

## Die Folsäure im Stoffwechsel der Einkohlenstoff-Einheiten

Von Prof. Dr. L. JAENICKE

Chemisches Laboratorium der Universität München, Institut für Biochemie

Das Vitamin Folsäure steht als 5.6.7.8-Tetrahydrofolsäure im Mittelpunkt der Reaktionen des C<sub>1</sub>-Stoffwechsels. An der Äthylendiamin-Gruppierung dieses Cofaktors werden Formiat oder Formaldehyd gebunden („aktivierte Ameisensäure“, „aktivierter Formaldehyd“), ineinander umgewandelt und auf andere Acceptoren übertragen. Bei der Biogenese der Methylgruppe kann Tetrahydrofolsäure intermediär auch den zur Reduktion der Hydroxymethylgruppe notwendigen Wasserstoff liefern. Biogenese der Einkohlenstoff-Einheiten, Transformylierung, Transhydroxymethylierung und Transmethylierung (sofern Folsäure an ihr beteiligt ist) werden besprochen und die Mechanismen dieser Stoffwechselreaktionen diskutiert.

### 1. Einleitung

Die Entdeckung Otto Warburgs<sup>1)</sup>, Richard Kuhns<sup>2)</sup> und Hugo Theorells<sup>3)</sup>, daß Vitamine ihre biologische Funktion als Cofaktoren enzymatischer Reaktionen entfalten, und die durch Untersuchungen Otto Meyerhofs<sup>4)</sup> begründete Erkenntnis, daß synthetische Prozesse im Stoffwechsel durch die Spaltung der Adenosintriphosphorsäure (ATP) betrieben werden, legten den Grund zu neuen Anschauungen in der biochemischen Forschung. Das dadurch gelöste eingehende Studium biochemischer Vorgänge führte zur Aufklärung zahlreicher Mechanismen, nach denen komplexe Moleküle in der Zelle gespalten und synthetisiert werden. Die Vitamin-Cofaktoren binden, aktivieren und übertragen dabei vorgebildete Molekülgruppen, ohne daß diese erst zu kleinsten Bausteinen abgebaut werden, d. h. ohne daß die zu ihrer Synthese bereits aufgewendete Energie<sup>5, 6)</sup> verloren geht.

Einer der interessantesten unter diesen Cofaktoren ist die Pteroylglutaminsäure oder Folsäure, wie sie gemeinhin genannt wird. Sie ist nicht nur wegen ihrer komplizierten Struktur bemerkenswert, sondern vor allem weil sie als Überträger der Einkohlenstoff-Einheit in ihren verschiedenen Oxydationsstufen, d. h. als Formyl-, Hydroxymethyl- und Methyl-Gruppe, wirkt<sup>7)</sup> und dabei vermutlich in enger Beziehung zu einem anderen Vitamin der B-Gruppe, dem Vitamin B<sub>12</sub>, steht. Die Einkohlenstoff-Einheiten treten in Analogie etwa zum Acetat<sup>8)</sup> niemals frei auf, sondern werden am Ort ihrer Bildung vom Träger-Coenzym gebunden, an dem die erforderlichen Umwandlungen stattfinden und das die Einkohlenstoff-Gruppe überträgt<sup>9–11)</sup>.

Es gibt kaum eine zweite Verbindung in der Biochemie, die den Schlüssel zu so vielen Beobachtungen aus der Ernährungslehre, der Pharmakologie und der Chemotherapie bietet, wie die Folsäure.

### 2. Die Folsäure

1931 berichtete Wills<sup>12)</sup>, daß man mit frischer Leber oder Hefe bestimmte Anämieformen ausheilen könne. Von da ab haben zahlreiche Arbeitsgruppen Extrakte von Leber und anderem biologischen Material analysiert, um das aktive Prinzip zu konzentrieren und vom Antiperniciosafaktor (Vitamin B<sub>12</sub>) zu trennen. Die Arbeiten gingen langsam voran, denn die Substanz ließ sich zunächst nur durch umständliche Tierversuche nachweisen. Erst die Beobachtung, daß der Faktor ein höchst wirksamer Wuchsstoff für *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus casei*<sup>13, 14)</sup> ist, bildete die Grundlage für mikrobiologische Tests, mit deren Hilfe dann 1943 die Isolierung gelang<sup>13, 15, 16)</sup>. Die aus dieser Entwicklung resultierende Fülle der Bezeichnungen (Vitamin M<sup>17)</sup>, Faktor U<sup>18)</sup>, B<sub>12</sub>-Faktor<sup>19)</sup>, Norit-Eluatfaktor<sup>20)</sup>, *L. casei*-Faktor<sup>21)</sup>, Folsäure<sup>22)</sup>) machen die frühere Literatur unübersichtlich und kompliziert. Nach der Reindarstellung<sup>18, 23–25)</sup> all dieser Verbindungen konnte ihre gegenseitige Identität bewiesen werden.

<sup>1)</sup> O. Warburg, W. Christian u. A. Griese, *Biochem. Z.* 282, 157 [1935].

<sup>2)</sup> R. Kuhn, H. Rudy u. F. Weygand, *Ber. dtsch. chem. Ges.* 69, 2034 [1936].

<sup>3)</sup> H. Theorell, *Experientia* 13, 2 [1957].

<sup>4)</sup> O. Meyerhof, P. Ohlmeyer u. W. Möhle, *Biochem. Z.* 297, 113 [1938].

<sup>5)</sup> Th. Bücher, *Angew. Chem.* 62, 257 [1950].

<sup>6)</sup> H. Holzer, *Angew. Chem.* 64, 248 [1952].

<sup>7)</sup> A. D. Welch u. C. A. Nichol, *Annu. Rev. Biochem.* 21, 633 [1952].

<sup>8)</sup> L. Jaenicke u. F. Lynen in *Boyer-Lardy-Myrbäck: The Enzymes*, Academic Press, New York 1960, Bd. III, S. 11.

<sup>9)</sup> H. M. Rauen u. L. Jaenicke, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 293, 46 [1953].

<sup>10)</sup> F. M. Huennekens u. M. J. Osborn, *Adv. Enzymology* 21, 369 [1959].

<sup>11)</sup> J. M. Buchanan u. S. C. Hartman, *Adv. Enzymology* 21, 199 [1959].

<sup>12)</sup> L. Wills, M. A. Contab u. B. S. Lond, *Brit. med. J.* 1, 1059 [1931].

<sup>13)</sup> E. L. R. Stokstad, in *Sebrell-Harris: The Vitamins*, Academic Press, New York 1954, Bd. III, S. 87.

<sup>14)</sup> T. H. Jukes u. E. L. R. Stokstad, *Physiol. Rev.* 28, 51 [1954].

<sup>15)</sup> B. L. Hutchings, E. L. R. Stokstad, N. Bohonos, N. H. Sloane u. Y. SubbaRow, *J. Amer. chem. Soc.* 70, 1 [1948].

<sup>16)</sup> E. L. R. Stokstad, B. L. Hutchings u. Y. SubbaRow, *J. Amer. chem. Soc.* 70, 3 [1948].

<sup>17)</sup> P. L. Day, W. C. Langston u. W. J. Darby, *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.* 38, 860 [1938].

<sup>18)</sup> E. L. R. Stokstad u. P. D. V. Manning, *J. biol. Chemistry* 125, 687 [1938].

<sup>19)</sup> A. G. Hogan u. E. M. Parrott, *J. biol. Chemistry* 128, XLVI [1939].

<sup>20)</sup> E. E. Snell u. W. H. Peterson, *J. Bacteriol.* 39, 273 [1940].

<sup>21)</sup> E. L. R. Stokstad, *J. biol. Chemistry* 139, 475 [1941].

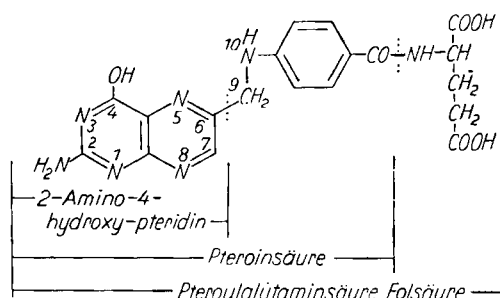
<sup>22)</sup> H. K. Michell, E. E. Snell u. R. J. Williams, *J. Amer. chem. Soc.* 63, 2284 [1941].

<sup>23)</sup> J. J. Pfaffner, S. B. Binkley, E. S. Bloom, R. A. Brown, O. D. Bird, A. D. Emmett, A. G. Hogan u. B. L. O'Dell, *Science* [Washington] 97, 404 [1943].

<sup>24)</sup> J. J. Pfaffner, S. B. Binkley, E. S. Bloom u. B. L. O'Dell, *J. Amer. chem. Soc.* 69, 1476 [1947].

<sup>25)</sup> E. L. R. Stokstad, *J. biol. Chemistry* 149, 573 [1943].

Die Aufklärung der chemischen Konstitution folgte fast unmittelbar<sup>26)</sup>, denn bereits während der Reinigung hatte man Anhaltspunkte für verschiedene Gruppierungen im Molekül erhalten. Folsäure besteht aus Glutaminsäure, p-Aminobenzoesäure und einem Pteridin, die in der gezeigten Weise miteinander verknüpft sind. Der systematische Name für Folsäure ist also {[2-Amino-4-hydroxy-6-pteridyl)-methyl]-p-aminobenzoyl}-L-glutaminsäure.



In allen natürlichen Quellen kommt das Vitamin nur höchst verdünnt vor, und seine Gewinnung ist ein langwieriges Verfahren, das zumeist auf den Methoden der Adsorption, Elution und Chromatographie beruht. Die Synthese des komplexen Moleküls durch Kondensation eines entsprechend substituierten Diaminopyrimidins mit einem reaktionsfähigen Dreikohlenstoff-Körper und p-Aminobenzoyl-glutaminsäure (vgl. <sup>13)</sup>) macht die Substanz relativ einfach zugänglich.

Folsäure ist gelb, lichtempfindlich und kristallin, bei  $p_H = 5,5$  praktisch unlöslich in Wasser, aber löslich in Alkalien und Säuren. Ihr UV-Spektrum läßt sowohl die Banden der Pterine bei 260 und 360  $m\mu$  als auch die der p-Aminobenzoesäure bei 280  $m\mu$  erkennen (Abb. 1).

Wie bei anderen Vitaminen fand man bald, daß neben der Stammverbindung noch andere Wirkformen in der

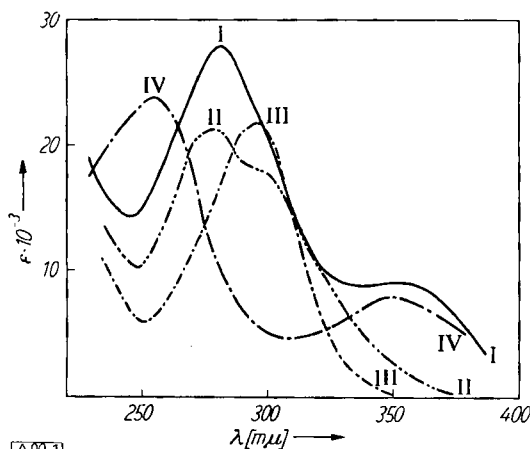


Abb. 1. Spektren von Folsäure und ihren Derivaten (alle Spektren bei  $p_H = 8$ )

(I) = Folsäure; (II) = Dihydrofolsäure; (III) = Tetrahydrofolsäure; (IV) = N(10)-Formylfolsäure

<sup>26)</sup> E. L. R. Stokstad, B. L. Hutchings, J. H. Mowat, J. H. Boothe, C. W. Waller, R. B. Angier, J. Semb u. Y. SubbaRow, J. Amer. chem. Soc. 70, 5 [1948].

Verbindung	Wirksamkeit bei			
	<i>S. faecalis</i> R (Folsäure = 100)	<i>L. casei</i> (Folsäure = 100)	<i>L. citrovorum</i> (Citrovorum- faktor = 100)	Huhn (Folsäure = 100)
Pteroyl-glutaminsäure . . . .	100	100	0,00025	100
Pteroyl-triglutaminsäure . . .	7,5	80	—	100 (o, p)
Pteroyl-heptaglutaminsäure	0,3	0,2	—	100 (o, p)
10-Formyl-pterinsäure (Rhizopterin)	125	sehr niedrig	—	sehr niedrig
10-Formyl-folsäure . . . . .	50	50	—	—
Leucovorin (synthet. Citrovorum-faktor	50	50	150	20 (o), 50 (p)
L(-)-Citrovorumfaktor . . . .	100	—	100	100 (o)
Anhydro-leucovorin A . . . .	50	50	0,12	70 (o, p)
10-Nitroso-leucovorin . . . . .	—	—	10	—
Tetrahydro-folsäure (unrein)	—	—	1,2	—

(o) = oral, (p) = parenteral

Tabelle 1. Vergleich der biologischen Wirksamkeit einiger Folsäure-Derivate <sup>29)</sup>

Natur vorkommen. Von diesen wurden einige charakterisiert. Sie enthalten einen, zwei oder sogar sechs zusätzliche Glutaminsäure-Reste, die peptidartig mit der  $\gamma$ -Carboxylgruppe der Pteroylglutaminsäure verknüpft sind. Diese Konjugate<sup>15, 27)</sup> (Diophterin, Teropterin, B<sub>12</sub>-Konjugat) besitzen einen unterschiedlichen biologischen Wirkungsgrad (Tabelle 1).

In zellfreien Enzymsystemen ist das Triglutamat des Coenzym im allgemeinen aktiv. In der folgenden Diskussion über die biologischen Funktionen der Folsäure wollen wir auf diese Konjugate aber keine Rücksicht nehmen, zumal fast alle in-vitro-Untersuchungen mit dem Monoglutamat ausgeführt wurden.

### 3. Derivate der Folsäure

#### a) Rhizopterin

Das erste formylierte Folsäure-Derivat, das isoliert und durch das die Aufmerksamkeit auf die Beziehungen zwischen der Folsäure und dem Stoffwechsel der Ameisensäure gelenkt wurde, war das Rhizopterin<sup>28)</sup>, N(10)-Formylpterinsäure<sup>30)</sup>. Man erhielt es aus dem Kulturmedium des Pilzes *Rhizopus nigricans*. Es ist Wachstoffsstoff für *S. faecalis* R, aber nicht für *L. casei* oder für Tiere. Seine Synthese gab Anlaß zu einer richtungsweisenden Hypothese über die Funktion der Folsäure-Derivate als Formiat-Überträger<sup>31)</sup>.

#### b) Citrovorumfaktor

1948 gaben Sauberlich und Baumann bekannt<sup>32)</sup>, daß eine folsäure-artige Verbindung für das Wachstum von *L. citrovorum* 8081 (*Pediococcus cerevisiae*) notwendig ist. Dieser „Citrovorumfaktor“ (folinic acid) konnte teilweise durch überaus große Mengen von Folsäure ersetzt werden, Er ist bei Mikroorganismen, ähnlich wie Rhizopterin, auch in Gegenwart von Folsäure-Antimetaboliten als Vitamin wirksam. Man schloß daraus, daß der Citrovorumfaktor ein funktionelles Derivat der Folsäure sei. Gleichzeitig mit seiner Isolierung aus Pferdeleber wurde seine Struktur durch Synthese und Abbau als N(5)-Formyl-tetrahydro-

<sup>27)</sup> J. J. Pfaffner, D. G. Calkins, B. L. O'Dell, E. S. Bloom, R. A. Brown, C. J. Campbell u. O. D. Bird, Science [Washington] 102, 228 [1945].

<sup>28)</sup> T. H. Jukes in D. Glick: Methods of Biochemical Analysis, Interscience Publishers, New York 1955, Bd. 11, S. 121.

<sup>29)</sup> E. L. Rickes, L. Chaiet u. J. C. Keresztesy, J. Amer. chem. Soc. 69, 2749 [1947].

<sup>30)</sup> D. E. Wolf, R. C. Anderson, E. A. Kaczka, S. A. Harris, G. E. Arth, P. L. Southwick, R. Mazingo u. K. Folkers, J. Amer. chem. Soc. 69, 2753 [1947].

<sup>31)</sup> M. Gordon, J. M. Ravel, R. E. Eakin u. W. Shive, J. Amer. chem. Soc. 70, 878 [1948].

<sup>32)</sup> H. E. Sauberlich u. C. A. Baumann, J. biol. Chemistry 176, 165 [1948].

folsäure<sup>33, 34</sup>) (VI) erkannt. Wie Folsäure kann der Citrovorumfaktor in Form von Konjugaten vorkommen.

### c) N(10)-formyl-folsäure

Durch Einwirkung starker Ameisensäure oder von Ameisensäure-Essigsäureanhydrid<sup>35</sup>) auf Folsäure erhält man N(10)-Formyl-folsäure<sup>30</sup>) (II), eine Reaktion, die bei starker Verdünnung auch enzymatisch durch Pferde-<sup>36</sup>) und Schweineleber-Homogenate<sup>9, 37</sup>) katalysiert werden kann. Analog entsteht aus Pteroinsäure N(10)-Formylpterinsäure, Rhizopterin.

### d) Dihydro- und Tetrahydrofolsäure

Die Reduktion von Folsäure mit Wasserstoff/Platinosyd in Eisessig führt über die 7.8-Dihydro- zur 5.6.7.8-Tetrahydrofolsäure<sup>39</sup>) (III). Man erhält sie aus dem Hydrieransatz nach Aufnahme von 2 Mol H<sub>2</sub> durch Fällen mit Äther als hellcremefarbenes Produkt<sup>36, 39</sup>). Ihr Absorptionsmaximum bei 298 mμ<sup>40</sup>) verschiebt sich durch Autoxydation sehr rasch nach 282 mμ, dem Maximum der Dihydrofolsäure. Tetrahydrofolsäure läßt sich auch durch zweistufige Reduktion mit Dithionit<sup>41</sup>) und Borhydrid darstellen. Synthetische Tetrahydrofolsäure ist das Racemat an C(6) und daher biologisch nur halb so aktiv wie das natürliche Produkt, das durch enzymatische Reduktion von Folsäure mit reduziertem Triphosphopyridinnucleotid (TPNH) und Folsäure-Reduktase<sup>41, 41a</sup>) entsteht. Durch Reduktionsmittel (Ascorbinsäure, Dimercaptopropanol, Cystein, KBH<sub>4</sub>) oder Komplexon wird Tetrahydrofolsäure stabilisiert und ihre Autoxydation verlangsamt<sup>39, 42</sup>).

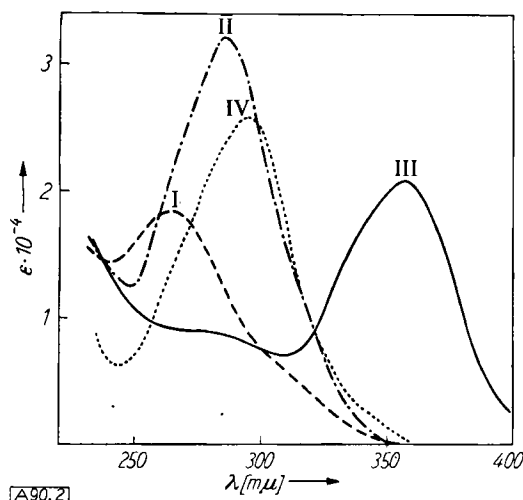


Abb. 2. Spektren von Folsäure-Derivaten (III) bei pH = 2, alle übrigen bei pH = 8)

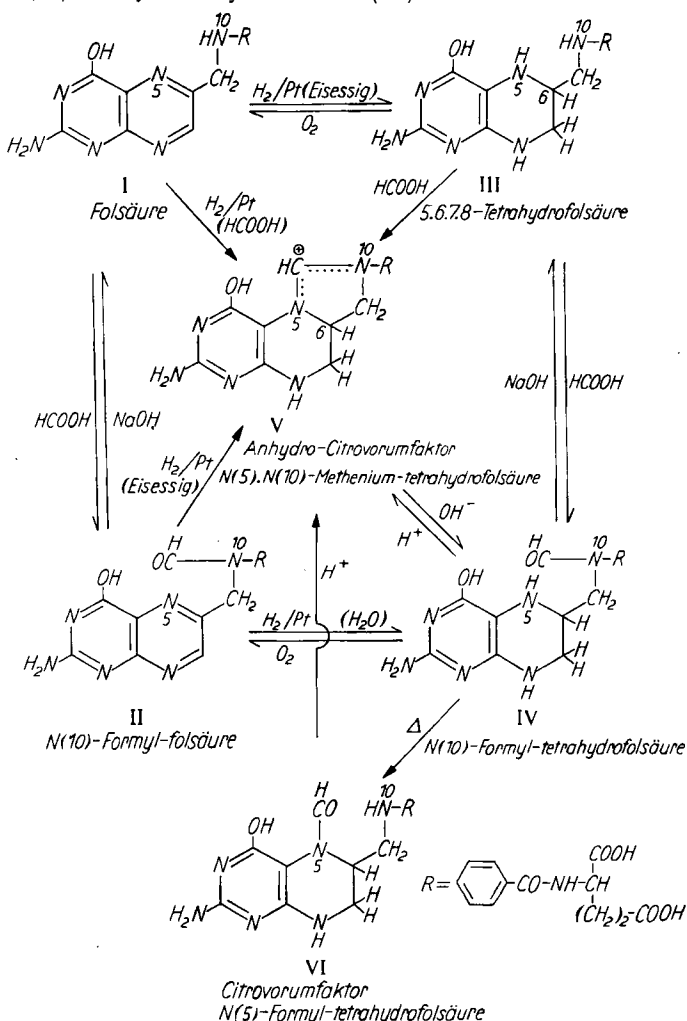
(I) = N(10)Formyl-tetrahydrofolsäure; (II) = N(5)-Formyl-tetrahydrofolsäure (Leucovorin); (III) = N(5).N(10)-Methenium-tetrahydrofolsäure (Anhydroleucovorin); (IV) = N(5).N(10)-Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure

- <sup>33</sup>) E. H. Flynn, T. J. Bond, T. J. Bardos u. W. Shive, J. Amer. chem. Soc. 73, 1979 [1951].  
<sup>34</sup>) B. Roth, M. E. Hultquist, M. J. Fahrenbach, D. B. Cosulich, H. P. Broquist, J. A. Brockman jr., J. M. Smith jr., R. P. Parker, E. L. R. Stokstad u. T. H. Jukes, J. Amer. chem. Soc. 74, 3247 [1952].  
<sup>35</sup>) L. Jaenicke u. G. R. Greenberg, unveröffentl.  
<sup>36</sup>) M. Silverman, J. C. Keresztesy u. G. J. Koval, J. biol. Chemistry 211, 53 [1954].  
<sup>37</sup>) L. Jaenicke, Habilitationsschrift, Universität Marburg 1954.  
<sup>38</sup>) B. L. O'Dell, J. M. Vandenbelt, E. S. Bloom u. J. J. Pfaffner, J. Amer. chem. Soc. 69, 250 [1947].  
<sup>39</sup>) G. R. Greenberg u. L. Jaenicke in Wolstenholme-O'Connor: The Chemistry and Biology of Purines, Churchill, London 1957, S. 204.  
<sup>40</sup>) Y. Hatefi, P. T. Talbert, M. J. Osborn u. F. M. Huennekens, in: Biochemical Preparations, J. Wiley & Sons, New York 1960, Bd. VII, S. 89.  
<sup>41</sup>) S. Futterman, J. biol. Chemistry 228, 1031 [1957].  
<sup>41a</sup>) F. M. Huennekens u. M. J. Osborn in Umbreit-Molitor: Vitamin Metabolism, Pergamon Press, London 1960, S. 112.  
<sup>42</sup>) R. L. Blakley, Biochem. J. 74, 71 [1960].

Sonst geht sie rasch über Dihydro-folsäure und ein gelbes, nicht identifiziertes Produkt, dem wir die Struktur eines Dihydropteridyl-6-carbinols zuschreiben, in Xanthopterin, Formaldehyd (aus C(9)) und eine stöchiometrische Menge p-Aminobenzoesäure über; daneben entstehen kleinere Mengen Pteridincarbonsäure und Pteridinaldehyd. Diese in ihrem Chemismus (vgl. auch <sup>43</sup>)) noch ungeklärte Spaltung kann auch zur Bestimmung der Tetrahydrofolsäure herangezogen werden<sup>44</sup>). Empfindlicher und auch im Reaktionsgemisch direkt anzuwenden ist die spektrophotometrische Messung der Änderungen im UV-Bereich bei Übertragungs- und Oxydations-Reaktionen (Abb. 1 und 2). Man verfolgt am besten die Änderung der optischen Dichte beim Absorptionsmaximum der Tetrahydrofolsäure, d. h. bei 298 mμ<sup>10</sup>).

### e) N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure und Anhydrocitrovorumfaktor

Bei der Reduktion von Folsäure (I) in Ameisensäure, oder von N(10)-Formyl-folsäure (II) in Eisessig erhält man N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure<sup>40</sup>) (IV). Zuerst bildet sich aber eine betain-artige Verbindung, in der die N-Atome 5 und 10 durch eine Methin-Gruppe verknüpft sind. Dieses Imidazoliniumsalz wird als Anhydroformyl-tetrahydrofolsäure oder Anhydrocitrovorumfaktor (ACF) (V)<sup>44, 45</sup>) bezeichnet. Es fluoresziert stark und besitzt ein hohes Absorptionsmaximum bei 355 mμ. Dies zeigt, daß die Elektronen des Pyrimidin- und Benzol-Ringes über die planare Imidazolinium-Struktur in Mesomerie treten können. (V) geht in schwach alkalischer Lösung in die offene N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure (IV) über. Beim Stehen



Scheme 1. Formylierte Tetrahydrofolsäure-Verbindungen

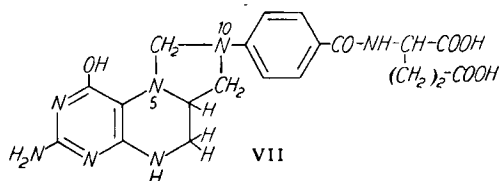
- <sup>43</sup>) F. Weygand, A. Wacker u. V. Schmied-Kowarzik, Experientia 4, 427 [1948].  
<sup>44</sup>) M. May, T. J. Bardos, F. L. Barger, M. Lansford, J. M. Ravel, G. L. Sutherland u. W. Shive, J. Amer. chem. Soc. 73, 3067 [1951].  
<sup>45</sup>) D. B. Cosulich, B. Roth, J. M. Smith jr., M. E. Hultquist u. R. P. Parker, J. Amer. chem. Soc. 74, 3252 [1952].

neutraler Lösungen von (IV) unter anaeroben Bedingungen, besonders bei erhöhter Temperatur, wandert die Formyl-Gruppe vom N(10) zum basischeren N(5)<sup>46)</sup>. Das Produkt (VI) ist bis auf die Konfiguration an C(6) mit dem aus natürlichem Material isolierten Citrovorumfaktor<sup>32, 39)</sup> identisch: VI ist das Racemat, natürlicher Citrovorumfaktor ist die L-(–)-Form.

N,N'-Diaryl-äthylendiamine<sup>44, 47, 48)</sup> als Modelle (vgl. Abschnitt 10) lassen sich in gleicher Weise formylieren. Die Monoformyl-Verbindungen sind in jeder Beziehung, z. B. Säurelabilität, Alkalistabilität der N(10)-Formyltetrahydrofolsäure ähnlich. In Säure erhält man die Imidazolium-Verbindungen. Diese Analoga der Anhydroformyltetrahydrofolsäure sind ebenfalls durch ein langwelliges Absorptionsmaximum ausgezeichnet und stehen in einem pH-abhängigen Gleichgewicht mit der N-Formyl-Form.

#### f) Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure

Die Reaktion von Tetrahydrofolsäure mit überschüssigem Formaldehyd im schwach sauren Medium ( $p_H = 6$ ) gibt neben anderen Kondensationsprodukten Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure (VII), die sich chromatographisch abtrennen läßt<sup>39, 42, 49–51)</sup>. Die Kondensation kann spektrophotometrisch bei 295 m $\mu$  (vgl. Abb. 2) verfolgt werden. Die Beständigkeit gegen Luftoxydation, die elektrometrische Titration, die Stabilität der Formaldehyd-Bindung<sup>50, 52)</sup> (Formaldehyd kann nur auf stark C-H-acide Acceptoren wie Dimedon oder Acylaminomalonsäure übertragen werden), nicht zuletzt die Synthese durch Reduktion von Hydroxymethylfolsäure beweisen, daß sowohl N(5) als auch N(10) an der Bindung des Formaldehyds teilnehmen.



Die Verbindung kann daher als substituiertes Imidazolidin-Derivat betrachtet werden (= N(5).N(10)-Methylentetrahydrofolsäure), was sich durch Modelluntersuchungen an substituierten N,N'-Diaryl-imidazolidinen bestätigen ließ<sup>47, 48)</sup> (vgl. Abschnitt 10a).

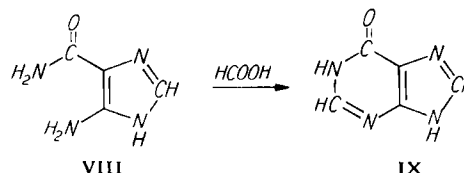
### 4. Die biologische Rolle der Folsäure

#### a) Vorgeschichte

Seit der Entdeckung der Folsäure sind noch keine 15 Jahre vergangen, aber eine überaus große Zahl von Arbeiten und Vermutungen ist seitdem der Funktion dieses Vitamins gewidmet worden<sup>7, 9–11, 53)</sup>. Auf die Stoffwechselbeziehungen zwischen Ameisensäure oder Formaldehyd und den verschiedenen Donatoren und Acceptoren der Formyl- und Hydroxymethyl-Gruppe wurde man zunächst durch Isotopenversuche am lebenden Organismus aufmerksam: <sup>14</sup>C-Formiat ist eine wirksame Vorstufe des  $\beta$ -Kohlenstoffs im Serin<sup>54)</sup>, der Kohlenstoffatome 2 und 8 in den Purinen<sup>39, 55–59)</sup> und des Amidin-Kohlenstoffs (C–2) im Histi-

din<sup>60)</sup>. Überdies stehen alle diese C-Atome miteinander im Stoffwechselgleichgewicht<sup>61, 62)</sup>. Formaldehyd wird im Stoffwechsel ebenso verwertet wie Formiat, und die beiden C<sub>1</sub>-Verbindungen tauschen nicht nur miteinander, sondern auch mit der Methyl-Gruppe des Methionins oder Thymins<sup>63)</sup> rasch aus. Die beobachteten Umwandlungen verlaufen offenbar über aktivierte Zwischenverbindungen, denn Formaldehyd wird zwar besser als Formiat in die CH<sub>2</sub>OH-Gruppe von Serin aufgenommen, ein großes Reservoir von freiem Formaldehyd vermindert aber den enzymatischen Einbau von Formiat nicht wesentlich<sup>64, 65)</sup>. Man bezeichnete das für diese Reaktionen angenommene gemeinsame C<sub>1</sub>-Bruchstück – zunächst ohne Kenntnis seiner chemischen Natur – als „aktivierte Ameisensäure“<sup>9)</sup>.

Die Beziehungen zwischen dem Stoffwechsel der Ameisensäure und Derivaten der Folsäure ließen Gordon<sup>31)</sup> und Mitarbeiter bereits 1948 postulieren, daß die Folsäure an biologischen Transformierungen beteiligt sei und in einer Coenzymform als Träger der Einkohlenstoffgruppe diene.



Die Isolierung natürlich vorkommender formylierter Folsäure-Derivate, nämlich des Rhizopterins und Citrovorumfaktors, gaben dieser Hypothese neuen Auftrieb. Aus der Kulturflüssigkeit von sulfonamid-gehemmten *Coli*-Bakterien wurde ein diazotierbares Amin<sup>66, 67)</sup> isoliert, das sich als 4(5)-Amino-imidazol-5(4)-carbonsäureamid (VIII), also als ein Purin minus einem Kohlenstoff-Atom erwies, und das durch Ameisensäure in das Purin Hypoxanthin (IX) umgewandelt werden konnte<sup>58, 59, 68)</sup>. Wooley und Pringle<sup>69)</sup> beobachteten, daß sich die Verbindung (VIII) auch unter der Wirkung von Folsäure-Antagonisten anhäuft.

Kurz darauf konnte in vivo die Umwandlung von Folsäure in Formylfolsäure<sup>9)</sup> und in Citrovorumfaktor<sup>39, 45)</sup> nachgewiesen werden. Zusammen mit der Beobachtung, daß letzterer eine Aminopterin-Hemmung im mikrobiologischen Test viel wirksamer aufhebt als Folsäure selbst<sup>13)</sup>, verleitete dies zu der Annahme, daß Citrovorumfaktor bereits die „aktivierte Ameisensäure“ sei.

Unklar blieb, wie sich die folsäure-abhängigen Transhydroxymethylierungen erklären lassen sollten. Sprinson<sup>61, 62)</sup> hatte beobachtet, daß die Umwandlung des  $\beta$ -Kohlenstoffs des Serins in die Methyl-Gruppen von Cholin und Thymin zwar folsäure-abhängig ist, aber nicht über eine Formiatstufe verläuft: Versuche mit Deuterium bewiesen, daß bei dieser Umwandlung zwei Wasserstoff-Atome den Kohlenstoff begleiten, was bei einer intermediären Oxydation zu „aktiver Ameisensäure“ unmöglich wäre.

<sup>46)</sup> L. Jaenicke u. E. Brode, unveröffentl.

<sup>47)</sup> L. Jaenicke u. E. Brode, Liebigs Ann. Chem. 624, 120 [1959]; vgl. Angew. Chem. 71, 380 [1959].

<sup>48)</sup> E. Brode, Diplomarbeit, Universität Marburg 1959.

<sup>49)</sup> R. L. Kisluk, J. biol. Chemistry 227, 805 [1957].

<sup>50)</sup> L. Jaenicke, Fed. Proc. 15, 281 [1956]; vgl. Angew. Chem. 70, 82 [1957].

<sup>51)</sup> R. L. Blakley, Biochim. biophysica Acta 23, 654 [1957].

<sup>52)</sup> R. L. Blakley, Biochem. J. 72, 707 [1959].

<sup>53)</sup> B. E. Wright, in Umbreit-Mollitor: Vitamin Metabolism. Pergamon Press, London 1960, S. 87.

<sup>54)</sup> W. Sakami in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism, The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 658.

<sup>55)</sup> G. R. Greenberg, Fed. Proc. 13, 745 [1954].

<sup>56)</sup> J. M. Buchanan, J. G. Flaks, S. C. Hartman, B. Levenberg, L. Lukens u. L. Warren in Wolstenholme-O'Connor: Chemistry and Biology of Purines. Churchill, London 1957, S. 204.

<sup>57)</sup> J. M. Buchanan, B. Levenberg, J. G. Flaks u. J. A. Gladner in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 743.

<sup>58)</sup> D. A. Goldthwait, R. A. Peabody u. G. R. Greenberg, ebenda, S. 765.

<sup>59)</sup> D. A. Goldthwait u. G. R. Greenberg in Colowick-Kaplan: Methods in Enzymology. Academic Press, New York 1955, Bd. 11, S. 504.

<sup>60)</sup> C. Mitoma u. E. E. Snell, Proc. nat. Acad. Sci. USA 41, 891 [1955].

<sup>61)</sup> D. B. Sprinson in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 608.

<sup>62)</sup> D. Elwyn, A. Weisbach u. D. B. Sprinson, J. Amer. chem. Soc. 73, 5509 [1951].

<sup>63)</sup> D. Elwyn u. D. B. Sprinson, J. Amer. chem. Soc. 72, 3317 [1950]; J. biol. Chemistry 184, 465 [1950].

<sup>64)</sup> C. Mitoma u. D. M. Greenberg, J. biol. Chemistry 196, 599 [1952].

<sup>65)</sup> W. Shive, Ann. N. Y. Acad. Sci. 52, 1212 [1950].

<sup>66)</sup> W. Shive, Fed. Proc. 12, 639 [1953].

<sup>67)</sup> M. R. Stetten u. C. R. Fox Jr., J. biol. Chemistry 161, 333 [1945].

<sup>68)</sup> G. R. Greenberg, Fed. Proc. 12, 651 [1953].

<sup>69)</sup> D. W. Wooley u. R. B. Pringle, J. Amer. chem. Soc. 72, 634 [1950].

Außerdem geht Formaldehyd in die Purin-Kohlenstoffe 2 und 8 ein, ohne das Formiat-Reservoir zu durchlaufen. Welch und Nichol<sup>7)</sup> postulierten daher neben der folsäuregebundenen Ameisensäure, einen „aktivierten Formaldehyd“, der dann auch wesentlich später direkt nachgewiesen werden konnte (s. u.).

#### b) Die „aktivierte Ameisensäure“

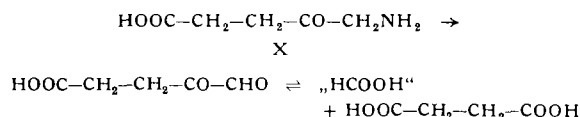
Zur Beantwortung der Frage nach der chemischen Natur der „aktivierten Ameisensäure“<sup>(9,39)</sup> haben Untersuchungen über den Stoffwechsel des Serins und über die Biosynthese der Purine den wesentlichen Beitrag geliefert. G. R. Greenberg<sup>70)</sup> fand, daß die enzymatischen Formylierungen im Verlauf der Biosynthese der Purine nur vor sich gehen, wenn ATP als Energiequelle und ein hitzestabiler Cofaktor vorhanden sind, der sich als Tetrahydrofolsäure-Derivat erwies. Erst die Kombination ATP + Tetrahydrofolsäure + Formiat gibt im biologischen System die Reaktionen der „aktivierten Ameisensäure“<sup>(37)</sup>. Gleichzeitig konnten wir zeigen, daß mit Tetrahydrofolsäure inkubierte Zellextrakte in Abwesenheit eines anderen biologischen Formiat-Acceptors eine formylierte Tetrahydrofolsäure anhäufen<sup>(37,71)</sup>. In weiteren Arbeiten gelang es dann, aus biologischem Material „aktives Formiat“ zu isolieren und es als N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure<sup>(39,71)</sup> zu charakterisieren. Schließlich beobachtete Buchanan<sup>11,56,57,72)</sup>, daß Formiat in einem Taubenlebersystem rasch mit dem C(2) der Inosinsäure austauscht und daß diese Reaktion durch Citrovorumfaktor(N(5)-Formyl-tetrahydrofolsäure) beschleunigt wird. Die „Inosinsäure-Transformylase“ war das erste teilweise gereinigte Enzymsystem, in dem die Funktion eines Folsäure-Derivates als Formiat-Überträger klar gezeigt werden konnte<sup>(57,73,74)</sup>.

### 5. Biogenese der „aktivierten Ameisensäure“

Die Einkohlenstoff-Einheit auf der Oxydationsstufe der Ameisensäure kann aus Heterocyclen, durch oxydative Spaltung von Glycin oder durch Aktivierung von freiem Formiat entstehen. Ein weiterer Weg ist die Oxydation des „aktivierten Formaldehyds“ (s. Abschnitt 8).

#### a) Oxydative Spaltung von Glycin

Für die Bildung des C<sub>1</sub>-Bruchstückes aus Glycin sind bisher zwei Wege bekannt: der δ-Kohlenstoff der δ-Aminolävulinsäure<sup>(75,76)</sup>, die in einer pyridoxalphosphat-abhängigen Reaktion aus Glycin und Succinyl-CoA gebildet wird, steht mit dem Formiat-Reservoir der Zelle im Gleichgewicht. Vermutlich entsteht aus δ-Aminolävulinsäure (X) durch oxydative Desaminierung α-Ketoglutaraldehyd, der, in gewissem Umfang sogar reversibel, zu „aktivem Formiat“ und Succinat gespalten wird.



Das Cofaktor-Bedürfnis dieser Reaktion ist noch unbekannt.

<sup>70)</sup> G. R. Greenberg, J. Amer. chem. Soc. 76, 1458 [1954]; Fed. Proc. 13, 221 [1954].

<sup>71)</sup> L. Jaenicke, Biochim. biophysica Acta 17, 588 [1955].

<sup>72)</sup> J. M. Buchanan u. M. P. Schulman, J. biol. Chemistry 202, 241 [1953].

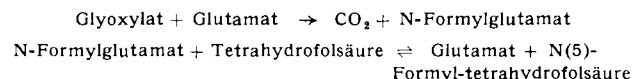
<sup>73)</sup> J. G. Flaks, L. Warren u. J. M. Buchanan, J. biol. Chemistry 228, 215 [1957].

<sup>74)</sup> L. Warren, J. G. Flaks u. J. M. Buchanan, J. biol. Chemistry 229, 613 [1957].

<sup>75)</sup> D. Shemin in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 727.

<sup>76)</sup> I. Welliky u. D. Shemin, Fed. Proc. 16, 268 [1957].

Der zweite Weg ist die Formiat-Bildung über Glyoxylsäure<sup>(77)</sup>: Glycin wird durch Transaminierung oder oxydative Desaminierung in Glyoxylat umgewandelt. Dieses kann dann oxydativ in „aktives Formiat“ und CO<sub>2</sub> gespalten werden<sup>(78)</sup>. Das löslich gemachte mitochondriale Enzym, das diese Reaktion katalysiert, benötigt DPN, Thiamin-pyrophosphat, Mn<sup>2+</sup> und Glutamat<sup>(79)</sup>. N-Formylglutamat und CO<sub>2</sub> konnten isoliert werden, weswegen man als Zwischenstufe N-Glyoxylglutamat postuliert. Da Silverman<sup>(80)</sup> ein Enzym anreichern konnte, das Formylglutamat aus Citrovorumfaktor und Glutamat bildet, ließe sich eine Reaktionsfolge konstruieren, die zum Citrovorumfaktor führt:

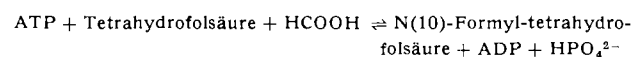


Auch bei der Spaltung von Oxalat in CO<sub>2</sub> und HCOOH durch manche Bakterien scheint „aktives Formiat“ gebildet zu werden<sup>(81)</sup>.

#### b) Aktivierung freien Formiates

Die Aktivierung freien Formiates, d. h. seine Umwandlung in ein Formyl-Derivat der Tetrahydrofolsäure wurde zuerst von G. R. Greenberg<sup>(70,82)</sup> im Taubenlebersystem und von Jaenicke<sup>(37)</sup> in Schweineleberextrakten beobachtet. Das Enzym Tetrahydrofolat-Formylase<sup>(39,82)</sup> wurde dann von Rabinowitz und Pricer<sup>(83)</sup> aus *C. cylindrosporum* als erstes Folsäure-Enzym kristallisiert<sup>(84)</sup>.

Tetrahydrofolat-Formylase katalysiert folgende, reversible, ATP-abhängige Reaktion<sup>(39,85)</sup>:



Das Gleichgewicht liegt weit auf der rechten Seite. Die Reversibilität der Reaktion konnte durch Abfangen des ATP mit dem Hexokinase-System bewiesen werden<sup>(89,86)</sup>.

Das Enzym eignet sich wegen seiner günstigen kinetischen Konstanten auch zur Bestimmung der Reaktionspartner<sup>(59,83,87)</sup>. Der Vergleich der Michaelis-Konstanten verschiedener Tetrahydrofolat-Formylasen (Tabelle 2) zeigt für alle Substrate, mit Ausnahme der Ameisensäure, große Ähnlichkeit.

Der Mechanismus der Tetrahydrofolat-Formylase-Reaktion ist durch Untersuchungen von Whiteley<sup>(88)</sup>, Rabinowitz

	Enzym aus		
	<i>C. cylindrosporum</i>	<i>M. aerogenes</i> <sup>88)</sup>	Schaf <sup>86)</sup>
Formiat .....	1,7	25	1,7
ATP .....	0,22	0,11	0,14
Tetrahydrofolsäure .	0,25	0,55	0,44
Mg <sup>2+</sup> .....	0,93	—	3

Tabelle 2. Michaelis-Konstanten K<sub>M</sub>·10<sup>3</sup> einiger Tetrahydrofolat-Formylasen

<sup>77)</sup> A. Meister: Biochemistry of the Amino Acids. Academic Press, New York 1957.

<sup>78)</sup> S. Weinhouse in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism, The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 637.

<sup>79)</sup> H. I. Nakada u. L. P. Sund, J. biol. Chemistry 233, 8 [1958].

<sup>80)</sup> M. Silverman, J. C. Keresztesy, G. J. Koval u. R. C. Gardiner, J. biol. Chemistry 226, 83 [1957].

<sup>81)</sup> L. Jaenicke u. P. C. Chan, Angew. Chem. 72, 752 [1960].

<sup>82)</sup> G. R. Greenberg, L. Jaenicke u. M. Silverman, Biochim. biophysica Acta 17, 589 [1955].

<sup>83)</sup> J. C. Rabinowitz u. W. E. Pricer, Fed. Proc. 17, 293 [1958], J. biol. Chemistry 229, 321 [1957].

<sup>84)</sup> J. C. Rabinowitz, Fed. Proc. 17, 334 [1958]; IV. Intern. Kongr. Biochem., Wien 1958, Abstracts, Pergamon Press, London 1958, S. 54.

<sup>85)</sup> L. Jaenicke, Angew. Chem. 69, 65 [1957].

<sup>86)</sup> E. Brode, Dissertation, Universität Marburg 1960.

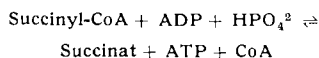
<sup>87)</sup> L. Jaenicke, IV. Intern. Kongr. Biochem., Wien 1958, Abstracts, Pergamon Press, London 1958, S. 47.

<sup>88)</sup> H. R. Whiteley, M. J. Osborn u. F. M. Huennekens, J. Amer. chem. Soc. 80, 757 [1958]; J. biol. Chemistry 235, 1538 [1960].

witz<sup>89</sup>) und Jaenicke<sup>39, 86, 87</sup>) weitgehend geklärt worden, wobei sich allerdings für die verschiedenen Enzyme Unterschiede ergaben. Mit der 200-fach angereicherten Formylase aus *M. aerogenes*<sup>88, 90</sup>) und mit Taubenleberenzym<sup>86</sup>) entsteht aus ATP und Tetrahydrofolsäure in Abwesenheit von Formiat ADP. Ein vermutlich phosphoryliertes Tetrahydrofolat-Derivat konnte isoliert und durch Inkubieren mit Formiat in N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure umgewandelt werden<sup>88</sup>):

- a)  $\text{ATP} + \text{Tetrahydrofolsäure} \rightleftharpoons \text{„Phosphoryl-tetrahydrofolsäure“} + \text{ADP}$   
 b) „Phosphoryl-tetrahydrofolsäure“ + Formiat  $\rightleftharpoons$  N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure +  $\text{HPO}_4^{2-}$

Die Charakterisierung des als N(10)-phosphorylierte Tetrahydrofolsäure<sup>39</sup>) angesprochenen Zwischenproduktes steht noch aus; die chemische Synthese einer solchen Verbindung ist noch nicht eindeutig gelungen. Die Substitution des Stickstoffs N(10) der Tetrahydrofolsäure durch Phosphat würde allerdings die Reaktionsfähigkeit des N-Atoms eher schwächen als stärken und seiner Formylierung entgegenstehen. Immerhin wäre eine Formolyse der N-Phosphat-Bindung möglich, wenn das Formiat primär nicht am Stickstoff, sondern am Phosphor angreift. Die Bildung der Säureamid-Bindung wäre dann erst der zweite Schritt (vgl. Abschnitt 10c). Man tut wohl gut, die augenblickliche Formulierung der Struktur des phosphorylierten Produktes nur als Arbeitshypothese zu werten. Die als Parallelbeispiel anzuführende Reaktion eines phosphorylierenden Enzyms mit Succinyl-CoA:



ist bisher, durch Befunde von Smith und Mitarbeiter<sup>91</sup>) gestützt, über CoA-Phosphat formuliert worden. Dagegen sprechen aber Austauschversuche mit  $^{18}\text{O}$ . Sie ergaben, daß im Lauf der Reaktion Succinat und Phosphat, nicht aber Cofaktor und Phosphat, zeitweilig kovalent miteinander verbunden sind<sup>92, 93</sup>).

Nach Jaenicke<sup>87</sup>) und Brode<sup>86</sup>) bleibt bei der Säugetier-Formylase das phosphorylierte Zwischenprodukt\*, dessen Entstehen durch Austauschversuche demonstriert werden konnte, an das Enzym gebunden. Durch Hemmversuche und durch kinetische Untersuchungen ließ sich folgender Mechanismus herauschälen, bei dem ein Intermediärprodukt aber nicht abzufangen ist: Das nach a) und b) entstehende enzym-gebundene Folyl-phosphat wird an N(5)

- a)  $\text{Enzym-SH} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Enzym-S-P} + \text{ADP}$   
 b)  $\text{Enzym-S-P} + \text{Tetrahydrofolsäure} \rightleftharpoons \text{Enzym-n-Tetrahydrofolsäure-N-P}$   
 c)  $\text{Enzym-n-Tetrahydrofolsäure-N-P} + \text{Formiat} \rightleftharpoons \text{Enzym-n-Formyl-tetrahydrofolsäure-N-P}$   
 d)  $\text{Enzym-n-Formyl-tetrahydrofolsäure-N-P} \rightleftharpoons \text{Enzym-SH-Anhydro-Citrovorumfaktor} + \text{HPO}_4^{2-}$   
 e)  $\text{Enzym-SH-Anhydro-Citrovorumfaktor} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure} + \text{Enzym-SH}$   
 a)-e)  $\text{ATP} + \text{Tetrahydrofolsäure} + \text{Formiat} \rightleftharpoons \text{N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure} + \text{ADP} + \text{HPO}_4^{2-}$   
 ( $n = \text{N(5)}; N = \text{N(10)}; P = \text{HPO}_3^{2-}$ )

<sup>88</sup>) R. H. Himes u. J. C. Rabinowitz, Fed. Proc. 19, 47 [1960].

<sup>90</sup>) H. R. Whiteley, M. J. Osborn, P. T. Talbert u. F. M. Huennekens, Fed. Proc. 17, 334 [1958].

<sup>91</sup>) R. A. Smith, I. F. Frank u. I. C. Gunsalus, Fed. Proc. 16, 251 [1957]; I. C. Gunsalus u. R. A. Smith, Proc. Intern. Sympos. Enzyme Chem., Tokio u. Kyoto 1957, Pergamon Press, London 1958, S. 77.

<sup>92</sup>) M. Cohn, Biochim. biophysica Acta 20, 92 [1956].

<sup>93</sup>) P. D. Boyer, O. J. Koeppe, W. W. Luchsinger u. A. B. Falcone, Fed. Proc. 14, 135 [1955].

formyliert (c). Unter Verlust des Phosphats bildet sich über Anhydro-Citrovorumfaktor (d) N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure (e) (vgl. Abschnitt 10 c).

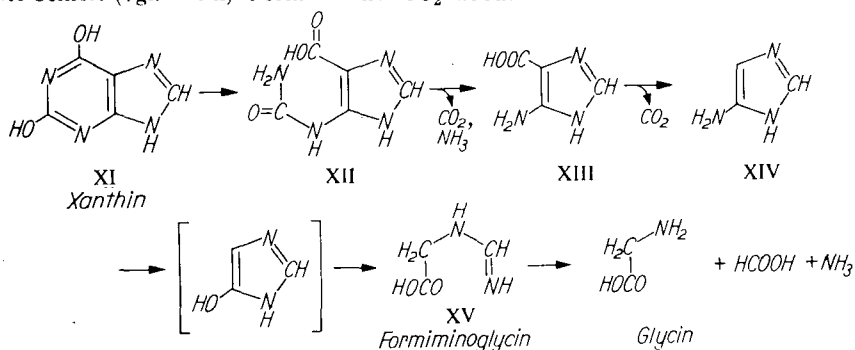
Rabinowitz<sup>89</sup>) formuliert die Reaktion des bakteriellen Enzyms auf Grund kinetischer Untersuchungen als Mehrzentrenprozeß (wohl mit einem Enzym-ATP-Komplex), bei dem nach sterischer Ordnung der Substrate auf der Enzym-Oberfläche ein glatter Elektronenfluß die Bildung der Reaktionsprodukte in einem Zug ermöglicht, so daß individuelle Zwischenstufen nicht gefaßt werden können.

Die entstandene N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure kann durch eine spezifische Deacylase, die von Huennekens<sup>84</sup>) in Rinderleber nachgewiesen wurde, zu Ameisensäure und Tetrahydrofolsäure hydrolysiert werden. Durch dieses Enzym wird der Cofaktor im Stoffwechsel auch in Abwesenheit eines Formiat-Acceptors freigesetzt.

### c) Abbau von Heterocyclen

Sehr eingehend sind wir über die Mechanismen der Bildung von „aktiviertem Formiat“ beim Abbau heterocyclischer Moleküle, der Purine und des Histidins, unterrichtet.

Barker und Mitarbeiter<sup>95-97</sup>) haben gezeigt, daß Extrakte der anaeroben Mikroorganismen *Clostridium cylindrosporum* und *C. acidi-urici* Purine zu Ammoniak, Glycin, Formiat und  $\text{CO}_2$  abbauen. Die dabei ablaufenden



Reaktionen konnten Rabinowitz und Pricer<sup>98-100</sup>) in glänzenden Untersuchungen klären. Sie zeigten, daß als Produkt einer Reihe von hydrolytischen Schritten aus Xanthin (XI) Formiminoglycin ( $\text{NH}=\text{CH}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), (XV) entsteht. Zwischenstufen sind 4-Ureido-imidazol-5-carbonsäure (XII), 4-Amino-imidazol-5-carbonsäure (XIII) und 4-Amino-imidazol (XIV).

Die Reaktionen des Formiminoglycins<sup>101-103</sup>) sind für das Problem der Formyl-Übertragung von erheblichem Interesse, führten sie doch zur Entdeckung einer neuen Einkohlenstoff-Einheit, der Formimino-Gruppe ( $\text{H}-\text{C}=\text{NH}$ )<sup>99</sup>). In Gegenwart von Tetrahydrofolsäure sind drei aufeinanderfolgende Reaktionen möglich:

- a)  $\text{Formiminoglycin} + \text{Tetrahydrofolsäure} \rightleftharpoons \text{5-Formimino-tetrahydrofolsäure} + \text{Glycin}$   
 b)  $\text{Formimino-tetrahydrofolsäure} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{Anhydro-Citrovorumfaktor} + \text{NH}_4^+$   
 c)  $\text{Anhydro-Citrovorumfaktor} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure} + \text{H}^+$

<sup>84</sup>) M. J. Osborn, Y. Hatefi, L. D. Kay u. F. M. Huennekens, Biochim. biophysica Acta 26, 208 [1957].

<sup>95</sup>) H. A. Barker u. J. V. Beck, J. biol. Chemistry 141, 3 [1941]; J. Bacteriol. 43, 291 [1942].

<sup>96</sup>) J. L. Karlsson u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 218, 147 [1949].

<sup>97</sup>) J. C. Rabinowitz u. H. A. Barker, J. biol. Chemistry 218, 147, 161 [1956].

<sup>98</sup>) J. C. Rabinowitz, J. biol. Chemistry 218, 175 [1956].

<sup>99</sup>) J. C. Rabinowitz u. W. E. Pricer jr., J. biol. Chemistry 218, 189 [1956]; 222, 537 [1956]; J. Amer. chem. Soc. 78, 5702 [1956].

<sup>100</sup>) L. A. Heppel u. J. C. Rabinowitz, Ann. Rev. Biochem. 27, 613 [1958].

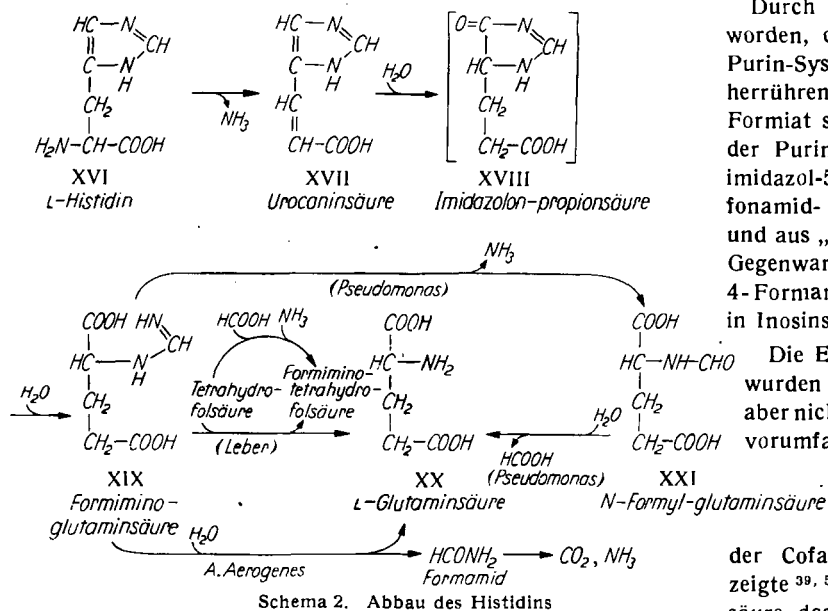
<sup>101</sup>) R. D. Sagers u. J. V. Beck, J. Bacteriol. 72, 199 [1956].

<sup>102</sup>) R. D. Sagers, J. V. Beck, W. Gruber u. I. C. Gunsalus, J. Amer. chem. Soc. 78, 694 [1956].

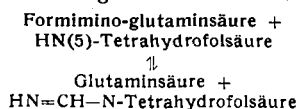
<sup>103</sup>) J. C. Rabinowitz u. W. E. Pricer jr., J. Amer. chem. Soc. 78, 1513, 4176 [1956].

Die Enzyme, welche diese Reaktionen katalysieren, wurden Formiminoglycin-formimino-Transferase (a), Formimino-tetrahydrofolat-Cyclodesaminase (b) und Cyclohydrolase (c) genannt. Nur der zweite Schritt ist irreversibel und begünstigt so die Bildung der N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure.

Der Abbau des Histidins (XVI) zu Ammoniak, Glutamat und „aktivierter Ameisensäure“ (Schema 2) findet in tierischer Leber statt<sup>104-107</sup>). Die Aminosäure wird über Urocaninsäure (XVIII) in Imidazolpropionsäure (XVIII) umgewandelt und diese zu Formimino-glutaminsäure (XIX)<sup>108</sup> hydrolysiert. Bei Folsäure-Mangel scheiden Ratten diese Verbindung im Urin aus<sup>109</sup>). Mit Tetrahydrofolsäure reagiert XIX zu Glutaminsäure und Formimino-tetrahydrofolsäure<sup>104, 110</sup>).



Miller und Waelsch<sup>110</sup>) konnten durch Isotopenaustausch-Versuche die intermediäre Bildung eines Formimino-Enzymkomplexes ausschließen. Sie nehmen daher einen nucleophilen Angriff des N(5) der Tetrahydrofolsäure am Amidin-C-Atom der Formimino-glutaminsäure an:



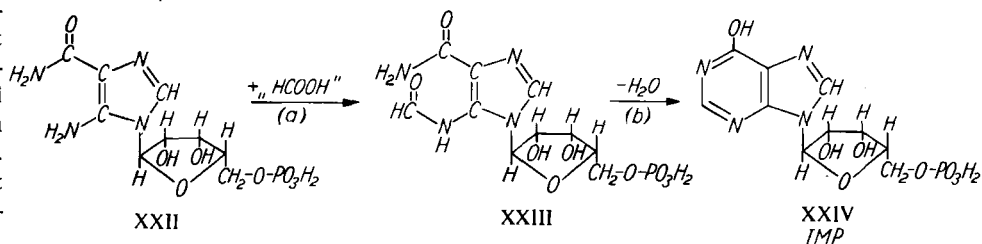
## 6. Transformylierung

Die aus Ameisensäure, Glycin, heterocyclischen Verbindungen oder durch Oxydation des „aktivierten Formaldehyds“ (s. Abschnitt 8) entstehende „aktive Ameisensäure“ kann im Stoffwechsel zur Synthese zahlreicher Verbindungen

gen verwendet werden, von denen die Synthese der Purine und des Histidins am eingehendsten untersucht wurde.

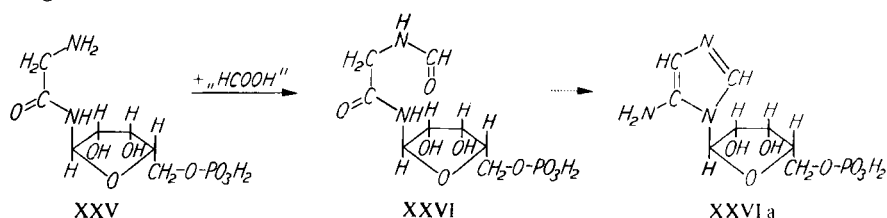
### a) Purin-Biosynthese

Die vollständige Aufklärung der Purin-Biosynthese verdanken wir den eleganten Untersuchungen von G. R. Greenberg<sup>39, 58, 59, 111</sup>) und J. M. Buchanan<sup>56, 57, 112</sup>). Sie sind für unser Thema von Interesse, weil hier die ersten enzymatischen Transformylierungen entdeckt wurden.



Durch Isotopen-Untersuchungen in vivo war erkannt worden, daß alle Kohlenstoff- und Stickstoff-Atome des Purin-Systems aus kleinen Bausteinen (Glycin, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) herrühren und daß die Kohlenstoffatome 2 und 8 aus Formiat stammen<sup>112</sup>). Ausgangspunkt für die Aufklärung der Purin-Biosynthese war die Isolierung des 4-Aminoimidazol-5-carbonsäureamidribotids (XXII)<sup>113</sup> aus sulfonamid- oder aminopterin-blockierten Mikroorganismen und aus „purinarmen“ Bakterien-Mutanten. XXII wird in Gegenwart von Formiat durch Taubenleber-Extrakte über 4-Formamido-imidazol-5-carboxamidribotid (XXIII)<sup>111</sup>) in Inosinsäure (IMP; XXIV) umgewandelt.

Die Enzyme Transformylase (a) und Inosinicas (b) wurden von Buchanan aus Hühnerleber angereichert<sup>114</sup>), aber nicht voneinander getrennt. Da die Zugabe von Citrovorumfaktor die Rückreaktionen beschleunigt und damit auch den Austausch von Formiat mit dem Kohlenstoffatom 2 des IMP, nahmen Buchanan und Mitarbeiter<sup>72</sup>) an, daß Citrovorumfaktor der Cofaktor der Transformylierung sei, bis Greenberg zeigte<sup>39, 55, 58, 59, 70</sup>), daß N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure das Formylierungsmittel ist und Citrovorumfaktor nur nach einer ATP-abhängigen Isomerisierung wirksam wird<sup>116</sup>).



Der durch Glycinamidribotid-Transformylase<sup>117</sup>) katalysierte Einbau von Formiat in die Stellung 8 der Purine verläuft ähnlich. Acceptor der Formylgruppe ist Glycinamidribotid (XXV), aus dem Formylglycinamidribotid (XXVI) entsteht. Hier ist Anhydrocitrovorumfaktor der Formyl-Donator<sup>118</sup>). Im weiteren Verlauf der Biosynthese wird

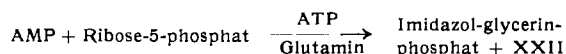
- <sup>104</sup>) A. Miller u. H. Waelsch, Arch. Biochem. Biophysics 63, 263 [1956].  
<sup>105</sup>) H. Tabor u. J. C. Rabinowitz, J. Amer. chem. Soc. 78, 5705 [1956].  
<sup>106</sup>) H. Tabor in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 373.  
<sup>107</sup>) H. Waelsch u. A. Miller in McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism. The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 407.  
<sup>108</sup>) B. Borek u. H. Waelsch, J. Amer. chem. Soc. 75, 1772 [1953]; J. biol. Chemistry 205, 459 [1953].  
<sup>109</sup>) H. Tabor, M. Silverman, A. H. Mehler, F. S. Daft u. H. Bauer, J. Amer. chem. Soc. 75, 756 [1953].  
<sup>110</sup>) A. Miller u. H. Waelsch, J. Amer. chem. Soc. 76, 6195 [1954]; J. biol. Chemistry 228, 379, 383 [1957].

- <sup>111</sup>) D. A. Goldthwait in Rebeck-Bethell-Monto: The Leukemias. Academic Press, New York 1957, S. 555.  
<sup>112</sup>) J. M. Buchanan in Rebeck-Bethell-Monto: ebenda S. 523; Proc. Intern. Sympos. Enzyme Chem., Tokyo u. Kyoto 1957, Pergamon Press, London 1958, S. 67.  
<sup>113</sup>) M. P. Schulman, J. C. Sonne u. M. J. Buchanan, J. biol. Chemistry 196, 499 [1952].  
<sup>114</sup>) J. S. Gots, Nature [London] 172, 256 [1953].  
<sup>115</sup>) J. G. Flaks, M. J. Erwin u. J. M. Buchanan, J. biol. Chemistry 229, 603 [1957].  
<sup>116</sup>) L. D. Kay, M. J. Osborn, Y. Hatefi u. F. M. Huennekens, J. biol. Chemistry 235, 195 [1960].  
<sup>117</sup>) B. Levenberg u. J. M. Buchanan, J. Amer. chem. Soc. 78, 504 [1956].  
<sup>118</sup>) S. C. Hartman u. J. M. Buchanan, IV. Intern. Kongr. Biochem., Wien 1958, Colloquia, Pergamon Press, London 1959, S. 97.

Formylglycinamid-ribotid mit Glutamin und ATP in Formylglycinamidin-ribotid umgewandelt und der Ring unter abermaliger Spaltung von ATP zu ADP und Phosphat zum 4-Aminoimidazol-ribotid (XXVIa) geschlossen<sup>119)</sup>.

## b) Histidin-Biosynthese

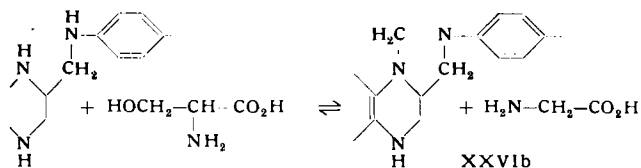
Die Schritte der Histidin-Synthese sind erst in letzter Zeit mit isolierten Enzymsystemen untersucht worden, und die Bildung des Imidazolrings ist noch recht unklar. Vermutlich gibt die C<sub>6</sub>-Kette der Ribose das Gerüst, das mit Ammoniak und „aktivem Formiat“ zum Imidazol-glycerinphosphat kondensiert wird. Aus den Untersuchungen von *Magasanik*<sup>120)</sup> und *Waelsch*<sup>121)</sup> an purin-bedürftigen *Coli*-Mutanten geht eindeutig hervor, daß eine Formimino-Gruppe, die aus Guanin oder Adenylsäure (AMP) stammt, Vorstufe von C(2) und von N(1) ist. Die Amid-Gruppe des Glutamins wird zum N(3) des Heterocyclus, so daß sich die Reaktion in folgender Weise beschreiben läßt:



Die weiteren Schritte vom Imidazol-glycerinphosphat zum Histidinolphosphat und Histidin sind aus den Arbeiten von *Ames* und *Mitchell*<sup>121a)</sup> wohlbekannt. Nach *Moyed* und *Magasanik*<sup>122)</sup> ist Tetrahydrofolsäure nicht direkt an der Synthese des Imidazol-Ringes beteiligt, sondern AMP und Ribose-5-phosphat kondensieren sich unmittelbar zu einem Adenylsäure-N(3)-ribotid, aus dem in Gegenwart von Glutamin Aminoimidazol-carboxamid-ribotid und Imidazol-glycerophosphat entstehen. Trifft dies zu, so wäre Tetrahydrofolsäure an der Histidin-Biosynthese nur indirekt beteiligt, indem sie eine Formylgruppe auf das Aminoimidazol-carboxamid-ribotid überträgt und so das AMP regeneriert.

## 7. „Aktivierter Formaldehyd“

Zweifellos die physiologisch wichtigste Quelle der Einkohlenstoff-Einheiten ist das  $\beta$ -Kohlenstoff-Atom des Serins; es stammt letzten Endes aus den Kohlenstoff-Atomen 1 und 6 der Glucose. Nach *D. M. Greenberg*<sup>123)</sup>, *Blakley*<sup>124)</sup>, *Huennekens*<sup>125)</sup>, *Sakami*<sup>126, 127)</sup> und *Jaenicke*<sup>39, 50)</sup> wird das  $\beta$ -C-Atom des Serins als Hydroxymethyl-Gruppe auf Tetrahydrofolsäure übertragen. Katalysator dieser Reaktion ist das Enzym Serin-Aldolase (Serin-Hydroxymethylase). Es entstehen Glycin und Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure („aktivierter Formaldehyd“ = N(5).N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure; XXVIb):



<sup>119)</sup> B. Levenberg u. J. M. Buchanan, J. biol. Chemistry 224, 1005, 1019 [1957].

<sup>120)</sup> B. Magasanik, H. S. Moyed u. D. Karibian, J. Amer. chem. Soc. 78, 1510, 5449 [1956].

<sup>121)</sup> A. Neidle u. H. Waelsch, J. Amer. chem. Soc. 78, 1767 [1956]; Fed. Proc. 16, 225 [1957].

<sup>121a)</sup> B. N. Ames u. H. K. Mitchell, J. biol. Chemistry 212, 687 [1955]; B. N. Ames, ebenda 228, 131 [1957]. Heredity, Baltimore 1957, S. 609.

<sup>122)</sup> H. S. Moyed u. B. Magasanik, J. Amer. chem. Soc. 79, 4812 [1957].

<sup>123)</sup> N. Alexander u. D. M. Greenberg, J. biol. Chemistry 214, 821 [1955]; 220, 775 [1956].

<sup>124)</sup> R. L. Blakley, Biochem. J. 61, 315 [1955].

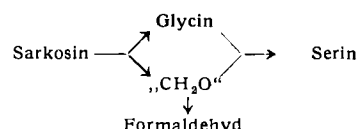
<sup>125)</sup> F. M. Huennekens, M. J. Osborn u. H. R. Whiteley, Science [Washington] 128, 120 [1958].

<sup>126)</sup> R. L. Kisliuk u. W. Sakami, J. biol. Chemistry 214, 47 [1955].

<sup>127)</sup> S. Deodhar, W. Sakami u. A. Stevens, Fed. Proc. 14, 201 [1955].

Die reversible Umwandlung von Serin und Tetrahydrofolsäure in Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure und Glycin durch Serin-Hydroxymethylase erfordert Pyridoxal und Mangan-Ionen<sup>50)</sup>. Dieses Cofaktor-Bedürfnis war auf Grund der Vorstellungen von *Metzler*, *Ikawa* und *Snell*<sup>128)</sup> vorauszusehen.

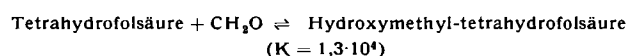
Ein weiterer Weg, der zum „aktivierten Formaldehyd“ führt, ist die oxydative Umlagerung von Sarkosin (= N-Methyl-glycin) zu Serin. Sie ist auch als Modellfall der Oxydation heterocyclisch gebundener Methyl- zu Hydroxymethyl-Gruppen durch Cytoplasma-Partikel von Interesse. Nach der Inkubation von Sarkosin mit teilweise gereinigten partikulären Enzymen fanden *Mackenzie*<sup>129)</sup> sowie *Greenberg*<sup>64)</sup> Formaldehyd, Glycin und Serin, in dessen  $\beta$ -Kohlenstoff-Atom die Methyl-Gruppe des Sarkosins übergeht. Sie nehmen folgende Reaktionen an:



Dieses Schema erklärt, daß Glycin die Serin-Synthese vermehrt. Zugesehter <sup>14</sup>C-Formaldehyd wird nicht inkorporiert und ein Reservoir von unmarkiertem Formaldehyd wirkt nicht verdünnend, obwohl mit Semicarbazid der Methyl-Kohlenstoff des Sarkosins quantitativ als Formaldehyd abgefangen werden kann. Mit deuteriertem Sarkosin läßt sich zeigen, daß die Oxydation nicht die Stufe der Ameisensäure durchläuft. Nach *Mackenzie*<sup>129, 130)</sup> wird Dimethyl-glycin zunächst zu Sarkosin und Formaldehyd oxydiert und dann auf dem gezeigten Weg weiter umgewandelt.

Die Beteiligung von Tetrahydrofolsäure an diesen Reaktionen ist zwar wahrscheinlich, aber mit der offenbar irreversiblen Bildung freien Formaldehyds schwer zu vereinbaren. Auch die Natur der Elektronen-Acceptoren bei der Oxydation ist noch unbekannt. Die baldige Klärung dieser Fragen ist zu erwarten, nachdem *Sakami*<sup>131)</sup> das partikuläre System durch Digitonin in Lösung bringen konnte. Ein lösliches Enzym aus *C. acidiphilus* und *Diplococcus glycinophilus*, das das  $\alpha$ -Kohlenstoff-Atom des Glycins in aktiven Formaldehyd umwandelt, haben *Sagers* und *Gunsalus*<sup>132)</sup> erhalten.

Schließlich vermag die Zelle freien Formaldehyd mit Tetrahydrofolsäure zu „aktiviertem Formaldehyd“ zu kondensieren:



Die Reaktion wird durch ein formaldehyd-aktivierendes Enzym<sup>10, 125, 133)</sup> beschleunigt. *Deodhar*<sup>127)</sup> und *Jaenicke*<sup>50)</sup> konnten die entstehende Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure aus Enzymsätzen chromatographisch isolieren.

## 8. Gegenseitige Umwandlung von „aktiviertem Formaldehyd“ und „aktivierter Ameisensäure“

Bereits die Isotopen-Untersuchungen am Gesamtorganismus hatten erkennen lassen, daß Formiat und die  $\beta$ -CH<sub>2</sub>OH-Gruppe des Serins miteinander im Gleichgewicht stehen. *Jaenicke*<sup>39, 50, 71)</sup> und später *Flaks*<sup>73)</sup> beobachteten, daß im Zellextrakt die Zugabe von TPN<sup>+</sup> diejenigen Reaktionen stark stimuliert, bei denen ein Übergang von Formaldehyd

<sup>128)</sup> D. E. Metzler, M. Ikawa u. E. E. Snell, J. Amer. chem. Soc. 76, 648 [1954].

<sup>129)</sup> C. G. Mackenzie in *McElroy-Glass: Amino Acid Metabolism*. The John Hopkins Press, Baltimore 1955, S. 684; J. biol. Chemistry 222, 145 [1956].

<sup>130)</sup> C. G. Mackenzie u. W. R. Frisell, J. biol. Chemistry 232, 417 [1958].

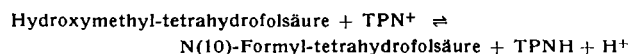
<sup>131)</sup> R. C. Knowles u. W. Sakami, Amer. chem. Soc. 132nd Meeting, New York 1957, Abstr. S. 36C.

<sup>132)</sup> R. D. Sagers u. I. C. Gunsalus, Bacteriol. Proc. 1958, 119.

<sup>133)</sup> M. J. Osborn, E. N. Verkamer, P. T. Talbert u. F. M. Huennekens, J. Amer. chem. Soc. 79, 6565 [1957].



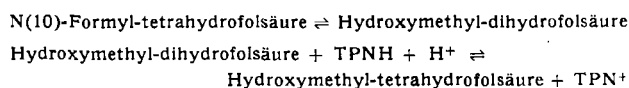
und Formiat ineinander postuliert werden muß, z. B. den Einbau des  $\beta$ -Kohlenstoffs von Serin in Purine. Das von *Jaenicke*<sup>50)</sup> beschriebene und von *Hatefi*<sup>134, 135)</sup> weiter gereinigte Enzym Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure-Dehydrogenase katalysiert die reversible Reaktion



Bei dieser Oxydoreduktion wird die Onium-Struktur des TPN<sup>+</sup> zunächst im Imidazolium-Ring des Anhydrocitrovorumfaktors aufrechterhalten, der als energiereiches Zwischenprodukt nachgewiesen werden konnte<sup>134)</sup>.

Der mühevolle Wechsel der Oxydationsstufe zwischen Formiat und Formaldehyd wird durch die cyclische Bindung an einen Partner ermöglicht, der eine geringere Elektronendichte als Sauerstoff hat (vgl. aber Abschnitt 10b). Die freien, hydratisierten C<sub>1</sub>-Verbindungen haben ein Redox-Potential, das mit -700 mV (pH = 7) vollständig auf der Seite der Ameisensäure liegt. Dagegen liegt das Gleichgewicht der enzymatischen Redox-Reaktion mit ca. -260 mV (K = 1,7 · 10<sup>-2</sup>) auf der Seite des aktivierten Formaldehyds.

Es ist die Hypothese geäußert worden, daß die Umwandlung von Formyl-tetrahydrofolsäure in Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure mit der Disproportionierung von Formyl-tetrahydrofolsäure zu Hydroxymethyl-dihydrofolsäure beginnt und das Zwischenprodukt durch TPNH zur Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure reduziert wird:



Chemisch besteht diese Möglichkeit durchaus, da der Wasserstoff an C(6) der Tetrahydrofolsäure leicht als Hydrid-Ion abgespalten und so auf die Formylgruppe übertragen werden kann<sup>47)</sup>. Die Reaktion mit Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure-Dehydrogenase folgt diesem Mechanismus aber nach den bisherigen Untersuchungen nicht.

## 9. Bildung von Methylgruppen aus „aktiviertem Formaldehyd“

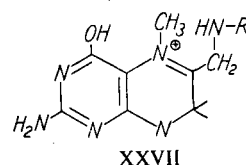
Die Biosynthese der Pyrimidin-Base Thymin (5-Methyluracil)<sup>136)</sup> ist für uns an der Stelle von Interesse, an der die aus Formaldehyd oder Serin (vgl. <sup>81, 82)</sup>) stammende Einkohlenstoff-Einheit an das Kohlenstoff-Atom 5 angefügt wird. Die Beteiligung eines Folsäure-Cofaktors geht aus der Blockierung der Thymin-Synthese mit Folsäure-Antagonisten in Bakterien hervor. *Friedkin* und *Kornberg*<sup>137)</sup> wiesen die Teilnahme von Tetrahydrofolsäure an der Bildung der Thymidylsäure aus Desoxyuridin-5'-phosphat und Serin oder Formaldehyd nach, wobei Tetrahydrofolsäure und der Einkohlenstoffkörper auch durch synthetische Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure ersetzt werden konnten.

Da diese Reaktionen auch ohne Zugabe von Reduktionsmitteln ablaufen, läßt sich diskutieren, daß die Reduktion der Hydroxymethyl- zur Methylgruppe durch Tetrahydrofolsäure besorgt wird. Dafür sprechen Tritium-Versuche von *Friedkin*<sup>138)</sup>, bei denen der Wasserstoff aus Tetratrio-folsäure im Thymin wiedergefunden wurde. In gleiche Richtung weist die stöchiometrische Bilanz zwischen Methyl-Synthese und freigesetzter Dihydrofolsäure sowie der Ersatz katalytischer Mengen TPN<sup>+</sup> durch große Tetrahydrofolsäure-Konzentrationen<sup>139)</sup>.

Auch die Methyl-Gruppe des Methionins stammt aus dem Einkohlenstoff-Reservoir des Stoffwechsels. Ihre Synthese

erfordert Tetrahydrofolsäure, TPN, ATP und Mg<sup>2+</sup>-Ionen<sup>140)</sup>. Als Acceptor der Kohlenstoff-Einheit konnte zunächst Homocystein<sup>45, 141)</sup>, als Donator ein „aktiver“ Formaldehyd nachgewiesen werden, so daß der Mechanismus anfangs als einfache Kondensation der beiden Substrate zu S-Hydroxymethylhomocystein aufgefaßt wurde. Jedoch weisen die Ergebnisse eigener Untersuchungen<sup>142)</sup> und der sorgfältigen Studien von *Stevens* und *Sakami*<sup>143)</sup> sowie *Doctor*<sup>144)</sup> darauf hin, daß intermediär S-Adenosyl-homocystein oder eine ähnliche reaktivierte Verbindung (etwa Adenylyl-homocystein) entsteht, deren weiterer Umsatz ATP-abhängig bleibt. Tetrahydrofolsäure ist auch hier nicht nur Überträger der Einkohlenstoff-Einheit, sondern ist auch an ihrer Reduktion beteiligt<sup>140)</sup>.

Angereicherte Fraktionen aus Ratten- und Schweineleber wandeln Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure in ein reaktionsfähiges Zwischenprodukt, möglicherweise die Ammoniumverbindung N(5)-Methyl-dihydrofolsäure (XXVII) um, die sich mit S-Adenosyl-homocystein zu Methionin und Dihydrofolsäure kondensiert. TPNH reduziert die Dihydrofolsäure zur Tetrahydrofolsäure. Es kann durch große Mengen Tetrahydrofolsäure ersetzt werden. Tritium geht aus 5.6.7.8-Tetratrio-folsäure in die Methylgruppe des Methionins über<sup>140)</sup>.



Die Beteiligung von Vitamin-B<sub>12</sub>-Proteinen an der Methionin-synthese<sup>145-147)</sup> ist mehrfach mitgeteilt worden. Es ließe sich ein Zusammenhang zwischen dem Vitamin und der Bildung der Methyl-dihydrofolsäure oder eines Tetrahydrofolsäure-Polyglutamats<sup>148)</sup> denken oder aber die Bereitstellung von Methylradikalen aus einer Redox-Reaktion diskutieren.

## 10. Modell-Reaktionen und Reaktionsmechanismen

Alle durch Enzyme katalysierten Prozesse haben ein Analogon in nichtenzymatischen organischen Reaktionen, deren Regeln auch für enzymatische Vorgänge zutreffen müssen. Eine vernünftige Theorie der Enzym-Katalyse hat daher den Prinzipien der physikalischen organischen Chemie zu gehorchen<sup>149)</sup>.

Für die biologischen Reaktionen der Einkohlenstoff-Einheiten ist die chemische und sterische Ausnahmestellung der Formyl- und Hydroxymethylgruppe von Bedeutung. Formaldehyd hat eine gewisse Acidität und kann durch Abgabe eines Protons das Anion HCO<sup>-</sup> bilden. Besonders ausgeprägt ist seine Fähigkeit, nucleophile Agentien zu addieren. Die bei solchen Kondensationen mit Aminen entstehenden N-Methylol-Verbindungen spalten leicht OH<sup>-</sup>-Ionen ab und sind daher noch reaktionsfähiger als das Aldehyd-Kation. Unter bestimmten Bedingungen kann aus der Methylol-Verbindung auch ein Hydrid-Ion abgespalten werden. Man erhält dann das gleiche Formyl-Kation R-CHOH<sup>+</sup>, das sich aus einem gebundenen Formylrest durch Abgabe eines OH<sup>-</sup>-Ions bildet. Die Zwitterstellung der Ameisensäure als stärkste Carbonsäure H-COOH und als Aldehyd HO-CHO ist für ihr biologisches und chemisches Verhalten charakteristisch.

<sup>140)</sup> W. Wilmanns, Vortr.-Tagg. Schweiz., dtsch. u. franz. Biochemiker, Zürich 1960, Ref. A 9.

<sup>141)</sup> H. R. V. Arnstein u. A. Neuberger, Biochem. J. 55, 259 [1953].

<sup>142)</sup> B. Rücker, unveröffentl.

<sup>143)</sup> A. Stevens u. W. Sakami, J. biol. Chemistry 234, 2063 [1959].

<sup>144)</sup> V. M. Doctor, T. D. Patton u. J. Awapara, Arch. Biochem. Biophysics 67, 404 [1957].

<sup>145)</sup> R. L. Kisliuk u. D. D. Woods, J. gen. Microbiol. 18, XV [1957]; Fed. Proc. 18, 261 [1959].

<sup>146)</sup> F. T. Hatch, S. Takeyama, R. E. Cathou, A. R. Larrabee u. J. M. Buchanan, J. Amer. chem. Soc. 81, 6525 [1959]; Fed. Proc. 18, 243 [1959].

<sup>147)</sup> H. R. V. Arnstein, Biochem. J. 74, 616 [1960].

<sup>148)</sup> J. R. Guest u. K. M. Jones, Biochem. J. 78, V111 [1960].

<sup>149)</sup> D. E. Koshland jr. in *McElroy-Glass: Mechanism of Enzyme Action*, The John Hopkins Press, Baltimore 1954, S. 608; J. cell. comp. Physiol. 47, Suppl. 1, 217 [1956].

<sup>134)</sup> M. J. Osborn u. F. M. Huennekens, Biochim. biophysica Acta 26, 646 [1957].

<sup>135)</sup> Y. Hatefi, M. J. Osborn, L. D. Kay u. F. M. Huennekens, J. biol. Chemistry 227, 637 [1957].

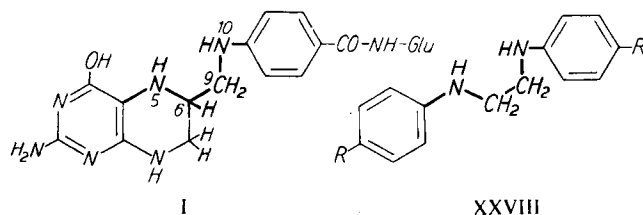
<sup>136)</sup> P. Reichard, Adv. Enzymology 21, 263 [1959].

<sup>137)</sup> M. Friedkin u. A. Kornberg in *McElroy-Glass: Chemical Basis of Heredity*, Baltimore 1957, S. 609.

<sup>138)</sup> M. Friedkin, Fed. Proc. 16, 183 [1957]; 18, 230 [1959].

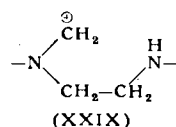
<sup>139)</sup> G. K. Humphreys u. D. M. Greenberg, Biochim. biophysica Acta 78, 275 [1958].

Für die Deutung der Reaktionen der aktivierten Einkohlenstoff-Einheiten war die Beobachtung von *Jaenicke* und *Brode*<sup>47, 48)</sup> wesentlich, daß das Wirkungszentrum der Tetrahydrofolsäure in der Äthylendiamin-Struktur zu suchen ist, die durch die Atome 5, 6, 9 und 10 gebildet wird. Damit ließ sich der äußerst instabile natürliche Cofaktor durch einfache, stabile Modellsubstanzen aus der Klasse der N,N'-Diaryl-äthylendiamine (XXVIII) ersetzen.

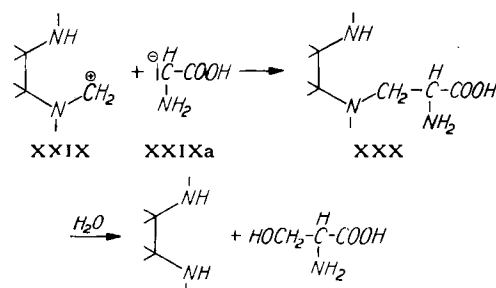


#### a) Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure

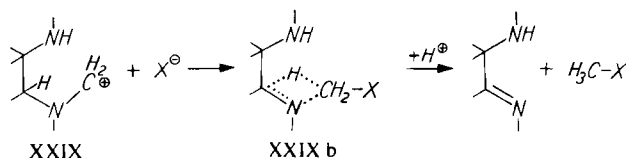
Äthylendiamine kondensieren mit Formaldehyd zu Imidazolidinen<sup>150)</sup>, die der natürlichen Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure entsprechen. Diese Imidazolidine können die Einkohlenstoff-Einheit in nichtenzymatischen Reaktionen auf andere Äthylendiamine übertragen. Sie sind aber im allgemeinen zu träge, um wie bei der biologischen Transhydroxymethylierung C-C-Bindungen zu bilden. Wir schließen daraus, daß nicht die Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure selbst, sondern das aus Tetrahydrofolsäure und Formaldehyd intermediär zu erwartende Kation (XXIX) die Wirkform des „aktivierten Formaldehyds“



ist. In einer solchen Verbindung ist die CH<sub>2</sub><sup>+</sup>-Gruppe so locker gebunden, daß sie bereits unter milden Bedingungen als Formaldehyd abgespalten werden kann. Oder aber das Carbonium-Ion reagiert in elektrophiler Reaktion mit Carbanionen vom Typ des pyridoxal-aktivierten Glycins (XXIXa) und des Dihydrouracils oder mit sulfidischem Schwefel des Homocysteins unter Bildung von C-C- bzw. C-S-Bindungen.



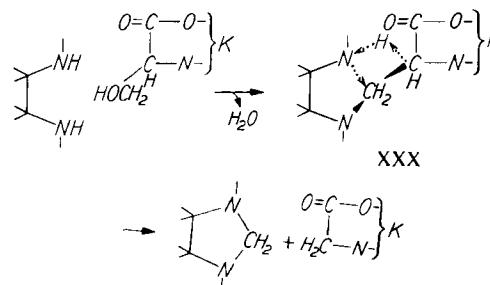
Von der polarisierten Struktur XXIX aus könnte die Synthese der Methylgruppe den im folgenden Formelbild vorgeschlagenen alternativen Verlauf nehmen: (vgl. dazu Abschnitt 9): Lagert sich der nucleophile Partner an das



Kation an, so wird die Reaktionsfolge durch Lockerung des C(6)-Wasserstoffs (XXIXb) eingeleitet. Das Intermediärprodukt (XXIXb) stabilisiert sich durch Abspaltung der Einkohlenstoff-Einheit. Diese Spaltung führt ebenfalls zu Dihydrofolsäure und methyliertem Acceptor. Im Gegen-

satz zu der im Abschnitt 9 geschilderten Methioninsynthese ist hierbei aber kein isolierbares Zwischenprodukt zu erwarten, da bei einem push-pull-Prozeß der Elektronen-Übergang zur gleichen Zeit wie die Spaltung und Bildung der covalenten Bindungen stattfindet.

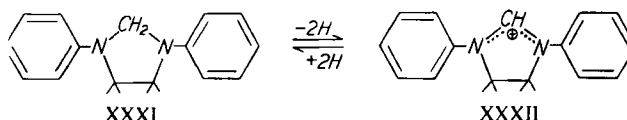
Der natürliche Donator des Formaldehyds ist wohl fast stets Serin, dessen α,β-Kohlenstoff-Bindung durch die tetrahydrofolsäure- und pyridoxalabhängige Serin-Aldolase gespalten wird. In nichtenzymatischen Modell-Versuchen mit Diaryl-äthylendiaminen<sup>151)</sup> läßt sich nachweisen, daß diese Spaltung über einen Zwischenzustand (XXX) verläuft, in dem der β-Kohlenstoff der Aminosäure mit einem sekundären Amino-Stickstoff der Äthylendiamin-Wirkgruppe kondensiert wird. Die C-C-Bindung dieses „Alanyl-äthylendiamins“ wird dann in einem Pyridoxal-Metall-Komplex



(K) polarisiert und gespalten. Während daher Serin bei pH = 5,5 in Gegenwart von Pyridoxal oder Diaryl-äthylendiamin allein praktisch stabil ist, zerfällt es in Anwesenheit beider Cofaktoren in beträchtlichem Ausmaß unter Freisetzung von Glycin. Im natürlichen System konnte eine XXX entsprechende „Alanyl-tetrahydrofolsäure“ chromatographisch wahrscheinlich gemacht werden.

#### b) Hydroxymethyl ≡ Formyl

Die bekannte Reduktionskraft des Formaldehyds ließ stark reduzierende Eigenschaften der 1,3-Diaryl-imidazolidine (XXXI) erwarten. Tatsächlich fanden wir jedoch<sup>47)</sup>, daß der Ersatz der Sauerstoff-Funktion des Formaldehyds durch die weniger elektronegativen Stickstoff-Funktionen



eine starke Erhöhung des HCOOH/HCHO-Potentials bewirkt, weshalb diese Substanzen nur durch relativ starke Mittel oxydiert werden. Sie geben dabei die entsprechenden Imidazolinium-Verbindungen (XXXII), die sich durch ein charakteristisches Spektrum auszeichnen.

Verfolgt man die Reaktion spektrophotometrisch, so erhält man eine Kurvenschar mit zwei isosbestischen Punkten. Die Oxydation führt also ohne Zwischenstufe zur mesomerie-stabilisierten Imidazolinium-Verbindung, die dem natürlichen Anhydrocitravorfaktor zu vergleichen ist. Ihre Reduktion gelingt mit naszierendem Wasserstoff oder Borhydrid.

Auch das basischste unter den synthetischen Tetrahydrofolsäure-Modellen kann, im Gegensatz zum Cofaktor, nicht in reversiblen Austausch mit dem TPN<sup>+</sup>/TPNH-System treten. Man kann daraus folgern, daß nicht allein die Bindung des Formaldehyds zwischen zwei Stickstoff-Atomen für die starke Verschiebung des Redox-Potentials verantwortlich ist. Vielmehr ist der Tetrahydropyrazin-Gruppierung des biologischen Wirkstoffes ein entscheidender Einfluß zuzuschreiben. Dabei greift das Oxydationsmittel primär am N(5) des Tetrahydropyrazins an, da dort die Elektronendichte am größten ist. Unter Abspaltung eines Pro-

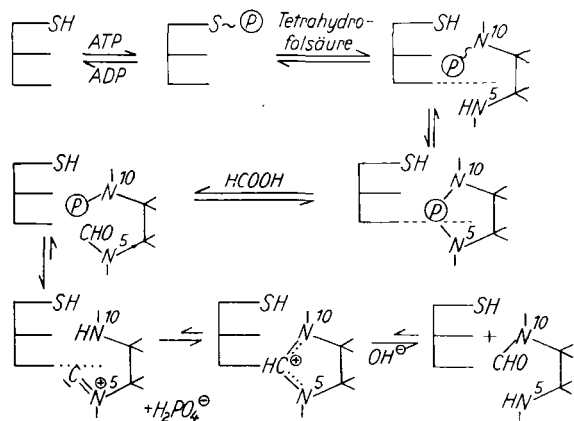
<sup>150)</sup> H.-W. Wanzlick u. W. Löchel, Chem. Ber. 86, 1463 [1953].

<sup>151)</sup> E. Brode u. L. Jaenicke, Biochem. Z. 332, 259 [1960].

tons von der C<sub>1</sub>-Einheit stabilisiert sich das Kation zur gleichen Imidazolinium-Verbindung, die bei der direkten Formylierung der Äthylendiamin-Struktur entsteht. Bei der Oxydation der Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure wird die Onium-Energie des Pyridin-Nucleotids auf das Oxydationsprodukt übertragen: man erhält die mesomere Carbimonium-Struktur (vgl. XXXII) als neuartigen Typ energiereicher Verbindungen (vgl. Abschnitt 8).

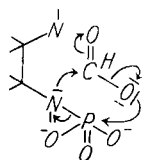
### c) Formiat-Aktivierung

Bei der Untersuchung des Mechanismus der Formiat-Aktivierung<sup>88, 152</sup> (Schema 3) konnte abgeleitet werden (Abschnitt 5b), daß aus ATP und Tetrahydrofolsäure zunächst ein enzym-gebundener N(10)-Phosphoryl-tetrahydrofolsäure-Komplex entsteht, der mit Formiat reagiert, so daß N(5)-Formyl-N(10)-phosphoryl-tetrahydrofolat resultiert. Mit dem Postulat einer solchen Verbindung ergibt sich die Frage, wie das nucleophile Zentrum am N(5) aktiviert wird, um die Formyl-Gruppe aufzunehmen. Die sterisch günstige Konfiguration innerhalb der Äthylendiamin-Gruppierung zwingt geradezu, die Bildung eines cyclischen Phosphamids für die Aktivierung verantwortlich zu machen. Die Formolyse dieser cyclischen Verbindung kann dann analog der Hydrolyse des Anhydrocitrovorumfaktors zu N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure vor sich gehen. So wie dort formal ein Proton an das N(5) tritt, würde sich hier ein Formyl-Kation anlagern. Die Bildung dieses Kations aus der Ameisensäure wird durch den Phosphoryl-Rest begünstigt sein, dessen elektrophile Tendenz durch die Bindung an zwei N-Atome stark erhöht ist. Es entsteht dann N(5)-Formyl-N(10)-phosphoryl-tetrahydrofolsäure, die sich sofort unter Phosphat-Abspaltung zu N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure umlagert.



Schema 3. Aktivierung des Formiates durch Tetrahydrofolat-Formylase (E)<sup>88</sup>

An sich wäre auch eine unmittelbare Formiat-Spaltung des N(10)-Phosphats denkbar, indem sich das Formiat-Anion an den koordinativ 5-bindigen Phosphor anlagert und die Ausbildung der N(10)-C-Bindung eine Folge dieses Angriffs ist, ähnlich der kondensierenden Wirkung anderer Phosphorsäure-Amide<sup>153, 154</sup>:



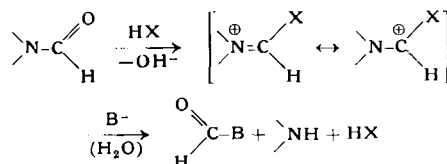
Die Stellung der N(5)-Formyl-N(10)-phosphoryl-Verbindung als Zwischenprodukt bei der Synthese der „aktivierten Ameisen-

<sup>152</sup> F. M. Huennekens, H. R. Whiteley u. M. J. Osborn, J. comparat. Cell. Physiol. 54, Suppl. 1, 109 [1959].

<sup>153</sup> St. Goldschmidt u. H. L. Krauss, Angew. Chem. 67, 471 [1955].

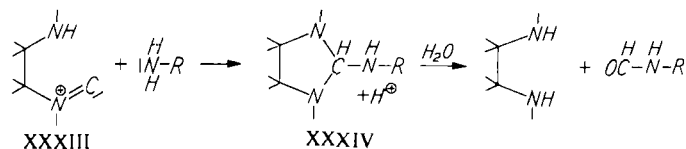
<sup>154</sup> M. Zaoral u. Z. Arnold, Tetrahedron Letters 14, 9 [1960].

säure“ legt einen Vergleich mit der bei der Vilsmeier-Reaktion<sup>155-159</sup> ablaufenden Formylierung nahe:



In beiden Fällen sind Formamide die Formyl-Donatoren; in beiden Fällen dienen Phosphorsäure-Derivate als Aktivierungsmittel. Ganz ähnlich lassen sich nach Ugi<sup>160</sup> Isonitrile aus Formamiden unter dem Einfluß von Phosphoroxychlorid synthetisieren.

Die Rolle, die in diesen Reaktionen das Phosphoroxychlorid spielt (Polarisierung und  $\alpha$ -Eliminierung des Protons der Formylgruppe) könnte in der N(5)-Formyl-N(10)-phosphoryl-tetrahydrofolsäure die Phosphamidgruppe übernehmen. Es entstünde die sehr elektrophile Verbindung (XXXIII). Dieser Zwischenzustand der „aktivierten Ameisensäure“ kann als eigentliches formylierendes Agens angesehen werden. Carbimonium-Verbindungen, wie der Anhydrocitrovorumfaktor, sind nämlich keine besonders wirksamen Alkylierungsmittel. Man kann fast vermuten, daß die intramolekulare Bildung der Carbimonium-Struktur in Abwesenheit eines Formyl-Acceptors es der Zelle ermöglicht, die extrem polarisierte Verbindung im physiologischen Milieu zu stabilisieren und vor dem vorzeitigen Zerfall zu bewahren. Bei der Übertragung der Formylgruppe auf einen nucleophilen Acceptor entsteht intermediär in jedem Fall eine Anlagerungsverbindung (XXXIV), die etwa einem Orthoester vergleichbar ist und in der Richtung zerfällt, in der der größte Energiegewinn erzielt wird, d. h. so, daß mesomerisierbares Formyl am Acceptor und Tetrahydrofolsäure resultieren.



Solche Formiat-Übertragungen lassen sich auch mit den Imidazolinium-Modellen verifizieren, z. B. entsteht aus 2,5,6-Triamino-4-hydroxy-pyrimidin die Purinbase Guanin, oder aus Hydroxylamin erhält man Formhydroxamsäure<sup>47</sup>).

## 11. Enzymatische Reaktionen mit Tetrahydrofolsäure-Modellen

Wir haben gesehen, daß substituierte Äthylendiamine Ameisensäure und Formaldehyd aufnehmen und in gewissem Umfang auch übertragen können. Damit erfüllen sie die chemischen Voraussetzungen für ein Tetrahydrofolsäure-Modell. Wir konnten zeigen, daß sich diese Verbindungen auch unter physiologischen Bedingungen wie Tetrahydrofolsäure verhalten<sup>48</sup>. Sie haben allerdings den Nachteil, daß sie sehr wenig löslich sind und daher die Umsätze gering bleiben. Immerhin konnten wir mit ihrer Hilfe den chemischen und enzymatischen Mechanismus der Reaktionen der Einkohlenstoff-Einheiten sowie die Äthylendiamin-Gruppierung als Wirkort des Coenzyms beweisen<sup>161</sup>. Mit der Folat-Formylase fixiert N,N'-p-Dicarboxyphenyl-äthylendiamin in einer ATP-abhängigen Reaktion Formiat. Es entsteht N-Formyl-N,N'-p-dicarboxyphenyl-äthylendiamin, das chromatographisch und durch seine Umsetzungen identifiziert wurde. Die Affinitäts-Konstanten sind jedoch etwa 100 mal geringer als für den natürlichen Cofaktor. Auch in der Serin-Hydroxymethylase-Reaktion können diese Modelle Tetrahydrofolsäure ersetzen. Das Produkt, N,N'-p-Dicarboxyphenyl-imidazolidin wurde

<sup>155</sup> A. Vilsmeier u. A. Haak, Ber. dtsch. chem. Ges. 60, 121 [1927].

<sup>156</sup> Z. Arnold u. F. Sorn, Chem. Listy 51, 1082 [1957].

<sup>157</sup> C. Jutz, Chem. Ber. 91, 850 [1958].

<sup>158</sup> H. H. Bosshard u. H. Zollinger, Helv. chim. Acta 42, 1659 [1959].

<sup>159</sup> H. Brederick, R. Gompper, K. Klemm u. H. Rempfer, Chem. Ber. 92, 837 [1959].

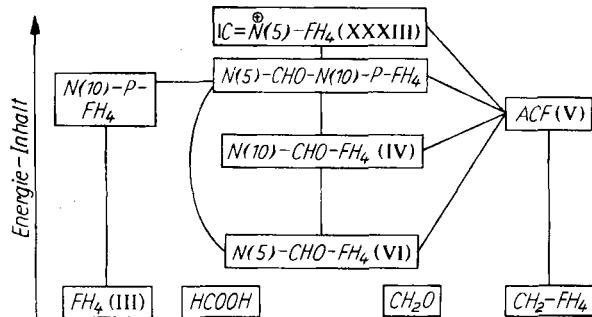
<sup>160</sup> I. Ugi u. R. Meyr, Angew. Chem. 70, 702 [1958].

<sup>161</sup> E. Brode u. L. Jaenicke, Vortr. Dtsch. Ges. Physiol. Chem., Berlin 1959; Ber. wiss. Biol. 215, 38 [1960].

isoliert und charakterisiert. Jedoch läßt sich in diesem Fall keine *Michaelis*-Konstante angeben, da Nebenreaktionen eine saubere Bestimmung kinetischer Daten unmöglich machen. Wie nach dem Redox-Potential der Modelle zu erwarten ist, läßt sich dagegen die Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure - Dehydrogenase nicht zur Oxydoreduktion der Modelle verwenden.

## 12. Energetik der Reaktionen der Einkohlenstoff-Körper

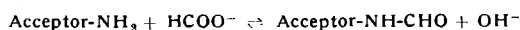
Schema 4 zeigt die postulierten Energie-Niveaus verschiedener Tetrahydrofolsäure-Cofaktoren.



Schema 4. Relative Energie-Inhalte verschiedener „aktivierter“ Einkohlenstoff-Körper.  $\text{FH}_4$  = Tetrahydrofolsäure

Die freien Hydrolyse-Energien der drei Formyl-Derivate der Tetrahydrofolsäure wurden noch nicht gemessen, obwohl sie in diesem Zusammenhang von erheblichem Interesse sind. Man kann sie aber aus den Gleichgewichtskonstanten der nichtenzymatischen Cyclisierung zum Anhydrocitraconiumfaktor abschätzen<sup>10, 46</sup>. Danach ergibt sich als Differenz der freien Energien bei  $p_{\text{H}} = 7$  und  $25^\circ\text{C}$  zwischen N(5)-Formyl-tetrahydrofolsäure und N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure  $\Delta F_0 = +5620$  cal, zwischen dieser Verbindung und Anhydrocitraconiumfaktor  $\Delta F_0 = +1400$  cal. Nimmt man für N(5)-Formyl-tetrahydrofolsäure die Dissoziations-Energie eines einfachen Amids von etwa 2000 cal an, so erhält man für die freie Hydrolyseenergie von N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure  $+7620$  cal und von Anhydrocitraconiumfaktor  $+9070$  cal. Die gleiche Reihenfolge geht auch aus der Messung der Basizitäten hervor<sup>46</sup>. Diese Werte erscheinen allerdings, besonders im Hinblick auf die geringe Reversibilität der Folat-Formylase-Reaktion, reichlich hoch.

Die Energie für die Überführung des Formiats in das cyclische Diamid Anhydrocitraconiumfaktor wird der Spaltung von ATP entnommen. Wie im Abschnitt 5b gezeigt ist, wird ATP hierbei zu ADP und Orthophosphat gespalten<sup>39, 42</sup>, nicht wie bei der Aktivierung der Acyl-Reste an Coenzym A in AMP und Pyrophosphat. Beide Formen der Spaltung sind sich zwar energetisch gleichwertig, denn in beiden Fällen handelt es sich um die Lösung einer Pyrophosphat-Bindung. Der Sinn der Spaltung in ADP und Phosphat ist aber vermutlich darin zu sehen, daß die Formiat-Aktivierungs-Reaktion auf diese Weise reversibel bleibt, also unter bestimmten Umständen zur Energie-Erzeugung verwendet werden kann, besonders bei Koppelung mit den Formimino-Transferasen oder der Hydroxymethyl-Dehydrogenase. Die Frage, welchen Zweck es hat, daß in der Zelle nicht freie Ameisensäure oder freier Formaldehyd, sondern ihre Tetrahydrofolsäure-Derivate reagieren, läßt sich nun beantworten: die Einkohlenstoff-Einheiten werden durch diese Bindung so reaktionsfähig, daß die Mittel der Zelle ausreichen, um die Übertragungen in verdünntem neutralem Medium auszuführen. Eine Formylierung der Acceptoren durch freie Ameisensäure wäre im Milieu der Zelle aus thermodynamischen Gründen unwahrscheinlich. Das aus den Bindungsenergien errechnete Gleichgewicht der Reaktion



liegt mit  $\Delta F > 5$  bis 6 kcal für die Formylierung sehr ungünstig. Durch die Bindung der  $\text{C}_1$ -Einheiten an Tetrahydrofolsäure werden die Reaktionen reversibel.

Wenn aber die Wirkungsgruppe der Tetrahydrofolsäure die Äthylendiamin-Struktur ist, so bleibt es doch verwunderlich, daß sich die Zelle — gleichgültig ob Einzeller, pflanzliches oder tierisches Gewebe — einer derartig komplizierten Verbindung als Äthylendiamin-Komponente bedient. Energetisch betrachtet könnten einfachere Analoge dasselbe leisten. Warum Folsäure verwendet wird, läßt sich zunächst nur entwicklungsgeschichtlich erklären, wobei es immerhin bemerkenswert ist, daß die Biosynthese der Folsäure bereits der Einführung von Ameisensäure in das Pterin-Gerüst bedarf.

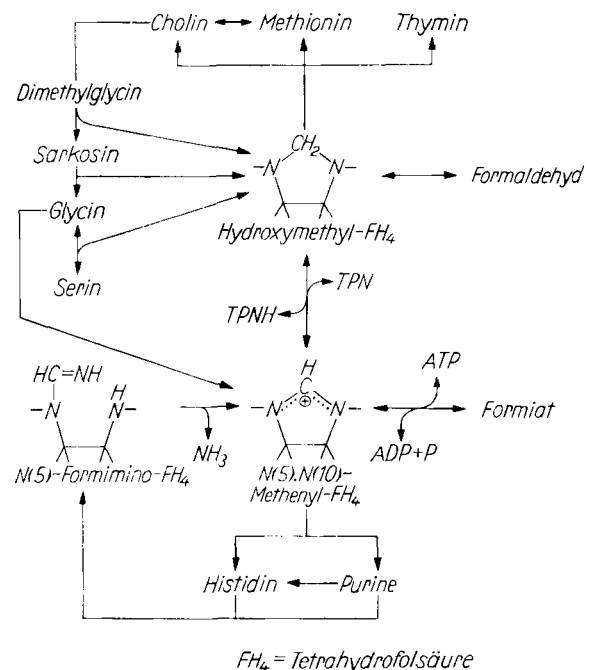
## 13. Zusammenfassung

Im Schema 5 sind die wichtigsten Reaktionen des folsäure-abhängigen  $\text{C}_1$ -Stoffwechsels noch einmal zusammengefaßt. Im Zentrum stehen die beiden  $\text{C}_1$ -Überträger, die das  $\text{C}_1$ -Bruchstück auf der Oxydationsstufe des Formaldehyds (Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure) bzw. auf der Oxydationsstufe der Ameisensäure (N(5).N(10)-Methenyl-tetrahydrofolsäure) enthalten. Beide Verbindungen können durch Redox-Reaktion mit dem TPN/TPNH-System ineinander umgewandelt werden.

Die  $\text{C}_1$ -Einheit in der Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure kann unmittelbar aus Formaldehyd gebildet werden, sie kann aus den N-Methylgruppen des Dimethylglycins oder Sarkosins stammen, und sie kann ihren Ursprung vor allem in der  $\beta\text{-CH}_2\text{OH}$ -Gruppe des Serins haben.

Lieferanten des Methenyl-Restes in der N(5).N(10)-Methenyl-tetrahydrofolsäure sind: freies Formiat unter der Mitwirkung von Adenosintriphosphat (ATP), Glycin sowie die Purine und Histidin (auf dem Wege über N(5)-Formimino-tetrahydrofolsäure). Die Aktivierung freien Formiats ist reversibel und liefert ATP aus ADP und anorganischem Phosphat, wenn die Reaktion von links nach rechts verläuft.

Synthese-Reaktionen, zu denen Hydroxymethyl-tetrahydrofolsäure oder N(5).N(10)-Methenyl-tetrahydrofolsäure ihre  $\text{C}_1$ -Einheiten beisteuern, sind: die Bildung von Thymin, Methionin und Cholin (Methylierung), die Bildung von Serin aus Glycin (Hydroxymethylierung), die Bildung von Purinen und Histidin (Formylierung).



Schema 5. Stoffwechselwege der Einkohlenstoff-Körper

Eingegangen am 16. März 1960 [A 90]