

Wirkung von Sulfonamiden und Antisulfonamiden auf das Wachstum von Pisumwurzeln in steriler Organkultur

Autor(en): **Anker, Walter**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft in Bern**

Band (Jahr): **8 (1951)**

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-319454>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern. Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

WALTER ANKER

Wirkung von Sulfonamiden und Antisulfonamiden auf das Wachstum von Pisumwurzeln in steriler Organkultur

EINLEITUNG

Wenn man die auf verschiedenen Gebieten durch die wissenschaftliche Forschung erzielten Ergebnisse der letzten Jahrzehnte betrachtet, so gehört sicher das Gebiet der Wirkstoffe zu denjenigen, die ganz bedeutende Fortschritte erfuhren.

Stand im Anfang die Konstitutionsaufklärung neu entdeckter Vitamine im Vordergrund der Forschung, so versuchte man bald die Wirkstoffphysiologie und ganz besonders den Wirkungsmechanismus der Vitamine zu ergründen. Es zeigte sich nach den Untersuchungen und Ergebnissen von Schopfer [1], Lwoff [2], Schopfer [3, 4], Knight [5], Moller [6], Snell, Strong und Peterson [7], Schopfer [8], daß nicht nur das Tier auf eine exogene Zufuhr von Vitaminen angewiesen ist, sondern daß auch Mikroorganismen wie Pilze und Bakterien die Synthesefähigkeit verlieren können und somit auf eine Vitaminzufuhr angewiesen sind. Durch die Kenntnis der Konstitution der Wachstumsfaktoren war es möglich, ihre Wirkungsspezifität zu prüfen, und da zeigte es sich, daß die Wirkung stark mit der spezifischen Struktur zusammenhängt, und daß schon kleine Veränderungen im Molekül die biologische Aktivität herabsetzen oder auslöschen (Knight und McIlwain [9], Landy [10], Snell und Strong [11], Moller [12], Schultz [13, 14], Schopfer [15], Schopfer, Posternak und Mlle Guilloud [16]). Eine solche Veränderung am Molekül, zum Beispiel ein Ersatz einer chemischen Gruppe durch eine andere, kann die Aktivität des Wuchsstoffes nicht nur auslöschen, sondern diese neue Substanz kann sogar hemmend, also

antagonistisch wirken und die Bedeutung eines Antivitamins besitzen (Brown und du Vigneaud [17], Schöpfer [18], Wollery [19], Schöpfer und Grob [20]).

Die Entdeckung der Vitamin-Antivitaminverhältnisse bei den Sulfonamiden erfolgte nun interessanterweise nicht auf dem oben beschriebenen Weg, sondern ging zuerst von der Forschung neuer chemotherapeutischer Substanzen aus. Nach der Einführung des Prontosil gegen bakterielle Infektionen durch Domagk [21], zeigten Trefouel und seine Mitarbeiter [22, 23], daß p-Aminophenylsulfonamid die wirksame Substanz *in vitro* und *in vivo* war. Die Versuche von FournEAU und Mitarbeiter [24] ergaben, daß p-Aminophenylsulfonamid nicht wie ein letal wirkendes Antisepticum (bacterizid), sondern die Entwicklung hemmend, also bakterio-statisch wirkt. Man schloß daraus, daß die Sulfonamide irgendwie in der Ernährung der Mikroorganismen eingreifen und so die Bakterio-stase verursachen (Lockwood [25], McIntosh und Whitby [26]).

Als erkannt wurde, daß die Sulfonamide nur dann *in vitro* gegen die Mikroorganismen wirksam waren, wenn kleine Mengen injiziert wurden oder wenn das Milieu kein Pepton enthielt, tauchte die Ueberlegung auf, daß im Pepton oder in der größeren Impfmenge eine Substanz sei, die den Sulfonamiden entgegenwirke. Die Bestätigung dieser Ansicht wurde 1939 von Stamp [27] geliefert, der zeigte, daß durch Zugabe von abgetöteten Bakterien die Sulfonamidhemmung aufgehoben wird. Es gelang ihm die wirksame Substanz zu extrahieren, und er betrachtet sie als eine zusammengesetzte Aminosäure. Auch Green [28] berichtet, daß organische Produkte die Sulfonamidwirkung neutralisieren. Woods und Fildes [29] und Woods [30] fanden den gleichen Effekt mit Hefeextrakten und zeigten daß die verantwortliche Substanz mit p-Aminobenzoessäure identisch ist. Die Untersuchungen über die antagonistische Wirkung der p-Aminobenzoessäure (PAB) durch Lwoff, Nitti, Mme Trefouel und Mlle Hamon [31], sowie die Isolierung der PAB aus der Hefe durch Kuhn und Schwarz [32] bestätigten sehr schön die bisherigen Ergebnisse.

Die Aehnlichkeit der chemischen Struktur von p-Aminobenzoessäure und dem Grundkörper der Sulfonamide, der p-Aminobenzolsulfosäure, sowie der Tatsachen der Proportionalität (Fildes [33]) führte zu der Verdrängungshypothese von Woods. Auf Grund der Strukturähnlichkeit verdrängt das Sulfonamid die PAB, die ein lebensnotwendiges Vitamin ist und wahrscheinlich als Coenzym eines enzymatischen

Systems aufzufassen ist. Durch die Verdrängung wird also die spezifische physiologische Funktion der PAB blockiert. Die Tatsache, daß o- und m-Aminobenzolsulfosäure unwirksam sind, also Strukturspezifität herrscht, sowie das Auffinden von Mikroorganismen wie *Streptococcus plantarum* (M o e l l e r [34]) und *Clostridium acetobutylicum* (R u b b o und G i l l e s p i e [35]), die PAB als Wachstumsfaktor benötigen, bestätigte die Voraussetzungen der Verdrängungstheorie.

In weiteren Untersuchungen wurden neben der PAB auch andere Substanzen gefunden, die als Antagonisten der Sulfonamide zu betrachten sind. So erwies sich die p-Aminobenzoyl-glutaminsäure (PABG) als wirksames Antisulfonamid. Wenn wir annehmen, daß die PABG ein unentbehrlicher Wirkstoffkomplex für die Zelle darstellt, der durch die Verdrängung der PAB blockiert wird, so muß die PABG eine größere Antisulfonamidaktivität besitzen als PAB. Dieses Ergebnis wurde auch von A u h a g e n [36] berichtet. Umgekehrt finden W a g n e r - J a u r e g g und W a g n e r [37], sowie L a m p e n und J o n e s [38] aber das Gegenteil, also eine kleinere Aktivität der PAB. Man könnte sich fragen, ob hier die PABG nur eine Quelle für PAB sei.

Daß die PABG wahrscheinlich auch ein Teil eines Vitaminkomplexes ist, zeigten dann die Forschungen über die Folsäure, die sich nach der Strukturaufklärung und Synthese durch A n g i e r [39] als Pteroylglutaminsäure erwies. Die Folsäure ist ein unentbehrlicher Wachstumsfaktor für eine Anzahl von Mikroorganismen, vor allem Enterococccen und Lactobacillen, und ist imstande, die Wirkung der Sulfonamide aufzuheben. Die Pteroylglutaminsäure enthält die PAB als Bestandteil, wodurch auch hier die Verdrängungstheorie zu ihrem Recht kommt (W o o d s [40]).

Nun aber wurden Substanzen gefunden, die ohne chemische Verwandtschaft mit der PAB einen Antisulfonamidcharakter aufweisen. Es sind dies vor allem Purine und Nucleinsäuren. Aus den mikrobiologischen und cytologischen Versuchen über die Wirkung der Purine (vor allem Adenin) als Antisulfonamide (41, 42, 43) schließt S c h o p f e r, daß die PAB in die Biosynthese der Purine eingreift, und daß durch die Verdrängung der PAB die Synthese der Purine gestört ist. Da die Purine aber nicht nur Bestandteile der Nucleinsäuren sind, sondern wie Adenin auch in Atmungs-coenzymen (Codehydrase I) zu finden sind, so ist es begreiflich, daß diese Störung ein wichtiger Grund der Wachstumshemung ist. S h i v e und R o b e r t s [44] kommen 1946 unabhängig von S c h o p f e r zu den gleichen Schlüssen. Uebrigens ha-

ben seither *Shive* und Mitarbeiter den chemischen Mechanismus der Wirkung der PAB auf die Biosynthese der Purine weitgehend abklären können, indem sie in den durch Sulfonamid gehemmten Kulturen eine Vorstufe der Purine angehäuften fanden.

Wir sehen also, daß im Anfang die therapeutische Seite der Sulfonamidforschung im Vordergrund stand, und wie mit der Zeit das Interesse sich mehr und mehr der damit verbundenen Wirkstoffphysiologie zuwandte und so das Sulfonamidproblem zu einem allgemein Biologischen wurde.

Die meisten Versuche über die Wirkung der Sulfonamide und deren Aufhebung wurden mit Mikroorganismen ausgeführt, wahrscheinlich weil im Anfang dieser Forschung die Chemotherapie im Vordergrund stand, dann sind Mikroorganismen als auxoheterotrophe Organismen *) sehr geeignet zur Untersuchung solcher Wirkstoffverhältnisse. Demgegenüber bietet die höhere Pflanze den Vorteil, die Wirkung der Sulfonamide auf ein ganzes Organ oder ein Gewebe (Meristem) also zum Beispiel Veränderungen in histologischer und cytologischer Hinsicht zu untersuchen.

Der erste Versuch über die Wirkung der Sulfonamide bei höheren Pflanzen stammt von *Fournau* und seinen Mitarbeitern [24] und betrifft die Keimung der Samen von Gartenkresse. Die grundlegenden Versuche von *Mangenot* und *Carpentier* [45] zeigten, daß das Wurzelwachstum von *Pisum sativum* durch die Sulfonamide im Längenwachstum gehemmt wird und starke histologische Veränderungen erleidet. Weitere Ergebnisse über die Hemmung des Wurzelwachstums stammen von *Wiedling* [46], *Stoll* [47], *Hazard* [48], *Macht* [49] und *Schopfer* [50].

Alle diese Versuche wurden mit Wurzeln unternommen, die noch mit den Kotyledonen in Verbindung standen. Dabei ist zu bedenken, daß die Kotyledonen als Speicherorgane Vitamine in die Wurzel leiten, die das Wurzelmeristem als auxoheterotrophes Organ selber nicht synthetisieren kann. Daß die Kotyledonen unter anderem durch morphogene Stoffe auch einen formbestimmenden Einfluß haben, zeigt zum Beispiel der große Unterschied der Nebenwurzelzahl und ihrer Länge bei der Wurzelkultur von *Pisum sativum* mit oder ohne Kotyledonen.

*) Als auxoheterotroph wird ein Organismus bezeichnet, der die Fähigkeit zur Synthese der für ihn lebensnotwendigen Wirkstoffe verloren hat (*Schopfer*).

Erst durch die Organkultur wird jeglicher Einfluß durch Wirkstoffe ausgeschaltet. Die Wirkung der Sulfonamide auf Wachstum isolierter Tomatenwurzeln wurde von B o n n e r [51] untersucht und zeigte deutlich, daß die Wurzel ein hochempfindliches Testobjekt ist und die Organkultur die Methode der Wahl sei.

Aus diesem Grund wählten wir für die Untersuchung über die Wirkung von Sulfonamiden und Antisulfonamiden auf die höhere Pflanze die Methode der sterilen Organkultur. Mit der vorliegenden Arbeit, über deren Anfangsergebnisse eine kurze Mitteilung [52] berichtete, sollte untersucht werden, ob die bisherigen Ergebnisse auf dem Sulfonamidgebiet auch bei der höheren Pflanze und speziell bei der Wurzel bestätigt werden können, und ob neue Erkenntnisse dazu beitragen, weiter in dieses Gebiet des Zellstoffwechsels vorzudringen.

ORGANKULTUR UND GEWEBEKULTUR

Je höher organisiert ein Organismus ist, desto komplizierter ist sein Gesamtstoffwechsel und desto größer die Schwierigkeit, ihn zu überblicken. Denn die Organe und Gewebe eines Organismus haben meistens sehr verschiedene Funktionen, die einander ergänzen und die zusammen koordiniert sind. So ist es praktisch nicht möglich, die physiologischen Vorgänge eines einzelnen Organes zu erfassen, solange dieses Organ noch mit dem Gesamtorganismus in Zusammenhang steht. Nur die Kultur des betreffenden Organes oder des Gewebes für sich allein schließt jegliche Beeinflussung durch anderswo produzierte Stoffe vitaminischer und hormonaler Natur aus und gestattet die Erforschung des selbständigen Stoffwechsels. Erst durch die Organ- und Gewebekultur konnten manche Probleme der Wirkstoffphysiologie gelöst werden.

Die ersten Versuche über pflanzliche Gewebekulturen stammen von H a b e r l a n d t [53]. Später war es K o t t e [54] und R o b b i n s [55] gelungen, Gewebekulturen und Wurzelkulturen zu züchten, die aber nach kurzer Zeit zugrunde gingen. Der Grund an diesem Mißerfolg wird weniger in der Wahl von ungeeigneten Versuchspflanzen liegen, als daß die Nährlösung noch unvollkommen ist. Erst W h i t e [56] war es möglich, Tomatenwurzeln unbeschränkte Zeit lang wachsen zu lassen. Die Wurzeln der meisten Dikotyledonen konnten später unbeschränkte Zeit kultiviert werden, während bis heute das gleiche Ergeb-

nis (dauernde Ueberimpfung) bei den Monokotyledonen gescheitert ist. Bei der pflanzlichen Gewebekultur waren größere Schwierigkeiten zu überwinden und erst durch die Technik von G a u t h e r e t [57, 58] wurde es möglich, pflanzliches Gewebe aus einem Meristem — wie Cambium — stammend während unbeschränkter Zeit zu kultivieren.

Als wichtige Grundlage für die Organ- und Gewebekultur muß die richtige Zusammensetzung der Nährlösung vorausgesetzt werden. Natürlich muß die Nährlösung dem Bedürfnis des kultivierten Objektes angepaßt sein, und jenes wird von Fall zu Fall verschieden sein. Die ersten Nährmilieus waren auf der Grundlage der K n o p s c h e n und P f e f f e r s c h e n Nährlösung aufgebaut. Zuerst wurden die Wachstumsfaktoren in Form eines Hefeextraktes zu der Nährlösung zugesetzt und die von W h i t e mit Saccharose und Hefeextrakt verbesserte Nährlösung von U s p e n s k i ermöglichte die Kultur der Tomatenwurzeln. Natürlich ist diese Nährlösung nur halbsynthetisch und gerade bei der Erforschung der Wirkung einzelner Vitamine auf den Stoffwechsel von Organkulturen ist es nötig, die Zusammensetzung des Milieus genau zu kennen. Aber erst durch die Konstitutionsermittlung (1935) und Synthese (1936) des Aneurins und die sich stark entwickelnde Forschung auf dem Gebiet der Vitamine wurde es möglich, den Hefeextrakt durch chemisch reine Vitamine zu ersetzen.

So ersetzte W h i t e in seinem Milieu II den Hefeextrakt durch Spurenelemente (Fe, Mn, Zn, B, J), Glycocoll und Aneurin. Beim Milieu von R o b b i n s und S c h m i d t wurde das Grundmilieu (P f e f f e r s c h e Nährlösung) durch Zusatz von Spurenelementen (Fe, Cu, B, Mo, Zn, Mn), Aneurin und Pyridoxin verbessert.

B o n n e r und D e v i r i a n setzen zu ihrer Nährlösung keine kompliziert zusammengesetzte Spurenelementmischung hinzu, sondern Fetartrat und Aneurin (Milieu I), während das Milieu II Aneurin und Nicotinsäure enthält, und das Milieu III Aneurin und Pyridoxin.

Alle diese Grundmilieus enthalten folgende Salze in verschiedenen Mengenverhältnissen: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, MgSO_4 , KNO_3 , KCl , KH_2PO_4 . Jedes dieser Milieus ist für die Wurzelkultur von bestimmten Pflanzenarten geeignet und muß daher von Fall zu Fall geprüft werden.

Um ein optimales Wachstum der isolierten Wurzel zu ermöglichen, müssen alle synthetischen Nährlösungen Aneurin enthalten, da Aneurin ein Grundelement für das Wachstum der isolierten Wurzel ist, und die Wurzel nicht imstande ist, die Synthese dieses Vitamins durchzuführen. Daneben benötigen viele Wurzeln auch andere Wachstums-

faktoren, wie dies **B o n n e r** und **D e v i r i a n** [59] sowie **R o b b i n s** und **S c h m i d t** [60] zeigten. Die Wurzel weist in bezug auf den Vitaminstoffwechsel ganz ähnliche Verhältnisse auf wie die Mikroorganismen. Wir unterscheiden auch hier Vitamine als Hauptfaktor wie Aneurin, oder als Zusatzfaktor. Die Ergebnisse von **B o n n e r** [61, 62] über die Wirkungsspezifität der Vitamine bei der Kultur isolierter Wurzeln zeigen auch hier keine Unterschiede gegenüber Tier und Mikroorganismen. Die Wurzel ist also auxoheterotroph für ein oder mehrere Vitamine, und sie bezieht diese fehlenden Wirkstoffe einerseits aus den oberirdischen Pflanzenteilen, andererseits aus dem Boden.

TECHNIK

All unsere Versuche wurden mit der frisch isolierten Wurzelspitze, also ohne Ueberimpfung, gemacht. Es hat den einzigen Nachteil, daß der Einfluß der Kotyledonen nicht vollständig ausgeschaltet ist, da ja noch in der isolierten Wurzelspitze Stoffe aufgespeichert sein können, die das Wurzelmeristem nicht selber synthetisiert hat, sondern eben noch aus den Kotyledonen stammen. Ich glaube aber nicht, daß unsere Versuchsergebnisse anders lauten würden, wenn wir die Wurzelspitzen durch fortlaufende Passagen zuerst von jeglichen nicht eigenen Wirkstoffen befreit hätten. Höchstens in quantitativer Hinsicht, denn die durch mehrere Passagen vollständig auxoheterotrophe Wurzelspitze ist gegenüber einer Substanz, wie sie die Sulfonamide darstellen, sicher empfindlicher geworden.

Zu unseren Versuchen verwendeten wir die Wurzeln von *Solanum lycopersicum*, *Foeniculum dulce* und *Pisum sativum* (Sorte Maikönigin). Das Samenmaterial wurde durch eine 3,5% Chlorkalklösung vor der Keimung sterilisiert. Bei *Solanum lycopersicum* wurden die Samen vor der Chlorkalksterilisation 2—3 Stunden in Wasser gelegt, um sie schon vorher ein wenig aufquellen zu lassen. Die Einwirkungsdauer in der Chlorkalklösung war für *Solanum lycopersicum* 1½—2 Stunden, während für *Foeniculum dulce* und *Pisum sativum* etwa 1 Stunde genügte. Nun wurden mit einer sterilen, abgeflamten Gabel diese Samen direkt aus der Chlorkalklösung in sterile Petrischalen gebracht, deren Boden mit gut genäster Watte und Filtrierpapier versehen war. Die Petrischalen enthielten pro Stück ungefähr 10—15 Samen und wurden für 4—5 Tage in einem Warmraum von 23° im Dunkeln gelassen. Jede Schale wird mit der Lupe genau kontrolliert, um eventuelle Infektionen auszuschalten. Nun werden gekeimte Wurzeln ausgewählt, die ungefähr gleich lang sind, damit der großen Variationsbreite im Längenwachstum der Wurzeln schon am Anfang

Rechnung getragen wird. Die etwa 10 mm langen Wurzelspitzen werden mit einem sterilen Skalpell geschnitten und mit einem Spatel in die Kulturgefäße gebracht. Die Technik bleibt also im Prinzip die von Gautheret [63] für die Wurzelkultur vorgeschlagene.

Als Kulturgefäße wurden Röhren aus Jenaerglas 18/300 mm verwendet, die an der Oeffnung aufgebogen sind und mit Hilfe von «Wäscheklammern» liegend aufgestellt werden. Die Röhren werden mit 10 cm³ Nährlösung versehen, mit einem Wappetropfen verschlossen und im Autoklav für 15 Minuten bei 115° sterilisiert. In jede Röhre wird mit dem Spatel eine Wurzelspitze steril eingeführt.

Der Vorteil dieser von Geiger in die Technik eingeführten Kulturröhren besteht darin, daß die Wurzel in die Länge wächst und ihr Wachstum periodisch gemessen werden kann, ohne daß die Wurzel aus dem Milieu herausgenommen werden muß. Das Längenwachstum wurde mit Hilfe eines Busch-Citophot auf folgende Art gemessen: Wir legen die Kulturröhre auf eine Platte und beleuchten seitlich von oben die Wurzel. Das durch ein Objektiv aufgefangene Bild wird durch ein Prisma auf einen seitlich angebrachten Spiegel geworfen, der das 3.75 mal vergrößerte Bild auf einen Zeichentisch projiziert. Auf dem Zapiert wird nun die hell erscheinende Wurzel abgezeichnet, das heißt, es wird mit einem Bleistiftstrich nur die Länge festgehalten. Später messen wir mit einem Kurvenmesser (ein sogenanntes Distanzmeßgerät für geographische Karten) die Länge des Bleistiftstriches und können so leicht die wirkliche Länge der Wurzeln errechnen. So können wir die gleiche Wurzel während ihres Wachstums beliebig oft messen und erhalten dadurch Zeitwachstumskurven.

Der Nachteil der Röhren liegt in der schlechten und ungleichen Belüftung. Deshalb ist die Wachstumsgeschwindigkeit auch kleiner gegenüber derjenigen in Erlenmeyer und Petrischalen.

Für jede Konzentration eines Versuches wurden 20 Wurzeln genommen, um einen möglichst guten Durchschnittswert zu erhalten. Denn erstens weisen die Wurzeln eine ziemlich große Variationsbreite im Längenwachstum und in der Zahl der Nebenwurzeln auf, dann gibt es ja immer noch Ausfälle durch Infektion und durch Wurzeln, die überhaupt nicht oder schon nach sehr kurzer Zeit ihr Wachstum einstellen und sich braun verfärben.

Als Nährlösung verwendeten wir für *Pisum sativum* das Milieu von Bonner und Devirian mit Aneurin:

Aqua dest.	1000,0 cm ³
Ca-nitrat	242 mg
Mg-sulfat	42 mg
K-nitrat	85 mg
K-chlorid	61 mg
K-monophosphat	20 mg
Ferritartrat	1,5 mg
Saccharose puriss.	40 g (4%)
Aneurin	100 γ

Für die Kultur von *Solanum lycopersicum* und *Foeniculum dulce* kam das Milieu von Robbins und Schmidt mit Aneurin und Pyridoxin zur Anwendung:

Aqua dest.	1000,0	cm ³
Ca-nitrat	333	mg
Mg-sulfat	63	mg
K-nitrat	63	mg
K-chlorid	42	mg
K-monophosphat	60	mg
Ferrisulfat	2,5	mg
Kupfersulfat	150	γ
Borax	60	γ
Ammoniummolybdat	40	γ
Zinksulfat	800	γ
Mangansulfat	100	γ
Saccharose puriss.	20	g
Aneurin	200	γ
Pyridoxin	200	γ

Als Saccharose verwendeten wir Saccharose reinst von Siegfried. Schöpfer untersuchte diese Saccharose 1949 und fand, daß sie keineswegs als reinst angesehen werden kann, sondern durch Vitamine verunreinigt ist. Neben anderen Vitaminen enthielt die Saccharose «Siegfried» pro Gramm Zucker 172 mγ p-Aminobenzoesäure und 8 mγ Biotin. Da in unseren Versuchen die Wurzeln mit Sulfonamiden gehemmt und mit PAB enthemmt werden sollten, ist das Vorhandensein von PAB im Zucker und folglich in der Nährlösung gar nicht erwünscht. Natürlich ist zu bedenken, daß dieser Zusatz von PAB gleichmäßig verteilt ist, das heißt Kontrolle wie die gehemmte oder enthemmte Serie enthalten dieses Vitamin. Es kann also in den Versuchsergebnissen höchstens quantitative Unterschiede ergeben.

Trotzdem wurde versucht, ob eine Saccharose mit wenig oder keiner Vitaminverunreinigung die Saccharose «Siegfried» ersetzen könne. Geprüft wurde eine Saccharose, die 6mal umkristallisiert war (Hoffmann-La Roche) und die pro Gramm Zucker noch 16,6 mγ PAB enthält und gar kein Biotin mehr. Im weiteren wurde Glucose (reinst) geprüft, die pro Gramm Zucker 14,6 mγ PAB und kein Biotin enthält. Dann wurde auch eine d-Fructose (Hoffmann-La Roche) als Zuckerquelle versucht, über deren Vitamingehalt nichts bekannt war, die aber sicher noch Spuren von Wirkstoffen enthält. Die Glucose wie die Fructose sind Monosaccharide, deshalb wurde von ihnen nur die Hälfte genommen, also nur 2 % statt 4 %, damit die molare Konzentration gleichbleibt. Die Versuche wurden mit *Pisum sativum* in Kulturröhren mit 10 cm³ Nährlösung durchgeführt, und zwar dauerte die Kultur der Wurzeln 26 Tage bei 23 ° in völliger Dunkelheit.

Die folgende Tabelle zeigt die zusammengestellten Ergebnisse:

Zucker	% Zucker in Nährl.	Gehalt an PAB/g Zucker	Gehalt an Biotin	Längenwachstum am 26. Tag in %	Zahl der Kulturen
Saccharose „Siegfried“	4	172 mγ	8 mγ	100	84
Saccharose umkristallisiert	4	16,1 mγ	—	23	51
Glucose	2	14,16 mγ	—	59	19
d-Fructose	2	unbek.	unbek.	102	11

Auffallend an diesen Ergebnissen ist der Stillstand des Wachstums bei der 6mal umkristallisierten Saccharose. Die Wurzeln sind verkümmert und bräunlich verfärbt. Mit Glucose wachsen die Wurzeln besser, erreichen aber bei weitem nicht die Länge der in Saccharose «Siegfried» gewachsenen und sind auch morphologisch anders geartet (sehr dünne und schwache Wurzeln). Die d-Fructose hingegen ermöglichte ein ganz normales Wachstum der Wurzeln, so daß man berechtigt ist, eine der Saccharose «Siegfried» ähnliche Vitaminverunreinigung anzunehmen.

Es stellte sich nun die Frage, ob der Unterschied im Wachstum zwischen der Saccharose «Siegfried» und der gereinigten Saccharose auf den Unterschied im Gehalt an PAB und Biotin zurückzuführen sei. Deshalb wurde zu der umkristallisierten Saccharose, wie auch zur Glucose eine entsprechende Menge PAB oder Biotin, oder beides zusammen hinzugefügt. Zu der Saccharose wurde pro Gramm Zucker 200 mγ PAB und 10 mγ Biotin hinzugegeben. Um bei der Glucose, die ja nur

Zucker	Zugesetzte Menge PAB/g Zucker	Zugesetzte Menge Biotin/g Zucker	Längenwachstum am 26. Tag in %
Saccharose umkristallisiert	—	—	23
Saccharose umkristallisiert	200 mγ	—	17
Saccharose umkristallisiert	—	10 mγ	29
Saccharose umkristallisiert	200 mγ	10 mγ	28
Glucose (reinst)	—	—	59
Glucose	400 mγ	20 mγ	71

2 %ig vorlag, pro Kulturröhre die gleiche Menge Vitamin zu haben, wurde die doppelte Menge genommen, nämlich 400 m γ PAB und 20 m γ Biotin pro Gramm Zucker.

Bei der umkristallisierten Saccharose bleibt trotz der Zugabe von p-Aminobenzoesäure der Wachstumsstillstand bestehen. Durch die Zugabe von Biotin wird das Wachstum nicht gefördert, und auch durch das Zusammenwirken beider Vitamine bleiben die Wurzeln im Wachstum stark zurück. Aehnlich ist das Ergebnis bei der Glucose. Hier wird durch die Zugabe von PAB und Biotin das Wachstum leicht gefördert, aber die Wurzeln bleiben doch noch gehemmt.

Damit zeigt sich, daß in der Saccharose «Siegfried» neben der p-Aminobenzoesäure und Biotin noch andere Faktoren, Wuchsstoffe wahrscheinlich hormonaler Natur vorhanden sind, die ein optimales Wachstum der Wurzeln ermöglichen. Deshalb wurde für alle Versuche die Saccharose «Siegfried» verwendet, auch wenn sie nicht als reinst anzusehen ist.

Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration

Zu den das Wachstum limitierenden Faktoren gehört nicht zuletzt auch die Wasserstoffionenkonzentration. Dies bewiesen eindeutig die Versuche von White [64] und Gautheret [65]. Da in unseren Versuchen zu der Nährlösung Substanzen zugefügt werden sollten, wie p-Aminobenzoesäure oder Purine, die also sauer oder alkalisch sind, so mußte geprüft werden, wie groß der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Wurzelkultur von *Pisum sativum* bei unseren Kulturbedingungen ist. Im weiteren war festzustellen, wie weit das pH der Nährlösung durch das Zusetzen der zu prüfenden Substanzen verändert wird.

Die Messung des pH erfolgte elektrometrisch, und zwar mit einem pH-Meßgerät «Tena» mit Chinhydrin-Calomel-Elektrode. Zum Eichen des Gerätes und als Standardlösung wurden Puffergemische nach Sorensen benutzt. Die Nährlösung nach Bonner, die selbst ein pH um 5 besitzt, wurde nun durch Zusatz von Salzsäure oder Natronlauge saurer oder alkalischer gemacht.

10 cm ³ Nährlösung + 1 cm ³ n/10 HCl	= pH 2,06
10 cm ³ Nährlösung + 1 cm ³ n/100 HCl	= pH 2,87
Nährlösung nach Bonner	= pH 5,03
10 cm ³ Nährlösung + 1 cm ³ n/100 NaOH	= pH 6,33
10 cm ³ Nährlösung + 1 cm ³ n/10 NaOH	= pH 8

Die Nährlösungen mit dem pH 2,06, 2,87, 3,75, 5,03, 6,33, 8 wurden in die Röhren abgefüllt und während 15 Minuten bei 115 ° im Autoklav sterilisiert und dann das pH erneut bestimmt.

pH vor dem Sterilisieren	2,06	pH der sterilen Lösung =	2,06
» » » »	2,87	» » » »	= 2,85
» » » »	3,75	» » » »	= 3,78
» » » »	5,03	» » » »	= 5,02
» » » »	6,35	» » » »	= 6,30
» » » »	8	» » » »	= 8

Das pH der Nährlösungen wird also durch das Sterilisieren nicht verändert.

Die folgende erste graphische Darstellung (Fig. 1) zeigt das Längenwachstum der Wurzeln in Abhängigkeit von der Wasserstoffionenkonzentration und der Zeit, während die zweite Darstellung (Fig. 2) den Einfluß des pH auf das Längenwachstum und Trockengewicht der Wurzeln am 26. Tag zeigt.

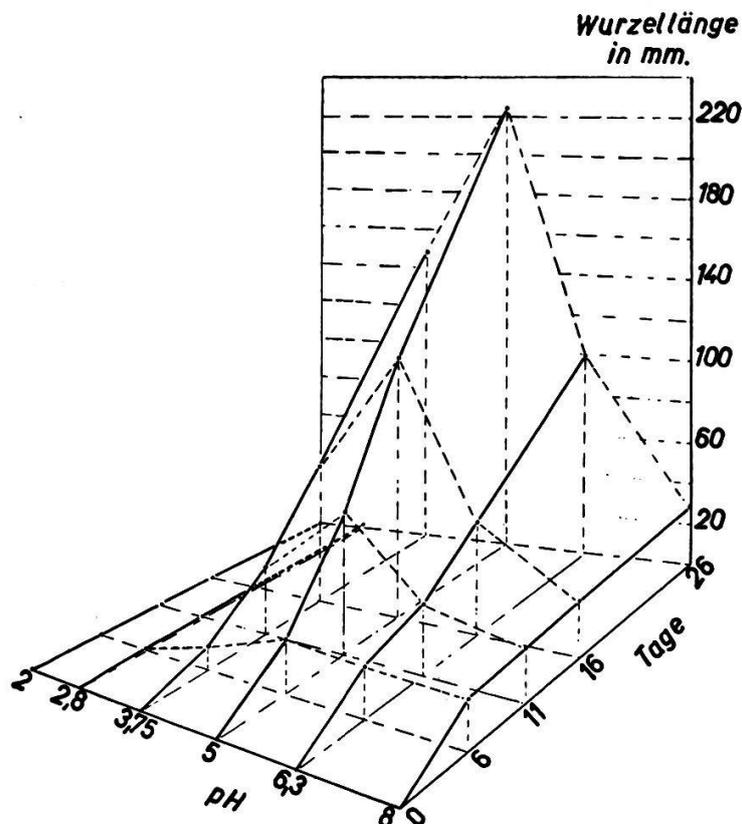


Fig. 1

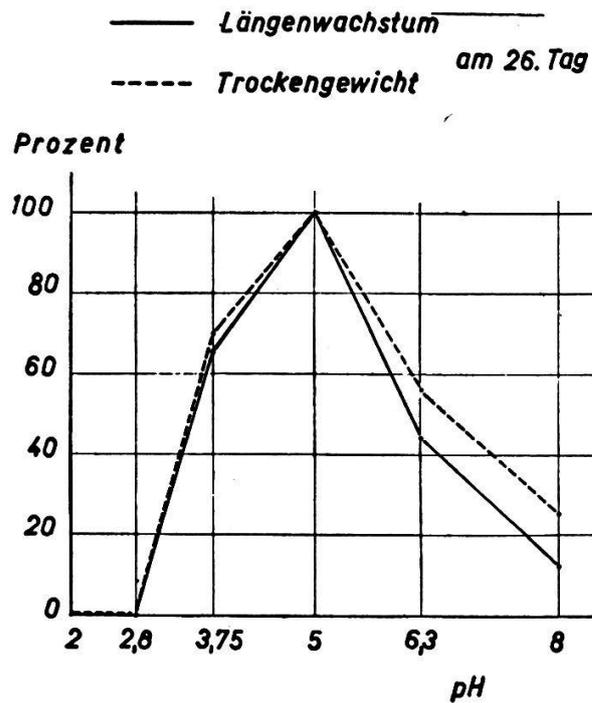


Fig. 2

Die Zusammenstellung der Versuchsergebnisse findet sich in der folgenden Tabelle:

pH	Zahl der Kulturen	Längenwachstum am 26. Tag in mm	Prozent	Trockengewicht in mg	Prozent
2,0	23	0	0	0	0
2,8	23	2	0	0	0
3,75	21	147,8	65,8	9,66	70
5,0	19	224,6	100	13,8	100
6,3	17	99,3	44,2	7,76	56,2
8	18	28,8	12,8	3,55	25,7

Das Wachstum der Pisumwurzeln in steriler Organkultur ist somit stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Das Optimum liegt bei pH 5 (Grundmilieu von B o n n e r) und das Verschieben um 1 pH nach dem sauren oder alkalischen Gebiet vermindert das optimale Wachstum um 30—40 %. Bei pH 2 und 2,8 wachsen die Wurzeln überhaupt nicht mehr und werden sofort bräunlich verfärbt.

Die Nährlösungen wurden nach 26tägiger Kulturdauer noch einmal auf ihr pH geprüft.

pH der Nährlösung am 1. Kulturtag	am 26. Tag	Differenz
2,0	2,23	+ 0,23
2,8	3,0	+ 0,20
3,75	5,05	+ 1,30
5,02	5,07	+ 0,07
6,3	4,7	— 1,60
8	7,4	—0,60

Es zeigt sich, daß die Wurzeln die Tendenz haben, das pH ihres Milieus näher an das pH des Optimalmilieus zu bringen. Liegt das pH der Nährlösung in saurem Bereich, so reagiert die Wurzel mit der Abgabe von Alkali um die Wasserstoffionenkonzentration herabzusetzen, auf der andern Seite wird im neutralen bis schwach alkalischen Milieu von der Wurzel Säure freigesetzt.

Um festzustellen wie weit nun das pH der Nährlösung durch den Zusatz von Sulfonamiden und anderen Substanzen beeinflußt wird, wurde das pH der verschiedenen Nährlösungen nach dem Sterilisieren gemessen. Es ergab sich, daß durch die Zugabe der sehr geringen Substanzmengen zu der Nährlösung das pH der letzteren nicht wesentlich verändert wird. So wurde zum Beispiel das pH der Nährlösung nach **B o n n e r** durch Zugabe von Sulfanilamidothiazol in einer Konzentration von 10^{-5} molar von 5,02 auf ein pH von 5,17 verschoben.

Somit hat also in unseren Versuchen die Wasserstoffionenkonzentration keinen Einfluß auf die Versuchsergebnisse.

VORVERSUCHE ÜBER DIE WIRKUNG EINES SULFONAMIDS AUF DIE STERILE WURZELKULTUR DREIER DIKOTYLEDONEN

Solanum Lycopersicum

Nach 6 Tagen wurden die bei 23 ° im Dunkeln gekeimten Wurzelspitzen von *Solanum lycopersicum* geschnitten. Je eine Wurzelspitze wurde in einer flachen Roux-Schale in 35 cm³ Nährlösung nach **R o b b i n s** mit Aneurin und Pyridoxin bei 23 ° im Dunkeln gezüchtet.

Zu einem Teil der Kulturen wurde Sulfanilamidothiazol (Cibazol) hinzugefügt, und zwar in jede Schale 0,5 cm³ einer sterilen 1 : 50 molaren Lösung, was eine molare Cibazolkonzentration von 1 : 3500 ergibt. Die Messung des Längenwachstums erfolgte hier auf photographischem Wege.

Die Durchschnittswerte des Versuches sind:

	Längenwachstum in mm				
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5. Tag	7. Tag
Kontrolle	9,3	20,5	29,8	64,6	93,3
Mit Cibazol 1 : 3500 molar	6,1	9,2	9,4	9,4	8,9

	Zahl der Nebenwurzeln pro Wurzel				
	1. Tag	2. Tag	3. Tag	5. Tag	7. Tag
Kontrolle	0,33	1,17	2,0	6,0	19,0
Mit Cibazol 1 : 3500 molar	0,25	0,62	0,87	1,0	1,0

Das Längenwachstum der Wurzeln von *Solanum lycopersicum* wurde durch Cibazol schon am 2. Tag ihrer Kultur vollständig gehemmt, während die Bildung von Nebenwurzeln, die zahlenmäßig sehr stark reduziert war, weiter dauerte und erst am 5. Tag zum Stillstand kam. Die gehemmten Wurzeln waren dicker und bräunlich verfärbt.

Foeniculum dulce

Nach 4 Tagen Keimung wurden die geschnittenen Wurzelspitzen in Erlenmeyer geimpft, die 40 cm³ Nährlösung nach Robbins (mit Aneurin und Pyridoxin) enthielten. Die Wurzeln wurden während 39 Tagen bei 23° im Dunkeln gezüchtet. Ein Teil der Kulturen wurde mit Sulfanilamidothiazol vergiftet, und zwar in einer molaren Konzentration von 1 : 20 000.

In der folgenden Tabelle sind die Durchschnittswerte angegeben:

	Länge der Hauptwurzel	Trockengewicht	Trockengewicht pro mm Wurzel	Zahl der Nebenwurzeln	Länge der Nebenwurzeln
Kontrolle	78,5 mm	1,25 mg	15,4 γ	1,2	28,8 mm
Mit Cibazol 1 : 20 000	34 mm	0,8 mg	23,4 γ	2,8	2 mm

Das Längenwachstum der Wurzeln von *Foeniculum dulce* wird durch Sulfanilamidothiazol um 57 % gehemmt, während das Trockengewicht nur um 36 % gehemmt wird. Die gehemmte Wurzel ist also im Verhältnis zur Kontrolle dicker und schwerer. Die Zahl der Nebenwurzeln ist unter der Einwirkung von Cibazol um mehr als das Doppelte gesteigert, aber ihre Länge bleibt im Gegensatz zur Kontrolle außerordentlich klein.

Pisum sativum

Nach 5 Tagen Keimung wurden die Wurzelspitzen geschnitten und in Kulturröhren mit 10 cm³ Nährlösung nach B o n n e r (mit Aeurin) bei 23 ° im Dunkeln wachsen gelassen. 20 Wurzeln dienten als Kontrolle, während in 20 anderen Röhren 0,5 cm³ einer sterilen Cibazolösung hinzugefügt wurde, so daß eine Konzentration von 1 : 60 000 molar erzielt wurde. Die Kultur dauerte 25 Tage.

In der folgenden Tabelle sind die Durchschnittswerte vom 25. Kulturtag zusammengestellt:

	Längenwachstum in %	Trockengewicht in %	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	100	100	4,8
Mit Cibazol 1 : 60 000	20,9	33,5	0,9

Die graphische Darstellung (Fig. 3) zeigt den Grad der Hemmung als Funktion der Zeit.

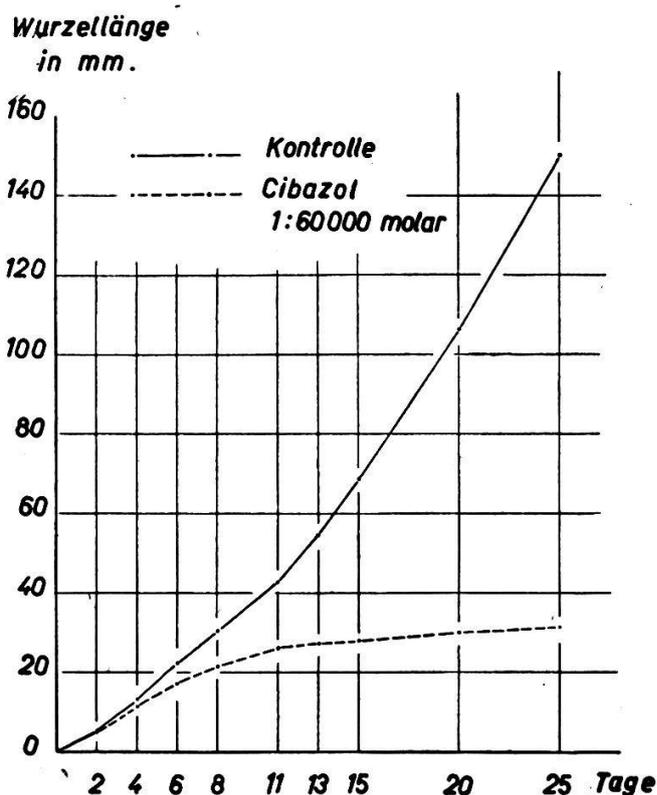


Fig. 3

Das Längenwachstum der Wurzeln von *Pisum sativum* wurde durch Cibazol stark gehemmt, und zwar nimmt vom 11. Tag der Kultur an der Längenwuchs beträchtlich ab. Die Hemmung beträgt für das Längenwachstum 79 %, für das Trockengewicht 66,5 % und für die Zahl der Nebenwurzeln 81 %. Die gehemmten Wurzeln waren deformiert und bräunlich verfärbt.

WIRKUNG VERSCHIEDENER SULFONAMIDE

Nachdem Domagk [21] 1935 das Prontosil (Sulfonamidochrysoidin), das 1932 von Klarer und Mietzsch entdeckt worden war, zu klinischen Versuchen eingeführt hatte, und nachdem im gleichen Jahr von Trefouel, Mme Trefouel, Nitti und Boveri [22] gezeigt wurde, daß die p-Aminobenzolsulfosäure der wirksame Bestandteil und in vitro und in vivo aktiv war, setzte eine gewaltige Herstellung ähnlicher Substanzen ein. Auf der einen Seite sollte die Wirksamkeit gegenüber pathogenen Bakterien erhöht werden, andererseits

sollte das Sulfonamid für den erkrankten höheren Organismus möglichst unschädlich sein und keine Nebenwirkung haben.

Die unterschiedliche Fähigkeit der verschiedenen Sulfonamide, die p-Aminobenzoessäure zu verdrängen, liegt nach Bell und Roblin in der Uebereinstimmung des Sulfonamids in der molekularen Struktur und in der Verteilung der elektrischen Ladungen mit dem p-Aminobenzoessäure-ion. Fox und Rose [66] zeigten, daß die Aktivität verschiedener Sulfonamide mit ihrem Grad der Ionisation zusammenhängt. Ein zusammenfassender Bericht über die physikalisch-chemischen Aspekte der Sulfonamidaktivität erschien von Roblin [67].

Eigene Versuche über die Aktivität verschiedener Sulfonamide

In mehreren Versuchen prüften wir die hemmende Wirkung verschiedener Sulfonamide auf das Wachstum von *Pisum sativum* in steriler Organkultur. Alle verwendeten Sulfonamide wurden in einer molaren Konzentration von 1 : 100 000 geprüft. Die Sulfonamidausgangslösung (für sich im Autoklav während 15 Minuten bei 115° sterilisiert) wurde so konzentriert gewählt, daß durch steriles Hinzugeben von 0,5 cm³ in jede Röhre die erwünschte molare Konzentration erhalten wurde. Die Kulturröhren enthielten 10 cm³ Nährlösung nach Bonner mit Zusatz von Aneurin. Die Kulturen wuchsen bei 23° in völliger Dunkelheit während 26 Tagen.

Es wurden folgende Sulfonamide geprüft:

- 4-Aminophenylsulfonamid, Sulfanilamid Mol. Gew. 172
- Acetylsulfanilamid, Albucid Mol. Gew. 214
- Dimethylacroyl-sulfanilamid-Na, Irgamid Mol. Gew. 277
- Dimethylbenzoyl-sulfanilamid, Irgafen Mol. Gew. 327
- Sulfanilamidothiazol, Cibazol Mol. Gew. 255
- N-dimethylbenzolsulfonsäureamid-4-sulfanilamid, Uliron Mol. Gew. 355
- Diamino--diphenylsulfon Mol. Gew. 248
- 6-Sulfanilamido-2,4-dimethylpyrimidin, Elkosin Mol. Gew. 278
- Sulfanilylguanidin, Guanicil Mol. Gew. 214
- 2-Sulfanilamidopyridin-Ca, Dagenan-Ca Mol. Gew. 270
- Bernsteinsäure-halbamid-sulfanilamidothiazol Mol. Gew. 354
- p-Thio-ureido-benzensulfamidothiazol Mol. Gew. 314
- p-Aminophenylsulfamido-methyl-thiodiazol Mol. Gew. 270

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Sulfonamid	Zahl der Kulturen	% Hemmung Längenwachstum	Aktivität Cibazol = 1	% Hemmung Trockengewicht	% Hemmung Nebenwurzelzahl
Sulfanilamid	26	7	0,09	- 12	14
Albucid	30	80	1,05	56	82
Irgamid	24	82	1,08	60	77
Irgafen	66	82	1,08	65	41
Cibazol	152	76	1,00	49	46
Uliron	23	10	0,13	- 5	- 14
Diaminodiphenylsulfon	23	35	0,45	25	- 17
Elkosin	23	51	0,67	25	- 3
Guanicil	23	36	0,47	30	37
Dagenan	24	32	0,41	37	25
Bernsteinsäurehalb- amidsulfanilamid	26	- 4	—	17	- 35
p-Thioureidobenzen- sulfamidothiazol	22	34	0,44	28	- 3
p-Aminophenylsulfa- midomethylthiadiazol	25	83	1,09	59	25

Die Ergebnisse zeigen, daß p-Aminophenyl-sulfamido-methyl-thio-diazol, Irgamid, Irgafen und Albucid die stärkste Wirkung besitzen, etwas weniger aktiv ist Cibazol. Der Grad der Hemmung des Längenwachstums stimmt mit demjenigen des Trockengewichtes überein, während die Hemmung der Nebenwurzelzahl einige Differenzen aufweist.

Elkosin, Guanicil, Diaminodiphenylsulfon und p-Thio-ureido-benzen-sulfamidothiazol sind ungefähr halb so wirksam wie Sulfanilamido-thiazol. Die Hemmung des Längenwachstums entspricht auch hier wieder derjenigen des Trockengewichtes. Die Zahl der Nebenwurzeln ist hingegen nicht immer in Übereinstimmung mit den Werten über Längenwachstum und Trockengewicht; so hemmt Guanicil die Zahl der Nebenwurzeln, während die sonst gleich aktiven Elkosin und Diaminodiphenylsulfon keinen Einfluß auf die Nebenwurzeln zeigen.

Sulfanilamid, Uliron und Bernsteinsäure-halbamid-sulfanilamidothiazol sind in dieser Konzentration (10^{-5} molar) inaktiv.

Hiermit zeigt sich, daß die Aktivität der verschiedenen Sulfonamide bei der höheren Pflanze (Wurzel) mit der bei den Mikroorganismen gefundenen weitgehend übereinstimmt.

KONZENTRATIONSVERSUCH ZWEIER SULFONAMIDE

Der Versuch wurde mit Wurzeln von *Pisum sativum* ausgeführt, in Kulturröhren mit 10 cm³ Nährlösung nach B o n n e r mit Aneurin. Es sollte untersucht werden, ob die Hemmung des Wachstums proportional der Sulfonamidkonzentration ist, und ob die Sulfonamide in sehr schwacher Konzentration eine fördernde Wirkung auf das Wurzelwachstum ausüben, also eine ähnliche Reaktion auslösen wie Heteroauxin, das je nach der Konzentration wachstumsfördernd oder -hemmend wirkt.

Sulfanilamidothiazol

Es wurden folgende Konzentrationen von Sulfanilamidothiazol geprüft: 1 : 50 000, 1 : 100 000, 1 : 150 000, 1 : 200 000 molar.

Die verschiedenen Konzentrationen wurden für sich sterilisiert. Für jede Konzentration wurden 20 Wurzeln angesetzt.

Die Tabelle zeigt das Längenwachstum der Pisumwurzeln am 25. Tag:

	Kontrolle	Cibazol 1 : 50 000	Cibazol 1 : 100 000	Cibazol 1 : 150 000	Cibazol 1 : 200 000
Längenwachstum in mm ..	135,3	31,3	38,5	50,5	61,9

Durchschnittliche Zahl der Nebenwurzeln pro Wurzel:

	Zeit der Kultur				
	9. Tag	13. Tag	16. Tag	20. Tag	25. Tag
Kontrolle	0,1	0,33	0,44	0,66	2,44
Cibazol 1 : 150 000	—	0,25	0,5	0,5	0,87
Cibazol 1 : 200 000	—	0,16	0,33	0,5	1,0

Die graphische Darstellung (Fig. 4) zeigt das Längenwachstum und das Trockengewicht der Pisumwurzeln am 25. Tag ihrer Kultur in Prozenten.

Das Wachstum der Pisumwurzeln wird durch Sulfanilamidothiazol gehemmt, und zwar ist die Hemmung proportional der Konzentration.

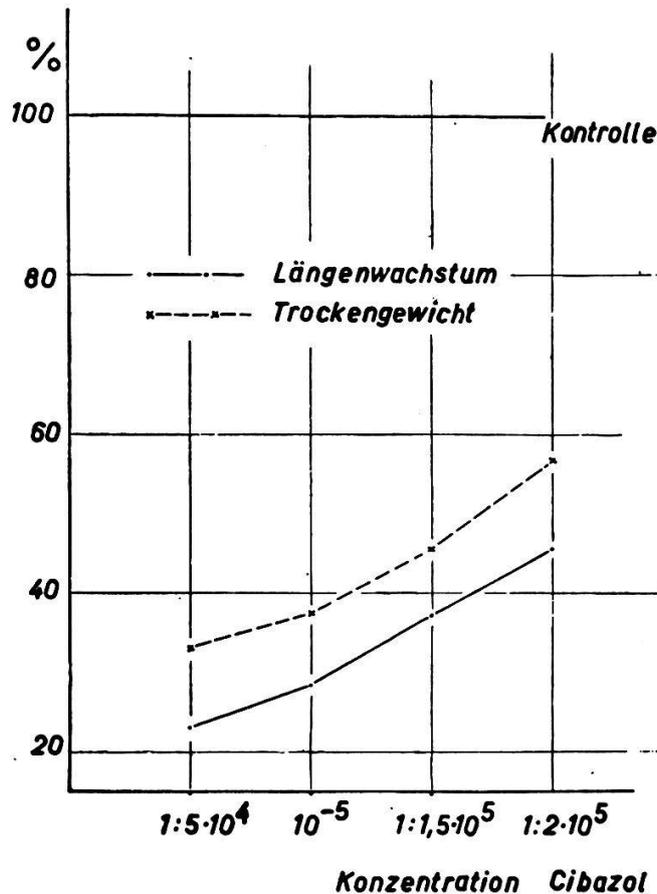


Fig. 4

Dimethylbenzoyl-sulfanilamid (Irgafen)

Folgende Konzentrationen von Irgafen wurden geprüft: $1 : 4 \cdot 10^5$, $1 : 8 \cdot 10^5$, $1 : 1,6 \cdot 10^6$, $1 : 3,2 \cdot 10^6$, $1 : 6,4 \cdot 10^6$ molar.

Die Abbildung stellt die Versuchsergebnisse in bezug auf Längenwachstum, Trockengewicht und Zahl der Nebenwurzeln am 26. Tag der Kultur graphisch dar (Fig. 5).

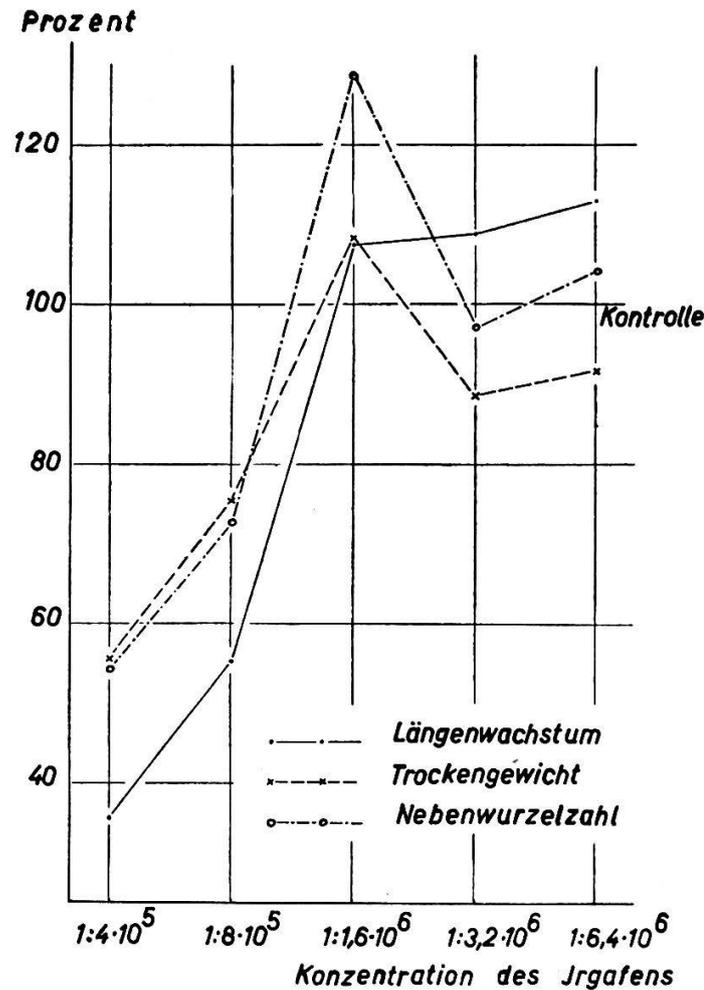


Fig. 5

Der Versuch zeigt, daß die beiden Irgafenkonzentrationen $1 : 4 \cdot 10^5$ und $1 : 8 \cdot 10^5$ mol die Wurzel von *Pisum sativum* in ihrer Entwicklung hemmen, und zwar wird das Längenwachstum im Vergleich zur Hemmung des Trockengewichtes und der Nebenwurzelzahl stärker gehemmt. Die toxische Wirkung des Irgafens ist erheblich, entspricht doch die Konzentration von $1 : 8 \cdot 10^5$ mol einer Menge von $0,4 \gamma$ Irgafen pro cm^3 . Die schwächeren Irgafenkonzentrationen ($1 : 1,6 \cdot 10^6$, $1 : 3,2 \cdot 10^6$ und $1 : 6,4 \cdot 10^6$ mol) sind vollständig wirkungslos und besitzen auch keine fördernde Wirkung auf das Wachstum der Pisumwurzeln. Höchstens kann eine minime Förderung der Nebenwurzelzahl bei der Konzentration $1 : 1,6 \cdot 10^6$ mol in Erwägung gezogen werden.

Durch die Tatsache, daß ein Sulfonamid nur einseitig wirkt, das heißt das Längenwachstum der Wurzeln nur hemmt, unterscheiden sich die Sulfonamide unter anderem typisch von einem Phytohormon wie Heteroauxin.

KURZE EINLEITUNG
ÜBER DIE BEZIEHUNG ZWISCHEN SULFONAMID UND
P-AMINO BENZOESÄURE

Bevor wir die verschiedenen Antisulfonamide im einzelnen besprechen, sei hier kurz das Vitamin-Antivitaminproblem unter Berücksichtigung der chemischen Konstitution gestreift.

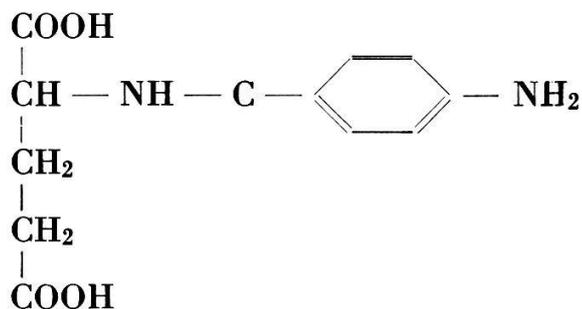
Noch einmal sei daran erinnert, daß man zuerst das Antivitamin kannte, das heißt auf synthetischem Wege hergestellt hatte. Die wirksame Grundsubstanz, von der sich alle Sulfonamide ableiten, war p-Aminobenzolsulfosäure:



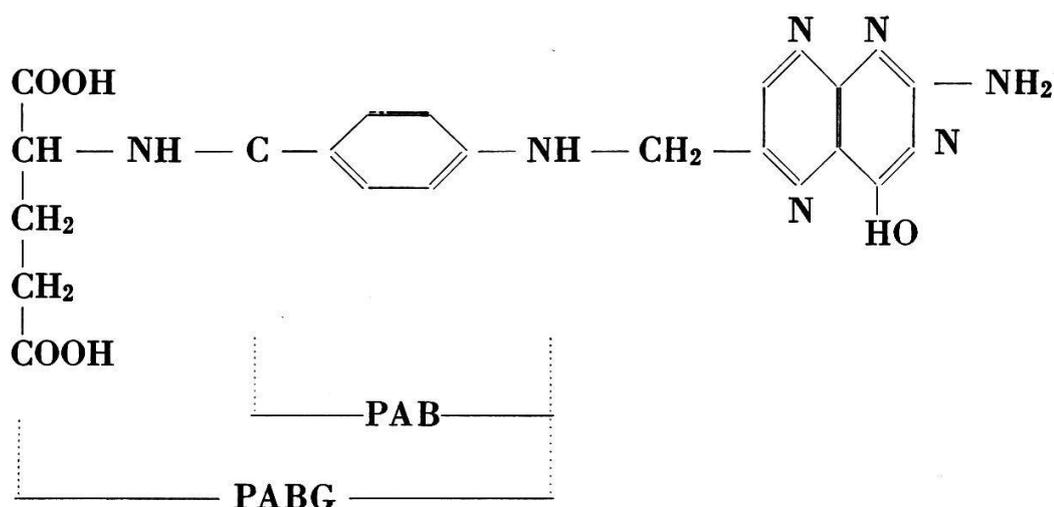
Erst nachträglich, durch die Fähigkeit, die Wirkung dieses Chemotherapeutikums aufzuheben, wurde von Woods die p-Aminobenzoesäure entdeckt, und es zeigte sich die große Uebereinstimmung in der chemischen Konstitution der beiden Substanzen, was zu der Verdrängungshypothese führte.



Auch das später gefundene Antisulfonamid p-Aminobenzoylglutaminsäure:



erweist sich als ein höherer Vitaminkomplex mit PAB als Grundkörper. Schließlich haben die Forschungen und Ergebnisse über die Folsäure dieses Vitamin-Antivitingebiet auf das schönste ergänzt. Die synthetische Folsäure, die Pteroylglutaminsäure hat folgende Konstitution:



Im Molekül der Pteroylglutaminsäure ist also die p-Aminobenzoylglutaminsäure (PABG) mit einer Pterinkomponente, die strukturell dem Xanthopterin sehr ähnlich ist, verknüpft.

DIE P-AMINOBEZOE SäURE ALS ANTAGONIST DER SULFONAMIDE

Die p-Aminobenzoensäure als Vitamin

Die PAB ist ein Endovitamin, das für die lebende Materie unentbehrlich ist. Viele Organismen haben den Wirkstoff im Milieu nicht nötig, führen aber die Synthese durch. So wurde von Woods [30] der Nachweis erbracht, daß die PAB der wirksame Antagonist der Sulfonamide in der Hefe ist. Dann isolierten Kuhn und Schwarz [32], später Ratner [68], sowie Blanchard [69] die PAB aus der Hefe, während Lampen und Jones [70] die PAB in der Nährlösung der Hefe nachweisen konnten, der Wirkstoff also von der Hefe ausgeschieden wird.

Gewisse Mikroorganismen haben die Fähigkeit zur Synthese verloren und benötigen nun PAB als Wachstumsfaktor. Es sind dies zum Beispiel *Clostridium acetobutylicum* (Rubbo und Gillespie [35]), *Lactobacillus plantarum* (Kuhn und Schwarz [71]), *Acetobacter suboxydans* (Lampen, Underkofler und Peterson [72]), *Corynebacterium diphtheriae gravis* (Chattaway und Mitarb. [73]), dann auch die durch Bestrahlung erzielten Mutanten von *Neurospora crassa* (Tatum und Beadle [74] und *Escherichia coli* (Lampen, Roepke und Jones [75]).

Es wurde erkannt, daß ein Vitamin in höheren Konzentrationen eine hemmende Wirkung haben kann, so wird zum Beispiel nach Schopfer [76, 77] *Rhizopus oryzae* und *Rhizopus suinus* durch größere Mengen von Aneurin gehemmt, wie auch nach West und Wilson [78] *Rhizobium trifolium* durch hohe Dosen von Aneurin oder Riboflavin gehemmt wird. Ein solches Ergebnis wurde auch bei der PAB gefunden (Sevag [79]). Neu ist vielleicht die Erscheinung, daß auch kleine Mengen von PAB hemmend wirken, wie dies Anigstein und Bader [80], beim Erreger des Meerschweinchenfleckfiebers feststellten. Gleiche Ergebnisse stammen von Rose [81], Hamilton [82], sowie Snyder und Zarafonitis [83] beim Rockey-Mountain-Fleckfieber. Yeomans und Mitarb. [84] und Greiff [85] fanden die PAB als Hemmstoff der Typhusbacillen, und ein ähnliches Ergebnis stammt von Di Fonzo [86] bei Tuberkelbacillen. Die Tatsache aber, daß Landy und Mitarb. [87], sowie Bird [88] im Stoffwechsel der Tuberkelbacillen die PAB fanden, lassen vermuten, daß wahrscheinlich alle diese Erscheinungen auf eine Konzentrationswirkung zurückzuführen sind.

Auch bei höheren Pflanzen wirken stärkere Konzentrationen von PAB hemmend, wie dies Mangenot und Carpentier [45] zeigten. Die PAB erzeugt in einer Konzentration von 1 : 1000 mol bei *Pisum sativum* und *Lupinus albus* eine deutliche Hemmung der Hauptwurzel und eine Stimulation der Nebenwurzeln. Aehnlich sind die Ergebnisse von Macht [49] über die Wirkung der PAB auf das Wurzelwachstum von *Lupinus albus* Keimlingen. Schwache Lösungen förderten, stärkere hemmten das Wachstum.

Einfluß verschiedener PAB-Konzentrationen auf die Wurzelkultur von Pisum sativum

Es wurden folgende Konzentrationen von p-Aminobenzoensäure geprüft: 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , $1 : 2 \cdot 10^7$ mol. Die Kultur der Wurzeln erfolgte in Röhren in 10 cm³ Nährlösung nach Bonner mit Aneurin.

Die folgende graphische Darstellung (Fig. 6) zeigt die Wirkung der PAB auf Längenwachstum, Trockengewicht und Zahl der Nebenwurzeln.

Das Längenwachstum der Pisumwurzeln wird durch die PAB in unseren Versuchen weder gehemmt noch gefördert. Sowohl die leichte Hemmung von 16 %, wie die Förderung von 11 % müssen als Variationsdifferenz angesehen werden.

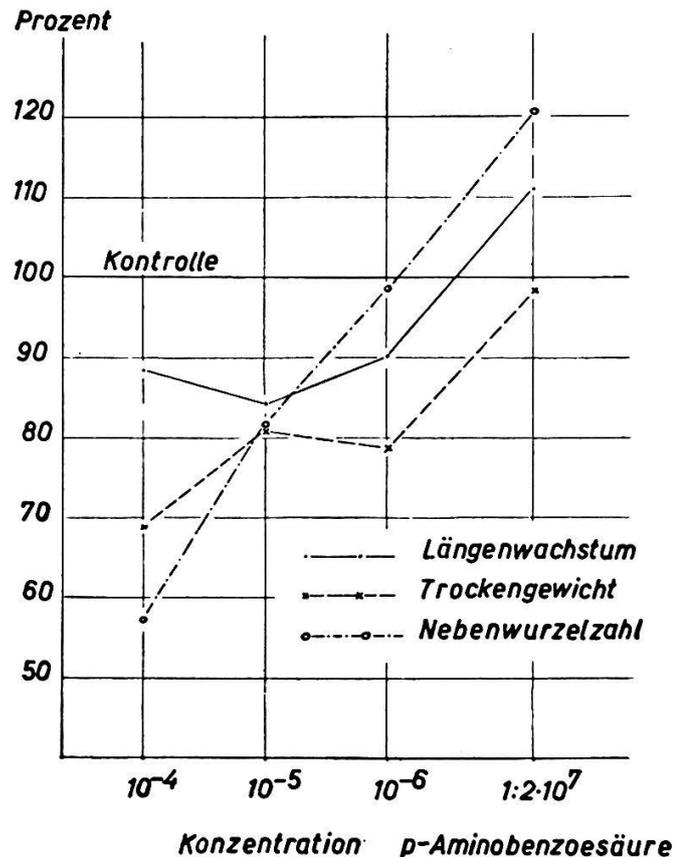


Fig. 6

Im Trockengewicht ergibt sich mit der stärksten Konzentration von PAB (10^{-4}) eine Hemmung von 32 %, während die Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-6} eine fragliche Hemmung ausüben.

Die Zahl der Nebenwurzeln wird durch die PAB-Konzentration 10^{-4} um 43 % gehemmt, während die Konzentrationen 10^{-5} und 10^{-6} unwirksam bleiben und die Konzentration $1:2 \cdot 10^7$ eine leichte Förderung ergibt.

Die PAB als Antagonist der Sulfonamide

Die Fähigkeit der PAB, die Hemmung der Sulfonamide aufzuheben, besteht für alle Sulfonamide mit Ausnahme einer Serie von Sulfanyl-aniliden und Benzensulfoaniliden, die von Goetchius und Lawrence [89] untersucht wurden. Dann kann auch das Sulfonamid «Marfanil» nach Jensen und Schmith [90] nicht durch PAB enthemmt werden. Es wird eben bei diesen Substanzen ein anderer Wirkungsmechanismus vorliegen (Schreus [91]), (Evans, Fuller und Walker [92]), (Lawrence [93]).

Die PAB ist für alle Mikroorganismen, die durch Sulfonamide gehemmt werden, wirksam, mit Ausnahme von *Bact. tularensis* (Tamura [94]).

Bei den höheren Pflanzen zeigten Mangenot und Carpentier [45] die antagonistische Wirkung der PAB bei *Pisum sativum*. Bonner [51] zeigte die Enthemmung der Sulfonamidwirkung durch PAB bei isolierten Tomatenwurzeln, und zwar genügte eine 10- bis 30mal kleinere PAB-Menge als die Sulfonamidkonzentration. Ein weiterer Beitrag stammt von Hazard [48] bei der Keimung von Leinsamen, sowie von Stoll [47] bei *Allium cepa*. Die Ergebnisse von Schopper [50] zeigten, daß die PAB die hemmende Wirkung der Sulfonamide auf die Pisumwurzel aufhebt und zudem die Zahl der Nebenwurzeln steigert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht der Bericht von Macht [49], wonach die PAB bei *Lupinus albus* die Sulfonamidwirkung verstärkt, also synergistisch wirkt.

Unsere Versuche wurden mit Wurzeln von *Pisum sativum* ausgeführt, und zwar wurde die Wirkung der PAB gegenüber Sulfanilamidothiazol (Cibazol) und Dimethyl-benzoyl-sulfanilamid (Irgafen) geprüft.

Enthemmung des Cibazols durch PAB

Die Kultur der Pisumwurzeln erfolgte in Röhren nach der bisherigen Technik. Die untersuchten Konzentrationen wurden für sich während 15 Minuten bei 115° sterilisiert. Die Wurzeln wurden durch eine Cibazolkonzentration von $1 : 1,5 \cdot 10^5$ mol gehemmt. Es wurden folgende Konzentrationen der PAB verwendet: $1 : 2,4 \cdot 10^6$, $1 : 4,8 \cdot 10^6$, $1 : 9,6 \cdot 10^6$ mol.

Die folgende Tabelle zeigt das Längenwachstum, das Trockengewicht der Wurzeln inklusive Nebenwurzeln, sowie die durchschnittliche Zahl der Nebenwurzeln am 26. Tag in Prozenten:

	Kontrolle	Cibazol $1 : 1,5 \cdot 10^5$	Cibazol + PAB $1 : 2,4 \cdot 10^6$	Cibazol + PAB $1 : 4,8 \cdot 10^6$	Cibazol + PAB $1 : 9,6 \cdot 10^6$
Längenwachstum am 16. Tag	100	52,6	92,4	56,1	60,2
Längenwachstum am 26. Tag	100	34,7	55,6	36,2	36,8
Trockengewicht	100	45,4	79,2	62,7	53,3
Zahl der Nebenwurzeln	100	28,7	123,7	38,7	30,0

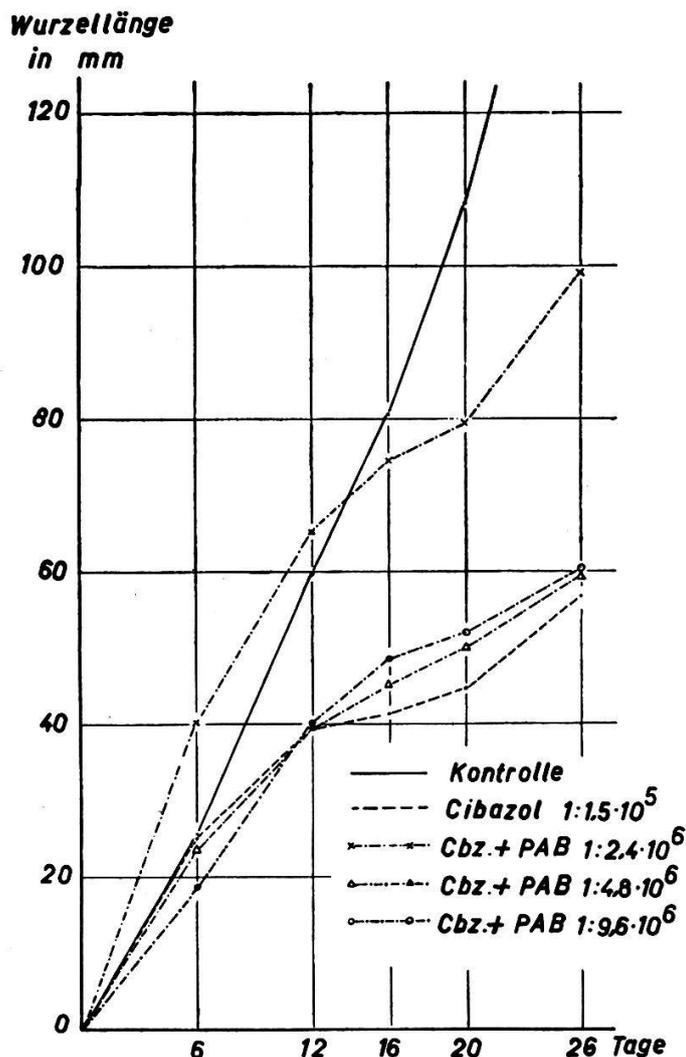


Fig. 7

Die graphische Darstellung (Fig. 7) zeigt die Hemmung und Ent-
hemmung des Längenwachstums als Funktion der Zeit.

Die Ergebnisse zeigen, daß nur die PAB-Konzentration $1 : 2,4 \cdot 10^6$ mol wirksam ist und die Hemmung des Wachstums durch Sulfanilamidothiazol aufzuheben vermag. Wie aus der graphischen Darstellung zu ersehen ist, ist die Entthemmung des Längenwachstums nur bis zum 16. Tag vollständig, dann bleibt das Längenwachstum dieser Wurzel gegenüber der Kontrolle beträchtlich zurück. Es macht ganz den Anschein, als ob die Wurzeln durch die Einwirkung des Sulfonamids in ihrem Stoffwechsel so gestört sind, daß dieser Schaden auch durch das Hinzufügen von PAB nicht mehr ganz aufgehoben wird. Natürlich kann auch die Konzentration zu gering sein, ist sie doch 16mal schwächer als diejenige des Cibazols. Bei Mikroorganismen ist das Verhältnis

Sulfonamid - PAB bedeutend größer, aber die höhere Pflanze scheint in dieser Beziehung nicht gleich zu reagieren. Die Hemmung der Nebenwurzelzahl wird durch die PAB nicht nur vollständig aufgehoben, sondern leicht gefördert.

Enthemmung des Irgafens durch PAB

Pisumwurzeln wurden durch eine Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ mol gehemmt, was einer Irgafenmenge von $0,545 \gamma$ pro cm^3 entspricht. Die PAB-Konzentrationen waren folgende: $1 : 6 \cdot 10^3$, $1 : 6 \cdot 10^5$, $1 : 6 \cdot 10^6$, $1 : 6 \cdot 10^7$ und $1 : 6 \cdot 10^8$ mol.

Die folgende Tabelle zeigt die Durchschnittswerte in Prozenten vom Längenwachstum, dem Trockengewicht und der Nebenwurzelzahl am 26. Tag der Kultur:

	Zahl der Kulturen	Längenwachstum	Trockengewicht	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	50	100	100	100
Irgafen $1 : 6 \cdot 10^5$	50	42,1	58	96,3
Irgafen + PAB $1 : 6 \cdot 10^3$	18	43,3	49,3	13
Irgafen + PAB $1 : 6 \cdot 10^5$	47	98,6	94,9	98,1
Irgafen + PAB $1 : 6 \cdot 10^6$	11	70,5	91,3	140,7
Irgafen + PAB $1 : 6 \cdot 10^7$	21	69,2	75,4	175,9
Irgafen + PAB $1 : 6 \cdot 10^8$	20	52,6	65,2	122,2

Die Abbildung bringt die 3 Größen: Konzentration, Zeit und Längenwachstum zur graphischen Darstellung (Fig. 8).

Besprechung der Ergebnisse

Bei der PAB-Konzentration $1 : 6000$ mol bleibt die Hemmung des Längenwachstums der durch Irgafen behandelten Wurzeln unverändert, während wir im Trockengewicht eine zusätzliche Hemmung haben. Ganz auffällig ist diese verstärkte Hemmung in der Zahl der Nebenwurzeln. Bei gleicher molarer Konzentration von Irgafen und PAB ist die Enthemmung praktisch 100 %ig und die enthemmten Wurzeln

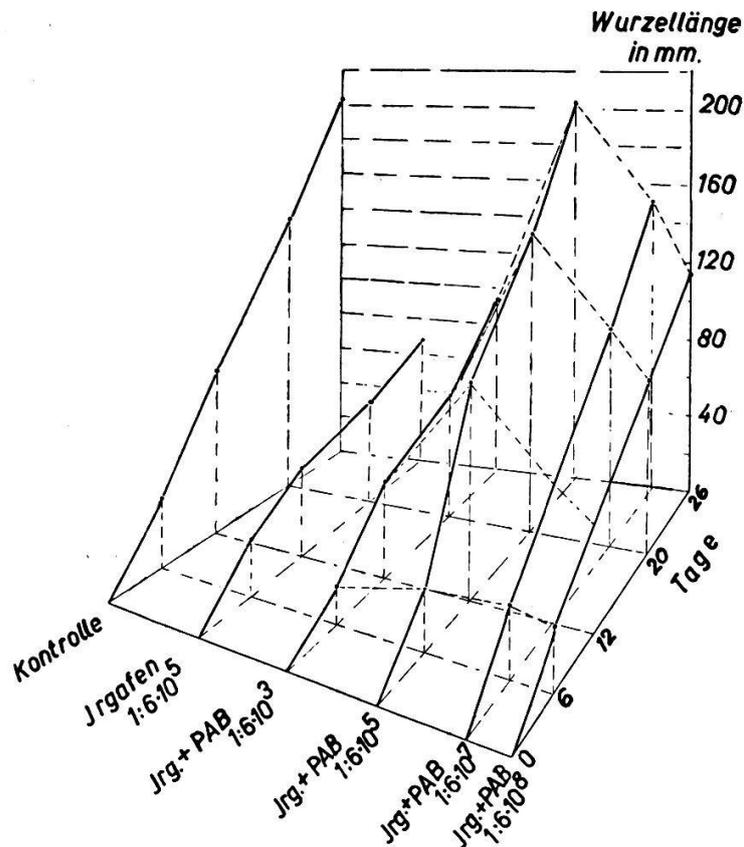


Fig. 8

sind nicht mehr von der Kontrolle zu unterscheiden. Die gegenüber der Irgafenkonzentration 10mal kleinere PAB-Menge zeigt schon eine schwächere enthemmende Wirkung, besonders im Längenwachstum, während das Trockengewicht deutlich enthemmt wird. Die Zahl der Nebenwurzeln ist gefördert. Die PAB-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^7$ zeigt nur noch eine sehr schwache Enthemmung im Längenwachstum und im Trockengewicht, die Zahl der Nebenwurzeln dagegen ist stimuliert. Die schwächste Konzentration der PAB ($1 : 6 \cdot 10^8$) weist gar keine Wirkung mehr auf.

DIE P-AMINOBENZOYL-GLUTAMINSÄURE ALS ANTAGONIST DER SULFONAMIDE

Nach A u h a g e n [36] soll die p-Aminobenzoyl-l-glutaminsäure (PABG) etwa 8- bis 10mal wirksamer sein als PAB bei *Sbm. plantarum*. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von W a g n e r -

Jauregg und Wagner [37], wonach die PABG in ihrer Wirkung schwächer sei. Im weiteren genügt nach Lampen und Jones [38] eine 10mal schwächere Konzentration von PAB gegenüber PABG, um das Wachstum von *Lb. arabinosus* und *Strep. plantarum* zu ermöglichen. Nicht zuletzt zeigten die Versuche von Schöpfer [50] an der Pisumwurzel, daß die PABG keine stärkere Wirksamkeit zur Enthemmung der Sulfonamidwirkung aufweist als die PAB.

Einfluß verschiedener PABG-Konzentrationen auf die Wurzelkultur von Pisum sativum

Wie bei der PAB mußte vorerst geprüft werden, ob die PABG allein zu der Nährlösung zugesetzt einen Einfluß auf das Wachstum der Pisum-Wurzeln ausübe. Es wurden folgende Konzentrationen von PABG geprüft: $1 : 6 \cdot 10^4$, $1 : 6 \cdot 10^5$, $1 : 6 \cdot 10^6$, $1 : 6 \cdot 10^7$ und $1 : 6 \cdot 10^8$ mol. Die Kultur erfolgte in Röhren in 10 cm^3 Nährlösung nach Bonner.

Die folgende Tabelle zeigt die Durchschnittswerte in Prozenten:

	Kontrolle	PABG $1 : 6 \cdot 10^4$	PABG $1 : 6 \cdot 10^5$	PABG $1 : 6 \cdot 10^6$	PABG $1 : 6 \cdot 10^7$	PABG $1 : 6 \cdot 10^8$
Länge	100	112,6	99,7	100,4	99,5	98,9
Trockengewicht	100	105,4	96,5	103,5	90,9	96,5

Die PABG besitzt in den geprüften Konzentrationen gar keine Wirkung auf das Wurzelwachstum.

Enthemmung des Irgafens durch PABG

Die Pisumwurzeln in steriler Organkultur wurden durch eine Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ gehemmt. PABG wurde in den gleichen Konzentrationen wie oben geprüft.

Die graphische Darstellung (Fig. 9) zeigt die enthemmende Wirkung der PABG beim Längenwachstum und Trockengewicht am 26. Tag. Zum Vergleich wurden auch die Werte der PAB hinzugefügt.

Die Tabelle bringt die Durchschnittswerte in Prozenten vom Längenwachstum, Trockengewicht und Zahl der Nebenwurzeln am 26. Tag:

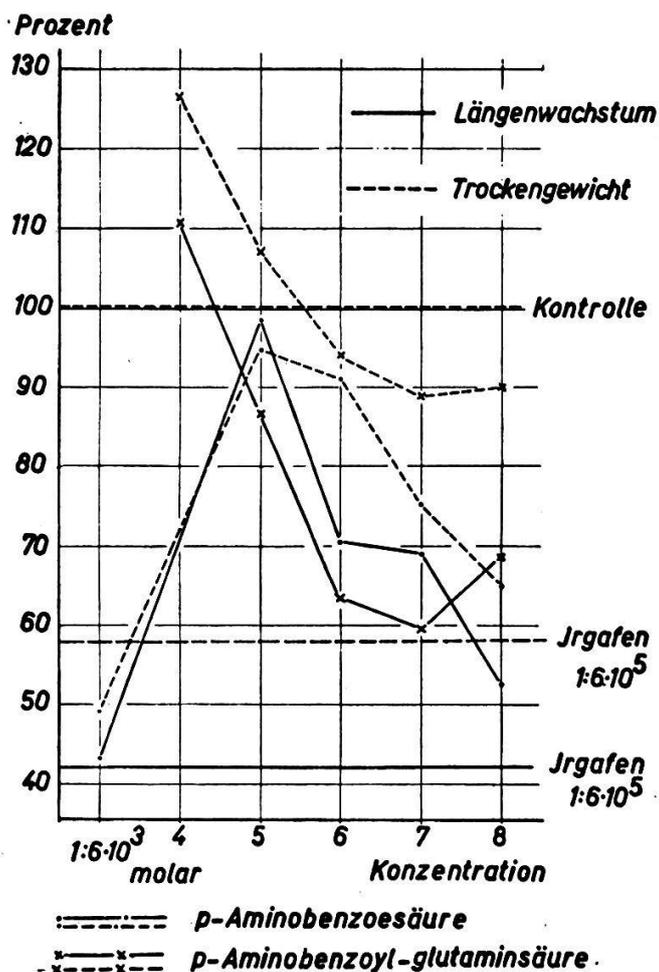


Fig. 9

	Zahl der Kulturen	Längenwachstum	Trockengewicht	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	50	100	100	100
Irgafen 1:6·10 ⁵	50	42,1	58	96,3
Irgafen + PABG 1:6·10 ⁴	11	110,8	126,8	126
Irgafen + PABG 1:6·10 ⁵	28	86,7	107,3	150
Irgafen + PABG 1:6·10 ⁶	10	63,4	94,2	140
Irgafen + PABG 1:6·10 ⁷	14	59,6	89,1	142,6
Irgafen + PABG 1:6·10 ⁸	15	68,8	90,3	141

Besprechung der Ergebnisse

Die p-Aminobenzoyl-glutaminsäure (PABG)-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^4$ mol wirkt vollständig enthemmend, in bezug auf das Trockengewicht sogar fördernd. Auch die 10mal schwächere Konzentration hebt die hemmende Wirkung des Irgafens deutlich auf. Die PABG-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^6$, $1 : 6 \cdot 10^7$ und $1 : 6 \cdot 10^8$ mol sind in bezug auf die Enthemmung des Längenwachstums von sehr geringer Wirksamkeit, während die Hemmung des Trockengewichtes auch mit den schwächsten Konzentrationen von PABG relativ stark aufgehoben wird. So bewirkt noch die PABG-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^8$ mol, das bedeutet 0,44 mg PABG pro cm^3 , also rund 1000mal kleiner als die Irgafenkonzentration, eine Enthemmung von 76 %. Dabei bleibt trotz der abnehmenden Konzentration das Maß der Enthemmung konstant. Die Zahl der Nebenwurzeln wird durch die PABG leicht gefördert.

Es mußte nun noch festgestellt werden, ob im Molekül der p-Aminobenzoyl-glutaminsäure neben der p-Aminobenzoessäure etwa auch die Glutaminsäure allein wirksam sei. Die Pisumwurzeln wurden wieder mit einer Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ gehemmt, während die Glutaminsäure in den Konzentrationen $1 : 6 \cdot 10^3$ und $1 : 6 \cdot 10^5$ mol geprüft wurde. Das Ergebnis dieses Versuches war, wie zu erwarten war, negativ, das heißt die Hemmung des Wachstums durch Irgafen wird durch die Glutaminsäure nicht aufgehoben.

DIE FOLSÄURE ALS ANTAGONIST DER SULFONAMIDE

Die Folsäure als Vitamin

Als ein neues Glied im Vitamin B-Komplex ist die Folsäure (folic acid) erkannt worden, die sich als essentieller Wachstumsfaktor für eine große Zahl von Mikroorganismen erwies. Es sind dies vor allem *Streptococcus faecalis* und *Lactobacillus casei*, die beide als Testobjekt dienen. Auch andere Lactobacillen verlangen Folsäure als Vitamin (Peterson [95]), sowie einige Enterococccenstämmen (Niven und Sherman [96]). Daneben spielt die Folsäure eine Rolle in der Ernährung der Vögel und Säugetiere (Jukes und Stockstad [97]).

1946 gelang es Angier und seinen Mitarbeitern [39], die Struktur der Folsäure aufzuklären und den Wirkstoff, die Pteroylglutaminsäure, zu synthetisieren. Es ist nach Hall [98] wahrscheinlich, daß die aus

pflanzlichen und tierischen Geweben extrahierten Wirkstoffe mit Folsäureaktivität nicht identisch sind. Andererseits konnte von P f i f f n e r und Mitarbeiter [99] festgestellt werden, daß das Vitamin B_c, der *Lb. casei*-Faktor der Leber und der *Lb. casei*-Faktor der Hefe mit der synthetischen Pteroylglutaminsäure identisch sind. Daneben kommt in der Natur die Folsäure auch in einer mit zusätzlichen Molekülen Glutaminsäure verknüpften Form vor. Der «fermentation»-Faktor der *Lb. casei* wurde als Pteroyltriglutaminsäure erkannt, während das sogenannte Vitamin B_c conjugate der Pteroylheptaglutaminsäure entspricht.

Auf die Beziehung zwischen Pteroylglutaminsäure und p-Aminobenzoessäure hinweisend ist das Ergebnis von Mills, Briggs, Luckey und Elvehjem (100), wonach in Kulturen von *Mycobact. tuberculosis* auf einem PAB enthaltenden Milieu Folsäure produziert wurde. Außerdem wurde nach Sarett (101) die Produktion des *Lb. casei*-Faktors durch *Lb. arabinosus* mit einer Vergrößerung der PAB-Konzentration erhöht. Die Tatsache, daß die Folsäure die PAB als Bestandteil enthält, beweist Tschesche [102], daß die PAB nicht als freie Verbindung, sondern als prosthetische Gruppe eines höheren Komplexes in den Bakterienstoffwechsel eingreift, und daß durch die Verdrängung der PAB durch Sulfonamid ein unwirksamer Komplex entsteht. Als Bestätigung dieser theoretischen Annahme fand Miller [103], daß bei *Esch. coli* die Synthese der Folsäure durch Sulfonamide gestört ist.

Die Pteroylglutaminsäure als Antagonist der Sulfonamide

Lb. casei und *Strep. faecalis* Rogers, die zu ihrem Wachstum Folsäure benötigen, sind nach Lampen und Jones [38] unempfindlich gegen Sulfonamide. *Strep. faecalis* Ralston und *Strep. zymogenes* 2b und C1 benötigen die Folsäure als Zusatzfaktor und werden in dessen Abwesenheit durch die Sulfonamide stark gehemmt. Durch Zusatz der Pteroylglutaminsäure sind die beiden Organismen sulfonamidoresistent. *Cl. acetobutylicum* und *Strep. plantarum* sind nach Nimmo-Smith und Woods [104] ebenfalls sulfonamidoresistent in Gegenwart von Pteroylglutaminsäure. Ganz ähnliche Resultate wurden bei *Sbm. plantarum* und *Lb. arabinosus* von Lampen und Jones [105] berichtet. Dabei ist die Aktivität 10- bis 100mal kleiner als PAB. Auch *Psittacose*-Virus ist nach Morgan [106] in Gegenwart von Folsäure unempfindlich gegen Sulfonamide.

Aus den meisten Versuchen ist zu ersehen, daß die Konzentration der Pteroylglutaminsäure, die erforderlich ist, die Sulfonamidhemmung aufzuheben, größer (10- bis 100mal) sein muß als diejenige der PAB. Es war deshalb von großem Interesse, zu untersuchen, ob sich die höhere Pflanze in dieser Hinsicht gleich verhalte wie die Mikroorganismen. Wiederum wurde die sterile Wurzelkultur von *Pisum sativum* verwendet.

Eigene Versuche mit Folsäure

Zuerst wurde festgestellt, ob die Pteroylglutaminsäure zu der Nährlösung zugesetzt eine fördernde oder hemmende Wirkung auf das Wachstum der Wurzeln ausübe.

Die Folsäure ist in Wasser schwer löslich, besonders in der Kälte. Es wurde deshalb in diesem Versuch einerseits Folsäure verwendet, die in kaltem destilliertem Wasser gelöst, und die durch ein Bakterienfilter kalt sterilisiert wurde. Andererseits lösten wir die Folsäure in heißem Wasser und sterilisierten diese Lösung bei 115° während 15 Minuten. Die Lösungen wurden immer im Dunkeln aufbewahrt, da nach Stockstad und Mitarbeiter [107] die Folsäure gegen Tageslicht empfindlich ist.

Die Konzentrationen der heiß sterilisierten Folsäure waren 1 γ , 0,1 γ , 0,01 γ und 0,001 γ pro cm^3 . Die Konzentration der kalt sterilisierten Lösung war schwer zu bestimmen, da durch das Bakterienfilter ein Teil der ungelösten Folsäure zurückgehalten wurde. Deshalb wurde die Konzentration nach der Farbintensität geschätzt und wird etwa 1 γ pro cm^3 gewesen sein. Die Konzentrationen der Pteroylglutaminsäure waren in molare Konzentrationen umgerechnet: kalt ster. ca. $1 : 4,43 \cdot 10^5$, heiß steril. $1 : 4,43 \cdot 10^5$, $1 : 4,43 \cdot 10^6$, $1 : 4,43 \cdot 10^7$ und $1 : 4,43 \cdot 10^8$ mol.

Die Tabelle zeigt das Längenwachstum am 26. Tag in Prozent:

Kontrolle	Folsäure heiß steril.				Folsäure kalt steril
	$1 : 4,43 \cdot 10^5$	$1 : 4,43 \cdot 10^6$	$1 : 4,43 \cdot 10^7$	$1 : 4,43 \cdot 10^8$	$1 : 4,43 \cdot 10^5$
100	92,9	100,8	99,3	99,9	79,3

Es scheint also ein gewisser Unterschied zu bestehen zwischen der kalt und der heiß sterilisierten Folsäure. Die heiß sterilisierte Folsäure ist vollständig wirkungslos auf das Wachstum der Pisumwurzeln, während die kalt sterilisierte eine leichte Hemmung im Längenwachstum ergibt.

Enthemmung der Irgafenwirkung durch Pteroylglutaminsäure

Die Pisumwurzeln wurden durch eine Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ gehemmt. Zur Enthemmung wurden folgende Konzentrationen von Pteroylglutaminsäure untersucht: mit kalt steril. Folsäure $1 : 4,43 \cdot 10^5$, mit heiß steril. Folsäure $1 : 4,43 \cdot 10^5$, $1 : 4,43 \cdot 10^7$ und $1 : 4,43 \cdot 10^8$ mol.

Die graphische Darstellung (Fig. 10) zeigt das Längenwachstum am 26. Tag in Prozenten.

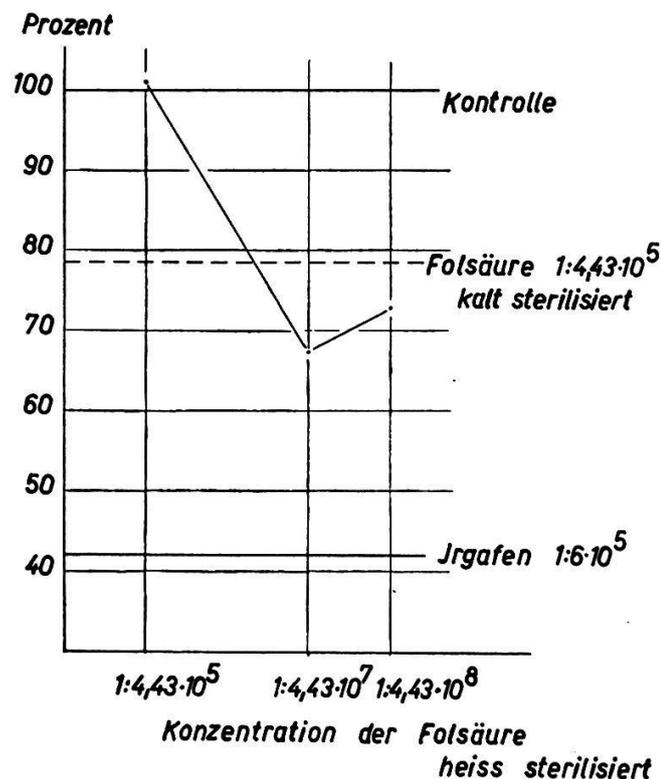


Fig. 10

Die Durchschnittswerte in Prozenten über Längenwachstum und Zahl der Nebenwurzeln sind aus der Tabelle ersichtlich:

	Zahl der Kulturen	Längenwachstum	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	50	100	100
Irgafen $1 : 6 \cdot 10^5$	50	42,1	96
Irgafen + Folsäure heiß steril. $1 : 4,43 \cdot 10^5$	15	101,3	78
Irgafen + Folsäure heiß steril. $1 : 4,43 \cdot 10^7$	13	67,4	165
Irgafen + Folsäure heiß steril. $1 : 4,43 \cdot 10^8$	12	72,9	130
Irgafen + Folsäure kalt steril. $1 : 4,43 \cdot 10^5$	12	78,5	70

Besprechung der Ergebnisse

Die kalt sterilisierte Pteroylglutaminsäure vermag die Hemmung des Wachstums wenn auch nicht vollständig, so doch deutlich aufzuheben. Zudem ist noch die durch diese Lösung allein erzielte kleine Hemmung in Betracht zu ziehen.

Die heiß sterilisierte Pteroylglutaminsäure wirkt in ihrer stärksten Konzentration vollständig enthemmend auf das Längenwachstum. Die schwachen Konzentrationen ($1 : 4,43 \cdot 10^7$ und $1 : 4,43 \cdot 10^8$ mol) weisen keine deutliche Enthemmung auf, und doch ist das Längenwachstum dieser Wurzeln weniger gehemmt als durch Irgafen allein. Die Zahl der Nebenwurzeln hingegen ist leicht gefördert. Die Pteroylglutaminsäure wirkt also ungefähr im gleichen Verhältnis wie die p-Aminobenzoensäure.

DIE NUCLEINSÄUREN UND IHRE BAUSTEINE ALS ANTAGONISTEN DER SULFONAMIDE

Neben der antagonistischen Wirkung der PAB wurden andere Substanzen gefunden, die ohne chemische Verwandtschaft mit PAB, zum Teil allein die Hemmung der Sulfonamide aufheben oder die Wirkung der PAB verstärken. So ist nach Loomis und Mitarbeiter [108], sowie Harris und Kohn [109] die Aminosäure Methionin ein Antisulfonamid. Besonders aber scheinen die Purine eine antagonistische Wirkung zu besitzen. So finden Martin und Fischer [110] Hypoxanthin und Adenin wirksam, später sollen nach Snell und Mitchell [111] bei *Lb. arabinosus* und *Lb. pentosus* die Purine die PAB nicht ersetzen können, sondern nur deren Wirkung verstärken, während bei *Lb. casei* die Purine allein wirksam seien. Daß Beziehungen zwischen PAB und Purinen bestehen, wurde durch die Tatsache ergänzt, daß bei *Cl. acetobutylicum* große Mengen von Purindosen die PAB als Wachstumsfaktor ersetzen können.

1946 berichtet Schöpfer [41], daß die Sulfonamidhemmung bei *Eremothecium Ashbyii* durch Ribonucleinsäure, Desoxyribonucleinsäure, Adenylsäure, Adenosin und Adenin aufgehoben wird. Adenin als wirksamer Bestandteil dieser Substanzen kann durch Guanin, Hypoxanthin und weniger gut durch Xanthin ersetzt werden, während Cytosin, Uracil, Thymin, Theobromin, Theophyllin und Coffein inaktiv sind. Dabei ist die Aktivität des Adenins ungefähr 10mal schwächer als diejenige der PAB, kann aber auch gleichwertig sein. Ähnlich sind

die Ergebnisse von S c h o p f e r [42] bei *Neurospora sitophila*, obwohl die Antisulfonamidwirkung der Purine schwächer war als bei *Eremothecium*. Bei der PAB-Mutante von *Neurospora crassa* kann die PAB als Antisulfonamid nicht durch Purine ersetzt werden, hingegen wird die Aktivität durch letztere erhöht. Ein ähnliches Ergebnis wie dasjenige mit *Eremothecium Ashbyii* wurde mit *Saccharomyces* erreicht [41]. Auch hier wirkte Adenin als Antisulfonamid, und zwar die Aktivität nur fünfmal schwächer als diejenige der PAB. S h i v e und R o b e r t s [44] zeigten, daß bei *Lb. arabinosus* Adenin der Sulfonamidhemmung entgegenwirkt, aber nur in Gegenwart einer suboptimalen PAB-Menge.

Bei der PAB-Mutante von *Esch. coli* kann nach L a m p e n , R o e p k e und J o n e s [75] die PAB vollwertig ersetzt werden durch die Kombination Thymin + Purine (Adenin, Guanin und Xanthin) + Aminosäurengemisch (Methionin und Lysin). Unter diesen Bedingungen sind die Kulturen sehr sulfonamidresistent. W i n k l e r und D e H a a n [112] berichten, daß bei *Esch. coli* ein Gemisch von Methionin, Serin und Xanthin + Pteroylglutaminsäure den gleichen Antisulfonamideffekt aufweise wie PAB, und daß in diesem Gemisch die Pteroylglutaminsäure durch eine große Konzentration von Thymin ersetzt werden könne. Die Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen den Purinen und PAB erkennen und ergeben die Vermutung, daß die Sulfonamide in die Biosynthese der verschiedenen Purine störend eingreifen. Die p-Aminobenzoesäure ist der Beginn einer Reaktionskette, an deren Ende die Purinbase oder schlußendlich die Nucleinsäure steht. Die PAB oder wahrscheinlich ein höherer Komplex wie die Folsäure dient als Coferment in einem Enzymsystem zur Synthese der Purine und Pyrimidine. Daß zwischen Folsäure und Purin ein Zusammenhang besteht zeigten W i n k l e r und d e H a a n , indem sie die Pteroylglutaminsäure durch große Mengen Thymin ersetzen konnten. Wenn wir auch für jede Purin- und Pyrimidinbase ein anderes Enzymsystem annehmen dürfen, so haben wir doch wahrscheinlich eine gemeinsame Ausgangsbasis, nämlich die PAB und zugleich der Angriffspunkt der Sulfonamide. Die dort erfolgte Störung führt eben zur Störung der Biosynthese der Purine und dadurch zur eigentlichen Schädigung der lebenden Zelle.

Stammen auch alle diese Ergebnisse von Mikroorganismen, so war es doch sehr wahrscheinlich, daß die höhere Pflanze ähnlich reagieren würde. So konnte auch S c h o p f e r [50] bei *Pisum sativum* feststellen,

daß die Hemmung des Wurzelwachstums durch größere Mengen von Ribonucleinsäure oder Xanthin aufgehoben wurde, während Adenin, Guanin und Hypoxanthin wirkungslos waren. Es war deshalb interessant, die Versuche mit Wurzeln in steriler Organkultur fortzusetzen.

Die Wirkung der Purine, Pyrimidine, Nucleoside, Nucleotide und Nucleinsäuren auf das Wachstum der Wurzeln von Pisum sativum

Um festzustellen, ob diese Substanzen eine fördernde oder hemmende Wirkung auf die Wurzelkultur ausüben, wurden sie zur Nährlösung zugesetzt, und zwar 25 γ pro cm^3 . Da einige dieser Substanzen schlecht löslich sind, ganz besonders Guanin, wurden sie in der gesamten Nährlösung heiß gelöst, worauf diese Nährlösung in die Kulturrohre abgefüllt und wie üblich sterilisiert wurde.

Die folgende Tabelle bringt die Durchschnittswerte in Prozenten vom Längenwachstum, der Zahl der Nebenwurzeln und dem Trockengewicht am 26. Tag der Kultur.

	Zahl der Kulturen	Längenwachstum	Trockengewicht	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	14	100	100	100
Adenin	13	107	101	110
Guanin	17	106	93	156
Hypoxanthin	14	92	76	81
Xanthin	16	107	93	178
Thymin	14	107	104	99
Uracil	16	100	81	54
Cytosin	14	133	98	45
Adenosin	10	67	74	120
Guanosin	11	67	65	70
Adenosinphosphorsäure	16	114	106	195
Cytidinphosphorsäure ..	14	108	97	87
Ribonucleinsäure	15	117	117	178
Thymonucleinsäure	14	104	104	166

Die 4 Purine haben keinen Einfluß auf das Wachstum, während von den 3 Pyrimidinbasen Cytosin das Längenwachstum um 30 % fördert.

Interessanterweise hemmen die beiden Nucleoside, Adenosin und Guanosin die Wurzelkultur, sowohl im Längenwachstum um 33 % wie auch im Trockengewicht. Die Nucleotide wie auch die Nucleinsäuren sind ohne Wirkung. Die Zahl der Nebenwurzeln ist sehr unterschiedlich, zum Teil gehemmt wie beim Cytosin und Uracil, dann gefördert wie bei der Adenosinphosphorsäure, Xanthin, Ribonucleinsäure, Thymonucleinsäure und Guanin.

Die Wirkung der Nucleinsäuren und ihrer Bausteine auf die Cibazolhemmung

Wurzeln von *Pisum sativum* wurden durch eine Cibazolkonzentration von $1 : 1,5 \cdot 10^5 \text{ mol} = 2,55 \text{ } \gamma / \text{cm}^3$ gehemmt. In mehreren Versuchen wurde die Enthemmung durch folgende Substanzen ausprobiert: die Purine Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin, die Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und Cytosin, Adenosin und Adenosinphosphorsäure als Nucleosid beziehungsweise Nucleotid und die beiden Nucleinsäuren Ribonucleinsäure und Thymonucleinsäure.

Die Tabelle bringt die Zusammenstellung aus all den verschiedenen Versuchen. Es sind die Durchschnittswerte des Längenwachstums und des Trockengewichts am 26. Tag in Prozent (s. S. 95).

Die Ergebnisse aus diesen Versuchen sind sehr undeutlich, wie überhaupt die Hemmung des Wachstums durch Cibazol im Vergleich zu Irgafen bedeutend schwerer und immer nur teilweise enthemmt wird. Eine relativ sichere Enthemmung wird durch Adenosinphosphorsäure und Guanin erzielt. Die so enthemmten Wurzeln sind nicht mehr deformiert und verfärbt. Alle anderen Substanzen scheinen keine Wirkung zu haben.

Da die Versuche zur Enthemmung der Cibazolwirkung nicht so deutliche Ergebnisse lieferten, wurde ein Versuch mit Vorbehandlung gemacht. Die sterilen Wurzelspitzen von *Pisum sativum* wurden zuerst einige Zeit mit einer Lösung der enthemmenden Substanz behandelt. Damit die Wurzelspitzen in dieser Vorbehandlung nicht zu stark wachsen, werden sie bei Zimmertemperatur und in einer Nährlösung nach **B o n n e r** mit reduziertem Zuckergehalt (statt 4 % nur 1 %) kultiviert.

	Zahl der Kulturen	Längen- wachstum	Trocken- gewicht
Kontrolle	94	100	100
Cibazol 2,55 γ/cm^3	103	22	54
„ + Ribonucleinsäure 25 γ	10	29	
„ + Thymonucleinsäure 25 γ	12	30	78
„ + Adenosinphosphors. 25 γ	8	27	68
„ + Adenosin 25 γ/cm^3	13	18	38
„ + Adenin 25 γ/cm^3	31	31	71
„ + Cytosin 50 γ/cm^3	24	21	49
„ + Uracil 50 γ/cm^3	21	29	69
„ + Thymin 50 γ/cm^3	20	26	61
„ + Adenin 50 γ/cm^3	22	27	67
„ + Guanin 8 γ/cm^3	40	34	71
„ + Hypoxanthin 50 γ/cm^3	23	27	58
„ + Xanthin 50 γ/cm^3	18	23	54
„ + Adenosinphosphorsäure 50	14	40	79

Als Kulturgefäße wurden Petrischalen verwendet, da sie den Vorteil besitzen, daß man die Wurzeln direkt in der sterilen Schale schneiden kann. Ein Nachteil ist die große Infektionsgefahr. Wichtig ist, daß die Nährlösung nicht in den Petrischalen sterilisiert wird, sondern die für sich sterilisierte Nährlösung muß sorgfältig in die trockenen und sterilen Schalen gegossen werden. Jede Petrischale enthielt 15 cm^3 Nährlösung nach Bonner (1% Saccharose) und folgende Substanzen wurden verwendet:

p-Aminobenzoensäure $1 : 2 \cdot 10^6 \text{ mol} = 0,069 \gamma / \text{cm}^3$

Ribonucleinsäure 50 γ / cm^3

Adenosinphosphorsäure 50 γ / cm^3

Guanin 8 γ / cm^3

Pro Substanz wurden 6 Petrischalen à 5 Wurzelspitzen angesetzt. Die Wurzelspitzen wurden 94 Stunden in den Petrischalen wachsen gelassen, dann steril geschnitten (wieder auf eine Wurzelspitzenlänge von 10 mm) und in Kulturröhren überimpft, die wie bisher 10 cm³ Nährlösung nach B o n n e r (nun wieder mit 4 % Saccharose) enthielten. Die Kultur erfolgte im Dunkeln bei 23 ° während 24 Tagen. Die Hemmung wurde durch eine Cibazolkonzentration von 10⁻⁵ mol erzielt, während die Enthemmung durch PAB, Ribonucleinsäure, Adenosinphosphorsäure und Guanin in den oben angegebenen Konzentrationen erfolgte.

Die folgende Tabelle bringt die Durchschnittswerte der Länge, des Trockengewichtes und der Zahl der Nebenwurzeln am 24. Tag in Prozent:

	Länge	Trocken- gewicht	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	100	100	100
Cibazol 10 ⁻⁵	55	51	31
Cbz. + PAB 1 : 2 · 10 ⁶	74	71	122
„ + Ribonucleinsäure 50 γ/cm ³	69	45	12
„ + Adenosinphosphorsäure 50 γ	78	67	91
„ + Guanin 8 γ/cm ³	66	64	85

Die graphische Darstellung (Fig. 11) zeigt den Hemmungs- und Enthemmungsgrad als Funktion der Zeit.

Dieser Versuch zeigt, daß durch eine 20mal schwächere PAB-Konzentration die Wachstumshemmung durch Cibazol aufgehoben wird.

Adenosinphosphorsäure und Guanin wirken deutlich enthemmend, während die Ribonucleinsäure nur im Längenwachstum eine Wirkung zeigt und das Trockengewicht stark gehemmt bleibt.

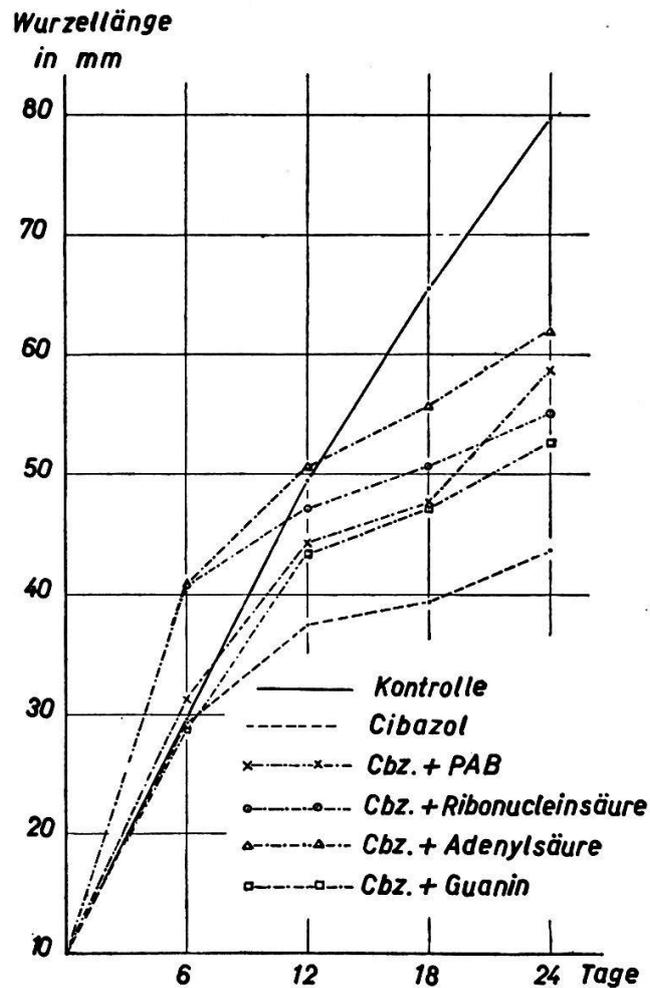


Fig. 11

Die Wirkung der Purine und Nucleinsäuren auf die Irgafenhemmung

Wurzeln von *Pisum sativum* in steriler Organkultur wurden durch eine Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ mol gehemmt. 4 Purinbasen, 3 Pyrimidinbasen, 2 Nucleoside, Nucleotide und 2 Nucleinsäuren wurden zur Enthemmung geprüft, und zwar 25γ pro cm^3 . Die Substanzen wurden zusammen mit der Nährlösung sterilisiert.

Die Tabelle bringt die Durchschnittswerte des Längenwachstums, des Trockengewichtes und der Zahl der Nebenwurzeln am 26. Tag in Prozenten:

	Zahl der Kulturen	Längenwachstum	Trockengewicht	Zahl der Nebenwurzeln
Kontrolle	14	100	100	100
Irgafen $1:6 \cdot 10^5$	12	67	78	113
Irg. + Adenin $25 \gamma/\text{cm}^3$	13	58	70	87
Irg. + Guanin $25 \gamma/\text{cm}^3$	10	92	85	230
Irg. + Hypoxanthin 25γ	10	63	74	74
Irg. + Xanthin $25 \gamma/\text{cm}^3$	11	71	90	150
Irg. + Thymin $25 \gamma/\text{cm}^3$	13	100	111	127
Irg. + Uracil $25 \gamma/\text{cm}^3$	15	87	100	127
Irg. + Cytosin $25 \gamma/\text{cm}^3$	17	117	107	79
Irg. + Adenosin $25 \gamma/\text{cm}^3$	12	80	95	128
Irg. + Guanosin $25 \gamma/\text{cm}^3$	10	68	68	121
Irg. + Adenosinphosphorsäure	16	87	100	128
Irg. + Cytidinphosphorsäure	11	77	84	110
Irg. + Ribonucleinsäure 25γ	16	67	75	112
Irg. + Thymonucleinsäure	10	69	83	96

Besprechung der Ergebnisse

Von den Purinbasen Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin wirkt einzig Guanin als Antagonist des Irgafens und bestätigt das mit Cibazol erhaltene Ergebnis. Die Zahl der Nebenwurzeln wird durch Guanin deutlich gefördert.

Die Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und Cytosin wirken alle 3 enthemmend, und zwar wirkt Uracil am schwächsten (besonders im Längenwachstum, während die Hemmung des Trockengewichtes vollständig aufgehoben wird).

Bei den beiden Nucleosiden Adenosin und Guanosin ist zu bedenken, daß sie allein zu der Nährlösung zugesetzt das Wurzelwachstum hem-

men. Unter dieser Berücksichtigung wirkt Adenosin deutlich enthemmend, während man durch das negative Resultat des Guanosin nicht unbedingt auf Inaktivität schließen darf.

Von den 2 geprüften Nucleotiden ist Cytidinphosphorsäure unwirksam, während Adenosinphosphorsäure entsprechend dem Resultat mit Cibazol ein Antagonist der Sulfonamidwirkung ist.

Die beiden Nucleinsäuren Ribonucleinsäure und Thymonucleinsäure sind vollständig wirkungslos.

HISTOLOGISCHE UND CYTOLOGISCHE ASPEKTE

Der erste Bericht über eine morphologische Veränderung der Zelle durch die Einwirkung der Sulfonamide stammt von L w o f f , N i t t i , T r e f o u e l und H a m o n [31], die bei *Polytomella caeca* neben der Hemmung der Vermehrung eine bedeutende Volumenvermehrung feststellten. Viel geeigneter zur Untersuchung von histologischen Veränderungen war natürlich die höhere Pflanze, und so sind die grundlegenden Untersuchungen über strukturelle Abnormitäten bei *Pisum*wurzeln von M a n g e n o t und C a r p e n t i e r [45] gemacht worden. Die mit Sulfonamid behandelten Wurzeln sind stark verdickt, da die Rindenparenchymzellen und die parenchymatischen Markzellen diametral hypertrophiert sind. Durch Veränderungen im Mark wird auch die Entwicklung der Gefäße gestört.

Histologie der Wurzelspitze von Pisum sativum nach der Behandlung mit Sulfanilamidothiazol

Die *Pisum*wurzeln wurden in steriler Organkultur in Röhren bei 23 ° im Dunkeln gezüchtet. Als Milieu wurde Nährlösung nach B o n n e r mit Aneurinzusatz verwendet. Eine Serie von 20 Wurzeln wurde als Kontrolle verwendet, während die andere Serie durch eine Cibazol-konzentration von 10^{-5} mol gehemmt wurde. Nach 26 Tagen wurden die Wurzelspitzen geschnitten und in Juel oder Zenker-Formol fixiert. Gefärbt wurden die Schnitte mit Eisenhaematoxilin-Kongokorinth oder mit der später besprochenen Ribonuclease-Toluidinblaumethode.

Im Längsschnitt durch die Wurzelspitze, die unter der Einwirkung des Cibazols verdickt und bräunlich verfärbt ist, zeigt sich nun folgendes Bild (vergleiche Mikroaufnahme I und VII):

Es sind in der Wurzelspitze keine embryonalen Zellen mehr zu finden. Die Zellen variieren sehr in der Größe, enthalten wenig Cytoplasma und große Vakuolen. Das Dermatogen scheint nicht verändert zu sein, höchstens im Vergleich zur Kontrolle mehrschichtiger. Stark deformiert und degeneriert ist das Periblem. Die Verdickung der Wurzel ist hauptsächlich auf die starke Anschwellung und Vergrößerung des Periblems zurückzuführen. Die parenchymatischen Periblemzellen (Rindenzellen) sind sehr unregelmäßig angeordnet, stark vergrößert, ja es bilden sich Riesenzellen, die bis 50mal größer sind als eine normale Zelle. Durch diese Zellwucherung wird das Dermatogen gesprengt und die hypertrophierten Rindenzellen stoßen nach außen. Das Plerom ist wenig verändert, aber auch hier sind die Zellen sehr verschieden in der Größe und zum Teil hypertrophiert. Das Plerom ist gegenüber der Kontrolle schon stark differenziert, und so finden wir auf dem Längsschnitt schon Tracheiden. Zwischen Zentralzylinder und Rinde, mit ersterem in Verbindung stehend, sieht man relativ zahlreich eine knospenartige Anhäufung von embryonalen Zellen. Es sind dies Nebenwurzeln im Anfangsstadium, deren Bildung nach *M a n g e n o t* und *C a r p e n t i e r* durch die Sulfonamide stimuliert wird, die aber in ihrer Entwicklung gehemmt nicht durch die Rinde stoßen.

Um festzustellen, ob die durch Sulfonamid gehemmte und verdickte Wurzel im Vergleich zur Kontrolle auch schwer geworden sei, wurde folgender Versuch unternommen. Es wurde das Frischgewicht und Trockengewicht von gehemmten Cibazolwurzeln mit gleich langen Kontrollwurzeln verglichen. Dies wurde erreicht, indem man zuerst die Wurzelserie mit Cibazol kultivierte, und dann 9 Tage später die Kontrollserie ansetzte.

Sobald die beiden Wurzelserien ungefähr die gleiche Länge hatten, es war dies für die Cibazolwurzeln der 17. Tag und für die Kontrolle der 8. Tag, wurden sie geerntet und ihr Frischgewicht und Trockengewicht bestimmt.

	Zahl der Wurzeln	Länge in mm	Frischgewicht ganze Wurzel	Trockengewicht ganze Wurzel	Frischgewicht pro mm Wurzel	Trockengewicht pro mm Wurzel
Kontrolle	31	62,84	35,87 mg	2,77 mg	571 γ	44 γ
mit Cibazol	29	59,4	39,5 mg	5,0 mg	665 γ	84 γ

Damit ist gezeigt, daß bei gleicher Wurzellänge die durch Sulfonamid gehemmte Wurzel schwerer ist als die Kontrollwurzel, was auf die Verdickung und Zellwucherung zurückzuführen ist.

Histologie der enthemmten Wurzeln

Durch Cibazol gehemmte Wurzeln von *Pisum sativum* wurden durch p-Aminobenzoesäure und durch Adenosinphosphorsäure enthemmt, worauf die Wurzelspitzen fixiert, geschnitten und gefärbt wurden. Die Wurzelspitze ist in ihrer histologischen Struktur wieder normal; wir erkennen im Dermatogen, Periblem und Plerom keine Veränderungen mehr und die Zellen sind wieder embryonal, obwohl die Zellen nicht ganz so plasmareich erscheinen wie in der Kontrollwurzel. Damit zeigt sich, daß die Enthemmung nicht nur in bezug auf Längenwachstum und Gewicht der Wurzel erfolgt, sondern auch punkto morphologischer Struktur.

Stoffliche Veränderung der Zelle unter der Einwirkung der Sulfonamide

Die Bestandteile der Zelle enthalten Nucleinsäuren, und zwar besteht das basophile Cytoplasma vor allem aus Ribonucleinsäuren, während der Kern sich hauptsächlich aus Thymonucleinsäuren zusammensetzt. Um in «kernlosen» Zellen niederer Organismen wie Hefen und Bakterien Kernstrukturen nachweisen zu können, muß die Ribonucleinsäure entfernt werden. Dies geschieht nach Brachet [113] und nach Jeener und Brachet [114] mit Hilfe eines Fermentes, das die Ribonucleinsäure abbaut ohne die Desoxyribonucleinsäure anzugreifen. Dieses Ferment, die Ribonuclease, wird aus Rinderpankreas gewonnen und während 10 Minuten gekocht, um alle Spuren der thermolabilen Desoxyribonuclease zu entfernen. Da die Herstellung einer reinen Ribonuclease nach Kausche und Hahn [115] zu zeitraubend war, stellten wir das Ferment nach der Methode von Brachet her. Die mit der Ribonuclease behandelten Zellen werden mit Toluidinblau gefärbt, wobei nach Auswaschen mit Alkohol nur noch die thymonucleinsäurehaltigen Zellbestandteile die Farbe behalten.

Eine andere Methode zur Unterscheidung von Kernstrukturen vom basophilen Cytoplasma bei Bakterien stammt von Robinow [116] und Klieneberger-Nobel [117] und besteht in der Behandlung mit warmer Salzsäure und nachfolgender Giemsa-Färbung. Nach

Tulasne [118] und Tulasne und Vendrely [119] wird die Ribonucleinsäure des Bakteriencytoplasmas durch die HCl-Giemsamethode extrahiert, wodurch die Zelle ihren basophilen Charakter verliert. Die resistenteren Desoxyribose-haltigen Anteile bleiben erhalten und lassen sich färben.

Da die Sulfonamide die Synthese der Purine hemmen, wird auch die Biosynthese der Nucleinsäuren gestört sein. Mit Hilfe der erwähnten cytologischen Nachweisreaktionen kann deshalb untersucht werden, ob ein solcher störender Effekt durch Sulfonamidwirkung zu beobachten sei. Von dieser Idee ausgehend untersuchte 1946 Schopper [42] mit Hilfe der Methode von Jeener und Brachet [114] die Wirkung von Cibazol auf *Saccharomyces*. Bei den durch Cibazol behandelten Hefezellen war die cytoplasmatische Färbbarkeit gegenüber Toluidinblau schon nach einer Stunde Fermenteinwirkung vollständig verschwunden, während bei den Kontrollzellen über 4 Stunden gebraucht wurde. Das Ribonucleinsäuresubstrat scheint also unter der Wirkung der Sulfonamide irgendwie verändert worden zu sein, so daß es leichter durch die Ribonuclease angegriffen wird.

Auf Grund dieser Ergebnisse versuchten wir die gleiche Methode bei Wurzelspitzen von *Pisum sativum*. Es kamen Wurzelspitzen von Kontrollwurzeln und solchen, die mit einer 10^{-5} molaren Cibazolösung behandelt waren, nach einer Kulturdauer von 26 Tagen zur Untersuchung.

Technik

Die Pisumwurzelspitzen wurden geschnitten und während 24 Stunden in Mélange de Helly oder Zenker-Formol fixiert. Diese Fixierflüssigkeit hat den großen Vorzug, daß sie an Stelle der Essigsäure Formalin besitzt und eignet sich daher besonders gut für die Toluidinblaufärbung. Nach der Fixierung wurden die Wurzelspitzen 1 Stunde in fließendem Wasser gewaschen, langsam mit Alkohol entwässert, über Chloroform in Paraffin geführt. Die in Paraffin eingebetteten Wurzelspitzen wurden mit Mikrotom $10\ \mu$ dick geschnitten. Sie wurden nicht wie üblich mit Eiweißglycerin auf die Objektträger geklebt, sondern um jegliches Fremdeiweiß auszuschalten, direkt auf die peinlich sauberen Objektträger gelegt, wo sie dank molekularer Adhäsion festklebten. Zur Behandlung mit Ferment und zur Färbung wurde mit Xylol das Paraffin entfernt und über Alkohol in Wasser gebracht. Die Objektträger wurden im Brutschrank bei 60° zum Teil in destilliertem Wasser (Kontrolle) oder in der Fermentlösung eine bestimmte Zeit stehen gelassen, dann sehr gut in Wasser gewaschen und nun mit wässriger Toluidinblaulösung während kurzer Zeit gefärbt. Nun wird mit absolutem Alkohol differenziert, bis der Alkohol vom Objektträger vollständig farblos abläuft, das heißt bis aller überschüssiger

Farbstoff aus den Schnitten gespült ist. Nun werden die Schnitte in Xylol gebracht und dann in Kanadabalsam eingeschlossen. Diese Methode ergibt eine sehr schöne Kontrastfärbung der Zellkerne, da das Cytoplasma durch die fermentative Zerstörung der Ribonucleinsäure farblos, während der Kern und besonders seine Teilungsphasen leuchtend blau gefärbt sind. Die mit dem Panphot und Citophot gemachten Mikroaufnahmen (II, III, IV und V) zeigen solch behandelte Zellen mit Mitosestadien (Metaphasen und Telophasen).

Ergebnis der Fermentbehandlung

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den normalen Kontrollwurzeln und den mit Cibazol behandelten. Bei den Cibazolwurzeln braucht es zwischen 15—20 Minuten Fermentbehandlung, um das Cytoplasma zu «entfärben», während bei den Kontrollwurzeln 30—40 Minuten erforderlich sind. Die Ribonucleinsäure wird also bei den mit Sulfonamid gehemmten Wurzelspitzen viel rascher abgebaut. Auffallend ist, daß auch bei langer Einwirkung der Ribonuclease der Nucleolus seine Färbbarkeit gegenüber Toluidinblau behält, obwohl er eigentlich aus Ribonucleinsäure besteht. Nun fand aber *Tulasne* und *Vendrelly* [119] *Staphylococcen*, die sehr resistent waren gegenüber Ribonuclease, obschon die chemischen Analysen [120, 121] gezeigt haben, daß die *Staphylococcen* beträchtliche Mengen der gleichen Ribo- und Desoxyribonucleinsäure besitzen wie die andern Bakterien. *Tulasne* und *Vendrelly* nehmen deshalb an, daß in diesen Organismen die Ribonucleinsäure mit Cytoplasmaprotein verbunden ist und daß die Ribonuclease nur die freie, nicht aber die gebundene Ribonucleinsäure angreifen kann. In unserem Fall würde also der Nucleolus aus solch gebundenen Nucleinsäuren bestehen.

Wenn also unter der Wirkung der Sulfonamide eine Veränderung der Ribonucleinsäure aufzutreten scheint, so daß dieselbe durch die Ribonuclease leichter abgebaut wird, ist es naheliegend anzunehmen, daß durch ein Antisulfonamid wieder der ursprüngliche Zustand der Zelle hergestellt wird. Das heißt der Organismus wäre also nicht nur äußerlich punkto Wachstum, histologischer und cytologischer Struktur, sondern auch in bezug auf seine stofflichen Reaktionen der Kontrolle gleich zu stellen.

Es wurde nur 1 Versuch in dieser Hinsicht gemacht, und zwar wurde die durch die Adenosinphosphorsäure aufgehobene Sulfonamidhemmung von Pisumwurzeln nach der Methode von *Jener* und *Brachet* untersucht. Um ganz genau gleiche Bedingungen zu haben, wurden die Wurzelspitzen der 3 Serien, also Kontrolle, mit Cibazol ge-

hemmte und die mit Cibazol behandelten, aber durch Adenosinphosphorsäure enthemmten Wurzelspitzen auf demselben Objektträger montiert. Die Wurzelspitzen von *Pisum sativum* waren nach 26 Tagen steriler Kultur geschnitten und fixiert worden. Die Präparate wurden einer Fermentbehandlung von 3 Minuten unterworfen. Die Mikroaufnahmen wurden mit dem Busch-Citophot gemacht.

Mikroaufnahme VI:

Bei der Kontrollwurzel ist das Cytoplasma blau gefärbt, das heißt die Ribonucleinsäure ist noch nicht abgebaut worden. Die Kerne mit ihrem Chromatingerüst, speziell aber die Kernteilungsphasen sind stärker blau gefärbt als das Cytoplasma.

Mikroaufnahme VII:

Die stark verdickte und degenerierte Wurzelspitze der mit Cibazol behandelten Wurzel hat vollständig farbloses Cytoplasma, so daß sich nun die blau gefärbten Kerne gut abheben. Die Ribonucleinsäure ist also gegenüber der Kontrolle viel rascher abgebaut worden.

Mikroaufnahme VIII:

Die Hemmung der Wurzel ist durch Adenosinphosphorsäure aufgehoben worden, was sich deutlich in der histologischen Struktur äußert. Sehr überraschend ist nun die Tatsache, daß sich die enthemmte Wurzelspitze in bezug auf die stoffliche Reaktion von der Kontrolle unterscheidet. Das Cytoplasma ist farblos, während die dicht vorhandenen Zellkerne blau gefärbt sind. Die Ribonucleinsäure des Cytoplasmas ist also im Gegensatz zur Kontrolle abgebaut worden und verhält sich somit gleich wie bei der gehemmten Wurzel.

Damit ergeben sich neue Ueberlegungen. Wir haben gestützt auf die cytologische Untersuchung angenommen, daß die Sulfonamide die Ribonucleinsäure irgendwie verändert, und daß diese Veränderung ein Grund der Wachstumshemmung sei. Offenbar ist nun dieser Eingriff nur sekundärer Bedeutung, oder aber die Wurzel besitzt die Möglichkeit, auf anderem Wege diese Schädigung gut zu machen.

Sulfonamidwirkung auf Zellteilung

Seit der Entdeckung, daß Polyploidie bei Pflanzen durch Colchizin erzeugt werden kann (B l a k e s l e e [122, 123], E i g s t i [124]), wurde

nach anderen Chemikalien gesucht, die imstande sind, Polyploidie hervorzurufen. So berichtet E i g s t i [125] von mitotischen Unregelmäßigkeiten im Pollenschlauch von *Tradescantia occidentalis* bei einer Behandlung mit Sulfanilamid in einer Konzentration von 1 : 10 000. Größere Konzentrationen sollen die Bildung des Pollenschlauches hemmen. T r a u b [126] untersucht *Allium*wurzeln und findet nach einer 48stündigen Behandlung mit einer 0,5 %igen Sulfanilamidkonzentration polyploide und zweikernige Zellen. Weitere Untersuchungen über den Einfluß von Sulfonamiden auf die Wurzeln von *Allium cepa* stammen von P e t e r s [127], der von einer starken Kontraktion der Chromosomen in der Metaphase und einer Hemmung des Spindelapparates berichtet. Der Eintritt der Zellen in Mitose sei gehemmt und nach 48stündiger Behandlung seien Teilungen selten zu beobachten. Im allgemeinen haben die Sulfonamide eine schwächere Polyploidiewirkung als Colchizin, nur P e t e r s berichtet, daß bei einigen Arten von *Vaccinium* das Sulfanilamid wirksamer sei. Ein weiterer Beitrag zu diesen Untersuchungen liefert F u l l e r [128], der wiederum die cytologische Wirkung von Sulfonamiden auf *Allium cepa* prüft. Eine Sulfanilamidkonzentration von 0,5 % zeigte im allgemeinen die gleichen Ergebnisse wie die von P e t e r s. Hauptsächlich also Verdickung und Verkürzung der Chromosomen, Störung des Spindelapparates, dann tetraploide Metaphasen und Anaphasen.

Zu erwähnen sind ferner die Untersuchungen von B a u c h [129, 130] bei Wurzeln von *Zea Mays* und *Allium cepa*. Eine Konzentration von 2 % Prontosil hemmt das Wachstum der Wurzeln um 50 %, wobei aber die Mitosen in normaler Weise vor sich gehen. Andere Sulfonamide verursachen in konzentrierten Lösungen bei der Zwiebelwurzel typische Keulenbildung, ähnlich den durch Colchizin hervorgerufenen. Diese Sulfonamidkeulen unterscheiden sich aber von den Colchizinkeulen dadurch, daß bei ersteren geordnete Mitosen und keinerlei Störung des Spindelapparates vorkommen. Eine Ausnahme macht nur das Sulfanilamid selbst. Es unterdrückt in der Telophase die Zellwandbildung, was zu zweikernigen Zellen führt. Bei der synchron erfolgenden Teilung dieser beiden Kerne können benachbarte Ana- oder Telophasenplatten miteinander verschmelzen, so daß nunmehr in der Zelle 2 tetraploide Kerne vorhanden sind. Sehr eigenartig sind die Ergebnisse von B a u c h über den Antagonismus zwischen Colchizin und Sulfonamiden. So soll eine 2 %ige Prontosillösung den Colchizineffekt, das heißt Keulenbildung und Polyploidie aufheben. Nicht alle Sulfon-

amide wirken dem Colchizin gegenüber antagonistisch. Wirksam sind die Bindungen des p-Aminophenylsulfonamids mit bestimmten heterozyklischen Ringen, wie dem Pyrimidin-, dem Thiazol- und dem Thio-diazolring. Unwirksam sind Sulfapyrimidin und Sulfaguanidin.

Auch unsere Wurzelspitzen von *Pisum sativum* wurden auf die von Peters und Fuller gefundenen Ergebnisse hin untersucht. Die Wurzeln wurden während 260 Stunden kultiviert, und zwar eine Serie als Kontrolle, die andere mit einem Zusatz von Irgafen 10^{-5} mol. Die Wurzelspitzen wurden 6μ dick geschnitten und nach der Methode von Robinow und Tulasne und Vendrely behandelt. Die Präparate wurden 8 bis 14 Minuten mit n-HCl bei 60° behandelt, sehr gut gewaschen und gefärbt. Statt der Giemsa-Färbung mit Azur Eosin, die nach der Einbettung in Kanadabalsam sehr rasch verblaßte, färbten wir die Präparate mit einer 1%igen Toluidinblaulösung. Durch die Extraktion der Ribonucleinsäure des Cytoplasmas ergibt sich eine sehr schöne Färbung der Kerne und ganz speziell der Chromosomen in den Mitosestadien.

Die mit Irgafen behandelten Zellen weisen keinerlei Störungen in den Mitosestadien auf, wie sie zum Beispiel Fuller beschrieben hat. Dabei ist aber der Konzentrationsunterschied zu betrachten. Fuller braucht eine Konzentration von 0,5% Sulfanilamid, das sind 5000γ pro cm^3 Nährlösung. Meine Pisumwurzeln wurden durch eine 10^{-5} molare Irgafenlösung gehemmt, das sind $3,27 \gamma$ pro cm^3 , also eine 1000mal schwächere Konzentration.

Ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollwurzel und der Sulfonamidwurzel war die reduzierte Zahl der Mitosen der letzteren. Zur Untersuchung dieser Verhältnisse wurde auf einer gleich großen Fläche eines Wurzelspitzenlängsschnittes mit Hilfe eines Mikrometers die Zahl der Ruhekerne und Mitosen bestimmt. Die Fläche war $4 \cdot 0,167$ mm in der Länge und $2,3 \cdot 0,167$ mm in der Breite, das ergibt eine Fläche von $2,56 \text{ mm}^2$. Um einen guten Durchschnitt zu erhalten, wurde diese Fläche bei 5 Wurzelspitzen ausgezählt.

	Ruhekerne	Prophasen	Meta-phasen	Ana-phasen	Telo-phasen
Kontrolle 185 Std. kultiviert	811	26	12,6	3,2	9
Irgafen 10^{-5} mol 185 Std. kult.	906	12	4,2	0,2	1,8

Wenn wir die Zahl der Anaphasen gleich 1 setzen, so ist das Verhältnis der Prophasen, Metaphasen, Anaphasen und Telophasen bei der Kontrolle 8,1 : 4 : 1 : 2,8, während es bei den durch Irgafen gehemmten Wurzelspitzen 60 : 21 : 1 : 9 ist.

Durch die Einwirkung des Sulfonamids wird also die Zahl der Mitosen reduziert, und zwar ersehen wir aus dem Zahlenverhältnis der einzelnen Teilungsphasen, daß die eigentliche Störung der Kernteilung von der Metaphase an beginnt.

DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte sehr schön gezeigt werden, daß die Sulfonamide nicht nur die Mikroorganismen in ihren Stoffwechsel schädigen und so bakteriostatisch wirken, sondern daß auch die höhere Pflanze und speziell die isolierte Wurzel in Organkultur gleich reagiert.

Worauf beruht nun die bakteriostatische Erscheinung? Die Blockierung der Lebensvorgänge in einer Zelle beruht unter anderem auf einem Fehlen eines lebensnotwendigen Bestandteiles oder auch auf einem nicht aktionsfähig sein eines solchen. So muß bei einem heterotrophen Organismus nur der Wirkstoff, dessen Synthese der Organismus nicht ausführen kann, fehlen, um eine Unmöglichkeit des Wachstums oder eine Bakteriostase zur Folge zu haben. Bei einem autotrophen Organismus kann ein solcher statischer Effekt dadurch erfolgen, daß wir einen lebenswichtigen Bestandteil künstlich physikalisch oder chemisch so verändern, daß er nicht mehr aktionsfähig ist. Als physikalischen Eingriff wäre die durch Erhitzen erfolgte Koagulation der Proteine zu erwähnen, während wir als Beispiel einer chemischen Veränderung die Mercaptidbildung von Enzymen und die dadurch bedingte Hemmung der Fermenttätigkeit kennen. Diese chemische Blockierung kann meistens dadurch rückgängig gemacht werden, indem man die blockierte Substanz im Ueberschuß hinzufügt und somit das «vergiftende» Reagens absättigt. Gerade durch diese Enthemmung sind wir vielfach imstande, den Wirkungsort der Hemmung festzustellen. Ein klassisches Beispiel dieser Art wurde das Sulfonamid-Antisulfonamidproblem. Hier wurde erst durch das Sulfonamid das verdrängte und blockierte Vitamin, die p-Aminobenzoensäure entdeckt, während später durch die Befunde, daß Purine auch Antisulfonamidwirkung besitzen, der effektive Wirkungsort der Sulfonamide und damit der Grund der bakteriostatischen Wirkung gefunden wurde.

Die p-Aminobenzoesäure vermag also die Hemmung des Wurzelwachstums durch Sulfonamide vollständig aufzuheben, das heißt die höhere Pflanze reagiert gleich wie die Mikroorganismen. Nur das Konzentrationsverhältnis zwischen Sulfonamid und PAB ist unterschiedlich. Das Verhältnis zwischen Sulfonamid und PAB ist bei der Pisumwurzel ungefähr 1 bis 50, während dieses Verhältnis bei Mikroorganismen bedeutend größer, bis 1000 und mehr ist. Nun ist zu bedenken, daß wir auf der einen Seite ein Meristem, auf der andern Seite Einzelzellen haben, und daß die Oberflächenverhältnisse und Absorptionsverhältnisse somit ganz anders sind und dadurch diesen Unterschied bedingen können.

Andererseits ist die Empfindlichkeit der Wurzel in isolierter Organkultur gegenüber den Sulfonamiden beträchtlich und erreicht oder übertrifft sogar diejenige von Mikroorganismen. So benötigt Schöpfer [43] 80 γ Irgafen oder 140 γ Cibazol pro cm^3 um eine 50%ige Hemmung bei *Neurospora sitophila* (Mutante PAB) zu erzielen, und nach Wyß, Grubauch und Schmelkes [131] hemmen 3 γ Sulfathiazol pro cm^3 bei *Staph. aureus* und 6,5 γ bei *Esch. coli* das Wachstum um 50%, während Bonner [51] nur 2 γ Sulfathiazol pro cm^3 braucht, um das Wachstum der in Organkultur kultivierten Wurzeln von *Solanum lycopersicum* um 50% zu hemmen, und in unseren Versuchen eine Hemmung des Wurzelwachstums von *Pisum sativum* in steriler Organkultur um 50% mit einer Konzentration von 0,5 γ Irgafen und 1,5 γ Cibazol pro cm^3 erreicht wurde.

Auffallend waren nun die Ergebnisse mit p-Aminobenzoylglutaminsäure. Bei den meisten Resultaten an Mikroorganismen war die PABG von schwächerer Wirksamkeit als PAB. Bei der Pisumwurzel in steriler Organkultur scheint nun die p-Aminobenzoylglutaminsäure (PABG) eine größere Aktivität zu besitzen als PAB, jedenfalls in bezug auf das Trockengewicht. Die gegenüber dem Sulfonamid rund 1000mal kleinere PABG-Konzentration enthemmt die Wurzeln noch sehr deutlich, während die gleiche PAB-Konzentration gar keine Wirkung mehr zeigt. Wenn wir die beiden Enthemmungskurven von PAB und PABG miteinander vergleichen, so fällt auf, daß trotz der abnehmenden Konzentration von PABG das Maß der Enthemmung konstant bleibt. Es scheint also die p-Aminobenzoylglutaminsäure für die Wurzel ein besserer Antagonist der Sulfonamidwirkung zu sein als die PAB.

Aus diesen Ueberlegungen heraus sollte die Pteroylglutaminsäure als höherer Wirkstoffkomplex eine bessere Wirksamkeit besitzen als

PAB und eventuell sogar diejenige der PABG übersteigen. Die Ergebnisse bei den Mikroorganismen lauten anders; so ist die Aktivität der Folsäure 10- bis 100mal kleiner als PAB. In unseren Versuchen ist die Aktivität der Pteroylglutaminsäure ungefähr gleich groß wie diejenige der PAB, wobei wieder diese Erscheinung der Konstanz des Enthemmungsgrades auftritt. Vergleichen wir das Maß der Enthemmung durch eine PAB-Konzentration von $1 : 6 \cdot 10^8$ (1000mal kleiner als die Sulfonamidkonzentration) mit demjenigen der Pteroylglutaminsäure, so wirkt letztere deutlich stärker. Wir haben also ganz ähnliche Verhältnisse wie bei der p-Aminobenzoylglutaminsäure.

Wie steht es nun mit den Konzentrationsverhältnissen bei den Purinen und Nucleinsäuren? In unseren Versuchen wurde die Konzentration der Purine usw. 50mal größer gewählt als die Irgafenkonzentration. Daß aber zum Beispiel Adenin die gleiche Aktivität erreichen kann wie PAB zeigten die Versuche von Schöpfer [41]. Natürlich spielen Löslichkeits-, Resorptions- und Permeabilitätsverhältnisse sicher eine gewisse Rolle.

Vergleichen wir die Ergebnisse der Nucleinsäuren und ihrer Bausteine als Antagonisten der Sulfonamide bei den Mikroorganismen und bei unsern Versuchen, so fällt vor allem auf, daß bei der Pisumwurzel die Purinbase Adenin kein Antisulfonamid ist. Erst das Nucleosid, die Verbindung einer Pentose mit einer Purin- oder Pyrimidinbase, in unserem Falle die Verbindung von Adenin mit d-Ribose kann von der Wurzel als Antagonist gegen das Sulfonamid verwendet werden. Wird das Nucleosid mit Phosphorsäure verknüpft, erhalten wir das Nucleotid, also hier die Adenosinphosphorsäure oder Adenylsäure, welche die hemmende Wirkung der Sulfonamide vollständig aufzuheben vermag. Eigentlich sollte nun die Hefenucleinsäure als ein Polynucleotid auch wirksam sein, was aber in unseren Versuchen nicht der Fall war. Wahrscheinlich spielt aber bei der Wirksamkeit einer Substanz und ganz besonders bei einem differenzierten Meristem die Permeabilität eine große Rolle.

Von den Purinen wirkt einzig Guanin, während alle 3 geprüften Pyrimidinbasen aktiv waren. Besonders bemerkenswert ist die Wirkung von Thymin, wurde doch gerade hier von Winkler und de Haan die Verbindung mit der Pteroylglutaminsäure gezeigt. Die Tatsache, daß Guanin als 2-Amino-6-oxypurin wirksam ist, dagegen Hypoxanthin als 6-Oxypurin und Adenin als 6-Aminopurin nicht, zeigt die komplizierten Verhältnisse, die hier auftreten.

Die Wirkung der Sulfonamide auf die Wurzel äußert sich entsprechend der Bakteriostase in einem Stillstand des Längenwachstums, während die Bildung der Nebenwurzeln oft noch andauert, wie dies *Mangenot* und *Carpentier* zeigten. Durch diese «Rhizostase» ist auch das Trockengewicht vermindert, aber nicht proportional der Hemmung des Längenwachstums, da die gehemmte Wurzel auch dicker ist als die Kontrollwurzel. Diese Verdickung ist auf eine starke Zellwucherung speziell im Periblem zurückzuführen. Wenn wir auf der einen Seite eine Hemmung des Wachstums haben, andererseits eine Zellwucherung, so scheint das widersinnig zu sein. Aber die Hemmung des Wurzelwachstums zeigt sich vor allem in der Länge, während die Zellwucherung sich als Dickenwachstum äußert, indem die Periblemzellen diametral hypertrophieren. Auch beim Colchizin kennt man neben der Hemmung und Störung der Mitosen noch die sogenannten c-Tumoren. Ein Mitosegift bringt eben den ganzen Ablauf der Zellteilung in Unordnung, und zwar wird sich die Wirkung wahrscheinlich je nach der Art des Meristems verschieden äußern.

Die bisherigen Forschungen über das Sulfonamidproblem und unsere eigenen Versuche lassen die Möglichkeit erkennen, daß es neben der bekannten und experimentell bewiesenen Wirkung der Sulfonamide, die in der Verdrängung der PAB und der damit zusammenhängenden gestörten Biosynthese der Nucleinsäuren besteht, noch einen andern Wirkungsmechanismus geben könnte. Um diesen hypothetischen Gedanken zu erläutern, wenden wir uns kurz dem Problem der Mitosehemmung zu.

Die heute bekannten Zellkerngifte scheinen eine sehr verschiedene Wirkungsweise zu besitzen, da jedenfalls die pathologischen Erscheinungen sich ungleich äußern. Nach Ansicht von *Bauch* und *Geißler* können wir die Mitosegifte in 3 Typen einteilen: in die Spindelgifte, Zellteilungsgifte und Chromosomengifte. Andere Autoren wie *Marquart* sprechen von einer Ruhekerntgiftstörung, einer Spindelgiftstörung und einer unspezifischen physiologischen Störung, während *Heilmeyer* eine ganze Reihe von verschiedenen Wirkungstypen aufstellt. Man kann sich aber fragen, ob eine solche Unterscheidung zweckmäßig ist, und ob nicht die Konzentration des Mitosegiftes und der individuelle physiologische Zustand der vergifteten Zelle für das ungleiche Verhalten verantwortlich sei, und infolgedessen die Wirkungsweise eine mehr oder weniger ähnliche sei.

Die durch H. und R. L e t t r e [132] erbrachte Tatsache, daß die Wirkung der Mitosegifte vom Trypaflavintyp durch Nucleinsäuren (Hefe- und Thymonucleinsäure) aufgehoben wird, zeigt, daß der chemische Angriffspunkt der cytostatischen Stoffe die Nucleoproteide sind. In neueren Arbeiten konnte in Zellen, die mit Stilbamidin, einem Mitosegift, behandelt waren, eine Verbindung von Stilbamidin mit Desoxyribonucleinsäure nachgewiesen werden und damit der Grund der Mitosestörung gedeutet werden.

Kehren wir nun zu den Sulfonamiden und deren Wirkung auf die Pflanzenzelle zurück. Was uns bei unseren Versuchen überraschte, war die Tatsache, daß sich bei der enthemmten Wurzelspitze die Ribonucleinsäure auf Grund der cytochemischen Reaktion nach J e e n e r und B r a c h e t gleich verhält wie diejenige in den durch Sulfonamid behandelten Zellen. Die Ribonucleinsäure ist unter der Wirkung des Sulfonamids irgendwie verändert worden, und diese Änderung ist irreversibel und bleibt trotz der Enthemmung durch ein Antisulfonamid bestehen. Die chemische Veränderung der Ribonucleinsäure würde also darin bestehen, daß sich das Sulfonamid analog vom Trypaflavin oder Stilbamidin direkt mit der Ribonucleinsäure verbindet. Durch diese Blockierung der Ribonucleinsäure würde der cytostatische Effekt erfolgen. Damit hätten wir zwei verschiedene Wirkungsmechanismen der Sulfonamide, was manchen scheinbaren Widerspruch erklären könnte. So den Unterschied in der Wirkung von schwachen und starken Sulfonamidkonzentrationen.

Eine schwache Sulfonamidmenge wirkt vor allem auf die Reaktionskette PAB-Folsäure-Purin, was zum Stillstand des Wachstums führt. Eine solche Hemmung wird durch PAB oder ein anderes Antisulfonamid leicht und vollständig aufgehoben.

Bei einer stärkeren Sulfonamidkonzentration würde sich nun neben der bekannten Wirkungsart das Sulfonamid direkt mit der Ribonucleinsäure verbinden. Untersuchen wir durch Sulfonamid gehemmte Wurzelspitzen, ergibt sich eine deutliche Reduktion der Zellteilungen, aber keine Mitosestörungen. Wir hätten also hier im Sinne von M a r q u a r d t eine unspezifische, physiologische Störung.

An der normalen Zellteilung ist sicher nicht nur der Kern allein, sondern auch das ihn umgebende Cytoplasma beteiligt. Aus der Tatsache, daß mit Adenosinmonophosphorsäure die Sulfonamidhemmung gut aufgehoben wurde, mögen zwei Schlüsse gezogen werden.

Erstens läßt dies vermuten, daß bei der normalen Zellteilung von der Ribonucleinsäure Adenosinmonophosphorsäure abgespalten wird und irgendwie im Zellteilungsmechanismus gebraucht wird. Zweitens kann durch die Bindung des Sulfonamids mit der Ribonucleinsäure aus letzterer die Adenosinphosphorsäure nicht mehr abgespalten werden und die Zellteilung ist gestört. Durch Hinzufügen von freier Adenosinmonophosphorsäure wird das Wachstum, das heißt die Zellteilung, wieder hergestellt, obwohl der blockierte Nucleinsäurekomplex bestehen bleibt.

Bei einer starken Sulfonamidkonzentration würde diese direkte Sulfonamidwirkung vorherrschen und durch diese verstärkte Bindung, die wahrscheinlich auch die Desoxyribonucleinsäure erfaßt, haben wir nicht nur eine Verminderung der Zellteilungszahl, sondern nun auch eine deutliche Störung der Mitosen mit den Erscheinungen der Chromosomenverklumpungen wie sie P e t e r s und F u l l e r beschrieben.

Im Zusammenhang mit dieser direkten Sulfonamidwirkung könnte auch erklärt werden, warum die einen Sulfonamide wie Dimethylbenzoyl-sulfanilamid bedeutend besser enthemmt werden können, während die durch Sulfanilamidothiazol erfolgte Hemmung schlecht oder nicht vollständig aufgehoben werden kann. Sulfanilamidothiazol würde sich also viel besser mit den Nucleinsäuren verbinden können, oder dieser Nucleinsäurekomplex wäre viel beständiger, wodurch der Sulfonamidschaden nicht mehr ganz aufgehoben werden kann.

Diese letzten Betrachtungen mögen zeigen, daß das Problem über die Sulfonamide noch nicht abgeschlossen ist und immer weitere Ausblicke eröffnet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit untersuchte den Einfluß der Sulfonamide und Antisulfonamide auf die höhere Pflanze, und zwar ihre Wirkung auf die Wurzel in steriler Organkultur.

1. Nach einer Einleitung über die Entwicklung dieser Vitamin- und Antivitaminforschungen wird die Technik der Organkultur besprochen. Da die in der Nährlösung verwendete Saccharose durch Vitamine (so unter anderen PAB und Biotin) verunreinigt war, wurde versucht, sie durch einen gereinigten Zucker zu ersetzen. Es zeigte sich aber, daß nur die verunreinigte Saccharose «Siegfried» ein optimales Wachstum der Wurzeln ermöglichte.

2. Ein Versuch über den Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration bewies die starke Abhängigkeit des Wachstums der Pisumwurzeln in steriler Organkultur vom pH. Das Optimum liegt bei pH 5, dem Wert der verwendeten Nährlösung nach B o n n e r .
3. In einem Vorversuch wurde die Wirkung von Sulfanilamidothiazol (Cibazol) auf die sterile Wurzelkultur von 3 verschiedenen Dikotyledonen geprüft. Die Wurzeln von *Solanum lycopersicum*, *Foeniculum dulce* und *Pisum sativum* wurden durch Cibazol im Längenwachstum gehemmt. Die gehemmten Wurzeln waren deformiert, dicker und bräunlich verfärbt. Die Nebenwurzelbildung war bei *Foeniculum dulce* gefördert, während sie bei den andern Wurzeln gehemmt war. Dagegen war die Länge der Nebenwurzeln stets reduziert.
4. Im weiteren wurde die Aktivität verschiedener Sulfonamide geprüft, und zwar wurde ihre Wirkung auf das Wachstum von *Pisum sativum* festgestellt. Es zeigte sich, daß p-Aminophenyl-sulfamidomethyl-thiodiazol, Dimethylbenzoyl-sulfanilamid (Irgafen), Dimethyl-acroylsulfanilamid-Na (Irgamid) und Acetylsulfanilamid (Albucid) die stärkste Wirkung besitzen; etwas weniger aktiv ist Sulfanilamidothiazol (Cibazol). 6-Sulfanilamido-2,4-dimethylpyrimidin (Elkosin), Sulfanilylguanidin (Guanicil), Diaminodiphenylsulfon und p-Thioureido-benzensulfamidothiazol sind ungefähr halb so wirksam wie Sulfanilamidothiazol. 4-Aminophenylsulfonamid (Sulfanilamid), N-dimethyl-benzolsulfonsäureamid-4-sulfanilamid (Uliron) und Bernsteinsäure-halbamid-sulfanilamidothiazol sind in dieser Konzentration (10^{-5} molar) inaktiv.
5. In einem Konzentrationsversuch wurde Sulfanilamidothiazol in den Konzentrationen $1 : 5 \cdot 10^4$, 10^{-5} , $1 : 1,5 \cdot 10^5$, und $1 : 2 \cdot 10^5$ mol geprüft, wobei sich zeigte, daß alle Konzentrationen auf das Wachstum der Pisumwurzeln hemmend wirkten.
Die Konzentrationen von Dimethylbenzoyl-sulfanilamid $1 : 4 \cdot 10^5$, und $1 : 8 \cdot 10^5$ mol hemmten die Wurzeln von *Pisum sativum* in ihrer Entwicklung, während die Konzentrationen $1 : 1,6 \cdot 10^6$, $1 : 3,2 \cdot 10^6$ und $1 : 6,4 \cdot 10^6$ mol vollständig wirkungslos sind und auch keine fördernde Wirkung auf das Wachstum der Wurzeln zeigten.
6. Es wurde der Einfluß verschiedener Konzentrationen von p-Aminobenzoessäure (PAB) auf die Wurzelkultur von *Pisum sativum* ge-

prüft und festgestellt, daß das Längenwachstum durch die verwendeten Konzentrationen weder gehemmt noch gefördert wird. Das Trockengewicht, sowie die Zahl der Nebenwurzeln wird durch die stärkste Konzentration von PAB (10^{-4}) um 32 %, beziehungsweise um 43 % gehemmt, während die Konzentrationen 10^{-5} , 10^{-6} , und $1 : 2 \cdot 10^7$ mol keine Wirkung zeigen.

7. Die Hemmung des Wachstums der Wurzeln durch Sulfanilamidothiazol wird durch p-Aminobenzoesäure in einer Konzentration, die 16mal schwächer ist als diejenige des Cibazols, aufgehoben, und zwar bis zum 16. Kulturtag vollständig.

Die durch eine Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ mol gehemmten Pisumwurzeln wurden durch eine PAB-Konzentration von $1 : 6 \cdot 10^3$ mol nicht enthemmt, sondern im Trockengewicht hatten wir eine zusätzliche Hemmung. Bei der PAB-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^5$ haben wir eine 100 %ige Enthemmung. PAB $1 : 6 \cdot 10^6$ zeigt schwächere enthemmende Wirkung besonders im Längenwachstum, während das Trockengewicht deutlich enthemmt wird und die Zahl der Nebenwurzeln gefördert wird. Die PAB-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^7$ zeigt nur noch eine sehr schwache Enthemmung im Längenwachstum und im Trockengewicht, die Nebenwurzelzahl ist stimuliert.

8. Die durch eine Irgafenkonzentration von $1 : 6 \cdot 10^5$ gehemmten Pisumwurzeln werden durch p-Aminobenzoyl-glutaminsäure (PABG) in einer Konzentration von $1 : 6 \cdot 10^4$ vollständig enthemmt. Auch die 10mal schwächere PABG-Konzentration hebt die hemmende Wirkung des Irgafens deutlich auf. Die PABG-Konzentration $1 : 6 \cdot 10^6$, $1 : 6 \cdot 10^7$ und $1 : 6 \cdot 10^8$ mol sind in bezug auf die Enthemmung des Längenwachstums von sehr geringer Wirksamkeit, während die Hemmung des Trockengewichtes auch mit den schwächsten Konzentrationen von PABG relativ stark aufgehoben wird, wobei das Maß der Enthemmung konstant bleibt. Die Zahl der Nebenwurzeln wird durch die PABG leicht gefördert. Die PABG hat allein gar keine Wirkung auf das Wurzelwachstum.
9. Die durch Irgafen gehemmten Wurzeln wurden durch heiß sterilisierte Pteroylglutaminsäure in der Konzentration von $1 : 4,43 \cdot 10^5$ vollständig enthemmt. Die schwachen Konzentrationen ($1 : 4,43 \cdot 10^7$ und $1 : 4,43 \cdot 10^8$) weisen keine deutliche Enthemmung auf, während die Zahl der Nebenwurzeln leicht gefördert wird.

Die kalt sterilisierte Folsäure ($1 : 4,43 \cdot 10^5$) wirkt weniger stark enthemmend, doch ist die durch diese Lösung allein erzielte kleine Hemmung in Betracht zu ziehen.

10. Von Adenin, Guanin, Hypoxanthin, Xanthin, Thymin, Uracil, Cytosin, Adenosin, Adenosinphosphorsäure, Ribonucleinsäure und Thymonucleinsäure erzielten einzig Adenosinphosphorsäure und Guanin eine relativ sichere Enthemmung der Cibazolhemmung. Dieses Ergebnis wurde durch einen Versuch mit Vorbehandlung bestätigt.

Bei der Prüfung der Nucleinsäuren und ihrer Bausteine als Antagonisten des Irgafens hat Guanin als einzige Purinbase Antisulfonamidwirkung, während die Pyrimidinbasen Thymin, Uracil und Cytosin die Irgafenhemmung aufheben. Wenn wir berücksichtigen, daß Adenosin und Guanosin allein zu der Nährlösung zugesetzt, das Wurzelwachstum hemmen, so besitzt Adenosin deutlichen Antisulfonamidcharakter. Von Cytidinphosphorsäure, Adenosinphosphorsäure, Ribonucleinsäure und Thymonucleinsäure ist allein Adenosinphosphorsäure ein Antagonist der Sulfonamidwirkung.

11. Die Histologie der Wurzelspitze von *Pisum sativum* war nach der Behandlung mit Sulfanilamidothiazol deutlich verändert, und zwar war vor allem das Periblem deformiert und degeneriert.
12. Die Histologie der enthemmten Wurzel weist keine morphologischen Veränderungen mehr auf.
13. Die von Schöpfer bei *Saccharomyces* gefundenen Ergebnisse, daß die Ribonucleinsäure der mit Sulfonamid behandelten Zellen bedeutend rascher abgebaut wird als bei den Kontrollzellen, konnten bei isolierten Wurzelspitzen von *Pisum sativum* bestätigt werden.
14. Die durch Adenosinphosphorsäure enthemmte Wurzel ist nur histologisch und morphologisch wieder normal, in bezug auf die stoffliche Reaktion bleibt die Ribonucleinsäure gleich wie bei der gehemmten Wurzel.
15. Mit Irgafen behandelte Zellen weisen keinerlei Störungen in den Mitosestadien auf. Dagegen ist die Zahl der Mitosen deutlich reduziert.

Literatur

- 1 W. H. Schopfer, Arch. f. Mikrobiol. 5, 513, 1934.
- 2 A. und M. L w o f f, C. r. Soc. Biol. Paris, 126, 644, 1937.
- 3 W. H. Schopfer, Erg. Biol., 16, 1—172, 1939.
- 4 W. H. Schopfer, Z. Vitaminforsch., 16, 181, 1945.
- 5 B. C. J. G. K n i g h t, British J. Exp. Path., 16, 309, 1935.
- 6 E. F. M o l l e r, Z. physiol. Chem., 254, 285, 1938.
- 7 E. E. S n e l l, F. M. S t r o n g & W. H. P e t e r s o n, J. Amer. Chem. Soc., 60, 2825, 1938.
- 8 Weitere Literatur bei W. H. Schopfer, Plants and Vitamins, Waltham, Mass., USA, 1949.
- 9 B. C. J. G. K n i g h t und H. M c I l w a i n, Biochem. J., 32, 1241, 1938.
- 10 M. L a n d y, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 38, 311, 1938.
- 11 E. E. S n e l l und F. M. S t r o n g, Enzymologia, 6, 186, 1939.
- 12 E. F. M o l l e r, Angewandte Chem., 53, 204, 1940.
- 13 F. S c h u l t z, Z. phys. Chem., 265, 113, 1940.
- 14 — Z. phys. Chem., 272, 29, 1941.
- 15 W. H. S c h o p f e r, C. r. Soc. phys. hist. nat., Genève, 58, 58, 1941.
- 16 W. H. S c h o p f e r, Th. P o s t e r n a k und M^{lle} M. G u i l l o u d, Ant. van Leeuwenhoek, J. Microbiol. and Serol. 12, 133, 1947.
- 17 G. B. B r o w n und V. d u V i g n e a u d, J. Biol. Chem., 163, 761, 1946.
- 18 W. H. S c h o p f e r, Internat. Z. f. Vitforsch., XX, 116, 1948.
- 19 D. W. W o o l e y, J. Biol. Chem., 163, 481, 1946.
- 20 W. H. S c h o p f e r und E. C. G r o b, Arch. des Sciences, Soc. phys. hist. nat. Genève, 1, 524, 1948.
- 21 G. D o m a g k, Angew. Chem., 48, 657, 1935.
— Deutsch. Med. Wochenschr., 61, 250, 1935.
— Klin. Wochenschr., 15, 1585, 1936.
- 22 J. T r e f o u e l, M^{me} T r e f o u e l, F. N i t t i und D. B o v e t, C. R. Soc. Biol., Paris, 120, 756, 1935.
- 23 — C. R. Soc. Biol., Paris 122, 1221, 1936.
- 24 J. F o u r n e a u et M^{me} T r e f o u e l, F. N i t t i und D. B o v e t, C. R. Soc. Biol., Paris 122, 652, 1936.
- 25 J. S. L o c k w o o d, J. Immunol. 35, 155, 1938.
- 26 J. M c I n t o s h und L. E. H. W h i t b y, Lancet i, 431, 1939.
- 27 S t a m p, Lancet, 237, 10, 1939.
- 28 G r e e n, Brit. Journ. exper. Pathol., 21, 38, 1940.
- 29 D. D. W o o d s und P. F i l d e s, Chemistry and Industry, 59, 133, 1940.
- 30 D. D. W o o d s, Brit. J. exp. Path., 21, 74, 1940.
- 31 A. L w o f f, F. N i t t i, M^{me} T r e f o u e l und M^{lle} H a m o n, Ann. de l'Inst. Pasteur, 67, 1941.

- 32 Kuhn und Schwarz, Ber. D. chem. Ges., 74, 1617, 1941.
- 33 P. Fildes, Lancet., 1, 959, 1940.
- 34 Moeller, Agew. Chem., 53, 204, 1940.
- 35 S. D. Rubbo und J. M. Gillespie, Nature, 146, 838, 1940.
- 36 Auhagen, Z. physiol. Chem., 277, 197, 1943.
- 37 Wagner-Jauregg und Wagner, Z. Naturforsch., 1, 129, 1946.
- 38 J. O. Lampen und M. J. Jones, J. biol. Chem., 166, 435, 1946.
- 39 R. B. Angier und Mitarbeiter, Science, 103, 667, 1946.
- 40 D. D. Woods, Bull. d. l. Soc. de chimie biol. XXX, 11—12, 1948.
- 41 W. H. Schopfer und M. Guilloud, Helv. Physiol. Acta, 4, C 24, 1946.
- 42 W. H. Schopfer, Experientia, 2, 188, 1946.
- 43 W. H. Schopfer, Bull. de la Soc. de Chimie biol., XXX, 11—12, 748, 1948.
- 44 W. Shive und E. C. Roberts, J. Biol. Chem., 162, 463, 1946.
- 45 G. Mangenot und M^{lle} S. Carpentier, C. r. Soc. Biol., 135, 1053, 1057, 1152, 1941.
- 46 S. Wiedling, Naturwiss., 31, 114, 1943.
- 47 Stoll, C. r. Soc. Biol., 137, 170, 1943.
- 48 Hazard, C. r. Soc. Biol., 138, 972, 1944.
- 49 D. Macht, Proc. of the Soc. f. exp. Biol. and Med., 60/2, 217, 1945.
- 50 W. H. Schopfer und M. Guilloud, Verh. Schweiz. Nat. Ges. 143, 1946.
- 51 J. Bonner, Proc. Nat. Acad. of Sci. USA., 28, 321, 1942.
- 52 W. H. Schopfer und W. Anker, Experientia. V/3, 117, 1949.
- 53 G. Haberlandt, Sitz. Ber. Akad. Wiss., Wien, 111, 69, 1902.
- 54 W. Kotte, Ber. Dtsche. Bot. Ges., 40, 269, 1922.
- 55 W. J. Robbins, Bot. Gaz., 73, 376, 1922.
- 56 P. R. White, Plant. Physiol., 9, 585, 1934.
- 57 R. J. Gautheret, C. r. Acad. Sci., 198, 2195, 1934.
- 58 — C. r. Acad. Sci., 208, 118, 1939.
- 59 J. Bonner und P. S. Devirian, Amer. J. Bot., 26, 661, 1939.
- 60 W. J. Robbins und M. B. Schmidt, Proc. Nat. Acad. Sci., Wash., 25, 1, 1938.
- 61 J. Bonner, Amer. J. Bot., 25, 543, 1938.
- 62 J. Bonner, Plant. Physiol., 15, 533, 1940.
- 63 R. J. Gautheret, Manuel technique de culture des tissus végétaux, Masson, Paris, 1942.
- 64 P. R. White, Plant. Physiol., 4, 613, 1932.
- 65 R. Gautheret, C. r. séances Ac. Sci., 224, 410, 1947.
- 66 C. L. Fox und H. M. Rose, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 50, 142, 1942.
- 67 R. O. Roblin, Chem. Rev., 38, 255, 1946.
- 68 Ratner und Mitarb., J. biol. Chem., 155, 689, 1944.
- 69 K. C. Blanchard, J. biol. Chem., 140, 919, 1941.
- 70 J. O. Lampen und M. J. Jones, Arch. Biochem., 7, 277, 1945.
- 71 R. Kuhn und K. Schwarz, Ber. dtsch. chem. Ges., 74, B, 1617, 1941.
- 72 J. O. Lampen, L. A. Underkofler und W. H. Peterson, J. biol. Chem., 146, 277, 1942.
- 73 F. W. Chattaway und Mitarb., Biochem. J., 36, VI, 1942.
- 74 G. W. Beadle und E. L. Tatum, Amer. J. Bot., 32, 678, 1945.

- 75 J. O. Lampen, R. R. Roepke und M. J. Jones, *J. biol. Chem.*, 164, 789, 1946.
- 76 W. H. Schopfer, *Z. Vitaminforsch.*, 4, 187, 1935.
- 77 W. H. Schopfer, *Z. Vitaminforsch.*, 16, 181—296, 1945.
- 78 P. M. West und P. W. Wilson, *J. Bact.*, 37, 161, 1939.
- 79 M. G. Sevag, *Advances in Enzymol.*, 6, 33, 1946.
- 80 Anigstein und Bader, *Science*, 101, 591, 1945.
- 81 H. M. Rose und Mitarb., *J. Amer. med. Assoc.*, 129, 1160, 1945.
- 82 Hamilton, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 59, 220, 1945.
- 83 Snyder und Zarafonietis, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 60, 115, 1945.
- 84 Yeomans und Mitarb., *J. Amer. med. Assoc.*, 126, 349, 1944.
- 85 Greiff und Mitarb., *J. exp. Med.*, 80, 561, 1944.
- 86 Di Fonzo, *Boll. Soc. ital. biol. sper.*, 20, 832, 1945.
- 87 Landy und Mitarb., *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 52, 338, 1943.
- 88 Bird, *Nature*, 159, 33, 1947.
- 89 G. R. Goetschius und C. A. Lawrence, *J. Bact.*, 49, 575, 1945.
- 90 Jensen und Schmith, *Z. Immunforsch.*, 102, 261, 1942.
- 91 H. T. Schreus, *Klin. Wochenschr.*, 30, 671, 1942.
- 92 D. G. Evans, A. T. Fuller und J. Walker, *Lancet*, ii, 523, 1944.
- 93 C. A. Lawrence, *J. Bact.*, 49, 149, 1945.
- 94 J. T. Tamura, *J. Bact.*, 47, 529, 1944.
- 95 Peterson und Peterson, *Bact. Revs.*, 9, 49, 1945.
- 96 Niven und Sherman, *J. Bact.*, 47, 335, 1944.
- 97 T. H. Jukes und E. L. R. Stokstad, *Physiol. Rev.*, 28, 51, 1948.
- 98 D. A. Hall, *Biochem. J.*, 41, 287, 294, 1947.
- 99 J. J. Pfiffner, D. G. Calkins, E. S. Bloom und B. L. O'Dell, *J. Amer. chem. Soc.* 68, 1392, 1946.
- 100 R. C. Mills, G. M. Briggs, T. D. Luckey und C. A. Elvehjem, *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, 56, 240, 1944.
- 101 H. P. Sarett, *J. biol. Chem.*, 17, 265, 1947.
- 102 Tschesche, *Z. Naturforsch.*, 2 b, 10, 1947.
- 103 A. K. Miller, *Proc. Soc. exp. Biol., N. Y.*, 57, 151, 1944.
- 104 R. H. Nimmo-Smith und D. D. Woods, *J. gen. Microbiol.*, 2 x, 1948.
- 105 J. O. Lampen und M. J. Jones, *J. biol. Chem.*, 170, 133, 1947.
- 106 H. R. Morgan, *J. exp. Med.*, 88, 285, 1948.
- 107 Stockstad und Mitarb., *J. biol. Chem.*, 167, 877, 1947.
- 108 T. A. Loomis, R. S. Hubbard und E. Netter, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 47, 159, 1941.
- 109 H. T. Kohn und J. S. Harris, *J. Pharmacol.*, 73, 383, 1941.
- 110 G. J. Martin und C. V. Fischer, *J. Biol. Chem.*, 144, 289, 1942.
- 111 E. E. Snell und H. K. Mitchell, *Arch. Biochem.*, 1, 93, 1943.
- 112 K. C. Winkler und P. G. De Haan, *Arch. Biochem.*, 18, 97, 1948.
- 113 J. Brachet, *Arch. Biologie (Liège)*, 53, 207, 1941.
- 114 R. Jeener und J. Brachet, *Enzymologia*, 9, 222, 1943.
- 115 G. A. Kausche und F. Hahn, *Naturwissensch.*, 33, 188, 1946.
- 116 C. F. Robinow, «Addendum» do Dubos, R. J. «The Bacterial Cell» (Cambridge, Mass., Harvard Univers. Press, 1945).

- 117 E. Klieneberger-Nobel, *J. Hyg. Camb.*, 44, 99, 1945.
- 118 R. Tulasne, *C.r. Soc. Biol.*, 141, 411, 1947.
- 119 R. Tulasne und R. Vendrely, *Nature*, 160, 4059, 1947.
- 120 R. Vendrely und Lehoul, *C.r. Acad. Sci.*, 222, 1357, 1946.
- 121 R. Vendrely und J. Lipardy, *C.r. Acad. Sci.*, 223, 342, 1946.
- 122 A. F. Blakeslee, *C.r. Acad. Sci. (Paris)*, 205, 476, 1938.
- 123 — *Gard. Chron. III*, 103, 270, 1938.
- 124 O. J. Eigsti, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24, (2), 56, 1938.
- 125 O. J. Eigsti, *Genetics*, 27, 141, 1942.
- 126 H. P. Traub, *Jour. Hered.*, 32, 157, 1941.
- 127 J. J. Peters, *Bot. Gaz.*, 107, 390, 1946.
- 128 T. C. Fuller, *Bot. Gaz.*, 109, 177, 1947.
- 129 R. Bauch, *Naturwissensch.*, 33, 25, 1946.
- 130 R. Bauch, *Pharmazie*, 4, 1, 1949.
- 131 Wyss, Grubauch und Schmelkes, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49, 618, 1942.
- 132 H. und R. Lettre, *Naturwiss.*, 33, 283, 1947.

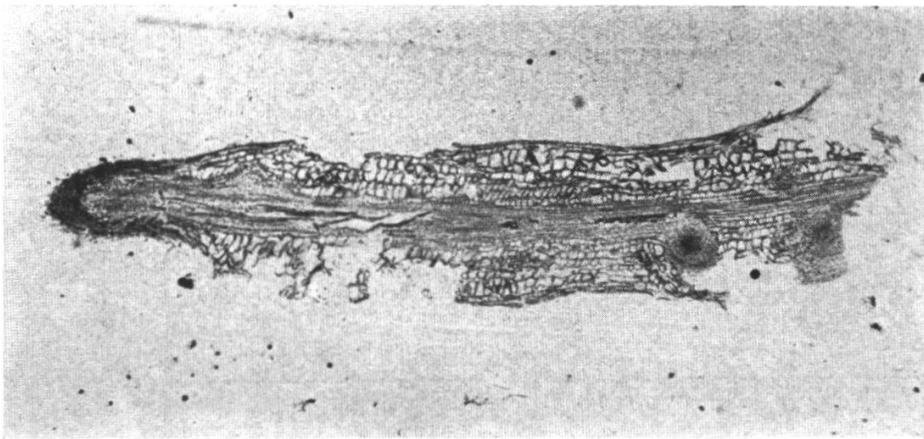
Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	55
Organkultur und Gewebekultur	59
Technik	61
Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration	65
Vorversuche über die Wirkung eines Sulfonamids auf die sterile Wurzelkultur dreier Dikotyledonen	
<i>Solanum lycopersicum</i>	68
<i>Foeniculum dulce</i>	69
<i>Pisum sativum</i>	70
Wirkung verschiedener Sulfonamide	71
Konzentrationsversuch zweier Sulfonamide	74
Sulfanilamidothiazol	74
Dimethylbenzoyl-sulfanilamid	75
Kurze Einleitung über die Beziehung zwischen Sulfonamid und p-Aminobenzoessäure	77
Die p-Aminobenzoessäure als Antagonist der Sulfonamide	
Die p-Aminobenzoessäure als Vitamin	78
Einfluß verschiedener PAB-Konzentrationen auf die Wurzelkultur von <i>Pisum sativum</i>	79
Die PAB als Antagonist der Sulfonamide	80
Enthemmung des Cibazols durch PAB	81
Enthemmung des Irgafens durch PAB	83
Die p-Aminobenzoyl-Glutaminsäure als Antagonist der Sulfonamide	84
Einfluß verschiedener PABG-Konzentrationen auf die Wurzelkultur von <i>Pisum sativum</i>	85
Enthemmung des Irgafens durch PABG	85

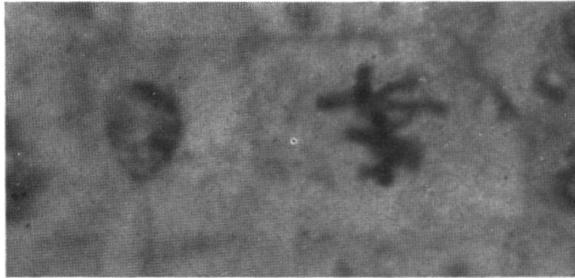
Die Folsäure als Antagonist der Sulfonamide	Seite
Die Folsäure als Vitamin	87
Die Pteroylglutaminsäure als Antagonist der Sulfonamide	88
Eigene Versuche mit Folsäure	89
Enthemmung der Irgafenwirkung durch Pteroylglutaminsäure	90
Die Nucleinsäuren und ihre Bausteine als Antagonisten der Sulfonamide	91
Die Wirkung der Purine, Pyrimidine, Nucleoside, Nucleotide und Nucleinsäuren auf das Wachstum der Wurzeln von <i>Pisum sativum</i>	93
Die Wirkung der Nucleinsäuren und ihrer Bausteine auf die Cibazolhemmung	94
Die Wirkung der Purine und Nucleinsäuren auf die Irgafenhemmung ...	97
Histologische und Cytologische Aspekte	99
Histologie der Wurzelspitzen von <i>Pisum sativum</i> nach der Behandlung mit Sulfanilamidothiazol	99
Histologie der enthemmten Wurzeln	101
Stoffliche Veränderung der Zelle unter der Einwirkung der Sulfonamide	101
Sulfonamidwirkung auf Zellteilung	104
Diskussion	107
Zusammenfassung	112
Literatur	116

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer am botanischen Institut der Universität Bern vom Herbst 1945 bis Frühjahr 1950 ausgeführt. Meinem sehr verehrten Lehrer möchte ich für sein stetes Interesse am Gang der Untersuchungen und für seine wertvolle Unterstützung herzlich danken.

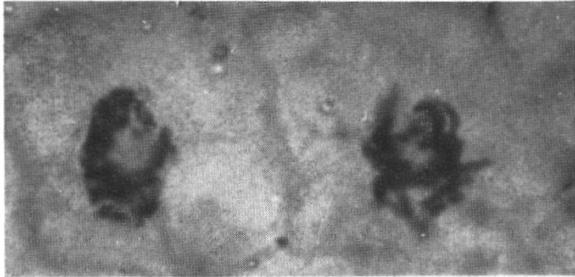
Den Firmen F. Hofmann-La Roche & Co. AG, Basel und Ciba AG, Basel verdanke ich die Ueberlassung von Substanzen und Produkten.



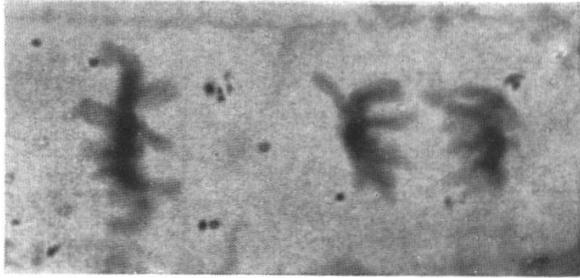
I



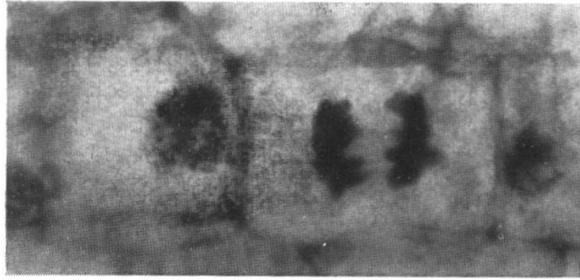
II



III

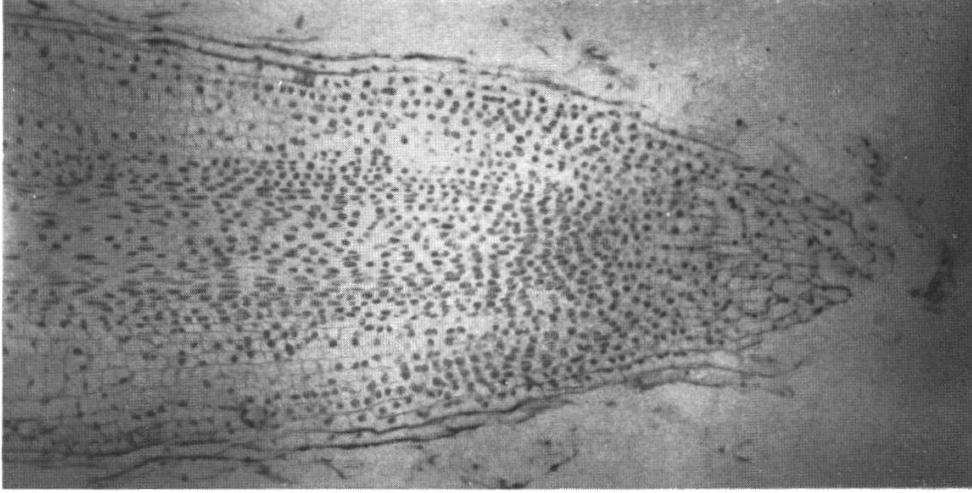


IV

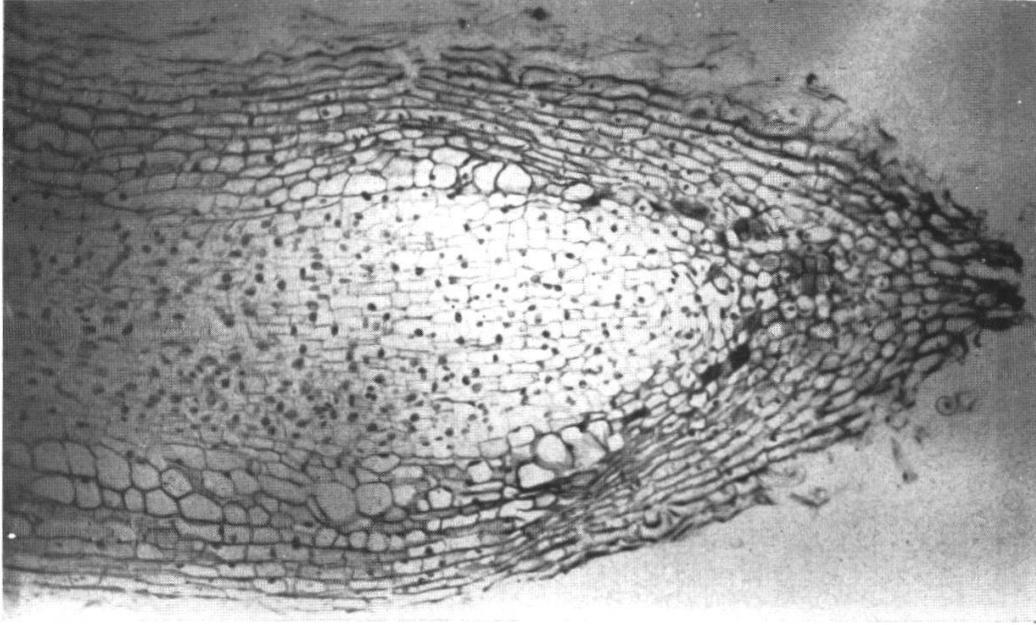


V

Mikroaufnahmen

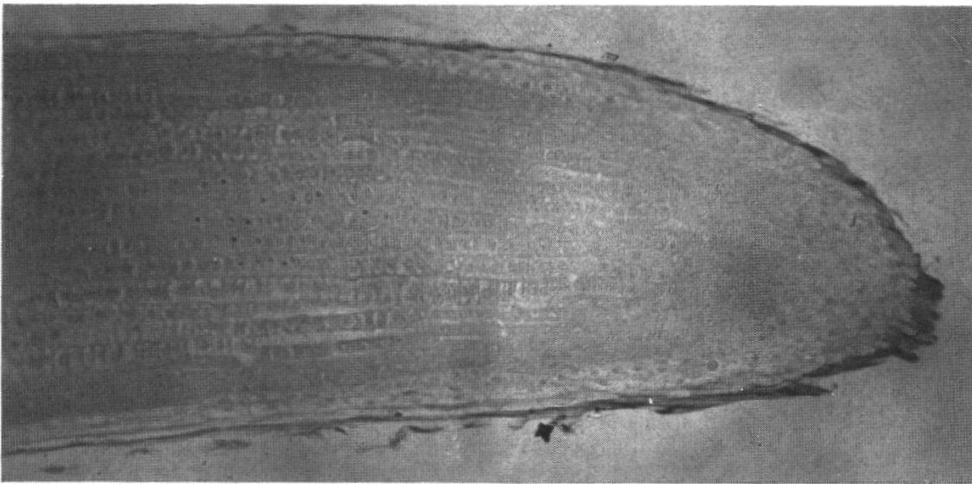


VIII



VII

Mikroaufnahmen



VI