

Die Nucleinsäuren und ihre Bausteine als Antagonisten der Sulfonamide

Objektyp: **Chapter**

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

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

PDF erstellt am: **22.07.2024**

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.

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.

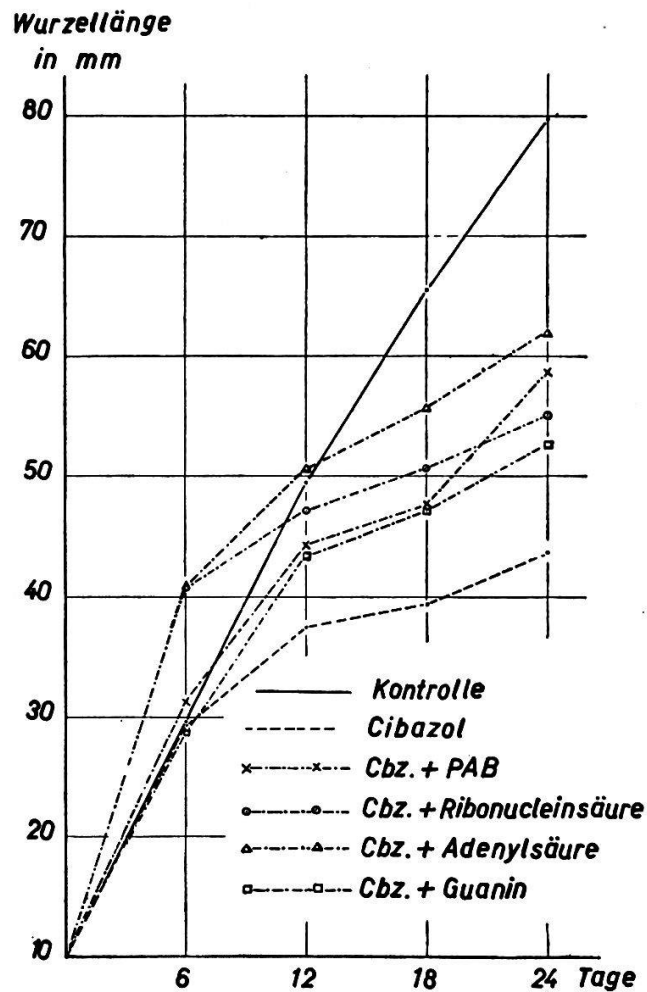


Fig. 11

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):