

50X1-HUM

Page Denied

Next 1 Page(s) In Document Denied

О МЕТАБОЛИЗМЕ ФОЛЛЕВОЙ КИСЛОТЫ. II* УСЛОВИЯ ФОРМИЛИРОВАНИЯ ФОЛЛЕВОЙ КИСЛОТЫ**

К. СЛАВИК и В. МАТОУЛКОВА

Центральная лаборатория Первой Государственной факультетской больницы и 3-я лаборатория клиники внутренних болезней Второй Государственной факультетской больницы, Прага

Поступило в редакцию 18 января 1954 г.

Авторы разработали методику бумажной хроматографии птеринов в водных растворителях и количественного определения формил-фоллевой кислоты.

Гистидин, уромановая и формилдигоглутаровая кислоты в несколько раз увеличивают количество формилфоллевой кислоты, образующейся из фоллевой кислоты в печеночном гомогенате. Действие гистидина проявляется в анаэробных условиях и не наблюдается при аэробии. Формилглутамин и формилдигоглутамин влияют на образование формилфоллевой кислоты.

В предыдущем сообщении¹ был опубликован найденный нами факт, что при инкубации гомогената из печени крысы с фоллевой кислотой образуется синевелено флюоресцирующий метаболит, который на основании спектров поглощения был идентифицирован как 10-формилфоллевая кислота. Уже ранее Рауен², на основании изучения кривых его разбалтывания между 0,1*n*.HCl и бутанолом, полагал, что этот метаболит тождествен с формилфоллевой кислотой. Весьма вероятно, что это вещество, обладающее любопытным физиологическим действием, или само влияет на протеиновый анаболизм, или является предшественником при образовании лейковорина, синтез которого из фоллевой кислоты в гомогенатах из куриной печени доказал Николь³ при помощи микробиологических тестов с *Leucovorin citrovorum*. В настоящей работе мы изучали условия, при которых образуется формилфоллевая кислота, что при большом значении этого вещества для анаболизма белков могло бы дать некоторые сведения о регуляционных механизмах синтеза белковых веществ в организмах.

Экспериментальная часть

Материал

Формил-L-глутамин:*** 300 мг L-глутамин растворялся в 12 мл 80% муравьиной кислоты, к раствору прибавлялось 12 мл уксусного ангидрида. Температура при этом самопроизвольно повышалась до 45°. Формилировочная смесь оставалась стоять

* Сообщение I см. в журнале *Chem. listy* 47, 1516 (1953) и в этом журнале 19, 393 (1954).

** Было ранее опубликовано в журнале *Chem. listy* 48, 765 (1954).

*** После окончания этой работы Борек и Уальм⁴ описали получение этих веществ. Они приводят для формил-L-глутамин т. пл. 118—120°, для формил-L-дигоглутамин (полученного иным путем) т. пл. 138°.

О метаболитах фолиевой кислоты. II

1 час, затем перегонялась при 30°, а оставшийся сироп растирался в смеси спирта и ацетона (2 : 1). При этом выкристаллизовывалась небольшая часть непрореагировавшего глутамина, который отфильтровывался. После выпаривания в вакууме на спирте-ацетатного фильтрата получилось 120 мг кристаллов. Т. пл. 118°.

$C_5H_{10}O_4N_2$ (175) вычислено: 16,20 % N;
найдено: 15,92 % N (Кьельдаль).

Форма-L-изоглутамин:*** 250 мг L-изоглутамин растворялся в 10 мл 80% муравьиной кислоты, к раствору прибавлялось 10 мл уксусного ангидрида. После того, как температура достигла 45°, раствор охлаждался до комнатной температуры и после стояния в течение 1 часа формилировочная смесь перегонялась при 30°. Оставшийся сироп растворялся в спирту и небольшая часть непрореагировавшего выделившегося изоглутамин отфильтровывалась. Путем выпаривания спиртового раствора в вакууме получался сироп, постепенно затвердевавший в кристаллы. При растирании с уксусно-этиловым эфиром сироп затвердевал в игольчатые кристаллики. Выход 70 мг. Т. пл. 128°.

$C_5H_{10}O_4N_2$ (175) вычислено: 16,20 % N;
найдено: 16,08 % N.

Оба вещества не дают реакции с нингидрином. При их гидролизе 2н. HCl при 100° выделяется аммиак и глютаминовая кислота, которую можно доказать раздельной бумажной хроматографией.

Формилидиноглутаровая кислота получалась по способу Борера и Уальша¹¹ путем инкубации вытяжки из печени кошки с гистидином. Повторяя эти опыты, мы, однако, не достигли количественной реакции гистидина в выходов, указанных этими авторами в их предварительном сообщении¹¹. Так как нам не удалось удалить большое количество непрореагировавшего гистидина пермутитом, то мы отделили формилидиноглутаровую кислоту от гистидина путем препаративного ионофореза в бумажной массе в 0,05M ацетатном буферном растворе pH 6. Мы получили таким образом продукт, не содержащий веществ, дающих реакцию Паули.

Фолиевая кислота очищалась методом, описанным в предыдущем сообщении, ее чистота контролировалась при помощи бумажной хроматографии.

Количественное определение формилфолиевой кислоты

Формилфолиевая кислота отличается сильной синеватой флуоресценцией, в особенности в щелочной среде, которая дает возможность при применении подходящего

Таблица 1

Величины R_f некоторых птеридинов при хроматографии в водных растворах

Птеридин	0,1н. HCl	0,1н. NaOH	ацетат pH 5	фосфат pH 6,5	фосфат pH 7,7	0,5% Na ₂ CO ₃
Птеридин-6-кар- боксальдегид ...	0,62	0,45	0,35	0,45	0,38	0,42
Птеридин-6-карбо- новая кислота ...	0,52	0,68	0,60	0,65	0,55	0,61
6-Метилптеридин	0,76	0,53	0,48	0,53	0,51	0,55
Лейкоптеридин	0,30	0,50	0,24	0,29	0,28	0,35
Формилфолиевая кислота	0,78	0,93	0,77	0,81	0,84	0,87
Фолиевая кислота	—	0,53	0,32	0,35	0,45	0,50

Славик, Матюлково

аппарата определить до 0,02 $\mu\text{г}/\text{мл}$. Прямое флуориметрическое определение формил-фолиевой кислоты в растворах, полученных после удаления белков из инкубационных смесей, весьма ненадежно, так как в течение инкубации образуются и другие флуоресцирующие птеридиновые метаболиты, а при измерении флуоресценции интерферирует также желтая флуоресценция флавинов. Кроме того, некоторые вещества, прежде всего непрореагировавшая фолиевая кислота, гасят флуоресценцию. Поэтому был разработан метод бумажной хроматографии птеридинов, дающий возможность полного отделения формилфолиевой кислоты от нарушающих веществ. Наиболее себя оправдала хроматография на бумаге Ватман М 1 при использовании водных буферных растворов, в которых очень хорошо можно разделить ряд птеридинов. В таблице 1 приведен обзор величин R_f некоторых синтетических птеридинов в равных буферных растворах. Физическая сущность этого вида бумажной хроматографии водными растворами неизвестна. Шульце¹, разделивший хроматографически производные салициловой кислоты водными растворами, предполагает, что бумага действует в качестве ионообменника.

При количественном определении мы поступали таким образом, что очищенный от белка образец в количестве 50 $\mu\text{л}$ накапывался на четырехсантиметровую полоску бумаги на трех или четырех местах. После разделения в 0,6% растворе углекислого натрия и открытия в УФ-лучах зона формилфолиевой кислоты вырезывалась и в продолжение 2 час. промывалась 10 мл углекислого натрия в колбочке при выбалтывании время от времени. Раствор фильтровался и флуоресценция измерялась на бекмановском кварцевом спектрофотометре DU с приспособлением для измерения флуоресценции. Вместо первоначального источника света в виде электрической лампочки накаливания мы пользовались ртутной лампой, и из ее спектра при помощи специального фильтра в аппарате админировалась возбуждающая линия 365 $\mu\text{м}$. Отраженные УФ-лучи исключались при помощи желтого фильтра, вставленного перед фотоэлементом. Образцы измерялись по сравнению со стандартом 10 или 20 $\mu\text{г}$ синтетической формилфолиевой кислоты, которая также подвергалась хроматографии и промыванию для того, чтобы были выполнены условия опытов админированных образцов. При использовании стандартов 10—20 $\mu\text{г}$ ход калибровочной кривой оказывался линейным.

Опыты с энзимами

В большей части опытов инкубации подвергались 2 мл 50% печеночного гомогената в 0,9% NaCl с 0,2 мл раствора фолиевой кислоты (= 3 мг) в пробирках под слоем толстого масла в течение 22 час. при 36°, в темноте. Из образцов затем удалялся белок 0,3 мл 70% раствора трихлоруксусной кислоты; после его отцентрифугирования трихлоруксусная кислота удалялась трехкратным выбалтыванием в эфир (3 раза по 4 мл). Обработанные таким образом образцы хроматографировались и анализировались на формилфолиевую кислоту. При изучении аэробного и анаэробного анаэробия образцы инкубировались в сосудах варбургских манометров в атмосфере кислорода, анаэробные же образцы инкубировались в трубках Туинберга в атмосфере водорода.

Результаты и их обсуждение

Для установления условий реакции формилирования фолиевой кислоты было необходимо найти источники формильной группы, а также источник энергии для этой реакции. Мы испробовали ряд веществ, относительно которых известно, что они могут функционировать в качестве доноров метильной группы, прежде всего метионин, серин и холин, однако ни у одного из этих веществ не проявилось существенного стимуляционного действия на образование формилфолиевой кислоты. Только гистидин, являющийся в организмах при известных условиях источником метильной группы, оказался стимулятором биосинтеза формилфолиевой кислоты. Относительно гистидина уже довольно давно известно⁶, что он повышает количество микробиологически уловимой фолиевой кислоты в печеночных гомогенатах. Опыты некоторых авторов^{7,8} с гистидином, меченым C^{14} показали, что углерод, находящийся в имидзольном цикле гистидина

О метаболизме фолиевой кислоты. II

в положении 2, переходит в другие соединения (например, в креатин, холин, серин) в виде метильной группы и также становится составной частью пуринового ядра. Поэтому можно было бы предполагать, что гистидин может быть источником формильной группы при формилировании фолиевой кислоты. Наши опыты показали, что гистидин увеличивает количество формилфолиевой кислоты, образующейся из фолиевой кислоты

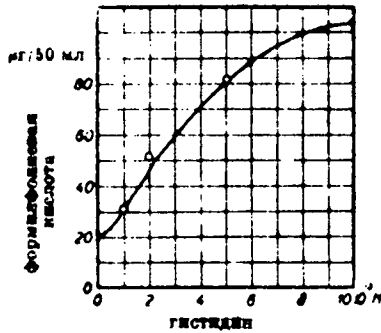


Рис. 1

Зависимость количества образовавшейся формилфолиевой кислоты от концентрации гистидина в инкубационной смеси.

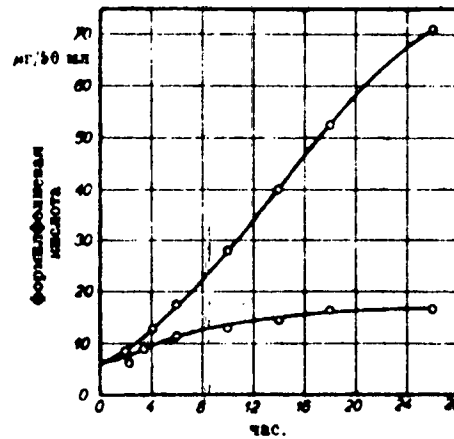


Рис. 2

Ход формилирования фолиевой кислоты в зависимости от времени без прибавления гистидина и после его прибавления в концентрации 10^{-4} м.

Таблица 2

Влияние некоторых веществ на образование формилфолиевой кислоты в печеночных гомогенатах

Концентрация исследованных веществ 10^{-4} м., кроме аминоптерина (0,5 мг/мл) и витамина B_{12} (10 µг/мл)

Вещество	µг формилфолиевой кислоты в 50 µл гомогената	Вещество	µг формилфолиевой кислоты в 50 µл гомогената
Гистидин	20,1	Витамин B_{12}	3,00
Урокановая кислота	58,5	Пролин	3,85
Имидазолуксусная кисл.	4,04	Метколин	2,98
Имидазолпропионовая кислота	4,00	Серин	4,09
Гистамин	3,85	Триптофан	3,85
Формамидиноглутаровая кислота	75,4	Глютатин	4,10
Формилглутамин	3,89	Холин	3,95
Формилдиглутамин	3,85	Аскорбиновая кисл.	4,04
Глютамин	3,90	Муравьиная кисл.	4,00
Глютаминовая кислота	3,02	Цианистый калий	3,84
Аминоптерин	2,38	Азид натрия	4,62
		Контроль	3,95

Славик, Матюлкова:

в печеночных гомогенатах (рис. 1 и рис. 2), и поэтому можно предполагать, что он является источником для образования формильной группы. Количество прибавленного гистидина оказывается прямо пропорциональным количеству образовавшейся формилфолиевой кислоты (рис. 2).

Для того, чтобы найти метаболит гистидина, который непосредственно дает формильную группу, мы пытались установить, будут ли оказывать стимуляционное действие на образование формилфолиевой кислоты также некоторые вещества, считаемые природными метаболитами гистидина. Сюда относятся прежде всего урокановая (имидазолакриловая) кислота,

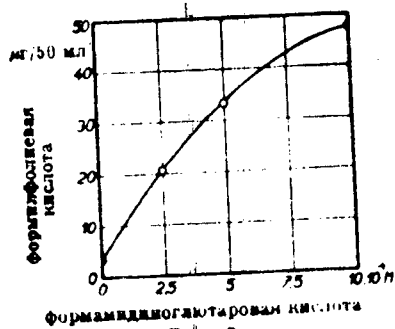


Рис. 3

Зависимость количества образовавшейся формилфолиевой кислоты от концентрации формамидноглутаровой кислоты в инкубационной смеси.

образованной которой из гистидина в печени доказал Мелер⁹. По сравнению с гистидином урокановая кислота обладает в три раза большим активирующим действием (табл. 2). Предполагается, что урокановая кислота в печени расщепляется далее на формилпроизводное глутаминовой кислоты, которое и образует самый источник формильной группы. Ойамада¹⁰ предполагал, что этим соединением является формилглютамин. Недавно Борек и Уэльши выделили после инкубации экстракта из печени кошки с гистидином, вещество, которое они считают формамидноглутаровой кислотой. Мы испробовали действие синтетически полученных формилглютамина и формилглютамидина и нашли, что ни тот, ни другой не влияют на реакцию (табл. 2). Однако у формамидноглутаровой кислоты проявилось сильное стимуляционное влияние на образование формилфолиевой кислоты в печеночных гомогенатах, как это ясно видно из кривой, выражающей зависимость количества образующейся формилфолиевой кислоты от концентрации препарата (см. рис. 3).

Таблица 3

Влияние аэробных и анаэробных условий на образование формилфолиевой кислоты
Образование формилфолиевой кислоты в µg/60 µl гомогената

	аэробноз	анаэробноз
10-м. гистидин	8.2	109.8
контроль	7.2	14.8

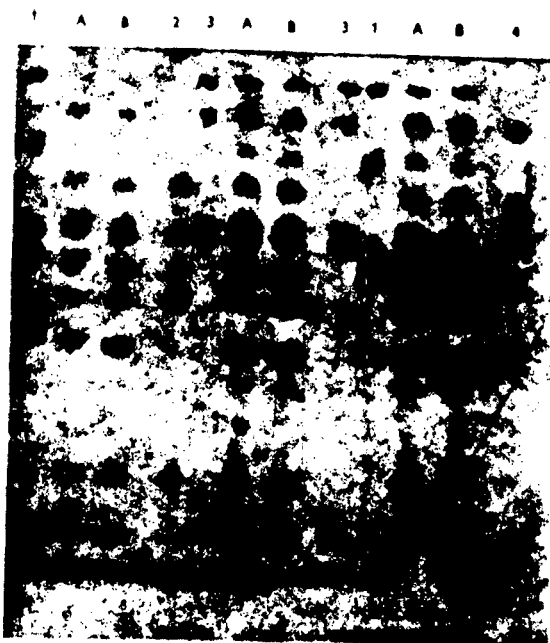
В течение дальнейшей работы было необходимо выяснить, в какой степени формилирование фолиевой кислоты зависит от окислительного обмена веществ. В аэробных условиях процесс формилирования незначителен, точно так же действие гистидина в этих условиях практически не проявляется. В анаэробных условиях формилирование гораздо интенсивнее, а также значительно выразительнее проявляется активизирующее дей-

Кейль: О белках. XXVI

Рис. 2

Хроматограмма полного гидролизата химотрипсиногена, модельной смеси и отдельных аминокислот, полученная при повторном проведении после открытия 1% нитридным и ацетоном.

На бумагу было нанесено по 40 мкг, 80 мкг и 120 мкг гидролизата (А) и модельной смеси (В), и по 5 мкг отдельных аминокислот. Последовательность аминокислот от старта к нижнему краю: 1-цистеиновая кислота, аргинин, глицин, глютаминовая кислота, аланин, лейцин; 2-аспарагиновая кислота, глицин, глютаминовая кислота, треонин, валин; 3-цистеиновая кислота, лизин, серин, глицин, аланин, валин, аспарагиновая кислота, серин, глютаминовая кислота.



Кейль, Шорм: О белках XXVII

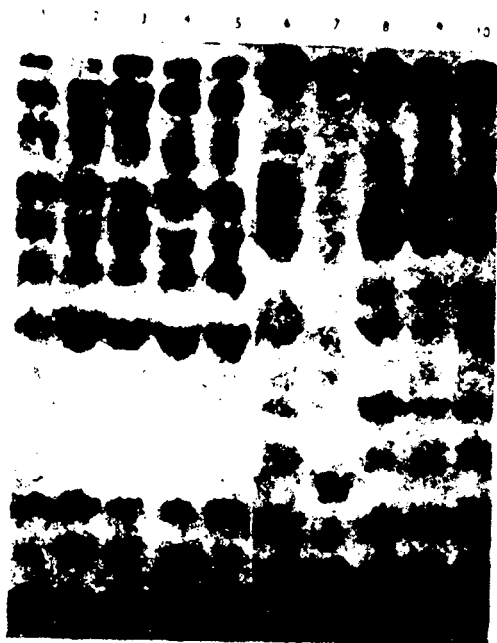


Рис. 4.

Хроматограмма полных гидролизатов белков и отдельных кислых пептидов

- 1 говяжий фибриноген (6 пептиды)
- 2 говяжий глобулин (7 пептиды)
- 3 говяжий сывальбумин (8 пептиды)
- 4 говяжий химотрипсиноген (9 пептиды)
- 5 говяжий трипсиноген (10 пептиды)

V. Kalous: *Elektrophoretische Analyse von Blutsereen*

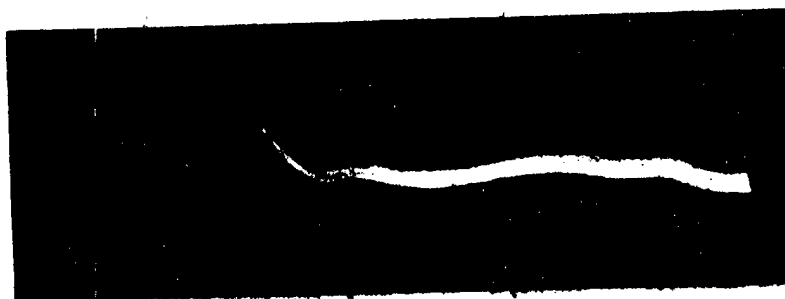


Abb. 1

Elektrophoretisches Diagramm der im Sulfosalicylfiltrat nach Winzler eines karzinomatösen Serums enthaltenen Komponenten im Acetatpuffer vom pH 4,62, $\mu = 0,1$

(1) *метаболизме фолиевой кислоты. II*

ствие гистидина (табл. 3). Прибавление АТФ не оказывает никакого влияния на процесс формилирования. Неожиданное различие в ходе формилирования в аэробных и анаэробных условиях, находящееся в противоречии с утверждением Рауена², можно было бы объяснить тем, что деградация гистидина протекает в аэробных условиях так, что метаболит, представляющий собой прямой источник образования формильной группы, или вообще не образуется, или не может быть заменен. Возможно также, что образовавшаяся формилфолиевая кислота подвергается дальнейшим быстрым превращениям.

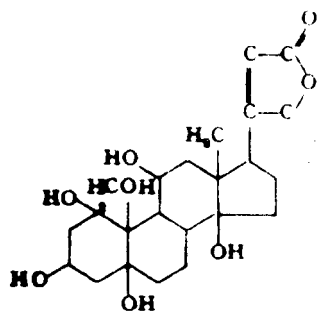
Николь⁴ описывает активирующее действие аскорбиновой кислоты на образование лейковорина в печеночных гомогенатах. Ввиду того, что аскорбиновая кислота не оказывает никакого влияния на формилирование фолиевой кислоты (табл. 2), вероятно, что ее влияние проявляется при самом превращении форми фолиевой кислоты в лейковорин.

Указанные результаты позволяют предполагать, что активирующее действие гистидина на формилирование фолиевой кислоты состоит, очевидно, в том, что один из продуктов метаболизма гистидина — вероятно, формамидинолуктаровая кислота — является источником формильной группы. Этот вывод вытекает из факта, что активирующее действие гистидина проявляется только до сравнительно высоких концентраций, а также из зависимости хода реакции от времени. Если к реакционной смеси гистидин не прибавляется, то при синтезе проявляет себя только то небольшое количество гистидина, которое находится в печени, или же та часть, которая образовалась при аутолизе белков печени.

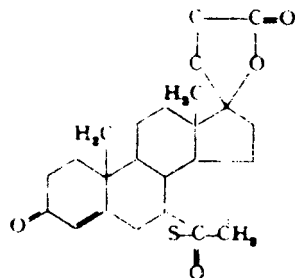
Литература

1. Slavik K., Matoušková V., Chem. listy 47, 1516 (1953).
2. Raue H., Z. physiol. Chem., 189, 81 (1952).
3. Slavik K., Holásková E., Matoušková V., Poupř O.: Доклад на съезде физиологов. Брно, сентябрь 1953 г.
4. Nichol A., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 74, 52 (1950).
5. Schulte J. B., Nature 171, 839 (1953).
6. Hall D. A., Biochem. J., 42, ix (1948).
7. Goporek M., J. Biol. Chem., 198, 839 (1952).
8. Sprinson D. B., J. Biol. Chem., 198, 655 (1952).
9. Mehler A. H., J. Biol. Chem., 201, 216 (1953).
10. Oyamaia Y., Biochem. Japan 36, 227 (1944).
11. Borek B. A., Wachs H., J. Am. Chem. Soc., 75, 1772 (1953).
12. Borek B. A., Wachs H., J. Biol. Chem., 205, 459 (1953).

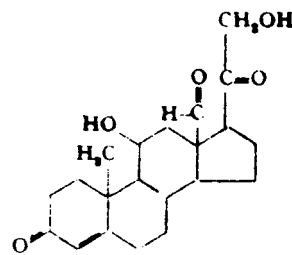
Перевод П. Милова.



Ouabagenin



SC 9420 (Aldactone)



Aldosterone (Aldehyde form)

centration ($3 \times 10^{-8} M$ in 0.1 ml of ethanol) similar to that used for the steroids with lactone rings, which KAHN and ACKERSON found to be active on cation transport in their experiments in cold-stored erythrocytes¹⁰. The same amount of pure ethanol was added to the control aliquots. Ouabain was added at the concentration of $2.5 \times 10^{-8} g$ in 0.1 cm³ of distilled water; the same amount of pure water was added to the control samples.

The quantities of potassium removed from the incubation medium and the quantities of sodium set free in the same medium during incubation are shown in the Table. SC 9420 had no measurable effect on these changes under the conditions of the experiment. On the contrary, Ouabain blocked potassium uptake by, and sodium output from, incubated cold-stored human erythrocytes.

Our experiments do not support the assumption that steroidal antagonists of aldosterone compete with aldosterone-like hormones for the enzymatic mechanism which controls cation transport not only within the renal tubular cells, but also within the blood red cells and possibly within the body cells in general.

Riassunto. Nonostante l'affinità strutturale con l'ouabaina, lo spirolattone antialdosteronico SC 9420 non esercita la stessa azione del glicoside cardiocinetico sugli scambi attivi che si manifestano *in vitro* attraverso la membrana di eritrociti umani incubati a 37°C dopo 6 giorni di conservazione a 4°C. Non trova quindi conferma sperimentale l'ipotesi che entrambe queste sostanze competano con l'aldosterone in qualche fase del processo enzimatico di trasporto degli elettroliti a livello di tutte le membrane cellulari dell'organismo.

G. D'AMICO and A. CESANA

Istituto di Clinica Medica dell'Università di Milano (Italia), November 30, 1960.

single carbon carriers. Besides the folic acid hydrogenases, the serine-aldolase⁹ and the hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase^{9,10} from pigeon liver were studied as the hydroxymethylation coenzyme generating systems. From the enzymes participating in the formation of formylation coenzymes, the ATP-activated formylase of tetrahydrofolate¹¹, using formate as the formyl source, the formiminotransferase and deaminase, described recently by TABOR and WYNGARDEN¹², and the aerobic formylase¹³ were examined. The enzyme system leucovorin-cyclodehydrogenase¹⁴ converting leucovorin into its coenzymatically active imidazoline-derivate was included in the enzymes studied. Table I shows the inhibitory properties of several 4-amino-analogues of folic acid on the above mentioned enzyme systems achieved from acetone powders of mammalian and avian liver in a partially purified form.

The inhibiting power of the 4-amino analogues mentioned could be observed neither on the aerobic formylase of folic acid nor on the tetrahydrofolic acid formylase using formate as the formyl donor with the inhibitor concentrations equimolecular to the substrate concentration. The most strongly inhibited enzyme systems are the folic acid hydrogenases which are inhibited by $8.6 \times 10^{-9} M$ aminopterin, or $6.2 \times 10^{-8} M$ amethopterin. The substitution of the nitrogen atom N¹⁰ by the formyl or hydroxymethyl group, and the hydrogenation of the pyrazine ring, diminish the inhibition activity more than 10-100 times.

Of the enzymes formylating the tetrahydrofolate, the system formiminotransferase + cyclodeaminase only was inhibited by all 4-amino-analogues tested, but only concentrations $10^{-6} M$ caused the 50% inhibition of the enzymes. As tested by the Lineveaver-Burk test, the

¹ R. L. BLAKLEY, *Biochem. J.* **58**, 446 (1954).

² S. FUTTERMAN, *Chem. Zentr.* **35**, 9010 (1958).

³ S. F. ZAKREWSKI and C. A. NICHOL, *Biochim. biophys. Acta* **57**, 425 (1958).

⁴ G. R. GREENBERG, *Fed. Proc.* **13**, 746 (1954).

⁵ J. M. PETERS and D. M. GREENBERG, *Nature* **51**, 1609 (1956).

⁶ M. J. OSBORN and F. M. HUENNEKENS, *J. biol. Chem.* **233**, 900 (1958).

⁷ K. SLAVIK, V. SLAVIKOVA, and Z. KOLMAN, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **26**, 1929 (1960).

⁸ M. J. OSBORN and F. M. HUENNEKENS, *Biochim. biophys. Acta* **26**, 646 (1957).

⁹ R. L. BLAKLEY, *Biochem. J.* **61**, 315 (1955).

¹⁰ Y. HATEFI, M. J. OSBORN, L. D. KAY, and F. M. HUENNEKENS, *J. biol. Chem.* **232**, 637 (1957).

¹¹ G. R. GREENBERG, L. JAENICKE, and M. SILVERMAN, *Biochim. biophys. Acta* **17**, 569 (1955).

¹² H. TABOR and L. WYNGARDEN, *J. biol. Chem.* **236**, 1830 (1960).

¹³ K. SLAVIK and V. MATOUŠKOVÁ, *Coll. Czech. Chem. Commun.* **19**, 1032 (1954).

¹⁴ J. M. PETERS and D. M. GREENBERG, *J. biol. Chem.* **236**, 320 (1961).

On the Mechanism of Action of Some 4-Aminoanalogues of Folic Acid

The biochemical mechanism of action of the antileukemic active 4-amino-analogues of folic acid, aminopterin and amethopterin has been found to be in a strong inhibition of the folic acid hydrogenases¹⁻³. In this way, the formation of the coenzymatically active tetrahydrofolic acid may be prevented and therefore the biosynthesis of thymidylate and purines inhibited. In order to prepare less toxic antimetabolites of folic acid with another mechanism of action, some 4-amino-analogues of coenzymatically active folic acid derivatives have been prepared in our laboratory⁴. This paper presents the inhibiting action of these substances on some enzyme systems converting folic acid into coenzymatically active

Tab. I. The inhibition of some enzyme systems converting folic acid into coenzymatically active derivatives by 4-aminoanalogues of folic acid metabolites

Enzyme	Leucovorin cyclodehydrase			Folic acid reductase + dihydrofolic acid reductase		
	1 μ at 342 mg in the incubation mixture (anhydrous derivative of tetrahydrofolate)			Determination of diastable amine after decomposition of tetrahydrofolate formed with acid		
Method of activity determination				1	2	3
Antimetabolite	1*	2	3	1	2	3
Aminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3} M$			$8.6 \cdot 10^{-9}$	0.0038	0.000016
N ¹⁰ -Formylaminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3} M$			$3.5 \cdot 10^{-8}$	0.0167	0.0000724
N ¹⁰ -Formyltetrahydroaminopterin				$4.3 \cdot 10^{-7}$	0.19	0.00082
N ⁵ -Formyltetrahydroaminopterin	$4.3 \cdot 10^{-4}$	202.0	0.76	$1.2 \cdot 10^{-6}$	2.3	0.01
Tetrahydroaminopterin	$1.43 \cdot 10^{-3}$	634.0	2.38	$1.0 \cdot 10^{-6}$	0.46	0.002
N ^{5,10} -Methylenetetrahydroaminopterin	$1.0 \cdot 10^{-3}$	477.0	1.78	$4.5 \cdot 10^{-7}$	0.202	0.00088
N ¹⁰ -Hydroxymethylaminopterin				$1.19 \cdot 10^{-6}$	0.526	0.0023
N ¹⁰ -Hydroxymethyltetrahydroaminopterin				$7.6 \cdot 10^{-6}$	0.338	0.00146
Trihydroxymethyltetrahydroaminopterin				$2.0 \cdot 10^{-6}$	0.885	0.00325
N ¹⁰ -Methylaminopterin	$4.6 \cdot 10^{-4}$	266.0	0.83	$6.2 \cdot 10^{-6}$	0.00275	0.0000119
N ¹⁰ -Methyltetrahydroaminopterin	no inhibition at $0.5 \cdot 10^{-3} M$					

* 1. Molar concentration of the inhibitor causing the 50% inhibition. 2. Absolute concentration of the inhibitor (μ g/ml) causing the 50% inhibition. 3. Molar inhibitor - substrate relation.

Tab. II

Enzyme	Serine aldolase + hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase			Hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase			Formiminotransferase + cyclodeaminase		
	1 μ at 355 mg (anhydrous leucovorin) after HClO ₄ deproteinization								
Method of activity				1	2	3	1	2	3
Antimetabolite	1*	2	3	1	2	3	1	2	3
Aminopterin	$1.8 \cdot 10^{-4}$	79.0	0.518	$1.9 \cdot 10^{-4}$	84.2	0.549	$1.5 \cdot 10^{-4}$	67.0	0.43
N ¹⁰ -Formylaminopterin	$3.2 \cdot 10^{-4}$	142.0	0.93	$2.3 \cdot 10^{-4}$	103.0	0.67	$2.7 \cdot 10^{-4}$	122.0	0.78
N ¹⁰ -Formyltetrahydroaminopterin							$2.3 \cdot 10^{-4}$	104.0	0.67
N ⁵ -Formyltetrahydroaminopterin	$6.9 \cdot 10^{-4}$	30.6	0.20	$1.7 \cdot 10^{-4}$	73.7	0.48	no inhibition at $0.4 \cdot 10^{-3} M$		
Tetrahydroaminopterin	$3.7 \cdot 10^{-4}$	16.5	0.109	$2.2 \cdot 10^{-4}$	9.7	0.0634	$3.9 \cdot 10^{-4}$	173.0	1.106
N ^{5,10} -Methylenetetrahydroaminopterin	$7.3 \cdot 10^{-4}$	3.2	0.0205	$7.4 \cdot 10^{-4}$	3.3	0.0209	$8.2 \cdot 10^{-4}$	365.0	2.34
N ¹⁰ -Hydroxymethylaminopterin							$1.86 \cdot 10^{-4}$	82.6	0.53
N ¹⁰ -Hydroxymethyltetrahydroaminopterin	$3.14 \cdot 10^{-4}$	139.5	0.911	$8.3 \cdot 10^{-4}$	38.1	0.247	$3.62 \cdot 10^{-4}$	160.0	1.02
Trihydroxymethyltetrahydroaminopterin	$3.25 \cdot 10^{-4}$	14.1	0.094	$3.28 \cdot 10^{-4}$	14.6	0.214	$2.5 \cdot 10^{-4}$	1130.0	16.1
N ¹⁰ -Methylaminopterin							$7.0 \cdot 10^{-4}$	312.0	2.0
N ¹⁰ -Methyltetrahydroaminopterin							$5.85 \cdot 10^{-4}$	2600.0	16.7

* 1. Molar concentration of the inhibitor causing the 50% inhibition. 2. Absolute concentration of the inhibitor (μ g/ml) causing the 50% inhibition. 3. Molar inhibitor - substrate relation.

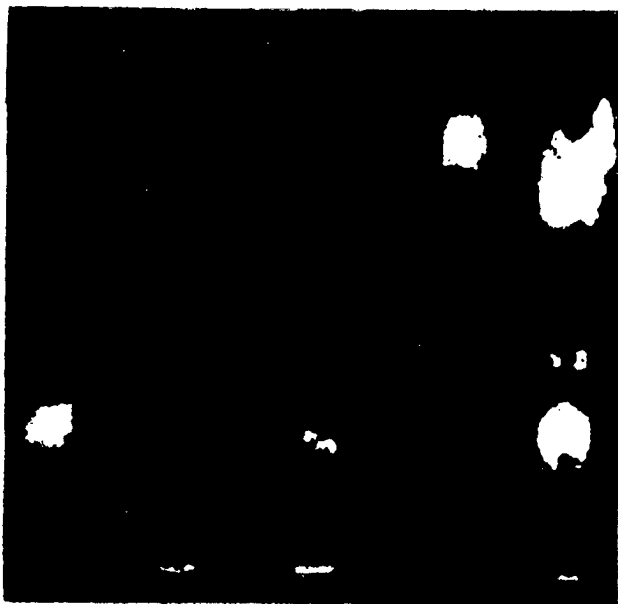
inhibition may not be of competitive nature. The enzyme leucovorin-cyclodehydrase was mostly inhibited by the structural analogue of leucovorin, but the inhibition was of the same order as in the case of the formimino-system.

As for the hydroxymethylating systems, the manometric method for the serine-aldolase determination described by BLAKLEY⁵, appeared to be unsuitable for the inhibition studies. Thus, the activity of the hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase was determined with serine and tetrahydrofolate as substrates. The activity of both the serine-aldolase and the dehydrogenase has been determined in these experiments. For the determination of the dehydrogenase activity only, N^{5,10}-

methylenetetrahydrofolic acid was used as the substrate. From the comparison of the inhibition of both enzymes tested, it can be concluded that the serine-aldolase may not be inhibited by lower concentrations of the inhibitors than the dehydrogenase.

In two enzyme systems tested, it was found that the structural 4-amino-analogue of the substrate was attacked by the enzyme. The enzymic formylation of aminopterin into N¹⁰-formylaminopterin¹⁰ was described earlier. In the course of the studies on the serine-aldolase, the conversion

¹⁰ K. SLAVIK, H. TOMÁŠOVÁ, and V. SLAVIKOVÁ, Coll. Czech. Chem. Commun. 33, 1367 (1968).



The chromatogram of the incubation mixture of serine aldolase from pigeon liver with tetrahydroaminopterin (0.5% sodium carbonate, ascending technique).

Samples: 1. serine aldolase + tetrahydroaminopterin + serine. 2. sample without enzyme. 3. sample without serine. 4. synthetic N^5-^{10} -methyltetrahydroaminopterin. 5. the mixture of sample 1. with the synthetic N^5-^{10} -methyltetrahydroaminopterin.

Zones: a) light-green fluorescent decomposition product of tetrahydroaminopterin, probably 3,4,6-triaminopteridine. b) tetrahydroaminopterin. c) N^5-^{10} -methyltetrahydroaminopterin.

of tetrahydroaminopterin into N^5-^{10} -methyltetrahydroaminopterin was detected by means of paper chromatography of the reaction mixtures. The product showed identical behaviour with that prepared by the non-enzymic hydroxymethylation of tetrahydroaminopterin by low concentrations of formaldehyde. However, the dehydrogenation of the substance mentioned to the N^5-^{10} -methyltetrahydroaminopterin could not be observed. From the results presented here, it can be supposed that from the enzyme systems of folic acid turnover the hydrogenases are most strongly inhibited by the 4-amino-analogues of folic acid derivatives. Even the hydrogenated and N^5 or N^{10} substituted 4-amino-analogues, which are much less active than aminopterin or amethopterin themselves, show the strongest activity on the folic acid hydrogenases. However, in the case of the last-mentioned substances, the inhibition of the hydroxymethyltetrahydrofolic acid dehydrogenase should be considered.

The results of the toxicity determination of the above-mentioned 4-amino-analogues for mice¹⁴ do not agree with the enzyme inhibition observed. Thus another mechanism of action might be supposed; i.e., the interference with the natural folic acid coenzymes in the single carbon transfer reactions. The inhibition of the thymidylate synthetase and the glycinaminoribotide and aminoimidazolcarboxamide ribotide transformylases will be reported later.

Zusammenfassung. Der Einfluss einiger 4-Aminoanaloge der coenzymatisch aktiven Folsäurederivate auf die Enzyme der Folsäureumwandlungen wurde verfolgt. Die stärkste Hemmung zeigen alle 4-Aminoanaloge auf die Hydrogenase der Folsäure, wobei die Hydrierung des Pyrazinringes dieselbe deutlich vermindert. Eine mässige,

jedoch deutlich schwächere Hemmung von nonkompetitiver Natur wurde bei der Hydroxymethyltetrahydrofolsäuredehydrogenase, Formiminotransferase und Leukovorincyclohydrase festgestellt. Weiter wurde die enzymatische Hydroxymethylierung von Tetrahydroaminopterin durch Serinaldolase aus der Taubenleber beobachtet.

VĚRA SLAVÍKOVÁ and K. SLAVÍK

Institute of Hematology and Laboratory of Protein Metabolism, Charles' University (Prague), 8. November 1960.

¹⁴ K. MOTYČKA and J. SOCHMAN, in press.

Establishment of an Epithelial Cell Strain from Calf Liver in Continuous Culture

Calf liver cells were isolated in September 1958 for various researches in the following way. Fetal calf liver was minced and the fragments were explanted on glass without plasma in a culture medium containing 25% calf serum and 0.5% lactalbumine hydrolysate (N.B.C.) in Hanks balanced salt solution¹. The cultures were incubated at 37°C. Media were changed every 2-3 days. Subcultures were made after about a month by trypsinizing (0.5% trypsin in a salt solution deficient in Ca^{++} and Mg^{++}). In the beginning growth of the cells was slow, but after the 5th subculture (March 1959) the growth was more regular, quicker and clearly epithelial as a close packed pavement epithelium. Cells from various explants were kept in culture. In the early stages most explants often formed epithelial cells, but after prolonged culture the cells were fibroblastlike. One of the subcultures however grows as a sheet of cells on the glass wall. After establishment of these cells in continuous culture the serum percentage of the medium was reduced gradually to 5%. The doubling time for this strain is two to three days and the mitotic index 2-3%. The shape of the cells from this strain (KaLe) is polygonal (see Fig.). The mean nuclear size, measured in a culture fixed with formal-alcohol-aceticacid and stained with iron hematoxylin, is 16 μ . (The mean nuclear size of liver tissue fixed and stained on the same manner is 7 μ .) There are some 'giants', 6-7%, whose nuclear size varies from 23-42 μ . The number of nucleoli per nucleus varies from 1-7. There is no relation between number of nucleoli and size of the nucleus. The number of chromosomes is 70 ± 2 (normal fetal liver cells 60). The cells on the photograph were fixed and stained with 2% $AgNO_3$ ². Between the cells a 'cement substance' is clearly visible, which is stained by the silver. (Cultures of cartilage cells, stained with $AgNO_3$, never gave staining of such 'cement substance' although some aneuploid strains grow as epithelial sheets as well.) The mitochondria of the liver cells are mostly spherical, some are filamentous. The plasma of the liver cells fixed with alcohol 70% and stained with the PAS reaction is clearly PAS positive. Physiologically they are thus liver cells. Up to now it was impossible to cultivate this KaLe strain as separate cells in suspension. We tried it with shake and stir cultures, but always groups of cells were found. It is probable that the cells are held together by the cement substance. Biochemical research on this strain will be published elsewhere.

¹ J. PAUL, *Cell and Tissue Culture* (R. and S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1959).

² B. ROBERTS, *Mikroskopische Technik*, 16th Ed. (R. Oldenbourg, München 1948).