

171. Untersuchungen über die Biosynthese der Pterine bei *Drosophila melanogaster*

3. Mitteilung: Über die Herkunft der Seitenkette im Drosopterin

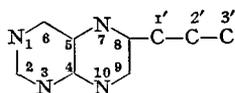
von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

(26. VII. 65)

In früheren Arbeiten [1] [2] berichteten wir von Versuchen, bei denen verschiedene radioaktive Verbindungen (Glykokoll- ^{14}C], Formiat- ^{14}C] und verschieden markierte Glucosen- ^{14}C]) an Larven von *Drosophila melanogaster* verfüttert wurden. Aus den geschlüpften Fliegen isolierten wir die Pterine und die Harnsäure. Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten, sowie die Ergebnisse des Abbaus der Pterine zeigten, dass die C-Atome 8 und 9 des Pyrazinrings¹⁾ direkt aus der Glucose stammen. Wie andere Autoren früher schon vermutet haben, leitet sich das Pteringerüst von einem Purin-Nucleotid oder -Nucleosid ab, aus welchem das Ureid-C-Atom 8 eliminiert worden ist. Unsere Beobachtungen führten zur Annahme, dass die am N-Atom 9 sitzende Ribose, welche durch Verkürzung der Kohlenstoffkette unmittelbar aus der Glucose entstehen kann, direkt zur Bildung des Pyrazinringes herangezogen wird, wobei ein primäres Pterin mit Seitenkette entsteht. WEYGAND *et al.* [3] gelangten zur gleichen Vorstellung. Im Zusammenhang mit der Riboflavin- und Folsäuresynthese ist der Übergang von Purin zu Pterin von verschiedenen Autoren diskutiert worden [4]; McNUTT [5] konnte dann mit Hilfe von Adenin- ^{15}N] und Xanthin- ^{15}N] den Übergang des kompletten Puringerüsts in das Isoalloxazingerüst des Riboflavins mit Ausnahme von C(8) experimentell beweisen. Ebenso zeigten REYNOLDS & BROWN [6] bei *Escherichia coli* und SIMON u. Mitarb. [7] an Kohlweisslingen, dass eine Umwandlung des Puringerüsts in das Pteringerüst ohne tieferegreifende strukturelle Veränderung vor sich gehen muss.

Während der Übergang des Purins in das Pterin damit weitgehend sichergestellt ist, steht jedoch die Frage über den Ringschluss des Pyrazinringes, die Bildung der Seitenkette und den genetischen Zusammenhang der verschiedenen Pterine noch immer offen. Wir äusserten in einer früheren Arbeit [2] die Ansicht, dass durch Einbeziehung der unverkürzten C-Kette der Ribose zuerst Pterine mit Seitenkette gebildet werden, aus denen dann durch Abspaltung solche mit verkürzter oder solche ohne Seitenkette entstehen. PFLEIDERER [8] weist darauf hin, dass anstelle der Ribose auch nur ein aus der Ribose oder Glucose sich ableitendes C_2 - oder C_3 -Bruchstück für den Ringschluss verwendet werden könnte. WEYGAND, SIMON u. Mitarb. [3] [9] nehmen an, dass nach Schliessung des Pyrazinringes durch die Ribose die Seitenkette abgespalten wird, und dass später in das dehydrierte Pteridingerüst neue Substituen-

¹⁾ Sog. deutsche Bezifferung, entsprechend Puringerüst.



ten und Seitenketten eingeführt werden. In der Tat lassen sich verschiedene Tatsachen nicht ohne weiteres mit der Annahme in Einklang bringen, dass die Seitenkette der Pterine der Biopterin-Gruppe sich unmittelbar aus der Ribose ableitet. Es ist z. B. nichts bekannt über die Reduktion der endständigen CH_2OH -Gruppe der Ribose in die CH_3 -Gruppe der Seitenkette des Biopterins oder der Drosopterine und Sepia-pterine. Bei den bekannten Synthesen von Desoxyzuckern (Rhamnose, Fucose) erfolgt die Reduktion nach Überführung der Zucker in das Uridindiphosphat-Derivat. Ein schwerwiegender Einwand liegt darin, dass beim Biopterin in der Seitenkette die *L-erythro*-Konfiguration vorliegt, während die Ribose zu einer Seitenkette mit *D-erythro*-Konfiguration führen müsste. Es kommen aber auch Pterine mit Seitenketten anderer Konfiguration vor. REMBOLD [10] hat im Weiselzellenfuttersaft der Honigbiene ein Pterin, das Neopterin, gefunden, das eine Trihydroxypropylseitenkette mit der *D-erythro*-Konfiguration besitzt. Er nimmt an, dass es sich dabei um das erste stabile Produkt der Purin-Pterin-Umwandlung handelt. VISCONTINI u. Mitarb. [11] isolierten aus *Pseudomonas roseus fluorescens* ein *L-threo*-Trihydroxypropylpterin, das Monapterin, und GORO [12] fand in *Bufo vulgaris* das *L*-Isomere des Neopterins.

In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir Versuche, die zur weiteren Klärung dieses Problems ausgeführt worden sind. In Ergänzung früherer Resultate [2] führen wir hier zuerst Versuche an, in welchen wir neben homogen markierter und in C(1) markierter Glucose Glucose-[6- ^{14}C] an *Drosophila*-Larven verfütterten. Wir verglichen einerseits in den Extrakten aus den geschlüpften Fliegen die spezifische Radioaktivität von Drosopterin (Pterin mit C_3 -Seitenkette) und Isoxanthopterin (Pterin ohne Seitenkette); andererseits bauten wir Isoxanthopterin ab, wobei die C-Atome (8 + 9) isoliert und deren spezifische Gesamtaktivität bestimmt wurde. Die Fig. 1 und Tabelle 1 zeigen die dabei erhaltenen Resultate. Während mit Glucose-[1- ^{14}C] Isoxanthopterin und Drosopterin ungefähr dieselbe spezifische Aktivität zeigten, wies im Versuch mit Glucose-[6- ^{14}C] das Drosopterin eine wesentlich grössere Aktivität auf. Mit total markierter Glucose hingegen lagen die Werte zwischen den beiden andern. Dass die Aktivität des Isoxanthopterins auch mit Glucose-[6- ^{14}C] einen rela-

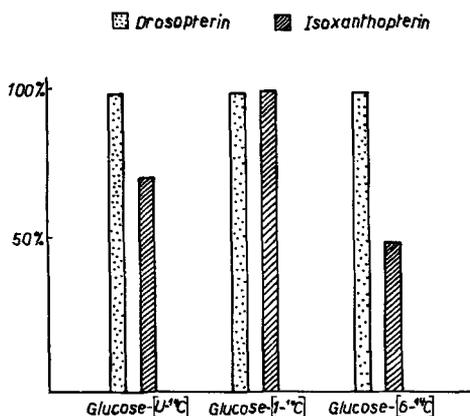


Fig. 1. Spez. Aktivitäten (Mittelwerte verschiedener Versuche) von Drosopterin und Isoxanthopterin nach Verabreichung verschieden markierter Glukosen. Drosopterin wurde als 100% gesetzt

Tabelle 1. *Spezifische Aktivitäten von biologisch gebildetem Isoxanthopterin nach Verfütterung von Glucose-[U-¹⁴C], Glucose-[1-¹⁴C] und Glucose-[6-¹⁴C] und des daraus durch Abbau mit NaNO₂/Cl₂/HCl erhaltenen Calciumoxalates*

Verfütterte radioaktive Substanz	Spez. Aktivität DpM/ μ Mol	Aktivität des Oxalats bezogen auf Isoxanthopterin	
Glucose-[U- ¹⁴ C] (Vers. 42)	Isoxanthopterin	1,69 · 10 ⁵	
		1,69 · 10 ⁵	
	Ca-Oxalat	6,50 · 10 ⁴	
		6,75 · 10 ⁴	40%
Glucose-[U- ¹⁴ C] (Vers. 43)	Isoxanthopterin	1,90 · 10 ⁵	
		1,95 · 10 ⁵	
	Ca-Oxalat	7,38 · 10 ⁴	
		7,24 · 10 ⁴	38%
Glucose-[1- ¹⁴ C] (Vers. 44)	Isoxanthopterin	1,09 · 10 ⁵	
		1,08 · 10 ⁵	
	Ca-Oxalat	4,82 · 10 ⁴	
		4,77 · 10 ⁴	44%
Glucose-[1- ¹⁴ C] ($\frac{1}{8}$ der gewöhnlich verabreichten Akt.) (Vers. 48)	Isoxanthopterin	3,5 · 10 ⁴	
		3,5 · 10 ⁴	
	Ca-Oxalat	1,35 · 10 ⁴	
		1,25 · 10 ⁴	38%
Glucose-[6- ¹⁴ C] (Vers. 53)	Isoxanthopterin	1,95 · 10 ⁵	
		1,85 · 10 ⁵	
	Ca-Oxalat	4,5 · 10 ⁴	
		4,4 · 10 ⁴	23%

tiv hohen Wert aufweist, liegt am spezifischen Einbau des C(6) der Glucose (über Hydroxypyruvat \rightarrow Serin \rightarrow aktiviertes Formiat) in das C(2) des Pyrimidinringes, eine Reaktion, über die wir in einer früheren Arbeit [13] berichteten.

Beim Abbau von Isoxanthopterin nach Verfütterung von Glucose-[6-¹⁴C] und Isolierung der C-Atome (8 + 9) als Calciumoxalat [2] ergaben sich die Resultate, die in Tabelle 1 mit denjenigen früherer Versuche [2] mit homogen bzw. in C(1)-markierter Glucose verglichen werden. Es zeigt sich dabei, wie erwartet, dass die spezifische Aktivität von C(8 + 9) mit Glucose -[6-¹⁴C] kleiner ist als mit Glucose-[1-¹⁴C] und homogen markierter Glucose, dass also nach Verfütterung von Glucose-[6-¹⁴C] ein grösserer Anteil der Aktivität sich in der Seitenkette findet.

Um weitere Auskunft darüber zu erhalten, aus welcher Quelle die C-Atome der Seitenkette stammen, gingen wir daran, ein Pterin mit Seitenkette, das Drosopterin, nach Verabreichung verschieden markierter Zucker abzubauen und die Verteilung des Leit isotops im Ringsystem und in den beiden endständigen C-Atomen der Seitenkette zu untersuchen.

Das intakte Ringsystem konnte nach oxydativem Abbau des Drosopterins mit KMnO₄ [14] in Form der Pterin-8-carbonsäure erhalten werden. Die C-Atome 2 und 3 der Seitenkette wurden durch Oxydation nach KUHN-ROTH [15] in Essigsäure über-

Tabelle 2. *Oxydativer Abbau von Drosopterin mit KMnO₄ zu Pterin-8-carbonsäure und Abspaltung der 2 endständigen C-Atome der Seitenkette mit CrO₃ als Essigsäure*

Versuch	Verfütterte akt. Subst.	Drosopterin		Pterin-8-carb. säre		Essigsäure	
		spez. Akt. DpM/ μ Mol	%	spez. Akt. DpM/ μ Mol	%	spez. Akt. DpM/ μ Mol	%
1(103)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	308000	100	252250	81,8		
				232000	75,3		
		299750	100	232000	77,3		
				219750	73,5		
4(107)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	40368	100			4750	11,8
						6180	15,3
						6209	15,4
		26200	100	21500	82,0		
6(109)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	15480	100			2093	13,5
						2456	15,8
8(112)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	19701	100			3502	17,8
						3632	18,4
						2401	12,6
10(117)	Glucose-[1- ¹⁴ C]	27874	100	21407	76,7	4361	15,7
				20447	73,3	4319	15,5
				21605	77,5		
2(104)	Glucose-[6- ¹⁴ C]	160970	100	107000	66,4		
3(105)	Glucose-[6- ¹⁴ C]	42000	100	25200	60,2	11600	27,7
		13325	100	9060	68,2	3900	29,5
5(108)	Glucose-[6- ¹⁴ C]	14842	100			4130	27,9
						4180	28,2
7(110)	Glucose-[6- ¹⁴ C]	13654	100			4130	30,3
						4210	30,9
9(115)	Glucose-[6- ¹⁴ C]	11163	100	7542	67,6	3014	27,0
				7180	64,5	3230	28,9
11(118)	Glucose-[6- ¹⁴ C]	7422	100	5070	68,3	1820	24,6
				5133	69,2	2201	29,8
						1837	24,8
12(119)	Glucose-[2- ¹⁴ C]	30237	100	27739	91,7	4181	13,8
				27033	89,4	3155	10,4
						3704	12,2

führt. Die Resultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die graphische Darstellung Fig. 2 zeigt, welcher Anteil der totalen Radioaktivität sich im Ringsystem und welcher sich in den zwei endständigen C-Atomen der Seitenkette findet.

Eine weitere Auftrennung der aus der Seitenkette erhaltenen Essigsäure in die beiden C-Atome erfolgte nach SCHMIDT & PHARES [16] mit Na-Azid in konzentrierter Schwefelsäure. Das Carboxyl-C-Atom, das dem C(2') der Seitenkette entspricht, wird dabei als CO₂ abgespalten; das C-Atom der Methylgruppe kann nach Oxydation des

bei der Reaktion mit NaN_3 entstandenen Amins ebenfalls als CO_2 aufgefangen werden. Zur Bestimmung der Radioaktivität fällten wir bei unseren ersten Versuchen das CO_2 als BaCO_3 . In späteren Versuchen haben wir das in Natronlauge aufgefangene CO_2 aus dem SCHMIDT-PHARES-Abbau direkt manometrisch bestimmt und parallel

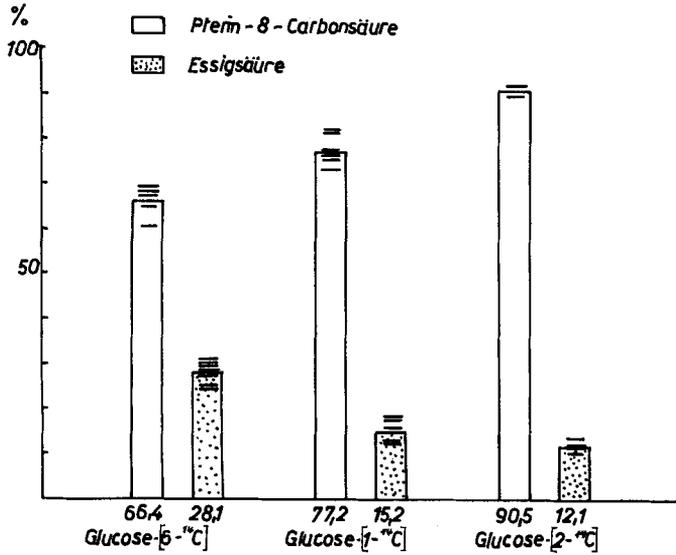


Fig. 2. Prozentualer Anteil der Radioaktivität in der Pterin-8-carbonsäure und der Essigsäure nach Abbau der Drosopierinmolekel (spez. Aktivität des Drosopierins = 100%) nach Verfütterung von verschieden markierten Glucosen

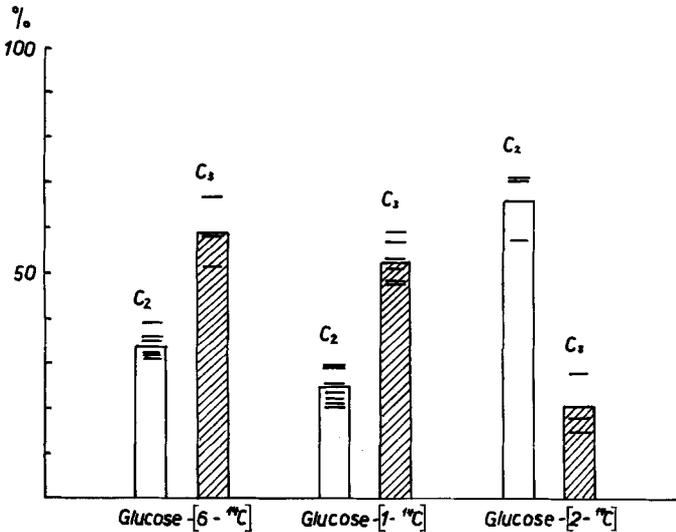


Fig. 3. Prozentualer Anteil der Radioaktivität von C(2') und C(3') der Seitenkette von Drosopierin, bezogen auf die aus der Seitenkette abgespaltene Essigsäure (spez. Aktivität der Essigsäure = 100%) nach Verfütterung verschieden markierter Glucosen

dazu aus einem aliquoten Teil der Lösung das CO_2 in CONWAY-Schalen freigesetzt und in Cyclohexylamin absorbiert. Die Cyclohexylaminlösung hat den Vorteil, dass sie direkt dem Toluol zugesetzt und im Scintillationszähler gemessen werden kann. Tabelle 3 und Fig. 3 zeigen die dabei gewonnenen Resultate.

Tabelle 3. *Prozentualer Anteil der Radioaktivität von C(2') und C(3') der Seitenkette von Drosopterin, bezogen auf die aus der Seitenkette abgespaltene Essigsäure (= C(2') + C(3') = 100%)*

Versuch	eingesetzte radioakt. Subst.	Essigsäure = C(2') + C(3')		C(2')		C(3')	
		spez. Akt. DpM/ μ Mol	%	spez. Akt. DpM/ μ Mol	%	spez. Akt. DpM/ μ Mol	%
8(112)	Glucose-[1- ^{14}C]	10,9	100	2,33 ¹⁾	21,3	5,19 ¹⁾	47,5
				2,2 ²⁾	20,2	5,2 ²⁾	47,7
		8,4	100	2,1 ¹⁾	24,9	4,43 ¹⁾	52,7
				1,85 ²⁾	22,0	4,3 ²⁾	51,3
		10,8	100	2,8 ²⁾	25,9		
				3,15 ²⁾	29,2		
				3,2 ²⁾	29,6		
				3,18 ¹⁾	29,5		
10(117)	Glucose-[1- ^{14}C]	18,6	100	4,65 ³⁾	25,1	10,62 ³⁾	57,1
		24,35	100	5,97 ³⁾	24,5	14,4 ³⁾	59,2
9(115)	Glucose-[6- ^{14}C]	15,96	100	5,58 ²⁾	35,0	8,18 ²⁾	51,3
				5,04 ²⁾	31,6		
		12,76	100	4,62 ²⁾	36,2		
				3,98 ²⁾	31,5		
11(118)	Glucose-[6- ^{14}C]	16,4	100	6,36 ³⁾	38,8		
		17,25	100	5,42 ³⁾	31,5	10,15 ³⁾	58,8
		11,3	100		32,6		67,4
12(119)	Glucose-[2- ^{14}C]	16,4	100	9,4 ³⁾	57,3	2,5 ³⁾	15,3
		12,6	100	8,9 ³⁾	70,6	2,3 ³⁾	18,2
		12,7	100	9,0 ³⁾	70,7	3,65 ³⁾	28,6

¹⁾ $\text{CO}_2 \rightarrow \text{BaCO}_3$, Einwage; Freisetzung des CO_2 im Warburg; Aktivitätsmessung in Hyamin

²⁾ $\text{CO}_2 \rightarrow \text{BaCO}_3$, Einwage; Freisetzung des CO_2 in CONWAY-Schalen; Aktivitätsmessung in Cyclohexylamin

³⁾ CO_2 , manometrische Bestimmung im WARBURG-Apparat; für Aktivitätsmessung Freisetzung des CO_2 aus NaOH in CONWAY-Schalen und Messung in Cyclohexylamin

Diskussion

Verteilung der Radioaktivität auf Ringsystem und Seitenkette. (Tabelle 2 und Fig. 2): Bei Verabreichung von Glucose-[6- ^{14}C] finden wir in der Seitenkette C(2') + C(3') 25–30% der Gesamtaktivität, in der durch Abbau des Drosopterins gewonnenen Pterin-8-carbonsäure 65–70%. Mit Glucose-[1- ^{14}C] ist der Anteil der Aktivität in der Seitenkette nur halb so gross, ca. 15%, während in der Pterin-8-carbonsäure ca. 78% gefunden werden. Dass auch mit Glucose-[1- ^{14}C] das Leit isotop in der Seitenkette auftritt, ist durch den Austausch der C-Atome 1 und 6 der Glucose bedingt, wie er bei der glykolytischen Reaktion auftritt. Dass die Aktivität um die Hälfte geringer ist als bei Verabreichung von Glucose-[6- ^{14}C] lässt sich dadurch erklären, dass die

Glucose zu einem guten Teil über den Pentosephosphatcyclus abgebaut wird, wobei das C(1) gleich zu Beginn der Reaktion als CO_2 verlorengeht.

Das C(2) der Glucose kann bei der glykolytischen Reaktion (Aldolase-Triose-Isomerase) in das C(5) übergehen. Da aber das C(2) der Glucose (das dem C(1) der Ribose entspricht) im Pyrazinring als C(9) erscheint, ist zu erwarten, dass bei Verfütterung von Glucose-[2- ^{14}C] mehr Aktivität im Pteridinringsystem und weniger in der Seitenkette erscheint, als bei Verfütterung von Glucose-[6- ^{14}C]. Tatsächlich erhielten wir bei Versuchen mit Glucose-[2- ^{14}C] in der Pterin-8-carbonsäure ca. 90%, in der Essigsäure nur ca. 10% der Aktivität.

Dass bei allen diesen Versuchen ein gewisser Ausgleich in der Verteilung des Leit-isotops stattfindet, ist durch die relativ lange Versuchsdauer von ca. 5 Tagen bedingt, welche zwischen der Verabreichung des markierten Stoffes an die Larve und der Extraktion des Drosopterins aus der Fliege liegt.

Verteilung der Aktivität auf die beiden endständigen C-Atome der Seitenkette (Tab. 3 und graphische Darstellung Fig. 3): Das C(6) der Glucose würde nach der oben erwähnten Hypothese das endständige C-Atom C(3') der primären Seitenkette der Pterine bilden. Tatsächlich finden wir bei Verfütterung von Glucose-[6- ^{14}C] über 60% der Aktivität von C(2') + C(3') im endständigen C-Atom C(3'). Mit Glucose-[1- ^{14}C], welche durch die reversiblen glykolytischen Reaktionen in Glucose-[6- ^{14}C] übergehen kann, ergibt sich wie erwartet annähernd die gleiche Verteilung. Das C(2) der Glucose kann in das C(5) übergehen, das seinerseits das C(2') der primären Seitenkette liefert, falls unsere Hypothese zutrifft. Es ist daher zu erwarten, dass nach Verfütterung von Glucose-[2- ^{14}C] im mittleren C-Atom der Seitenkette die grössere Aktivität auftritt als im endständigen C-Atom. Unsere Resultate decken sich mit dieser Annahme: Mit Glucose-[2- ^{14}C] erhielten wir im C(2') der Seitenkette ca. 70% der Essigsäure-Aktivität, im endständigen C nur ca. 30%.

Unsere Daten liefern keinen eindeutigen Beweis dafür, dass bei der Biosynthese der Pterine die Ribose des Purinnucleotids, aus welchem sie sich ableiten, als Ganzes in der Molekel erhalten bleibt, wobei die C-Atome 3, 4 und 5 der Ribose die definitive Seitenkette des Drosopterins und anderer Pterine der Biopterin-Gruppe bilden würden. Die Isolierung von drei natürlichen Pterinen mit Trihydroxypropylseitenkette verschiedener Konfiguration [10] [11] [12] spricht sogar gegen diese Annahme. Andererseits zeigen aber unsere Versuchsergebnisse eindeutig, dass die Seitenkette des Drosopterins in engster Beziehung zu den C-Atomen 4, 5 und 6 der Glucose steht. Anders können die nach der langen Versuchsdauer noch so deutlichen Markierungen nicht erklärt werden. Falls also eine Abspaltung der Seitenkette aus einem Primärpterin angenommen werden muss, kann sich die neue Seitenkette nur aus einem der Glucose sehr nahe stehenden Metaboliten, wahrscheinlich aus einer der Triosehälften, ableiten. Das aus dem C(6) der Glucose abstammende C-Atom dieses Metaboliten würde zum endständigen C-Atom, das aus dem C(5) sich ableitende C-Atom zum mittleren C-Atom der Seitenkette. Eine Beteiligung von Threonin (über Ketobutyrat und aktivierten Propionaldehyd) am Aufbau der Seitenkette, wie sie kürzlich FORREST [17] für Biopterin vorschlug, erscheint uns wenig wahrscheinlich, da wir bei einem Kontrollversuch mit Threonin-[^{14}C] weniger als 5% der Aktivität in den beiden endständigen C-Atomen der Seitenkette von Drosopterin fanden. Man müsste schon annehmen, dass die Seitenketten beim Drosopterin und Biopterin aus verschiedenen Quellen stammen.

Experimenteller Teil

1) *Ernährung der Versuchstiere.* Die Zucht der *Drosophila* erfolgte auf einem Nährboden von Agar, Mais, Hefe und Zucker. Für die radioaktiven Versuche wurden die Larven ungefähr ein Tag vor der Verpuppung in Halbrundschalen gebracht, in denen pro 250 Versuchstiere 55 mg Trockenhefe und 0,08 mC radioaktive Substanz in 0,4 ml Wasser suspendiert und mit einem Luftstrom leicht angetrocknet worden waren. Die Menge an Hefesuspension war so bemessen, dass sie von den Larven möglichst vollständig aufgefressen wurde. Nach der Verpuppung wurden die Tiere durch kurzes Waschen in Wasser von der nicht aufgenommenen Nahrung befreit.

2) *Isolierung des Drosopterins aus den Fliegen.* Die Fliegen wurden sofort nach dem Schlüpfen extrahiert und das Drosopterin nach der Methode von VISCONTINI [14] mit einigen kleinen Modifikationen chromatographiert: Zu 1000 Fliegen setzten wir 2g Cellulosepulver (WHATMAN, Standardgrade = CF 11) und 15 ml 80-proz. Methanol zu und homogenisierten in einem hochtourigen Homogenisator solange, bis das Homogenat unter der UV.-Lampe fluoreszierte (1–2 Min.). Das so erhaltene Gemisch wurde auf eine Säule von ca. 2,2 cm Durchmesser und 15 cm Länge vom selben Cellulosepulver, das vorher mit NH_3 , Hydroxychinolin in Methanol und HCl gewaschen worden war, aufgetragen und mit 80-proz. Methanol so lange durchgewaschen, bis alle andern fluoreszierenden Stoffe eliminiert waren. Das Drosopterin bleibt in der obersten Schicht der Säule hängen. Anschliessend wird die Methanolkonzentration auf 50% gesenkt und darauf das Drosopterin mit einer 0,05-proz. Lösung von Ammoniumsulfat in 50-proz. Methanol eluiert. Es folgt eine gleiche Chromatographie an einer Säule von 1,3 cm Durchmesser und 35 cm Länge.

3) *Bestimmung der spezifischen Radioaktivität.* Die quantitative Bestimmung von Drosopterin erfolgte durch Messung des Absorptionsspektrums in 0,1 N HCl (Max. 475 nm: für $c = 12,2\gamma/\text{ml}$; $E = 0,87$ [14]). Die Radioaktivität konnte einerseits direkt in einem speziell für wässrige Lösungen geeigneten Scintillator (BRUNO-CHRISTIAN [18]) gemessen werden, andererseits wurde sie nach Verbrennung nach der Methode von KALBERER & RUTSCHMANN [19] bestimmt.

4) *Abbau des Drosopterins mit KMnO_4 zu Pterin-8-Carbonsäure* [14]. Um für die Abbaubersuche genügend Material zu haben, wurde das radioaktive Drosopterin mit inaktivem Drosopterin ungefähr im Verhältnis 1:10–1:20 verdünnt. Die bei den verschiedenen Abbaubersuchen erhaltenen Resultate sind alle auf die spezifische Aktivität dieser durch inaktive Trägersubstanz verdünnten Drosopterine berechnet. Eine Lösung von ca. 500 γ Drosopterin wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft, in 1 ml 0,5 N NaOH aufgenommen und durch tropfenweise Zugabe von 1 N KMnO_4 während zwei Tagen oxydiert. Der geringe Überschuss an KMnO_4 wurde sodann durch Zugabe von wenig Na_2SO_3 reduziert. Durch zweimaliges Waschen des abzentrifugierten Brausteins mit wenig Wasser kann daran haftende Pterincarbonsäure ebenfalls gewonnen werden. Überstehendes und Waschwässer wurden zusammen im Vakuum auf ca. 1 ml eingedampft. Nach Neutralisation dieser Lösung mit verdünntem NH_3 , Zugabe von wenig gewaschenem WHATMAN-Cellulosepulver und Einstellen des pH-Wertes mit Essigsäure auf ca. 4–5, wird das Gemisch auf eine Säule von gewaschenem WHATMAN-Cellulosepulver (Durchmesser 1 cm, Länge 30 cm) aufgezogen und mit Propanol/1-proz. NH_3 2:1 chromatographiert. Dieser ersten Chromatographie folgen zwei weitere an WHATMAN-Säulen (1 cm \times 25 cm) mit 3-proz. NH_4Cl . Zur Entfernung des Ammoniumchlorids wird die Pterincarbonsäure noch auf eine vierte gleichartige Säule aufgetragen und mit Wasser eluiert. Die zur Trockne eingedampfte Pterin-8-Carbonsäure wird in 3 ml 0,5 N HCl aufgenommen. Die Konzentration wurde aus der Lichtabsorption im BECKMAN-Photometer bestimmt. Als Bezugsgrössen dienten Spektren, die mit reiner synthetischer Pterin-8-Carbonsäure²⁾ aufgenommen worden waren (in 0,5 N HCl; $c = 10\gamma/\text{ml}$: bei 310 nm $E = 0,464$; bei 265 nm $E = 0,557$). Die Radioaktivität wurde nach Verbrennung nach der Methode von KALBERER & RUTSCHMANN [19] im Scintillations-Zähler (PACKARD Tricarb) gemessen.

5) *Abbau des Drosopterins nach KUHN-ROTH* [15]. Eine Lösung von 400–500 γ des mit inaktivem Drosopterin verdünnten, radioaktiven Drosopterins wurde im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 30 mg Essigsäure als Träger und 1 ml Oxydationsgemisch (CrO_3 in konz. H_2SO_4) versetzt. Nach 10-minütigem Erhitzen am Rückfluss wurden 50 ml Wasser in Portionen von 2–3 ml zufließen gelassen und die abgespaltene Essigsäure damit überdestilliert.

²⁾ Wir möchten an dieser Stelle Herrn Prof. M. VISCONTINI für die Überlassung von synthetischer Pterincarbonsäure bestens danken

6) *Bestimmung der Essigsäure.* Um den Anteil der überdestillierten aktiven Essigsäure zu bestimmen, die wegen ihrer geringen Menge von 100–150 μ quantitativ nicht hätte exakt erfasst werden können, wurde die überdestillierte Trägeressigsäure potentiometrisch titriert (Potentiograph METROHM). Mit 50 ml überdestilliertem Wasser konnten bei den meisten Versuchen ca. 95% der Essigsäure erhalten werden. Die Messung aliquoter Teile der Essigsäurelösung im Scintillationsgemisch nach BRUNO-CHRISTIAN ergab ihre Radioaktivität.

7) *Abbau der Essigsäure nach SCHMIDT & PHARES* [16]. Der nach Titration und Aktivitätsmessung verbleibende Rest der Essigsäurelösung aus dem KUHN-ROTH-Abbau wurde mit verdünnter NaOH auf pH 8 gebracht und im Spezialkölbchen für den Abbau nach SCHMIDT & PHARES zur Trockne eingedampft. Das bei der ersten Stufe des Abbaus durch Decarboxylierung erhaltene CO₂ wurde in 0,5 N NaOH aufgefangen. In den ersten Versuchen fällten wir das erhaltene CO₂ aus der Lauge durch Zusatz von BaCl₂ als BaCO₃. Nach Trocknung wurde aus eingewogenen Mengen in Manometergefässchen nach WARBURG das CO₂ wieder freigesetzt und in Hyamin aufgenommen. Die Aktivität des CO₂ wurde in Hyamin und Toluolszintillator im PACKARD Tricarb bestimmt. Bei späteren Versuchen dienten aliquote Teile von 0,2 ml der in der SCHMIDT-PHARES-Apparatur vorgelegten Natronlauge zur Bestimmung des im WARBURG-Manometer mit 0,1 N H₃PO₄ freigesetzten CO₂. Aliquote Teile von je 1 ml wurden in CONWAY-Schalen gegeben. Mit 3 N Citronensäure setzten wir das CO₂ daraus frei und führten es während 16 h unter langsamem Hin- und Herkippen in das Cyclohexylamin über. Die Cyclohexylamin-Lösung des CO₂ konnte in gewöhnlichem Toluolszintillator im Tricarb gemessen werden.

Die beim Umsatz mit NaN₃ und konz. H₂SO₄ in Methylamin übergeführte Methylgruppe der Essigsäure wurde mit KMnO₄ nach SCHMIDT-PHARES ebenfalls in CO₂ übergeführt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte auch bei dieser zweiten Stufe wie oben beschrieben.

Fräulein V. SPRENGER und Frau B. PFISTER-SUTER möchten wir für ihre Mithilfe bei der Durchführung der Versuche und ihren Einsatz herzlich danken. Herrn Prof. VISCONTINI sind wir für verschiedene Ratschläge sehr verbunden.

Diese Arbeit wurde mit Hilfe des SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG durchgeführt, dem wir unsern besten Dank aussprechen.

SUMMARY

(1) Larvae of *Drosophila melanogaster* (wild type) were fed with differently labelled [¹⁴C]-glucose. Drosopterine and isoxanthopterine were isolated from the extracts of the young flies. After the administration of glucose-[1-¹⁴C] both pterines had the same specific radioactivity; after glucose-[U-¹⁴C] and glucose-[6-¹⁴C] isoxanthopterine had a lower activity than drosopterine (70% and 45% resp. with respect to the latter).

(2) Carbon atoms (8 + 9) of isoxanthopterine contained much more of the label after the administration of glucose-[1-¹⁴C] than after glucose-[6-¹⁴C]. (Carbon atoms (8 + 9) were obtained as oxalic acid after degradation of the pterine with chlorine.)

(3) Drosopterines extracted from flies after administration of glucose-[1-¹⁴C], glucose-[2-¹⁴C] and glucose-[6-¹⁴C] were oxidized (a) by potassium permanganate in order to obtain the pteridine skeleton in the form of pterine-8-carboxylic acid, and (b) by the KUHN-ROTH degradation in order to obtain the two terminal carbon atoms of the side chain as acetic acid. The terminal carbon atoms of the drosopterine extracted from the flies after administration of glucose-[6-¹⁴C] contained twice the activity as that found in a parallel experiment with glucose-[1-¹⁴C]. Drosopterine synthesized in the presence of glucose-[2-¹⁴C] contained most of the activity in the pteridine skeleton.

(4) The acetic acid obtained from the pterines by the KUHN-ROTH oxidation was submitted to the SCHMIDT-PHARES degradation. In drosopterines synthesized in the presence of glucose-[6-¹⁴C] or glucose-[1-¹⁴C], most of the activity was found in the terminal C-atom of the side chain (methyl group of the acetic acid). In the corresponding experiment with glucose-[2-¹⁴C] the second C-atom of the side chain (carboxyl group of the acetic acid) was the more active.

(5) The pattern of labelling found is discussed. Our results show that the label in position 6 of the glucose is preferentially incorporated in the side chain, and the label in position 2 in the pyrazine ring of the pterines. The question remains open whether the side chain of drosopterine (and of other pterines of the biopterine group) corresponds to the carbon atoms 3 to 5 of a ribose residue which, as we suppose, is used in building the pyrazine ring of the pterines, or whether the side chain is introduced in a secondary reaction. In any case our results demonstrate a close relationship between the side chain of drosopterine and the carbon atoms 4 to 6 of glucose. The terminal carbon atom of the side chain derives from carbon 6, the second carbon of the side chain from carbon 5 of glucose.

Aus dem Biochemischen Institut
der Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] I. Mitt. O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* **42**, 2254 (1959).
- [2] 2. Mitt. O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* **44**, 1480 (1961).
- [3] F. WEYGAND, H. SIMON, G. DAHMS, M. WALDSCHMIDT, M. J. SCHLIEF & M. WACKER, *Angew. Chem.* **73**, 402 (1961).
- [4] W. S. McNUTT & H. S. FORREST, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 951 (1958); E. VIEIRA & E. SHAW, *J. biol. Chemistry* **236**, 2507 (1961); F. KORTE & G. LUDWIG, *Liebigs Ann. Chem.* **648**, 131 (1961); F. KORTE u. Mitarb., *Angew. Chem.* **70**, 406 (1958).
- [5] W. S. McNUTT, *J. Amer. chem. Soc.* **83**, 2303 (1961).
- [6] J. J. REYNOLDS & G. M. BROWN, *J. biol. Chemistry* **237**, 2713 (1962).
- [7] H. SIMON, F. WEYGAND, J. WALTER, H. WACKER & K. SCHMIDT, *Z. Naturf.* **18b**, 757 (1963).
- [8] W. PFLEIDERER, R. LOHRMANN, F. REISSER & D. SÖLL, in «Pteridine Chemistry», Pergamon Press, London 1964, S. 87.
- [9] H. SIMON, H. WACKER & J. WALTER, in «Pteridine Chemistry», Pergamon Press, London 1964, S. 327.
- [10] H. REMBOLD & L. BUSCHMANN, *Liebigs Ann. Chem.* **662**, 72 (1963); *Chem. Ber.* **96**, 1406 (1963).
- [11] M. VISCONTINI, M. POUTEAU-THOUVENOT, R. BÜHLER-MOOR & M. SCHROEDER, *Helv.* **47**, 1948 (1964).
- [12] T. GOTO, *Jap. J. Zool.* **14**, 83, 91 (1963).
- [13] O. BRENNER-HOLZACH & F. LEUTHARDT, *Helv.* **48**, 1147 (1965).
- [14] M. VISCONTINI, E. HADORN & P. KARRER, *Helv.* **40**, 579 (1957).
- [15] R. ENTSCHEL, C. H. EUGSTER & P. KARRER, *Helv.* **39**, 1263 (1956); C. F. GARBERS, H. SCHMID & P. KARRER, *Helv.* **37**, 1336 (1954).
- [16] K. F. SCHMIDT, *Angew. Chem.* **36**, 511 (1923); *Ber.* **57**, 704 (1924); E. F. PHARES, *Arch. Biochemistry Biophysics* **33**, 173 (1951).
- [17] F. I. MACLEAN, H. S. FORREST & J. MYERS, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 623 (1965).
- [18] G. A. BRUNO & J. E. CHRISTIAN, *Analyt. Chemistry* **33**, 1216 (1961).
- [19] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).