabei nur auf dem untersten Drittel des Filterpapiers auseinandergezogen. Die nach-folgende zweidimensionale Chromatographie mit Propanol-4-proz. NH_3 5:3 (in beiden Dimen-sionen) ergab eine günstige Verteilung der Pterine.

Die fluoreszierenden und absorbierenden Stoffe wurden unter der UV.-Lampe, die radio-aktiven Verbindungen mittels Autoradiographie lokalisiert.

4. *Elution der Substanzen aus dem Papierchromatogramm.* Harnsäure und Pterine wurden in einer Spezialapparatur eluiert, in welcher das Elutionsmittel durch eine Kapillare von oben her auf das Papierstreifen tropft. Harnsäure, Isoxanthopterin und Sepiapterin wurden mit Wasser, Drosoplerin mit verdünntem Ammoniak eluiert.

5. *Rechromatographie des Isoxanthopterins.* Da Isoxanthopterin und Xanthopterin im oben beschriebenen Chromatogramm sehr ähnliche Rf-Werte aufweisen, und da der Blindwert des Papiers bei der für die quantitative Bestimmung von Isoxanthopterin massgebenden Wellenlänge relativ hoch ist, musste Isoxanthopterin rechromatographiert werden. Dies erfolgte auf ge-waschenem Papier in Butanol-Eisessig-Wasser 20:3:7.

6. *Quantitative Bestimmungen.* — a) *Pterine:* 1. *Drosoplerin.* Absorptionsmessung bei 505 $\text{m}\mu$ ²). 2. *Sepiapterin.* Absorptionsmessung bei 420 $\text{m}\mu$ ⁷). 3. *Isoxanthopterin.* Absorptionsmessung bei 340 $\text{m}\mu$ ⁶).

b) *Harnsäure:* 1. Absorptionsmessung bei 290 $\text{m}\mu$ (Mol.-Ext. 11,6 bei 290 $\text{m}\mu$). 2. Bestimmung mit Arsenphosphorwolframsäure⁸).

7. *Bestimmung der Radioaktivität.* Aliquote Teile der Eluate wurden zusammen mit 5 mg Bernsteinsäure in Spezialröhren gefriertrocknet. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch Verbrennung des Kohlenstoffs zu CO_2 und Messung des radioaktiven Anteils im Zählrohr.

SUMMARY

Larvae of *Drosophila melanogaster* (wild type and mutant *Sepia*) were fed with labelled glycine, formate and glucose and the specific radioactivity in uric acid and pterines of the flies was measured. These experiments showed that carbon atoms of the glucose are specifically incorporated into the pterines but not in the purines. Possible pathways are discussed.

Aus dem Biochemischen Institut
der Universität Zürich