

## Folsäure als Cofaktor biologischer Reaktionen\*

Von L. JAENICKE\*\*

Seit man weiss, dass Vitamine als Cofaktoren enzymatischer Reaktionen fungieren, ist die Suche nach ihren molekularen Mechanismen ein Hauptproblem der Biochemie gewesen. Der Stoffwechsel der Einkohlenstoffeinheit<sup>1</sup> ist aufs engste verknüpft mit dem Vitamin Folsäure (Pteroylglutaminsäure<sup>2</sup>), das die biologische Aktivierung, Übertragung und Umwandlung der Ameisensäure, des Formaldehyds oder der Methylgruppe katalysiert.

Die Folsäure (Fig. 1, I) wirkt in der Zelle in Form der 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure (II) oder eines ihrer als Konjugate bezeichneten Glutamylpeptide. Sie wird durch ein spezifisches, Triphosphopyridinnucleotid als Wasserstoffüberträger erforderndes Ferment, die Folsäure-Reduktase<sup>3</sup>, in zwei aufeinanderfolgenden Stufen reduziert. Biologisch spielt aber nur der zweite Schritt, der reversible Übergang von Dihydrofolsäure (III) in Tetrahydrofolsäure (II), eine grössere Rolle. Dihydrofolsäure ist nämlich zunächst ein Zwischenprodukt der Folsäurebiosynthese; sie entsteht weiter auch bei bestimmten enzymatischen Reaktionen durch intermediäre Oxydation eines Tetrahydrofolsäure-Derivats. Auf Folsäure selbst wird nur im Notfall zurückgegriffen. Sie stellt eine Art Reserve dar.

Inkubiert man rohe Zellextrakte mit Tetrahydrofolsäure, einer Energiequelle und einem Substrat, das im Stoffwechsel ein Einkohlenstoff-Fragment abspalten kann – sei es als Formyl(CHO)-, Hydroxymethyl(CH<sub>2</sub>OH)- oder Methyl(CH<sub>3</sub>)-Gruppe – erhält man stets

die gleiche Verbindung, die durch ihre in Figur 2 zusammengestellten Reaktionen<sup>4</sup> als N(10)-Formyltetrahydrofolsäure identifiziert wurde. Setzt man umgekehrt diese den Zellhomogenaten zu, verschwindet sie. Sie wird entformyliert. Der Formylrest wird dabei aber nicht frei, sondern bleibt in verschiedenen Metaboliten gebunden<sup>5</sup>. Diese Beobachtung bildet den Ausgangspunkt unserer Untersuchungen über die Folsäure-katalysierten Reaktionen. Ihr heutiger Stand soll im folgenden betrachtet werden.

Aus der Formel der Tetrahydrofolsäure ist zu erkennen, dass das Molekül aus zwei Anteilen zusammengesetzt ist, dem Pteridin-Rest und der substituierten p-Aminobenzoesäure, aus welchen es auch biosynthetisch entsteht<sup>6</sup>. Die die beiden Hälften verbindende Methylenbrücke ist von grosser Bedeutung, stellt sie doch einen Teil des Wirkungszentrums des Cofaktors

\* Nach einem Vortrag, gehalten auf der gemeinsamen Tagung der schweizerischen, deutschen und französischen Biochemiker, Zürich (Schweiz), 12. 10. 1960.

\*\* München (Deutschland).

<sup>1</sup> L. JAENICKE, *Angew. Chem.* 73, im Druck (1961).

<sup>2</sup> E. L. R. STOKSTAD in: SEBRELL-HARRIS, *The Vitamins* (Academic Press, N. Y. 1954), Bd. III, p. 87.

<sup>3</sup> S. FUTTERMAN, *J. biol. Chem.* 228, 1031 (1957).

<sup>4</sup> G. R. GREENBERG und L. JAENICKE in: WOLSTENHOLME-O'CONNOR, *Chemistry and Biology of Purines* (Churchill, London 1957), p. 204.

<sup>5</sup> L. JAENICKE, *Habilitationsschrift* (Marburg 1954). – H. M. RAVEN und L. JAENICKE, *Hoppe-Seyler's Z.* 293, 46 (1953).

<sup>6</sup> L. JAENICKE und P. C. CHAN, *Angew. Chem.* 72, 752 (1960).

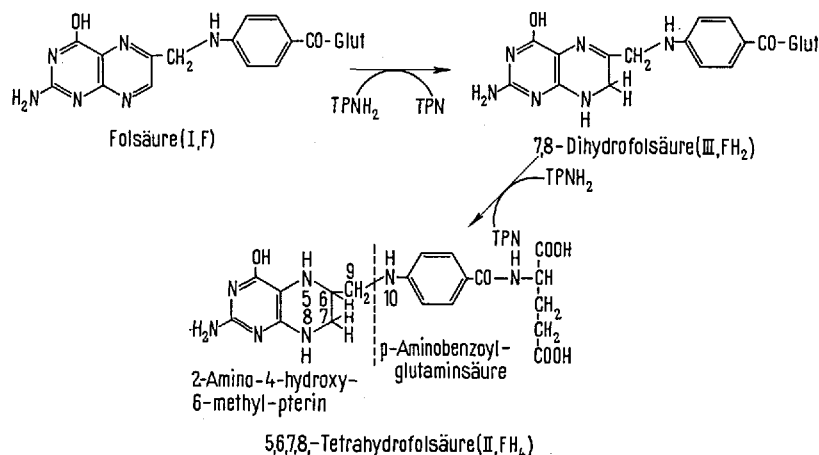


Fig. 1. Folsäure und ihre Reduktionsprodukte.

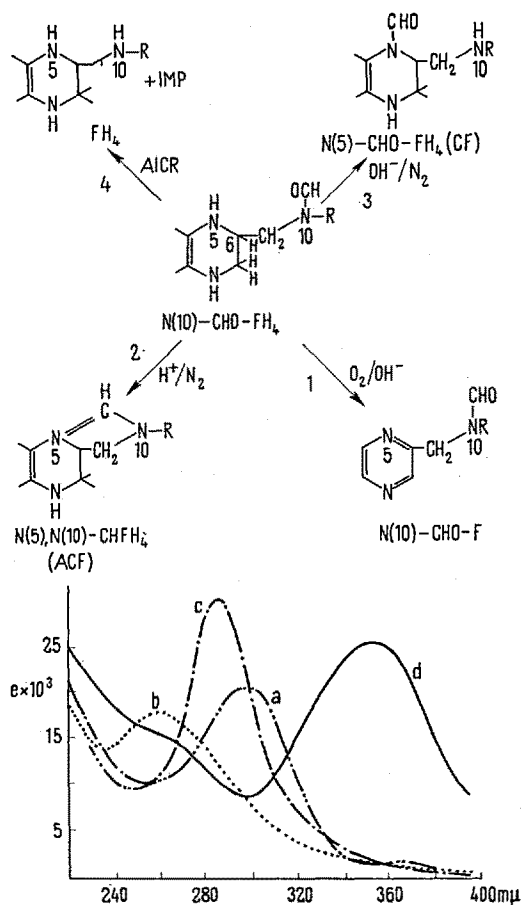


Fig. 2. Strukturbeweis der «aktivierten Ameisensäure». 1. Oxydation zu N(10)-Formyl-dihydrofolsäure und N(10)-Formylfolsäure. 2. Übergang in Anhydroleukovorin beim Ansäuern. 3. Übergang in mikrobiologisch voll aktiven 1, L-Citrovorumfaktor. 4. Transformierung auf Amino-imidazolcarboxamid-ribotid (AICR) zu Inosinsäure (IMP). Unten: Spektren von Tetrahydrofolat-Verbindungen a) Tetrahydrofolsäure, b) N(10)-Formyltetrahydrofolsäure, c) N(5)-Formyltetrahydrofolsäure, d) N(5),N(10)-Anhydroformyltetrahydrofolsäure.

dar, wie es sich bei der Untersuchung Folsäure-katalysierter Reaktionen und auch aus Modellbetrachtungen ergeben hat<sup>7</sup>.

Ausser der oben genannten N(10)-Formyltetrahydrofolsäure, der eigentlichen «aktivierten Ameisensäure», wurden aus biologischem Material ihr im allgemeinen physiologisch unwirksames N(5)-Isomeres, der Citrovorumfaktor<sup>8</sup>, und N(5)-Imidoformyl-tetrahydrofolsäure<sup>9</sup> isoliert. Diese cyclisiert bei der Desaminierung, ebenso wie die beiden Formylverbindungen unter Einwirkung von Protonen, zu einer neuen Verbindung, der N(5),N(10)-Anhydroformyltetrahydrofolsäure<sup>10</sup>, dem Anhydroleukovorin. Durch Reduktion geht daraus die auch natürlich vorkommende stabile N(5),N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure<sup>11</sup> hervor, der «aktivierte Formaldehyd». Dessen Strukturbeweis liegt in der unmittelbaren Synthese, im spektralen Verhalten und in der bemerkenswerten Stabilität des Produkts, die darauf hinweisen, dass sowohl N(10) wie auch einer der Tetrahydropyrazin-Stickstoffe substituiert sind.

Beim Betrachten der Formeln in Figur 3 fällt auf, dass die Umwandlungen und Aktivierungen der gebundenen Kohlenstoffreste an einer eng umschriebenen Stelle des gesamten komplexen Moleküls stattfinden. Wir haben als Wirkungszentrum des Cofaktors die Äthylendiamingruppierung erkannt, die von den Stickstoffen N(5) und N(10) und der sie verbindenden Zweikohlenstoffkette dargestellt wird (Fig. 4). Modell-

<sup>7</sup> L. JAENICKE und E. BRODE, Liebigs Ann. 624, 120 (1959).

<sup>8</sup> H.E. SAUBERLICH und C.A. BAUMANN, J. biol. Chem. 176, 165 (1948).

<sup>9</sup> J. C. RABINOWITZ und W. E. PRICER jr., J. Amer. chem. Soc. 78, 5702 (1956).

<sup>10</sup> M. MAY, T. J. BARDOS, F. L. BARGER, M. LANSFORD, J. M. RAVEL, G. L. SUTHERLAND und W. SHIVE, J. Amer. chem. Soc. 73, 3067 (1951).

<sup>11</sup> L. JAENICKE, Fed. Proc. 15, 281 (1956).

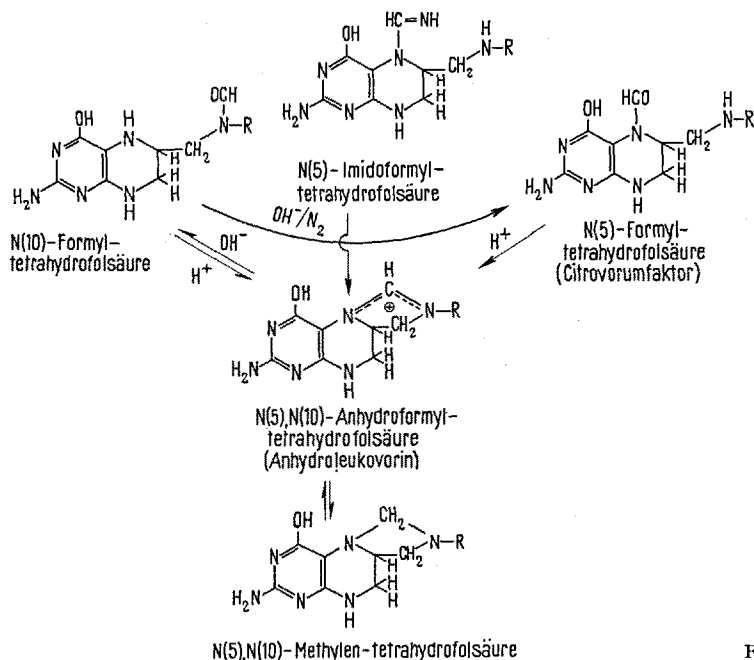


Fig. 3. Natürlich vorkommende Tetrahydrofolat-Derivate.

versuche beweisen, dass diese Anschauung berechtigt ist<sup>7</sup>. Es ist sogar möglich, durch entsprechende Modelle die Folsäure-abhängigen Reaktionen nicht nur chemisch nachzuahmen, sondern darüberhinaus auch am Enzym den natürlichen durch den künstlichen Cofaktor zu ersetzen<sup>12</sup>.

In der Tetrahydrofolsäure ist die Äthylendiamin-gruppe von aromatischen oder quasi-aromatischen Systemen flankiert. Wir synthetisierten daher substituierte Diaryläthylendiamine und konnten mit diesen einfachen Modellverbindungen den Mechanismus der Folsäure-abhängigen Reaktionen studieren<sup>7</sup>. Solche Untersuchungen sind mit Tetrahydrofolsäure nur schwer auszuführen, da ihre Instabilität die Ergebnisse unsicher macht; die Äthylendiamin-Modelle dagegen sind leicht zu handhaben und können sowohl Ameisensäure wie Formaldehyd binden.

Dem Chemiker ist es geläufig, dass diese beiden Moleküle ganz spezifische Reaktionen zeigen, durch die sie sich von ihren höheren Homologen unterscheiden. Diese besondere Reaktionsfähigkeit ist nur zum Teil durch die Dimensionen der beiden Einkohlenstoffkörper bedingt. Einen wesentlichen Beitrag liefern ihre Struktur und die eigenartigen Bindungseigenschaften. Sie bewirken die leichte Addition an Partner mit freiem Elektronenpaar, da die Carbonylbindung durch die benachbarten H-Atome stark polarisiert ist (Fig. 5). In dieser Weise lagert sich Formaldehyd auch an die Stickstoffe der Äthylendiamine zu einem Imidazolidin an. Dieses ist dem aktivierten Formaldehyd strukturanalog und kann auch im schwach alkalischen Milieu Formaldehyd übertragen. Diese Reaktionsfolge hat durchaus ihre Parallele in der bekannten Mannich-Kondensation<sup>13</sup>: Die Verbindung dissoziiert als Kation und kondensiert sich mit dem nucleophilen Partner unter Bildung einer C-C-Bindung. So erhalten wir nach Hydrolyse der schwächeren Bindung zum Heteroatom den freien Donator und eine neue Methylolverbindung.

Freies Formiat lässt sich nur durch verhältnismässig drastische Mittel zu Formaldehyd reduzieren. Die Umwandlung der Imidazolidinverbindungen gelingt aber bereits unter biologischen Bedingungen. Dabei entsteht aus dem gebundenen Formaldehyd gebundenes Formiat – zunächst in Form des Imidazoliniumsalzes, das sich durch ein charakteristisches langwelliges Spektrum auszeichnet. Unter Wirkung von Hydroxylionen wird der Oniumring geöffnet: Man erhält in reversibler Reaktion die gleiche N-Formylverbindung, die man auch durch direkte Kondensation von Ameisensäure mit dem Äthylendiamin darstellen kann.

Die Formylgruppe ist in diesen Verbindungen polarisiert, sozusagen «energiereich», kann eine Hydroxamsäure geben oder sogar formylierend wirken. Als wirk-same Form kann man – wie bei der Vilsmeier Reaktion<sup>14</sup> – die am stärksten polarisierte Grenzstruktur einer solchen Formylverbindung betrachten, das resonanzstabilisierte Isonitriliumsalz<sup>15</sup>. Dieses Kation lässt

sich durch Einwirken von Phosphoroxychlorid auf die Formylverbindung darstellen und zeigt alle Eigenschaften eines aktiven Formyldonators. An ihm greift der negativ geladene Reaktionspartner an, es entsteht eine Orthoverbindung, die in der Richtung des grössten Resonanzenergiegewinns zerfällt, nämlich in formylierten Acceptor und freien Donator. Eine dritte Reaktion der Folat-Coenzyme, die Bildung von Methylgruppen, gelingt mit den einfachen Modellen nicht. Das ist auch nicht zu erwarten, denn, wie wir jetzt wissen, ist für diese Reaktion der Tetrahydropyrazin-Ring der Tetrahydrofolsäure notwendig.

Der fundamentale Mechanismus der Folsäure-katalysierten Reaktionen liegt damit in der Fähigkeit des Vitamins, die Einkohlenstoffkörper in eine aktivierte Form zu bringen, so dass Übertragungen und Umwandlungen des biologischen Bausteins am Cofaktor erfolgen können: An den gebundenen Einkohlenstoff-Einheiten setzen dann Reaktionen in einem physiologischen Milieu ein, die an den freien Substraten nicht möglich wären, da durch die Kondensation mit den Stickstoffatomen die Polarisierung der verschiedenen

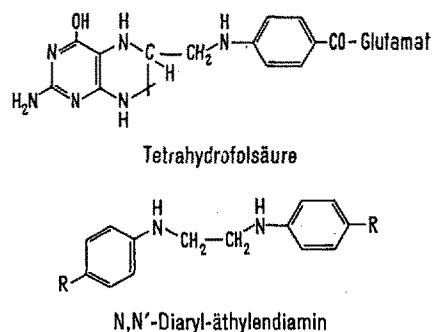


Fig. 4. Diaryläthylendiamine als Modelle der Tetrahydrofolsäure.

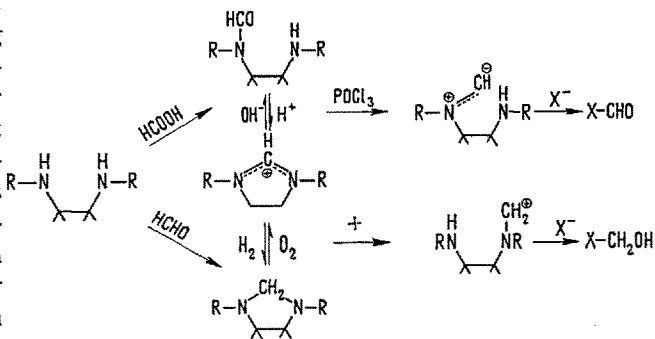


Fig. 5. Reaktionen der Tetrahydrofolatmodelle mit Formiat und Formaldehyd.

<sup>12</sup> E. BRODE, Diplomarbeit (Marburg 1959).

<sup>13</sup> H. HELLMANN und G. OPITZ, *α-Aminoalkylierung* (Verlag Chemie, Weinheim 1960).

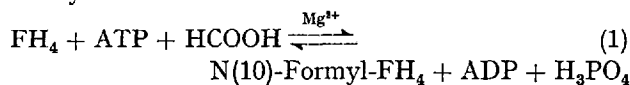
<sup>14</sup> H. H. BOSSHARD und H. ZOLLINGER, *Helv. chim. Acta* **42**, 1659 (1959).

<sup>15</sup> I. UGI und R. MEYER, *Angew. Chem.* **70**, 702 (1958).

Bindungen verändert wird. Der Cofaktor hat dadurch tatsächlich die Funktion eines Katalysators. Alle diese Vorgänge werden in der Zelle durch entsprechende Folatfermente, sog. Pteroproteine<sup>16</sup>, bewirkt. Durch Kombination können sie die verschiedenen Reaktionsketten katalysieren, die anschliessend besprochen werden.

Durch die Arbeiten von GREENBERG<sup>4,17</sup> und BUCHANAN<sup>18</sup> war es bekannt, dass die Biosynthese des Purinrings durch den Ringschluss der 2- und 8-Stellung mit einer Einkohlenstoffeinheit vollendet wird (Fig. 6).

Hierbei wurde auch das erste Mal in einem zellfreien System die enge Verknüpfung dieser Reaktionen mit der Folsäure-aktivierten Ameisensäure gezeigt<sup>19</sup>. Den tatsächlichen Acceptor der aktivierten Einkohlenstoff-Einheit fand GREENBERG im Nucleotid des 5(4)-Aminoimidazol-4(5)-carbonsäure-amids, bei dessen Transformylierung Inosinsäure entsteht<sup>20</sup>. Der Donator ist eine formylierte Tetrahydrofolsäure – allerdings nicht Citrovorumfaktor – die durch ATP-getriebene enzymatische Kondensation aus Tetrahydrofolsäure mit Formiat entsteht<sup>4,21</sup>. Die Aktivierung bewirkende Tetrahydrofolatformylase wurde aus verschiedenen Quellen weitgehend (vgl. <sup>16</sup>) angereichert. Sie katalysiert die reversible Gesamtreaktion<sup>22</sup>.



Die Bilanz dieser Reaktion ist in Tabelle I gezeigt<sup>23</sup>.

Das unmittelbare Produkt der Formylasereaktion ist N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure. Die Brückenverbindung Anhydroleukovorin wird, wie aus Figur 7 hervorgeht, nicht gebildet. Man beobachtet bei spektrophotometrischer Verfolgung der Aktivierungsreaktion keine Veränderung bei 360 m $\mu$ , dem Absorptionsmaximum dieser Verbindung.

Ein interessantes Problem ist der Mechanismus dieser Reaktion, der für eine Reihe ähnlich zu formulierender von grundsätzlicher Bedeutung ist. Die Erhaltung der freien Energie ist ein Prinzip der Energieübertragung. Aus den <sup>18</sup>O-Versuchen von COHN<sup>24</sup> können wir verallgemeinern, dass bei einer Spaltung von ATP in ADP und Orthophosphat die Bindung zwischen dem terminalen Phosphor der ATP und dem Sauerstoff gelöst wird, so dass diese Reaktionen tatsächlich als nucleophile Substitutionen, die katalysierenden Enzyme als Transphosphorylasen zu betrachten sind. Obgleich solche Messungen für die Formylase, die ebenfalls eine spezifische Phosphatase ist, noch nicht vorliegen, sind wir auf indirektem Weg, durch Verfolgen von Austauschreaktionen<sup>25</sup> und durch Hemmversuche zum gleichen Schluss gekommen<sup>26</sup>. Eine ADP-Aktivierung und Formylphosphat als Zwischenprodukt konnten ausgeschlossen werden. Freies anorganisches Phosphat ist nicht an der Rückreaktion beteiligt, wie das auch bei anderen Reaktionen mit gleicher ATP-Bilanz der Fall ist: Wir können daher die

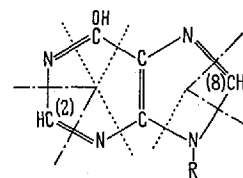


Fig. 6. Schema der Purinbiogenese.

Tab. I. Bilanz der Tetrahydrofolat-Formylase aus Taubenleber

$\text{FH}_4 + \text{HCOOH} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{\text{Mg}^{++}} \text{N(10)-Formyl-FH}_4 + \text{ADP} + \text{P}$					
Start ( $\mu\text{Mol}$ )					
1,26	1,55	1,92	0,0	0,03	0,05
Ende ( $\mu\text{Mol}$ )					
0,84	1,18	1,52	0,38	0,40	0,45
Differenz ( $\mu\text{Mol}$ )					
-0,42	-0,37	-0,40	+0,38	+0,37	+0,40

Ansatz ( $\mu\text{Mol}$ ): Trispuffer pH 7,8 40,  $\text{FH}_4$  1,3,  $\text{HCOOK}$  (5200 cpm/ $\mu\text{M}$ ) 1,5  $\text{MgCl}_2$  2,0, Thioglykolat 6. 60  $\mu\text{g}$  Formylase (3,7 AE). Vol. 0,5 ml. 15 min 37°. Bestimmungsmethoden:  $\text{FH}_4$  und N(10)-Formyl- $\text{FH}_4$  spektrophotometrisch; ATP, ADP enzymatisch im gekoppelten Test; Phosphat nach FISKE-SUBBAROW; Formiat und N(10)-Formyl- $\text{FH}_4$  durch Radioaktivität.

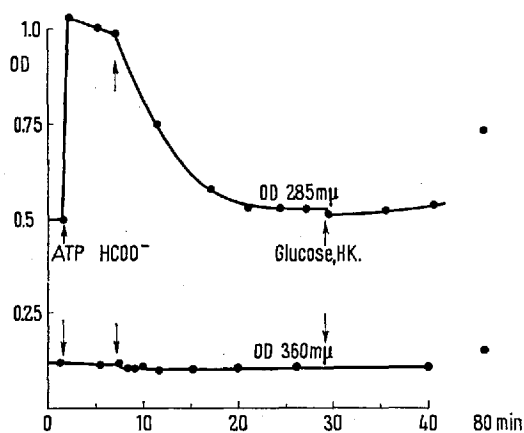


Fig. 7. Optischer Test der Tetrahydrofolat-Formylase. Die Küvette enthält in 0,6 ml: 0,062  $\mu\text{Mol}$   $\text{FH}_4$ , 5  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgCl}_2$ , 6  $\mu\text{Mol}$  Thioglykolat, 23  $\mu\text{g}$  Enzym. Es wurden zugesetzt: 1,0  $\mu\text{Mol}$  Formiat, 0,5  $\mu\text{M}$  ATP, 50  $\mu\text{M}$  Glucose + 30  $\mu\text{g}$  Hexokinase. Raumtemperatur.

<sup>16</sup> F. M. HUENNEKENS und M. J. OSBORN, Adv. Enzymol. 21, 369 (1959). – F. M. HUENNEKENS, H. R. WHITELEY und M. J. OSBORN, J. cell. comp. Physiol. 54, Suppl. 1, 189 (1959).

<sup>17</sup> D. A. GOLDTHWAIT, R. A. PEABODY und G. R. GREENBERG in: McELROY-GLASS, Amino Acid Metabolism (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 765.

<sup>18</sup> J. M. BUCHANAN und S. C. HARTMAN, Adv. Enzymol. 21, 199 (1959).

<sup>19</sup> J. M. BUCHANAN, J. biol. Chem. 202, 241 (1953).

<sup>20</sup> G. R. GREENBERG, Fed. Proc. 12, 651 (1953).

<sup>21</sup> L. JAENICKE, Biochim. biophys. Acta 17, 588 (1955).

<sup>22</sup> G. R. GREENBERG, L. JAENICKE und M. SILVERMAN, Biochim. biophys. Acta 17, 589 (1955).

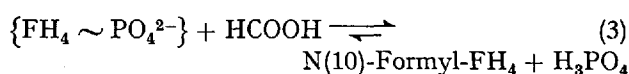
<sup>23</sup> L. JAENICKE und E. BRODE, Biochem. Z., im Druck.

<sup>24</sup> M. COHN, Biochim. biophys. Acta 37, 344 (1960).

<sup>25</sup> L. JAENICKE, 4. Intern. Kongress für Biochemie, Wien 1958 (Pergamon Press, London 1958), Vortragsreferate S. 47.

<sup>26</sup> E. BRODE, Dissertation Marburg (1960). – L. JAENICKE und E. BRODE, in Vorbereitung.

Reaktion als aus Enzym-gebundenen Teilschritten (2) und (3) bestehend formulieren:



in denen das erste Gleichgewicht weit nach links, das zweite weit nach rechts liegt<sup>4</sup>. Für eine signifikante Reaktion wären dann alle Substrate nötig, denn wie bei der Glutathionsynthese<sup>27</sup> ist die Reversibilität der Gesamtreaktion von genügenden Mengen des Zwischenprodukts abhängig, das das Enzym absättigen und die Reaktion umkehren kann.

Durch Spaltung von N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure in Gegenwart von ADP und Phosphat entsteht ATP. Die Formamidbindung der «aktivierten Ameisensäure» stellt also einen neuartigen Typ einer «energiereichen Bindung» dar, die bei dem überaus interessanten, von RABINOWITZ<sup>9,28</sup> auf elegante Weise aufgeklärten anaeroben Abbau des Xanthins durch Bakterien eine Schlüsselposition einnimmt. Hierbei wird aus dem heterocyclischen System durch eine Reihe von vorbereitenden Schritten Imidoformylglycin gebildet (Fig. 8).

Seine HN=CH-Gruppe wird auf Tetrahydrofolsäure übertragen: Es entsteht N(5)-Imidoformyl-tetrahydrofolsäure, die unter enzymatischer Abspaltung von Ammoniak in Anhydroleukovorin übergeht. Dies wird durch eine spezifische Cyclohydrolase in N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure umgewandelt. Die Spaltung dieser Verbindung, zusammen mit der Bildung von ATP, in Umkehr der von uns studierten Formylasereaktion, ist die Basis des Energiestoffwechsels von *Clostridium cylindrosporum* und *Cl. aciduri*.

Das aus den verschiedenen Beobachtungen zusammengesetzte Schema des Mechanismus der Folat-formylase<sup>26</sup> (Fig. 9) besteht primär in der Bildung eines Enzymphosphats, das seine Energie auf Tetrahydrofolsäure überträgt, so dass ein enzymgebundenes Tetrahydrofolylphosphat entsteht. Dies wird formolytisch gespalten, indem zunächst N(5) aktiviert und formyliert wird und ein N(5)-Formyl-N(10)-phosphoryl-Zwischenprodukt auftritt. Zum Verständnis dieses Vorgangs helfen wiederum Versuche mit Modellsubstanzen. Die günstige sterische Konfiguration macht die Bildung eines intermediären cyclo-Phosphats verständlich, und die Formylierung der Phosphamidverbindung lässt sich der Hydrolyse des Anhydroleukovorins an die Seite stellen. So wie in diesem Fall ein Proton addiert wird, greift bei der Formylierung ein Formylkation an. In der Endphase des Mehrzentrenprozesses haben wir dann den Zerfall des Komplexes in Enzym, Phosphat und formylierten Cofaktor. Die gleiche Zwischenverbindung müssen wir auch bei der Isomerisierung des Citrovorumfaktors<sup>29</sup> und bei den Übertragungsreaktionen von Formiat auf Acceptoren

erwarten<sup>18</sup>. In diesem Fall ist tatsächlich eine Phosphatabhängigkeit zu beobachten<sup>30</sup>.

Die einzelnen Schritte des molekularen Mechanismus folgen einander in der Art einer Mehrzentrenreaktion: Die Polarisierung einer Bindung bewirkt sogleich die Polarisierung der nächsten, bis die Endprodukte frei werden. Das schliesslich isolierte Produkt, N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure, liegt auf einem niedrigeren Energieniveau als die Zwischenstufen, wie es in Figur 10 dargestellt ist, die die relativen Energien der verschiedenen bei den Einkohlenstoff-Reaktionen auftretenden Verbindungen darstellt.

Figur 10 deutet gleichzeitig eine weitere wichtige Reaktion der Einkohlenstoffkörper an: Die Bildung der Methylentetrahydrofolsäure aus freiem oder gebundenem Formaldehyd und ihre Oxydation.

Unter den Vorläufern der Formylgruppe der aktiven Ameisensäure ist neben Formiat, Purinen oder Histidin das Serin die wirksamste Verbindung. Sein  $\beta$ -Kohlenstoff steht mit Formaldehyd im Gleichgewicht und man

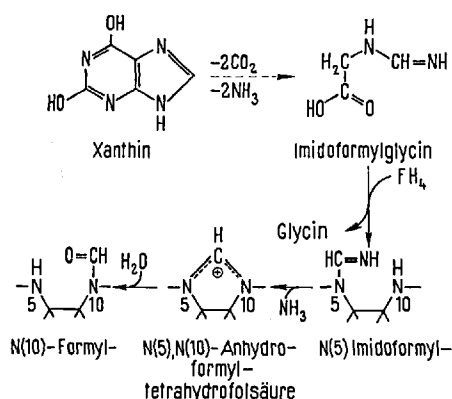


Fig. 8. Anaerober Abbau des Xanthins (gekürzt).

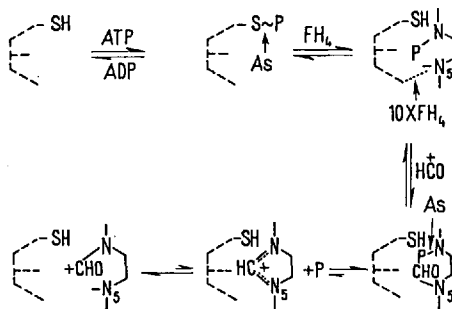


Fig. 9. Vorgeschlagener Mechanismus der Formiataktivierung durch Tetrahydrofolat-Formylase. As und 10X FH<sub>4</sub> hemmen die Reaktion an den angedeuteten Stellen.

<sup>27</sup> J. E. SNOKE, S. YANARI und K. BLOCH, J. biol. Chem. **201**, 573 (1953). - S. MANDELES und K. BLOCH, J. biol. Chem. **214**, 639 (1955).

<sup>28</sup> L. A. HEPPEL und J. C. RABINOWITZ, Ann. Rev. Biochem. **27**, 613 (1958).

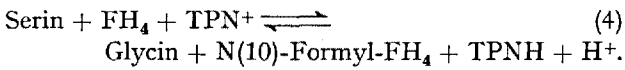
<sup>29</sup> J. M. PETERS und D. M. GREENBERG, J. biol. Chem. **226**, 329 (1957).

<sup>30</sup> Eigene Beobachtungen.

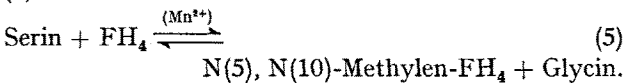
kann sogar sagen, dass Serin das Stoffwechselreservoir an Einkohlenstoff-Bausteinen darstellt, wie es aus den Untersuchungen von SHEMIN<sup>31</sup> und SAKAMI<sup>32</sup> deutlich wird.

Bei der Umwandlung von Glycin und Serin ineinander oder beim Übergang in die Ureid-Positionen der Purine<sup>33</sup> tritt die Kohlenstoffeinheit nicht frei auf<sup>34</sup>, sondern an Tetrahydrofolsäure gebunden. Es war eigentlich hier das erste Mal, dass dieser Cofaktor enzymatisch eingesetzt wurde.

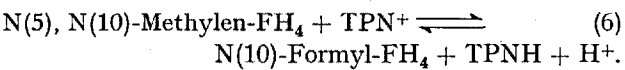
Leberextrakte können nämlich unter diesen Bedingungen den  $\beta$ -Kohlenstoff des Serins in N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure umwandeln, wozu das System Triphosphopyridinnucleotid benötigt<sup>4,11</sup>. Die Gesamtgleichung (4) ergibt sich aus der in Figur 11 gezeigten Bilanz



Es konnte nachgewiesen werden, dass N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure die Formylgruppe unter Reduktion auf Glycin übertragen kann, dass dabei Serin entsteht, die Gesamtreduktion also reversibel ist<sup>5,35</sup>. Nach Auftrennung des Serin-abbauenden Systems in die beiden Enzyme, Serinhydroxymethylase und Methylentetrahydrofolat-dehydrogenase, liess sich der Mechanismus des Vorgangs klären<sup>11</sup>. Das erste, Tetrahydrofolsäure benötigende Enzymsystem hat die folgende Reaktion (5):



Das Reaktionsprodukt, N(5), N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure, dessen Konstitution eingangs erörtert wurde, häuft sich an und kann in der zweiten Reaktion eingesetzt werden. Sie ist TPN<sup>+</sup>-abhängig und folgt der Gleichung (6):



Die Tabelle II zeigt, dass die Reaktionen der angegebenen Formulierung folgen: Mit Serinhydroxymethylase entstehen «aktiver Formaldehyd» und Glycin in äquimolaren Mengen. Die Dehydrogenase reagiert nicht mit Serin. Koppeln wir jetzt beide Enzyme, finden wir N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure und Glycin, nicht jedoch «aktiven Formaldehyd». Setzt man diesen aber ein, kann er durch Triphosphopyridinnucleotid oxydiert werden. Das lässt sich bequem im optischen Test (Fig. 12) verfolgen, der gleichzeitig beweist, dass die Reaktion für dieses Pyridinnucleotid spezifisch ist. Weitere Fraktionierung und Versuche mit Modellverbindungen der Tetrahydrofolsäure ergaben, dass die Serinhydroxymethylase als Cofaktor Pyridoxalphosphat benötigt<sup>11,36</sup>. Tetrahydrofolsäure ist also eines der beiden Substrate der Enzyme. Wir

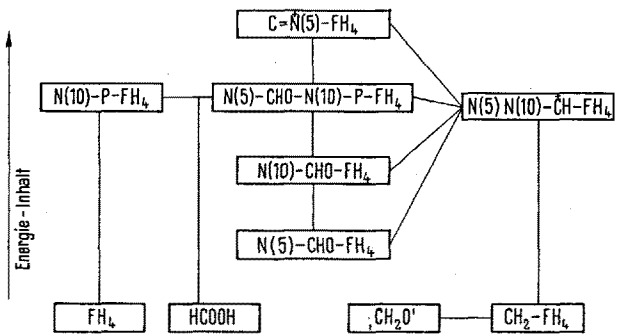


Fig. 10. Relative Energie-Inhalte verschiedener Einkohlenstoffkörper.

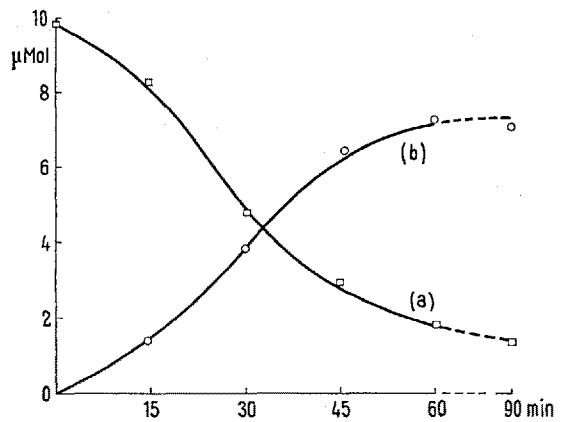


Fig. 11. Bilanz der Serinspaltung. Inkubiert wurden: 10  $\mu$ Mol  $\beta$ -<sup>14</sup>C-Serin, 2  $\mu$ Mol FH<sub>4</sub>, 300  $\mu$ g DPN, 5  $\mu$ Mol  $\alpha$ -Ketoglutarat, 5  $\mu$ Mol Pyruvat, 0,15 mg Schweineleberextrakt. Die Aminosäuren wurden papierchromatographisch als Dinitrophenylderivate isoliert (Rf in Toluol (50)-Pyridin (10)-Äthylchlorhydrin (30)-0,8 M NH<sub>4</sub>OH (30); org. Phase: Glycin 0,37; Serin 0,30; die Folatverbindungen in 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 10<sup>-3</sup> M Komplexon + 10<sup>-2</sup> M Thioglykolat (Rf: N(10)-Formyl-FH<sub>2</sub> 0,46; Citrovorumfaktor 0,72). □ Serin (a) ○ Formyl-folatverbindungen (gesamt) (b).

Tab. II. Bilanz der Serinspaltung

	(A)			
	Serin + FH <sub>4</sub>	Methylen-FH <sub>4</sub> + Glycin	Formyl-FH <sub>4</sub> + TPNH + H <sup>+</sup>	
	(B)			
	Methylen-FH <sub>4</sub> + TPN <sup>+</sup>	Formyl-FH <sub>4</sub> + TPNH + H <sup>+</sup>		
Serinhydroxymethylase (A)	+	+	—	—
Dehydrogenase (B)	+	—	+	+
Serin (2 $\mu$ Mol)	+	+	+	—
Methylen-FH <sub>4</sub> (0,1 $\mu$ Mol)	—	—	—	+
Glykokoll ( $\mu$ Mol)	0,24	0,19	0,03	—
Methylen-FH <sub>4</sub> ( $\mu$ Mol)	0	0,27	—	—
Formyl-FH <sub>4</sub> ( $\mu$ Mol)	0,20	0	0,02	0,085

Ansatz ( $\mu$ Mol): TPN<sup>+</sup> 0,1, FH<sub>4</sub> 0,6, MnCl<sub>2</sub> 1,8, Pyruvat 10, MDH 25E in 1 ml 0,05 M K-phosphat pH 7,8

<sup>31</sup> D. SHEMIN, J. biol. Chem. 162, 297 (1946).  
<sup>32</sup> W. SAKAMI in: McELROY-GLASS, *Amino Acid Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 658.  
<sup>33</sup> D. B. SPRINSON in: McELROY-GLASS, *Amino Acid Metabolism* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1955), p. 608.  
<sup>34</sup> C. MITOMA und D. M. GREENBERG, J. biol. Chem. 196, 599 (1952).  
<sup>35</sup> R. L. KISLIUK und W. SAKAMI, Fed. Proc. 13, 242 (1954). — R. L. BLAKLEY, Biochem. J. 58, 448 (1954).  
<sup>36</sup> S. DEODHAR und W. SAKAMI, Fed. Proc. 12, 195 (1953).

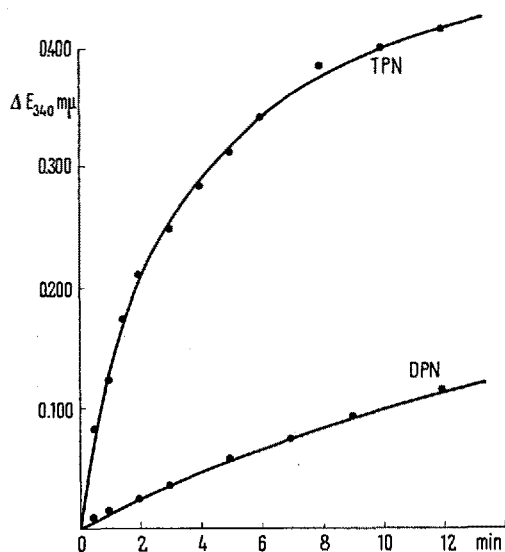


Fig. 12. Optischer Test der Methyltetrahydrofolat-Dehydrogenase aus Taubenleber. Die Küvette enthält: 0,6  $\mu$ Mol N(5), N(10)-Methyltetrahydrofolsäure (papierchromatographisch einheitlich, Rf ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 0,66–0,69); 10  $\mu$ Mol KCl, 5  $\mu$ Mol  $\text{MgCl}_2$ , 22  $\mu$ g Enzymprotein in 0,95 ml 0,02 M K-phosphat. 25°. Bei 0 min Zugabe von 0,5  $\mu$ Mol TPN<sup>+</sup> bzw. DPN<sup>+</sup>.

konnten im Verlauf unserer Modelluntersuchungen zum Verständnis der Mechanismen von Folat-katalysierten Reaktionen nachweisen, dass tatsächlich eine Additionsverbindung des Pyridoxal-aktivierten Serins<sup>37</sup> mit der Wirkgruppe der Tetrahydrofolsäure entsteht<sup>38</sup>. Weder Pyridoxal noch das aromatische Äthylendiamin können für sich Serin spalten. Mit beiden zusammen aber werden grosse und stöchiometrische Mengen an gebundenem Formaldehyd und Glycin gemessen. Die in Figur 13 gezeigte Reaktionsfolge gibt daher ein Bild des Mechanismus der Serinhydroxymethylase und damit eines der wichtigsten Schritte zur Bereitstellung biologisch aktiver Einkohlenstoff-Fragmente. Auch hier lässt sich am Enzym ein echtes Zwischenprodukt nicht isolieren, weil Knüpfen und Lösen der im Reaktionskomplex zusammengefassten Bindungen voneinander abhängen.

Während bei dieser Reaktion gezeigt werden konnte<sup>39</sup>, dass die Reduktion des Formylrestes unmittelbar durch reduziertes Pyridinnucleotid bewirkt wird, nicht durch die labilen Wasserstoffe des Cofaktors, kennen wir eine andere Gruppe von Reaktionen, bei denen Tetrahydrofolsäure direkt als Reduktionsmittel dient. Obschon diese Möglichkeit seit längerem diskutiert wurde, ist sie doch erst in letzter Zeit für die Bildung der Methylgruppe des Thymins und Methionins nachgewiesen worden. Seit den Arbeiten von SPRINSON<sup>33</sup> ist es bekannt, dass wiederum die  $\beta$ -Gruppe des Serins, die, wie wir gesehen haben, im Stoffwechsel so leicht in aktiven Formaldehyd übergeht, auch der beste Vorläufer der Methylgruppen von Thymin und Methionin ist<sup>39</sup>. Wie dieser potentielle kann auch freier Formaldehyd mit Hilfe von Tetrahydrofolsäure als Methyltetrahydrofolsäure an solchen Reaktionen teilnehmen.

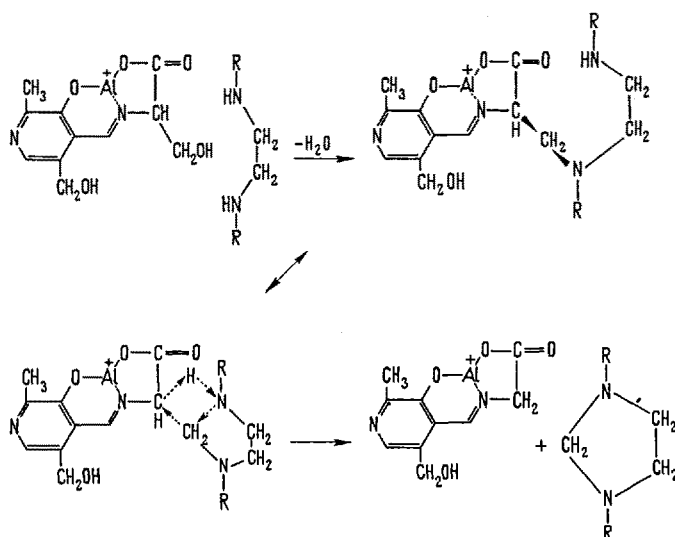
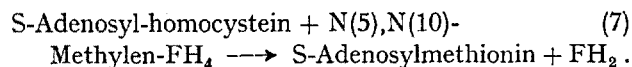


Fig. 13. Reaktionsmechanismus der Serinhydroxymethylase.

Acceptor ist bei der Thyminsynthese ein Uracilderivat<sup>40</sup>, bei der Methionin-Synthese<sup>41, 42</sup> ein Derivat des Homocysteins<sup>41</sup>, und zwar, entsprechend Gleichung (7), S-Adenosyl-homocystein<sup>43</sup>.



Die primären Produkte sind S-Adosylmethionin und Dihydrofolsäure, die durch spezifische Reaktionen, nämlich Kreatinmethylperase bzw. Dihydrofolatreduktase, nachgewiesen werden konnten. Sie entstehen in einander ungefähr entsprechenden Mengen (Tab. III).

Tab. III. Stöchiometrie der Methionin-Synthese

Versuch	Methionin ( $\mu$ Mol)	Dihydrofolat ( $\mu$ Mol)
I. 30 min	62	80
II. 60 min	110	143

Ansatz ( $\mu$ Mol): Adenosylhomocystein 2,0,  $^{14}\text{CH}_3\text{O}$  (8600 cpm/ $\mu$ M) 1,5,  $\text{FH}_4$  0,6, K-phosphat pH 7,2 10. Vol. 0,3 ml. 37°. Nach Versuchsende wurden aliquote Teile chromatographiert bzw. mit TPNH und Folsäurereduktase und mit Kreatin-Methylperase getestet.

<sup>37</sup> A. E. BRAUNSTEIN in: BOYER-LARDY-MYRBÄCK, *The Enzymes* (Academic Press, N.Y. 1960), vol. II, p. 113.

<sup>38</sup> E. BRODE und L. JAENICKE, *Biochem. Z.* 332, 259 (1960).

<sup>39</sup> S. KIT, *Cancer Res.* 17, 56 (1957).

<sup>40</sup> M. FRIEDKIN und A. KORNBERG in: McELROY-GLASS, *The Chemical Basis of Heredity* (The Johns Hopkins Press, Baltimore 1957), p. 609.

<sup>41</sup> P. BERG, *J. biol. Chem.* 205, 145 (1953).

<sup>42</sup> A. STEVENS und W. SAKAMI, *J. biol. Chem.* 234, 2063 (1959).

<sup>43</sup> W. WILMANN, B. RÜCKER und L. JAENICKE, *Hoppe-Seyler's Z.* 322, 283 (1960).

Inkubiert man «aktiven Formaldehyd» mit einer Proteinfraction aus Schweineleber, wird er in eine neue Verbindung (Fig. 14) umgewandelt, die mit Hilfe eines weiteren Enzyms die Einkohlenstoffgruppe direkt auf Adenosylhomocystein übertragen kann und die wir daher als ein N-Methylderivat der Dihydrofolsäure formulieren.

Welches sind nun die Beweise für eine unmittelbare Beteiligung der Tetrahydrofolsäure an der Methylgruppenbildung aus Formaldehyd? Zunächst wurde gefunden, dass die Reaktion kein Reduktionsmittel erfordert, wenn Substratmengen an Tetrahydrofolsäure zugegen sind. Die Menge synthetisiertes Methionin ist etwa der Menge Tetrahydrofolsäure proportional. Werden dagegen nur katalytische Mengen des Cofaktors zugesetzt, ist ein Reduktionsmittel, nämlich Triphosphopyridinnucleotid, ein oxydierbares Substrat und eine Dehydrogenase als regenerierendes System erforderlich. Die Menge verbrauchtes Triphosphopyridin-nucleotid- $H_2$  ist der Menge des Methionins äquivalent. Das heisst aber, dass die Wasserstoffe der Tetrahydrofolsäure offenbar unmittelbar zur Reduktion der Hydroxymethylgruppe genutzt werden. Wenn das der Fall ist, sollte sich Tritiummarkierung aus Tetratritiofolsäure in der Methylgruppe wiederfinden. Das wird nach den Ergebnissen der Tabelle IV tatsächlich beobachtet. Tritium-markierte Tetrahydrofolsäure erhält man durch Reduktion von Folsäure mit Natriumbortritid. Setzt man diese in der enzymatischen Reaktion als Substrat, zusammen mit Adenosyl-homocystein ein, isoliert das entstandene Methionin und spaltet die Methylgruppe ab, findet man das Tritium ohne wesentliche Verdünnung lediglich in der Methylgruppe, während der Rest des Moleküls unmarkiert bleibt.

Figur 16 formuliert unsere Vorstellung vom Mechanismus dieser neuartigen Reduktionsreaktion, bei der die Einkohlenstoffeinheit durch den Cofaktor nicht nur aktiviert und übertragen, sondern darüber hinaus intramolekular umgewandelt wird. In N(5), N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure ist der Wasserstoff am Kohlenstoffatom (6) gelockert, wie wir aus dem Zerfall des Moleküls in Dihydro-xanthopterin, Formaldehyd und *p*-Aminobenzoessäure wissen<sup>1,30</sup>. Das hiervon abgespaltene Hydrid-Ion lagert sich an das Methylen-Kation an. Es entsteht unter Ausbildung der Doppelbindung die quaternäre Verbindung, die in üblicher Weise als Transmethylierungsmittel dient und die Methylgruppe auf einen nucleophilen Partner überträgt. Das Endprodukt ist der methylierte Acceptor, also Thymin oder Methionin und Dihydrofolsäure.

Obwohl man bei dieser Umlagerungs-Reaktion einen weiteren Cofaktor wohl erwarten könnte und auch Untersuchungen von Woods<sup>44</sup> und von BUCHANAN<sup>45</sup> eine Beteiligung von Vitamin B<sub>12</sub> vermuten lassen, konnten wir bei der Methylgruppenbildung mit Leberenzymen bisher keinen Einfluss von Cobalaminderi-

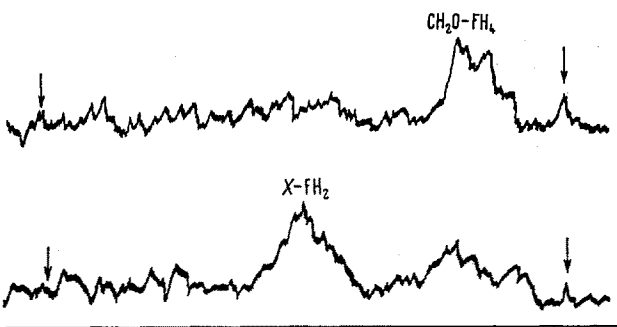


Fig. 14. Enzymatische Umwandlung von Methylen-tetrahydrofolsäure in «Methyldihydrofolat». Chromatographie in 5% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/Amylalkohol. Streifen-zählung mit FH 452.

Tab. IV. Einbau von Tritium in Methionin

Tritio-FH <sub>4</sub> (ges. Impulse)	Methionin Spez. Akt.	Tritium in Methyl	Tritium in Homocystein
64 000	5 600	+	0
80 000	6 300	+	0

Tritio-FH<sub>4</sub> (durch Reduktion von FH<sub>2</sub> mit NaBT<sub>4</sub>), 0,16 μMol; Adenosylhomocystein 2,0 μMol; CH<sub>2</sub>O 1,5 μMol in 0,3 ml K-phosphat pH 7,4. Nach Inkubation wurden Folatverbindungen an Kohle adsorbiert und Methionin isoliert. Zählung im Gasdurchflusszähler.

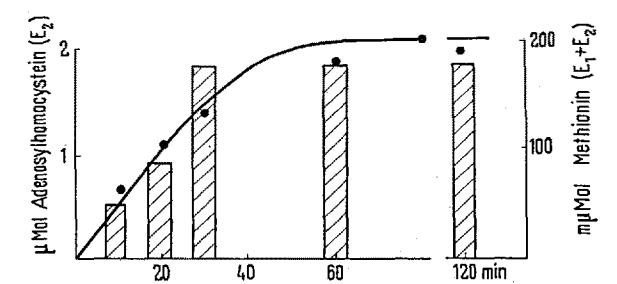


Fig. 15. S-Adenosylhomocystein als Acceptor der Methylgruppe. Präinkubation von ATP und Homocystein mit Adenosylhomocystein-Synthetase. Entfernung von ATP mit Apyrase, Hauptinkubation mit Methylen-tetrahydrofolsäure und Enzym I + II. Analyse durch Messung des *de novo* entstandenen Methionions.

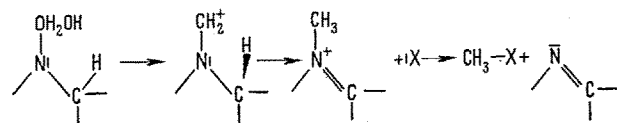


Fig. 16. Vorgeschlagener Mechanismus der Methylgruppenbildung.

<sup>44</sup> R. L. KISLIUK und D. D. WOODS, Biochem. J. 75, 467 (1960).  
<sup>45</sup> F. T. HATCH, S. TAKEYAMA, R. E. CATHOU, A. R. LARRABEE und J. M. BUCHANAN, J. Amer. chem. Soc. 81, 6525 (1959).



vaten beobachten. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die mitgeteilten B<sub>12</sub>-Effekte an der Bildung des eigentlichen natürlichen Folat-Cofaktors<sup>46</sup> beteiligt sind, dessen Struktur noch immer unbekannt ist. Tetrahydrofolsäure selbst scheint nur ein Bruchstück zu sein, das das aktive Zentrum des Cofaktors enthält<sup>47</sup>.

Die Funktion biologischer Katalysatoren besteht darin, den Energiebedarf biochemischer Reaktionen zu vermindern, indem sie Bindungen bilden und lösen, ohne dass die Bindungsenergie verloren geht. Um jedoch ihre Funktion als Katalysator erfüllen zu können, müssen die Cofaktoren aber auch noch in einem cyclischen Prozess stehen, in dem sie zurückgebildet werden und in die Reaktionen von neuem eintreten.

Unter diesem Gesichtspunkt sollen die geschilderten Reaktionen noch einmal in Figur 17 zusammengefasst werden.

Die biologische Umwandlung der Einkohlenstoff-Fragmente geht vom Serin als der Hauptquelle der Kohlenstoffeinheiten aus. Die Reaktionsschritte seiner Spaltung haben wir oben kennengelernt. Die dabei entstandene N(5), N(10)-Methylen-tetrahydrofolsäure kann die Hydroxymethylgruppe in einem Transhydroxymethylierungs-Cyclus auf Acceptoren wie Glycin oder Pyrimidine übertragen, wobei der Cofaktor wieder frei wird. Andererseits kann in der Triphosphopyridinnucleotid-abhängigen Dehydrogenasereaktion N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure gebildet werden. Diese Verbindung wird aber auch durch Spaltung der N(5)-Formamido-tetrahydrofolsäure oder durch direkte Aktivierung der Ameisensäure erhalten, wobei ATP-Energie benötigt wird, die bei der Formaldehydoxydation in Form der Oniumenergie von oxydiertem Pyridinnucleotid übertragen wird. Die «aktivierte Ameisensäure» ist nun der Träger des Formylrestes für die Bildung des Purinrings, wobei, wie BUCHANAN<sup>48</sup> gefunden hat, je nach der Reversibilität des Schrittes entweder die offene Form, N(10)-Formyl-tetrahydrofolsäure, in der nahezu irreversiblen Formylierung des 5(4)-Aminoimidazol-4(5)-carboxamid-ribotids, oder das cyclische Anhydrid, Anhydroleukovorin, in der reversiblen Formylierung des Glycinamid-ribotids, verwendet wird. Bei allen diesen Reaktionen wird ebenfalls wieder der Cofaktor in unveränderter Form frei, so dass sich ein Transformylierungs-Cyclus schliessen lässt. Für den Notfall steht aber eine von HUENNEKENS<sup>49</sup> entdeckte Deformylase bereit, die die N-Formylverbindung hydrolysiert und damit als Sicherheitsventil bei Verarmung an freiem Cofaktor dienen kann. Andererseits ist die Zelle in der Lage, den formylierten Cofaktor in den stabilen, aber unwirksamen Citrovorumfaktor – unter Energieverlust – umzuwandeln und auf diese Weise Formylreste zu speichern. Schliesslich geht von der Methylenverbindung noch ein weiterer Kreislauf aus. Die intramolekulare Reduktion – oder die Hydrid-Spaltung eines Kondensationsproduktes – führt zu

Methylgruppen und Dihydrofolsäure. Diese wird durch die spezifische Reduktase in Tetrahydrofolsäure zurückverwandelt und vollendet auf diese Weise den Kreis. Alle diese Reaktionen des *einen* Cofaktors Tetrahydrofolsäure dienen somit der Zelle als Grundlage der verschiedenen Synthesen wichtiger Zellbausteine: von Purinen, Pyrimidinen und Aminosäuren bis zu den Kohlehydraten, an denen Einkohlenstoffkörper teilnehmen. Einige kennen wir nunmehr auch in ihrem Mechanismus und es ist wohl klar, dass unser Mangel an Kenntnis der anderen nicht auf einem Mangel an Möglichkeiten beruht<sup>49</sup>.

**Summary.** Tetrahydrofolate requiring enzymes catalyze three types of biochemical reactions, *viz.* formylation, hydroxymethylation, and methyl group formation. Their chemistry and mechanism of action is discussed on the molecular level. There is evidence, from model reactions, that the ethylene diamine grouping in tetrahydrofolic acid is the active center of the cofactor. Its condensation with one-carbon compounds, together with those of the labile hydride ion of the tetrahydropteridine ring, make clear the enzymatic steps by which the one carbon fragment is activated, transferred, and reduced. In cell metabolism, these cycles are geared together by the key compound N(5), N(10)-methylene tetrahydrofolic acid. Through a TPN-linked oxidation, N(10)-formyl tetrahydrofolic acid is produced, from which energy can be derived; by intramolecular reduction, the methyl group is formed.

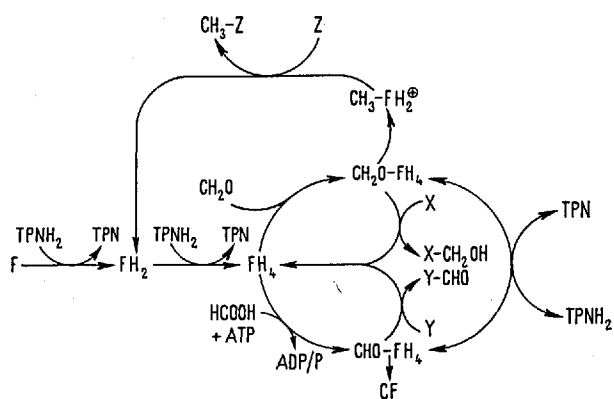


Fig. 17. Tetrahydrofolsäure-katalysierte Biosynthesecyclen.

<sup>46</sup> B. E. WRIGHT, 4th Intern. Congr. Biochem. Vol. XI, *Vitamin Metabolism* (Pergamon Press, London 1958), p. 266.

<sup>47</sup> M. SILVERMAN und B. E. WRIGHT, *J. Bacteriol.* 72, 373 (1956).

<sup>48</sup> M. J. OSBORN, Y. HATEFI, L. D. KAY und F. M. HUENNEKENS, *J. biol. Chem.* 227, 637 (1957).

<sup>49</sup> Ich danke Dr. G. R. GREENBERG für viele Monate glücklicher Zusammenarbeit, sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Fa. C. H. Boehringer, Ingelheim, für grosszügige Unterstützung der hier zusammengefassten Arbeiten.