

ÜBER EINE FUNKTIONELLE INVERSION DER C-ATOME VON GLYCIN IM PURINSTOFFWECHSEL

D. SCHLEE und H. REINBOTHE

Institut für Allgemeine Botanik der Universität Halle und Institut für Biochemie der
Pflanzen der DAW zu Berlin in Halle (Saale)

(Received 28 December 1962)

Zusammenfassung—Unter Verwendung von Glycin-1-¹⁴C und Glycin-2-¹⁴C wurde der Mechanismus der Ureidbiosynthese in chlorophyll-defekten Blättern von *Pelargonium zonale* und Keimlingen von *Triticum vulgare* untersucht. Die festgestellte Verteilung der Radioaktivität über die C-Atome 4, 5 und 2+8 (2+2') von Allantoin und Allantoinsäure bestätigt nachdrücklich die Annahme einer Ureidbildung aus Purinstufen und schliesst andersgeartete Mechanismen einer direkten Ureidsynthese, z.B. aus Glyoxylsäure und Harnstoff, definitiv aus. In den untersuchten Pflanzen ist ein Reaktionscyclus wirksam, der aeroben Purinabbau und Purinneusynthese durch Glyoxylat aneinanderschliesst. Als Konsequenz dieser Reaktionsfolge tritt ein Austausch von ¹⁴C zwischen den C-Atomen 1 und 2 von Glycin in Erscheinung, verursacht durch einen Einbau von carboxylmarkiertem Glycin in die Stellung 4 und von methylenmarkiertem Glycin in die Stellung 5 von Allantoin und Allantoinsäure. So liefert Glycin-1-¹⁴C Glyoxylat-2-¹⁴C und damit Glycin-2-¹⁴C, während Glycin-2-¹⁴C carboxylmarkiertes Glyoxylat und Glycin liefert. Aus Glycin-2-¹⁴C wird Radio-kohlenstoff aber auch in die Ureido-C-Atome von Allantoin und Allantoinsäure eingebaut und erscheint somit auch in Harnstoff. Die beobachtete Harnstoffakkumulation in chlorophyll-defekten Blättern von *Pelargonium zonale* ist eine Folge der unterschiedlichen Verwertungsgeschwindigkeit von aus der Ureid-hydrolyse anfallendem Glyoxylat und Harnstoff. Harnstoff wird nur gering gespalten, während Glyoxylat sehr effektiv in die Synthese von Glycin und Ureiden einbezogen wird. Die für den Glycinmetabolismus sich ergebenden Gesichtspunkte werden diskutiert.

Abstract—Results concerning ureide biosynthesis in chlorophyll-deficient leaves of *Pelargonium zonale* and germinating seeds of *Triticum vulgare* are consistent with the concept that allantoin and allantoic acid are formed via purine intermediates. The determination of radiocarbon distribution over the carbon atoms 4, 5 and 2 and 2' (2+8) of allantoin and allantoic acid after feeding glycine-1-¹⁴C and glycine-2-¹⁴C, definitely excludes a more direct pathway of ureide biosynthesis from simpler molecules, e.g., by condensation of glyoxylate and urea. In the plants in question a reaction cycle is operative connecting aerobic purine degradation and *de novo* purine synthesis by means of glyoxylate. Glyoxylate which is rapidly formed in the degradative pathway is readily introduced into purine synthesis via glycine (and serine?), and thus becomes an important link in the cyclic reaction path. As a consequence, radiocarbon from glycine-1-¹⁴C is introduced in the methylene carbon of glycine. By analogy, glycine-2-¹⁴C is transformed to glycine-1-¹⁴C. But radioactivity from glycine-2-¹⁴C is also incorporated into positions 2 and 8 (2 and 2') of glyoxylic ureides, thus furnishing ¹⁴C-urea. As a consequence of the cyclic reaction pathway, carboxyl-labeled glycine is also introduced in the ureide carbons of allantoin and allantoic acid, thus also yielding urea-¹⁴C. The accumulation of considerable amounts of free urea observed in chlorophyll-deficient leaves of *Pelargonium zonale* is a result of different rates of urea and glyoxylate utilization depending on low urease activity and a rapid utilization of glyoxylate for glycine and ureide synthesis. The results are discussed in terms of the metabolism of glycine.

EINLEITUNG

IN EINER Zahl von Arbeiten der letzten Jahre ist über Vorkommen, Physiologie und Biosynthese der Glyoxylsäureureide in Pflanzen berichtet worden, worüber zusammenfassend referiert worden ist.¹⁻⁴ Zwei verschiedene Wege der Biosynthese von Allantoin und Allantoinsäure sind immer wieder diskutiert worden: (1) ein Weg über Purinvorstufen, und (2) eine Ureidsynthese aus Glyoxylat und Harnstoff, wie sie Brunel und Brunel-Capelle⁵ für *Agaricus campestris* berichtet haben. Dieser Weg scheint indes in höheren Pflanzen

¹ K. MOTHES, *Encyclopedia of Plant Physiology*, 8, 716 Springer, Berlin, 1958.

² K. MOTHES, *Can. J. Botany* 39, 1785 (1961).

³ H. REINBOTHE and K. MOTHES, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 13, 129 (1962).

⁴ H. REINBOTHE, *Ergeb. Biol.* 25, 33 (1962).

⁵ A. BRUNEL et G. BRUNEL-CAPELLE, *Compt. rend.* 232, 1130 (1951).

nicht realisiert zu sein. Auch war es uns nicht möglich, eine enzymatische Ureidbildung auf dem Wege einer Harnstoff-Glyoxylsäure-Kondensation in Fruchtkörpern von *Agaricus bisporus* Lange und verschiedenen Lycoperdon-Species nachzuweisen.⁶ Eine Allantoin- und Allantoinsäurebildung auf dem Wege der Purinneusynthese und durch nachfolgenden aeroben Purinabbau ist durch mehrere Arbeiten der letzten Jahre sichergestellt worden.⁷⁻¹² Offenbar ist der Mechanismus des oxydativen Purinabbaus über Harnsäure ubiquitär verbreitet. Auch dürften keine alternativen Wege der Purinneusynthese bestehen, wenn auch über den Mechanismus der pflanzlichen de novo-Synthese der Purine noch wenig bekannt ist.

Gewisse experimentelle Befunde im Zusammenhang mit der Ureidsynthese bedurften weiterer Klärung. Butler *et al.*¹² hatten gefunden, dass nach Glycin-2-¹⁴C-Gabe an *Symphytum uplandicum* Radiokohlenstoff auch in das C-Atom 4 von Allantoin eintritt. Reinbothe fand, dass in Speichervurzeln von *Symphytum officinale* Glycin-1-¹⁴C ebenfalls, wenn auch nur gering, in die Ureido-C-Atome von Allantoin inkorporiert wird. Die Annahme einer cyclischen Reaktionsfolge, die von Glycin u.a. Vorstufen der Purinsynthese ausgeht und über Purinderivate und Glyoxylsäureureide zu Glyoxylat (und weiter zu Glycin) und Harnstoff führt, könnte diese Befunde zwanglos erklären.¹³ Denn Glyoxylat-1,2-¹⁴C wird in Ureidpflanzen sehr wirksam in Glycin und Serin verwandelt, wodurch der Abbau wieder in die Synthese mündet (Abb. 1).

In dieser postulierten Reaktionsfolge müsste das Radio-kohlenstoffatom aus Glycin-1-¹⁴C das C-4 von Allantoin bzw. Allantoinsäure markieren, deren hydrolytischer Abbau im

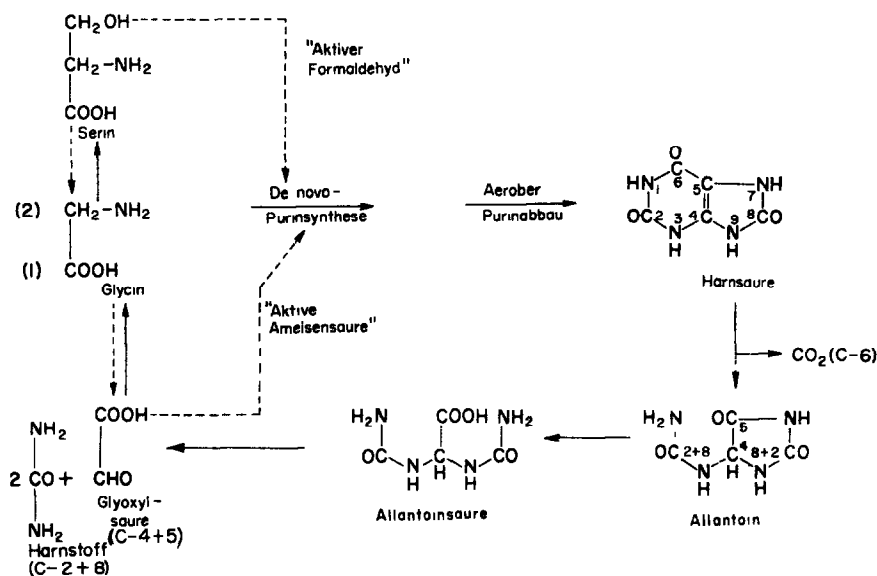


ABB. 1. GLYCINMETABOLISMUS IN UREIDPFLANZEN ("GLYCIN-ALLANTOIN-CYCLUS").

⁶ H. REINBOTHE, unveröffentlicht.

⁷ R. L. BARNES, *Can. J. Botany* **40**, 563 (1962).

⁸ R. M. KRUPKA and G. H. N. TOWERS, *Can. J. Botany* **36**, 179 (1958).

⁹ R. M. KRUPKA and G. H. N. TOWERS, *Can. J. Botany* **37**, 539 (1959).

¹⁰ H. REINBOTHE and K. MÖTHES, *Tetrahedron Letters* **25**, 32 (1960).

¹¹ H. REINBOTHE, *Flora* **150**, 128, 474 (1961); *Flora* **151**, 315 (1961).

¹² G. W. BUTLER, J. D. FERGUSON and R. M. ALLISON, *Physiol. Plantarum*, **14**, 310 (1961).

¹³ H. REINBOTHE, *Wiss. Z. Univ. Halle, Math.-Nat.* **X/5**, 1121 (1961).

α -C-Atom markiertes Glyoxylat und Glycine liefern würde, das nun bei einem weiteren Umlauf des Cyclus Radioaktivität in das C-5 der Glyoxylsäureureide inkorporiert. Auf diese Weise würde auch der Carboxylkohlenstoff von Glycine in die Ureido-C-Atome von Allantoin und Allantoinsäure eingebaut. Denn Glycine-2- ^{14}C inkorporiert das ^{14}C -Isotop zunächst in die Positionen 5, 2 und 8 der Glyoxylsäureureide. Bei weiteren Umläufen der cyclischen Reaktionsfolge müsste die Markierung im C-Atom 4 sukzessive zunehmen, während bei längeren Versuchszeiten die radioaktive Beladung der Ureido-C-Atome sich verringern müsste. Als Effekt dieser Reaktionen müsste ein Austausch der Markierung zwischen C-1 und C-2 von Glycine bzw. eine Gleichverteilung der Markierung über beide C-Atome nach Fütterung von positionsmarkiertem Glycine in Erscheinung treten. Wir prüften diese Annahmen unter Verwendung von Glycine-1- ^{14}C und Glycine-2- ^{14}C für Weizenkeimlinge (*Triticum vulgare*, Sorte 'Remo') und für chlorophyll-defekte Blätter von *Pelargonium zonale* (die im Vergleich zu den grünen Blättern ureidreicher sind).

Bestimmt wurden die spezifischen Aktivitäten von Allantoin, Allantoinsäure und Harnstoff (I/min/mM) nach ansteigenden Fütterungszeiten und die prozentuale Verteilung der Radioaktivität über die C-Atome 4, 5 und 2+8 von Allantoin bzw. Allantoinsäure zu verschiedenen Zeitintervallen.

Die Tabelle 1 zeigt das nach Glycine-2- ^{14}C -Gabe an Blätter von *Pelargonium zonale* erhaltene Ergebnis.

TABELLE 1. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT UND PROZENTUALE VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT ÜBER DIE C-ATOME 4, 5 UND 2+8 VON ALLANTOINSÄURE NACH APPLIKATION VON GLYCINE-2- ^{14}C (0,825 mC/mM; 200 μl MIT 20 μC PRO ANSATZ). CHLOROPHYLL-DEFEKTE BLÄTTER VON *Pelargonium zonale*. DIE BLÄTTER (CA. 1 g FRISCHMATERIAL PRO VERSUCH) WURDEN ÜBER DEN TRANSPIRATIONSSTROM MIT JE 200 μl GLYCINLÖSUNG DIE ANGEgebenEN ZEITEN VERSORGT

Versuchszeit hr	I/min/mM Allantoinsäure $\times 10^{-8}$	% Aktivität von		
		C 2+8	C-4	C-5
1	0,212	19,8	1,0	79,0
2	0,256	20,1	1,7	77,4
4,5	0,834	17,7	4,2	77,6
10	1,116	23,6	8,7	67,2
17	1,884	20,6	15,9	63,2
24	3,323	19,1	32,4	48,5

Die festgestellte Verteilung der Radioaktivität konnte durch 2 Parallelversuche bestätigt gefunden werden. Die Tabelle 2 zeigt das nach Applikation von Glycine-1- ^{14}C erhaltene Ergebnis.

TABELLE 2. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT UND PROZENTUALE VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT ÜBER DIE C-ATOME 4, 5 UND 2+8 VON ALLANTOINSÄURE NACH APPLIKATION VON GLYCINE-1- ^{14}C (4 mC/mM; 200 μl MIT 20 μC PRO BLATT). CHLOROPHYLL-DEFEKTE BLÄTTER VON *Pelargonium zonale*. DIE BLÄTTER (CA. 1 g PRO VERSUCH) WURDEN ÜBER DEN BLATTSTIEL MIT JE 200 μl GLYCINLÖSUNG DIE ANGEgebenEN ZEITEN GEFÜTTERT

Versuchszeit hr	I/min/mM Allantoinsäure $\times 10^{-8}$	% Aktivität von		
		C 2+8	C-4	C-5
1	0,136	0,5	98,3	1,1
2,5	0,214	2,3	94,5	2,8
10	0,610	8,8	77,6	13,4
24	0,994	12,8	51,3	35,8

Aus den Tabellen 1 und 2 ist zu entnehmen, dass nach ansteigenden Zeiten bei zunehmender Inkorporation von ^{14}C in das Glyoxylsäuremittelstück von Allantoinsäure eine Gleichverteilung der Markierung über die C-Atome 4–5 angestrebt wird, beruhend auf dem Ineinanderfließen von Synthese und Resynthese nach Abbau der Verbindung. Da das Methylen-C-Atom von Glycin das oxydierte C-Atom des Glyoxylsäuremittelstückes von Allantoinsäure liefert, tritt Radioaktivität aus Glycin-2- ^{14}C aus den C-Atomen 5 von Glyoxylsäureureiden in den Carboxylkohlenstoff von Glyoxylat und Glycin ein. Carboxylmarkiertes Glycin liefert via C-4 von Allantoinsäure das aldehydische C-Atom von Glyoxylat und damit das α -C-Atom von Glycin. Glycin-2- ^{14}C tritt aber auch in die Bildung der Ureido-C-Atome von Allantoin und Allantoinsäure ein, so dass durch den geschilderten Mechanismus Harnstoff, der aus den Ureidogruppen von Allantoinsäure hervorgeht, Markierung nicht nur nach Applikation von Glycin-2- ^{14}C , sondern auch nach Glycin-1- ^{14}C -Gabe erfährt (Tab. 2 und 3).

TABELLE 3. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT VON HARNSTOFF NACH APPLIKATION VON GLYCIN-2- ^{14}C (0,825 mC/mM) UND GLYCIN-1- ^{14}C (4 mC/mM) AN CHLOROPHYLL-DEFEKTE BLÄTTER VON *Pelargonium zonale* NACH VERSCHIEDENEN ZEITEN. PRO BLATT (CA. 1 g FRISCHGEWICHT) WURDEN 200 μl GLYCINLOSUNG (20 μC) ÜBER DEN BLATTSTIEL GEFÜTTERT

Versuchszeit hr	Spezifische Aktivität. I/min/mM Harnstoff $\cdot 10^{-4}$ nach Applikation von	
	Glycin-2- ^{14}C	Glycin-1- ^{14}C
1	0,313	0,01
2	0,940	
2,5		0,047
4,5	1,640	
10	3,000	1,432
17	9,327	
24	11,630	1,574

Während Glycin offenbar in den Sog der Glycin-Synthese hineingerissen wird, so dass freies Glyoxylat nicht in nennenswertem Umfang auftritt, fällt Harnstoff aus dem Purinabbau in nicht unbeträchtlicher Konzentration an. Die in chlorophylldefekten, aber auch grünen Pflanzenteilen von Ureidpflanzen beobachtete Anhäufung von freiem Harnstoff ist somit kein Artefakt der Aufarbeitung, wie Tracey¹⁴ vermutete, sondern die Folge einer Steigerung bestimmter Enzymaktivitäten im Bereich des Purinstoffwechsels und der unterschiedlichen Verwertungsgeschwindigkeit von aus der Allantoinsäurehydrolyse anfallendem Harnstoff und Glyoxylat. Wie wir zeigten, wird Harnstoff- ^{14}C von solchen Blättern metabolisiert, wenn auch nur langsam, wofür wir Ureaseaktivität verantwortlich machten.

Allantoinsäure kann indes, insbesondere nach exogener Zufuhr von Glyoxylat, leicht aus Harnstoff und Glyoxylsäure durch nicht-enzymatische Kondensation gebildet werden. Obwohl unter den experimentellen Bedingungen mit einer solchen Möglichkeit nicht gerechnet zu werden brauchte, erschien es uns notwendig, die für Allantoinsäure erhaltenen Ergebnisse an einem Objekt zu überprüfen, das Allantoin neben Allantoinsäure in präparativ gut fassbarer Menge enthält. Wir fütterten deshalb 4 d alte Keimlinge von *Triticum vulgare* mit Glycin-2- ^{14}C . Bestimmt wurden die spezifische Aktivität von Allantoin- ^{14}C und die prozentuale Verteilung der Radioaktivität über die C-Atome 4, 5 und 2+8 nach steigenden Versuchszeiten (Tab. 4).

¹⁴ M. V. TRACEY, *Modern Methods of Plant Analysis*, 4, 119. Springer, Berlin, 1955.

TABELLE 4. SPEZIFISCHE AKTIVITÄT UND PROZENTUALE VERTEILUNG DER RADIOAKTIVITÄT ÜBER DIE C-ATOME 4, 5 UND 2+8 VON ALLANTOIN NACH APPLIKATION VON GLYCIN-2-¹⁴C (0,825 mC/mM) AN 4 D ALTE KEIMLINGE VON *Triticum vulgare*. PRO ANSATZ WURDEN 15 KEIMLINGE VON CA. 1 g FRISCHGEWICHT MIT 125 μ C IN 20 ml H₂O ÜBER DIE WURZELN VERSORGT

Versuchszeit hr	I/min/mM Allantoin $\times 10^{-8}$	% Aktivität von		
		C 2+8	C-4	C-5
1	0,110	13,2	2,2	83,3
8	0,375	15,7	5,5	78,1
14	0,923	17,3	15,9	66,4
24	1,172	14,1	33,4	51,5

Die Daten zeigen somit eine gute Übereinstimmung mit den für *Pelargonium* erhaltenen Werten (s. Tab. 1). Ein Austausch von durch Transaminierung oder oxydative Desaminierung gebildetem Glyoxylat mit dem Glyoxylsäuremittelstück von Allantoinsäure dürfte deshalb nicht vorgelegen haben. Denn Allantoin wird durch spontan-chemische Kondensation aus Glyoxylat und Harnstoff unter den gewählten Aufarbeitungsbedingungen nicht gebildet. Wie Krupka und Towers⁸ gezeigt haben, bauen Weizenkeimlinge Glycin sehr wirksam in Glyoxylsäure ein auf dem Wege über Allantoin. Unter Bedingungen, die oxydative Bildungswege von Glyoxylat aus Glycin ausschliessen, wird wohl Glyoxylat sehr effektiv in Glycin verwandelt, nicht aber umgekehrt. So scheint in Weizenkeimlingen eine direkte Bildung von Glyoxylat aus Glycin (auf dem Wege der Transaminierung) in nur geringem Ausmass zu erfolgen, während Glyoxylat schnell in Glycin transformiert wird.

DISKUSSION

Die erhaltenen Daten bestätigen nachdrücklich, dass Glyoxylsäureureide in höheren Pflanzen aus Purinvorstufen und durch nachfolgenden oxydativen Purinabbau gebildet werden. Glycin-2-¹⁴C erfährt Inkorporation in die C-Atome 5, 4, 2 und 8 von Allantoin und Allantoinsäure. Die mit der Versuchszeit zunehmende, zunächst (1 Stunde) nur geringe Inkorporation von Radioaktivität in das C-Atom 4 von Glyoxylsäureureiden wird verständlich durch die Annahme eines Reaktionscyclus, der mit Hilfe von Glyoxylat Purinabbau und Purinneusynthese aus Glycin aneinanderschliesst. C-2 und C-8 von Allantoin und Allantoinsäure dürften auf dem Wege über aktive Einkohlenstoffkörper gebildet werden. Offenbar ist auch in Ureidpflanzen Serinaldolase (Serinhydroxymethylase) wirksam; denn Glycin wird sehr effektiv in Serin verwandelt. Das Methylen-C-Atom von Glycin könnte auf dem Wege über das β -C-Atom von Serin oder über aus Glyoxylat gebildete "aktive Ameisensäure" Zugang zur Bildung der Ureidkohlenstoffatome finden. Glycin-1-¹⁴C transferiert Radioaktivität bevorzugt in die Position 4 von Glyoxylsäureureiden. Durch den beschriebenen Reaktionsverlauf erreicht das Carboxyl-C-Atom von Glycin aber auch das C-Atom 5 und die Ureidkohlenstoffatome. Somit gewinnt das C-1 von Glycin auch Zutritt zum Metabolismus der aktiven Einkohlenstoffkörper.

Der in Ureidpflanzen anzutreffende freie Harnstoff entstammt möglicherweise allein dem Purinstoffwechsel. Doch wissen wir z.Zt. nicht, ob weitere Bildungswege für Harnstoff in diesen Pflanzen existieren (Ornithin-Cyclus, Pyrimidinabbau usw.). Die Akkumulation von Harnstoff in Allantoinsäurepflanzen findet jedenfalls eine plausible Erklärung durch das Wirken des Purinmechanismus der Ureidsynthese und durch eine unterschiedliche Verwertungsgeschwindigkeit von über den Purinabbau anfallendem Glyoxylat und Harnstoff. Während Glyoxylat sehr wirksam in Glycin/Serin und Ureide transformiert wird, ist die harnstoffspaltende Aktivität in diesen Pflanzen nur gering.

Der dargestellte Reaktionscyclus, der im Effekt auf einen C-Austausch im Glycin hinausläuft, zeigt neue Aspekte des Glycinmetabolismus auf. Durch diesen Mechanismus kann das Methylen-C-Atom von Glycin zu CO_2 oxydiert werden und das Carboxyl-C-Atom kann zur Bildung von aktiven Einkohlenstoffkörpern Anlass geben. Damit könnte auch Kohlendioxyd aktive C-1-Fragmente liefern; denn $^{14}\text{CO}_2$ wird in Ureidpflanzen (z.B. Speicherwurzeln von *Symphytum officinale*) sehr wirksam in Glycin und Serin eingebaut. Doch ist über den Biosynthesemechanismus dieser Verbindungen in den genannten Objekten nichts bekannt.

Unter gewissen physiologischen Bedingungen dürften Allantoin und Allantoinsäure aus dem Reaktionscyclus herausgenommen werden, um als Stickstofftransportformen zu fungieren.

EXPERIMENTELLES

Allantoin, Allantoinsäure und Harnstoff wurden durch Radioautographie lokalisiert, aus Papierchromatogrammen eluiert und nach Buchanan *et al.*¹⁵ einem definierten chemischen Abbau unterworfen. Allantoin wurde alkalisch zu Allantoinsäure, Allantoinsäure sauer zu Glyoxylsäure und Harnstoff hydrolysiert. Glyoxylat wurde in das Semi-carbazon überführt und mit saurem Kaliumpermanganat oxydiert: das nach 7 min aufgefangene CO_2 repräsentiert das C-1, das nach Verwerfen einer intermediären Fraktion aufgefangene CO_2 das C-2 von Glyoxylat. $^{14}\text{CO}_2$ wurde aufgefangen und im Methanzähler gemessen. Harnstoff wurde von Glyoxylat durch Ionenaustausch auf Dowex 1 (Formiat) abgetrennt. Allantoin und Allantoinsäure wurden mit dem Rimini-Schryver-Fosse-Reagens quantitativ bestimmt,¹¹ Harnstoff mit dem Mikrodiffusionsverfahren nach Conway und O'Malley.¹⁶

Anerkennung—Für die stete Förderung der Untersuchungen und für hilfreiche Diskussionen sei unserem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. K. Mothes, an dieser Stelle gedankt. Dank gebührt auch Herrn Dr. H.-R. Schütte für die Überlassung von Glycin- ^{14}C .

¹⁵ J. M. BUCHANAN, J. C. SONNE and A. M. DELLUVA, *J. Biol. Chem.* 173, 81 (1948).

¹⁶ E. J. CONWAY and E. O'MALLEY, *Biochem. J.* 36, 655 (1942).