

## 257. Hans v. Euler: Coenzyme und Hemmstoffe; Vitamine und Antivitamine.

[Aus d. Institut für Organ.-chem. Forschung d. Universität Stockholm.]

(Eingegangen am 16. November 1942.)

Die Einsicht in die Rolle und Stellung, welche der prosthetischen Gruppe im Enzymmolekül zukommt, hat man während der Durchbruchsperiode der chemischen Richtung in der Enzymforschung bei den Hydrolasen zu gewinnen gehofft<sup>1)</sup>. Während diesen Bemühungen nicht der gewünschte Erfolg beschieden war, gelang es später bei den Dehydrasen, in günstigen Fällen nicht nur das Gleichgewicht zwischen der prosthetischen Gruppe, der Codehydrase I (Cozymase), und der Apodehydrase zahlenmäßig zu bestimmen, sondern auch den Wirkungsmechanismus dieses Coenzymis recht vollständig zu beschreiben. Es konnte nämlich gezeigt werden<sup>2)</sup>, daß die Cozymase als Wasserstoffüberträger fungiert. Zunächst gelang uns der Nachweis, daß die Cozymase, Co, unter Mitwirkung einer Apodehydrase aus Alkohol Wasserstoff aufnimmt und dessen Dehydrierung zu Acetaldehyd vollzieht, indem die Cozymase selbst in Dihydrocozymase,  $\text{CoH}_2$ , übergeht. Bald darauf ergaben sich auch die Mechanismen der Wasserstoffübertragung durch Cozymase: Bei der Glykolyse und bei der alkoholischen Gärung wird die Oxydoreduktion durch die Kopplung zweier Cozymase-bedingter Dehydrasesysteme, eines Donator- und eines Acceptor-Systems, vermittelt, während bei der Atmung die Reoxydation des  $\text{CoH}_2$  durch ein Enzym bewirkt wird, dem unser Arbeitskreis den Namen Diaphorase gegeben hat<sup>3)</sup>. Die prosthetische Gruppe der Diaphorase ist ein Flavin-adenin-dinukleotid.

Die im Tier- und Pflanzenreich außerordentlich weitverbreitete Cozymase ist der unentbehrliche Ergänzungsstoff für eine große Reihe lebenswichtiger Dehydrasen, welche in die Enzymsysteme des Kohlenhydratabbaus eingehen. Ihrer chemischen Zusammensetzung nach hat sich die Cozymase, in welcher zuerst die Adenylgruppe nachgewiesen wurde<sup>4)</sup>, nach ihrer Reindarstellung als Nicotinsäureamid-adenin-dinucleotid erwiesen<sup>5)</sup>; auch die Natur der Pentosen ist nunmehr vollständig aufgeklärt: Es gehen 2 Ribosereste in die Cozymase ein<sup>6)</sup>.

Zu einer Totalsynthese dieses zentralen Stoffes ist der Tierkörper keineswegs befähigt, vielmehr muß ihm — in irgendeiner Form oder Vorstufe — die Komponente Nicotinsäureanid und wohl auch Adenin bzw. Adenylsäure zugeführt werden. Diese beiden Stoffe sind ihrer biologischen Rolle nach

<sup>1)</sup> Vergl. Euler, Zusammenfass. Vortrag, B. **55**, 3583 [1922]. Die an Hydrolasen studierten Hemmungen bezogen sich besonders auf Schwermetallsalze (Euler u. Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. **121**, 177 [1922]), sowie auf Aldehyde und Amine (Euler u. Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. **125**, 297 [1923]; Myrbäck, Ztschr. physiol. Chem. **158**, 160 [1926]).

<sup>2)</sup> Euler u. Adler, Ztschr. physiol. Chem. **238**, 233 [1935].

<sup>3)</sup> Adler, Euler u. Hellström, Ark. Kemi Mineral., Geol. Ser. B. **12**, Nr. 38 [1937]. — Euler, Günther u. Hasse, Naturwiss. **26**, 187 u. 676 [1938].

<sup>4)</sup> Euler u. Myrbäck, Naturwiss. **17**, 291 [1929]; Ztschr. physiol. Chem. **184**, 163 [1929].

<sup>5)</sup> Euler, Albers u. Schlenk, Ztschr. physiol. Chem. **234**, 1 [1935]; **240**, 113 [1936].

<sup>6)</sup> Euler, Karrer u. Usteri, Helv. chim. Acta **25**, 323 [1942].

Vitamine<sup>7)</sup>; man zählt sie der Vitamin-B-Gruppe zu<sup>8)</sup>. Gerade darin liegt — ganz oder im wesentlichen — die Bedeutung dieser beiden Vitamine, daß sie das Material zum Aufbau von Coenzymen liefern. Die Adenylsäure geht, wie erwähnt, nicht nur in die Cozymase ein, sondern auch in die prosthetische Gruppe der Diaphorase, deren andere Komponente, das Riboflavinucleotid, durch das Vorkommen des Riboflavins, des Vitamins B<sub>2</sub>, in der Zelle bedingt ist. Dasselbe wird, wie H. Theorell gezeigt hat, vor seiner weiteren biologischen Verwendung phosphoryliert.

Daß im allgemeinen die Vitamine — meist nach Umwandlung im Tierkörper oder überhaupt in der lebenden Zelle — als Coenzyme bzw. als prosthetische Gruppe von Enzymen fungieren<sup>9)</sup>, kann nunmehr wohl als sicher gestellt betrachtet werden.

Die neuen Ergebnisse über den Wirkungsmechanismus der durch Domagks Entdeckung in die Therapie eingeführten Sulfonamide haben nun eine Reihe von neuen Fragen aufgeworfen, die mit dem Aufbau der Coenzyme aus den Vitaminen sowie mit der Funktion der Coenzyme in Zusammenhang stehen.

Die Tatsache, daß das Bakterienwachstum durch Sulfanilamide gehemmt wird, erhielt eine wichtige biochemische Unterlage durch die Ergebnisse von Woods und Fildes<sup>10)</sup>, aus denen hervorging, daß diese Wachstumshemmung durch *p*-Amino-benzoësäure aufgehoben werden kann, welche bald darauf aus Mikroorganismen isoliert und als Wuchsstoff erkannt wurde (Rubbo und Gillespie<sup>11)</sup>; Kuhn und Schwarz<sup>12)</sup>).

Die Kenntnis dieses bemerkenswerten Antagonismus wurde dann erweitert durch die quantitativen Messungen an *Streptobacterium plantarum* (Möller und Schwarz<sup>13)</sup>) unter der Einwirkung von Sulfanilsäure und *p*-Amino-benzoësäure. Aus diesen Versuchsergebnissen berechnete Kuhn nach dem Massenwirkungsgesetz die Affinität der *p*-Amino-benzoësäure und der Sulfanilsäure zu dem bindenden Protein der untersuchten Bakterien<sup>14)</sup>. Er zog aus diesen Ergebnissen den Schluß, daß es sich um eine Verdrängungsreaktion zwischen Wuchsstoff und Hemmstoff handelt. Es war nach

<sup>7)</sup> Vitaminwirkung des Nicotinsäureamids: Euler, Malmberg, Heiwinkel u. Schlenk, Ark. Kemi, Mineral., Geol. Ser. B. **12**, Nr. 39 [1937]; Naturwiss. **26**, 45 [1938].

<sup>8)</sup> Bei neuen, in diesem Institut durchgeführten Wachstumsversuchen an Ratten wurden als Tagesbedarf angenommen: 30 γ Nicotinsäureamid und 20 γ Adenylsäure (Ztschr. physiol. Chem. **276**, im Druck [1942]).

<sup>9)</sup> Euler, Nord. med. Tidskr. **1934**, 1696.

<sup>10)</sup> Meet. biochem. Soc. Sheffield Febr. 1940; Woods, Brit. Journ. exp. Pathol. **21**, 74 [1940].

<sup>11)</sup> Nature [London] **146**, 838 [1940].

<sup>12)</sup> B. **74**, 1617 [1941].

<sup>13)</sup> B. **74**, 1612 [1941].

<sup>14)</sup> Nach Versuchen dieses Instituts ist die Verzögerung des Wachstums unserer Unterhefe, welche etwa 1 γ *p*-Amino-benzoësäure je g Trockenhefe enthält, durch 10—100 γ Sulfapyridin nur gering; erst durch 1 mg Sulfapyridin je ccm Nährlösung wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefe auf etwa die Hälfte herabgesetzt. Die Tatsache, daß die *p*-Amino-benzoësäure erst durch große Überschüsse von Sulfanilsäure-Derivaten aus ihrer Bindung verdrängt wird, steht mit den an *Streptobacterium plantarum* gewonnenen Affinitätskonstanten in Übereinstimmung.

Kuhn<sup>16)</sup> „am einfachsten anzunehmen, daß es in den Bakterien ein spezifisches Protein oder einen Receptor gibt, der in umkehrbarer Weise sowohl mit der Carbonsäure als auch mit der Sulfonsäure sich vereinigt“. Die *p*-Amino-benzoësäure ist danach „Baustein oder prosthetische Gruppe eines Ferments der Bakterienzelle“<sup>16)</sup>.

Es ist nun aber auch denkbar, daß die *p*-Amino-benzoësäure nicht als solche wirksam ist, sondern erst nachdem sie zu einem neuen, als Coenzym fungierenden Molekül aufgebaut worden ist. In diesem Falle könnte die „Antivitamin“-Wirkung auch darin bestehen, daß der Hemmungsstoff die *p*-Amino-benzoësäure von demjenigen Enzymsystem verdrängt, welches den Aufbau zum Coenzym bewirkt.

Die Frage, an welchen enzymatischen Systemen der Hemmungsstoff als Antivitamin in Konkurrenz mit dem als Wuchsstoff fungierenden Vitamin eintritt, ist bis jetzt noch in keinem Falle beantwortet worden. Sie mußte an isolierten Enzymsystemen angegriffen werden<sup>17)</sup>.

Was überhaupt Art und Stellen der Verdrängungen an Enzymmolekülen betrifft, so ist zu einer eingehenden Besprechung der Systematik der Hemmungs- und Inaktivierungsvorgänge an Enzymsystemen hier nicht der Raum. Es seien also nur kurz die Haupttypen der Verdrängungsvorgänge gekennzeichnet.

In einem System mit abdissoziierbaren Coenzymen besteht eine reversible Bindung des Apoenzyms sowohl zum Substrat als auch zum Coenzym. Das reaktionsvermittelnde Molekül Substrat-Apoenzym-Coenzym, welches die Größe der Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt, läßt zwei Möglichkeiten einer Verdrängung aus der Bindung an Apoenzym offen, nämlich 1) des Substrates und 2) des Coenzyms.

Dazu kommen noch 3) Blockierungen der Wirkungsgruppe des Coenzyms und 4) Inaktivierungen nicht näher definierter Art, etwa Besetzungen solcher Atomgruppen, welche irgendwie die spezifische Reaktionsfähigkeit des reaktionsvermittelnden Moleküls beeinflussen.

Unter diesen Verdrängungen spielen besonders diejenigen durch Säuren und Basen eine große Rolle.

#### Zur Verdrängung der Cozymase in Dehydrasesystemen.

Das Problem der Reaktionshemmungen bei Einwirkung eines Antivitamins auf ein Vitamin haben wir an Enzymen angegriffen, deren Komponenten genau bekannt sind, nämlich an Dehydrasen. Wie einleitend erwähnt, enthält die Codehydrase I (wie auch die Codehydrase II) das Vitamin Nicotinsäure, und es lag nahe, die Wirkungsweise eines „Antivitamins“

<sup>15)</sup> Kuhn, Wieland u. Möller, B. **74**, 1605 [1941]; Kuhn, Die Chemie **55**, 1 [1942].

<sup>16)</sup> Siehe Auhagen, Ztschr. physiol. Chem. **274** (Hörlein-Festschrift), 48 [1942].

<sup>17)</sup> Hemmende Wirkungen der Sulfonamide sind allerdings an mehreren Enzymen in vitro gefunden worden, nämlich an Katalase, ferner an Kohlensäureanhydrase (Mann u. Keilin, Nature [London] **146**, 164 [1940], Locke, Main u. Mellon, Science [New York] **93**, 66 [1941]) und an Cholinesterase (Zeller, Helv. chim. Acta **25**, 216 [1942]). Über den Mechanismus dieser Hemmungen ist aber noch nichts bekanntgeworden, was zur Klärung des hier behandelten Problems beitragen könnte. Auf die Möglichkeit, daß Sulfanilamid-Wirkungen an Metall-Komponenten von Enzymen ansetzen, kommen wir an anderer Stelle noch zurück.

an Beispielen wie Nicotinsäure-Pyridinsulfonsäure, die an lebenden Zellen vielfach untersucht worden sind, im isolierten Dehydrasesystem zu studieren, besonders hinsichtlich der Frage, ob und in welchem Grade der Hemmstoff (das Antivitamin) schon in den Aufbauvorgang der Coenzyme eingreift.

Allerdings ist der Antagonismus Nicotinsäure-Pyridinsulfonsäure an lebendem Material noch nicht sichergestellt, vielmehr liegen hier, wie schon in vorhergehenden diesbezüglichen Mitteilungen aus unserem Arbeitskreis hervorgehoben wurde<sup>18)</sup>, Widersprüche vor, welche bis jetzt noch nicht aufgeklärt werden konnten.

Zunächst stellte Mc Ilwain<sup>19)</sup> an *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris* und *Bacterium coli* starke Wachstumshemmungen durch Pyridinsulfonamid bzw. Pyridinsulfonsäure in Gegenwart von Nicotinsäure fest, und diese positiven Ergebnisse wurden kürzlich von Erlenmeyer und Würgler<sup>20)</sup> an *Proteus vulgaris* mit Pyridinsulfonsäure bestätigt und durch den Nachweis einer Enthemmung mittels Nicotinsäureamids ergänzt. Im Gegensatz hierzu konnten Lwoff und Mitarb.<sup>21)</sup> in einer vorangegangenen Arbeit an *Proteus vulgaris* keine Wachstumshemmung durch Pyridinsulfonamid nachweisen.

West und Coburn<sup>22)</sup> beobachteten eine Wachstumshemmung an *Staphylococcus haemolyticus* durch Sulfapyridin, und wollen diese Hemmung als eine Verdrängung der Codehydrase I und II durch den Pyridinanteil des Sulfapyridins auffassen; nach ihren Angaben enthemmten Codehydrasepräparate, nicht aber Nicotinsäureamid. Diesen Befund konnte indessen G. Ivánovics<sup>23)</sup> nicht bestätigen.

Dorfman und Mitarb.<sup>24)</sup> konnten die Atmung an Dysenteriebazillen, die in nicotinsäureamidarmem Medium gezüchtet waren, durch Zusatz von Nicotinsäureamid steigern, und diese Atmungserhöhung durch Zusatz von Sulfapyridin, nicht aber von Sulfanilamid, hemmen. In der oben zitierten Arbeit von Adler, Euler u. Skarzynski wurden Dorfmans Befunde so gedeutet, daß der Pyridin-Anteil in den Hemmungsstoffen das Nicotinsäureamid von demjenigen Enzym bzw. von denjenigen Enzymen verdrängt, die den Aufbau des Dinucleotids aus Nicotinsäureamid vollziehen, so daß die Hemmung nicht oder nicht ausschließlich in einer Coenzym-, sondern in einer Substrat-Verdrängung bestehen würde.

In einer vor kurzem erschienenen Arbeit teilen Möller und Birkofe<sup>25)</sup> mit, daß sie an ihren *Proteus*-Stämmen mit Pyridinsulfonsäure und deren Amid erst bei relativ hohen Konzentrationen Hemmungen erreichten. Ihre zahlreichen, bemerkenswerten Beobachtungen konnten sie nicht im Sinne eines einfachen Antagonismus zwischen Nicotinsäure bzw. Nicotinsäureamid und Pyridinsulfonamid deuten.

Gegenüber allen diesen Versuchen an lebenden Mikroorganismen bedeutet eine *in vitro* durchführbare Untersuchung eine wesentliche Vereinfachung und eine Konstanthaltung der Versuchsbedingungen. Insbesondere kann nur von solchen *in vitro*-Versuchen die Entscheidung der Frage erwartet werden, ob eine gegen Nicotinsäure gerichtete Hemmung durch ein spezifisches „Antivitamin“ schon beim Aufbau dieses Vitamins zum Coenzym

<sup>18)</sup> Euler, Ahlström, Säberg u. Wallerström, Ark. Kemi, Mineral. Geol. Ser. B. **16**, Nr. 2 [1942]; Adler, Euler u. Skarzynski, ebenda **16** A, Nr. 9 [1942].

<sup>19)</sup> Brit. Journ. exp. Pathol. **21**, 136 [1940].

<sup>20)</sup> Helv. chim. Acta **25**, 249 [1942].

<sup>21)</sup> Ann. Inst. Pasteur **67**, 9 [1941].

<sup>22)</sup> Journ. exp. Medicine **72**, 91 [1940].

<sup>23)</sup> Ztschr. Immunitätsforsch. exp. Therap. **101**, 58 [1941].

<sup>24)</sup> Dorfman, Race u. Koser, Journ. biol. Chem. **140**, Proc. XXXIII [1941].

<sup>25)</sup> B. **75**, 1118 [1942].

eingreift, oder ob das Coenzym aus seiner Wirkungsstelle am Apoenzym verdrängt wird.

Letztere Alternative, eine Verdrängung der Cozymase aus ihrer Bindung mit einer Apodehydrase, kann leicht geprüft werden, indem man die wasserstoffübertragende Wirksamkeit einer Cozymase-bedingten Dehydrase nach Zusätzen des Hemmungsstoffes mißt. Der Nachweis einer Hemmung des Cozymase-Aufbaues erfordert zwar eigentlich die Verwendung des dabei wirksamen isolierten Enzyms. In erster Annäherung genügt es aber, ein System, das Dinucleotide abbaut, zu solchen Versuchen heranzuziehen.

Wir haben bis jetzt nur die Verdrängung der Cozymase experimentell untersucht und dazu zweierlei Dehydrasen benutzt: 1) eine tierische Glucose-dehydrase, dargestellt nach Quibell<sup>26)</sup>, 2) eine Milchsäuredehydrase, die aus Herzmuskel nach der Vorschrift von Boyland hergestellt war.

Die Beeinflussung der Dehydrasegeschwindigkeit haben wir im Thunberg-Versuch geprüft. Bei dieser Methodik liegt ein Enzymsystem vor, bei dem die Cozymase in Verbindung mit zwei Enzymen steht, der Apodehydrase und der Diaphorase, so daß eine mögliche Verdrängung an beiden Stellen einsetzen kann. Eine getrennte Beobachtung der beiden Beeinflussungen läßt sich spektrophotometrisch durchführen, worüber später näher berichtet wird.

Beide Dehydrasen wurden durch Zusätze der Pyridinsulfonsäure, ihres Amids und dessen Jodmethylats, sowie im Anschluß daran durch Zusätze von strukturähnlichen Stoffen geprüft. Von den Hemmstoffen wurden Pyridin- $\beta$ -sulfonsäure, ihr Amid und dessen Jodmethylat nach Macheck dargestellt, Nicotinsäure-jodmethylat nach P. Karrer und Mitarbeiter<sup>27)</sup>.

Zur Methodik: Die Dehydrierungsgeschwindigkeiten wurden nach der Methylenblau-Methode von Thunberg-Ahlgren gemessen. Zu den gereinigten Dehydrasen wurden abgewogene Mengen reinster Cozymase zugesetzt. Die Wasserstoffübertragung auf Methylenblau wurde durch Zusätze von Flavinenzym oder Diaphorase auf optimale Geschwindigkeit gebracht.

Aus den direkt abgelesenen Entfärbungszeiten wurde die prozentische Hemmung berechnet, bezogen auf die ohne Hemmstoff erhaltene Entfärbungsgeschwindigkeit, wobei bei der Glucosedehydrase wegen der Entfärbung durch die Eigensubstrate korrigiert wurde. Zur Berechnung der prozentischen Hemmung diente die Formel:

$$\% \text{ Hemmung} = \frac{\left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) - \left( \frac{1}{t} - \frac{1}{t_0} \right) \cdot 100}{\left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right)}.$$

Hier bedeutet: T Entfärbungszeit mit Glucose,  $T_0$  ohne Glucose, t mit Glucose, mit Hemmstoff,  $t_0$  ohne Glucose, mit Hemmstoff.

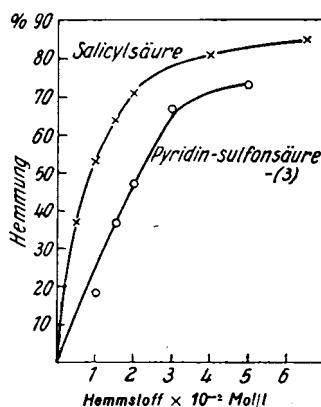
<sup>26)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **251**, 102 [1930]. Die durch Glucosedehydrase katalysierte Reaktion: Glucose + CoI  $\rightarrow$  Gluconsäure + CoH<sub>2</sub>I ist nicht umkehrbar, so daß mit rel. kleinen CoI-Mengen gut meßbare Dehydrierungen erreicht werden. Dadurch können durch rel. kleine Mengen des Hemmstoffes Verdrängungswirkungen deutlich hervortreten.

<sup>27)</sup> Helv. chim. Acta **19**, 826 [1936].

Hemmungen durch Adenosin, Adenosin-Derivate und einige andere Stoffe wurden auch im zellfreien System der alkoholischen Gärung durch Messung der je Zeiteinheit entwickelten Kohlensäure studiert. Die Gärungsmischungen (2,4 ccm) enthielten bei jedem Versuche 400 mg durch Auswaschen von Cozymase befreite Apozymase, welche dann durch 30 γ Cozymase aktiviert wurde, 100 mg Glucose, Phosphatpuffer und eine kleine Menge Hexosediphosphat (zur Verkürzung der Induktionsperiode). Der Raumersparnis wegen werden hier nicht die Gärungskurven angegeben, sondern nur die daraus entnommenen Werte für ccm  $\text{CO}_2$ /60 Minuten.

### Beschreibung der Versuche.

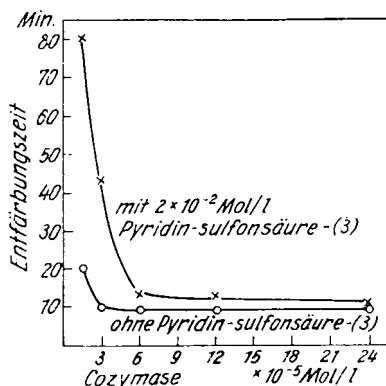
Wir führen unsere Versuchsergebnisse im folgenden in Abbildungen und Tafeln an. Abbild. 1 zeigt die Hemmung der Milchsäuredehydrierung bei konstanter Cozymase-Konzentration und steigenden Mengen Pyridinsulfonsäure.



Abbild. 1. Hemmung der Milchsäuredehydrierung durch Pyridin-sulfonsäure-(3) (o—o) und Salicylsäure (x—x).

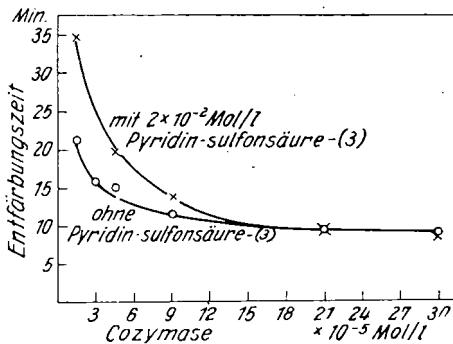
Reaktionsmischung: 0.25 ccm 0.5-mol. *d,L*-Na-lactat; 0.5 ccm Enzymlösung (enthaltend Lactico-apodehydrase + Diaphorase); 50 γ Cozymase; 0.25 ccm 0.5-mol. Phosphatpuffer, pH 7.6; 0.5 ccm Methylenblau 1:5000; pyridin-sulfonsaures-(3) bzw. salicylsaures Na in steigender Menge; jeder Ansatz mit Wasser auf 2.5 ccm ergänzt. Thunberg-Methodik. Temp. 37°. Konzentration der Cozymase in der Reaktionsmischung  $3 \times 10^{-5}$  Mol/l.

Der Nachweis, daß es sich hier um eine Verdrängung der Cozymase und nicht um Hemmungen anderer Art handelt, wurde in der Weise erbracht, daß eine Wiederaufhebung der Hemmung durch steigende Mengen Cozymase eintritt. Wie theoretisch zu erwarten war, tritt bei genügender Cozymase-Konzentration eine konstante Entfärbungszeit ein, die sich bei weiterem Cozymasezusatz nicht mehr ändert, und diese wird auch in Gegenwart des Hemmstoffes erreicht (Abbild. 2 und 3). Der gleiche Nachweis wurde an drei weiteren Substanzen geführt, die sich ebenfalls als Hemmstoffe erwiesen hatten. Wir sehen von der Mitteilung der Hemmungs- und Enthemmungskurven ab und geben nur in Tafel 1 die für ein bis zwei Konzentrationen geltenden Hemmungen der Reaktionsgeschwindigkeiten an.



Abbild. 2. Abhängigkeit der Pyridin-sulfonsäure-(3)-Hemmung von der Cozymase-Konzentration.

Glucosedehydrase aus Rinderleber; Pyridinsulfonsäure-Konzentration  $2 \times 10^{-2}$  Mol/l; 0.5-mol. Glucose als Substrat, übrige Zusätze wie zu Abbild. 1.



Abbild. 3. Abhängigkeit der Pyridin-sulfonsäure-(3)-Hemmung von der Cozymase-Konzentration.

Milchsäuredehydrase aus Herzmuskel; 0.5-mol. Lactat als Substrat.

Die Zusammensetzung der Reaktionsmischung entsprach im wesentlichen der zu Abbild. 1 angegebenen. Die Konzentration der Cozymase in der Versuchsmischung betrug in den Versuchen Nr. 3, 6, 7, 13 und 14  $1.5 \times 10^{-5}$

Tafel 1. Hemmung der Glucose- bzw. Milchsäuredehydrase.

Vers. Nr.	Dehydrase	Zugesetzte Substanz		Hemmung der Dehydrierungs- geschwindigkeit %
		Name	Konz. in der Versuchsmischg. Mol/l	
1	Glucose	Nicotinsäure	$1.3 \times 10^{-2}$	52
2	"	"	$2.6 \times 10^{-2}$	58
3	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	38
4	Glucose	Nicotinsäureamid	$1.3 \times 10^{-2}$	26
5	"	"	$2.6 \times 10^{-2}$	36
6	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	16
7	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	27.5
8	Glucose	Pyridin-sulfonsäure-(3)	$1.7 \times 10^{-2}$	36
9	"	"	$2.0 \times 10^{-2}$	42
10	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	47.5
11	Glucose	Benzolsulfonsäure	$1.0 \times 10^{-2}$	28
12	"	"	$2.0 \times 10^{-2}$	32
13	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	27.5
14	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	54

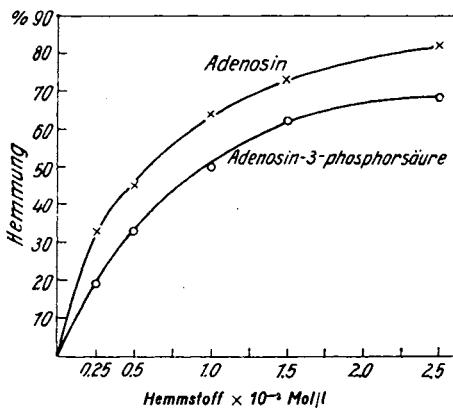
Mol/l, in den übrigen Versuchen  $3 \times 10^{-5}$  Mol/l. Soweit die zugesetzten Stoffe Säuren waren, wurden sie in Form ihrer Natriumsalze verwendet.

Des weiteren ist eine große Anzahl anderer Hemmstoffe geprüft worden. Die Tafel 2 enthält die Versuche 1—8 mit Pyridin-Derivaten. Pyridinsulfon-

Tafel 2. Hemmung der Glucose- bzw. Milchsäuredehydrase.

Vers. Nr.	Dehydrase	Zugesetzte Substanz		Hemmung der Dehydrierungs- geschwindigkeit %
		Name	Konzentration in der Versuchsmischung Mol/l	
1	Glucose	Trigonellin	$4.0 \times 10^{-2}$	0
2	Milchsäure	"	$4.0 \times 10^{-2}$	0
3	Glucose	Pyridin-sulfonsäure-(3)-amid	$1.5 \times 10^{-2}$	10
4	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	20
5	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	50
6	"	Adermin		75
7	Glucose	Nicotinsäureamidjodmethylat	$2.0 \times 10^{-2}$	0
8	"	Pyridinsulfonamidjodmethylat	$2.0 \times 10^{-2}$	18
9	"	Benzosäure	$2.0 \times 10^{-2}$	21
10	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	24
11	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	47
12	"	Benzamid	$1.6 \times 10^{-2}$	22.5
13	"	"	$3.2 \times 10^{-2}$	46
14	Glucose	<i>p</i> -Amino-benzosäure	$2.0 \times 10^{-2}$	70
15	Milchsäure	"	$2.0 \times 10^{-2}$	50
16	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	83
17	"	<i>m</i> -Amino-benzosäure	$2.0 \times 10^{-2}$	27.5
18	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	43
19	"	Salicylsäure	$2.0 \times 10^{-2}$	72
20	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	84
21	"	Salicylamid	$1.6 \times 10^{-2}$	50
22	"	"	$3.2 \times 10^{-2}$	72
23	"	Sulfanilsäure	$2.0 \times 10^{-2}$	38
24	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	48
25	"	Sulfanilamid	gesättigt	29
26	Glucose	Sulfapyridin	"	50
27	Milchsäure	Phenol	$2.0 \times 10^{-2}$	28
28	"	"	$4.0 \times 10^{-2}$	44
29	Glucose	Essigsäure	$2.0 \times 10^{-2}$	0
30	"	Schwefelsäure	$2.0 \times 10^{-2}$	0
31	Milchsäure	Adenin	gesättigt	38.5
32	"	Adenosin	$1.0 \times 10^{-2}$	60
33	"	"	$2.0 \times 10^{-2}$	72.5
34	"	Adenosin-3-phosphorsäure	$1.0 \times 10^{-2}$	49
35	"	"	$2.0 \times 10^{-2}$	57.5
36	"	Adenosin-5-triphosphorsäure	$1.0 \times 10^{-2}$	35
37	"	"	$2.0 \times 10^{-2}$	46
38	"	Tetranucleotid aus Hefe- nucleinsäure	$0.13 \times 10^{-2}$	55
39	"	"	$0.26 \times 10^{-2}$	55
40	"	Tetranucleotid aus Thymus- nucleinsäure (Bredereck)	$0.13 \times 10^{-2}$	49
41	"	"	$0.26 \times 10^{-2}$	61.5
42	"	Tetranucleotid aus Thymus- nucleinsäure (F. G. Fischer)	$0.13 \times 10^{-2}$	13.5
43	"	"	$0.26 \times 10^{-2}$	13.5
44	Glucose	Aneurin	$2.0 \times 10^{-2}$	0
45	Milchsäure	"	$1.0 \times 10^{-2}$	29
46	"	"	$2.0 \times 10^{-2}$	38.5
47	"	Cocarboxylase	$2.0 \times 10^{-2}$	0

amid hemmt etwas schwächer als die freie Säure; die Jodmethylate des Nicotinsäureamids und des Pyridinsulfonamids zeigen sehr geringe Hemmungen. Ebenso hat sich Trigonellin als nicht hemmend erwiesen. Adermin hemmt sehr stark. An diesen wie an den anderen in der Tafel 2 aufgeführten Stoffen ist noch nicht untersucht worden, ob eine Cozymase-Verdrängung vorliegt oder nicht. Sicher ist schon, daß nicht alle in Tafel 2 aufgeführten Hemmstoffe Cozymase verdrängen, z. B. konnte für Salicylsäure (vergl.



Abbild. 4. Hemmung der Milchsäuredehydrierung durch Adenosin (x-x) und Adenosin-3-phosphorsäure (o-o).  
Reaktionsmischung analog der zu Abbild. 1 angegebenen.

Abbild. 1) sowie für Adenosin und Hefeadenylsäure (Adenosin-3-phosphorsäure) (vergl. Abbild. 4) eine Enthemmung durch steigende Cozymasemengen nicht nachgewiesen werden.

Im übrigen sieht man, daß sich spezifische Einflüsse wenig geltend machen; an heterocyclischen und aromatischen Carbon- und Sulfonsäuren treten Hemmungswirkungen deutlich hervor.

Es wäre zu erwarten gewesen, daß Adenin-Derivate wie auch die Tetranucleotide<sup>28)</sup> eine starke Verdrängung der Cozymase bewirken; tatsächlich wurden nur durch Adenosin und Adenylsäure starke Hemmungen erzielt, und zwar werden dieselben auch bei der Apozymase-Gärung gefunden; überraschender Weise scheinen diese Hemmungen nicht auf einer Cozymase-Verdrängung zu beruhen; weitere Versuche sollen in dieser Hinsicht noch ausgeführt werden.

Gegen die Auffassung einer Cozymase-Verdrängung bei vielen der in Tafel 2 angegebenen Hemmstoffe sprechen unsere neuen Versuche, wonach auch die Bernsteinsäuredehydrase, die bekanntlich in ihrer Wirkung von der Cozymase unabhängig ist, durch Stoffe wie Salicylsäure<sup>29)</sup>, aber auch durch Adenylsäure gehemmt wird.

<sup>28)</sup> Adenosin und Hefeadenylsäure verdanken wir der Firma F. Hoffmann-La Roche, Basel. Für die Überlassung kleiner Tetranukleotidmengen bin ich den H. Hrn. Kollegen H. Bredereck, Jena, und F. G. Fischer, Würzburg, zu Dank verpflichtet.

<sup>29)</sup> S. Mählén, Skand. Arch. Physiol. **53**, 152 [1927]; Collett u. Mitarb., Journ. biol. Chem. **100**, 371 [1933]. Wie Ivanovics (Ztschr. physiol. Chem. **276**, 33 [1942]) kürzlich gezeigt hat, wird die Synthese der Pantothensäure in der Bakterienzelle durch Salicylsäure gehemmt.

Auch bei der Apozymase-Gärung wurden mit den bei der Beschreibung der Methodik erwähnten Versuchsbedingungen Hemmungen von gleicher Größenordnung beobachtet wie in Dehydrase-Systemen. Ohne hier auf die Art und Konzentrationsfunktion dieser Hemmungen einzugehen, geben wir nur einige diesbezügliche Ergebnisse an.

Zusatz	Konzentration des Zusatzes im Gärungsgemisch	% Hemmung der $\text{CO}_2$ -Entwicklung/Stunde
Trigonellin .....	$2 \times 10^{-3}$	12
Adenosin .....	$3 \times 10^{-3}$	45
Adenosin-3-phosphat .....	$5 \times 10^{-3}$	47
Cocarboxylase .....	$2 \times 10^{-2}$	15
Zimtaldehyd .....	$5 \times 10^{-4}$	60

Die hier an einigen Beispielen behandelten Hemmungen, Enthemmungen und Verdrängungen sind nicht nur von reaktionskinetischem Interesse. Beeinflussungen von Coenzymbildungen aus Vitaminen und verwandte Vorgänge dürften für die Regulierung der Lebensvorgänge in den Zellen von wesentlicher Bedeutung sein.

Bis jetzt hat sich an einigen Systemen gezeigt, daß, besonders im Fall der Pyridinsulfinsäure, Hemmungen am Dehydrasesystem eintreten, welche sich als Verdrängung von Cozymase deuten lassen. Es ist deshalb möglich, daß die an Mikroorganismen beobachteten Wachstumshemmungen ebenso aufgefaßt werden können. Dennoch bleibt die Möglichkeit durchaus offen, daß die Wirkung der Pyridinsulfinsäure im Aufbau der Cozymase einsetzt. Weitere Versuche an isolierten Enzymsystemen werden zeigen, in welchem Grade dieser Hemmungsmechanismus eine Rolle spielt.

## 258. Paul Pfeiffer und Heinrich Jäger: Halochromie nitrierter Thiophenoläther.

[Aus d. Chem. Institut Bonn.]

(Eingegangen am 16. November 1942.)

Als wir bei einer Untersuchung über aromatische Sulfone und Sulfonsäuren den nitrierten Thiophenoläther I darstellten, machten wir die Beobachtung, daß er eine sehr charakteristische Farbreaktion mit konz. Schwefelsäure gibt. Wir haben uns diese Halochromieerscheinung etwas näher angesehen.

Man erhält den Thiophenoläther recht bequem ausgehend vom 3-Nitro-6-amino-toluol (II)<sup>1)</sup>, indem man das Amin in das 3-Nitro-6-rhodan-toluol (III) überführt<sup>2)</sup> und dieses mit methylalkoholischer Kalilauge behandelt. Es entstehen so zwei Produkte, der oben erwähnte 4-Nitro-2-methyl-thiophenol-methyläther (I) und das Mercaptan IV, welches sich mit Ferricyankalium glatt zum Disulfid V oxydieren läßt. Aus dem Disulfid wurde mit rauchender

<sup>1)</sup> Diese Verbindung wurde uns liebenswürdigerweise von der I. G. Farbenindustrie, Werk Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

<sup>2)</sup> Siehe zu dieser Verbindung Fr. Challenger u. A. Th. Peters, Journ. chem. Soc. London 1928, 1364.