

Der Wirkungsantagonismus Sulfathiazol-Folsäuregruppe bei *Neurospora crassa**

Von

H. M. Rauen, G. Hess und J. Mechery

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Münster

(Der Schriftleitung zugegangen am 17. Dezember 1958)

Neurospora crassa ist zur Biosynthese des enzymatischen Komplexes des Transformylase-Systems^{1,2} (CoF**) befähigt, denn zum Wachstum benötigen die Wildstämme außer anorganischen Salzen, einer N-Quelle (NO₃-N oder NH₄-N) und einer C-Quelle (Saccharose, Glucose) nur Biotin³, aber weder Pab noch eine der Substanzen der Folsäuregruppe***. Sulfonamide hemmen das Wachstum, wobei die Conidienkeimung empfindlicher reagiert als das Mycelwachstum⁴, und Pab enthemmt wieder, in Übereinstimmung mit der Theorie von Woods^{5,6}.

Da sich der Horizontalwuchstest mit *N. crassa*⁷ zur quantitativen Hemmungsanalyse eignet⁸, wurden mit ihm die enthemmenden Wirkungen von Pab, Pab-Glu und Angehörigen der Folsäuregruppe auf das durch Sulfathiazol partiell gehemmte Wachstum des Wildstammes 3177-4A verglichen, um Anhaltspunkte für den Reaktionsverlauf der Biosynthese von CoF zu erhalten.

* Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Research Corporation, New York, und der Gesellschaft zur Förderung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

** Es werden folgende Abkürzungen gebraucht: CoF = enzymat. Komplex des Transformylase-Systems, Pab = *p*-Amino-benzoessäure, Glu = L(+)-Glutaminsäure, Pab-Glu = *p*-Amino-benzoyl-L(+)-glutaminsäure, Pts = Pteroinsäure, 10-CHO-Pts = 10-Formyl-pterinsäure (Rhizopterin), Ptgs = Pteroylglutaminsäure, 5-CHO-PtgsH₄ = 5-Formyl-5.6.7.8-tetrahydro-pteroylglutaminsäure (Citrovorum-Faktor, synthet. Racemat: Leukovorin), 10-CHO-Ptgs = 10-Formyl-pteroylglutaminsäure.

*** Hierunter werden alle Verbindungen mit dem Grundgerüst Pteridin-Pab-Glu verstanden.

¹ J. M. Buchanan u. D. W. Wilson, Federation Proc. **12**, 646 [1953]; G. R. Greenberg, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1458 [1954]; Federation Proc. **13**, 221 [1954]; A. Wacker, H. Grisebach, A. Trebst u. F. Weygand, Angew. Chem. **66**, 326 [1954].

² F. Weygand, A. Wacker, A. Trebst u. O. P. Swoboda, Z. Naturforsch. **11b**, 689 [1956].

³ E. T. Butler, W. J. Robbins u. B. O. Dodge, Science [New York] **94**, 263 [1941]; G. W. Beadle u. E. L. Tatum, Proc. nat. Acad. Sci. USA **27**, 499 [1941].

⁴ E. L. Tatum u. G. W. Beadle, Proc. nat. Acad. Sci. USA **28**, 234 [1942].

⁵ D. D. Woods, Brit. J. exp. Pathol. **21**, 74 [1940]; D. D. Woods u. P. Fil-des, J. Soc. chem. Ind. **18**, 133 [1940].

⁶ D. D. Woods, Ann. Rev. Biochem. **16**, 616 [1947].

⁷ F. J. Ryan, G. W. Beadle u. E. L. Tatum, Amer. J. Bot. **30**, 784 [1943].

⁸ H. M. Rauen, G. Hess u. J. Mechery, diese Z. **315**, 46 [1959], vorstehend.

Bei den erfolgreichen Versuchen, mit der Mutanten-Methode Stoffwechselfvorgänge aufzuklären, insbesondere Einblicke in die Biosynthese der B-Vitamine zu erhalten⁹, erstaunte es, daß sich keine stabile Mutante finden ließ, die eine der stabilen Substanzen der Folsäuregruppe zum normalen Wachstum benötigt¹⁰. Wir kennen nur einige stabile Pab-benötigende Mutanten von *N. crassa*, von denen drei genetisch eingehend untersucht sind¹¹, mit den Genbezeichnungen und Isolierungsnummern: pab-1, 1633^{4,10,12}, pab-2, H 193^{12,13} und pab-3, 71301^{10,12}. Bei keiner dieser Mutanten ließ sich Pab durch eine der stabilen Folsäuren als Wachsfaktor ersetzen¹⁴. Bei einer weiteren pab-Mutante, 8043 M, konnten Ptg_s, Methionin oder *p*-Toluidin an die Stelle der Pab treten¹⁵.

Methodik

Verwendete Substanzen*: Pab, Pab-Glu, Ptg_s und 10-CHO-Ptg_s (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach**). Pts, Leukovorin (Lederle Cyanamid Co., München bzw. Pearl River, N.Y.**). Rhizopterin (Merck, Sharp & Dohme, New Jersey**). Sulfathiazol (Farbenfabriken Bayer, Wuppertal**).

Versuche zur Isolierung von Ptg_s-Mutanten: Nach der üblichen Vorschrift¹⁰ wurden fünf Tage alte Conidien des Wildstammes 3178-2a in steriler wäßr. Suspension mit 550 r bestrahlt und diese auf fünf Tage alte Mycelrasen des Wildstammes 3177-4A mit reichlich Perithezien, die auf Westergaard-Mitchell-Medium¹⁶ wuchsen, aufgesprüht¹⁷. Zwischen dem 11. und 17. Entwicklungstage wurden die Ascosporen auf Agar-Minimal-Medium ausgestreut und nach 8–12-stdg. Auskeimen mutmaßliche Mutanten mit einer Lanzette unter dem Präpariermikroskop entnommen und nach Beadle und Tatum getestet¹⁰. Unter etwa 2000 Isolierungen befanden sich die üblichen morphologischen und biochemischen Mutanten, jedoch keine, die Ptg_s zum Wachstum benötigte.

Horizontalwuchstest: Die Hemmwirkung von Sulfathiazol auf das Wachstum von *N. crassa* im Horizontalwuchstest⁴ wurde in der vorhergehenden Arbeit als alc4-Hemmtyp beschrieben (s. l. c.⁸, Abb. 3), ebenso eine Verlaufsform der Enthemmung mit Pts (s. l. c.⁸, Abb. 6). Hier untersuchten wir die Verlaufsformen der Enthemmungen mit den oben genannten Substanzen bei 0,8, 1,0 und 1,3 mg Sulfathiazol/ml.

Ergebnisse

Alle hier untersuchten Verbindungen heben die Sulfathiazol-Hemmung prinzipiell auf, doch in graduell sehr verschiedenem Maß. Keine enthemmt im Bereich der experimentell möglichen Konzentrationen vollständig. Die Kurven der Dosis-Zeit-Beziehungen für eine festgesetzte Wuchsstrecke nähern sich bei diesen Verbindungen mit Ausnahme des

* Abkürzungen s. Anmerkung ** S. 60.

** Den genannten Firmen sowie Frau Dr. Lotte Ludwig, Hamburg, und Herrn Dr. E. L. R. Stokstad, Pearl River (New York) danken wir für die Zuwendung der oben erwähnten Substanzen.

⁹ s. z. B. P. Kärfsson, *Ergebn. Enzymforsch.* **11**, 85 [1954].

¹⁰ G. W. Beadle u. E. L. Tatum, *Amer. J. Bot.* **32**, 678 [1945].

¹¹ s. R. W. Barratt, J. Newmeyer, D. D. Perkins u. L. Garnjobst. *Advances in Genetics* **6**, 1 [1954].

¹² E. M. Zimmer, Thesis, Stanford University 1946.

¹³ F. P. Hungate, Thesis, Stanford University 1946.

¹⁴ D. D. Woods, Oxford, persönl. Mitteilung.

¹⁵ B. L. Strehler, *J. Bacteriol.* **59**, 105 [1950].

¹⁶ M. Westergaard u. H. K. Mitchell, *Amer. J. Bot.* **34**, 573 [1947].

¹⁷ J. Lein, H. K. Mitchell u. M. B. Houlahan, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **34**, 435 [1948].

Rhizopterins asymptotisch einem Grenzwert unter 100. Sulfathiazol muß also außer dem Enzymsystem, das Pab produziert oder sie zu Synthesen weiter verwendet, noch ein anderes partiell blockieren.

Im einzelnen wurden folgende weitere Beobachtungen gemacht:

p-Amino-benzoesäure: Die höchste Konzentration des Versuchs der Abb. 1a, 0,26 γ Pab/ml, enthemmte 81%, 0,9 γ /ml in einem anderen Versuch (1 mg Sulfathiazol/ml) 87%. 1–10 γ /ml enthemmten nicht stärker. 100–1000 γ /ml hemmten zusätzlich zur Sulfathiazolhemmung. In diesen Ansätzen entstand durch die Stoffwechselwirkungen des wachsenden Mycels aus der Pab ein orangefarbenes Pigment, das bereits früher

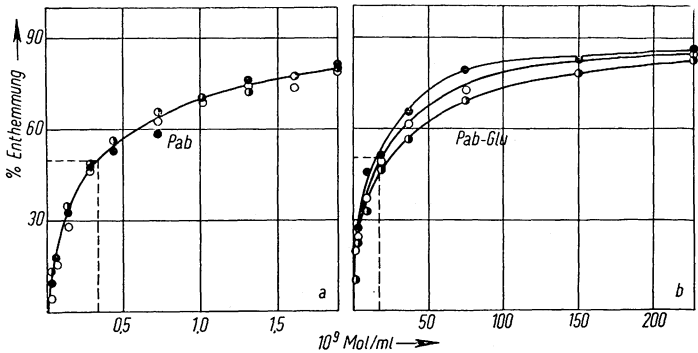


Abb. 1. Die Enthemmwirkung von a) *p*-Amino-benzoesäure (Pab) und b) *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure (Pab-Glu) bei der Wuchshemmung durch verschiedene Sulfathiazol-Konzentrationen im Horizontalwuchstest mit *Neurospora crassa*. Abszisse: Konzentrationen der enthemmenden Substanzen in Mol/ml Nährmedium.

Die Ansätze enthielten 0,8 (●), 1,0 (○) bzw. 1,3 (●) mg Sulfathiazol/ml.

beschrieben wurde¹⁸. Die enthemmende Wirkung gleicher Pab-Konzentrationen ist, unabhängig von der Sulfathiazol-Konzentration, etwa gleich, d. h. die Enthemmung verläuft nicht kompetitiv.

p-Amino-benzoyl-glutamat: Die enthemmenden Wirkungen gleicher Substanzmengen bei steigenden Sulfathiazol-Konzentrationen fallen ab, so daß die Kurven (Abb. 1b) in der genannten Reihenfolge untereinander liegen. Hier verläuft die Enthemmung also kompetitiv. 60 γ Pab-Glu/ml bei 1 mg Sulfathiazol/ml enthemmten zu 84,7%, 100 γ zu 90,5% und 200 γ nicht stärker als 100 γ .

Pteroinsäure (Abb. 2): Gleiche Mengen enthemmten mit steigender Sulfathiazol-Konzentration ganz deutlich stärker, ein Zeichen der nichtkompetitiven Enthemmung. Die stärkste enthemmende Wirkung bei 1,3 mg Sulfathiazol/ml betrug 91,5%, bei 1,0 mg/ml 79%.

¹⁸ J. E. Cushing u. E. B. Reid, *J. Bacteriol.* **55**, 551 [1948]; E. B. Reid, E. G. Pritchett u. J. E. Cushing, *J. biol. Chemistry* **199**, 443 [1952].

Rhizopterin (Abb. 2): Als einzige Verbindung enthemmte sie nach einem anderen Typus. Die Kurven laufen nahezu linear schwach ansteigend, und die enthemmende Wirkung ist unabhängig von der Sulfathiazol-Hemmung. Die höchst erreichbare Enthemmung betrug 62%.

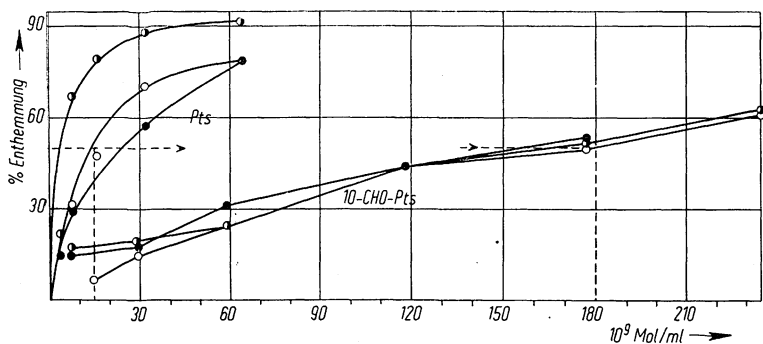


Abb. 2. Die enthemmende Wirkung von Pterinsäure (Pts) und Rhizopterin (10-CHO-Pts). Erläuterung s. Abb. 1.

Pteroylglutaminsäure (Abb. 3a): In niedrigen bis mittleren Konzentrationen enthemmten gleiche Ptg-Mengen stärker mit steigender Sulfathiazol-Hemmung, ähnlich wie bei der Pts. Mit 71% war die

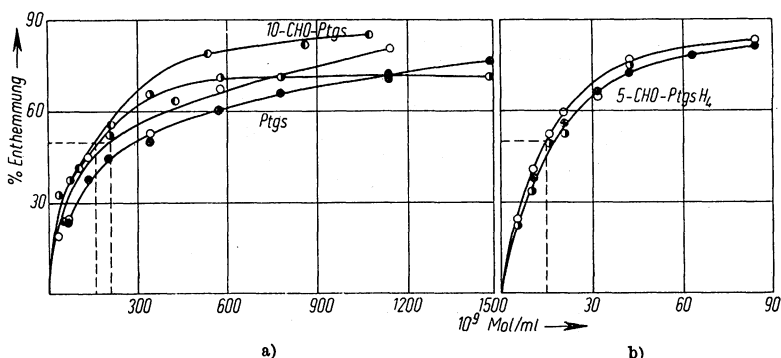


Abb. 3. Die enthemmende Wirkung von a) Pteroylglutaminsäure (Ptg), 10-Formylpteroylglutaminsäure (10-CHO-Ptg, oberste Kurve \bullet , mit 1 mg Sulfathiazol/ml) und b) Leukovorin (5-CHO-PtgH₄). Erläuterungen s. Abb. 1.

höchste Enthemmung bei 1,3 mg Sulfathiazol/ml erreicht, während sich bei 1,0 und 0,8 mg/ml die enthemmenden Wirkungen mit steigender Ptg-Konzentration noch erhöhten.

10-Formyl-pteroylglutaminsäure (Abb. 3a): Dieser Versuch wurde nur mit 1,0 mg Sulfathiazol/ml durchgeführt. Bei grundsätzlich analoger Verlaufsform der Enthemmung erreichte man früher als mit Ptg eine höhere Enthemmung von maximal 85%.

Leukovorin: Abb. 3b zeigt den von der Sulfathiazol-Hemmung nahezu unabhängigen, d. h. nichtkompetitiven Verlauf der Entthemmung. Höchste enthemmende Wirkung: 83%.

Alle Verbindungen mit Ausnahme von Rhizopterin ergeben also exponentiell verlaufende Dosis-Wirkung-Beziehungen, Rhizopterin dagegen eine lineare. Zum Vergleich der Dosen, die gleiche enthemmende Wirkungen ausüben, liest man bei den Kurven der Ansätze mit 1 mg Sulfathiazol/ml für 50% Entthemmung auf den Abszissen die zugehörigen Dosen ab. Die Tabelle zeigt das Ergebnis.

Vergleich der Konzentrationen an enthemmenden Verbindungen, die die Wachshemmung durch 1 mg Sulfathiazol/ml bei *N. crassa* im Horizontalwuchstest um 50% vermindern.

	10 ⁹ Mol/ml	Relative Wirkung
<i>p</i> -Amino-benzoesäure	0,34	1000
5-Formyl-5.6.7.8-tetrahydro-pteroylglutaminsäure (Leukovorin)	7,5	45,5
Pteroinsäure	15	22,7
<i>p</i> -Amino-benzoylglutaminsäure	18	18,9
10-Formyl-pteroylglutaminsäure	160	2,13
10-Formyl-pteroinsäure (Rhizopterin)	180	1,89
Pteroylglutaminsäure	220	1,54

Das synthetische Leukovorin ist ein Racemat (Asymmetriezentrum an C-6), von dem nur eine Komponente bei *Leuconostoc citrovorum* 8081 wuchsfördernd ist. Unter der Annahme, daß dies auch für *N. crassa* zutrifft, sind in 15×10^{-9} m Leukovorin, die 50% enthemmen, $7,5 \times 10^{-9}$ Mol/ml aktive Verbindung enthalten.

Diskussion

Bei den meisten zur Biosynthese von CoF befähigten Mikroorganismen besteht die einzige Funktion von Pab darin, Ausgangspunkt dieser Reaktionsfolge zu sein¹⁹. Der erste Reaktionsschritt ist entweder a) Pab + Glu → Pab-Glu oder b) Pteridin (bzw. Vorstufe) + Pab → X (Pterid-Derivat?). Im Falle a) müßte Pab-Glu bei Pab-benötigenden Mikroorganismen ebenso wuchsfördernd oder noch wirksamer sein als Pab und bei Pab-nichtbenötigenden Organismen wirksamer sein in der (nichtkompetitiven) Entthemmung des durch Sulfonamide blockierten Wuchses.

Bei *N. crassa* ist Pab-Glu sehr viel weniger wirksam als Pab in der Überwindung der Hemmung durch Sulfathiazol, eine Beobachtung, die mit anderen an fast allen Einzellern übereinstimmt.

¹⁹ D. D. Woods, in G. E. W. Wolstenholme u. M. P. Cameron, Chemistry and Biology of Pteridines, J. & A. Churchill, London 1954.

Pab-Glu beseitigt nur bei einem bestimmten Stamm von *Streptococcus plantarum* 10S die Wuchshemmung durch Sulfanilamid wirksamer als Pab²⁰, dagegen nicht bei anderen Bakterien²¹⁻²³. An *Lactobacillus arabinosus* z. B. zeigt Pab-Glu nach 20 Stdn. Inkubation 25%, nach 64 Stdn. 77% der Wuchswirkung von Pab, enthemmt aber wirksamer als Pab die Toxizität geringer Konzentrationen von Sulfapyridin^{23,24}. Bei *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae* I verhindert dagegen Pab besser die Bakterio-stase durch Sulfanilamid als Pab-Glu²². Analoge Beobachtungen wurden auch mit Sulfapyridin bei *D. pneumoniae* III, *S. haemolyticus* A und mit Sulfadiazin bei *S. faecalis* Ralston* und *S. zymogenes* 26Cl gemacht²⁵.

Nach diesen Befunden dürfte es nahezu sicher sein, daß der erste Reaktionsschritt bei allen Mikroorganismen, auch bei *N. crassa*, nicht nach a) verläuft, sondern möglicherweise nach b), wenn auch nicht a priori angenommen werden darf, daß bei allen Mikroorganismen die CoF-Biosynthese nach dem gleichen Schema verläuft.

Abgesehen von 5-CHO-PtgsH₄ ist Pts nach Pab die nächst wirksame Verbindung, die nichtkompetitiv die Sulfathiazol-Hemmung überwindet. Für sie gelten jedoch die gleichen Überlegungen wie für Pab-Glu.

Die in der Natur nicht vorkommende Pts ersetzt Ptgs vollständig als Wuchsstoff bei *S. faecalis* R.²⁶ und ist bei *L. arabinosus* sogar wirksamer als die letztere²³. Eine gewaschene Suspension von *S. faecalis* R. führt Pts in ein Ptgs-Derivat über²⁷. Die Pts-Wirkung ist jedoch nicht einheitlich bei allen Mikroorganismen. Bei *Cl. tetanomorphum*, *Cl. acetobutylicum* und einem Stamm von *S. aureus* wirkt Pts als starker nicht-kompetitiver Antagonist von Sulfonamiden, ist aber inaktiv bzw. wirkt schwach kompetitiv bei *S. faecalis* Ralston, *L. arabinosus* und *L. plantarum*^{23,26,28}. Auch können Suspensionen von *Mycobacterium avium* keine Ptgs aus Pts + Glu synthetisieren²⁹. Obgleich einige Mikroorganismen CoF aus Pts bilden können, scheint es kein generelles Intermediärprodukt

²⁰ E. Auhagen, diese Z. **277**, 197 [1942].

²¹ Th. Wagner-Jauregg u. W. H. Wagner, Z. Naturforsch. **1**, 229 [1946].

²² R. J. Williams, J. biol. Chemistry **156**, 85 [1944].

²³ J. O. Lampen u. M. J. Jones, J. biol. Chemistry **170**, 133 [1947].

²⁴ H. P. Sarett, J. biol. Chemistry **171**, 265 [1947].

²⁵ O. H. Johnsen, D. E. Green u. R. Pauli, J. biol. Chemistry **153**, 37 [1944].

²⁶ J. O. Lampen u. M. J. Jones, J. biol. Chemistry **164**, 485 [1946]; **166**, 435 [1946].

²⁷ J. H. Stokes u. A. Larsen, J. Bacteriol. **50**, 219 [1945].

²⁸ R. H. Nimmo-Smith u. D. D. Woods, J. gen. Physiol. **2**, X [1948]; K. A. Sims u. D. D. Woods, J. gen. Microbiol. **4**, II [1950]; R. H. Nimmo-Smith, Dissertat., Oxford 1951; E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Z. Naturforsch. **4b**, 100 [1949].

²⁹ N. Katunuma, T. Shoda u. H. Noda, J. Vitaminol. [Nagoya] **3**, 77 [1957], zit. nach D. D. Woods, Resumes IV. Int. Congr. Biochem., Wien 1958 im Druck.

* Ist nicht identisch mit *S. faecalis* R. (Roger).

der CoF-Biosynthese zu sein. Dies dürfte auch für *N. crassa* zutreffen, doch steht Pts einem normalen Intermediärprodukt der CoF-Biosynthese sehr nahe, wofür neben der starken nichtkompetitiv enthemmenden Wirkung auch der merkwürdige Kurvenverlauf der Enthemmungsversuche (Abb. 2) spricht. Dieses Intermediärprodukt ist nicht mit dem 10-Formyl-derivat von Pts, dem Rhizopterin, identisch. Dies zeigt seine viel geringere enthemmende Wirkung und der im Vergleich zu den anderen untersuchten Substanzen atypische Verlauf des Enthemmungsversuches.

Zuerst aus einer Kulturlösung von *Rhizopus nigricans* isoliert³⁰, ist 10-CHO-Pts nur für *S. faecalis* R. Wachsfaktor und als solcher 30mal wirksamer als Pts, doch inaktiv bei *L. casei* und anderen Mikroorganismen³¹.

Analog der Pts ist auch Pts kein normales Intermediärprodukt der CoF-Biosynthese bei *N. crassa* und steht dazu einem solchen chemisch noch ferner als Pts, denn Pts ist die zur Enthemmung am wenigsten wirksame der untersuchten Verbindungen, und die Enthemmung verläuft kompetitiv.

Auch diese Folgerung stimmt mit Beobachtungen an anderen Mikroorganismen überein¹⁹, obgleich einige unter ihnen Pts sehr viel leichter in CoF überführen können als *N. crassa*. *E. coli* und *L. arabinosus*, bei denen Pts nicht die Sulfonamidhemmung beseitigt³², bauen Pts-¹⁴C-2 nicht in intracelluläre Pts ein, während dies *L. plantarum* (Pts enthemmt die Sulfonamidhemmung), ferner *S. faecalis* R. und *Enterococcus stei* tun². (Die Wachstumswirkung von Pts im Vergleich zu Pts, Pab-Glu, Pab u. a. bei *S. faecalis* R., *L. arabinosus* und *S. plantarum* 10S vgl. l. c.^{23,26}). Organismen, die Pts als Wachsfaktor benötigen, sind bei höheren Konzentrationen von Pts sulfonamidresistent², doch nicht bei Konzentrationen, die gerade eben den Wuchs ermöglichen³³.

Die nichtkompetitive Reversion der Sulfonamidhemmung durch Pts bei einigen Mikroorganismen zeigt, daß Pts ein normales Intermediärprodukt der CoF-Biosynthese zwar ersetzen kann, doch beträchtlich weniger ausgenutzt wird als Pab². Diese Ersatzreaktion beruht nicht auf der Spaltung von Pts in ihre Bestandteile und der Wiederverwendung von Pab vom ersten Reaktionsschritt an. Berücksichtigt man noch den Extremfall, daß Pab-benötigende *E. coli*-Mutanten nicht auf Pts ansprechen³⁴, dann bestehen bei den bis jetzt untersuchten Mikroorganismen

³⁰ E. L. Rickes, L. Chalet u. J. C. Keresztesy, J. Amer. chem. Soc. **69**, 2749 [1947].

³¹ M. Gordon, J. M. Ravel, R. E. Eakin u. W. Shive, J. Amer. chem. Soc. **70**, 878 [1948].

³² R. Tschesche, K. Soehring u. K. Harder, Z. Naturforsch. **2b**, 244 [1947].

³³ E. E. Snell u. H. K. Mitchell, Arch. Biochemistry **1**, 93 [1942]; R. H. Nimmo-Smith, zit. nach l. c.⁶; W. Shive u. E. C. Roberts, J. biol. Chemistry **162**, 463 [1946].

³⁴ J. O. Lampen, R. R. Roepke u. M. J. Jones, J. biol. Chemistry **164**, 789 [1946].

men alle Übergänge vom voll- und gleichwertigen Ersatz von Pab durch Ptg_s bis zur teilweisen oder fehlenden Verwendung von Ptg_s.

N. crassa gehört demnach zur Gruppe der Mikroorganismen, die Ptg_s nur schwer in CoF überführen können. Ihnen fehlt ein in anderen Mikroorganismen, in Pflanzen, Vögeln und Säugetieren vorhandenes Enzym-system ganz oder teilweise, das den Pteridinring partiell hydrieren kann.

Das CoF von *N. crassa* ist noch nicht genau bekannt (Untersuchungen mit J. Mechery), doch dürfen wir annehmen, daß es ein Derivat der tetrahydrierten Pteroyl-polyglutaminsäure ist. Aus *Cl. sticklandii* wurden 6 Faktoren angereichert, die Polyglutamate von Pteridinen sind, und z. T. noch andere Aminosäuren und Pentose + Phosphat enthalten³⁵. Hierdurch sind ältere Beobachtungen über eine „gebundene Form“ von natürlichen Pteroiden bestätigt³⁶. *Enterococcus stei* führt Ptg_s-¹⁴C-2 in 5-CHO-Pt(gs)_xH₄ mit mindestens 3 Glutamatresten über³⁷.

Die Primärreaktion des mehrstufigen Vorgangs Ptg_s → CoF bei den Ptg_s verwertenden Organismen ist wahrscheinlich: Ptg_s → Ptg_sH₂, die folgende Reaktion Ptg_sH₂ → Ptg_sH₄^{38,39}. Es ist aber nicht ausgeschlossen, daß Ptg_s primär an N-10 formyliert wird, wie wir dies früher für das höhere Säugetier annahmen⁴⁰, und daß 10-CHO-Ptg_s dann sekundär hydriert wird. Für alle zur Reaktion Ptg_s → Ptg_sH₂ → Ptg_sH₄ befähigten Mikroorganismen ist Aminopterin ein starker Wachstumsinhibitor. Dieser und andere Folsäure-Antagonisten blockieren die Reaktion Ptg_sH₂ → Ptg_sH₄. Auch die (unveröffentlichte) Beobachtung, daß *N. crassa* gegen Aminopterin nahezu resistent ist, spricht dafür, daß es die obige Reaktion nur schwer durchführen und dadurch Ptg_s kaum verwenden kann.

Die CoF-Biosynthese bei *N. crassa* verläuft auch nicht primär über die 10-CHO-Ptg_s, denn diese ist nur wenig wirksamer als Ptg_s in der Überwindung der Sulfathiazol-Hemmung.

10-CHO-Ptg_s wurde zuerst chemisch dargestellt und ist bei *S. faecalis* R. und *L. casei* ebenso wuchswirksam wie Ptg_s, doch 30mal wirk-

³⁵ B. E. Wright, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **16**, 165 [1955], *Federation Proc.* **14**, 308 [1955]; *J. Amer. chem. Soc.* **77**, 3930 [1955]; *J. biol. Chemistry* **219**, 863, 873 [1956].

³⁶ L. S. Dietrich, W. J. Mouson, H. Gwoh u. C. A. Elvehjem, *J. biol. Chemistry* **194**, 549 [1952]; V. M. Doctor u. J. R. Couch, *J. biol. Chemistry* **200**, 223 [1953]; C. H. Hill u. M. L. Scott, *J. biol. Chemistry* **196**, 189 [1952]; J. J. Piffner, D. G. Calkins, E. S. Bloom u. B. L. O'Dell, *Science* [New York] **102**, 228 [1945]; B. L. Hutchings, E. L. R. Stokstad, N. Bohonis, N. H. Sloane u. Y. Subbarow, *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 1 [1948]; L. E. Ericson, *Ark. Kemi* **6**, 504 [1953].

³⁷ A. Wacker, M. Ebert u. N. Kolm, *Z. Naturforsch.* **13b**, 141 [1958].

³⁸ B. E. Wright u. M. L. Anderson, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 2027 [1957]; B. E. Wright, M. L. Anderson u. E. C. Herman, *J. biol. Chemistry* **230**, 271 [1958]; S. Futterman, *J. biol. Chemistry* **228**, 1031 [1957]; S. F. Zakrzewski u. C. A. Nichol, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **27**, 425 [1958].

³⁹ M. J. Osborn u. F. M. Huennekens, *J. biol. Chemistry* **233**, 969 [1958].

⁴⁰ H. M. Rauen u. L. Jaenicke, *diese Z.* **293**, 46 [1953]; s. hierzu l. c.³⁹ S. 973.

samer in der Überwindung der Wuchshemmung durch 7-Methyl-Ptgs bei *S. faecalis* R.⁴¹. Sie entsteht auch enzymatisch aus Ptgs durch Schweineleberenzyme⁴² nach einem gekoppelten, mehrstufigen Reaktionsschema, das die gleichzeitige oxydative Aufspaltung einer zweiten Ptgs-Molekel einbezieht⁴³.

Nach Pab ist das eine der beiden in Leukovorin enthaltenen Diastereomeren von 5-CHO-PtgsH₄ am wirksamsten, enthemmt nichtkompetitiv und steht somit dem CoF von *N. crassa* chemisch am nächsten. Es wird leichter in die „gebundene Form“ übergeführt als das intermediäre Derivat von Pts.

Aus den vorliegenden Befunden mit der Hemmungsanalyse ergibt sich also für die CoF-Biosynthese bei *N. crassa*, daß die Ausgangssubstanz Pab zuerst in eine der Pts nahestehende Verbindung, vermutlich PtsH₂ oder PtsH₄, übergeführt wird, die dann in zweiter Reaktion in die Monoglutamatform oder die „gebundene Form“ übergeht, doch ohne intermediär die oxydierte Pteridinring-Konfiguration zu durchlaufen. Die Pts-Stufe wird leicht, die Ptgs-Stufe dagegen schwer hydriert, wobei die Hydrierungsreaktion nicht durch Anwesenheit von Sauerstoff verhindert wird, denn *N. crassa* ist obligater Aerobier.

Zusammenfassung

Im Horizontalwuchstest mit *Neurospora crassa* enthemmen *p*-Amino-benzoesäure, *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure, Pteroinsäure, Rhizopterin, Pteroylglutaminsäure, 10-Formyl-pteroylglutaminsäure und Leukovorin die partielle Wuchshemmung durch Sulfathiazol unter vergleichbaren Bedingungen sehr verschieden. Für den Verlauf der noch unbekanntenen Biosynthese des enzymatischen Komplements des Transformylasesystems bei *N. crassa* ergeben sich aus dem Vergleich der Enthemmwirkungen folgende Anhaltspunkte:

1. Der erste Syntheseschritt dürfte in der Bildung eines Derivates der Pteroinsäure bestehen und nicht in der Bildung von *p*-Amino-benzoyl-glutaminsäure.
2. Da das eine Diastereomere von Leukovorin und die Pteroinsäure am wirksamsten sind, liegt dieses erste Intermediärprodukt wahrscheinlich in der hydrierten Form vor. Es ist nicht mit Rhizopterin identisch.
3. Weder Pteroylglutaminsäure noch 10-Formyl-pteroylglutaminsäure sind normale Zwischenprodukte dieser Biosynthese.

⁴¹ M. J. Gordon, M. Ravel, R. E. Eakin u. W. Shive, J. Amer. chem. Soc. 70, 878 [1948].

⁴² H. M. Rauen u. W. Stamm, diese Z. 289, 201 [1952]; H. M. Rauen, W. Stamm u. K.-H. Kimbel, diese Z. 289, 80 [1952]; H. M. Rauen, H. Waldmann u. M. Buchka, diese Z. 288, 10 [1951]; H. M. Rauen, Biochem. Z. 328, 562 [1957].

⁴³ H. M. Rauen, Z. Naturforsch. 13b, 45 [1958]; H. M. Rauen u. G. Brendler, ebenda 13b, 730 [1958]; H. M. Rauen, M. Rauen-Buchka u. G. Hess, diese Z. 313, 37 [1958].

Summary

The partial inhibition of growth caused by sulphathiazol in the horizontal growth test with *Neurospora crassa* is prevented very differently by *p*-amino benzoic acid, *p*-amino benzoylglutamic acid, pteronic acid, rhizopterin, pteroylglutamic acid, 10-formyl-pteroylglutamic acid and leucovorin under comparable conditions. For the still unknown biosynthetic pathway of the enzymatic complement of the transformylase system in *N. crassa*, the comparison of these releases of inhibition gives the following clues:

1. The first step in the synthesis seems to be the formation of a derivative of pteronic acid and not the formation of *p*-amino benzoylglutamic acid.
 2. Since pteronic acid and one of the diastereoisomers of leucovorin are the most active compounds, this first intermediary product is probably present in the hydrogenated form. It is not identical with rhizopterin.
 3. Neither pteroyl glutamic acid nor 10-formyl-pteroylglutamic acid are normal intermediates of this biosynthesis.
-