

Der Wirkungsmechanismus der Sulfonamide

1. Mitt. über Coenzym F*)

Von Doz. Dr. ADOLF WACKER, Dr. H. GRISEBACH,

Dipl.-Chem. A. TREBST und

Prof. Dr. FRIEDRICH WEYGAND

Aus dem Chemischen Institut der Universität Tübingen

Bei allen Bakterien kann man die Sulfonamid-Hemmung mit p-Aminobenzoesäure aufheben¹⁾, dagegen nur bei einem Teil der Bakterien auch mit Folsäure^{2), 3)}. Da die p-Aminobenzoesäure in der Folsäure-Molekel enthalten ist, könnte in der Störung der Folsäure-Synthese — das Sulfonamid verdrängt die p-Aminobenzoesäure — der Wirkungsmechanismus der Sulfonamide beruhen. Es war aber unklar, welche Aufgabe die p-Aminobenzoesäure im Stoffwechsel derjenigen Bakterien hat, bei denen die Folsäure nicht enthemmt⁴⁾. Um dies zu klären, haben wir bei beiden Gruppen von Bakterien Untersuchungen mit Hilfe von p-Aminobenzoesäure-[carboxyl-¹⁴C] und Folsäure-[2-¹⁴C]⁵⁾ ausgeführt.

Synthese von p-Aminobenzoesäure-[carboxyl-¹⁴C]:

a) K¹⁴CN wurde nach der Vorschrift von J. K. Jeane⁶⁾ in 95proz. Ausbeute dargestellt.

b) p-Nitrobenzoesäure-[carboxyl-¹⁴C]: 0,2 g p-Nitroanilin (1,5 mmol) wurden diazotiert. Die Diazoniumsalzlösung wurde nach dem Neutralisieren mit Calciumcarbonat in eine 40 °C warme Lösung von 65 mg K¹⁴CN (1 mmol, Aktivität 2,73 mC/mmol) + 30 mg CuCN⁷⁾ in 2 cm³ Wasser einfließen gelassen. Nachdem 1 h bei 40 °C gehalten worden war, wurde das Nitril mit 2 cm³ Natronlauge durch Erhitzen auf 100 °C (1 h) verseift. Nach Sublimation im Hochvakuum Ausb. 60 mg (36 % d. Th., ber. auf K¹⁴CN).

c) p-Aminobenzoesäure-[carboxyl-¹⁴C]: p-Nitrobenzoesäure wurde mit H₂/PtO₂ in Äthanol bei Zimmertemperatur reduziert und durch Sublimation im Hochvakuum gereinigt. Ausb. 47 mg (34 % d. Th., ber. auf K¹⁴CN), Fp: 189 °C.

Züchtung der Bakterien: Herkunft und Züchtung der Stämme *Enterococcus* Stei, *B. coli* 1883 Co, sowie Zusammensetzung des Nährmediums s.⁸⁾.

Ergebnisse:

a) Versuche mit *Enterococcus* Stei und p-Aminobenzoesäure-¹⁴C.

Bei diesem Bakterienstamm läßt sich die Sulfonamid-Hemmung nichtkompetitiv⁹⁾ mit Folsäure aufheben. — Das Nährmedium enthält 1 γ/cm³ Sulfathiazol und 0,1 γ/cm³ p-Aminobenzoesäure-¹⁴C. Bebrütung 48 h, Aufarbeitung der Bakterien: Abzentrifugieren vom Kulturmedium, waschen mit Wasser, einige Male einfrieren und wieder auftauen, danach versetzen mit der auf Trockengewicht berechneten Menge Aluminiumpulver und wenig Wasser, im Porzellanmörser 1 bis 2 h kräftig zerreiben, 15 min im Wasserbad auf 100 °C erhitzen und bei 15000 Umdrehungen/min zentrifugieren. Der leicht gelbe Extrakt wurde chromatographiert in Phosphatpuffer vom p_H 7¹⁰⁾; Citronensäure-Ammoniak vom p_H 9¹¹⁾; Äthanol-n-Butanol-2n Ammoniak-Wasser¹²⁾ und Methanol-2n Ammoniak¹³⁾.

In allen Systemen zeigte das Papierchromatogramm nur einen Flecken, der radioaktiv war. Bei der mikrobiologischen Austestung der Chromatogramme auf Wachstoffs für *Streptococcus faecalis*

R¹⁴⁾ und *Leuconostoc citrovorum* 8081¹⁵⁾ fanden wir ebenfalls nur diesen Flecken, mit Wachstoffsaktivität für beide Teststäme.

Beim Vergleich des R_F-Wertes unserer in dem Bakterienextrakt gefundenen radioaktiven und wuchstoffsaktiven Substanz mit Folsäure und synthetischer Tetrahydro-formyl-folsäure¹⁶⁾ zeigte sich, daß das Stoffwechselprodukt der p-Aminobenzoesäure-¹⁴C keine Folsäure ist (Lösungsmittelgemische nach^{10), 11)}). Obwohl die Substanz einen ähnlichen R_F-Wert wie Tetrahydro-formyl-folsäure hat, ist sie mit ihr nicht identisch, was besonders Mischchromatogramme zeigen.

b) Versuche mit *B. coli* 1883 Co und p-Aminobenzoesäure-¹⁴C.

Bei diesem Bakterienstamm läßt sich die Sulfonamid-Hemmung nicht mit Folsäure aufheben, wohl aber mit p-Aminobenzoesäure⁹⁾. — Das Nährmedium enthielt 30 γ/cm³ Sulfathiazol und 1 γ/cm³ p-Aminobenzoesäure-¹⁴C. Aufarbeitung der Bakterien s. unter a). Auf den Papierchromatogrammen wurde wie bei dem Versuch mit *Enterococcus* Stei nur eine Substanz gefunden, die radioaktiv war und gleichzeitig Wachstoffsaktivität bei *Sc. faecalis* R und *L. citrovorum* 8081 besaß. Mischchromatogramme mit der aus *Enterococcus* Stei isolierten Verbindung ließen keinen Unterschied erkennen.

c) Versuche mit *Enterococcus* Stei und Folsäure-[2-¹⁴C]. Das Nährmedium enthielt 0,1 γ/cm³ Folsäure-¹⁴C. Nach dem Abzentrifugieren wurden die Bakterien mit Wasser, Alkohol und Äther gewaschen. Zur Messung der Radioaktivität wurden die getrockneten Bakterien unter hohem Druck in kleine Scheibchen gepreßt¹⁷⁾. Dadurch erhält man bei gleichen Einwiegen Bakterienpräparate, deren Radioaktivität exakt vergleichbar ist. Aktivität: z. B. 90 Imp./min (Glockenzählrohr). Bei der Aufarbeitung nach a) zeigte sich, daß aus Folsäure-[2-¹⁴C] die gleiche Verbindung entsteht wie aus p-Aminobenzoesäure-¹⁴C. Lediglich die Markierung mit ¹⁴C ist verschieden.

d) Versuche mit *B. coli* 1883 Co und Folsäure-[2-¹⁴C]. Das Nährmedium enthielt 0,1 γ/cm³ Folsäure-¹⁴C. Aufarbeitung s. c). Ergebnis: Die Bakterien waren nicht radioaktiv.

Diskussion: Durch die Verwendung von p-Aminobenzoesäure-[carboxyl-¹⁴C] erbrachten wir den Beweis, daß die p-Aminobenzoesäure als Baustein für die Synthese einer Verbindung gebraucht wird, die große Ähnlichkeit mit Tetrahydro-formyl-folsäure hat, mit ihr aber nicht identisch ist. Wir glauben, daß das von uns isolierte Stoffwechselprodukt der p-Aminobenzoesäure Coenzym F darstellt¹⁸⁾. Das UV-Spektrum zeigt ein Maximum bei 260 mμ (p_H 7) und die Verbindung fluoresziert schwach blau auf den Papierchromatogrammen¹⁹⁾. Da die Substanz ein Wachstoffs für *L. citrovorum* 8081 ist, muß sie zumindest eine formylierte und hydrierte Folsäure-Verbindung sein.

Bei Bakterienstämmen, bei denen die Folsäure die Sulfonamid-Hemmung nicht aufhebt, wird die p-Aminobenzoesäure ebenfalls nur für die Synthese des Coenzym F als Baustein gebraucht.

Die Sulfonamide hemmen somit bei allen Bakterien durch die Verdrängung der p-Aminobenzoesäure die Synthese des Coenzym F, wodurch es dann zu einer Hemmung des Bakterienwachstums kommt²⁰⁾.

Aus den Versuchen mit Folsäure-¹⁴C erklärt sich auch, warum bei *B. coli*²¹⁾ die Folsäure die Sulfonamid-Hemmung nicht aufhebt: Bei *B. coli* ist die Folsäure selbst kein Intermediärprodukt auf dem Wege von der p-Aminobenzoesäure zum Coenzym F. Es fehlen die Rezeptoren zur Bindung von Folsäure. Damit finden auch zwei andere Tatsachen ihre Erklärung. Einmal ist es nicht möglich bei *B. coli* eine Folsäure-Mangelmutante zu erzeugen²²⁾ und weiterhin hemmt Aminofolsäure das Wachstum von *B. coli*⁹⁾ nicht. — Eine ausführliche Mitteilung wird in der Z. Naturforschg. folgen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie — Fonds der Chemie — danken wir bestens für die Unterstützung dieser Arbeit.

Eingeg. am 31. Mai 1954 [Z 109]

* Coenzym F = Coenzym der Formylierung.

¹⁾ D. D. Woods, Brit. J. exper. Pathol. 21, 74 [1940].

²⁾ Folsäure = Pteroyl-l-glutaminsäure.

³⁾ J. O. Lampen u. M. J. Jones, J. biol. Chemistry 164, 485 [1946]; 166, 435 [1946]; 170, 133 [1947]. E. Auhagen, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 283, 195 [1948]. E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Z. Naturforschg. 4b, 100 [1949]; R. Tschesche, K. Soehring u. K. Harder, ebenda 2b, 244 [1947].

⁴⁾ H. P. Sarett, J. biol. Chemistry 171, 265 [1947]; M. G. Sevag et al., ebenda 185, 17 [1950]; D. Hendlin et al., J. Bacteriol. 65, 466 [1953].

⁵⁾ F. Weygand, H. Grisebach u. H. Simon, Chem. Ber. 86, 1389 [1953].

⁶⁾ J. K. Jeane, Science [Washington] 118, 719 [1953].

⁷⁾ Das Kupfercyanid erniedrigt die Radioaktivität um 1/4.

⁸⁾ E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Z. Naturforschg. 4b, 92 [1949]. Es hat sich ergeben, daß der dort als *Staph. aureus* Stei bezeichnete Stamm ein *Enterococcus* ist.

⁹⁾ E. F. Möller, F. Weygand u. A. Wacker, Z. Naturforschg. 5b, 18 [1950].

¹⁰⁾ S. F. Zakrzewski u. C. A. Nichol, J. biol. Chemistry 205, 361 [1953].

¹¹⁾ O. P. Wieland et al., Arch. Biochem. Biophys. 40, 205 [1952].

¹²⁾ V. M. Doctor u. J. R. Couch, J. biol. Chemistry 200, 223 [1953].

¹³⁾ S. Burrows et al., Nature [London] 170, 800 [1952].

¹⁴⁾ Der Stamm wächst mit allen Derivaten der Folsäure.

¹⁵⁾ Der Stamm wächst nur mit Tetrahydroformylfolsäure (= „folinic acid“).

¹⁶⁾ F. Weygand et al., Z. Naturforschg. 5b, 413 [1950].

¹⁷⁾ Analog der Herstellung von KBr-Scheibchen für die UR-Spektroskopie. U. Schiedt, Z. Naturforschg. 8b, 66 [1953]. Wir danken Dr. U. Schiedt, M.P.I. für Biochemie, Tübingen, für die frdl. Unterstützung bei der Herstellung der Scheibchen.

¹⁸⁾ J. M. Buchanan u. D. W. Wilson, Fed. Proc. 12, 646 [1953]. G. R. Greenberg, J. Amer. chem. Soc. 76, 1458 [1954]; Fed. Proc. 13, 221 [1954].

¹⁹⁾ G. R. Greenberg, J. Amer. chem. Soc. 76, 1458 [1954].

²⁰⁾ Versuche mit Sulfonamid-resistenten Bakterien sind im Gange.

²¹⁾ *Lactobacillus arabinosus* 17-5 verhält sich genau so wie *B. coli*.

²²⁾ B. D. Davis, Proc. Nat. Acad. Sci. 35, 1 [1949].