

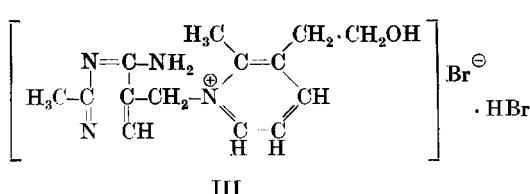
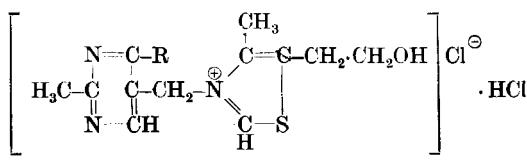
139. Leopold R. Cerecedo*), Albert J. Eusebi) und Morris Soodak***):** Untersuchungen über thiaminähnliche Verbindungen, II.
Mitteil.: Wirkung auf Mikroorganismen****)

[Aus dem Department of Biochemistry, Fordham-University, New York]

(Eingegangen am 21. März 1952)

Die Wirkung von Oxythiamin und Neopyrithiamin auf *Staphylococcus aureus* und *Lactobacillus fermentum* wurde verglichen. Oxythiamin erwies sich als sehr giftig für *S. aureus*; es wurde ein Hemmfaktor von ungefähr 50 gefunden. Demgegenüber betrug der Hemmfaktor des Neopyrithiamins ungefähr 1300. Auf *L. fermentum* wirkte Neopyrithiamin als Hemmstoff ungefähr viermal stärker als Oxythiamin. Die Untersuchungen wurden auf eine Anzahl Mikroorganismen ausgedehnt, deren Thiaminbedarf weniger ausgeprägt ist.

Wie wir in einer früheren Arbeit¹⁾ berichtet haben, ist Neopyrithiamin (III) im Mäuseorganismus ein wirksamerer Thiaminantagonist als Oxythiamin (II). Es lag nahe, als sinnvolle Erklärung des Unterschieds anzunehmen, daß Neopyrithiamin stärker als Oxythiamin im Gewebe festgehalten wird. Diese Beobachtungen veranlaßten uns, die Wirkung dieser mit dem Thiamin (I) nahe verwandten Verbindungen auf Mikroorganismen zu studieren.



Im einzelnen befaßt sich unsere Arbeit mit einer vergleichenden Untersuchung der Wirksamkeit von Oxythiamin (II) und Neopyrithiamin (III) auf

*) Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Geheimrat Professor Dr. Heinrich Wieland, zum 75. Geburtstag gewidmet. L. Cerecedo.

**) Z. Zt. Department of Chemistry, Georgetown University, Washington 7, D.C.

***) Z. Zt. Massachusetts General Hospital, Boston 14, Massachusetts.

****) Diese Untersuchung wurde z.Tl. ermöglicht durch eine Forschungsbeihilfe des National Cancer Institute des National Institute of Health, United States Public Health Service.

¹⁾ L. R. Cerecedo, M. Soodak u. A. J. Eusebi, Journ. biol. Chem. 189, 293 [1951].

Staphylococcus aureus und *Lactobacillus fermentum*. Zugleich werden Belegzahlen über die Wirkung von Oxythiamin auf einige Mikroorganismen mitgeteilt, die weniger spezifisch auf Thiamin eingestellt sind.

Beschreibung der Versuche

Zu den Untersuchungen wurden die im folgenden beschriebenen Organismen²⁾ und Kulturmedien benutzt: *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* wurden auf den von D. W. Woolley und A. G. C. White³⁾ beschriebenen Medien gezüchtet, *Lactobacillus fermentum* auf dem von H. P. Sarett und V. H. Cheldelin⁴⁾ angegebenen Medium. *Mucor ramannianus*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Sclerotium rolfsii* wurden auf der Nährösung E von F. Kavanagh⁵⁾ gezüchtet, nur insofern abweichend, daß 50 g Glucose und 2,5 g Asparagin im l gelöst wurden und daß kein Galliumsalz in der Lösung vorhanden war. Es wurden weiterhin gezüchtet: *Neurospora crassa cholineless* auf dem Medium von N. H. Horowitz und G. W. Beadle⁶⁾, *Fusarium lini Bolley* auf dem von L. J. Sciarini und F. F. Nord⁷⁾, *Lactobacillus arabinosus* auf dem von H. R. Skeggs und L. D. Wright⁸⁾ und *Streptococcus faecalis* auf dem nach Stokes und Mitarbeitern⁹⁾.

Alle Organismen wurden in thiaminfreien Medien gezüchtet mit Ausnahme derjenigen, die Thiamin selbst (*L. fermentum*) oder seine Komponenten (*S. aureus*, *M. ramannianus*, *S. rolfsii* und *P. blakesleeanus*) zum Wachstum benötigen. Die Pilzkulturen wurden über 1–2 Wochen in 125-ccm-Erlenmeyer-Kolben auf je 25 ccm der Nährösung gezüchtet und das Wachstum durch Auswiegen des gewaschenen Mycels bestimmt. Die Bakterien wurden in einem Gesamtflüssigkeits-Volumen von je 10 ccm in Colorimeterröhren gezüchtet und das Wachstum durch Trübungsmessung bestimmt. Das Wachstum der Milchsäurebakterien wurde sowohl durch Trübungsmessung wie auch durch Titration der gebildeten Säure bestimmt.

Ergebnisse

Die vergleichende Untersuchung der Wirkung von Oxythiamin und Neopyrithiamin¹⁰⁾ wurde mit zwei Bakterienarten durchgeführt, die beide Thiamin oder seine Komponenten zum Wachstum benötigen.

Im Falle des *Staphylococcus aureus* ließ sich ein gutes Wachstum erreichen, wenn Thiamin in einer Konzentration von 0,01 γ/cem zugegeben wurde. Dieses Mengenverhältnis wurde in unseren Versuchen beibehalten, während die Mengen von Oxythiamin und Neopyrithiamin variiert wurden. Alle Komponenten wurden vor dem Sterilisieren

²⁾ Die Kulturen von *Staphylococcus aureus* und *Lactobacillus fermentum* erhielten wir von der American Type Culture Collection, Georgetown University, School of Medicine, Washington D.C. Die Kultur von *Escherichia coli* lieferte uns die School of Pharmacy, Fordham University. Die anderen Organismen verdanken wir Dr. F. F. Nord, Chemistry Department, Fordham University (*Fusarium lini Bolley*), Dr. F. Kavanagh, New York Botanical Garden, New York (*Mucor ramannianus*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Sclerotium rolfsii*), Mr. L. Seigel, Food Research Laboratories, Long Island City, New York (*Neurospora crassa cholineless*), sowie Dr. John Foy, Nopco Chemical Company, Harrison, N. J. (*Lactobacillus arabinosus*, *Streptococcus faecalis*).

³⁾ Journ. Exptl. Med. 78, 489 [1943]. ⁴⁾ Journ. biol. Chem. 155, 153 [1944].

⁵⁾ Bull. Torrey Botan. Club 69, 669 [1942]. ⁶⁾ Journ. biol. Chem. 150, 325 [1943].

⁷⁾ Arch. Biochem. 3, 261 [1943]. ⁸⁾ Journ. biol. Chem. 156, 21 [1944].

⁹⁾ J. L. Stokes, M. Gunness, I. M. Dwyer u. M. C. Caswell, Journ. biol. Chem. 160, 35 [1945].

¹⁰⁾ Mit Neopyrithiamin wurden wir durch die freundliche Vermittlung von Hrn. Dr. Karl Folkers von Merck & Co. großzügig versorgt.

zusammengegeben. Die Röhren wurden angeimpft mit einem Tropfen einer 24 Std. alten Zucht von *S. aureus*, die zweimal gewaschen und dann in steriles Wasser bis zur eben erkenntlichen Trübung suspendiert worden war. Die Röhren wurden dann bei 37.4° im Thermostaten aufbewahrt. Nach 19–20, sowie nach 40 Std. wurde in einem Evelyn-Photometer unter Benutzung des Filters mit maximaler Durchlässigkeit bei 540 μ m gemessen. Die bei der nephelometrischen Bestimmung des Wachstums gefundenen Extinktionswerte sind in der Tafel 1 zusammengestellt.

Tafel 1. Einfluß von Oxythiamin und Neopyrithiamin auf das Wachstum von *Staphylococcus aureus*. Incubationszeit: 19–20 Std. bei 37.5°

Konzentrat. an Oxythiamin bzw. Neopyrithiamin μ Mol./ccm	Konzentrat. an Thiamin γ /ccm	Extinktion	
		Oxythiamin	Neopyrithiamin
0	0.01	0.194	0.187
1.5	0.01	0.018	0.004
3.0×10^{-2}	0.01	0.022	0.046
1.5×10^{-2}	0.01	0.027	0.097
3.0×10^{-3}	0.01	0.032	0.161
1.5×10^{-3}	0.01	0.051	0.180
3.0×10^{-4}	0.01	0.137	0.200
1.5×10^{-4}	0.01	0.149	0.200
3.0×10^{-3}	1.0	0.181	0.137
Hemmfaktor		50	1300

Ablesungen nach 40 stdg. Incubationszeit ergaben, daß in den Röhren mit der niedrigeren Konzentration an Oxythiamin (II) das Wachstum gegenüber den Blindproben ohne Hemmstoff merklich verstärkt war. Augenscheinlich spaltet *S. aureus* nach längerer Incubationszeit das Oxythiamin und verwendet die Thiazolkomponente zum Wachstum. Oxythiamin war für diesen Organismus überraschend giftig. Der Hemmfaktor, d.h. das Oxythiamin/Thiamin-Verhältnis, welches das Wachstum zu 50% hemmt, lag bei 50.

Eine gleiche molare Menge Neopyrithiamin (III) erwies sich als weit weniger giftig auf *S. aureus* als Oxythiamin; es wurde ein Hemmfaktor von annähernd 1300 gefunden. Die sowohl durch Oxythiamin als auch durch Neopyrithiamin bewirkte Hemmung wird überwunden, wenn die Incubationszeit 40 Std. übersteigt. Andererseits wird aber die wachstumsanregende Wirkung, die mit Oxythiamin nach einer solchen längeren Incubationszeit gefunden wird, bei Neopyrithiamin nicht beobachtet. Bemerkenswert ist, daß Oxythiamin, dessen Giftigkeit an der Maus nur $1/50$ der Giftigkeit des Neopyrithiamins beträgt, auf *S. aureus* einen bedeutend größeren antagonistischen Effekt zeigt.

Im Falle des *L. fermentum* wurde die Nährlösung nach Sarett und Cheldelin sowohl für die Präparation der Impfkeime wie auch für die Wachstumsuntersuchungen verwandt.

Der Organismus wurde in Stichkultur im Kühlschrank aufbewahrt; daraus wurden täglich nach Bedarf die Impfkeime entnommen. Thiamin bzw. Cocarboxylase wurden in die sterilen Röhren des Evelyn-Photometers pipettiert und dann die Antivitamine

Tafel 2. Einfluß von Oxythiamin (II) und Neopyrithiamin (III) auf das Wachstum von *L. fermentum*

Menge des Hemmstoffes μMol/Gefäß	Oxythiamin												Neopyrithiamin																	
	Thiamin						γ/Gefäß						Cocarboxylase						Thiamin						γ/Gefäß					
	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04
0.0	0.036	0.161	0.252	0.328	0.409	0.032	0.208	0.301	0.347	0.432	0.041	0.155	0.260	0.347	0.398	0.046	0.208	0.301	0.328	0.444	0.009	0.181	0.310	0.377	0.056	0.181	0.347	0.009	0.013	
3.0×10^{-4}	0.027	0.168	0.268	0.328	0.398	0.022	0.149	0.276	0.328	0.444	0.022	0.076	0.222	0.310	0.377	0.036	0.098	0.181	0.222	0.319	0.018	0.046	0.098	0.114	0.046	0.098	0.114	0.004	0.009	
9.0×10^{-4}	0.009	0.174	0.276	0.310	0.420	0.004	0.027	0.066	0.068	0.099	0.009	0.013	0.022	0.04	0.04	0.004	0.004	0.004	0.056	0.119	0.009	0.004	0.004	0.009	0.004	0.009	0.013	0.009	0.013	
3.0×10^{-3}	0.004	0.013	0.155	0.254	0.444	0.004																								

zugegeben. Mit sterilem Wasser wurde auf ein Gesamtvolumen von 5 ccm aufgefüllt und dann mit 5 ccm der Nährlösung versetzt. Die Röhren wurden schließlich mit Dampf behandelt und mit Ausnahme der Blindproben angeimpft. Nach einer Incubationszeit von 18 Stdn. bei 37° wurde das Wachstum im photoelektrischen Evelyn-Colorimeter unter Benutzung des 540-μm-Filters gemessen.

Die Ergebnisse (Tafel 2) zeigen, daß Neopyrithiamin für *Lactobacillus fermentum* giftiger ist als Oxythiamin. Mit Oxythiamin errechnen sich Hemmfaktoren von 40 bzw. 10 in Gegenwart von Thiamin bzw. Cocarboxylase. Mit Neopyrithiamin sind die entsprechenden Werte 10 bzw. 5. Beide Hemmstoffe zeigen also in Gegenwart von Cocarboxylase eine größere Giftigkeit als in Gegenwart von Thiamin. Durch Zugabe größerer Mengen von Thiamin oder Cocarboxylase kann die sowohl durch Oxythiamin als auch durch Neopyrithiamin erzeugte Hemmung ausgeschaltet werden.

Die mitgeteilten Ergebnisse passen für die Organismen, die Thiamin selbst zum Wachstum benötigen, in den allgemeinen Rahmen. Ihnen stehen die in der Tafel 3 mitgeteilten Ergebnisse gegenüber, die mit Organismen mit weniger spezifischen Anforderungen erhalten wurden. Hier finden wir Hemmfaktoren, die über den weiten Bereich von 100 für *Mucor ramannianus* bis 50000 für *Streptococcus faecalis* schwanken. Der zuerst genannte Organismus kann offensichtlich Thiamin synthetisieren, wenn er mit der Thiazol-Komponente des Moleküls versorgt wird, während *Streptococcus faecalis* zur Vollsynthese befähigt zu sein scheint.

Tafel 3. Einfluß von Oxythiamin (II) auf verschiedene Mikroorganismen

Mikroorganismus	Hemmfaktor (Oxythiamin/Thiamin)	Thiamin-Bedarf
<i>Mucor ramannianus</i>	100	Thiazol-Teil
<i>Sclerotium rolfsii</i>	1000	Pyrimidin-Teil
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	100—250	Pyrimidin- u. Thiazol-Teil
<i>Neurospora crassa</i>	etwa 10000	keiner
<i>Fusarium lini</i> Bolley ...	50000	„
<i>Escherichia coli</i>	500000	„
<i>Streptococcus faecalis</i>	etwa 50000	„

Diskussion der Versuchsergebnisse

Die in den Versuchen mit Oxythiamin und Neopyrithiamin erhaltenen Zählenwerte machen deutlich, daß die beiden verwandten Verbindungen gegenüber den untersuchten Mikroorganismen eine wechselnde Selektivität zeigen. Allgemein läßt sich jedoch feststellen, daß die Organismen, die Thiamin zum Wachstum benötigen, gegen beide Antivitamine empfindlich sind, während diejenigen, die Thiamin synthetisieren können, eine Wachstumshemmung nur bei wesentlich höheren Konzentrationen der Antivitamine erkennen lassen. Diejenigen, deren Bedürfnisse in der Mitte der beiden Extreme liegen, zeigten auch mittlere Empfindlichkeit. Diese Befunde stimmen überein mit denen, die von Woolley und White³⁾ mit Pyrithiamin erhalten worden sind.

Auf Grund ihrer Befunde über die Wachstumshemmung bei *Lactobacillus fermentum* sind Sarett und Cheldelin¹¹⁾ zu der Annahme gelangt, daß die Aminogruppe am Pyrimidin-Ring eine wesentliche Rolle spielt, denn sie stellten auch mit größeren Konzentrationen von 6-Amino-pyrimidin-Derivaten eine Hemmwirkung fest, nicht aber mit Uracil. Der konkurrierende Einfluß der Amino-Gruppe ist aber nicht der einzige Ansatzpunkt der Hemmung, wie durch die große Giftigkeit von Oxythiamin bewiesen wird. Im Gegensatz zu der Annahme von Sarett und Cheldelin ist ein Aminopyrimidin nicht unumgänglich notwendig, um eine Wachstumshemmung bei *L. fermentum* zu erreichen. Offenbar ist die Thiazol-Komponente von Bedeutung, da nämlich Oxypyrimidine allein keine antagonistische Wirkung zeigten. Es scheint also, daß man die vollständige Struktur des Antagonisten in Betracht ziehen muß, wenn man über Hemmungen dieser Art Überlegungen anstellt.

¹¹⁾ Journ. biol. Chem. 156, 91 [1944].