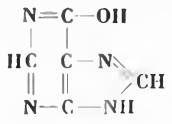
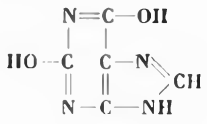
Die Biosynthese der Purine

Von Dr. James Bäumler, Basel

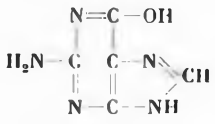
Die biochemische Forschung hat sich von jeher eingehend mit der Stoffklasse der Purine befaßt, sind doch diese Verbindungen weit verbreitet und immer wieder als Bausteine interessanter und neuer Molekülgruppen beteiligt. Einerseits treten sie in Fermenten auf und stehen in enger Beziehung zum Aminosäurestoffwechsel, andererseits werden sie als charakteristische Bestandteile der Nukleinsäuren in die Nukleoproteide eingebaut und in Form dieser Makromoleküle in physiologisch bedeutenden Körpern, wie z. B. Zellkernen, Chromosomen, Viren, aufgefunden. Es sei auch an die zentrale Stellung der Adenosintriphosphorsäure als Energieüberträger im gesamten Stoffwechsel erinnert und an die Alkaloide, wie z. B. Coffein.



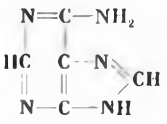
Hypoxantin



Xanthin



Guanin



Adenin

Trotz dieses vielseitigen Vorkommens war bis vor wenigen Jahren recht wenig über die Biosynthese der Purine bekannt. Einzig die Abbauprodukte der Purine waren genauer studiert. Erst die neueren Methoden mit Hilfe der isotopen Kohlenstoff- und Stickstoffatome erlaubten es, die Schwierigkeiten zu überwinden, so daß in den vergangenen Jahren einige Baustoffe und Zwischenprodukte der Purinsynthese erkannt und isoliert werden konnten. Die Kombination der Isotopentechnik mit der Papierchromatographie[1] ermöglichte es, mit so kleinen Substanzmengen zu experimentieren, daß auch die Ergebnisse durch Tierversuche gestützt werden konnten.

Im folgenden soll versucht werden, die zahlreichen Einzelarbeiten, die zur Aufklärung der Biosynthese der Purine erschienen sind, in einer übersichtlichen Form zusammenzufassen.

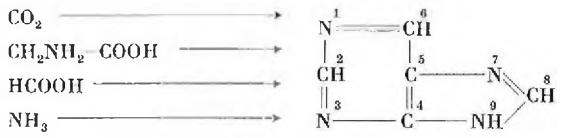
Ausgangsstoffe

Schon sehr früh wurde durch die Versuche an Hühnereiern gezeigt, daß der tierische Organismus zur Purinsynthese fähig ist. Auch Reptilien und vor allem Vögel vermögen wesentliche Mengen von Purinen aufzubauen. Durch Fütterungsversuche bei Vögeln und Hühnern und anschließender Isolierung der Harnsäure – das Purinabbauprodukt dieser Tierklassen – konnten schon Minkowski und Wiener zeigen, daß Zugabe von Glycin, Leucin, Asparagin und andern Aminosäuren, die durch Eiweißspaltung entstehen, eine vermehrte Harnsäureausscheidung zur Folge hatte. Dabei ist aber immer die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß die zugeführten

[1] P. Boulanger und J. Montreuil, Bull. Soc. Chim. France *1952*, 844.

Aminosäuren zuerst in einfache Verbindungen, wie z. B. Glycin, abgebaut und erst diese Spaltprodukte zur weiteren Purinsynthese verwendet werden. Derartig angelegte Experimente lassen daher keine Schlüsse zu über die zur Biosynthese verwendeten Aminosäuren.

Neuere Versuche mit Verbindungen, die mit Isotopen markiert waren, zeigten, daß als Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen Kohlensäure, «Formiat», Glycin und Ammoniak in Frage kommen.



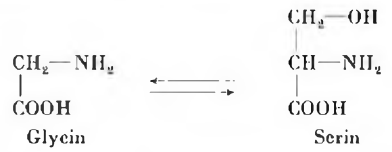
Purin

So verfütterten Buchanan und Sonne[2] Tauben C^{13}-haltiges Natriumformiat und isolierten die ausgeschiedene Harnsäure, wobei das Isotope C^{13} vor allem in 2-Stellung und zum Teil in 8-Stellung des Purinringsystems aufgefunden wurde. Ebenso werden das Kohlenstoffatom der Carboxylgruppe der Essigsäure und die α- und β-Kohlenstoffatome der Milchsäure hauptsächlich in 2- und 8-Stellung eingebaut[3].

Karlsson und Barker[4] injizierten Tauben subkutan oder intraperitoneal Natriumbicarbonat, dessen Kohlenstoff mit C^{14} markiert war. Aus den Exkrementen isolierten sie die Harnsäure, wobei festgestellt wurde, daß das Kohlenstoffatom des Bicarbonations in 6-Stellung des Purinrings einverleibt war. Zu diesem Ergebnis gelangten auch Sonne und Buchanan, die ähnliche Versuche mit C^{13}-haltigem Kohlendioxyd durchgeführt haben.

Eingehend wurde von verschiedenen Forschern das Problem bearbeitet, ob Glycin als Purinprekursor in Frage kommt. An Tauben konnten Buchanan und Sonne[5] schon 1946 zeigen, daß Glycin zur Purinsynthese benützt wird. Sie arbeiteten mit Glycin, dessen Carboxyl-Kohlenstoffatom mit C^{13} indiziert war, und fanden, daß bei der Synthese das Isotope in 4-Stellung des Purinrings erscheint[6]. Auch anhand von Wachstumsversuchen mit *Saccharomyces cerevisiae*[7] ließ sich zeigen, daß markiertes Glycin in die Purine eingebaut wird. Weiteren Einblick gewährten die Experimente von Abrams, Hammarsten und Shemin[8] an *Torulopsis utilis*. Sie setzten dem Hefenährboden Glycin, das mit N^{15} indiziert war, zu und isolierten aus den Nukleinsäurefraktionen das Guanin und Adenin. Durch Abbau dieser Verbindungen ließ sich zeigen, daß N^{15} in der 7-Stellung des Purinrings vorliegt. Gibt man zu *Aerobacter aerogenes*[9] markiertes Glycin, so werden in den isolierten Purinen Guanin und Adenin die zugefügten Isotopen ebenfalls wiedergefunden. Quantitative Untersuchungen lassen erkennen, daß das Stickstoffatom in 7-Stellung und das Carboxyl-Kohlenstoffatom des Glycins in 4-Stellung eingebaut wird. Daraus darf man schließen, daß das α-Kohlenstoffatom im Glycin wohl dem Kohlenstoffatom in 5-Stellung des Purinrings entspricht und daß die Atome in 4,5,7-Stellung im Purinring aus dem ursprünglichen Glycin stammen. Schließlich sei noch erwähnt, daß Shemin und Rittenberg[10] Untersuchungen mit Glycin, das mit N^{15} indiziert war, am Menschen durchführten. In der aus dem Urin isolierten Harnsäure wurde das Stickstoffisotope in Übereinstimmung mit den Tierversuchen in 7-Stellung gefunden.

Anhand der obigen Ausführungen darf wohl gesagt werden, daß die Herkunft der im Purinring enthaltenen Kohlenstoffatome weitgehend aufgeklärt ist. Sie stammen aus Glycin (4- und 5-Stellung) und aus Kohlensäure (6-Stellung). Auf den Einbau von «Formiat» soll später nochmals näher eingegangen werden. Der Übergang von Glycin mit zwei Kohlenstoffatomen in eine Aminosäure mit drei Kohlenstoffatomen ist schon lange bekannt, konnte doch, wie aus folgenden Versuchen hervorgeht, eindeutig gezeigt werden, daß Glycin direkt in Serin umgewandelt werden kann. An Leberhomogenaten von Ratten[11] wurde markiertes Glycin inkubiert und anschließend die Proteine isoliert. Von den bei der Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren zeigte einzig Serin einen hohen Isotopengehalt an. Zu gleichen Ergebnissen gelangte man bei Experimenten mit Hefen – *Torulopsis* –[12] und mit Ratten[13,14]. Daß die Purinsynthese nicht direkt über die freie Aminosäure Serin verläuft, geht aus den Versuchen von Elwyn und Springson[15] hervor, die mit markiertem Serin an Ratten durchgeführt wurden. Dabei zeigte es sich, daß Serin zuerst zu Glycin abgebaut und die beiden Bruchstücke, Glycin und ein Fragment mit einem Kohlenstoffatom, zur weiteren Purinsynthese verwendet werden. Das am Serin abgespaltene β-Kohlenstoffatom tritt über die von uns als «Formiat» bezeichnete Kohlenstoffquelle in 2- und 8-Stellung des Purinrings wieder in Erscheinung, wäh-

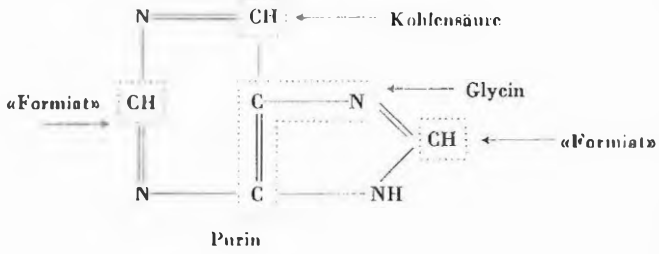


Glycin Serin

[2] J. M. Buchanan und J. C. Sonne, J. Biol. Chem. *166*, 781 (1946).
[3] J. C. Sonne, J. M. Buchanan und A. M. Delluva, J. Biol. Chem. *173*, 69 (1948).
[4] J. L. Karlsson und H. A. Barker, J. Biol. Chem. *177*, 597 (1949).
[5] J. M. Buchanan und J. C. Sonne, *l. c.*
[6] J. C. Sonne, J. M. Buchanan und A. M. Delluva, J. Biol. Chem. *166*, 395 (1946).
[7] R. Abrams, J. Amer. Chem. Soc. *73*, 1888 (1951).
[8] R. Abrams, E. Hammarsten und D. Shemin, J. Biol. Chem. *173*, 429 (1948).
[9] B. Sutton, F. Schlenk und C. H. Werkmann, Arch. Biochem. *32*, 85 (1951).
[10] D. Shemin und D. Rittenberg, J. Biol. Chem. *167*, 875 (1947).
[11] T. Winning, J. Morning und D. M. Greenberg, J. Biol. Chem. *175*, 127 (1948).
[12] C. Ehrensvärd, E. Sperber, E. Saluste, L. Reich und R. Stjernholm, J. Biol. Chem. *169*, 759 (1947).
[13] W. Sakami, J. Biol. Chem. *176*, 995 (1948).
[14] W. Sakami, J. Biol. Chem. *178*, 519 (1949).
[15] D. Elwyn und D. B. Springson, J. Biol. Chem. *207*, 407 (1954).

rend der Rest wie normales Glycin in 4,5,7-Stellung eingebaut wird.

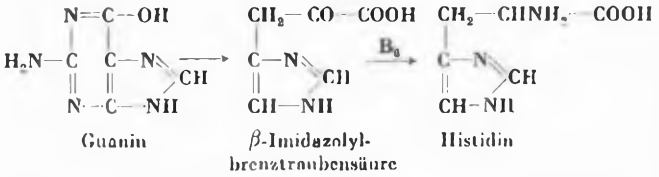
Was die Stickstoffatome des Purinrings anbetrifft, so ist einzig bekannt, daß das N-Atom in 7-Stellung vom Glycin stammt, während die beiden andern schlußendlich von Ammoniak geliefert werden, das von den Aminosäuren in genügender Menge geliefert wird.



Purin

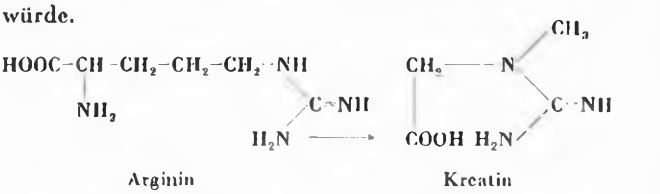
Zwischenprodukte

Weit schwieriger gestaltete sich die Aufklärung der in der Biosynthese der Purine auftretenden Zwischenprodukte. Die Vermutung lag nahe, daß sich der Purinring aus Aminosäuren bildet, in denen mindestens schon eines der beiden Ringsysteme – Pyrimidin- oder Imidazolring – vorgebildet ist. Wohl am einfachsten wäre die Synthese über Histidin zu denken, eine Hypothese, die sich aber nicht bestätigte. BROQUIST und SNELL[16] unternahmen Versuche an einem Stamm von *Streptococcus faecalis*, einem Mikroorganismus, der Histidin und Guanin zum Wachsen benötigt. Fügt man der Nährlösung nur Histidin zu, so bleibt jegliches Wachstum aus, was den Beweis erbringt, daß dieser Mikroorganismus nicht fähig ist, aus Histidin Guanin zu bilden. Umgekehrt ließ sich zeigen, daß *Lactobacillus arabinosus* und *Lactobacillus casei*[16], für die Histidin und Guanin Wachstumsfaktoren sind, die Fähigkeit



besitzen, aus Guanin Histidin zu bilden. Als Zwischenprodukt dieser Umwandlung wurde β-Imidazolylbrenztraubensäure nachgewiesen. Allerdings wird ein Zusatz von Vitamin B_6 benötigt, welcher wahrscheinlich verantwortlich ist für die Transaminierung der Ketosäure.

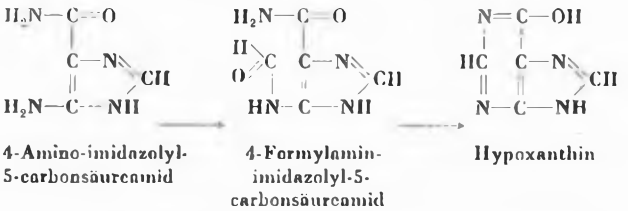
Ebenso falsch erwies sich die Hypothese, daß die Purinbildung über die Stufen Arginin–Kreatin verlaufen würde.



[16] H. P. BROQUIST und E. E. SNELL, J. Biol. Chem. *180*, 59 (1949).

Wohl konnte BLOCH[17] den ersten Schritt, die Umwandlung von Arginin in Kreatin, anhand von Versuchen mit Ratten und Tauben zeigen, doch ergaben Versuche zum Beweis der zweiten Stufe der Purinbildung aus Kreatin ein negatives Resultat. PLENTL und SCHOENHEIMER[18] verabreichten Tauben markierte Guanidoessigsäure, die rasch in Kreatin übergeht, und isolierten anschließend die Purinfraktionen, die aber frei von Isotopen waren.

Es ist bekannt, daß bei der durch die Sulfonamide bewirkten Hemmung von Mikroorganismen die Purinsynthese gestört wird, was zu einer Anreicherung der Vorstufe der Purine führen muß. Aus dieser Überlegung heraus gelang es schließlich, aus Kulturen von *Escherichia coli*, die durch Gegenwart von Sulfonamiden in ihrem Wachstum teilweise gehemmt wurden, einen normalerweise nicht vorhanden Stoff zu isolieren[19]. Das aus diesen Kulturen gewonnene Amin erwies sich identisch mit 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid. Wie anfänglich schon erwähnt, wird Glycin als Ausgangsstoff bei der Purinbildung benötigt. In Übereinstimmung damit stehen die Versuchsergebnisse von SHIVE, EAKIN und RAUOL[20], die zeigen, daß Glycin ein Prekursor von 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid ist.



Die Hypothese, daß 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid eine Zwischenstufe in der Biosynthese der Purine ist, wurde durch Experimente verschiedener anderer Forschergruppen sichergestellt. An durch Gegenwart von Sulfadiazin gehemmten *Escherichia coli* kann mit 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid durch Zugabe von Methionin (als Lieferant des noch fehlenden Kohlenstoffatoms) in Gegenwart katalytischer Mengen von p-Aminobenzoesäure eine Aufhebung der Sulfawirkung erzielt werden[21]. Eine Mutante von *Escherichia coli*, die Adenin zum Gedeihen benötigt, wächst bei Abwesenheit von Adenin weiter, wenn 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid vorhanden ist[22]; dabei zei-

[17] K. BLOCH, J. Biol. Chem. *165*, 469 (1946).

[18] A. PLENTL und R. SCHOENHEIMER, J. Biol. Chem. *153*, 203 (1944).

[19] W. STETTEN und J. J. FOX, J. Biol. Chem. *161*, 333 (1945). W. SHIVE, W. W. ACKERMANN, K. GORDON, M. E. GETZENDANER und R. E. EAKIN, J. Amer. Chem. Soc. *69*, 725 (1947). J. S. GOTS. Arch. Biochem. *29*, 222 (1950). D. M. GREENBERG, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 6307 (1952).

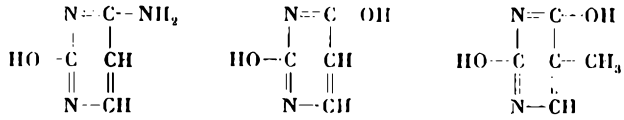
[20] W. SHIVE, R. E. EAKIN und J. M. RAOUL, J. Biol. Chem. *172*, 67 (1948).

[21] R. BEN-ISHAI, B. VOLCANI und E. D. BERGMANN, Experientia *7*, 63 (1951), und J. Biol. Chem. *194*, 521, 531 (1952).

[22] R. BEN-ISHAI, B. VOLCANI und E. D. BERGMANN, Arch. Biochem. *32*, 229 (1951). D. W. WOOLLEY und R. B. PRINGLE, J. Amer. Chem. Soc. *72*, 634 (1950). C. S. MILLER, S. GURIN und D. W. WILSON, J. Amer. Chem. Soc. *74*, 2892 (1952).

gen p-Aminobenzoesäure und Folsäure eine das Wachstum stimulierende Wirkung. Erinnern wir uns an das zuerst über die Ausgangsstoffe der Purinsynthese Gesagte, daß nämlich das Kohlenstoffatom in 2-Stellung aus dem «Formiat» stammt, so steht dies in Übereinstimmung mit den eben erwähnten Versuchen. Auch die mit p-Aminobenzoesäure- bzw. Folsäure-Zusätzen durchgeführten Experimente weisen auf die erwähnte Reaktionsfolge hin, daß 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid zuerst formyliert und dann der Pyrimidinring geschlossen wird.

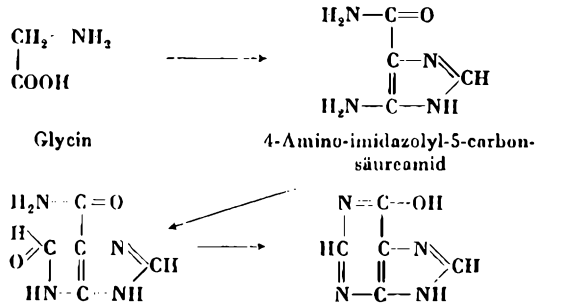
Eine Umwandlung von Pyrimidinen – die wie Cytosin, Uracil, Thymin ebenfalls Bestandteile der Nukleinsäuren



Cytosin Uracil Thymin

sind – in Purine scheint nach dem heutigen Stand der Versuche unwahrscheinlich. HAMMARSTEN, REICHARD und SALUSTE[23] injizierten Ratten markiertes Cytidin und untersuchten die Nukleinsäurefraktionen, wobei in Guanin und in Adenin keine markierten Atome nachgewiesen werden konnten. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß auch umgekehrt keine Umwandlung von Purinen in die drei genannten Pyrimidine stattfindet[24].

Betrachten wir die bis jetzt bekannten Ausgangs- und Zwischenprodukte, so läßt sich folgendes Reaktionsschema aufstellen.



Glycin 4-Amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid

4-Formyl-amino-imidazolyl-5-carbonsäureamid Hypoxanthin

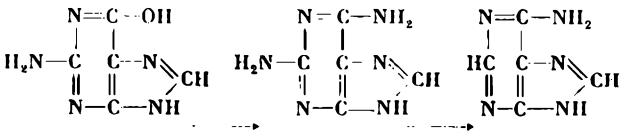
Das Glycin wird durch Kettenverlängerung in ein Serinderivat und durch Amidierung und Formylierung in ein Imidazolderivat verwandelt; aus diesem bildet sich dann durch eine zweite Formylierung das Purinderivat Hypoxanthin, das seinerseits wiederum leicht in die anderen physiologisch wichtigen Purine Xanthin, Guanin und Adenin umgewandelt wird.

[23] E. HAMMARSTEN, R. REICHARD und E. SALUSTE, J. Biol. Chem. *183*, 105 (1950).

[24] G. B. BROWN, P. M. ROLL, A. PLENTL und L. CAVALIERI, J. Biol. Chem. *172*, 469 (1948).

Stoffwechsel- und Abbauprodukte

Der Stoffwechsel und der Abbaumechanismus der Purine soll nur kurz gestreift werden, da die einzelnen Reaktionen zum Teil schon recht lange bekannt sowie einzelne dabei benötigte Enzyme isoliert und charakterisiert[25] worden sind. Die wichtigste Rolle dabei spielt Adenin, welches außer in den Nukleinsäuren als Komponente verschiedener Enzyme, wie z. B. Coenzym I und II, und auch in den pflanzlichen und tierischen Geweben nachweisbar ist. Adenin wird als hauptsächlichstes Ausgangsprodukt für den Aufbau der Nukleinsäuren verwendet[26]. An Ratten wurde gezeigt, daß verfüttertes markiertes Adenin in den Nukleinsäuren der innern Organe sowie in der Adenosintriphosphorsäure der Muskeln wieder nachgewiesen werden kann. Versuche an Ratten[27] mit andern gekennzeichneten Purinen, wie Xanthin oder Hypoxanthin, ergaben, daß diese Körper nicht direkt zur Nukleinsäuresynthese Verwendung finden, vielmehr wurde die Hauptmenge der Isotopen in den Abbauprodukten der Purine nachgewiesen. Auch Guanin[28] kann nur in beschränktem Maße, d.h. über die Zwischenstufe Adenin, als Nukleinsäurepräkursor verwendet werden. Guanin wird, wie BENDICH und BROWN[29] glauben, über 2,6-Diaminopurin in Adenin



Guanin 2,6-Diaminopurin Adenin

verwandelt; sie verfütterten Ratten gezeichnetes 2,6-Diaminopurin und untersuchten anschließend die Nukleinsäuren auf ihren Puringehalt, wobei die Isotopen vor allem im Adenin vorhanden waren. Eine nachfolgende Umwandlung von Adenin in Guanin oder dessen Verbindungen mit Zucker und Phosphorsäure erfolgt, wie an der Ratte mit isotop markiertem Adenin[28] gezeigt wurde, sehr leicht. Auch bei Experimenten mit *Tetrahymena gelii*, das zum Wachsen Guanin benötigt, wurden gleiche Ergebnisse[30] erhalten. Züchtet man die Organismen, deren Purinmetabolismus eingehend studiert wurde[31], mit markiertem Guanin, so wird aus den Nukleinsäuren das Isotope in Guanin und Adenin gefunden.

Je nach Organismus treten als Endprodukte des Purinstoffwechsels Harnsäure, Allantoin oder Harnstoff auf. Der enzymatische Abbau der Nukleinsäuren geht über

[25] Zusammenfassung in Physiol. Rev. *32*, 303 (1952).

[26] G. B. BROWN, P. M. ROLL, A. PLENTL und A. CAVALIERI, *l.c.* G. B. BROWN, H. L. PETERMANN und S. S. FÜRST, J. Biol. Chem. *174*, 1043 (1948).

[27] H. GETLER, P. M. ROLL, J. F. TINKER und G. B. BROWN, J. Biol. Chem. *178*, 259 (1949).

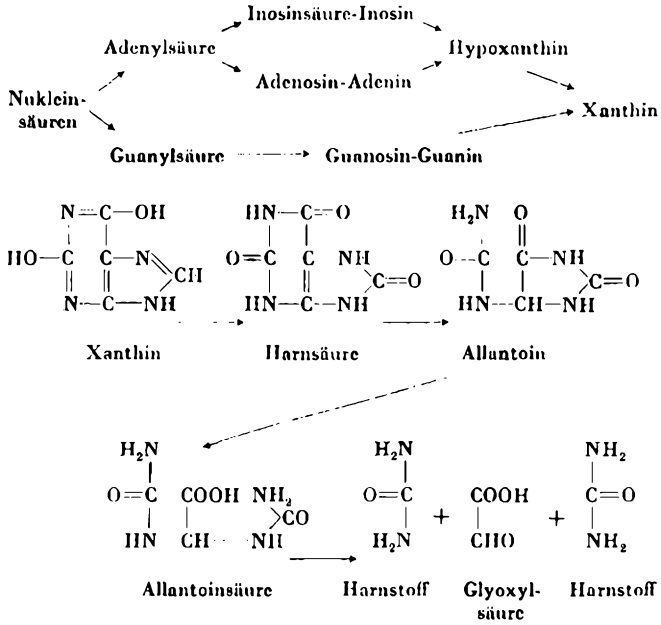
[28] G. B. BROWN, *l.c.*

[29] A. BENDICH und G. B. BROWN, J. Biol. Chem. *176*, 1471 (1948).

[30] M. FLAVIN und S. GRAFF, J. Biol. Chem. *191*, 55 (1951).

[31] G. W. KIDDER, V. C. DEWEY, R. E. PARKS und J. M. HEINRICH, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. *36*, 431 (1950).

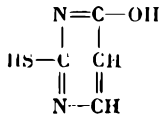
die Tetranukleotide zu den Mononukleotiden Adenylsäure und Guanylsäure. Adenylsäure wird über Inosinsäure-Inosin oder über Adenosin-Adenin in Hypoxanthin übergeführt, Guanylsäure hingegen direkt über Guanosin, Guanin zu Xanthin abgebaut. Beim Menschen

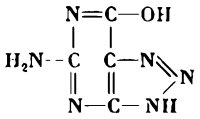


und bei den meisten Säugern wird dieses als Harnsäure ausgeschieden; die Ratte verwandelt Harnsäure noch weiter zu Allantoin; Fische und Amphibien vermögen auch Allantoin über Allantoinsäure in zwei Moleküle Harnstoff zu spalten.

Schlußbetrachtungen

Wie aus den obigen Darlegungen hervorgeht, ist schon heute ein wesentlicher Teil der Biosynthese der Purine bekannt. Es bieten sich somit der Chemotherapie neue Möglichkeiten, zu prüfen, wie in diese Reaktionsfolge eingegriffen werden kann. Bei der großen Bedeutung der Purine und der Nukleinsäuren in bezug auf das pflanzliche und bakterielle Wachstum dürften Antagonisten[32] zu diesen Körpern weite Anwendungsmöglichkeiten besitzen. So wurden bereits gewisse günstige Ergebnisse mit Thiouracil erzielt, das z. B. den Tabakmosaikvirus erheblich zu schädigen vermag. In diesem Zusammenhang sei auch an die Arbeiten von KIDDER[33]


2-Thiouracil


8-Azaguanin

erinnert, der ähnliche Resultate mit 8-Azaguanin erhielt. Diese wenigen Beispiele mögen genügen, um auf die Bedeutung der Aufklärung der Purinsynthese hinzuweisen und die Entwicklungsmöglichkeiten dieses Forschungsgebietes anzudeuten.

[32] E. SHAW und D. W. WOOLLEY, J. Biol. Chem. *189*, 401 (1951), *194*, 641 (1952).

[33] G. W. KIDDER, V. C. DEWEY, R. E. PARKS und G. C. WOODSIDE, Cancer Res. *11*, 2041 (1951).