

Untersuchungen über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.

IV. Mitteilung: Hemmungswirkungen verschiedener
Antibiotica auf die Eiweißspaltung durch Papain.

Von O. Hoffmann-Ostenhof und E. Biach.

Aus dem 1. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 24. Mai 1946. Vorgelegt in der Sitzung am 27. Juni 1946.)

I. In der Hoffnung, auf diesem Wege Aufklärung über den antibakteriellen Wirkmechanismus verschiedener Antibiotica zu erhalten, haben wir in früheren Arbeiten die Hemmwirkung einer Reihe von Antibiotica, hauptsächlich Derivate des Benzochinons und der Naphthochinone, gegenüber der Aktivität der Urease und der Blutkatalase untersucht und darüber in den ersten beiden Mitteilungen dieser Reihe¹ berichtet. Gleichartige Versuche über die Hemmwirkung einer großen Anzahl von Chinonen auf die Aktivität der Carboxylase wurden schon vorher von R. Kuhn und H. Beinert durchgeführt, worüber K. Wallenfels in einem Sammelreferat² eine tabellarische Übersicht gibt. Durch Vergleich der von uns erhaltenen Wirkungsreihen gegenüber der Urease- und Katalaseaktivität mit den von A. E. Oxford³ und von E. F. Möller (ebenfalls in dem obengenannten Sammelreferat von K. Wallenfels referiert) erscheint es uns unwahrscheinlich, daß die Hemmungswirkungen gegenüber den genannten Fermenten in einem ursächlichen Zusammenhang mit der antibiotischen Wirkung dieser Substanzen stehen. Auch der von K. Wallenfels², vermutete Zusammenhang zwischen bakteriostatischer Wirkung und Hemmung der Carboxylaseaktivität erscheint uns zumindest sehr zweifelhaft.

Trotz dieser Befunde wäre es aber verfrüht, die Theorie abzulehnen, nach welcher die antibiotische Wirkung der genannten Substanzen auf deren spezifischen Hemmvermögen gegenüber irgend welchen für den Bakterienstoffwechsel notwendigen Fermentsystemen beruht. Es erscheint uns

¹ O. Hoffmann-Ostenhof und W. H. Lee, Mh. Chem. **76**, 180 (1946); O. Hoffmann-Ostenhof und E. Biach, *ibid.* **76**, 319 (1947).

² Chemie **58**, 1 (1945).

³ Chem. Ind. **61**, 189 (1942).

als unbedingt notwendig, vor einer endgültigen Entscheidung dieser Frage weitere zur enzymatischen Ausrüstung der Bakterien gehörige Enzymsysteme in gleicher Weise wie Urease, Katalase und Carboxylase durchzuprüfen. So liegen bisher noch keine entsprechenden systematischen Befunde über die Hemmwirkungen von Chinonen an den für den Bakterienstoffwechsel unerläßlichen Proteinasen vor; ebensowenig wurde über die Inhibitorwirkung verschiedener Chinone gegenüber irgend welchen Dehydrasen gearbeitet, obwohl es aus den Arbeiten von *H. Wieland* und Mitarbeitern⁴ bekannt ist, daß die Wirkung einer Reihe von Dehydrasen – so z. B. der Bernsteinsäuredehydrase aus dem Muskelgewebe, der Xanthindehydrase der Milch und des dehydrierenden Enzymsystems von *Acetobacter peroxydans* – durch den Grundkörper unserer Reihe gehemmt wird.

II. In dieser Mitteilung berichten wir über Hemmungsversuche an der Eiweißspaltung durch Papain, welche wir mit ungefähr denselben Substanzen durchgeführt haben, deren Wirkung auf die Aktivität der Urease und der Blutkatalase wir geprüft hatten. Wir wählten Papain als den Vertreter der Gruppe der Papainasen, deren Verhalten uns deshalb besonders interessiert hat, weil Fermente aus dieser Gruppe, neben ihrem fast ubiquitären Vorkommen in Pflanzen aller Arten, auch in vielen Bakterien vorgefunden wurden. Nach neueren Befunden von *E. Maschmann*⁵ gehören allerdings eine Reihe von bakteriellen Proteasen, welche man früher zu den Papainasen gerechnet hatte, nicht zu dieser Gruppe; aber auch *Maschmann*, der über Bakterienproteasen sehr ausführliche Untersuchungen durchgeführt hat, betont die Bedeutung des Papainasetypus bei den Bakterien.

Bei unseren Versuchen folgten wir der klassischen Bestimmungsmethode der Papainaktivität von *R. Willstätter* und *W. Grassmann*⁶; es wurde also der Zuwachs der COOH-Gruppen durch Titration mit alkoholischer KOH in alkoholischer Lösung unter Verwendung von Thymolphthalein als Indikator gemessen. Wir ließen die Eiweißspaltung bei optimaler Temperatur (40°) und auch bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration ($p_H = 5,0$) vor sich gehen. Als Enzympräparat wurde das käufliche Papayotin (*Schuchardt*) und als Substrat reinste Gelatine verwendet. Die Inhibitoren wurden sämtlich in Wasser gelöst und der Versuchslösung zugesetzt. Die Verwendung anderer Lösungsmittel bei den in Wasser sehr schwer löslichen Chinonen wurde wohl versucht; es traten aber dadurch unspezifische Hemmungen auf, so daß die erhaltenen Werte als unzuverlässig ausgeschieden werden mußten. Bei jeder Hemmsubstanz wurde deren Wirkung sowohl auf die Aktivität des unaktivierten Enzyms als auch auf die Aktivität einer nach *Willstätter* und *Grassmann* mit Blausäure aktivierten Lösung des Ferments gemessen.

III. Wir geben in nachfolgender Tabelle eine Übersicht über die von uns erhaltenen Werte:

⁴ Liebigs Ann. Chem. **477**, 1 (1929); **485**, 193 (1931); **492**, 156 (1932); **509**, 182 (1934); **535**, 205 (1938).

⁵ Vgl. hiezu das Sammelreferat *E. Maschmann*, Erg. Enzymforsch. **9**, 155 (1943).

⁶ Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **138**, 184 (1924).

Tabelle 1.

 Hemmung der Aktivität des Papains durch Chinone
 und andere Antibiotica.

Substanz	Perzentuelle Hemmung der Eiweißspaltung bei verschiedenen molaren Konzentration der Hemmstoffe im Versuchsansatz					
	mit HCN aktiviert			nicht aktiviert		
	10 ⁻³	10 ⁻⁴	ges. Lsg.	10 ⁻³	10 ⁻⁴	ges. Lsg.
Benzochinon	100	33	—	100	32	—
Toluchinon	82	24	—	71	25	—
p-Xylochinon	40	27	—	42	29	—
4-Methoxytoluchinon	18	3	—	18	4	—
2,6-Dimethoxychinon	0	—	—	0	—	—
2,5-Dimethoxychinon	0	0	—	0	0	—
Chlorbenzochinon	0	—	—	0	—	—
2,6-Dichlorchinon	0	31	—	0	40	—
2,5-Dichlorchinon	0	23	—	0	29	—
Trichlormethylchinon	0	0	31 (ca. 10 ⁻⁵)	0	0	24 (ca. 10 ⁻⁵)
Chloranil	0	0	0 (ca. 10 ⁻⁶)	0	0	0 (ca. 10 ⁻⁶)
Chloranilsäure	16	0	—	8	0	—
1,2-Naphthochinon	0	48	—	0	50	—
1,4-Naphthochinon	0	5	—	0	6	—
Lawson	0	0	—	0	0	—
Isonaphthazarin	0	0	—	0	0	—
Naphthazarin	0	0	(45)(ca.10 ⁻⁵)	0	0	(43)(ca.10 ⁻⁵)
Methylnaphthazarin	0	0	(21)(ca.10 ⁻⁵)	0	0	(25)(ca.10 ⁻⁵)
Penicillin	0	—	—	0	—	—
Salicylsäure	0	—	—	0	—	—

Zeichen und Abkürzungen: ges. Lsg. = gesättigte Lösung, in Klammern hinter den Werten die ungefähre molare Konzentration. 0 bedeutet: in dieser Konzentration unlöslich. Bezüglich der eingeklammerten Werte bei Naphthazarin und Methylnaphthazarin siehe weiter unten.

Die in der Tab. 1 angegebenen Hemmungswerte sind in allen Fällen Durchschnittswerte aus den nach vier verschiedenen Zeiten (2, 4, 7 und 24 Stunden) gemessenen und durch Vergleich mit einem ohne Hemmstoff angesetzten Blindversuch errechneten Werten der perzentuellen Hemmung. Die Methode zeichnet sich nicht durch besondere Genauigkeit aus; immerhin sind die Werte selbst bei Verwendung verschiedener Gelatinesorten mit einer Fehlergrenze von $\pm 5\%$ reproduzierbar, was für den von uns angestrebten Zweck, den Vergleich der Inhibitorwirkung der verschiedenen Substanzen, völlig ausreicht. Im Falle des Naphthazarins (5,8-Dioxy-1,4-naphthochinon) und des Methylnaphthazarins (2-Methyl-5,8-dioxy-1,4-naphthochinon) sind die erhaltenen Werte in Klammern gesetzt, weil diese beiden Substanzen dadurch die Beobachtung des Farbumschlags des Thymolphthaleins stören, daß sie selbst als Indikatoren fungieren und in einem ziemlich breiten p_H -Bereich ihre Farbe von Rot nach Blau ändern. Die für diese Substanzen angegebenen Werte bedürfen also noch der Nachprüfung vermittels einer anderen Methodik.

Obwohl die Absolutwerte der Hemmungen bei mit Blausäure aktiviertem Papain sehr stark verschieden sind von denjenigen bei nichtaktiviertem Papain, sind die perzentuellen Hemmungswerte innerhalb der Fehlergrenzen bei beiden gleich. Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß mit irgend einem Chinon gehemmtes Papain auch durch Zusatz einer beliebigen Menge von Blausäure nicht wieder völlig reaktiviert werden kann.

IV. Wie bei unseren früheren Versuchen über die Hemmbarkeit von Urease und Katalase durch dieselben Substanzen fanden wir auch bei diesen Messungen, daß die Hemmung der Papainaktivität in keiner Weise parallel zur antibakteriellen Wirksamkeit der untersuchten Substanzen ging. Auch eine Übereinstimmung mit der Höhe der Oxydations-Reduktionspotentiale der Chinone mit ihrer Hemmwirkung läßt sich nicht feststellen. Damit soll aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Hemmbarkeit des Papains durch die Chinone auf einer oxydierenden Wirkung der letzteren beruht; in einer vor kurzem durchgeführten Untersuchung haben wir gezeigt, daß selbst bei einer einfachen biochemischen Oxydation, wie es die Bildung des Methämoglobins durch Chinone sein dürfte, die Stärke der oxydierenden Wirkung, also der Methämoglobinbildung, durch verschiedene Chinone durchaus nicht mit dem Oxydations-Reduktionspotential dieser Substanzen parallel geht⁷.

Von den in 10^{-3} - und 10^{-4} -molarer Konzentration löslichen Abkömmlingen des p-Benzochinons erwies sich das Benzochinon selbst als der stärkste Inhibitor. Es folgen das Toluchinon und das p-Xylochinon. Die schwerer löslichen Dichlorbenzochinone entsprechen in 10^{-4} -molarer Lösung etwa dem Benzochinon bei derselben Konzentration; das besonders schwer lösliche Trichlormethylchinon zeigt noch in 10^{-5} -molarer Lösung starke Hemmwirkung und dürfte wohl der wirksamste Stoff der ganzen Gruppe sein. Kaum oder gar nicht hemmen dagegen die Mono- und Dimethoxyderivate des Benzochinons, obwohl sich gerade unter diesen Körpern die wirksamsten Antibiotica der Benzochinonreihe finden lassen.

Unter den Naphthochinonen zeigt wie bei allen bisher geprüften Systemen das 1,2-Naphthochinon die stärkste Hemmwirkung; es ist von allen in 10^{-4} -molarer Konzentration untersuchbaren Stoffen der stärkste Inhibitor. Sein 1,4-Isomerer steht ihm darin weit nach. Das Lawson und das Isonaphthazarin (2,3-Dioxy-1,4-naphthochinon) zeigen überhaupt keine Hemmwirkung. Die bei Naphthazarin und Methylnaphthazarin gefundenen Hemmungswerte können wir aus den oben angeführten Gründen nicht in den Kreis unserer Betrachtung ziehen.

Penicillin und Salicylsäure zeigten in den geprüften Konzentrationen keinerlei Hemmwirkung auf die Papainaktivität.

Bei Vergleich der erhaltenen Werte der Hemmung gegenüber Urease, Katalase und Papain können wir ziemlich weitgehende Ähnlichkeiten feststellen. Bei Urease und Papain kommt dieser Befund nicht überraschend, da ja festgestellt worden ist, daß diese Fermente im allgemeinen gleich-

⁷ O. Hoffmann-Ostenhof, W. Weis und O. Kraupp, Mh. Chem. 77, 86 (1947.)

artige Aktivierungs- und Hemmreaktionen geben⁸; man erklärt diese Ähnlichkeit durch die Beeinflußbarkeit von SH-Gruppen, welche, wie nachgewiesen wurde, bei beiden Enzymen für die Wirksamkeit wesentlich sind. Die Übereinstimmung des Verhaltens der Katalase läßt sich allerdings durch bisherige Befunde nicht erklären.

Über den Wirkmechanismus der Bakterienhemmung durch Chinone läßt sich nach den bisherigen Untersuchungen noch keine Aussage machen. Es ist notwendig, die Hemmwirkungen derselben Substanzen auf weitere Fermentsysteme zu prüfen. Versuche mit Desmolasen sind bereits im Gange.

Herrn Prof. *L. Ebert* danken wir für seine Unterstützung und sein Interesse für diese Arbeit. Herrn Priv. Doz. *J. W. Breitenbach* sind wir für die Überlassung einiger Substanzen, Frl. *G. Reitmaier* für die Synthese einiger Hemmstoffe zu Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

Es wurde die hemmende Wirkung verschiedener Antibiotica, hauptsächlich aus der Chinonreihe, auf die Eiweißspaltung durch Papain gemessen. Die Resultate ergaben, daß eine Übereinstimmung zwischen der Hemmung der Papainaktivität und der antibakteriellen Wirkung der untersuchten Substanzen besteht. Dagegen zeigten sich auffallende Analogien zwischen der Stärke der Hemmung beim Papain durch die einzelnen Substanzen und dem Einfluß derselben Stoffe auf die Aktivität von Katalase und Urease, über deren Messung in früheren Mitteilungen berichtet wurde.

⁸ Vgl. hierzu z. B. *Th. Bersin* in *Nord-Weidenhagen*, Handbuch der Enzymologie, Leipzig 1940, S. 156 ff.