

## Über den biochemischen Wirkungsmechanismus einiger Chemotherapeutika und Antiseptika

Von Prof. Dr. R. TSCHESCHE

Biochemische Abteilung des Chemischen Staatsinstitutes der Universität Hamburg

Die Zahl der gegen einen Erreger verfügbaren Mittel steigt und ihre Art wird differenzierter. Über die Wirkungsmechanismen wissen wir oft noch wenig, doch sind – wie gezeigt wird – bereits tiefe Einblicke in das biochemische Geschehen der Mikroben gewonnen worden, die dem Chemiker die Grundlage zur Entwicklung neuer und besserer Heilmittel sein können.

### Einleitung

Unsere Kenntnis des Wirkungsmechanismus der Heilmittel gegen Mikroben hat nicht mit der Aufwärtsentwicklung der Chemotherapie Schritt gehalten. Die Auffassung von Ehrlich „*Corpora nun agent nisi fixata*“, – mit anderen Worten: Agentien sind nur wirksam, wenn sie von den Parasiten auch gebunden werden – bildete den Ausgangspunkt. Die Bindung an sogenannte Rezeptoren sah Ehrlich als eine im wesentlichen chemische an, wenn auch die Art der Auffassung uns heute recht bildhaft anmutet. Der parasidotrope Effekt wurde in Gegensatz gestellt zum organotropen Effekt, der die Bindung des Agens an die Chemorezeptoren der Zellen des Wirtes bezeichnen sollte. Nur wenn das quantitative Verhältnis beider Bindungen weitgehend zu Gunsten des Parasiten lag, war das Mittel als Chemotherapeutikum als verwendbar überhaupt erwägenswert. In diesem Verhältnis haben die bekannten chemotherapeutischen Begriffe der Dosis tolerata und Dosis toxica ihren Ursprung.

Der Einfluß einer antimikrobiellen Substanz auf einen Erreger kann sich recht verschieden äußern. Am einfachsten zu beobachten ist die Begrenzung des Wachstums, der Vermehrung. Zur Kennzeichnung wurden die Begriffe *bakteriostatisch* und *bakterizid* geprägt, wobei bakterizid die Entstehung einer Dauerschädigung bedeutet, die auch nach Befreiung des Nährbodens von dem toxischen Agens nicht rückgängig gemacht werden kann. Bakteriostatisch dagegen zeigt an, daß die Mikrobe in neuer Umgebung bei günstigen Bedingungen ihre Entwicklung fortsetzen kann. Entsprechend sind die Begriffe *fungistatisch* und *fungizid* bei Pilzen zu verstehen. Diese Einteilung ist problematisch, da es u. a. von der Konzentration und der Dauer der Einwirkung abhängt, wie der Einfluß einer wirksamen Substanz ausfällt. Weiter kommt hinzu, daß sich viele Organismen nur im Stadium lebhafter Teilungsvorgänge durch bestimmte Chemotherapeutika wirkungsvoll beeinflussen lassen, während im Ruhestadium oder im ungünstigen Milieu der Effekt gering bleibt. Das deutet darauf hin, daß die wirksamen Verbindungen eine Störung im biochemischen Ablauf der Lebensvorgänge setzen und da die Ursache der Wirkung zu suchen ist.

Nach Hotchkiss<sup>1)</sup> lassen sich folgende Stufen antimikrobieller Wirkung unterscheiden:

a) Ein physikochemischer Prozeß, der in der Anhäufung des wirksamen Agens auf oder innerhalb der Mikrobe besteht (einfache Diffusion, Adsorption, aktive Absorption).

b) Die chemische Reaktion dieses Agens bei der erreichten Konzentration mit einem morphologischen Element oder einem Stoffwechselbestandteil der Zelle.

c) Die Unterbrechung einer normalen Zellfunktion durch diese Reaktion.

d) Die allmähliche oder sofortige Änderung des biochemischen Wachstumsprozesses durch die Unterbrechung.

<sup>1)</sup> Ann. Rev. Microbiology 2, 184 [1948].

Die vollständige Beschreibung einer chemotherapeutischen Wirkung müßte daher eine volle Würdigung aller vier Momente, Anhäufung, Reaktion, Unterbrechung und Wachstumsänderung enthalten, aber von einer solchen Klarheit kann noch bei keinem Chemotherapeutikum oder Antiseptikum die Rede sein. Dazu kommt, daß wir über die biochemischen Vorgänge des Wachstums nur sehr unvollkommene Vorstellungen haben, die Aufklärung der Art der Wirkung muß sich daher vornehmlich auf die Stufen a) bis c) erstrecken und den Befund der Wachstumsänderung unter d) wenigstens plausibel machen. Aber auch für die Vorgänge a)–c) ist bisher für kein einziges Agens eine vollkommen sichere Klärung erfolgt und es besteht höchstens eine mehr oder weniger große Annäherung an diese strengen Forderungen. Es kann auch nicht genügen, wenn für irgendeine Substanz nachgewiesen wird, daß sie mit einem Fermentsystem reagiert. Es muß gezeigt werden, daß das Ferment auch in der Mikrobe vorkommt, und es ist wünschenswert zu wissen, in welcher Form die chemische Reaktion mit ihm abläuft, ob Coferment oder Apoferment in sie eintreten. Dann aber muß auch festgestellt werden, ob dieses Fermentsystem unbedingt lebensnotwendig für die Mikrobe ist, denn es gibt Beispiele genug, die zeigen, daß unter veränderten Umständen Organismen Ausweichmöglichkeiten finden, die ihnen ein Fortkommen trotzdem ermöglichen.

Für die Aufklärung von Wirkungsmechanismen waren entscheidend:

1) Die empirische Entdeckung von Stoffen, die den chemotherapeutischen Agentien entgegenwirken, und

2) die Auffindung von empfindlichen und resistenten Stämmen eines Erregers gegen eine wirksame Verbindung.

Die erste erlaubt eine Kontrolle, Begrenzung und u. U. Beendigung des Einflusses eines Agens auf die empfindliche Mikrobe und gibt so indirekt einen Einblick in die Natur der Vorgänge, die in ihr ablaufen. Die zweite wird oft studiert in der Hoffnung, aus den beobachteten Unterschieden bei empfindlichen und resistenten Varianten Schlüsse auf die Reaktionen biochemischer Art zu ziehen, in die das Agens eingreift. Hierbei muß man allerdings Vorsicht walten lassen und darf nur nahe verwandte Stämme zum Vergleich heranziehen, denn u. U. kann eine Mutation zu einer Änderung von Stoffwechselvorgängen führen, die der unempfindlichen Variante das Überleben gestattet, ohne daß dieser neue biochemische Vorgang etwas mit der zur Diskussion stehenden Wirkung des Arzneimittels zu tun hat.

Es empfiehlt sich diese Betrachtungen mit dem Wirkungsmechanismus der Sulfonamide zu beginnen, weil gerade hier eine große Zahl von Untersuchungen angestellt worden sind, ohne daß auch heute noch von einer völligen Klärung gesprochen werden kann. Immerhin haben die letzten Jahre weitere Tatsachen aufgezeigt, welche die Hoffnung erwecken, daß das gewünschte Endergebnis nicht mehr allzu lange auf sich warten lassen wird. Beginnen wir mit den älteren Erklärungen, um uns dann erst dem neuesten Stand der Entwicklung zuzuwenden.

## Hemmung der Folsäure-Synthese und der Methionin-Bildung

1937 äußerten Mayer und Oechslin<sup>2)</sup> die Vermutung, daß der bakteriostatische Effekt der Sulfonamide nach einer Oxydation ihrer kernständigen NH<sub>2</sub>-Gruppe zu Hydroxylamino-benzolsulfonamid zustande käme, denn diese Verbindung war in vitro bakterizider als die Sulfonamide selbst:



Nach Locke, Main und Mellon<sup>2a)</sup> sollte diese Verbindung als Inhibitor der Katalase wirken und damit empfindliche Bakterien der Einwirkung biogenen Wasserstoffperoxyds ausgeliefert sein, so daß es zu einer Schädigung und u. U. Zerstörung der Mikroben kommen sollte. Diese Vorstellungen erwiesen sich als nicht haltbar, da sich zeigen ließ, daß p-Aminobenzoesäure (PABA = p-aminobenzoic acid) die bakteriostatische Wirkung der Sulfonamide in vitro aufzuheben vermag, nicht aber die des p-Hydroxylamino-benzolsulfonamids, und daß der antagonistische Effekt in vivo auf eine Reduktion zu Amino-Derivaten zurückgeführt werden muß.

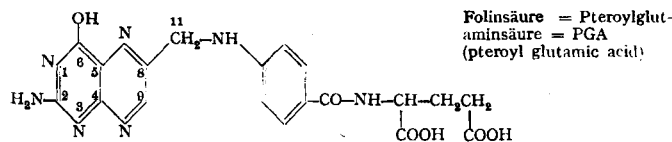
Die Unhaltbarkeit der obigen Erklärung geht vor allem auf die Entdeckung von Woods und von Fildes<sup>3)</sup> zurück, daß p-Aminobenzoesäure (PABA) ein spezifischer Inhibitor der Sulfonamid-Wirkung ist und daß diese Säure in einer Konzentration von 1,2–5,8·10<sup>-8</sup> Mol. ausreichend war, um 3,03·10<sup>-4</sup> Mol. Sulfonamid zu inhibieren. Sie fanden weiter, daß PABA sehr wahrscheinlich der natürliche Inhibitor in Hefe und Bakterienextrakten ist. Woods schloß aus seinen Versuchen, daß PABA ein wesentlicher Wuchsstoff für die Bakterien ist und daß die Fermentreaktion, in die die Verwertung von PABA verwickelt ist, Gegenstand der konkurrierenden Inhibition durch Sulfonamid ist. Diese Inhibition geht auf die strukturelle Verwandtschaft zwischen Sulfonamid und PABA zurück, diese Säure ist das Substrat für die in Betracht zu ziehende Fermentreaktion. In der Isolierung von PABA aus Hefe durch Rubbo und Gillespie<sup>4)</sup>, Blanchard<sup>5)</sup> und R. Kuhn und Mitarbeiter<sup>6)</sup> fand diese Vorstellung von Woods eine erfreuliche Bestätigung.

Eine neue Theorie der Sulfonamid-Wirkung mußte daher auf die Tatsache der konkurrierenden Inhibition von Sulfonamiden durch PABA gebührende Rücksicht nehmen. Sevag und Mitarbeiter<sup>7)</sup> entwickelten die Theorie, daß PABA nicht ein wesentlicher Wuchsstoff für die Bakterien ist, sondern nur ein nicht toxisches Analogon der Sulfonamide, das fähig ist, diese unspezifisch von einer Fermentoberfläche zu verdrängen, ohne selbst das Ferment in gleicher Weise zu hemmen. Es wurde dabei vor allem an solche Fermente gedacht, die mit dem Vorgang der Atmung verknüpft sind, so daß deren Hemmung auch die energieliefernden Prozesse stören würde und so Zellteilung und Wachstum gebremst werden würden. Aber eine genauere Prüfung der Beziehungen zwischen Atmungshemmung und Wachstumsinhibition durch Sulfonamide ergab keine Parallelität bei verschiedenen Mikroben und auch die Annahme von Sevag, daß PABA kein wesentlicher Wuchsstoff für Bakterien ist, konnte nicht aufrecht erhalten werden. Ließ sich doch auch zeigen, daß gewisse sulfonamid-resistente Stämme ihre Widerstandsfähigkeit erwerben bzw. erhöhen dadurch, daß sie größere Mengen PABA bilden als ihre nicht resistenten Verwandten. Demgegenüber kann auch der Feststellung von Sevag keine so große Bedeutung beigegeben werden, daß PABA in hohen Konzentrationen 12·10<sup>-3</sup> bis 35·10<sup>-3</sup> selbst inhibierend wirkt. Dieser Befund steht mit bekannten Tatsachen der Fermentchemie nicht in Widerspruch, daß ein Substrat in hohen Konzentrationen selbst als Hemmstoff für sein Ferment zu wirken vermag.

Es ist verständlich, daß man sich sehr bemüht hat, das Fermentensystem aufzufinden, für das PABA bedeutungsvoll ist. R. Kuhn<sup>8)</sup> äußerte die Ansicht, daß in den Bakterien ein spez. Protein oder ein sonstiger Receptor vorhanden ist, der in umkehrbarer Weise sich mit PABA als auch mit Sulfonamiden vereinigt. Hemmung und Entthemung gehorchen befriedigend dem Massenwirkungsgesetz. Damit war eine durchaus plausible Erklärung gefunden, es fehlte nur noch der hypothetische

Receptor, mit dem beide in Reaktion treten. Bemerkenswerterweise ließ sich zeigen, daß PABA in Hefe vorwiegend als ein Glutaminylpeptid vorkommt. Ratner, Blanchard, Coburn und Green<sup>9)</sup> und Auhagen<sup>10)</sup> fanden, daß für *Strept. plantarum* p-Aminobenzoylglutaminsäure ein besserer Entthemungsfaktor als PABA selbst ist. Neuere Untersuchungen haben aber erwiesen, daß diese Feststellung nicht allgemein und für diesen Stamm von *Strept. plant.* mehr oder weniger allein gilt<sup>11)</sup>.

Eine neue Richtung nahm die Erklärung der Sulfonamid-Wirkung an, als die Entdeckung und Konstitutionsermittlung des neuen B-Vitamins Folsäure durch Angier und Mitarbeiter<sup>12)</sup> gelungen war. Die Formel



zeigt PABA als Mittelstück der Molekel, und von Lampen und Jones<sup>13)</sup> wie von Tschesche<sup>14)</sup> wurde darauf hingewiesen, daß möglicherweise die Störung der Folsäure-Synthese in den Bakterien ein wesentliches Merkmal der Sulfonamid-Wirkung sein könnte. Durch Bindung dieser Chemotherapeutika an den Pteridin-Rest könnte ein biologisch unwirksames Reaktionsprodukt in den Mikroben auftreten und so die Lebenstätigkeit gestört werden. Die später noch zu erläuternde Bedeutung dieses Vitamins für den Aufbau der Nukleinsäuren würde die Wachstumshemmung durch Sulfonamide verständlich machen. Es würden also PABA und Sulfonamide um den Pteridin-Rest konkurrieren.

Eine Prüfung mußte von der Frage ausgehen, ob man bei sulfonamid-empfindlichen Mikroben die Hemmung mit Pteroylglutaminsäure aufheben kann, wenn man ihnen diesen Stoff in der Nährlösung anbietet, und ob Bakterien, die nicht in der Lage sind, ihn selbst zu synthetisieren, überhaupt sulfonamidempfindlich sind. Sie beziehen ja dieses Vitamin normalerweise aus dem Nährsubstrat, der zu inhibierende Prozeß kommt bei ihnen gar nicht vor.

Die Prüfung dieser Fragen, die mit den Namen Lampen und Jones<sup>13)</sup>, Auhagen<sup>15)</sup> und Möller, Weygand und Wacker<sup>16)</sup>, Kimmig<sup>17)</sup> und Tschesche<sup>18)</sup> verbunden ist, ergab: Anknüpfend an die Einteilung von Auhagen lassen sich drei Gruppen von Bakterien unterscheiden:

Gruppe A umfaßt solche, die durch Sulfonamide gehemmt werden, bei denen aber die Hemmung nicht durch Folsäure aufhebbar ist. Dazu gehören:

*B. coli*, *B. proteus*, *B. fluorescenz*, *B. typhi*, *B. paratyphi*, *B. dysenteriae*, *B. enteritis*, *B. subtilis*, *N. gonorrhoeae*, *Staphylokokkus aureus* H., *Strept. plant.* IC u. a.

Alle diese Bakterien sind gramnegativ, während diejenigen der Gruppe B und C im allgemeinen grampositiv sind.

Gruppe B sind Bakterien, die durch Sulfonamide inhibiert werden, bei denen aber die Hemmung nichtkonkurrierend durch eine bestimmte Menge Pteroylglutaminsäure aufhebbar ist, unabhängig von der angewandten Menge Sulfonamid. Die zur Überwindung der Inhibition notwendige Menge Folsäure ist ungefähr gleich derjenigen, welche die Gruppe C zum Wachstum benötigt. Zu dieser Gruppe gehören:

*Thermobakt. helv.* Wlg, *Enterokokken* Stamm W 12–W 18. *Strept. viridans* E, *Bakt. A. M. B.*, verschiedene Stämme von *Staphylokokken*, *Streptokokken* und einige Milchsäurebakterien.

Gruppe C schließlich sind solche, die nicht durch Sulfonamide im Wachstum bei nicht zu großen Konzentrationen gehemmt werden, aber auch Folsäure nicht selbst aufbauen, sondern aus der Nährlösung beziehen müssen. Dazu gehören:

*Strept. faecalis* R, *Lactobacillus casei*, ferner verschiedene *Streptokokken*- und *Staphylokokken*-Stämme.

Die Ergebnisse zeigen, daß die neue Vorstellung der Hemmung der Folsäure-Synthese durch Sulfonamide nur für die Gruppe B genügend gesichert erscheint, während die Gruppe C diese Deutung durch ihr Verhalten unterstreicht. Für die Gruppe

<sup>2)</sup> C. R. Séances Acad. Sci. Paris 205, 181 [1937].

<sup>2a)</sup> Brit. J. exp. Path. 21, 74 [1940].

<sup>3)</sup> Lancet 1, 955 [1940].

<sup>4)</sup> Nature [London] 146, 838 [1940].

<sup>5)</sup> J. biol. Chemistry 140, 919 [1941].

<sup>6)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 74, 1617 [1941].

<sup>7)</sup> M. G. Sevag u. M. N. Green, J. Bacteriol. 48, 623 [1944]; M. G. Sevag, J. Henry u. R. A. Richardson, ebenda 49, 71 [1945]; M. G. Sevag u. M. Shelburne, ebenda 43, 421, 447 [1942]; M. G. Sevag, M. Shelburne u. S. Mudd, J. gen. Physiol. 25, 805 [1942]; J. Bacteriol. 49, 65 [1945].

<sup>8)</sup> Diese Ztschr. 55, 4 [1942].

<sup>9)</sup> J. biol. Chemistry 155, 689 [1944].

<sup>10)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 277, 197 [1943].

<sup>11)</sup> Th. Wagner-Jauregg u. W. H. Wagner, Z. Naturforsch. 1, 229 [1946].

<sup>12)</sup> Science [New York] 103, 667 [1946]; J. Amer. Chem. Soc. 70, 25 [1948].

<sup>13)</sup> J. biol. Chemistry 164, 485 [1946]; 166, 435 [1946].

<sup>14)</sup> Z. Naturforsch. 2b, 10 [1947]. Vgl. diese Ztschr. 60, 137 [1948].

<sup>15)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 283, 195 [1948].

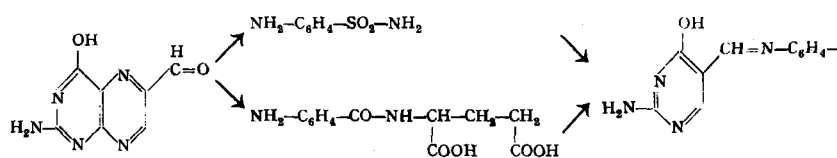
<sup>16)</sup> Z. Naturforsch. 4b, 100 [1949].

<sup>17)</sup> J. Kimmig u. R. Wehrmann, Arch. Dermatol. 187, 586 [1949].

<sup>18)</sup> Z. Naturforsch. 2b, 244 [1947].

A ist aber der dargelegte Wirkungsmechanismus allein nicht ausreichend und es müssen andere oder noch zusätzliche Vorstellungen entwickelt werden. Es mag aber in diesem Zusammenhang wichtig sein darauf hinzuweisen, daß *Miller*<sup>19)</sup> bei *E. coli* durch Konzentrationen von Sulfonamiden, die keine völlige Unterbindung des Wachstums hervorbringen, eine Minderung der Folin-säure-Bildung in diesem Bakterium beobachten konnte. Ferner wurde unter den gleichen Umständen bei dieser Mikrobe ein Zwischenprodukt der Purin-Synthese gefaßt, auf welches später noch eingegangen wird, das auch zeigt, daß eine Störung des Folin-säure-Aufbaus auch bei den Bakterien der Gruppe A durch Sulfonamide gesetzt wird. Es ist daher daran zu denken, daß außer dieser Synthese noch ein oder mehrere andere biochemische Prozesse durch Sulfonamide gestoppt werden, so daß trotz Zuführung der nicht herstellbaren Folin-säure von außen das Wachstum nicht wieder in Gang kommt. Auf Anhaltspunkte für solche weiteren Vorgänge wird später eingegangen werden. Die Beobachtung von *Martin, Tollman* und *Moss*<sup>20)</sup>, daß bei Staphylokokken die Sulfathiazol-Vergiftung zwar nicht durch Pteroylglutaminsäure, wohl aber durch Pterinsäure (Folin-säure frei von Glutaminsäure) aufhebbar ist, konnte von *Weygand* und Mitarbeitern<sup>21)</sup> nicht bestätigt werden.

Von *Tschesche*<sup>14)</sup> war die Inhibition der Folin-säure-Synthese so gedeutet worden, daß der intermediär in den Mikroben aufgebaute 2-Amino-6-oxy-pteridinaldehyd-8 sich an Stelle von PABA oder p-Aminobenzoylglutaminsäure mit den Sulfonamiden zu *Schiffschen* Basen vereinigen sollte. Die biochemische Hydrierung der normalerweise entstehenden Produkte würde zu Pterinsäure bzw. Folin-säure führen. Mit einem solchen Mechanismus steht in Übereinstimmung, daß nur solche Sulfonamide chemotherapeutisch wirksam sind, die eine freie NH<sub>2</sub>-Gruppe am Phenyl-Kern enthalten oder eine solche unter biologischen Bedingungen zu bilden vermögen. Nur diese werden auch antagonistisch durch PABA beeinflusst.

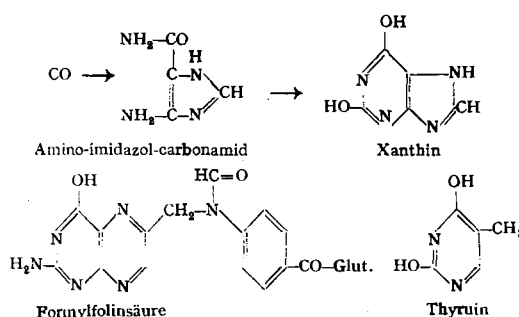


*Weygand* und Mitarbeiter<sup>21)</sup> haben diesen Pteridinaldehyd zusammen mit p-Aminobenzoylglutaminsäure Bakterien der Gruppe C angeboten, die also auf Zuführung fertiger Folin-säure angewiesen sind, und es zeigte sich, daß *Strept. faecalis R* nach einer Inkubationszeit daraus diesen Wuchsstoff zu bilden vermochte. Die Autoren konnten die gebildete Folin-säure nachher in den Bakterien nachweisen, und der Prozeß gehorchte dem Massenwirkungsgesetz<sup>21a)</sup>. Zu erklären verbleibt, warum die Bildung erst nach einer gewissen Zeit in Gang kommt. Erwähnt sei auch noch, daß die Hydrierung der *Schiffschen* Base zu Folin-säure *Weygand* und Mitarbeitern<sup>22)</sup> auch chemisch möglich war.

*Forrest* und *Walker*<sup>23)</sup> glaubten aus der Tatsache, daß in der logarithmischen Phase des Wachstums bei gewissen Bakterien eine stark reduzierende Substanz auftritt, schließen zu müssen, daß in ihr möglicherweise Redukton vorliegt. Sie konnten zeigen, daß aus 2.4.5-Triamino-6-oxy-pyrimidin, Redukton und p-Aminobenzoylglutaminsäure in vitro Folin-säure entsteht, und daß bei Gegenwart von Sulfonamiden dieses in die Synthese zu einem Sulfonamid - Analogen dieses Wuchsstoffes einbezogen wird. Sie vermuteten normalerweise eine Kondensation des Reduktons mit der p-Aminobenzoylglutaminsäure, und dieses Produkt sollte dann mit dem Pyrimidin-Derivat zur Pteroylglutaminsäure zusammentreten. Diese Ansicht ist recht unwahrscheinlich geworden, nachdem *Weygand* und Mitarbeiter gezeigt haben, daß Redukton keinen Einfluß auf die Synthese in vivo ausübt. Die chemische Gewinnung von Folin-säure mit Hilfe von Redukton wurde übrigens auch von *Angier* und Mitarbeitern<sup>27)</sup> durchgeführt. So scheint die Vorstellung der konkurrieren-

den Reaktion von Sulfonamiden und PABA mit Derivaten um den Pteridinaldehyd vorerst die einleuchtendste Erklärung zu sein.

Es bleibt noch zu erläutern, welcher biochemische Prozeß im Sinne von *Hotchkiss*, durch die Unterbindung der Folin-säure-Synthese unterbrochen wird. *Fox* und *Stetten*<sup>23)</sup> und *Fox*<sup>24)</sup> zeigten, daß sich bei *E. coli* in einem synthetischen Nährboden in Gegenwart von Sulfonamiden ein basischer Bestandteil anhäuft, der von *Shive* und Mitarbeitern<sup>25)</sup> als 5-Amino-4-imidazol-carbonamid erkannt wurde. Es wurde die Ansicht geäußert, daß er ein Zwischenprodukt der Purin-Synthese in den Mikroben darstellt. Ein Blick auf die Formel lehrt, daß nur noch die Einführung einer CO-Gruppierung notwendig ist, um die Bildung z. B. des Xanthins zu vollenden. Für diesen Vorgang soll ein Derivat der Folin-säure, die Formylfolinsäure notwendig sein. Die Auffindung des Rhizopterins in Kulturen von *Rhizopus nigricans*<sup>26)</sup>, welches mit Formylpterinsäure identisch ist, hatte die Aufmerksamkeit auch auf das Formyl-Derivat der Folin-säure<sup>29)</sup> gelenkt. Die Prüfung dieser Derivate im Sulfonamid-Enthemmungsversuch zeigte ebenfalls gute Wirksamkeit, und Rhizopterin erwies sich in einer Reihe von Fällen als Wachstumsfaktor dem nicht formylierten Grundstoff überlegen.



Gleicher Wachstumseffekt bei verschiedenen Konzentrationen

	Staph. aureus Ki Au	Str. faecal.
Folin-säure (PGA)	1,0	0,8
Formylfolinsäure	1,0	0,8
Pterinsäure	2,0	1,9
Rhizopterin	0,2	0,16
Teropterin (Pteroyl-triglut.)	34	28
Thymin	550	525

Konzentrationen in mg/cm<sup>3</sup> für halboptimales Wachstum nach *Möller, Weygand* und *Wacker*<sup>16)</sup>.

Man nimmt daher heute an, daß die Folin-säure oder vielleicht die Pterinsäure in Form des Formyl-Derivates Co-Faktor eines Fermentsystems ist, das den Aufbau der Purine in Bakterien katalysiert. Unklar bleibt dabei, wie die verbrauchte Formyl-Gruppe immer wieder regeneriert wird. In bisher nicht bekannter Weise soll auch die Thymin-Synthese durch Folin-säure ermöglicht werden. Purine wie Thymin und Analga können bei einigen Bakterien Folin-säure im Nährboden wirkungsvoll ersetzen, da mit ihnen das fertige Produkt der durch Folin-säure katalysierten Reaktion zugeführt wird. Dabei sind nur solche Pyrimidin-Derivate wirksam, die eine CH<sub>3</sub>-Gruppe wie im Thymin enthalten. Thymin allein ist wenig wirksam, zusammen mit Purinen und Aminosäuren kann jedoch eine Variante von *E. coli* gänzlich auf p-Aminobenzoesäure verzichten. In diesem Medium ist der Stamm hoch resistent gegen Sulfonamide (*Lampen, Roepke* und *Jones*<sup>30)</sup>). Es handelt sich dabei um eine Mutante, die durch Röntgenbestrahlung die Fähigkeit zur PABA-Synthese eingebüßt hatte. *E. coli* (Wildstamm) ist sonst in der Lage auf einem Medium zu wachsen, das Asparagin und Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle enthält.

Der Befund, daß Thymin und Purine nichtkonkurrierend die Sulfonamid-Hemmung beseitigen können, läßt auch noch die Möglichkeit zu, daß diese Stoffe Vorstufen der Folin-säure-Bildung sind und zum Aufbau des Pteridin-Teils der Molekel herangezogen werden. Dazu sind aber Mengen nötig, die viel-tausendfach die notwendige Konzentration der Folin-säure zur Enthemmung überschreiten. Diese Möglichkeit

<sup>19)</sup> Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 151 [1944].

<sup>20)</sup> Science [New York] 106, 168 [1947].

<sup>21)</sup> Z. Naturforsch. 3b, 299 [1948].

<sup>21a)</sup> Vgl. diese Ztschr. 61, 329 [1949] (Chemiedozententagung am 8.—11. 6. 1949 in Hamburg).

<sup>22)</sup> Chem. Ber. 82, 25 [1949].

<sup>23)</sup> J. biol. Chemistry 161, 333 [1945].

<sup>24)</sup> Proc. Soc. exp. Biol. Med. 61, 142 [1942].

<sup>25)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 69, 725 [1947].

<sup>26)</sup> Nature [London] 161, 721 [1948].

<sup>27)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 70, 25 [1948].

<sup>28)</sup> D. E. Wolf, R. C. Anderson, E. A. Kaczka, S. A. Harris, G. E. Arth, P. L. Southwick, R. Moxingo u. K. Folkers, ebenda 69, 2753 [1947].

<sup>29)</sup> M. Gordon, J. M. Road, R. E. Fakin u. W. Shive, ebenda 70, 878 [1948].

<sup>30)</sup> J. biol. Chemistry 164, 789 [1946].

entfällt auch mit der Feststellung, daß bei einer Reihe von Bakterien mit Thymin und Purinen Wachstum auftritt, ohne daß dabei Pteroylglutaminsäure gebildet wird. Ferner erweisen sich in diesem Fall eine Reihe von Analoga der Folsäure, die als Antivitamine wirken, z. B. die Pteroylasparaginsäure und die 9-Methylfolsäure, als ohne Einfluß auf das Wachstum.

Da Thymin und Purine wichtige Bausteine zum Aufbau der Nukleinsäuren sind und diese wieder sowohl für die Eiweißsynthese wie als Bestandteil der Gene unentbehrlich sind, macht ihr Fehlen die Hemmung des Wachstums bei den mit Sulfonamiden inhibierten Mikroben verständlich. Ferner sei auf die Bedeutung des Purins Adenin als Komponente in einer Reihe von Co-Faktoren (Co-dehydrasen, Isalloxazin-Adenin-dinukleotide) von Fermenten hingewiesen.

Außer PABA, Pteroylglutaminsäure, Thymin und Purinen wurde als weiterer Antagonist der Sulfonamide das Methionin erkannt<sup>31, 32</sup>). Methionin ist ein wesentlicher Wuchsstoff nicht nur für höhere Tiere, sondern auch für eine ganze Reihe von Bakterien, so für Diphtheriebazillen<sup>33</sup>), einige Streptokokken<sup>34</sup>), für *Cl. sporogenes*<sup>35</sup>) sowie für einige Stämme von Milchsäurebakterien<sup>36</sup>). Nach Kohn<sup>37</sup>) soll Methionin von *E. coli* nur aufgebaut werden können, wenn PABA zur Verfügung steht, und die Methionin-Synthese wird in bisher noch undurchsichtiger Weise durch die Gegenwart von Sulfonamiden inhibiert. In Gegenwart von Purinen und von Methionin fiel das PABA-Bedürfnis von 0,0012γ/cm<sup>3</sup> auf 0,00011γ/cm<sup>3</sup> Nährlösung bei der oben erwähnten Mutante von *E. coli* ab. Thymin allein erwies sich dabei praktisch als wirkungslos, aber in Gegenwart von Purinen unterstützte es das Wachstum. Der antagonistische Effekt des Methionins kommt nur bei niedrigen Konzentrationen von Sulfonamiden zum Ausdruck, andere Aminosäuren erwiesen sich wirkungslos, aber verstärken u. U. den antagonistischen Effekt des Methionins. Wir haben bei *E. coli* nach Sulfonamid-Vergiftung versucht, das Wachstum mit Folsäure und Methionin wieder in Gang zu bringen, es ließ sich ein kleiner Effekt feststellen, die Vermehrung erreichte aber bei weitem nicht die Höhe ohne Sulfonamid und war vorzeitig beendet. Es müssen hier also noch unbekannte Faktoren im Spiele sein.

Daß PABA möglicherweise auch noch in anderen Systemen als Folsäure eine katalytische Rolle spielt, zeigt, daß 2-Chlor-4-aminobenzoesäure ein Inhibitor von PABA ist; dieser Hemmstoff wird spezifisch aufgehoben durch Methionin<sup>38, 39</sup>). Ferner wird die Aminosalicylsäure – ein neuerdings sehr aktueller Hemmstoff für Tuberkelbazillen – durch PABA inhibiert, ebenso die p-Aminophosphorsäure, die ein Hemmstoff für *E. coli* ist. Es kann nicht behauptet werden, daß alle diese Effekte schon befriedigend erklärt sind; sie dürfen im Zusammenhang mit der antibakteriellen Wirkung der Sulfonamide nicht vernachlässigt werden. Immerhin scheint ein bedeutungsvoller Anfang gemacht, auf dem aufbauend es hoffentlich bald gelingen wird, die noch offenen Fragen widerspruchsfrei zu klären.

### Antivitamine und Hemmstoffe für Aminosäuren

Der Antagonismus Sulfanilsäure, bzw. Sulfanilamid-PABA hat mit Anlaß zur Synthese einer großen Zahl von Vitaminanaloga gegeben, mit denen sich in vielen Fällen Antivitamincharakter nachweisen ließ. Die Idee war, durch Verdrängung des eigentlichen Wirkstoffes durch eine sehr ähnlich gebaute Verbindung diese am Aufbau der Co-Fermente und Aktivatoren zu beteiligen oder aber die Entstehung der Co-Faktoren überhaupt zu inhibieren. Sie konnten dann in den meisten Fällen nicht die gleichen katalytischen Fähigkeiten entfalten wie die natürlichen Faktoren, so daß ein Hemmeffekt auftrat. Bei der Ähnlichkeit der Stoffwechselvorgänge in allen Formen des Lebens überrascht es nicht, daß ebenso wie bei höheren Tieren auch bei Mikroorganismen durch Antivitamine Wachstumsinhibition ausgelöst wer-

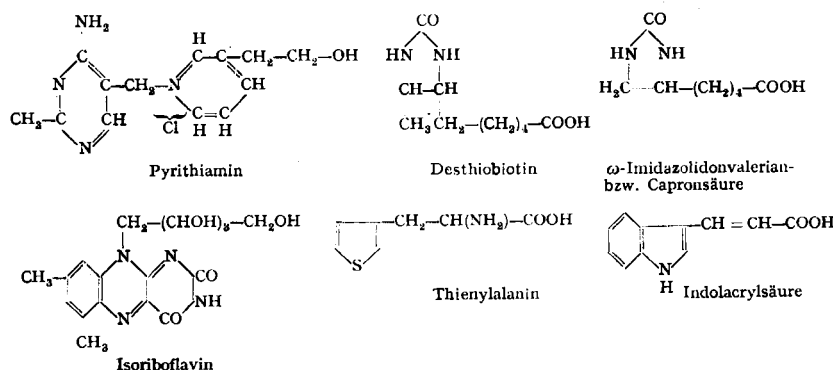
den kann; i. allgem. scheint aber der Unterschied in der toxischen Wirkung nicht groß genug zu sein, um diese Feststellung für die Chemotherapie auszunutzen. Jedenfalls haben die Antivitamine – wenn man von den Sulfonamiden absieht –, in ihr noch keine besondere Bedeutung erlangt; sie haben sich aber zum Studium biochemischer Vorgänge sehr bewährt. Die Übersicht der wichtigsten Antivitamine will keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben<sup>39a</sup>):

Aneurin (Thiamin)	– Oxythiamin (NH <sub>2</sub> durch OH ersetzt) Butylthiamin (CH <sub>3</sub> durch Butyl ersetzt) Pyriethiamin (Thiazolring durch Pyridinring ersetzt)
Riboflavin	– Lumiflavin Galaktoflavin Isoriboflavin 6.7-Dichlor-9-ribitylisoalloxazin 2.4-Diamino-7.8-dimethyl-10-ribityl-5.10-dihydrophenazin
Nikotinsäureamid (Niacin)	– β Acetylpyridin Pyridin 3-sulfosäure Indoleessigsäure (natürl. vorkomm. Antivitamin)
Pantothensäure	– Pantoyltaurin Phenylpantothanon
Biotin	– Desthiobiotin Biotinsulfon ω-Imidazolon-valerian- und -capronsäure
Pyridoxin Pyridoxal Pyridoxamin Folsäure	– 2.4-Dimethyl-3-hydroxy-5-oxymethylpyridin – Chinoxalin 2.6-Dioxy-folsäure 2.6-Diamino-folsäure 9 und 11-Methyl-folsäure Pteroylasparaginsäure Pteroyl-d-glutaminsäure
Ascorbinsäure Tocopherol Vitamin-K	– Glukoascorbinsäure – α-Tocopherolechinon – 2.3-Dichlor-1.4-naphthochinon 3.3'-Methylen-bis-(4-hydroxyeumarin)

Auch der Ersatz von für Mikroben essentiellen Aminosäuren durch Analoga hat zur Bildung von Hemmstoffen geführt. Es seien erwähnt:

Glutamin	– Methioninsulfoxyd
Phenylalanin	– Thienylalanin β-Hydroxyphenylalanin

Anders wirkt Indolacrylsäure, die die Synthese des Tryptophans inhibiert.



### Hemmung der Glutaminsäure-Assimilation

Viel erörtert ist die Frage nach dem Wirkungsmechanismus des Penicillins. Ein biochemischer Prozeß, der durch dieses Antibiotikum gestört wird, ist 1947 durch die Untersuchungen von Gale<sup>40</sup>) bekannt geworden. Zusammen mit Taylor konnte er zeigen, daß Staphylokokken und Streptokokken, die bei niedrigen Konzentrationen von Penicillin gewachsen waren, fast völlig die Fähigkeit verloren hatten, Glutaminsäure in ihre Zellen aufzunehmen und zu speichern. Dabei blieben die respiratorische und glykolytische Funktion der Bakterien unbeeinflusst. Gale nimmt an, daß bei grampositiven Organismen ein endergonischer Prozeß existiert, also ein Vorgang, der Energie verbraucht, um die Glutaminsäure zu assimilieren. Staphylokokken, die allmählich eine größere Penicillin-Resistenz erworben

<sup>31</sup>) J. S. Harris u. H. I. Kohn, J. Pharmacol. 73, 383 [1941].

<sup>32</sup>) E. A. Bliss u. P. H. Long, Johns Hopk. Hosp. Bull. 69, 14 [1941].

<sup>33</sup>) J. H. Mueller, J. Bacteriol. 29, 515 [1935].

<sup>34</sup>) K. L. Smiley, C. F. Niven u. J. M. Sherman, ebenda 46, 445 [1943].

<sup>35</sup>) P. Fildes u. G. M. Richardson, Brit. J. expt. Path. 16, 326 [1935].

<sup>36</sup>) M. S. Dunn, S. Shankman, M. N. Camlen u. H. Block, J. biol. Chemistry 168, 1 [1947].

<sup>37</sup>) J. Bacteriol. 44, 717 [1942].

<sup>38</sup>) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 52, 155 [1943].

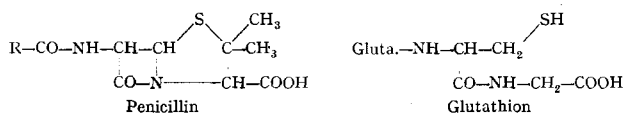
<sup>39</sup>) J. biol. Chemistry 162, 463 [1946].

<sup>39a</sup>) L. D. Wright, J. Amer. Diet Assoc. 23, 289 [1947].

<sup>40</sup>) J. gen. Microbiol. 1, 314 [1947]; Nature [London] 160, 407 [1947]; J. Bacteriol. 55, 161 [1948].

hatten, verloren auch entsprechend die Fähigkeit, Glutaminsäure innerhalb der Zellen zu speichern. Die hoch resistenten Stämme erwiesen sich schließlich nunmehr als gramnegativ und unabhängig von dem Vorkommen von Glutaminsäure im Nährmedium. *Gale* fand weiter, daß Staphylokokken, die im Hinblick auf die Eigenschaft gezüchtet worden waren, Aminosäuren aus dem Nährboden nicht zu benötigen, sich nunmehr auch gegen 2–5000fache Dosen Penicillin im Gegensatz zu den Ausgangsstämmen refraktär verhielten. Er sieht in der Unfähigkeit der penicillin-empfindlichen Bakterien, Glutaminsäure zu assimilieren (in Gegenwart dieses Agens), den das Wachstum begrenzenden Faktor, was schließlich auf eine Störung der Eiweiß-Synthese hinausläuft. Worin der endergonische Prozeß besteht, bleibt weiterhin zu klären.

In diesem Zusammenhang ist vielleicht eine Beobachtung von *Fischer*<sup>41)</sup> bedeutungsvoll. Er wies darauf hin, daß formal eine gewisse Ähnlichkeit im Aufbau von Penicillin und Glutathion besteht, und *Cavallito*<sup>42)</sup> zeigte, daß die Wirkung des Penicillins zwar durch Glutathion nur mäßig, stärker aber mit Cysteylglycin aufgehoben werden kann. Auch Cystein wirkt antagonistisch gegen Penicillin, aber ebenso nicht wie die vorher genannten Verbindungen, wenn dieses schon mit den Bakterien zusammengekommen ist. Es sei auch noch darauf hingewiesen, daß nur sich vermehrende Bakterien penicillinempfindlich sind und daß im Ruhestadium die Wirkung gering ist.



Eine künftige Theorie der Penicillin-Wirkung wird der Tatsache gerecht werden müssen, daß eine freie Carboxyl-Gruppe für die Wirksamkeit nicht bedeutungsvoll ist, da sowohl die Ester als auch das Amid noch gute Aktivität aufweisen. Dagegen ist die  $-\text{CO}-\text{N} <$  Gruppierung im Vierring unbedingt wesentlich, da ihre Aufspaltung z. B. durch das Ferment Penicillinase zu Unwirksamkeit führt. Ferner ist die sterische Anordnung der Molekel wichtig, da synthetisches Penicillin, das statt des im natürlichen Antibiotikum vorkommenden *D*-Dimethylcysteins, die *L*-Verbindung als Baustein verwendet, unwirksam ist.

Noch wenig klar liegen zur Zeit unsere Kenntnisse über den biochemischen Wirkungsmechanismus des Streptomycins und vieler anderer Antibiotika, von ihm ist jedoch bekannt, daß es eine Nukleinsäuren-fällende Eigenschaft besitzt, auch soll die Fähigkeit, Benzoesäure abzubauen, von ihm gestört werden\*).

### Hemmung des Wachstums durch Inhibition von SH-Fermenten

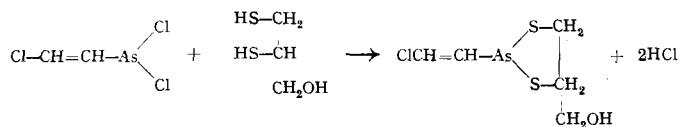
In der Chemotherapie der Protozoen- und Spirochäten-Infektionen waren und sind organische Derivate des Arsens und Antimons von großer Bedeutung, die im übrigen auch toxisch für viele Bakterien sein können. Es kann kein Zweifel darüber sein, daß der wirksame Teil der Molekel nicht der organische Träger, sondern die Metalloidatome sind und erstere nur die Verteilung und Spezifität der Wirkung variieren. Alle diese Substanzen sind auch mehr oder weniger toxisch für Mensch und Tier. Das gilt für Salvarsan, Tryparsamid, Orsanin, Stovarsol, Mapharsen u. a. in gleicher Weise, wie für die verschiedenen Antimon-Derivate, Stibosan, Neostibosan, Solustibosan<sup>42a)</sup> usw. Nach *Vögtlin*<sup>43)</sup> bildet sich in vivo nach einer gewissen Latenzperiode aus ihnen ein Arsenoxyd-, bzw. Antimonoxyd-Derivat,

das der eigentliche Träger der Wirksamkeit ist und dem auch vor allem die Giftigkeit zukommt. Dieses reagiert dann mit SH-Verbindungen der Zelle im Sinne der Gleichung



und er schloß, daß das dreiwertige Arsen ein spezifisches Gift für SH-Gruppen im Protoplasma darstellt, nachdem er auch zeigen konnte, daß Glutathion, Cystein und Thioglykolsäure wirkungsvoll der Arsenoxyd-Toxizität entgegenarbeiten können. Waren die Versuche zunächst in vitro an Trypanosomen unter Beobachtung ihrer Beweglichkeit durchgeführt worden, so zeigten dann Versuche in vivo, daß auch hier eine beträchtliche Verlangsamung der Zerstörung der Trypanosomen stattfand. Die S-S-Formen obiger Verbindungen waren von beträchtlich geringerem antagonistischen Effekt. Weiter ließ sich zeigen, daß die SH-Verbindungen den toxischen Einfluß der Arzneimittel auf den Wirt bedeutend herabsetzten. Es wurde also die Giftigkeit der Arsen-Derivate für Mensch und Tier wie für die Trypanosomen verringert. Entsprechende Versuche wurden mit Brech Weinstein und Cystein von *Chen, Geiling* und *MacHatton*<sup>44)</sup> durchgeführt. Ausscheidungsversuche mit 5-wertigen und 3-wertigen Arsen-Derivaten an Kaninchen, die neuerdings von *Crawford* und *Levy*<sup>45)</sup> angestellt worden sind, stehen mit diesen Vorstellungen in Übereinstimmung.

Als ein sehr wirksamer Antagonist der Arsen- und Antimonheilmittel hat sich das 2,3-Dimerkaptopropanol erwiesen, das unter der Bezeichnung B. A. L., British-Anti-Lewisite als Gegenmittel gegen diesen Kampfstoff entwickelt wurde. Es bildet sehr stabile Ringverbindungen mit Arsen- und Antimon-Derivaten und kann dazu dienen<sup>46)</sup>, die toxischen Erscheinungen dieser Mittel zu mildern. Es werden dadurch die SH-Gruppen enthaltenden Fermente vor der Inaktivierung geschützt.



*Barron* und *Singer*<sup>47)</sup> haben eine große Zahl bekannter Fermente daraufhin untersucht, ob sie freie SH-Gruppen enthalten, und haben etwa 30 gefunden. Es finden sich darunter solche, die für Atmung und Kohlenhydrat-Stoffwechsel sehr bedeutungsvoll sind.

SH-Gruppen enthalten: Systeme verantwortlich für Brenztraubensäureoxydation, Decarboxylierung und Acetessigsäure- und Acetylthylcarbinol-Bildung; Hexosemonophosphat-, Phosphoglycerinaldehyd-, Glycerin-,  $\alpha$ -Ketoglutar-, Bernsteinsäure-, Äpfelsäure- und Alkoholdehydrase der Hefe; Ferment der Synthese von  $\alpha$ -Ketoglutar-, Adenosintriphosphatase; Phosphoglukomutase; Phosphorylase; Hexokinase; Pankreasamylase;  $\beta$ -Amylase der Gerste; Stearinsäure-(Bakterien und Leber), Ölsäure-(Bakterien) und Essigsäure-(Hefe, Bakterien) Oxydase;  $\beta$ -Oxybuttersäure-dehydrase; Pankreaslipase und Esterase; Cerebrosidase; d-Aminooxydase; Monoaminoxydase; l-Glutaminsäure-dehydrase; Transaminase (sowohl Asparaginsäure wie Alanin); Urease; Kathepsin; Kathepsin-dipeptidase; Papain; Bromelain; Haemolysine; Lysozym; Cholinooxydase; Cholinesterase und Cholin-acetylase.

SH-Gruppen waren nicht bedeutungsvoll für Cytochromoxydase; Katalase; Alkohol-(Leber), Milchsäure- und Isocitronensäure-Dehydrase; Urikase; Diaminoxydase; Polyphenolooxydase; Ölsäure-(Erbse) Oxydase; Kohlensäureanhydrase; Säurephosphatase; Arginase; Pepsin und Trypsin.

Wenn Arsen-Derivate sich sowohl mit den Fermenten des Parasiten wie des Wirtes verbinden, erhebt sich die Frage, warum mit ihnen überhaupt eine erfolgreiche Therapie betrieben werden kann? Einmal kann die Verteilung der arsen-haltigen Heilmittel zwischen Gast und Wirt sich durch geeignete Substitution zu Gunsten des Parasiten verschieben, wobei daran zu denken ist, daß die Überführung in das hoch toxische Arsenoxyd-Derivat, das ja das eigentlich wirksame ist, erst am Ort der biochemischen Reaktion mit den SH-Fermenten stattfinden kann. Dann aber mag die Bedeutung des gleichen Fermentes oder zweier Fermente von ähnlicher Funktion bei Wirt und Gast für

<sup>41)</sup> Science [New York] 106, 146 [1947].

<sup>42)</sup> Ebenda 106, 235 [1947]; J. H. Bailey u. C. J. Cavallito, J. Bacteriol. 55, 175 [1948].

\* Zusatz b. d. Korrektur: Streptomycin soll durch Komplexbildung die Depolymerisation und Hydrolyse von Nukleinsäuren inhibieren. Penicillin dagegen scheint den Abbau der Mononukleotide, insbes. die dephosphorylierenden Vorgänge zu blockieren. Dadurch kommt es mittelbar oder unmittelbar zu einer Störung der Energiebereitstellung aus energiereichen Phosphatbindungen und zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes SH-S-S- nach der rechten Seite der Gleichung. Durch Zuführung von SH-Verbindungen ist dieser letztere Vorgang rückgängig zu machen. R. Pratt u. J. Dufrenoy, Texas Rep. Biol. Med. 7, 180 [1949].

<sup>42a)</sup> Vgl. H. Schmidt, „Weiterentwicklung chemotherapeutisch wirksamer Antimon-Verbindungen“, diese Ztschr. 60, 261 [1948].

<sup>43)</sup> Physiologic. Rev. 5, 63 [1925]; C. Voegtlin, H. A. Dyer u. C. S. Leonard, Publ. Health. Rep. 38, 1882 [1923]; C. Voegtlin, H. A. Dyer u. D. W. Miller, J. Pharmacol. 23, 55 [1924]; C. Voegtlin, S. M. Rosenthal u. J. M. Johnson, Publ. Health. Rep. 46, 339 [1931].

<sup>44)</sup> G. Chen, E. M. K. Geiling u. R. M. Mac Hatton, J. infect. Diseases 76, 152 [1945].

<sup>45)</sup> Biochemic. J. 41, 333 [1947].

<sup>46)</sup> L. A. Stocken, R. H. S. Thompson u. V. P. Whittaker, Biochemic. J. 41, 47 [1947].

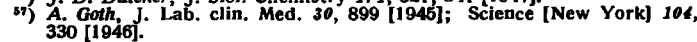
<sup>47)</sup> J. biol. Chemistry 157, 221, 241 [1943]; s. a. Ann. Rev. Biochemistry 15, 12–13 [1946].

Die Giftigkeit des Quecksilbers in seinen Verbindungen weist im wesentlichen den gleichen Mechanismus auf; sie kann vor allem bei Mikroben durch SH-Verbindungen wirkungsvoll beeinflusst werden, wenn die Einwirkungszeit nur kurz war. Wahrscheinlich werden auch viele Antibiotika die antibakterielle Wirksamkeit ihrer Reaktionsfähigkeit mit SH-Fermenten verdanken. Diese Möglichkeit wird diskutiert für Chinone, ungesättigte Laktone und ungesättigte Ketone. Hierbei wird an eine Anlagerung der SH-Gruppierungen an die benachbarte Doppelbindung gedacht. Für einen solchen Mechanismus kämen bei den Chinonen vorzugsweise solche in Betracht, die in Nachbarschaft zur CO-Gruppe nicht substituiert sind. Andere könnten durch Oxydation der Fermente zu S-S-Systemen wirken, wobei sie selbst in die entsprechenden Hydrochinone umgewandelt werden würden. Wahrscheinlich muß man mit beiden Mechanismen rechnen. Leider ist es wie bei den Arsen- und Antimon-Derivaten bisher nur in wenigen Fällen möglich gewesen zu zeigen, welche Fermente speziell durch ein Agens inaktiviert werden. Es ließ sich zwar eine Hemmung der Carboxylase, der Urease und von einigen Dehydrasen und Phosphomonoesterasen durch Chinone nachweisen, aber es wurde in sehr wenigen Fällen sicher gezeigt, daß dies die eigentliche Ursache der Wachstumsinhibition ist. Für Chinone hat *R. Kuhn* und *Beinert*<sup>18)</sup> die Hemmung der Carboxylase (Pyruvodehydrogenase) sehr wahrscheinlich gemacht. Dieses Ferment ist hoch empfindlich gegen Chinon und ist auch in Gonokokken, Staphylokokken und Streptokokken nachgewiesen worden. Ähnlich hohe Empfindlichkeit gegen Chinon zeigt die Urease. Weder Chinone, noch ungesättigte Laktone und Ketone haben für die Chemotherapie Bedeutung erlangt, in vivo haben sich alle bisher als unwirksam herausgestellt. Wahrscheinlich werden sie im Organismus zu schnell verändert. Das gleiche dürfte auch für das Allicin des Knoblauchs gelten,  $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{S}-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$ , das nach *Small*, *Bailey* und *Cavallito*<sup>19a)</sup> ebenfalls durch Inhibition von SH-Fermenten wirkt. Besser sollen noch einige synthetische Analoga mit längeren Alkylketten sein.

Unges. Lakstone sind: Patulin (neueste Formels. u. <sup>49a</sup>), Penicillinsäure, Protoanemonin, Parasorbinsäure, Carl-, Carol-, Carolin- und Carlossäure, Terrestrinsäure. Aus (*Penicillium Charlesii* Smith <sup>50a</sup>) und *P. terrestre* Jensen <sup>50b</sup>) u. a.

O=C1C=CC=C1  
CC1(C)OC1  
 Patulin  
OC1=CC(=O)C=CC1C(=O)O  
 Citrinin

<sup>52)</sup> Š. a. K. Wallenfels, diese Ztschr. 58, 1 [1945].





Pyridons aufgebaut, die zum Teil stärker wirksam waren als die Aspergillsäure und bei denen die Fähigkeit zur Komplexbildung und antibiotische Wirksamkeit parallel gingen. Derivate des 8-Oxychinolins haben ebenfalls bakteriostatische Fähigkeiten durch Bildung von Chelatkomplexen, *Albert und Mitarbeiter*<sup>58)</sup> fanden, daß dieser Effekt unterdrückt werden kann durch Zugabe geeigneter Metall-Ionen.

In diesem Zusammenhang mag auch die interessante Beobachtung *Pappenheimers*<sup>59)</sup> über die Abhängigkeit der Bildung von Diphtherietoxin vom Eisengehalt der Nährlösung bei Kulturen von Diphtheriebazillen Erwähnung finden. Quantitative Messungen ergaben, daß die Toxinbildung bei optimalem Wachstum und hohem Eisengehalt der Nährlösung bedeutend geringer war, als wenn dieser nur ein subnormales Wachstum ermöglichte. Unter diesen Umständen war auch der Porphyrin-Gehalt der Kulturlösungen höher als bei Eisenüberschuß. *Pappenheimer* nimmt an, daß das Toxin die Eiweißkomponente eines Eisen-Porphyrin-Fermentes der Diphtheriebazillen ist und daß bei Mangel an Eisen die Bindung der Komponenten zum Komplex nicht stattfinden kann. Porphyrin und Eiweißkomponente werden zwar dauernd weitergebildet, aber frei an die Kulturlösung abgegeben. Der Eiweißträger fungiert im menschlichen Organismus als Toxin, vielleicht weil er sich hier mit einem Eisen-porphyrin-Komplex verbindet, was zu Störungen des Stoffwechsels Anlaß gibt. Diese Befunde lassen darauf schließen, daß die Toxinbildung nicht eine Abwehrmaßnahme der Diphtheriebazillen, sondern mehr ein zufälliger Vorgang ist, der zwangsläufig mit ihrem Stoffwechsel in Verbindung steht.

#### Wachstumsstörungen durch Änderung an oder in Oberflächen von Mikroben

Mikroben sind durch eine Grenzschicht von der Umwelt getrennt, durch die sie einerseits sich vor schädlichen Einflüssen schützen, andererseits auch ihren Stoffaustausch mit der Außenwelt vornehmen. Diese Abgrenzung kann offenkundig zweierlei Formen annehmen. Bei Bakterien finden wir gekapselte und ungekapselte Formen, die sich durch ihre Virulenz unterscheiden, nur die ersteren sind im allgemeinen virulent. Die Kapseln stellen vermutlich eine Schutzmaßnahme des Bakteriums dar, sind aber nicht unbedingt lebenswichtig, da durch geeignete Züchtung in vielen Fällen auch ungekapselte Formen der gleichen Art gewonnen werden können. Die Kapseln bestehen chemisch aus Symplexen von hochmolekularen spezifischen Kohlenhydraten und Eiweiß, erstere zeigen vielfach antigenen Charakter und wirken als Hapten. In einigen Fällen können auch Lipide mitbeteiligt sein. Andererseits ist aber bei Mikroben noch eine Grenzschicht vorhanden, die für die Gramfärbung verantwortlich gemacht werden muß, bekanntlich werden nach ihr die Bakterien in grampositive und gramnegative eingeteilt. Durch die Untersuchungen von *Henry und Stacey*<sup>60)</sup> wurde festgestellt, daß erstere Magnesiumribonukleat enthalten, das vermutlich sich auch in komplexer Bindung an Eiweiß findet. Bei den grampositiven Mikroben ist nach den Untersuchungen von *Gale*<sup>61)</sup> der Stoffaustausch mit der Umwelt nicht immer ein reiner Diffusionsvorgang, sondern kompliziert mit chemischen Vorgängen verknüpft, wie die Unterbindung der Glutaminsäure-Aufnahme durch Penicillin anzeigt. Wir dürfen daher annehmen, daß die Grenzschicht eine Reihe von hochmolekularen Symplexen enthält. Stoffe, welche diese Komplexe zerlegen, sollten daher Störungen bewirken, die sich als Wachstumshemmung auswirken und u. U. zum Austritt von Zellbestandteilen in die umgebende Lösung Anlaß geben werden.

*R. Kuhn und Bielig*<sup>61)</sup> haben gezeigt, daß eine Reihe von sogenannten Oberflächenantiseptika, Invertseifen, auch als Netzmittel, Detergants oder Quats bezeichnet, solche Eigenschaften besitzen. Die bakterizide Wirkung hängt aufs engste mit der Oberflächenaktivität dieser Stoffe zusammen, von denen in Deutschland die bekanntesten das Zephirol und das Quaternon sind. Zephirol ist durch die Arbeiten *Domagks*<sup>62)</sup> bekannt geworden, es ist ein Dimethyl-alkyl-benzyl-ammonium-chlorid,

wobei das Alkyl von  $C_8H_{17}$  bis  $C_{18}H_{37}$  variieren kann. In USA sind ähnliche Typen im Handel, so Cetalon = Cetyl-dimethylbenzyl-ammonium-bromid, Phemero1 = Oktylphenoxy-äthoxydimethylbenzyl-ammonium-chlorid, Ceepryn = Cetyl-pyridinium-chlorid<sup>63)</sup>. Allen diesen Stoffen ist gemeinsam, daß sie quartäre Ammoniumsalze sind, die einen langen aliphatischen Rest enthalten. Die Bezeichnung Invertseifen soll darauf hinweisen, daß in ihnen im Gegensatz zu den eigentlichen Seifen das Kation der oberflächenaktive Anteil ist. Es gibt auch anionenaktive und neutrale Netzmittel, die aber als Antiseptika keine Bedeutung haben. Allen gemeinsam ist die Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers.

Die auffallendste Eigenschaft der Invertseifen ist ihre Fähigkeit, Eiweißstoffe zu fällen. Dabei tritt Bindung der negativ geladenen Eiweißpartikel an den positiv geladenen Rest der Invertseife unter Salzbindung ein. Für die Ausfällung ist eine bestimmte Invertseifenkonzentration notwendig; schon vorher findet aber eine Veränderung der Eiweißmolekeln statt, die sich in der Freilegung von SH-Gruppen kundtut. Die Ausfällung findet vermutlich durch Verringerung der freien Ladungen am Eiweiß und durch die Beladung mit lyophoben Resten statt. Es ist bemerkenswert, daß die bakterizide Wirkung erst dann auftritt, wenn die Konzentration auch zur Eiweißfällung und Spaltung von Symplexen ausreicht. Die Spaltung von Symplexen wurde von *R. Kuhn und Mitarbeitern*<sup>61)</sup> an einer Reihe von Beispielen studiert, vor allem an Chromoproteiden, wo sie sich besonders gut nachweisen läßt. Wodurch der Tod der Mikrobe im Endeffekt ausgelöst wird, ist offen, es kommen in Frage: Veränderungen in der Grenzschicht und dadurch hervorgerufene Semipermeabilität, das Austreten des Zellinhalts aus der Mikrobe durch Zerreißen der Oberfläche oder das Eindringen der Invertseife in die Mikrobe unter Ausfällung des Eiweißes und Spaltung von Komplexen.

Eine Reihe von Autoren<sup>64-66)</sup> bringen die antiseptische Wirkung von Phenolen, wie ihrer alkylierten und halogenierten Derivate, ebenfalls mit ihren oberflächenaktiven Fähigkeiten zusammen; es ist dabei wichtig, daß die bakterizide Wirkung mit der Länge der Alkyl-Reste ansteigt<sup>67)</sup>.

Die Wirkung des Antibiotikums Thyrocidin aus *Bacillus brevis* wird auf die gleiche Ursache zurückgeführt, es ist ein basisches Polypeptid vom Molgew. ca. 2560. Durch Serum wird es inaktiviert und zeigt daher in vivo keine Aktivität. Ähnlich soll der Wirkungsmechanismus des Gramicidin-S sein<sup>68)</sup>, das aber in vivo wirksam bleibt. Die Wirkung tritt unter Lysis der Bakterien ein. Es sei ferner darauf hingewiesen, daß der Vorgang der Hämolyse und Bakteriolyse durch Antikörper und Komplement, ein Vorgang der Immunchemie, gewisse Parallelen zu den eben besprochenen Erscheinungen aufweist<sup>69)</sup>.

Ein Antibiotikum, daß weniger durch Oberflächenaktivität, sondern auf Grund enzymatischer Fähigkeiten zu wirken scheint, ist das Lysozym, ein normaler Bestandteil des Speichels vieler Wirbeltiere und auch des Menschen. Es findet sich ferner in der Nasenschleimhaut, Tränen- und Peritonealflüssigkeit. Ein ihm recht ähnlicher Stoff ist das Avidin des Eiereiweiß, das durch seine Eigenschaft, mit Biotin einen festen Komplex zu bilden, bekannt geworden ist. Auch in Pflanzen soll ein Lysozym-ähnlicher Eiweißstoff vorkommen, so in Meerrettich, Rettich und Kohl. Diese Lysozyme verhalten sich immunologisch verschieden und scheinen auch im Molgew. zu differieren. Nach *Epstein und Chain*<sup>70)</sup> ist Lysozym des Menschen und der Tiere eine Polysaccharidase, die Polysaccharide einer Reihe von aerogenen Bakterien in N-Acetylglucosamin und eine Ketohexose zerlegt. Nur solche Bakterien sind gegen Lysozym empfindlich, die solche Kohlenhydrate in der Grenzschicht enthalten. Hier ist also ein Ferment ein antibakteriell wirkender Stoff.

In diesem Zusammenhang mögen auch die Ergebnisse von *Haas*<sup>71)</sup> erwähnt werden, der sich mit Stoffen der Bakterien und

<sup>58)</sup> O. Rahn u. W. P. Van Eseltine, Annu. Rev. Microbiology 1, 173 [1947].

<sup>59)</sup> J. biol. Chemistry 167, 251 [1947]; Brit. J. expt. Pathol. 17, 335 [1936].

<sup>60)</sup> W. C. Harden u. E. E. Reid, J. Amer. Chem. Soc. 54, 4325 [1932].

<sup>61)</sup> E. M. Richardson u. E. E. Reid ebenda 62, 413 [1940].

<sup>62)</sup> C. M. Suter, Chem. Rev. 28, 269 [1941].

<sup>63)</sup> R. D. Hotchkiss, Ann. N. Y. Acad. Sci. 46, 479 [1946].

<sup>64)</sup> R. D. Hotchkiss, Ann. Rev. Microbiology 2, 209 [1948].

<sup>65)</sup> R. Doerr, Das Komplement, Springer Verlag Wien 1947.

<sup>66)</sup> Brit. J. expt. Pathol. 21, 339 [1940].

<sup>67)</sup> J. biol. Chemistry 163, 63, 89, 101 [1946].

<sup>58)</sup> Brit. J. expt. Pathol. 28, 69 [1947].

<sup>59)</sup> J. biol. Chemistry 167, 251 [1947]; Brit. J. expt. Pathol. 17, 335 [1936].

<sup>60)</sup> Proc. Roy. Soc. [London] (B) 133, 391 [1946].

<sup>61)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 73, 1080 [1940].

<sup>62)</sup> Dtsch. Med. Wschr. 61, 829 [1935].

des Wirtes befaßt, die für das Eindringen, bzw. Nichteindringen eines Erregers durch die Haut von Belang sind. Die Bindegewebszellen der Haut sind durch das Polysaccharid Hyaluronsäure verkittet. Bakterien scheiden nun in vielen Fällen ein Ferment, Hyaluronidase (spreading factor) aus, das diese Kittsubstanz auflöst. Man nahm zuerst an, daß die Virulenz von Bakterien durch ihre Fähigkeit zur Hyaluronidase-Bildung begrenzt sei; es zeigte sich aber, daß die Verhältnisse wesentlich komplizierter sind. Haas fand, daß im normalen Blutplasma ein Ferment vorkommt, das Hyaluronidase inaktiviert (Antiinvasin I), dieses aber durch einen weiteren Bakterienstoff (Proinvasin I) wieder gehemmt wird. Gegen das Proinvasin I antwortet der Wirt mit dem Antiinvasin II des Plasmas. Die komplizierten quantitativen Verhältnisse dieser Fermente und Hemmstoffe bestimmen anscheinend, ob eine Infektion durch die Haut erfolgt oder nicht.

### Wirkstoffe, die die Reaktion von Viren mit Zellen inhibieren

1941 zeigte Hirst<sup>72)</sup>, daß Influenza-Virus rote Blutkörperchen verschiedener Herkunft agglutiniert, und daß dabei Virus von den Erythrozyten gebunden wird. Nach einer Inkubationszeit wird das Virus wieder frei und kann andere Blutkörperchen befallen, während die zuerst befallene Zelle nun nicht mehr in der Lage ist, Virus zu binden. Auch andere Zellen wie die der Lunge von Frettchen und anderer Tiere, sowie Hühnerembryonen verhielten sich entsprechend. Andere Viren wie Newcastlevirus, Pneumonitisvirus, Mumps u. a. zeigten ähnliches Verhalten. Auf 55° erhitztes Virus vermochte noch zu agglutinieren, nicht aber mehr sich wieder von den befallenen Zellen zu trennen, und war dann auch nicht mehr infektiös.

Diese Befunde machen es möglich, daß die Viren, die der Hämagglutination fähig sind, fermentartigen Charakter haben und einen Receptor auf oder innerhalb der Zellen so verändern, daß er nun nicht mehr Virus zu binden vermag. Gleichzeitig sollte es möglich sein, den Receptor u. U. in Lösung zu bringen, um ihn dort mit dem Virus reagieren zu lassen und so die Zellen vor dem Virus zu schützen. Die längere Inkubationszeit könnte sich dabei besonders günstig auswirken.

Zunächst beobachtete Hirst im Serum einen natürlichen Inhibitor der Virus-Hämagglutination, der sich als ein Mukoprotein herausstellte. Burnet<sup>73)</sup> fand, daß auch Blutgruppen-O-Substanz und rohes Mucin die Agglutination inhibierten. Schließlich konnte Hirst die chemisch ähnlichen Eigenschaften von Blutkörperchen-Receptor und Serum-inhibitor des Kaninchens wahrscheinlich machen. Beide sind stabil gegen erhöhte Temperaturen und bei pH 10 und werden durch Virus, ferner durch Trypsin und Perjodat inaktiviert. Diese Feststellung ist besonders interessant, da die Oxydation mit Jodat oder anderen Oxydationsmitteln ohne Einfluß blieb. Das macht es sehr wahrscheinlich, daß bei den beobachteten Erscheinungen ein Polysaccharid von besonderer Bedeutung ist. Eine solchen erschienene Arbeit von Gottschalk und Lind<sup>73a)</sup> berichtet über die Hämagglutination verhin-dernde Komponente des Ovomucins, sie macht es wahrscheinlich, daß der fermentative Effekt des Virus in der Abspaltung eines Kohlenhydrat-peptid-komplexes besteht. Der Zuckeranteil ist ein Oligosaccharid aus ein oder mehreren N-Acetylhexosamin-Resten, die durch eine alkalilabile Glykosid-Bindung an einen Nichtamino-Zucker gebunden sind.

In der Tat gibt es eine Reihe von Kohlenhydraten verschiedener Herkunft, welche die Virus-Zell-Reaktion inhibieren; so fanden Green und Woolley<sup>74)</sup>, daß gewisse Pektine und Pflanzengummi einen schützenden Einfluß gegen Virusinfektion ausüben, in hoher Konzentration aber selbst hämagglutinierend wirkten. Diese Stoffe vermochten auch im Hühnerembryo die Virusvermehrung zu stoppen, und Horsfall und Mc Carley<sup>75)</sup> fanden gewisse Bakterienpolysaccharide geeignet, die Vermehrung des Pneumonitisvirus in der Mäuselunge zu hindern und die Tiere vor der Infektion weitgehend zu bewahren. Ginsberg, Goebel und

Horsfall<sup>76)</sup> zeigten, daß ein Polysaccharid von *Klebsiella pneumoniae* von roten Blutkörperchen adsorbiert wird und diese dann auch nach Waschen nicht mehr mit Mumpsvirus reagierten. Das gleiche Polysaccharid vermochte auch die Vermehrung des Virus im Hühnerembryo zu unterbinden. Hierbei reagierte das Polysaccharid mit den Zellen, nicht aber mit dem Virus, so daß sich ein grundsätzlicher Unterschied im Verhalten mit den erstgenannten Kohlenhydraten ergibt. Wirksamkeit zeigten vor allem Polyuronide, wenn auch nicht alle in gleicher Weise.

Damit eröffnen sich neue Wege einer Chemotherapie der Virusinfektion, und es mag noch erwähnt werden, daß Anderson<sup>77)</sup> vor einigen Jahren zeigte, daß die Adsorption von Bakteriophagen an *E. coli* von der Anwesenheit von Tryptophan abhängig ist. Es bleibt abzuwarten, welche neue Möglichkeiten mit diesen Befunden eröffnet worden sind.

### Arzneifestigkeit und Hemmstoff-Resistenz

Die ersten Beobachtungen über Arzneimittelresistenz von Mikroben machten anscheinend Franke und Roehl an Trypanosomen bei der Verwendung von Parafuchsin. Mäuse infiziert mit *Trypanosoma brucei* zeigten Verschwinden des Erregers, wenn sie mit dem Farbstoff behandelt wurden. Nach 1–2 Wochen jedoch erschienen die Parasiten wieder im Blut und konnten daraus durch eine neue Parafuchsin-Gabe abermals entfernt werden. Dieser Vorgang konnte mehrere Male wiederholt werden, wobei sich allerdings erwies, daß die Zeiten bis zum neuen Erscheinen der Trypanosomen im Blut immer kürzer wurden, bis kaum mehr ein Einfluß einer erneuten Parafuchsin-Dosis festzustellen war. Wenn man die arzneifest gewordenen Erreger nun auf unbehandelte Mäuse übertrug, erwiesen sie sich auch hier als resistent und behielten diese Fähigkeit über zahlreiche Tierpassagen bei.

Damit haben wir ein typisches Beispiel der Entwicklung einer Arzneimittelresistenz, wie sie in anderer Form bei sehr vielen anderen Chemotherapeutika beobachtet worden ist. Bekannt ist in letzter Zeit besonders das Arzneifestwerden von Gonokokken gegen Sulfonamide geworden, wobei der Übertragungsmechanismus für die schnelle Verbreitung solcher Sulfonamid-fest gewordenen Stämme mit verantwortlich sein mag. Während 1940–41 noch 70% aller Gonorrhoe-Fälle einer amerikanischen Klinik prompt auf die Sulfonamid-Therapie ansprachen, waren es vier Jahre später nur noch etwa 30%. Das Verhältnis hatte sich also gerade umgekehrt<sup>78)</sup>. Inzwischen hat man sogar einen Stamm von *Neurospora* gefunden<sup>79)</sup>, der zum Wachstum Sulfonamid unbedingt benötigt und ohne diesen Stoff in der Nährlösung nicht gedeiht, das Wachstum wird durch PABA konkurrierend gehemmt. Eine andere Mutante der gleichen Art benötigt PABA und Sulfonamid in einem ganz bestimmten Verhältnis für ihre Entwicklung.

Die gleiche Erscheinung begegnet uns ähnlich beim Penicillin. In einer amerikanischen Klinik fanden sich unter 200 Staphylokokken-Infektionen von April–Nov. 1946 10, bei denen die Bakterien noch mit 10 Einh. Penicillin/cm<sup>3</sup> wuchsen. Diese Zahl stieg laufend an und war Febr.–Juni 1947 auf 30 gelangt<sup>80)</sup>. Auch sind schon eine ganze Anzahl mehr oder weniger resistenter Stämme bekannt. Besonders störend ist diese Erscheinung beim Streptomycin, von dem eine besonders schnelle Gewöhnung der Bakterien berichtet wird. Auch hier gibt es Streptomycin-feste Stämme in größerer Zahl<sup>81)</sup>, wobei unter anderem das paradoxe Phänomen beobachtet wurde, daß ein solcher Stamm nur noch in Gegenwart von Streptomycin zu wachsen vermochte und sich in vivo so lange als harmlos erwies, als nicht auch Streptomycin dem infizierten Tier verabfolgt wurde. Erst in diesem Zeitpunkt erwies sich der Stamm als pathogen. Die Arzneimittel-resistenz entwickelt sich meist nur gegen einen bestimmten oder mit ihm chemisch nahe verwandten Arzneistoff, doch

<sup>72)</sup> J. expt. Medicine 87, 301, 315 [1948].

<sup>73)</sup> Nature [London] 160, 404 [1947]; Australian J. Sci. 10, 21 [1947].

<sup>73a)</sup> Nature [London] 164, 232 [1949].

<sup>74)</sup> J. expt. Medicine 86, 55 [1947].

<sup>75)</sup> Ebenda 85, 623 [1947].

<sup>76)</sup> Proc. Soc. expt. Biol. Med. 86, 99 [1947].

<sup>77)</sup> J. comparat. cell. Physiol. 25, 17 [1945].

<sup>78)</sup> J. H. Mueller, Ann. Rev. Biochemistry 14, 733 [1945].

<sup>79)</sup> S. Emerson, J. Bacteriol. 64, 195 [1947]; S. Emerson u. J. E. Cushing, Federation Proc. 6, 379 [1946].

<sup>80)</sup> M. Barber, Brit. Med. J. 11, 863 [1947].

<sup>81)</sup> T. Cushnick, C. I. Randles, C. T. Gray u. J. M. Birkeland, Science [New York] 106, 587 [1947]; T. F. Paine u. M. Finland, ebenda 107, 143 [1948].



kann eine Mikrobe auch Resistenz gegen mehrere Hemmstoffe erlangen. Welche Vorstellungen lassen sich entwickeln, um diese Erscheinung zu erklären?

### Biologisches Problem

Von *Work* und *Work*<sup>82)</sup> werden drei Möglichkeiten herausgestellt, nach denen sich eine Resistenz gegen ein Heilmittel bilden kann, wobei wir zunächst einmal das Verhalten der einzelnen Individuen einer Mikropopulation ins Auge fassen wollen.

1) Auswahl von schon bestehenden oder spontan sich bildenden Varianten einer heterogenen Population.

2) Induktion einer geänderten biochemischen Reaktion durch Kontakt der Zellfermente mit dem Hemmstoff, die alle Glieder einer homogenen Population gleichermaßen erfährt.

3) Auswahl aus einer heterogenen Population von denjenigen Zellen, die einer Modifikation nach Mechanismus 2 zugänglich sind.

Betrachten wir zunächst 2), so ist klar, daß der geänderte Reaktionsmechanismus nicht an einen Vermehrungsvorgang geknüpft ist, denn alle Glieder der Population können sofort oder nach einer Einleitungsperiode an ihm teilnehmen. Wir werden uns diesen Vorgang am besten unter der Annahme einer Fermentadaptation verständlich machen. Unter dem Einfluß des Agens tritt eine Umwandlung von sogenannten adaptiven Fermenten in konstitutionelle ein, während die bisherigen Fermente, soweit sie nicht mehr benötigt werden, weniger stark entwickelt werden. Die neuen Fermente waren also schon vorher in minimalen Mengen da, oder aber die Anlage dazu war latent vorhanden. Solche Vorgänge sind vielfach bei Mikroben beobachtet worden, die sich z. B. mit Kohlenhydraten zur Fermentation abzufinden vermochten, die sie normalerweise nicht geneigt waren zu assimilieren. Bei 3) wird die Annahme gemacht, daß nur einige Zellen dieser Änderung fähig sind, ohne daß dabei ein Vermehrungsvorgang im Spiele ist.

Wesentlich häufiger und wichtiger jedoch ist Fall 1), der die Hauptursache von Variationen ist, der Variation durch Selektion. Hier stehen sich zwei Auffassungen gegenüber: Die eine sieht den Vorgang darin, daß durch die besondere Umgebung in einigen Gliedern einer Population durch das Mittel eine Änderung hervorgebracht wird, die diesen und ihren Nachkommen auf Grund der erworbenen Eigenschaft das Fortkommen erlaubt, während die nicht der Adaption fähigen Vertreter untergehen. Dieser Adaptionstheorie steht die Mutationstheorie gegenüber, nach der die arzneifesten Varianten spontan bei der Vermehrung in einer Population entstehen und das Arzneimittel nur insofern eine Rolle spielt, als es die anderen normalen Vertreter unterdrückt. Die Mutation erfolgt also auch, ohne daß die Hemmsubstanz gegenwärtig ist, sie dient nur dazu, den Vorgang zu offenbaren. Die Mutation kann u. U. in mehreren einzelnen Schritten erfolgen, bis die endgültige Höhe der Arzneifestigkeit erreicht wird. Man muß sich bei diesen Überlegungen vor allem auch die hohe Vermehrungsrate bei Bakterien vergewärtigen.

Die Entscheidung zwischen beiden Möglichkeiten haben anscheinend die Versuche von *Luria* und *Delbrück*<sup>83)</sup> an einem größeren Material verschiedener Bakterienstämme erbracht, die durch neue Versuche von *Newcombe*<sup>84)</sup> wirkungsvoll gestützt werden. *Demerrec*<sup>85)</sup> hat die Methode speziell am Fall der Penicillin-Resistenz von *Staph. aureus* geprüft, wobei die Entscheidung für die Mutationstheorie fiel. Er ging von folgender Versuchsanordnung aus:

Von einer Ausgangskulturlösung von *Staphylokokkus aureus* mit Empfindlichkeit gegen Penicillin, die ca. 300 Bakterien pro cm<sup>3</sup> enthielt, wurden 30 Proben mit je 0,3 cm<sup>3</sup> und eine Charge mit 15 cm<sup>3</sup> abgetrennt. Zur gleichen Zeit wurden 20 Proben mit 0,3 cm<sup>3</sup> aus der gleichen Stamm-lösung in ein Medium überführt, das 0,064 Oxford-Einh. Penicillin enthielt, und festgestellt, daß alle Bakterien gegen dieses Antibiotikum empfindlich waren und keine Probe resistente Formen enthielt. Die erst erwähnten Proben wurden nun 18 h bei 37° gehalten; während dieser Zeit vergrößerte sich die Zahl der Bakterien auf  $2 \cdot 10^8$ /cm<sup>3</sup>, das heißt, in den 30 Proben zu 0,3 cm<sup>3</sup> von 100 auf  $6,6 \cdot 10^7$ . Der ganze Inhalt jeder einzelnen dieser 30 Proben wurde nun mit 0,064 Einh. Penicillin pro cm<sup>3</sup> versetzt. Gleichzeitig wurde die große Charge von 15 cm<sup>3</sup> auf 20 Einzelgläser verteilt und jede Probe ebenfalls mit 0,064 Einh. Penicillin pro cm<sup>3</sup> behandelt. Es war also in allen 50 Proben die gleiche Menge Penicillin vorhanden und jede enthielt gleichviel Bakterien, nämlich etwa  $6,6 \cdot 10^7$ . Wenn sich nun gegen das Antibiotikum resistente Formen

entwickelt haben sollten, so würde ihre Zahl gleich groß sein, wenn sich die Resistenz unter dem Einfluß des Agens entwickelt haben sollte (Adaptionstheorie). Im anderen Falle (Mutationstheorie) sollte erwartet werden, daß sich die Zahl der resistenten Formen in den 30 unabhängig voneinander kultivierten Gläsern verschieden verhalten würde, je nachdem ob in ihnen eine zur Resistenz führende Mutation früh oder spät während der Bebrütung aufgetreten war. In den 20 Proben, die erst nach der Kultivierung aus der 15 cm<sup>3</sup> Charge entnommen wurden, sollte die Zahl der Penicillin unempfindlichen Formen in jeder einzelnen Probe etwa gleich groß sein.

Das Ergebnis der Bestimmung der resistenten Formen zeigte in den 20 Proben eine Variation zwischen 16 und 38, die Durchschnittszahl der Kolonien war 28,9 pro Kultur, in den 30 unabhängigen Proben jedoch schwankte sie zwischen 9 und 839, mit einem Durchschnitt von 120. Dieser Befund kann nur mit der Mutationstheorie befriedigend erklärt werden.

Man kann nun fragen, ob es gerechtfertigt ist, diesen Vorgang als Mutation zu bezeichnen, da es bei Bakterien weder verschieden geschlechtliche Formen, noch eine klare Trennung von Kern und Plasma gibt. Die Befunde von *Tatum*<sup>86)</sup> zeigen jedoch, daß sich Bakterien gegenüber Röntgenstrahlen nicht anders wie Kerne führende Zellen verhalten und dabei erbliche Veränderungen erfahren können, die mit genetischen Umwandlungen völlig analog sind. *Tatum* und Mitarbeiter<sup>87)</sup> erhielten so Varianten des nicht bestrahlten Ausgangsstammes, die mikroskopisch von ihm nicht unterscheidbar waren, aber durch eine Reihe biochemischer Ausfallserscheinungen auffielen. So wurden bei *E. coli* Varianten erhalten, die Biotin, Threonin, oder PABA nicht mehr aufbauen konnten. Bei *Acetobacter melanogenum* wurden andere Ausfälle beobachtet, so bei vier verschiedenen Stämmen die Unfähigkeit, Glycin oder Serin, Adenin oder Adenosin, Glycin und wahrscheinlich Leucin synthetisch zu bereiten. Die Versuche entsprechen also weitgehend denen, die *Beadle* und Mitarbeiter<sup>88)</sup> an *Neurospora* ausgeführt haben.

### Biochemische Variation

Welche biochemischen Vorgänge sind es nun, die bei den durch Mutation gebildeten resistenten Varianten eine Änderung erfahren haben? Es lassen sich vornehmlich vier Möglichkeiten in Betracht ziehen<sup>89)</sup>.

1) Vergrößerte Bildung eines wesentlichen Wuchsstoffes oder Arzneimittelantagonisten.

2) Entwicklung eines unempfindlichen Aufbau- oder Abbaufweges für einen wesentlichen Wuchsstoff.

3) Ausbildung eines Entgiftungsmechanismus für den Hemmstoff entweder durch oxydative Zerstörung oder durch Überführung in unwirksame Derivate.

4) Änderungen in der Grenzschicht, die dem Arzneimittel den Eintritt in die Mikrobe verwehrt oder den Angriff des Mittels an der Oberfläche verhindert.

Einige Vorgänge wurden schon in den vorhergehenden Abschnitten erwähnt, so die unter 1) zu rechnende vermehrte PABA-Bildung als Gegenwirkung gegen Sulfonamide. *Landy* und *Gerstung*<sup>89)</sup> prüften 175 Stämme von *N. gonorrhoeae* hinsichtlich ihrer Fähigkeit PABA zu synthetisieren und fanden, daß ihre Sulfathiazol-Resistenz eng parallel lief der Produktion von PABA. Stämme, die sich in vitro als unempfindlich erwiesen, gaben größere Mengen PABA an das Kulturmedium ab, während Gonokokken, die leicht bei Patienten durch Sulfonamide vernichtet werden konnten, dies nicht oder nur in relativ geringen Mengen taten. Ähnliche Verhältnisse wurden auch an *Staphylokokken* beobachtet. Doch ist sicherlich eine vermehrte PABA-Bildung nicht immer eine Ursache der Resistenz<sup>89a)</sup>. *Weygand* und Mitarbeiter<sup>16)</sup> haben gezeigt, daß Bakterien der Gruppe B, die normalerweise Folsäure selbst synthetisieren unter dem Einfluß von Sulfonamiden sich auf die Aufnahme dieses Wuchsstoffes aus der Nährlösung umstellen können und so der Inhibierung entgehen.

Das letzte Beispiel leitet schon zur Ausbildung einer Hemmstoffresistenz nach 2) über. Wir kennen schon eine Reihe von

<sup>82)</sup> Proc. nat. Acad. Sci. USA. 31, 215 [1945]; Cold Spring Harbour Symp. 11, 278 [1946].

<sup>83)</sup> Proc. nat. Acad. Sci. USA. 30, 404, [1944].

<sup>84)</sup> Physiologic. Rev. 26, 643 [1945]; Proc. nat. Acad. Sci. USA. 27, 499 [1941].

<sup>85)</sup> J. Bacteriol. 47, 448 [1944].

<sup>86a)</sup> R. Lemberg, J. P. Callaghan, D. E. Tandy u. N. E. Goldsworthy, Austral. J. exp. Biol. 20, 9 [1948].

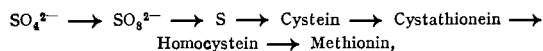
<sup>82)</sup> The Basis of Chemotherapy, Oliver and Boyd Ltd. Edinburgh 1948.

<sup>83)</sup> Genetics 28, 491 [1943].

<sup>84)</sup> H. B. Newcombe, Nature [London] 164, 150 [1949].

<sup>85)</sup> Ann. Mo. bot. Gdn. 32, 131 [1945].

Fällen, in denen die Unterbindung eines normalen Stoffwechselweges durch geeignete Gifte zur Ausbildung eines von ihnen ungestörten Alternativweges geführt hat. Interessant sind die Beobachtungen von Kohn und Harris<sup>90</sup>), die bei *E. coli* zwei gegen Sulfonamid resistente Stämme durch Training bei Zusatz steigender Mengen Sulfonamid entwickelten, von denen der eine in Gegenwart von Methionin, der andere ohne adaptiert worden war. Der erstere erwies sich nach Erwerb der Sulfonamid-Resistenz als Methionin-bedürftig und konnte ohne diese Aminosäure nicht mehr wachsen, er hatte also die einmal gehabte Fähigkeit zur Methionin-Synthese verloren. Der zweite, ebenfalls resistente Stamm hatte die Eigenschaft zur Methionin-Synthese bewahrt. Da der Aufbau von Methionin PABA benötigt und durch Sulfonamide inhibiert wird, muß dieser Organismus einen neuen Weg der Methionin-Bildung entwickelt haben, der sehr wahrscheinlich unabhängig von PABA ist. Lampen, Roepke und Jones<sup>91</sup>) haben gezeigt, daß die Methionin-Synthese bei *E. coli* auf dem Wege vom anorganischen Sulfat folgende Stufen durchläuft:



Unterbrochen wird der Aufbau bei der Überführung von Homocystein zu Methionin, der normalerweise ohne PABA nicht möglich ist.

Zu 3) sei die Pyrithiamin-Resistenz von *Endomyces vernalis* durch Entwicklung eines Fermentes erwähnt, welches die Molekel in die Komponenten spaltet, die nicht mehr toxisch sind. Ferner sei auf die schon erwähnte Penicillinase hingewiesen, die zuerst von Abraham und Chain<sup>91</sup>) bei gramnegativen Bazillen beobachtet wurde. Auch Streptokokken können das Ferment bilden<sup>92-94</sup>). Dabei sind die einzelnen Bakterien durchaus Penicillin-empfindlich und es kommt nach Luria<sup>95</sup>) darauf an, ob das Ferment das Penicillin zerstören kann, ehe es mit den Bakterien reagieren konnte. Von der unter 2) fallenden Möglichkeit

<sup>90</sup>) J. Bacteriol. 44, 717 [1942].

<sup>91</sup>) Nature [London] 146, 837 [1940].

<sup>92</sup>) W. M. Kirby, Science [New York] 99, 452 [1944].

<sup>93</sup>) A. Bondi u. C. C. Dietz, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 60, 55 [1945].

<sup>94</sup>) J. S. Gots, ebenda 60, 165 [1945].

<sup>95</sup>) Ebenda 61, 46 [1946].

der Entwicklung einer Penicillin-Resistenz durch Stoffwechselumstellung unter Eigensynthese von Glutaminsäure und Gram-negativ-werden der Bakterien ist schon berichtet worden. Die Zahl der bereits bekannten Beispiele ist bereits so groß, daß hier nur die mit der Chemotherapie zusammenhängenden Fälle erwähnt werden konnten. Auf die Feststellung, daß die Entwicklung einer Resistenz gegen einen Hemmstoff zugleich in vielen Fällen auch eine Minderung der Lebenstüchtigkeit an anderem Orte zur Folge hat, kann nur hingewiesen werden.

## Schluß

Es wurde gezeigt, daß das Studium des Wirkungsmechanismus der Chemotherapeutika und Antiseptika tiefe Einblicke in das biochemische Geschehen von Mikroben gewährt. Jede dieser Verbindungen ist ein Schlüssel zu einem biochemischen Schloß, der gestattet, einen oder mehrere bestimmte Stoffwechselvorgänge zu verschließen und zu stoppen. Aufgabe des Biochemikers ist es, zu dem Schlüssel auch das Schloß zu finden, für das dieser paßt, soweit ein solcher Vergleich zulässig ist. Wir gewinnen damit eine Möglichkeit mehr, tiefer in die Lebensvorgänge bei diesen einfachsten Formen des Lebens einzudringen, deren äußerste Kompliziertheit immer wieder ins Erstaunen setzt. Die große Zahl der Antibiotika und auch neuen Chemotherapeutika, die uns in den letzten Jahren in steigendem Maße beschert worden sind, läßt erwarten, daß sich unter ihnen weitere Typen von Hemmstoffen biochemischen Geschehens finden werden. Diese Befunde werden auch für andere Disziplinen biologischer Forschung steigende Bedeutung erlangen und helfen einmal die Chemotherapie aus der reinen Empirie zu befreien, in der sie noch weitgehend befangen ist. Die Erfassung der qualitativen und quantitativen Unterschiede im Wirkstoff- und Fermenthaushalt von Parasit und Wirt, zusammen mit der Kenntnis morphologischer Unterschiede, wird hoffentlich einmal zu einer gezielten Chemotherapie führen. Darunter möchte ich eine solche verstehen, die bewußt nach Hemmstoffen für die biochemischen Prozesse sucht, die allein für den Parasiten belangvoll sind und im Wirt keine besondere Bedeutung haben.

Eingeg. am 22. August 1949 [A 230]

# Beiträge zur Kenntnis des Wasserstoffperoxyds und seiner Derivate VI. Mitteilung<sup>1)</sup>

## Über ein quantitatives Bestimmungsverfahren für Schwefel in Zinkblenden und organischen Substanzen durch Aufschluß mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Von Prof. Dr. F. FEHÉR und Dr. E. HEUER<sup>2)</sup>. Aus dem Anorganisch-Chemischen Institut der Universität Göttingen

Es wird die Anwendung von konzentrierten Wasserstoffperoxydlösungen zum Aufschluß von schwefelhaltigen Verbindungen beschrieben: A) Schwefel-Bestimmung in Zinkblenden; B) Schwefel-Bestimmung in einigen organischen Substanzen.

## Einleitung

Die Anwendung von Wasserstoffperoxyd in der präparativen und analytischen Chemie blieb lange dadurch beschränkt, daß meist 3proz. Lösungen benutzt wurden, deren Oxydationswirkung verhältnismäßig schwach ist. Erst in neuerer Zeit wird immer mehr 30proz. Wasserstoffperoxyd benutzt. Höherprozentige Lösungen, die durch einfache Destillation von Perhydrol im Wasserstrahlvakuum jederzeit leicht herstellbar sind, wurden bisher kaum verwendet, obwohl sie bei Beachtung gewisser Vorsichtsmaßregeln in sämtlichen Konzentrationsbereichen gefahrlos zu handhaben sind.

Ein Vorzug des Wasserstoffperoxyds liegt in der sehr differenzierten Abstufung der Oxydationswirkung durch Verwendung verschiedener Konzentrationen und durch Arbeiten in verschiedenen Temperatur- und pH-Bereichen. Ferner werden keine fremden Ionen in die Reaktionsmischung eingeschleppt. Das Wasserstoffperoxyd wird zu Wasser reduziert, und ein Überschuß kann leicht durch Verkochen entfernt werden. Es dürfte daher in vielen Fällen den bisher gebräuchlichen Substanzen überlegen sein. In dieser Arbeit wurde versucht, den in Zinkblenden sulfidisch gebundenen Schwefel sowie den Schwefel einiger organischer Substanzen durch Oxydation mit Wasserstoffperoxyd in Sulfat zu überführen und so eine quantitative Schwefel-Bestimmungsmethode auszuarbeiten.

<sup>1)</sup> V. Mittellg. F. Fehér u. M. Baudler, Ber. dtsh. chem. Ges. 76, 939 [1943].

<sup>2)</sup> Diplomarbeit Dresden 1943.

## A. Schwefel-Bestimmung in Zinkblenden

Die zahlreichen Bestimmungsmethoden für Schwefel in sulfidischen Erzen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Durch Säurezersetzung wird nur der als Schwefelwasserstoff austreibbare Schwefel der leicht zersetzlichen Sulfide der Alkalimetalle, des Zinks, des Eisens usw. erfaßt, nicht jedoch der an Schwermetall gebundene. Für Zinkblenden scheidet das Verfahren daher aus, da in diesen ein Teil des sulfidisch gebundenen Schwefels als CuS und PbS vorliegt.

2) Die Abröstung des Erzes im Sauerstoff- bzw. Luftstrom ist der Nutzbarmachung des sulfidischen Schwefels im Großen nachgebildet. Sie wird heute meist in der sehr gut durchgearbeiteten, zunächst für Schwefel-Analysen organischer Substanzen entwickelten Apparatur von Grote und Krekeler<sup>3)</sup> oder der etwas modifizierten Anordnung von Schöberl und Senf<sup>4)</sup> ausgeführt, vor allem in Industrielaboratorien, wo es auf rasche Durchführung größerer Analysenserien ankommt. Für einzelne Schwefel-Bestimmungen kommt dieses Verfahren wegen der etwas komplizierten Apparatur weniger in Frage.

3) Aufschlußverfahren in oxydierender Schmelze mit Soda-Salpeter<sup>5)</sup> oder mit Natriumperoxyd<sup>6)</sup>, bei denen der sulfidisch gebundene Schwefel zum Sulfat-Ion oxydiert und als Bariumsulfat gefällt

<sup>3)</sup> W. Grote u. H. Krekeler, diese Ztschr. 46, 106 [1933].

<sup>4)</sup> A. Schöberl u. H. Senf, Z. analyt. Chem. 112, 171 [1938].

<sup>5)</sup> R. Fresenius, ebenda 16, 339 [1877].

<sup>6)</sup> W. Hempel, Z. anorgan. Chem. 3, 193 [1893]; Z. analyt. Chem. 34, 71 [1895].