

183. Untersuchung über die Biosynthese der Pterine bei *Drosophila melanogaster*

2. Mitteilung¹⁾

von **O. Brenner-Holzach** und **F. Leuthardt**

(24. VI. 61)

Wir haben 1959 an dieser Stelle Versuche über die Biosynthese der Pterine bei *Drosophila melanogaster* mitgeteilt¹⁾. In der vorliegenden Arbeit werden wir diese Versuche genauer beschreiben und über ihre Weiterführung berichten. Die Pterine der *Drosophila* sind besonders von HADORN u. Mitarb. eingehend studiert worden²⁾. Es zeigte sich dabei, dass verschiedene Mutanten der Fliege charakteristische Veränderungen des Pterinstoffwechsels aufweisen. Für die Trennung der verschiedenen fluoreszierenden Stoffe erwies sich die Papierchromatographie als besonders gut geeignet. In vielen Fällen lassen die Chromatogramme die genetischen Differenzen unmittelbar hervortreten. Angeregt durch diese Arbeiten haben VISCONTINI u. Mitarb.³⁾⁴⁾ die fluoreszierenden Substanzen der *Drosophila* genauer untersucht. Sie konnten verschiedene Pterine in reinem Zustand isolieren und ihre Struktur zum Teil aufklären. Über die Biosynthese des Pteridingerüsts war früher nur wenig bekannt. FORREST & MITCHELL stellten 1955 die Hypothese auf, dass die Pterine aus der Harnsäure entstehen⁵⁾. Nach einer Annahme von HUBBY & THROCKMORTON⁶⁾ sollen aus einer Vorstufe zuerst die hellblauen Pterine HB₁ und HB₂ hervorgehen, und aus diesen beiden dann alle übrigen. Experimentelle Untersuchungen über die Biosynthese wurden von WEYGAND u. Mitarb. durchgeführt⁷⁾. Diese Autoren injizierten in die Puppen des Kohlweisslings verschiedene radioaktive Verbindungen, die als Vorstufen der Pterine in Frage kommen, und isolierten aus den Flügeln der geschlüpften Schmetterlinge das Leukopterin. Dieses zeigte nach Verabreichung von Glycin-[1-¹⁴C] und Formiat-[¹⁴C] eine hohe Radioaktivität. Der Abbau ergab eine Lokalisation des Isotops, welche darauf schliessen lässt, dass das Pteridingerüst in ähnlicher Weise aufgebaut wird wie das Puringerüst. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass die Synthese der Pterine über ein Purin als Zwischenstufe führt.

Bei unseren Versuchen ging es uns vor allem darum, über den Ursprung der C-Atome 8 und 9 des Pyrazinrings Auskunft zu erhalten. Bei Verfütterung von markierter Glucose ist die Aktivität der gebildeten Harnsäure wesentlich geringer als die-

¹⁾ 1. Mitt.: O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* **42**, 2254 (1959).

²⁾ E. HADORN & H. K. MITCHELL, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **37**, 650 (1951); E. HADORN, *Proc. X. Int. Congr. Genetics*, Vol. **1**, 337 (1959).

³⁾ M. VISCONTINI, E. HADORN & P. KARRER, *Helv.* **40**, 579 (1957).

⁴⁾ M. VISCONTINI, E. LOESER & P. KARRER, *Helv.* **41**, 440 (1958); M. VISCONTINI, *Helv.* **41**, 1299 (1958); M. VISCONTINI & E. MÖHLMANN, *Helv.* **42**, 836, 1679 (1959).

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

⁶⁾ J. L. HUBBY & L. H. THROCKMORTON, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **46**, 65 (1960).

⁷⁾ F. WEYGAND & M. WALDSCHMIDT, *Angew. Chem.* **67**, 328 (1955); F. WEYGAND, H. J. SCHLIEP, H. SIMON & G. DAHMS, *ibid.* **71**, 522 (1959); F. WEYGAND, G. DAHMS & H. SIMON, *Tagung Physiol. chem. Ges., Berlin* 1959.

jenige der Pterine. Dies deutet darauf hin, dass die Glucose oder eine ihr sehr nahe-stehende Verbindung in spezifischer Weise am Aufbau des Pteridingerüsts, und zwar des Pyrazinrings, beteiligt ist. Als Baustein kommt die Ribose in Frage, die aus der Glucose entweder durch direkte Oxydation oder durch eine Transketolase-Reaktion entstehen kann. Wir nahmen an⁸⁾, dass die in den Purinnucleotiden in Stellung N-9 gebundene Ribose nach Öffnung des Imidazolrings und Elimination des C-Atoms 8 direkt in den Pyrazinring einbezogen wird. Mit dieser Vorstellung, die den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen bildete, stehen alle unsere experimentellen Befunde in Übereinstimmung⁸⁾.

1. *Einbau von radioaktivem Glykokoll in die Purine, Pterine und Aminosäuren der Drosophila (Wildtyp und Mutanten «rosy» und «sepia»)*. Wir verwendeten für unsere Versuche den Wildtyp der *Drosophila melanogaster* und die Mutanten «rosy» und «sepia». Bei «rosy» handelt es sich um eine Mutante, die keine Xanthinoxidase besitzt und daher Harnsäure und Isoxanthopterin nicht mehr bilden kann. Auch die Drosopterine sind nur in geringen Mengen vorhanden. Die «sepia»-Mutante ist nicht mehr fähig, die Drosopterine zu synthetisieren, häuft aber das Sepiapterin an. Bei Verfütterung von Glykokoll-[2-¹⁴C] an 3¹/₂ Tage alte Larven des Wildtyps und der beiden Mutanten und chromatographischer Auftrennung der Purine, Pterine und Aminosäuren von frischgeschlüpften Fliegen ergaben sich zunächst bei der Betrachtung der Autoradiogramme folgende qualitative Resultate:

a) *Purine*: Beim Wildtyp und der Mutante «sepia» zeigt die Harnsäure sehr starke Aktivität. Bei «rosy» dagegen fehlt die Harnsäure; dafür findet sich vermehrt Hypoxanthin mit beträchtlicher Radioaktivität.

b) *Pterine*: Es wurde besonders auf Drosopterin, Isoxanthopterin, Sepiapterin und die hellblauen Pterine HB₁ und HB₂ geachtet. Beim Wildtyp sind die Drosopterine und Isoxanthopterin stark, die hellblauen Pterine, die in eher geringen Mengen vorhanden sind, schwach aktiv. Auf den Chromatogrammen ist am Ort des Sepiapterins fast keine Radioaktivität vorhanden. Dies stimmt mit der Feststellung von HADORN & VISCONTINI¹¹⁾ überein, wonach beim Wildtyp nur Spuren von Sepiapterin vorkommen. Die Gegenwart des letzteren wird durch das chromatographisch gleichlaufende Riboflavin vorgetäuscht.

Bei der «sepia»-Mutante fehlen die Drosopterine. Dagegen ist das Sepiapterin angehäuft und weist starke Aktivität auf. Isoxanthopterin und «HB»-Pterine verhalten sich gleich wie beim Wildtyp.

Bei der Mutante «rosy» fehlt das Isoxanthopterin, und die Drosopterine sind nur in Spuren vorhanden. Sepiapterin ist, vermutlich aus denselben Gründen wie beim Wildtyp, nicht nachweisbar. Im Gegensatz dazu sind die hellblauen Pterine vermehrt und haben Aktivität aufgenommen.

⁸⁾ Die gleiche Vorstellung über die Pterinsynthese haben auch WEYGAND u. Mitarb. in einer soeben publizierten zusammenfassenden Darstellung ihrer Versuche entwickelt⁹⁾. NATHAN u. Mitarb.¹⁰⁾ vermuteten eine Beteiligung der Glucose an der Pterinsynthese auf Grund der Beobachtung, dass 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin zusammen mit Glucose den *Crithidia*-Faktor ersetzen kann.

⁹⁾ F. WEYGAND, H. SIMON, G. DAHMS, M. WALDSCHMIDT, M. J. SCHLIEP & M. WACKER, *Angew. Chem.* 73, 402 (1961).

¹⁰⁾ H. A. NATHAN & H. B. FUNK, *Amer. J. clin. Nutrition* 7, 375 (1959).

¹¹⁾ E. HADORN & M. VISCONTINI, persönliche Mitteilung.

c) *Aminosäuren*: Der Einbau der Radioaktivität in die Aminosäuren verhält sich bei Wildtyp und Mutanten völlig gleich: Die Aktivität erscheint in sämtlichen Aminosäuren, mit Ausnahme der fünf für die *Drosophila* essentiellen (Leucin, Valin, Arginin, Lysin, Histidin).

2. *Einbau von verschiedenen radioaktiven Verbindungen in die Purine und Pterine der Wildform und der Mutante «sepia»*. Wir verwendeten zunächst als radioaktive Vorstufen Glykokoll-[2-¹⁴C], Formiat-[¹⁴C] und total markierte Glucose-[¹⁴C], die wir in gleichen absoluten Aktivitäten zusammen mit Trockenhefe an die *Drosophila*-Larven ungefähr einen halben Tag vor der Verpuppung verfütterten. Aus den frisch geschlüpften Fliegen wurden die Purine und Pterine mit Wasser extrahiert und durch zweidimensionale Papierchromatographie aufgetrennt. Als Mass für den Einbau der radioaktiven Substanzen in Purine und Pterine diente uns die spezifische Aktivität derselben. Die quantitative Bestimmung der Pterine erfolgte durch Absorptionsmessung, wobei wir der Berechnung die von VISCONTINI³⁾12) und FORREST & MITCHELL¹³⁾ ermittelten Absorptionskoeffizienten zugrunde legten. Die Harnsäure wurde durch Messung der Lichtabsorption bei 290 m μ , sowie kolorimetrisch nach BENEDICT & FRANCKE¹⁴⁾ bestimmt. Die Radioaktivität wurde im Proportionalzählrohr, nach feuchter Veraschung der Substanz, im wesentlichen nach RUTSCHMANN¹⁵⁾ gemessen.

Wir verwendeten für diese Versuche den Wildtyp und die Mutante «sepia». Bei der Wildform wurde die Harnsäure mit dem Drosopterin und dem Isoxanthopterin

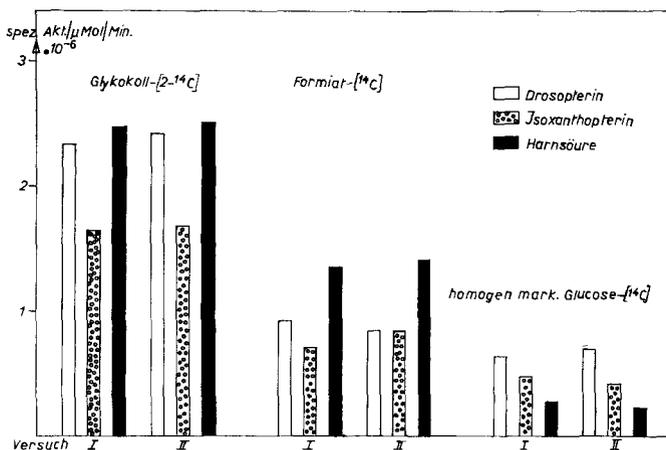


Fig. 1. Wildform der *Drosophila melanogaster*. Spezifische Aktivitäten (Impulse/μMol/Minute) von Drosopterin, Isoxanthopterin und Harnsäure nach Verabreichung von Glykokoll-[2-¹⁴C], Formiat-[¹⁴C] und total markierter Glucose-[¹⁴C]. Für jede Bestimmung wurden Eluate aus je 3 Chromatogrammen vereinigt.

¹²⁾ M. VISCONTINI, M. SCHOELLER, E. LOESER, P. KARRER & E. HADORN, *Helv.* 38, 397 (1955).

¹³⁾ H. S. FORREST & H. K. MITCHELL, *Chemistry and Biology of Pteridins*, Ciba Found. Symp. 1954, 143.

¹⁴⁾ S. R. BENEDICT & E. FRANCKE, in: PETERS and VAN SLYKE, *Quantitative Clinical Chemistry*, Vol. II, p. 590, London 1932.

¹⁵⁾ J. RUTSCHMANN, *Helv.* 40, 428 (1957).

verglichen; bei der «sepia»-Mutante stellten wir der Harnsäure das Sepiapterin und das Isoxanthopterin gegenüber. In Fig. 1 und 2 sind die spezifischen Aktivitäten von Drosopterin bzw. Sepiapterin, Harnsäure und Isoxanthopterin miteinander verglichen.

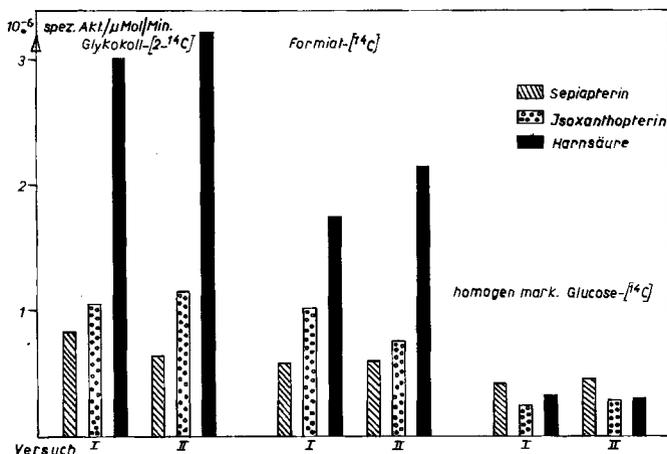
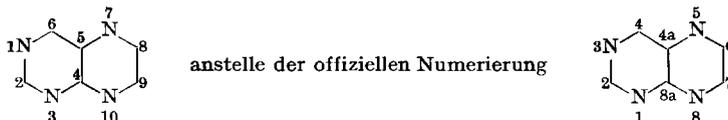


Fig. 2. *Sepiamutante der Drosophila melanogaster*. Erklärung siehe Fig. 1

Es ist aus den graphischen Darstellungen ersichtlich, dass bei den Versuchen mit Glykokoll und Formiat das Verhältnis der Aktivitäten von markierter Harnsäure zu markierten Pterinen 1 oder grösser als 1 ist, während bei Verfütterung von Glucose die Aktivität der Harnsäure wesentlich tiefer liegt (vgl. Fig. 1).

Aus diesen Versuchen geht klar hervor, dass am Aufbau des Pteridingerüsts Kohlenstoffatome, die sich aus der Glucose oder aus einem der Glucose sehr nahestehenden Körper ableiten, in spezifischer Weise beteiligt sind. Und zwar müssen diese Kohlenstoffatome in die Stellungen 8 und 9¹⁶⁾ eingeführt werden, da die übrigen C-Atome des Pteridingerüsts dem Glykokoll, dem Formiat und dem CO₂ entstammen. Wenn die Synthese der Pterine über ein Purin führt, so wird das N-Atom, das Stellung 10 des Pteridingerüsts liefert, auf einer frühen Stufe der Synthese mit einem Ribosyl-5'-phosphat-Rest verbunden¹⁷⁾. Man kann sich nun vorstellen, dass nach Elimination des C-Atoms 8 aus dem Purinnucleotid die Ribose direkt in die Bildung des Pyrazinringes einbezogen wird, wobei die C-Atome 1 und 2 der Ribose die C-Atome 8 und 9 des Pteridingerüsts und die restlichen C-Atome der Ribose die bei

¹⁶⁾ Wir verwenden in dieser Arbeit eine der Numerierung des Puringerüsts entsprechende Bezeichnung der Atome, weil sich daraus unmittelbar der genetische Zusammenhang der beiden Ringsysteme ergibt:



¹⁷⁾ Über die Purinsynthese vgl. J. M. BUCHANAN & S. C. HARTMAN, *Advances Enzymol.* 27, 199 (1959).

verschiedenen Pterinen vorhandene C-Seitenkette am C-Atom 8 liefern würden. Als analoge Vorgänge können hier die Bildung des Indolrings im Tryptophan aus An-
thranilsäure¹⁸⁾ und die Bildung des Imidazolrings im Histidin¹⁹⁾ erwähnt werden,
zu deren Aufbau ebenfalls die C-Atome 1 und 2 der Ribose benützt werden.

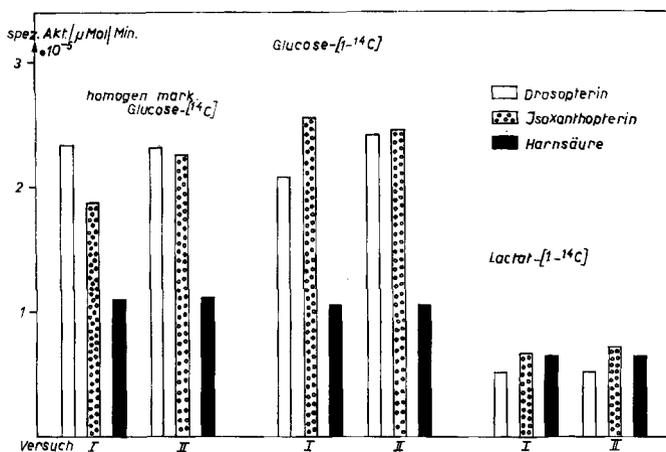


Fig. 3. Spezifische Aktivitäten (Impulse/μMol/Minute) von Drosopterin, Isoxanthopterin und Harnsäure nach Verfütterung von total markierter Glucose-[¹⁴C], von Glucose-[1-¹⁴C] und von Lactat-[1-¹⁴C]

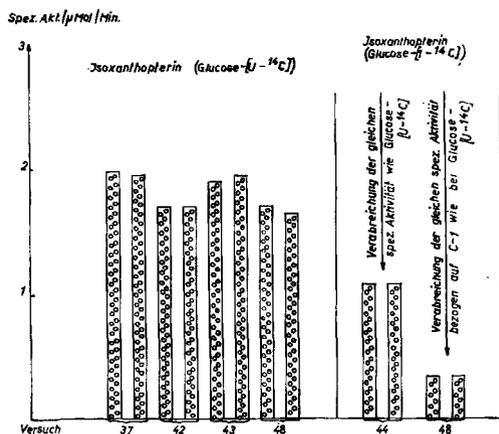


Fig. 4. Spezifische Aktivitäten (Impulse/μMol/Min.) von Isoxanthopterin nach Verabreichung von total markierter und [1-¹⁴C]-Glucose: a) in gleicher absoluter Aktivität; b) in gleicher spez. Aktivität des C-Atoms 1 der Glucose-[1-¹⁴C] und jedes der C-Atome der total markierten Glucose.

Stammen die C-Atome 8 und 9 des Pyrazinrings aus der Ribose, so ist eine geringe spezifische Aktivität der Pterine bei Verwendung von Glucose-[1-¹⁴C] zu erwarten, da das C-1 der Glucose beim Übergang der Glucose in Ribose zum grossen Teil ver-

¹⁸⁾ J. A. DEMOSS & D. M. BONNER, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 1405 (1959); C. YANOFKY & M. RACHMELER, Biochim. biophysica Acta 28, 640 (1958); C. YANOFKY, *ibid.* 20, 438 (1956); O. H. SMITH & C. YANOFKY, J. biol. Chemistry 235, 205 (1960).

¹⁹⁾ B. N. AMES, H. K. MITCHELL & M. B. MITCHELL, J. Amer. chem. Soc. 75, 1015 (1953).

loren geht. Fig. 3 zeigt die Resultate, die wir bei Verwendung von total markierter Glucose und Glucose-[1- ^{14}C] erhalten haben. Wir verfütterten von beiden Zuckern die gleiche absolute und spezifische Aktivität. Die Messung der spezifischen Aktivitäten von Harnsäure und Pterinen ergab mit beiden Glucosen annähernd dieselben Werte. Es muss hier aber berücksichtigt werden, dass bei Verwendung gleicher Aktivitäten von total markierter Glucose und 1- ^{14}C -Glucose das C-Atom 1 der letzteren die 6fache spezifische Aktivität des einzelnen C-Atoms der gleichmässig markierten Verbindung besitzt. Die spezifischen Aktivitäten der in beiden Fällen synthetisierten Produkte können daher nicht direkt verglichen werden; durch die höhere spezifische Aktivität des C-Atoms 1 der 1- ^{14}C -Glucose wird ein zu hoher Einbau vorgetäuscht. Wenn man die 1- ^{14}C -Glucose so stark verdünnt, dass das C-Atom 1 die gleiche Aktivität besitzt wie die einzelnen C-Atome der gleichmässig markierten Glucose, so ist die spezifische Aktivität des gebildeten Isoxanthopterins sehr gering (Fig. 4). Wir werden später auf diese Frage zurückkommen. Es wäre natürlich auch möglich, dass nicht die Glucose selbst, sondern ein Bruchstück derselben zum Aufbau des Pyrazinrings verwendet würde. Aus diesem Grunde führten wir Versuche mit einer C_3 -Verbindung, mit D,L-Lactat-[1- ^{14}C] aus; diese führten jedoch, wie aus Fig. 3 ersichtlich ist, bei Verfütterung der gleichen absoluten und spezifischen Aktivitäten wie bei der Glucose zu wesentlich weniger aktiven Verbindungen. Auch bei Verwendung der doppelten Ausgangsaktivität (für den Fall, dass nur eines der Enantiomeren verwertbar wäre) blieb die Aktivität der Pterine unter derjenigen, die in den Versuchen mit Glucose erhalten wurde. Lactat und die mit ihm verwandten C_3 -Körper scheinen daher als Vorstufe ausser Betracht zu fallen.

Um die Lokalisation des C-Isotops in den biologisch synthetisierten Pteridinen festzustellen, führten wir Abbauprobversuche durch. Zur Prüfung der Abbaumethoden, welche insbesondere die C-Atome 8 und 9 liefern sollten, synthetisierten wir zwei Isoxanthopterine, von welchen eines in Stellung 8, das zweite in Stellung 5 markiert war. Wir wählten dazu das Isoxanthopterin, weil es sich aus den Papierchromatogrammen leicht isolieren lässt, genügend stabil und ausserdem synthetisch gut zugänglich ist.

3. *Chemische Synthese von Isoxanthopterin-[8- ^{14}C] und -[5- ^{14}C] und Abbau von synthetischem und biologisch gebildetem Isoxanthopterin.* – A. Die Synthese von Isoxanthopterin-[8- ^{14}C] erfolgte von Malonsäureester-[2- ^{14}C] aus ²⁰⁾. Durch Oxydation mit SeO_2 wurde Mesoxalester erhalten, der nach PURRMANN ²¹⁾ durch Kondensation mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin über Isoxanthopterincarbonsäure zu Isoxanthopterin führte.

B. Für die Synthese des Isoxanthopterins-[5- ^{14}C] verwendeten wir radioaktive Bromessigsäure-[2- ^{14}C], die mit NaCN in Cyanessigsäure übergeführt wurde ²²⁾. Bei der Kondensation des Cyanessigesters mit Guanidin ²³⁾ erfolgt die Bildung des Pyrimidinringes. Durch Nitrosierung und nachfolgende Reduktion ²³⁾ wurde in Stellung 5 eine dritte Aminogruppe eingeführt und damit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-

²⁰⁾ R. MÜLLER, Ber. deutsch. chem. Ges. 66, 1668 (1933).

²¹⁾ R. PURRMANN, Liebigs Ann. Chem. 548, 284 (1941).

²²⁾ Org. Synthesen (deutsche Ausgabe) Sammelband 1, S. 247, Braunschweig 1937.

²³⁾ C. K. CAIN, M. F. MALLETT & E. C. TAYLOR jun., J. Amer. chem. Soc. 68, 1996 (1946).

hydrogensulfit erhalten. Eine Überführung des Hydrogensulfits ins Sulfat ²⁴⁾ und nachfolgende Kondensation mit Mesoxalester-hydrat führte über Isoxanthopterin-carbonsäure zu Isoxanthopterin-[5-¹⁴C].

Für den *Abbau des Isoxanthopterins* wurden drei Methoden geprüft: Oxydation mit Chlorwasser und nachfolgende Hydrolyse mit HCl ²⁵⁾; Oxydation mit Chlorwasser und nachfolgende Hydrolyse mit NaOH ²⁵⁾; Herstellung der Desiminoverbindung mit NaNO₂ in H₂SO₄, Aufspaltung des Pyrazinringes durch Behandlung mit Chlor und nachfolgende Hydrolyse mit HCl ²⁵⁾ ²⁶⁾.

Bei allen drei Methoden erfolgte die Isolierung der C-Atome 8 und 9 durch Fällung der gebildeten Oxalsäure als Ca-Salz. Von der Abbaumethode muss erwartet werden, dass sie nur im Falle des Isoxanthopterins-[8-¹⁴C] zu aktivem Oxalat führt, d. h. dass nur der Pyrazinring angegriffen wird. Aus den in Tabelle 1 zusammengestellten Versuchen geht klar hervor, dass diese Bedingung nur bei der letztgenannten Methode nach WIELAND & TARTTER ²⁶⁾ erfüllt ist. Bei dieser Abbaumethode wird der Pyrimidinring nicht oder nur sehr wenig angegriffen, das entstandene Calciumoxalat stammt also ausschliesslich aus dem Pyrazinring: Beim Abbau von C-8-markiertem Isoxanthopterin ist die spezifische Aktivität des Oxalats praktisch gleich wie diejenige des Isoxanthopterins; beim Abbau der C-5-markierten Verbindung ist das Calciumoxalat nahezu inaktiv. Bei der Behandlung mit Chlorwasser dagegen werden beide Ringe angegriffen. Die spezifische Aktivität des Calciumoxalats aus beiden markierten Verbindungen ist gegenüber der Ausgangsaktivität herabgesetzt, was auf

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten von C-5 und C-8 markiertem Isoxanthopterin und daraus durch Abbau erhaltenem Calciumoxalat*

Ausgangsmaterial	Abbaumethode	Abbauprodukt	Spez. Akt: Impulse pro μ Mol pro Min.	% der Ausgangs- aktiv.
Isoxanthopterin-[8- ¹⁴ C]			770 (*)	
Isoxanthopterin-[8- ¹⁴ C]	Chlorwasser HCl	Ca-Oxalat	763 331	42
Isoxanthopterin-[8- ¹⁴ C]	Chlorwasser NaOH	Ca-Oxalat	310 295	38
Isoxanthopterin-[8- ¹⁴ C]	NaNO ₂ /Cl ₂ / HCl	Ca-Oxalat	285 750 737	97
Isoxanthopterin-[5- ¹⁴ C]			1144 1124	
Isoxanthopterin-[5- ¹⁴ C]	Chlorwasser HCl	Ca-Oxalat	788 779*) 815 812	71
Isoxanthopterin-[5- ¹⁴ C]	NaNO ₂ /Cl ₂ / HCl	Ca-Oxalat	137 140 140	13
*) Parallelversuche.				

²⁴⁾ M. VISCONTINI, pers. Mitteilung.

²⁵⁾ H. WIELAND, H. METZGER, C. SCHÖPF & M. BÜLOW, Liebigs Ann. Chem. 507, 226 (1933).

²⁶⁾ H. WIELAND & A. TARTTER, Liebigs Ann. Chem. 543, 287 (1939).

Verdünnung des aus C-8 + C-9 stammenden Oxalats durch solches aus dem Pyrimidinring hindeutet.

Um den Abbau von biologisch gebildetem Isoxanthopterin zu untersuchen, fütterten wir Glykokoll-[2-¹⁴C], Glucose-[1-¹⁴C], total markierte Glucose und Fructose. Wir verwendeten dazu pro Ansatz ca. 1000 Larven des Wildtyps. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Auch aus diesen Abbauversuchen ergibt sich, dass die C-Atome 8 und 9 des Isoxanthopterins durch Glucose oder eine aus Glucose hervorgehende Verbindung geliefert werden. Die C-Atome 8 und 9 des Isoxanthopterins, welches in Gegenwart von markierter Glucose gebildet wurde, enthalten nur etwa 40% der Gesamtaktivität der Molekel. Dies hängt damit zusammen, dass während der Versuchsperiode von ca. 5 Tagen eine Verteilung des Isotops auf andere an der Pteridinsynthese beteiligte Ver-

Tabelle 2. *Spezifische Aktivitäten von biologisch gebildetem Isoxanthopterin nach Verfütterung von Glykokoll-[2-¹⁴C], total markierter Fructose und Glucose und Glucose-[1-¹⁴C], und des daraus durch Abbau mit NaNO₂/Cl₂/HCl erhaltenen Calciumoxalates*

Ausgangsprodukt	verfütterte radioaktive Substanz	Abbauprodukt	Spez. Akt.: Impulse/ μMol·Min.	% der Ausgangsaktiv.
Isoxanthopterin (Versuch 41)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]	Ca-Oxalat	4,05 · 10 ⁵	9
Isoxanthopterin (Versuch 41)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]		4,27 · 10 ⁵	
Isoxanthopterin (Versuch 45)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]	3,74 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 45)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]	3,65 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 45)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]	Ca-Oxalat	3,65 · 10 ⁵	9
Isoxanthopterin (Versuch 45)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]		3,72 · 10 ⁵	
Isoxanthopterin (Versuch 45)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]	3,33 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 45)	Glykokoll-[2- ¹⁴ C]	3,27 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 42)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]	Ca-Oxalat	1,69 · 10 ⁵	40
Isoxanthopterin (Versuch 42)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]		1,69 · 10 ⁵	
Isoxanthopterin (Versuch 43)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]	6,50 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 43)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]	6,75 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 43)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]	Ca-Oxalat	1,90 · 10 ⁵	38
Isoxanthopterin (Versuch 43)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]		1,95 · 10 ⁵	
Isoxanthopterin (Versuch 43)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]	7,38 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 43)	total markierte Glucose-[¹⁴ C]	7,24 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 47)	total markierte Fructose-[¹⁴ C]	Ca-Oxalat	1,70 · 10 ⁵	45
Isoxanthopterin (Versuch 47)	total markierte Fructose-[¹⁴ C]		1,68 · 10 ⁵	
Isoxanthopterin (Versuch 47)	total markierte Fructose-[¹⁴ C]	7,60 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 47)	total markierte Fructose-[¹⁴ C]	7,60 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 44)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	Ca-Oxalat	1,09 · 10 ⁵	44
Isoxanthopterin (Versuch 44)	Glucose-[1- ¹⁴ C]		1,08 · 10 ⁵	
Isoxanthopterin (Versuch 44)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	4,82 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 44)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	4,77 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 48)	Glucose-[1- ¹⁴ C] (1/6 der gewöhnl. verabr. Akt.)	Ca-Oxalat	3,5 · 10 ⁴	38
Isoxanthopterin (Versuch 48)	Glucose-[1- ¹⁴ C] (1/6 der gewöhnl. verabr. Akt.)		3,5 · 10 ⁴	
Isoxanthopterin (Versuch 48)	Glucose-[1- ¹⁴ C] (1/6 der gewöhnl. verabr. Akt.)	1,35 · 10 ⁴		
Isoxanthopterin (Versuch 48)	Glucose-[1- ¹⁴ C] (1/6 der gewöhnl. verabr. Akt.)	1,25 · 10 ⁴		

bindungen stattfindet («Randomisierung»). Diese allgemeine Verteilung des Isotops auf die verschiedenen Metabolite erklärt auch, warum in den Versuchen mit Glykoll die C-Atome 8 und 9 eine gewisse Aktivität (9%) enthalten. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass, wie die oben genannten Versuche mit dem Isoxanthopterin-[5-¹⁴C] gezeigt haben, der Pyrimidinring auch beim Abbau des Pterins nach WIELAND & TARTER²⁶⁾ nicht völlig intakt bleibt.

Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, ergibt sich bei Verfütterung von Glucose-[1-¹⁴C] nahezu die gleiche spezifische Aktivität der C-Atome 8+9 wie bei Verabreichung von total markierter Glucose. Wir haben aber schon früher (S. 1485) darauf hingewiesen, dass bei Verfütterung gleicher Aktivitäten der beiden Glucosen die verhältnismässig hohe spezifische Aktivität der in Gegenwart von Glucose-[1-¹⁴C] gebildeten Pterine einen zu hohen Einbau vortäuscht.

Die gleichartige Verteilung der Aktivität im Isoxanthopterin, die man mit total markierter und mit [1-¹⁴C]-Glucose erhält, deutet darauf hin, dass der Einbau in beiden Fällen in ähnlicher Weise erfolgt. Ribose kann aus Glucose durch direkte Oxydation des Glucose-6-phosphats zum Pentose-5-phosphat entstehen, wobei das erste C-Atom der Glucose verloren geht. Sie kann aber auch durch eine Transketolase-Reaktion zwischen Fructose-6-phosphat und Triosephosphat gebildet werden. Bei dieser Reaktion liefert das C-Atom 1 der Hexose das C-Atom 1 der Pentose, wird also nicht eliminiert, sondern geht gemäss unserer Vorstellung in den Pyrazinring des Pterins ein. Das Studium des Einbaus der Glucose in die Ribitol-Seitenkette des Lactoflavins hat zur Annahme eines ähnlichen Mechanismus geführt²⁷⁾. Bei den Dipteren ist das Vorhandensein einer Transketolase nachgewiesen worden²⁸⁾.

Wenn der Ringschluss bei der Bildung der Pyrazinhälfte der Pteridine derart erfolgt, dass die Atome 1 und 2 der Ribose die Atome 8 und 9 des Pterins liefern, so liegt die Annahme nahe, dass bei den Pterinen mit Seitenkette die letztere aus den Atomen 3, 4 und 5 der Ribose hervorgeht. Man wird also erwarten, dass bei Verabreichung einer in den Stellungen 4, 5 oder 6 markierten Glucose das Isoxanthopterin (und andere Pterine ohne Seitenkette) wesentlich weniger Aktivität aufnehmen als die Pterine mit Seitenkette im Grenzfall, wenn keine «Randomisierung» stattfinden würde, gar keine. WEYGAND u. Mitarb.⁷⁾ haben gefunden, dass bei Verabreichung von Glucose-[6-¹⁴C] die Einbaurate des Isotops in das Leukopterin wesentlich geringer ist, als bei Zufuhr von Glucose-[2-¹⁴C] oder Ribose-[1-¹⁴C], und dass insbesondere die Stellungen 8 und 9 nur 9% der Gesamtkaktivität enthalten. Wir haben Glucose-[6-¹⁴C] an *Drosophila*-Larven verfüttert und die Aktivität der Drosopterine mit derjenigen des Isoxanthopterins verglichen. Fig. 5 zeigt, dass die relative Aktivität des Isoxanthopterins im Vergleich zum Drosopterin bei diesem Versuch wesentlich kleiner ist als nach Verfütterung von gleichmässig markierter Glucose oder Glucose-[1-¹⁴C]. Das will heissen, dass die Drosopterine aus der Glucose-[6-¹⁴C] mehr Aktivität aufgenommen haben als das Isoxanthopterin; das Isotop ist offenbar in der Seitenkette lokalisiert, die dem Isoxanthopterin fehlt. Dieser Befund steht mit der obigen Annahme in Übereinstimmung, wonach sich die Seitenkette aus den C-Atomen 3, 4 und 5 der

²⁷⁾ G. W. E. PLAUT, Nutrition Symposium, Ser. Nr. 13, 20 (1956); G. W. E. PLAUT & P. L. BROBERG, J. biol. Chemistry 219, 131 (1956).

²⁸⁾ W. CHEFURKA, Canad. J. Biochemistry and Physiol. 36, 83 (1958).

Ribose ableitet. Das Isoxanthopterin nimmt allerdings bei Verabreichung der in Stellung 6 markierten Glucose beträchtliche Aktivität auf. Die Erklärung dafür ist in der Verteilung des Isotops auf andere Stellungen der Glucose und andere Verbindungen zu suchen, die während der relativ langen Versuchsdauer unvermeidlich ist.

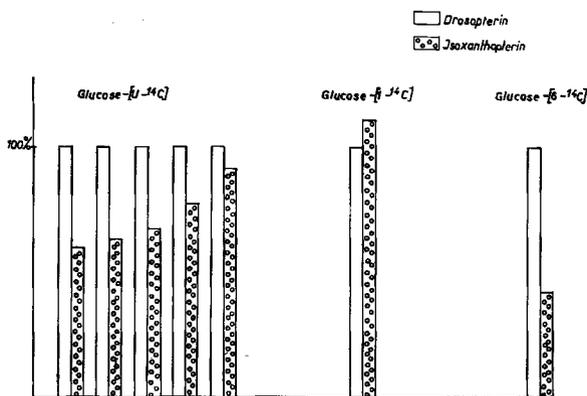


Fig. 5. Vergleich des Verhältnisses der spez. Aktivität von Drosopterin zu Isoxanthopterin nach Verabreichung von gleichmässig markierter Glucose und von Glucose-[1-¹⁴C] und -[6-¹⁴C] (spezifische Aktivität von Drosopterin = 100%)

Wenn man bei Verfütterung von Glucose-[6-¹⁴C] die Aktivität der Harnsäure mit derjenigen des Drosopterin vergleicht, so findet man, dass sie fast ebenso hoch ist wie die letztere (79%, vgl. Tab. 3). Dies deutet auf einen spezifischen Einbau des C-6 der Glucose in die Harnsäure hin. Es kommen dafür in erster Linie die C-Atome 2 und 8 des Puringerüsts in Frage. Tatsächlich haben WEYGAND u. Mitarb.⁷⁾ bei Verabreichung von Glucose-[6-¹⁴C] an Kohlweisslingpuppen auch beim Leukopterin eine hohe Konzentration des Isotops im C-Atom 2 gefunden. Das C-Atom 6 der Glucose muss demnach besonders leicht in aktiviertes Formiat übergehen. Die hohe Aktivität der Harnsäure in unsern Versuchen erklärt sich demnach aus dem Umstand, dass das Puringerüst zwei C-Atome enthält, die sich aus aktivierter Ameisensäure ableiten. Wahrscheinlich findet sich nach Verfütterung von Glucose-[6-¹⁴C] der grösste Teil der Aktivität des Isoxanthopterin im C-Atom 2.

Tabelle 3. Spezifische Aktivität der Harnsäure, verglichen mit derjenigen des Drosopterin, nach Verfütterung verschieden markierter Glucosen

	Drosopterin	Harnsäure
Glucose total markiert	100	40*)
Glucose-[1- ¹⁴ C]	100	44**)
Glucose-[6- ¹⁴ C]	100	79**)
*) Mittel aus 7 Versuchen **) Mittel aus 3 Versuchen		

Es wäre möglich, dass der Ringschluss des Pyrazinrings auch durch Einfügung eines aus den C-Atomen 1 und 2 der Ribose sich ableitenden C₂-Fragments zustandekommt. Die obigen Befunde, nach denen das C-Atom 6 der Glucose offenbar in

der Seitenkette des Drosopterins erscheint, machen diese Annahme wenig wahrscheinlich.

4. *Diskussion.* Alle bisherigen Versuche sprechen dafür, dass die C-Atome 8 und 9 des Pyrazinrings im Pteridingerüst aus der Glucose stammen, deren C-Kette nach Verkürzung zur Ribose partiell in den Ring einbezogen wird. Die wahrscheinlichste Annahme liegt darin, dass aus einem Purin-nucleotid oder -nucleosid (Guanylsäure, Guanosin?) das Ureid-C-Atom 8 eliminiert wird, und dass die am N-Atom 9 des Purins hängende Ribose direkt zur Bildung des Pyrazinrings herangezogen wird. Am ehesten scheint als Vorstufe das Guanin (in Form der Guanylsäure oder des Guanosins) in Frage zu kommen. Für diese Annahme sprechen Befunde von WEYGAND u. Mitarb.⁹⁾ sowie von NATHAN u. Mitarb.¹⁰⁾, nach welchen das 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin zur Pterinsynthese verwertet werden kann. Diese Verbindung entsteht durch Elimination des C-8 aus dem Guanin. Auch Versuche von AARONSON & RODRIGUEZ²⁹⁾ weisen auf Purine als Vorstufe der Pterine hin. Man kann hier auch die Befunde heranziehen, welche bei den Untersuchungen über die Synthese des Riboflavins erhoben worden sind. Das Isoalloxazingerüst enthält einen Pteridinkern. In Kulturen von *Eremothecium Ashbyi* und *Ashbya gossypii* sind Pteridine nachgewiesen worden, die als Zwischen- oder Seitenprodukte der Riboflavinsynthese aufgefasst werden können (MALEY & PLAUT³⁰⁾, McNUTT³¹⁾). Andererseits sprechen zahlreiche Beobachtungen dafür, dass der Pyrimidinring der Purine direkt zum Aufbau des Riboflavins verwendet werden kann (McNUTT & FORREST³²⁾; BROWN u. Mitarb.³³⁾). Man kann also auch hier annehmen, dass die als Zwischenprodukte auftretenden Pterine aus Purinen entstanden sind. ALBERT³⁴⁾ hat gezeigt, dass gewisse Purine sich auch chemisch leicht in Pteridine überführen lassen.

Es stellt sich noch die Frage nach dem genetischen Zusammenhang der verschiedenen bei der *Drosophila melanogaster* auftretenden Pterine. Die wichtigsten von HADORN, HADORN & MITCHELL, FORREST & MITCHELL, VISCONTINI u. Mitarb. isolierten Pterine sind die folgenden²⁻⁵⁾: 2-Amino-6-hydroxy-pteridin (HB₁), Isoxanthopterin, 2-Amino-6-hydroxy-pteridin-8-carbonsäure (HB₃), *L-erythro*-2-Amino-6-hydroxy-8-(dihydroxypropyl)-pteridin (HB₂, Biopterin), Drosopterin, Neodrosopterin, Isodrosopterin, Sepiapterin und Isosepiapterin. Nach unseren Annahmen über die Pterinsynthese müssten zuerst die Pteridine mit C₃-Seitenkette in Stellung 8 gebildet werden. Die übrigen könnten daraus durch Verkürzung oder vollständige Elimination der Seitenkette entstehen. Die Verkürzung führt zur Pteridincarbonsäure, die vollständige Abspaltung zum Xanthopterin oder zum HB₁. Aus dem letzteren entsteht durch Einwirkung der Xanthindehydrogenase das Isoxanthopterin³⁵⁾. Unsere Befunde mit Lactat-[1-¹⁴C] sprechen dagegen, dass die C₃-Seitenkette der Drosopterine und Sepiapterine einem C₃-Bruchstück der Hexosen entstammt und sekundär an den Pteridinkern angelagert wird. Die Pterine mit Seitenkette in Stellung 9 (Erythro

²⁹⁾ S. AARONSON & E. RODRIGUEZ, J. Bacteriol. 75, 660 (1958).

³⁰⁾ G. F. MALEY & G. W. A. PLAUT, J. Amer. chem. Soc. 81, 2025 (1959).

³¹⁾ W. S. McNUTT, J. Amer. chem. Soc. 82, 217 (1960).

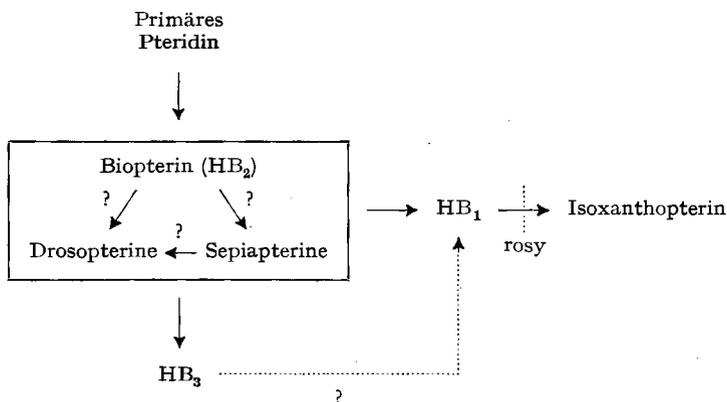
³²⁾ W. S. McNUTT & H. S. FORREST, J. Amer. chem. Soc. 80, 951 (1958).

³³⁾ E. G. BROWN, T. W. GOODWIN & O. T. G. JONES, Biochem. J. 68, 40 (1958).

³⁴⁾ A. ALBERT, in: Ciba Found. Symp. on the Chemistry and Biol. of Purines, London 1957, S. 97.

³⁵⁾ H. S. FORREST, E. GLASSMAN & H. K. MITCHELL, Science 124, 725 (1956).

pterin) könnten in analoger Weise entstehen, nur müsste in diesem Fall als Vorstufe ein Ribosid mit dem der Stellung 7 entsprechenden N-Atom gebildet werden. Dass die Harnsäure, welche auch bei der *Drosophila* ein Ausscheidungsprodukt zu sein scheint, die Muttersubstanz der Pterine darstellt, ist wie gesagt wenig wahrscheinlich. Alle bisherigen Beobachtungen lassen sich aber zwanglos aus der Annahme erklären, dass die Pterine aus einem Purin-nucleotid oder -nucleosid entstehen, und dass an der Bildung des Pyrazinrings, wie oben ausgeführt wurde, die Ribose beteiligt ist. Das folgende Schema zeigt, wie man sich den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Pterinen vorstellen kann.



Dieses Schema enthält viele Unsicherheiten. Der Zusammenhang zwischen den Pterinen mit C₃-Seitenketten ist unklar. Das vermehrte Auftreten der Sepiapterine bei gleichzeitigem Rückgang der Drosopterine bei der «sepia»-Mutante³⁶⁾ könnte dahin interpretiert werden, dass die letzteren aus dem erstgenannten entstehen, dass also bei dieser Mutante die Umwandlung des Sepiapterins in Drosopterin nicht möglich ist; doch gibt es auch Beobachtungen, die gegen diese Annahme sprechen. Nach den Arbeiten von VISCONTINI^{3) 4) 37)} handelt es sich bei den Drosopterin und beim Sepiapterin um hydrierte Pteridine. Beim Ringschluss des AMADORI-Umwandlungsprodukts, das nach WEYGAND⁷⁾ als Zwischenstufe angenommen werden muss, entsteht ein Dihydropteridin. Es stellt sich daher die Frage, ob die Drosopterine und Sepiapterine sich unmittelbar von diesem primären Pterin ableiten oder ob sie durch Reduktion des Biopterins (HB₂) entstehen, worauf die Beobachtung hinweist, dass in der Entwicklung der Puppen das HB₂ viel früher auftritt als die Drosopterine und die Sepiapterine. Die Aufklärung des Zusammenhangs zwischen den verschiedenen Pterinen mit Seitenkette wird erst möglich sein, wenn die Struktur der Sepiapterine und Drosopterine endgültig feststeht, was heute noch nicht der Fall ist. Biopterin, Drosopterine und Sepiapterine enthalten eine Dihydroxypropyl-Seitenkette. Wir wissen auch noch nicht, auf welcher Stufe die Reduktion der endständigen CH₂OH-Gruppe zur Methylgruppe stattfindet. Das Isoxanthopterin scheint nicht weiter umgewandelt zu werden, sondern stellt wahrscheinlich ein Ausscheidungsprodukt dar.

³⁶⁾ I. ZIEGLER-GÜNDER & E. HADORN, Z. Vererbungslehre 89, 235 (1958).

³⁷⁾ M. VISCONTINI, Ind. chim. belge 1960, 1181.

Experimenteller Teil

1. Ernährung der Versuchstiere. – Die Larven der *Drosophila melanogaster* (Wildtyp und Mutanten) wurden uns teils vom Zoologischen Institut (Prof. HADORN) geliefert, teils züchteten wir sie auf Nährböden von Agar, Mais, Hefe und Zucker selbst. Am dritten Tag nach dem Schlüpfen brachten wir die Larven in Halbrundschalen, in denen pro 250 Versuchstiere 55 mg Trockenhefe und 0,08 mc radioaktive Substanz in 0,4 ml Wasser suspendiert und mit dem „Föhn“ ange-trocknet worden waren. Die Menge an Hefesuspension war so bemessen, dass sie von den Larven möglichst vollständig aufgenommen wurde. Nach der Verpuppung wurden die Tiere durch kurzes Spülen in Wasser von der nicht aufgenommenen Nahrung befreit.

2. Herstellung der Extrakte aus den Fliegen. – *Elution der Pterine:* Pro Chromatogramm (zweidimensional) wurden 35 frisch geschlüpfte Fliegen in narkotisiertem Zustand homogenisiert und mit 0,4 ml Wasser versetzt. Bei sorgfältigem Erhitzen während 1–2 Min. über der freien Flamme fielen die Proteine aus. Die klare Lösung wurde auf ca. 0,1 ml eingedampft und auf das Chromatographierpapier aufgetragen.

Elution der Aminosäuren: Für ein zweidimensionales Chromatogramm verwendeten wir 20 frisch geschlüpfte Fliegen; nach der Homogenisierung in 5 ml Methanol wurde das Ungelöste abzentrifugiert und das Überstehende im Vakuum bei 45° auf ca. 0,2 ml eingedampft und aufgetragen.

3. Chromatographie. – Sämtliche Chromatogramme wurden auf Filterpapier WHATMAN Nr. 1 ausgeführt.

Pterine: Da bei gewöhnlicher zweidimensionaler Chromatographie die Radioaktivität der Aminosäuren die Beurteilung der Pterine erschwerte, wurden die Aminosäuren zuerst mit Wasser in der ersten Dimension gegen die Front gewaschen. Die Pterine als schlecht wasserlösliche Substanzen bleiben dabei innerhalb des ersten Drittels des Papiers zurück. Die nachfolgende Chromatographie mit n-Propanol/4-proz. NH₃ 5:3 in beiden Dimensionen ergab eine günstige Verteilung der Pterine.

Die fluoreszierenden und absorbierenden Substanzen wurden unter der UV.-Lampe, die radioaktiven Verbindungen mittels Autoradiographie lokalisiert.

4. Elution der Substanzen aus dem Papierchromatogramm. – Purin- und Pterin-Flecke wurden aus dem Chromatogramm herausgeschnitten und in einer Apparatur eluiert, in welcher das Elutionsmittel aus einer Kapillare von oben her auf das Filterstreifen tropft. Als Elutionsmittel verwendeten wir für Harnsäure, Isoxanthopterin und Sepiapterin Wasser (10–12 ml für Harnsäure und Isoxanthopterin und 3 ml für Sepiapterin), für Drosopterin ca. 3 ml verdünnte NH₃-Lösung (pH 11).

Da Isoxanthopterin bei der oben beschriebenen zweidimensionalen Chromatographie sehr ähnliche Rf-Werte wie Xanthopterin aufweist, und weil ausserdem der Blindwert des Papiers bei der für die quantitative Bestimmung des Isoxanthopterins massgebenden Wellenlänge sehr hoch ist, wurde Isoxanthopterin rechromatographiert. Dafür verwendeten wir in NH₃, Hydroxychinolin, HCl und H₂O bidest. gewaschenes Chromatographierpapier und als Milieu Butanol-Eisessig-Wasser 20:3:7.

5. Quantitative Bestimmungen. – *Harnsäure:* Die Bestimmung der Harnsäure erfolgte einerseits spektrophotometrisch (Mol. Ext. 11,6 bei 290 m μ) und andererseits colorimetrisch mit Arsenphosphorwolframsäure¹⁴).

Pterine: Absorptionsmessung bei 505 m μ ³) für Drosopterin, bei 420 m μ ¹³) für Sepiapterin und bei 340 m μ ¹²) für Isoxanthopterin. Da die Pterinmengen pro Chromatogramm (aus 35 Fliegen) sehr klein waren, wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität die Eluate von je drei Chromatogrammen vereinigt.

6. Bestimmung der Radioaktivität. – Aliquote Teile der Eluate wurden zusammen mit 5 mg Bernsteinsäure (als C-Träger) und 0,5 mg Glycerin (zur Verhinderung von Flockenbildung) im gefrorenen Zustand direkt in den KIPP-Röhren eingetrocknet, in denen die Oxydation erfolgt. Die Radioaktivität des CO₂ wurde nach feuchter Verbrennung im Gaszählrohr nach BERNSTEIN-BALLENTINE gemessen.

7. Synthese von C-8-markiertem Isoxanthopterin. – a. *Mesoxalester*²⁰): 1 mc (26,3 mg) radioaktiver Malonsäure-diäthylester-[2-¹⁴C] und 0,074 ml nicht aktiver Malonsäure-diäthylester

als Träger wurden mit 0,1 g SeO_2 und 0,1 ml Xylol versetzt und 6 Std. bei 155–165° unter Rückfluss oxydiert. Darauf wurde vom Selen abfiltriert, das Filter dreimal mit Xylol und zweimal mit Äther gewaschen, das Filtrat mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum vom Äther und Xylol befreit. Die Isolierung des Mesoxalsäureesters aus dem braunen Oxydationsgemisch erfolgte auf einer Celite-Säule mit wassergesättigtem Benzol. Aus den den Ester enthaltenden Fraktionen des Eluats kristallisierte das Mesoxalsäure-diäthylester-hydrat (Smp. 56°) sofort aus. Ausbeute: 65 mg = 54,2%.

b. *Kondensation des Mesoxalsäure-diäthylester-hydrats mit 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat*²¹): 65 mg Mesoxalester-hydrat in 3,5 ml Wasser wurden mit 130 mg Triamino-hydroxy-pyrimidin-sulfat und 89 mg Natriumacetat in 16 ml Essigsäure versetzt und 40 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Es bildete sich dabei ein gelber Niederschlag, der einige Std. stehengelassen und dann zentrifugiert wurde. Der gelbe Rückstand, die Isoxanthopterincarbonsäure, wurde zur Umfällung in 70 ml Wasser und 1,4 ml 2N NaOH gelöst und heiss in 35 ml heisse 2N HCl gegossen. Dabei entstand sofort ein hellgelber Niederschlag, der sich beim Stehen gut absetzte, so dass ein grosser Teil des Überstehenden abdekantiert werden konnte. Der Rest wurde zentrifugiert, der Rückstand 2 Std. bei 110–120° getrocknet.

Die Decarboxylierung der Isoxanthopterincarbonsäure erfolgte unter N_2 durch 3stündiges Erhitzen auf 260°. Das Rohisoxanthopterin wurde in 6,5 ml 0,2N NaOH und 17,5 ml Wasser gelöst und heiss in 12 ml heisse 2N HCl gegossen. Das Isoxanthopterin fiel sofort in Flocken aus; es wurde nach der Zentrifugation 2 Std. bei 110–120° getrocknet. Ausbeute: 41,4 mg = 68,3% (37% Totalausbeute über die ganze Synthese, bezogen auf Malonsäure-diäthylester). – Die Reinheit des Produkts, die mittels Absorptionsmessung bestimmt wurde, betrug 92,5%, die Radioaktivität $1,61 \cdot 10^6$ Impulse pro μMol pro Min.

8. Synthese von C-5-markiertem Isoxanthopterin. – a) *Cyanessigsäure-äthylester*²²): 0,5 mc (18,7 mg) Bromessigsäure-[2- ^{14}C], 1,04 g nicht radioaktive Bromessigsäure als Träger und 0,49 g Na_2CO_3 wurden in 1 ml Wasser auf 50° erwärmt und wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt. Beim Zufügen von 0,4 g NaCN in 1,1 ml Wasser von 55° erwärmte sich das Reaktionsgemisch. Es wurde unter dem fließenden Wasser und durch Zugabe von 0,3 ml Wasser abgekühlt und darauf 5 Min. unter Rückfluss gekocht. Mit 0,8 ml konz. HCl wurde aus der erkalteten Lösung die Cyanessigsäure freigesetzt. Beim Abdampfen des Wassers im Rotationsverdampfer bei 20 bis 30 Torr und 60° fiel NaBr aus. Das ganze Reaktionsgemisch wurde in der Zentrifuge solange mit 95-proz. Alkohol gewaschen, bis das Überstehende farblos war. Die vereinigten alkoholischen Lösungen wurden im Rotationsverdampfer bei 15 Torr und 60° eingedampft, der Rückstand mit 12 ml abs. Äthylalkohol und 0,2 ml konz. H_2SO_4 durch Kochen unter Rückfluss während 3 Std. verestert. Nach Abdampfen des Alkohols wiederholten wir die Veresterung mit denselben Mengen abs. Alkohols und Schwefelsäure während 2 Std. Nach Neutralisation mit konz. Na_2CO_3 -Lösung wurde der Cyanessigsäure-äthylester mit Benzol ausgeschüttelt. Nach Abdampfen des Benzols und Destillation des braunen Rückstandes wurden 428,5 mg Cyanessigsäure-äthylester (49,5%) gewonnen; Sdp./12 Torr 95°, Brechungsindex 1,415.

b) *2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-hydrogensulfat*²³): Zu 0,11 g Natrium in 4,5 ml absolotem Äthylalkohol wurden 0,6 g Guanidin-hydrochlorid und die oben erhaltenen 428,5 mg Cyanessigsäure-äthylester gegeben und das Gemisch 3 Std. unter Rückfluss gekocht. Es bildete sich dabei ein fester Anteil, der beim Zugeben von 3 ml Wasser und 0,3 ml konz. HCl in Lösung ging (2,4-Diamino-6-hydroxy-pyrimidin). Durch Zugabe von 0,3 g NaNO_2 in 0,9 ml Wasser, kurzes Erhitzen bis zum Sieden und Abkühlen erhielten wir das himbeerrote 2,4-Diamino-5-nitroso-6-hydroxy-pyrimidin. Nach der Zentrifugation wurde der Rückstand zweimal mit Wasser gewaschen und darauf mit 0,24 ml 20-proz. NaOH und 4,5 ml Wasser durch Erwärmen auf 70–80° teilweise in Lösung gebracht und bei dieser Temperatur mit 1,5 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, H_2O reduziert (ca. 45 Min.). Beim Erhitzen des Reaktionsgemisches zum Sieden trat bis auf eine leichte Trübung fast vollständige Lösung ein. Beim raschen Filtrieren durch ein kleines Faltenfilter wurde diese Verunreinigung abgetrennt. Im Filtrat fiel das 2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-hydrogensulfat sofort aus. Abnutschen und Trocknen des Niederschlags führte zu einer Ausbeute von 513,0 mg entspr. 61,5% (30,4% bezogen auf Bromessigsäure).

c) *2,4,5-Triamino-6-hydroxy-pyrimidin-sulfat*²⁴): 513 mg Triamino-hydroxy-pyrimidin-hydrogensulfat wurden in 25 ml Wasser und 50 mg NaHSO_3 suspendiert. Beim Erhitzen zum Sieden trat vollständige Lösung ein. Nun wurde solange 17-proz. H_2SO_4 (ca. 2,5 ml) zugetropft, bis

eine Trübung entstand. Beim Abkühlen und Stehen im Eisraum kristallisierte das Sulfat in Nadelchen aus. Ausbeute: 304,5 mg entspr. 55,3% (16,8% bezogen auf Bromessigsäure).

d) *Isoxanthopterin*²¹⁾: Die Synthese des Isoxanthopterins erfolgte wie oben für die Herstellung des C-8-markierten Produktes beschrieben mit zwei kleinen Abweichungen: Erstens wurde bei der Kondensation zu Isoxanthopterincarbonsäure das Mesoxalsäureester-hydrat im Überschuss verwendet (Ansatz: 304,5 mg Triamino-hydroxy-pyrimidin-sulfat + 330 mg Natriumacetat in 35 ml 1N Essigsäure und dazu 670 mg Mesoxalester-hydrat in 10 ml Wasser). Zweitens wurde vor der Decarboxylierung noch ein weiterer Reinigungsschritt durch Kochen in 18 ml 2N Soda eingeschaltet. Ausbeute an Isoxanthopterin: 167,4 mg entspr. 73% (12,3% Totalausbeute, auf Bromessigsäure bezogen). Die Reinheit des Produktes betrug 100%, die spezifische Radioaktivität $1,21 \cdot 10^5$ Impulse pro μMol pro Min.

9. Abbau von synthetischem Isoxanthopterin. – Zum Abbau wurde das C-8-markierte Isoxanthopterin 2000fach, das C-5-markierte 100fach mit nicht radioaktivem Isoxanthopterin verdünnt.

a) *Abbau mit Chlorwasser und HCl*²⁵⁾: Ca. 70 mg Isoxanthopterin wurden mit 35 ml Chlorwasser (gegen 0,2N) 4 Std. im geschlossenen Gefäß geschüttelt. Da die Auflösung unvollständig war, wurde das Ungelöste abzentrifugiert, getrocknet und zurückgewogen. Das Überstehende wurde im Vakuum eingedampft, der dabei verbleibende Rückstand in ca. 8,5 ml 0,1N HCl aufgenommen und 3 Std. im Bombenrohr bei 140–150° hydrolysiert. Die Lösung war nach der Hydrolyse klar und farblos. Nach Eindampfen zur Trockene wurde der Rückstand in 1 ml 2N HCl aufgenommen, mit CaCl_2 versetzt, kurz erhitzt und durch Zugabe von NH_4 -Acetat bis pH 5–6 das Ca-Oxalat ausgefällt. Durch dreimaliges Umfällen aus HCl mit NH_4 -Acetat liess sich ein rein weisses Präparat erhalten. Es wurde auf einem Hart-Rundfilter abgenutscht und mit Alkohol und Äther gewaschen. Die Radioaktivität konnte angenähert durch direkte Zählung auf dem Filter und Extrapolation auf unendliche Schichtdicke gemessen werden; die exakte Messung erfolgte nach Oxydation der Oxalsäure im Proportionalitätszählrohr.

b) *Abbau mit Chlorwasser und NaOH*²⁵⁾: Der Abbau mit Chlorwasser erfolgte gleich wie unter a). Die Hydrolyse wurde mit 2 ml 2N NaOH während 1 Std. im siedenden Wasserbad ausgeführt. Zur Fällung des Ca-Oxalats säuerten wir mit 50-proz. Essigsäure an und gaben CaCl_2 zu.

c) *Abbau mit NaNO_2 , Chlor und HCl*^{25) 26)}: Vor dem Abbau des Ringsystems mit Chlor wird die Aminogruppe in Stellung 2 des Pyrimidinringes durch eine Hydroxylgruppe ersetzt. Dies erfolgt durch Zugabe von 75 mg NaNO_2 in 1 ml konz. H_2SO_4 zu 50 mg Isoxanthopterin in 1,5 ml konz. H_2SO_4 . Beim Zufügen von viel Eis zum Reaktionsgemisch bildet sich ein fleischfarbiger Niederschlag (Desiminoverbindung). Die Fällung wurde einige Zeit stehengelassen, dann zentrifugiert, zweimal mit Wasser gewaschen und zuerst über CaCl_2 und darauf noch im Vakuum bei ca. 90–100° getrocknet.

Die Oxydation erfolgte direkt im Zentrifugenrohr in 4 ml absolutem Methanol durch Einleiten von Chlor. Die Desiminoverbindung ging dabei langsam in Lösung. Nachdem das überschüssige Chlor durch Einleiten von Stickstoff entfernt worden war, wurde die klare Lösung zur Trockne eingedampft. Die Hydrolyse des Rückstands erfolgte mit 2,5 ml 12-proz. HCl während 30 Minuten auf dem siedenden Wasserbad. Die Lösung wurde im Vakuum vollständig eingedampft und aus dem Rückstand die Oxalsäure wie unter a) isoliert.

10. Abbau von natürlich gebildetem radioaktivem Isoxanthopterin. – Zur Gewinnung von genügend radioaktivem Isoxanthopterin wurden grössere Ansätze von 1000 Larven mit der entsprechenden Menge an Trockenhefe und radioaktiver Substanz angesetzt. Die Aufarbeitung der wässerigen Fliegenextrakte und die Elution des Isoxanthopterins erfolgte wie unter 2. beschrieben. Vor dem Abbau des Isoxanthopterins, dessen Menge sich auf ca. 60–100 γ belief, wurde diese in 4 ml Wasser gelöst und photometrisch bestimmt. Ein aliquoter Teil dieser Lösung diente zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität. Der Rest wurde wiederum zur Trockne eingedampft und mit 60–70 mg nicht radioaktivem Isoxanthopterin als Träger versetzt. Der Abbau erfolgte nach den unter 9. beschriebenen Methoden.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG ausgeführt, dem wir unsern besten Dank aussprechen. Auch Herrn Prof. HADORN möchten wir für sein stetes Interesse an unserer Arbeit, sowie für die Lieferung eines Teils der Versuchstiere bestens danken. Herrn Prof. VISCONTINI sind wir für verschie-

dene praktische Hinweise und auch für die Überlassung von Vergleichssubstanzen sehr verbunden. Ferner sei auch Herrn A. SCHMID, Frau I. GINSIG-LEUPIN, Frl. B. SUTER und Frl. C. SCHÄER für ihre wertvolle Mithilfe bei der Durchführung der Versuche herzlich gedankt.

SUMMARY

1. Larvae of the wild type of *Drosophila melanogaster* and of two mutants («rosy» and «sepia») were fed with glycine-[2-¹⁴C], formate-[¹⁴C], glucose-[U-¹⁴C], glucose-(1-¹⁴C), glucose-(6-¹⁴C), fructose-[U-¹⁴C] and DL-lactate-[1-¹⁴C]. After the hatching of the flies isoxanthopterine, drosopterine, sepiapterine and uric acid were isolated by paper chromatography and their specific activities were determined. The carbon atoms 8 and 9 of the pyrazine ring were isolated as oxalic acid after degradation of the pterine with chlorine followed by acid hydrolysis (method of WIELAND & TARTTER). The pyrimidine ring is not attacked by this process. This procedure was tested by the degradation of the synthetic isoxanthopterines-[8-¹⁴C] and -[5-¹⁴C].

2. The experiments with glucose-[U-¹⁴C] and glucose-[1-¹⁴C] prove that carbon atoms of the glucose are specifically used to build up the pyrazine ring of the pteridines. They furnish the carbon atoms 8 and 9 of the pteridine skeleton.

3. After feeding glucose-[6-¹⁴C] the drosopterine, a pterine with a 3-carbon side chain, is much more active than isoxanthopterine.

4. These results are in accordance with the hypothesis suggested in a former paper (BRENNER-HOLZACH & LEUTHARDT): The glucose is transformed into ribose (by direct oxydation or through the pentose-phosphate-cycle). The pentose is used to form a purine nucleotide. After elimination of C-8 of the purine ring the ribosyl chain fixed in position 9 of the purine is directly incorporated in the pyrazine ring, the atoms 1 and 2 of ribose furnishing the carbons 8 and 9 of the pteridine nucleus, and the atoms 3, 4 and 5 furnishing the side chain.

5. We suggest that a pterine with side chain is the primary product of pteridine synthesis.

Aus dem Biochemischen Institut
der Universität Zürich

184. Synthese von Dab¹-Dab⁹-Bradykinin

von K. Vogler, R. O. Studer und W. Lergier

(6. VII. 61)

Bradykinin¹⁾, ein Nonapeptid mit blutdrucksenkenden Eigenschaften, das aus einer Globulinfraktion des Blutplasmas durch die Einwirkung von Enzymen gewonnen wird, erweckte im letzten Jahre das Interesse verschiedener Peptidsynthetiker-Gruppen. Dies liegt darin, dass einmal Bradykinin zu den pharmakologisch

¹⁾ M. ROCHA E SILVA, W. T. BERALDO & G. ROSENFELD, Amer. J. Physiol. 156, 261 (1949). – Dab = α, γ -Diaminobuttersäure. – M. ROCHA E SILVA, Biochemistry and Pharmacology of Bradykinin, in M. SCHACHTER, Polypeptides which Affect Smooth Muscles and Blood Vessels (Pergamon Press, Oxford – London – New York – Paris 1960).