

Der Einfluß von Chinonen auf verschiedene Stoffwechselfunktionen der Hefe.

(XV. Mitteilung über bakteriostatische Chinone und andere Antibiotica.)

Von

O. Hoffmann-Ostenhof und Else Kriz.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 4. April 1949. Vorgelegt in der Sitzung am 28. April 1949.)

Systematische Untersuchungen über die Wirkung von Chinonen auf einzelne Stoffwechselprozesse der lebenden Zelle liegen nur wenige vor. Zu erwähnen ist hier besonders eine Arbeit von *Meyerhof* und *Randall*¹ über den Einfluß von Adrenochrom und 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure auf Atmung und Glykolyse von *Trypanosoma equiperdum*, weiters eine Untersuchung von *Ball*, *Anfinsen* und *Cooper*² über die Hemmwirkung verschiedener 2-Oxy-3-alkyl-1,4-naphthochinone auf Atmungsvorgänge verschiedener Organismen (Bernsteinsäureoxydase aus Rinderherz, *Plasmodium knowlesi*, Hefe und Gewebsschnitte von Affenleber) sowie eine von uns kürzlich in dieser Reihe publizierte Mitteilung über den Einfluß verschiedener Chinone auf die Permeabilität von *Beta vulgaris* var. *rubra*, sowie auf die Phosphatresorption der Hefezelle³.

In der vorliegenden Arbeit sollen nun Untersuchungen über die Beeinflussung wesentlicher Stoffwechselfunktionen der Hefezelle, nämlich Gärung, Decarboxylierung von Brenztraubensäure, Atmung, Glykogenbildung, Gesamtlipoid- und Sterinbildung durch verschiedene Chinone beschrieben werden. Der Zweck dieser systematisch durchgeführten Versuche besteht darin, eine Korrelation zwischen den Wirkungen der Chinone auf diese Funktionen der lebenden Zelle und ihren hemmenden

¹ Arch. Biochem. 17, 171 (1948).

² J. biol. Chemistry 168, 257 (1947).

³ Mh. Chem. 79, 410 (1948).

Effekten auf das Wachstum der Hefe zu finden, wobei auch die Hemmwirkung der Chinone auf verschiedene isolierte Fermentsysteme, wie sie von anderen Autoren und auch von uns in mehreren Mitteilungen dieser Reihe beschrieben wurden, zu berücksichtigen sind.^{3a}

Methodik.

Gärung. Die Gärungsversuche wurden mit Oberhefe der Rasse „Red Star“, einem besonders widerstandsfähigen Stamm, vorgenommen. Die Hefe wurde für die Experimente folgendermaßen vorbereitet: 1 Öse voll Hefesuspension wurde je zweimal in 10 ccm Nährboden nach *Katznelson* (100 g Glucose, 30 g Pepton, 1 g KH_2PO_4 , 0,3 g MgSO_4 , 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl_2 ad 1000 ccm Wasser, p_{H} 5,6) 3 Tage lang bebrütet, die gewachsene Hefemenge abzentrifugiert und gewaschen.

Die Messungen erfolgten in der Manometeranordnung nach *Warburg*. Als Substrat wurde eine 0,5%ige Glucoselösung verwendet, welche in bezug auf Phosphatpuffer nach *Sørensen* $1/15$ molar war. Die auf die beschriebene Weise erhaltene Hefemenge suspendierten wir nun in 0,75 ccm der Substratlösung. Von dieser Suspension wurden 0,22 ccm in die Reaktionsgefäße eingefüllt und bei Versuchsbeginn 0,08 ccm der Lösung des Wirkstoffes — bei Blindversuchen die gleiche Menge Wasser — zugegeben. Die Gärversuche wurden bei 25° durchgeführt; die Messung des gebildeten CO_2 erfolgte in verschiedenen Zeitabständen.

Die gleichzeitig durch die Atmung stattfindende O_2 -Aufnahme kann bei den Ergebnissen der Gärversuche rechnerisch vernachlässigt werden, da Überprüfungen ergaben, daß der dadurch verursachte Fehler sehr gering ist und jedenfalls in die Fehlergrenze der Methodik fällt.

Decarboxylierung der Brenztraubensäure. Diese Versuche wurden mit einem Reinzuchtstamm von Unterhefe durchgeführt, welcher vor den Experimenten zweimal auf Nährboden von *Katznelson* überimpft worden war. Von der letzten Suspension entnahm man 5 ccm und überimpfte auf 100 ccm desselben Nährbodens im Pasteurkolben, dem 5 γ Thiamin pro Kubikzentimeter zugesetzt wurden, da es sich in Vorversuchen gezeigt hatte, daß ohne diesen Zusatz gezüchtete Hefe unter den gewählten Bedingungen nicht imstande war, Brenztraubensäure in meßbarer Menge zu decarboxylieren.

Nach 3 Tagen wurde der Inhalt des Pasteurkolbens abzentrifugiert und der Rückstand in 15 ccm einer $1/2$ %igen Lösung von Brenztraubensäure in Wasser aufgeschlämmt. Zur Messung des gebildeten CO_2 diente auch hier die Manometeranordnung nach *Warburg*. Für jeden Ansatz verwendeten wir 0,9 ccm der beschriebenen Hefesuspension, welcher 0,1 ccm der Wirkstofflösung — bei Blindversuchen 0,1 ccm Wasser — zugesetzt wurden. Die Messung erfolgte auch hier in verschiedenen Zeitabständen; die Versuchstemperatur war 25°.

Atmung. Die Atmungsversuche wurden mit Preßhefe bzw. Bierhefe vorgenommen. Die Hefe wurde gewaschen und in Wasser (0,04 g abgepreßte Hefe auf 1 ccm Wasser) suspendiert.

^{3a} *Anmerkung während der Korrektur:* Zur Zeit der Abfassung der vorliegenden Mitteilung waren uns die umfassenden Arbeiten von *Fieser* und Mitarbeitern über Antimalariamittel aus der Naphthochinonreihe (Übersicht: *J. Amer. chem. Soc.* **70**, 3151 [1948]) noch nicht zugänglich.

Die Messungen erfolgten ebenfalls in den *Warburg*-Manometern, wobei jeder Ansatz 0,5% Glucose, 0,5% Pepton und Phosphatpuffer nach *Sørensen* (p_H 6,8, $\frac{1}{15}$ -molar) sowie 0,25 ccm der beschriebenen Hefesuspension und 0,1 ccm Wirkstofflösung bzw. Wasser bei Blindversuchen enthielt. Im Mittelraum der Reaktionskölbchen befand sich zur Absorption von CO_2 ein Filterpapierröllchen, welches 0,2 ccm 3,5-n KOH aufgesaugt hatte. Der O_2 -Verbrauch wurde nach verschiedenen Zeitabständen gemessen und die Absolutwerte (Kubikzentimeter O_2) in üblicher Weise berechnet.

Glykogenbildung. Für diese Versuche verwendeten wir Bäckerhefe. Die Versuchsbedingungen entsprachen weitgehend denjenigen von *Brücke* und *Kaindl*⁴, deren Methodik eine Modifikation einer älteren von *Pflüger* darstellt.

Aus einer Hefesuspension, welche pro Ansatz 0,5 g Preßhefe, 1,5 ccm $\frac{1}{15}$ -molare Phosphatpufferlösung (p_H 6,8) sowie 1 ccm einer 10%igen Glucoselösung enthielt, wurden je 3 ccm entnommen und 2 ccm Wirkstofflösung, bzw. bei den Blindversuchen die gleiche Menge Wasser hinzugefügt. Hierauf ließ man die Ansätze unter guter Belüftung 5 Stunden lang im Thermostaten bei 25° stehen, gab dann 5 ccm 60%ige KOH hinzu und erhitze darauf 2 Stunden auf dem siedenden Wasserbad. Die entstandene Mischung wurde dann zur Ausfällung des Glykogens mit 1 ccm gesättigter Kochsalzlösung und 15 ccm 96%igem Alkohol versetzt und über Nacht stehen gelassen.

Am nächsten Tag wurde das ausgefällte Glykogen abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit dekantiert und der Rückstand in 20 ccm siedenden Wassers aufgenommen. Man säuerte dann mit HCl (Endkonzentration 2,5% HCl in der Lösung) an, worauf zur Hydrolyse des Glykogens 3 Stunden lang auf dem siedenden Wasserbad erhitzt wurde. Die Mischung filtrierte man durch ein ausgekochtes Filter, neutralisierte genau und ließ nach Auffüllen auf 50 ccm über Nacht stehen. Am darauffolgenden Tag wurde die Glucose in einem äquivalenten Teil nach *Hagedorn-Jensen* (Modifikation von *Fujita* und *Iwatake*^{4a}) titriert. Diese Methode hat gegenüber der von *Brücke* und *Kaindl* ausgeführten den Vorteil einer geringeren p_H -Empfindlichkeit, so daß kleine unvermeidliche Fehler beim Neutralisieren nicht so sehr ins Gewicht fallen. Die Werte sind mit einer Genauigkeit von 0,3 bis 0,4 mg Glykogen pro Gramm Hefe gut reproduzierbar.

Fett- und Sterinbildung. Je 10 g Bierhefe wurden gewaschen, in 100 ccm Nährlösung (20% Rohrzucker, 1,5% Pepton, 0,01% NaCl, 0,03% $MgSO_4$, 0,1% KH_2PO_4), in welcher der zu untersuchende Wirkstoff in entsprechender Konzentration gelöst war, suspendiert und 6 Tage lang bei 15° bebrütet.

Nach dieser Zeit wurde die Hefe abzentrifugiert, zweimal mit je 50 ccm Wasser gewaschen und filtriert. Zur Bestimmung der Gesamtlipoide diente die Methode von *Gorbach*⁵. Die Hefe wird in einem verkürzten Reagensglas mit 1 ccm Toluol versetzt, das Reagensglas verschlossen und 2 Tage autolysieren gelassen. Darnach wird der Rückstand bei 50° getrocknet, dann staubfrei zerrieben und schließlich 2 Stunden mit Äther extrahiert. Man füllt darauf den Extrakt in einen geeichten Rundkolben, dessen Gewicht bekannt ist, mit Äther auf 25 ccm auf und entnimmt davon 5 ccm zur Sterinbestimmung. Der Äther wird dann abgedampft, der Kolben im Exsikkator getrocknet und gewogen.

⁴ Wiener klin. Wschr. 59, 367 (1917).

^{4a} Biochem. Z. 242, 43 (1931).

⁵ Mikrochem. 12, 165 (1933).

Zur Sterinbestimmung wurde der Äther von der entnommenen Probe abgedampft und weiter nach *Bernhauer*⁶ verfahren: Der Rückstand wird in 5 ccm Benzol aufgenommen und mit einer Mischung von 2 ccm Essigsäureanhydrid und 6 Tropfen konzentrierter H_2SO_4 versetzt. Die Intensität der aufgetretenen Färbung mißt man nach 2 Minuten im Stufenphotometer (*Zeiß*). Als Vergleichsskala dient nach *Bernhauer* eine 0,05%ige wäßrige Lösung von Naphtholgrün B, welche 2 mg Ergosterin entsprechen soll.

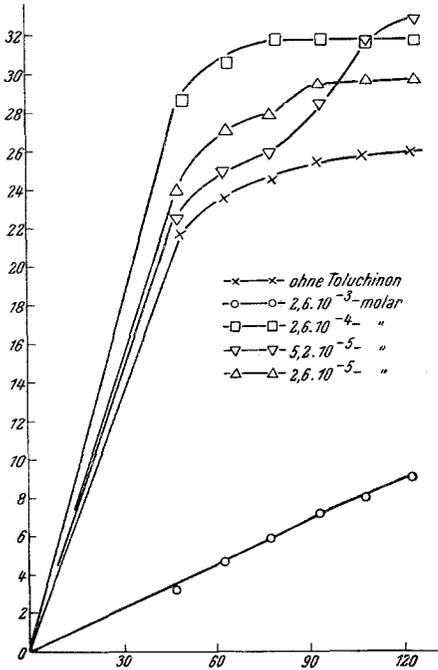


Abb. 1. Gärverlauf bei verschiedenen Konzentrationen von Toluchinon im Gäransatz. Abszisse: Zeit in Minuten. Ordinate: cmm entwickeltes CO_2 .

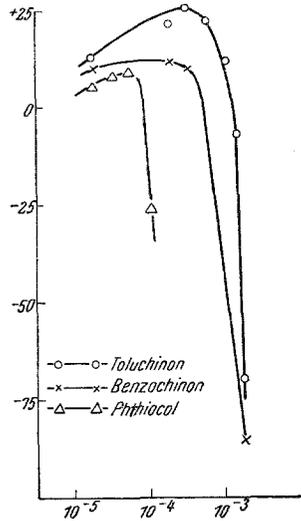


Abb. 2. Konzentrationsabhängigkeit der Gärungsbeeinflussung durch Chinone. Abszisse: molare Konzentration der Wirkstoffe. Ordinate: Prozentuelle Abweichung der CO_2 -Bildung vom Wert des unbeeinflussten Gärversuchs.

Ergebnisse.

Gärung. Die angewandten Chinone erwiesen sich in den Konzentrationen, in welchen sie ihre bekannten fungistatischen Wirkungen noch nicht entfalten, als *Gärungsförderer*. Dieser Effekt äußert sich in einer Erhöhung der endgültig gebildeten CO_2 -Menge, nicht aber in einer wesentlichen Beschleunigung des Gärvorganges.

Abb. 1 zeigt die erhaltenen Gärkurven für verschiedene Konzentrationen von Toluchinon. Diese verlaufen allgemein normal mit der Ausnahme, daß bei der Wirkstoffkonzentration von $5,2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l bei 77 bis 79% der entwickelten CO_2 -Menge (etwa 1 Stunde 15 Min.

⁶ Biochem. Z. 280, 388 (1935).

nach Versuchsbeginn) ein Wendepunkt eintritt. Dieser Effekt war in wiederholten Versuchen reproduzierbar, scheint aber bei geringer oder höheren Toluchinonkonzentrationen nur recht undeutlich oder gar nicht aufzutreten. Eine Erklärung für dieses Phänomen kann noch nicht gegeben werden.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Gärungsförderung ist in Abb. 2 wiedergegeben. Bei den meisten Chinonen ist es infolge ihrer geringen Wasserlöslichkeit unmöglich, den linken Ast der Kurve zu erhalten. Die Kurven der verschiedenen Chinone verlaufen fast durchwegs parallel und decken sich sogar in einigen Fällen (Toluchinon, *m*-Xylochinon, 2,6-Dimethoxybenzochinon und Thymochinon).

In Tabelle 1 sind die mit den verschiedenen Chinonen erhaltenen Daten bei mehreren Konzentrationen angeführt.

Tabelle 1. Der Einfluß verschiedener Chinone auf die Glucosevergärung durch Hefe (p_{H} 6,8; 25°; 3 Stunden; Reproduzierbarkeit der Methodik etwa $\pm 1,5\%$).

Substanz	Perzentuelle Abnahme (—) oder Zunahme (+) der gebildeten CO ₂ -Menge bei verschiedenen molaren Konzentrationen der Wirkstoffe				
	2,6 · 10 ⁻³	2,6 · 10 ⁻⁴	2,6 · 10 ⁻⁵	1 · 10 ⁻⁵	1 · 10 ⁻⁶
Benzochinon	— 85	+ 11	+ 9	—	—
Toluchinon	— 71	+ 23	+ 14	—	—
<i>m</i> -Xylochinon	—	+ 21	+ 13	—	—
4-Methoxytoluchinon	—	+ 19	+ 10	—	—
Thymochinon	—	+ 25	+ 16	—	—
1,4-Naphthochinon	—	—	—	— 52	—
1,2-Naphthochinon	—	—	—	—	+ 27
2-Chlor-3-oxy-1,4-naphthochinon	—	+ 20	+ 4	—	—
Phthiocol	—	— 26	+ 7	—	—
Naphthazarin	—	—	—	—	+ 27

Decarboxylierung der Brenztraubensäure. In Übereinstimmung mit den Befunden von *Kuhn* und *Beinert*⁷ über die Beeinflussung hochgereinigter Präparate von Brenztraubensäuredecarboxylase durch Chinone fanden wir auch bei lebender Hefe eine deutliche, wenn auch geringe Hemmung der Carboxylaseaktivität. Nur einige wenige Derivate des 1,4-Naphthochinons zeigten eine stärkere Beeinflussung der Brenztraubensäuredecarboxylierung.

Atmung. Sämtliche Chinone erwiesen sich als Hemmstoffe der Hefeatmung. Die durch die Substanzen bewirkte Verringerung der O₂-Aufnahme war bei Unterhefe allgemein größer als bei Oberhefe, wobei noch

⁷ Ber. dtsch. chem. Ges. 80, 102 (1947).

zu beachten ist, daß die absolute Atmungsgröße der Unterhefe nur etwa 20% derjenigen der Oberhefe entspricht.

Die Abhängigkeit der Atmungshemmung von der Chinonkonzentration ist für den Fall des Toluchinons in Abb. 3 wiedergegeben.

Tabelle 2. Hemmung der Decarboxylierung von Brenztraubensäure durch lebende Hefe bei verschiedenen Konzentrationen von Chinonen (ungepuffert in 0,5%iger wäßriger Brenztraubensäurelösung; 25°; 3 Stunden; Fehlergrenze der Methodik $\pm 1,5\%$).

Substanz	Prozentuelle Verringerung der CO ₂ -Bildung bei verschieden molarer Konzentration der Chinone im Versuchsansatz		
	1 · 10 ⁻³	1 · 10 ⁻⁴	1 · 10 ⁻⁵
Benzochinon	52	3	0
Toluchinon	48	0	0
4-Methoxytoluchinon	—	19	0
2,6-Dimethoxybenzochinon	—	6	0
m-Dichlorchinon	—	7	0
p-Dichlorchinon	—	9	0
Chloranil	—	—	19
1,2-Naphthochinon	—	2	0
2-Chlor-1,4-naphthochinon	—	—	0
2-Methyl-1,4-naphthochinon	—	5	0
Lawson	—	90	15
Phthiocol	—	19	5
Naphthazarin	—	49	11
2,3-Dichlor-1,4-naphthochinon	—	0	0

Die Zeit-Umsatz-Kurven verlaufen vorerst geradlinig und werden mit fortschreitender Zeit etwas steiler. Dieser Effekt dürfte durch eine während der Versuchszeit stattfindende geringfügige Vermehrung der Hefezellen verursacht werden. In den mit Chinon beschickten Ansätzen ist diese Abweichung von der Geradlinigkeit etwas größer, was sich durch die große Wasserdampf- flüchtigkeit der Chinone erklären läßt. Diese reichern sich während des Versuches allmählich in der zur Absorption des entstehenden CO₂ dienenden KOH im Mittelteil der Reaktionsgefäße an, wodurch die hemmende Chinonkonzentration im Versuchsansatz verringert wird.

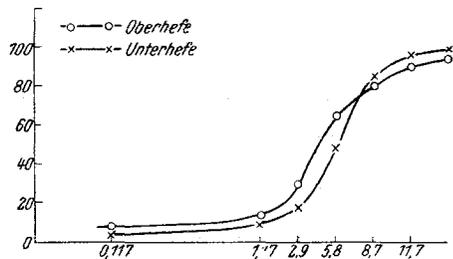


Abb. 3. Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Hefeatmung durch Toluchinon. Abszisse: Konzentration des Wirkstoffes in $\alpha \cdot 10^{-4}$ -molar. Ordinate: Prozentuelle Atmungshemmung.

In den Tabellen 3 und 4 sind die erhaltenen Hemmwerte der Atmung von Oberhefe bzw. Unterhefe bei verschiedenen Chinonkonzentrationen wiedergegeben.

Tabelle 3. Der Einfluß verschiedener Chinone auf die Sauerstoffaufnahme durch Oberhefe (p_H 6,8; 25°; 3 Stunden; Fehlergrenze der Methodik $\pm 1,5\%$).

Substanz	Perzentuelle Hemmung der O_2 -Aufnahme bei verschieden molarer Konzentration der Wirkstoffe		
	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$
Benzochinon	82,6	9,3	7,0
Toluchinon	97,5	11,0	7,2
m-Dichlorchinon	—	—	5,4
p-Dichlorchinon	—	5,9	5,0
4-Methoxytoluchinon	—	0	0
Chloranil	—	—	5,4
1,4-Naphthochinon	—	—	0
1,2-Naphthochinon	—	—	18,5
2-Chlornaphthochinon	—	—	10,6
2-Methyl-1,4-naphthochinon	—	—	9,4
2,3-Dichlornaphthochinon	—	—	8,3
Lawson	—	—	0
Phthiocol	—	—	6,5
Naphthazarin ⁸	—	68,7	10,8

Tabelle 4. Der Einfluß verschiedener Chinone auf die Sauerstoffaufnahme durch Unterhefe (gleiche Bedingungen wie bei Tabelle 3).

Substanz	Perzentuelle Hemmung der O_2 -Aufnahme bei verschieden molarer Konzentration der Wirkstoffe		
	$1,17 \cdot 10^{-3}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$
Benzochinon	88,9	15,4	8,4
Toluchinon	93,6	14,5	13,9
m-Dichlorchinon	—	31,4	14,6
p-Dichlorchinon	—	—	15,5
4-Methoxytoluchinon	—	10,0	8,4
2-Chlornaphthochinon	—	—	27,6
2-Methylnaphthochinon	—	—	27,6
Naphthazarin	—	—	26,8
Phthiocol	—	—	6,9

Die p_H -Abhängigkeit dieser Effekte wurde bei Toluchinon und Naphthazarin an Oberhefe untersucht. Es zeigte sich, daß die Maxima der durch diese Stoffe verursachten Atmungshemmungen etwa beim

⁸ In 3%iger alkoholischer Lösung im Versuchsansatz.

Neutralpunkt liegen. Die absolute Atmungsgröße steigt nach *Borei*⁹ mit sinkendem p_{H} an, was auch Kontrollversuche bestätigten. Die p_{H} -Abhängigkeit der Atmungshemmung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5. p_{H} -Abhängigkeit der Atmungshemmung bei Oberhefe durch Toluchinon und Naphthazarin (gleiche Bedingungen wie bei Tabelle 3).

p_{H}	Perzentuelle Hemmung der O_2 -Aufnahme bei verschiedenen molarer Konzentration der Wirkstoffe				
	Toluchinon			Naphthazarin	
	$8,7 \cdot 10^{-4}$	$5,8 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-4}$	$1,17 \cdot 10^{-5}$
5,2	81,7	45,3	7,0	62,8	4,9
5,6	81,2	41,4	7,0	61,2	10,9
6,2	84,4	47,4	9,0	65,7	10,1
6,8	86,4	50,2	11,0	68,7	10,8
7,4	89,7	52,1	12,8	70,5	12,4
8,0	88,7	46,4	—	49,0	7,5

Schließlich wurden auch Versuche durchgeführt, welche die Frage klären sollten, ob die Chinone in dieselbe Reaktionsfolge bei der Atmung der Hefe eingreifen wie das Cyanidion. Zu diesem Zwecke wurde eine Hefefraktion mit derjenigen Menge KCN behandelt, welche gerade 50%ige Hemmung der Hefeatmung bewirkt und zu diesem Versuchsansatz nunmehr die Chinone in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6. Hemmung der Atmung der Oberhefe durch Chinone mit und ohne Cyanidzusatz (gleiche Bedingungen wie bei Tabelle 3; „Cyanid“ bedeutet immer, daß der Versuchsansatz in bezug auf KCN $8 \cdot 10^{-4}$ molar ist).

Substanz	Perzentuelle Hemmung der O_2 -Aufnahme bei verschiedenen molarer Konzentration der Chinone					
	$1,17 \cdot 10^{-3}$		$1,17 \cdot 10^{-4}$		$1,17 \cdot 10^{-5}$	
	mit Cyanid	ohne Cyanid	mit Cyanid	ohne Cyanid	mit Cyanid	ohne Cyanid
Benzoehinon ...	78,2	82,6	10,1	9,3	3,0	7,0
Toluchinon	88,4	97,5	11,0	11,0	6,2	7,2
Naphthazarin ..			69,0	68,7	8,2	10,8
Phthiocol			62,0	58,0	2,0	6,5

Die perzentuelle Verringerung der O_2 -Aufnahme der Hefe ist also durch den Zusatz von Cyanidionen nur wenig beeinflussbar. In manchen Fällen ist sogar die cyanidvergiftete Hefe weniger chinonempfindlich

⁹ Biochem. Z. 316, 160 (1944).

als die nicht vorbehandelte, was vielleicht eine Reaktion zwischen Cyanid und Chinon vermuten läßt. Jedenfalls kann von einer Addition der Effekte nicht die Rede sein, was dafür spricht, daß Chinon und Cyanid an derselben Reaktionsreihe angreifen.

Glykogenbildung. Die von uns verwendete Bäckerhefe enthielt ursprünglich zwischen 25 und 30 mg Glykogen pro Gramm Hefe; diese Menge stieg in Blindversuchen unter den im methodischen Teil geschilderten Bedingungen auf

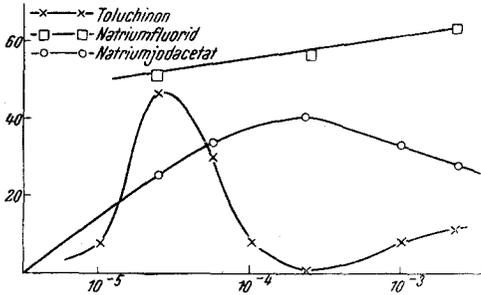


Abb. 4. Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Glykogenbildung der Hefe durch Toluchinon, Natriumfluorid und Natriumjodacetat. Abszisse: Molare Konzentration der Wirkstoffe. Ordinate: Prozentuelle Hemmung der Glykogenbildung.

35 bis 45 mg. Bei Zugabe der Chinone zeigte sich nun eine Hemmung der Glykogenbildung, welche in einer bemerkenswerten Weise von der Chinonkonzentration abhängig war: der Hemmeffekt war bei etwa $4 \cdot 10^{-5}$ -molarer Konzentration der Wirkstoffe im Versuchsansatz am stärksten und fiel nach

beiden Seiten der Konzentrationsreihe ab.

Diese Verhältnisse sind in Abb. 4 wiedergegeben. Zum Vergleich sind auf dieser Abbildung auch die entsprechenden Kurven für zwei Hemmstoffe anderer Gruppen, nämlich Jodacetat und Natrium-

Tabelle 7. Prozentuelle Hemmung der Glykogenbildung bei Bäckerhefe durch verschiedene Chinone (p_H 6,8; 25° ; 5 Stunden; Fehlergrenze der Methodik $\pm 4\%$).

Substanz	Prozentuelle Hemmung der Glykogenbildung bei verschieden molarer Konzentration der Wirkstoffe			
	$4 \cdot 10^{-3}$	$4 \cdot 10^{-4}$	$4 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Toluchinon.....	10	0	47	8
4-Methoxytoluchinon.....	—	10	59	9
2,6-Dimethoxychinon.....	—	16	52	0
p-Xylochinon.....	—	13	62	10
m-Xylochinon.....	—	18	52	4
p-Dichlorchinon.....	—	—	6	0
m-Dichlorchinon.....	—	—	7	—
Thymochinon.....	—	7	26	—
1,4-Naphthochinon.....	—	—	—	55
1,2-Naphthochinon.....	—	—	—	0
2-Chlornaphthochinon.....	—	—	44	—
2-Chlor-3-oxynaphthochinon.....	—	33	50	—
Naphthazarin.....	—	—	—	0

fluorid aufgenommen. Wie man sieht, zeigt sich bei Jodacetat ein analoges Maximum der Hemmwirkung bei einer um eine Zehnerpotenz höheren Konzentration, während im Falle des Fluorids eine annähernd lineare Konzentrationsabhängigkeit gefunden wird.

In Tabelle 7 sind nun die Hemmungswerte für verschiedene Konzentrationen der einzelnen Chinone wiedergegeben. Die Werte für das Benzochinon erwiesen sich als nicht reproduzierbar, was mit der großen Zersetzlichkeit des Grundkörpers unserer Reihe erklärbar sein dürfte.

Fett- und Sterinbildung. Der Gesamtgehalt an Lipoiden schwankt bei der von uns verwendeten Hefeart zwischen 2 und 2,9%. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen steigt er auf 2,5 bis 3,8%. Sämtliche Werte sind auf das Trockengewicht der Hefe bezogen. Der Sterinanteil der Lipoidfraktion beträgt im Durchschnitt 17% und sinkt während des unbeeinflussten Versuches auf 14 bis 15%.

Einige Chinone zeigen einen deutlich je nach Konzentration verschiedenen Einfluß auf die Lipoidbildung durch Hefe. Konzentrationen dieser Chinone unter 10^{-4} -molar in der Nährlösung bewirken vermehrte Lipoidbildung, während höhere Konzentrationen (ab 10^{-3} -molar) eine Hemmung verursachen. Eine Anzahl untersuchter Chinone (Benzochinon, 2,6-Dimethoxybenzochinon, 1,2-Naphthochinon und 1,4-Naphthochinon) hatten in keiner untersuchten Konzentration einen Einfluß auf die Gesamtlipoidbildung.

Tabelle 8. Einfluß verschiedener Wirkstoffe auf die Gesamtlipoidbildung durch Unterhefe. Steigerung (+) oder Hemmung (—), ausgedrückt in Prozenten des Gesamtlipoidgehaltes der unbeeinflussten Hefe (p_{H} 5,6; 15°; 5 Tage Versuchsdauer; Fehlergrenze der Methodik $\pm 3\%$).

Substanz	Molare Konzentration der Wirkstoffe		
	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$
Toluchinon	— 13	+ 32	+ 22
4-Methoxytoluchinon	0	+ 12	+ 5
Naphthazarin	—	—	+ 11
Natriumarsenat	— 33	— 10	0
Natriumjodacetat	— 36	— 28	— 24
Invertseife	+ 25	+ 8	+ 5

Zum Vergleich wurden auch Wirkstoffe anderer Gruppen auf ihren Einfluß auf die Lipoidsynthese unter den angewandten Bedingungen untersucht. Dabei erwiesen sich Natriumarsenat und Jodacetat als Hemmstoffe der Lipoidbildung, während eine Substanz vom Typus der Invertseifen, das Stearyldimethylbenzylammoniumchlorid, eine deutliche Steigerung bewirkte.

Auch bei längerer Züchtung der Hefe in den Wirkstofflösungen erhält man sehr ähnliche Resultate. Die nach 12tägiger Bebrütung mit den Wirkstoffen erhaltenen Werte stimmen innerhalb der Fehlergrenze der Methodik mit den in Tabelle 8 berichteten überein.

Der Einfluß der Chinone auf die Zusammensetzung der Lipoidfraktion ist weitaus bedeutender als derjenige auf die Menge der erzeugten Lipide. Die darauf geprüften Chinone erhöhen in niedrigeren Konzentrationen allgemein den Sterinanteil der Lipoidfraktion, wobei das Maximum dieses Effektes bei zirka 10^{-5} -molarer Konzentration der Wirkstoffe liegt. Die anderen untersuchten Wirkstoffe setzen hingegen allgemein den Sterinanteil herab.

Tabelle 9. Einfluß verschiedener Wirkstoffe auf den Steringehalt der Hefe. Steigerung (+) oder Abnahme (—) in Prozenten des Steringehaltes der Lipoidfraktion unbehandelter Hefe (p_{H} 5,6; 15°; 5 Tage Versuchsdauer; Fehlergrenze der Methodik $\pm 4\%$).

	Molare Konzentration der Wirkstoffe			
	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$
Benzochinon	+ 28	+ 35	+ 50	0
Toluchinon	0	+ 7	+ 29	0
4-Methoxytoluchinon	0	+ 18	+ 34	0
1,4-Naphthochinon	—	—	+ 12	0
1,2-Naphthochinon	—	—	—	+ 9
Naphthazarin	—	—	+ 35	—
Natriumarsenat	— 13	— 11	— 8	—
Natriumjodacetat	— 27	— 34	— 17	—
Invertseife	— 22	— 8	— 6	—

Diskussion.

Bevor wir die möglichen Beziehungen zwischen dem Einfluß der Chinone auf die hier besprochenen Systeme und der antibiotischen Wirkung bzw. andere schon bekannte Effekte derselben Substanzen diskutieren, sollen hier noch die wesentlichsten Ergebnisse jeder Versuchsanordnung kurz behandelt werden.

Eine gärungsfördernde Wirkung der Chinone scheint in der Industrie bereits bekannt zu sein; allerdings ist es uns mit der einzigen Ausnahme eines kurzen Hinweises in einem Lehrbuch neuesten Datums¹⁰ nicht gelungen, eine diesbezügliche Literaturstelle nachzuweisen.

Bei Betrachtung der Tabelle 1 fällt zuerst auf, daß die einzigen Chinone, welche in Konzentrationen von über 10^{-3} -molar im Versuchsansatz löslich sind, unter diesen Umständen eine starke Hemmung der Gärung bewirken. Diese hohen Konzentrationen erwiesen sich in den

¹⁰ A. Rippel-Baldes, Grundriß der Mikrobiologie. Berlin 1948.

Wachstumsversuchen¹¹ als nicht nur fungistatisch, sondern auch als fungizid und dieser Wirkung können wir auch den Hemmeffekt auf die Gärung zuschreiben. In subletalen Konzentrationen sind alle untersuchten Chinone mit Ausnahme des 1,4-Naphthochinons ausgesprochene Gärungsförderer; eine Erklärung für das unerwartete Verhalten des 1,4-Naphthochinons kann nicht gegeben werden.

Die Gärungsförderung läßt sich nun auf zwei Weisen erklären: entweder aktivieren die Chinone eines oder einige der vielen am Gärungsprozeß beteiligten Enzymsysteme oder sie verschieben das bestehende Gleichgewicht zwischen Glucosevergärung und Reservekohlenhydratbildung.

Gegen die erste Möglichkeit spricht vor allem, daß wir es hier nicht mit einer Beschleunigung des Gärungsvorganges sondern nur mit einer Erhöhung der gebildeten Menge CO₂, also des einen Endproduktes der Gärung, zu tun haben, wobei der Gärungsprozeß mit ungefähr der gleichen Geschwindigkeit wie im Blindversuche vor sich geht. Im Falle einer Aktivierung von einem oder mehreren der am Gärungsvorgang beteiligten Enzyme wäre wohl auch mit einer Beschleunigung zu rechnen.

Jedenfalls sprechen die später zu diskutierenden Hemmungen der Glykogenbildung bei analogen Konzentrationen der Wirkstoffe sehr dafür, daß der zweite oben erwähnte Grund für die Gärungsförderung verantwortlich sein wird, wengleich zwischen den beiden Versuchsreihen keine gute Übereinstimmung in der Reihung der einzelnen Chinone besteht. Dies läßt sich aber zwanglos mit den wesentlich verschiedenen Versuchsbedingungen der Messungen erklären.

Es muß übrigens betont werden, daß wir noch nicht wissen, ob die Bildung von Alkohol, also des zweiten Endproduktes der Gärung, unter Chinoneinwirkung ebenfalls eine Vermehrung erfährt; es wäre z. B. möglich, daß dasjenige Ferment, welches H₂ von DPN · H₂ auf Acetaldehyd überträgt (nach den verschiedenen Nomenklaturen als Alkoholdehydrase, Acetaldehydreductase oder am besten als DPN · H₂-Acetaldehydtranshydrase bezeichnet), gehemmt ist und die Reaktion nur bis zur Stufe des Acetaldehyds geht, welcher dann von der Zelle anderwärtig verwertet wird. Diese Frage wird in künftigen Versuchen geklärt werden müssen.

Die Tatsache, daß die Brenztraubensäure-Decarboxylierung durch Chinone — auch in den Konzentrationen, in welchen Gärungsförderung beobachtet wird — gehemmt wird, zeigt, daß es sicherlich nicht dieser Teilprozeß der Gärung ist, welcher für die berichtete Gärungsförderung verantwortlich gemacht werden kann. Als bemerkenswert sind die durch die Oxynaphthochinone an der Brenztraubensäure-Decarboxylierung bewirkten Hemmeffekte zu erwähnen.

¹¹ Vgl. die vorhergehende Mittlg.

Die Untersuchungen über den Einfluß der Chinone auf die Atmung der Hefe zeigen, daß nicht nur die beiden von *Balls* und Mitarbeitern² auf diese Wirkungen untersuchten zwei 2-Oxy-3-alkylnaphthochinone, sondern auch fast alle anderen Chinone eine Hemmwirkung auf die Atmung der Hefe zeigen. Ebenso wie bei den Wachstumsversuchen erwies sich auch hier die Unterhefe als der empfindlichere Organismus. Unsere Messungen mit cyanidvorbehandelter Hefe lassen annehmen, daß die Chinone in derselben Kette der Atmungsfermente eingreifen wie das Cyanid, was gut mit der Vorstellung von *Balls*², daß der Angriffspunkt der Chinone etwas unter dem Potential des Cytochroms c liegt, übereinstimmt.

Im übrigen dürfte den Effekten der Wirkstoffe auf die Hefeatmung keine wesentliche Bedeutung für das Zustandekommen der antibiotischen Wirkungen der Substanzen zukommen, da die Atmung für die Hefe ja eine vergleichsweise weniger wichtige Lebensfunktion darstellt, und wohl der größte Anteil des Energiebedarfs der Mikroorganismen durch die Gärungsvorgänge gedeckt wird. Außerdem sind die beobachteten Hemmeffekte — außer bei den schon letal wirkenden Konzentrationen — nicht sehr groß.

Eine wesentlich größere Bedeutung schreiben wir den bei den Versuchen an der Glykogenbildung erhaltenen Ergebnissen zu. Wie schon erwähnt wurde, ist ein Zusammenhang zwischen der Förderung der Glucosevergärung und der Hemmung der Bildung des Reservekohlenhydrats durchaus denkbar. Beide Prozesse gehen ja von derselben Ausgangssubstanz, dem Glucose-6-phosphat, aus, welches nach den derzeitigen Vorstellungen¹² einerseits mit dem *Cori*-Ester (Glucose-1-phosphat) und darüber hinaus mit dem Glykogen und andererseits mit Fructose-6-phosphat und mit den darauffolgenden Stufen der Gärungsreihe bis zur Brenztraubensäure im Gleichgewicht steht. Die beiden beschriebenen Effekte lassen sich also in der Weise deuten, daß eines der beiden Fermente, welche das Gleichgewicht zwischen Glykogen und Glucose-6-phosphat katalysieren, in seiner Wirksamkeit gehemmt ist. Eine Untersuchung über die Einwirkung der Chinone auf diese beiden Enzymsysteme, Phosphoglucomutase und Phosphorylase, ist geplant.

Die merkwürdige Form der für das Beispiel des Toluchinons in Abb. 4 wiedergegebenen Dosiswirkungskurven, welche ein Maximum der Hemmung bei einer etwa $4 \cdot 10^{-5}$ -molaren Konzentration der Chinone mit einem steilen Abfall nach beiden Seiten zeigen — analoge Effekte beobachten wir auch bei der Gesamtlipoidbildung und bei der Sterinbildung —, läßt sich aus den Gegebenheiten der Versuche erklären. Es werden nämlich hier die Glykogenmengen pro Gewichtseinheit Hefe

¹² Vgl. z. B. O. *Meyerhof*, Exper. 4, 169 (1948).

gemessen, ohne daß das während der Versuchsdauer eingetretene Wachstum berücksichtigt wird. Hohe Chinonkonzentrationen hemmen ja, wie wir wissen, weitgehendst das Wachstum der Hefe und verlangsamen auch die übrigen Stoffwechselforgänge, wodurch die ursprüngliche Zusammensetzung der Hefezellen erhalten bleibt, während bei niedrigeren Konzentrationen die Menge der Zellen vermehrt wird, die Gesamtmasse der Zellen aber durch die Hemmung der Glykogenbildung glykogenärmer ist.

Die Versuche über den Einfluß der Chinone auf die Bildung der Lipoide wurden unter Bedingungen durchgeführt, welche möglichst die Produktion von Fetten als Degenerationsprodukten ausschalten sollten. Wir waren uns der Tatsache bewußt, daß aus der Kenntnis der Chinonwirkungen auf Lipoid- und Sterinbildung kaum irgendwelche Rückschlüsse auf andere Lebensfunktionen gezogen werden können, da über den Mechanismus der Bildung dieser Stoffe durch die Mikroorganismen noch zu wenig bekannt ist.

Trotzdem erscheinen uns die Ergebnisse, daß Chinone in subletalen Konzentrationen eine nicht unwesentliche Vermehrung der Gesamtlipoidbildung und besonders des Sterinanteils der Lipoide bewirken, als interessant, wobei es bemerkenswert ist, daß die Sterinfraktion bei Chinonkonzentrationen von 10^{-5} -molar ein ähnliches Maximum zeigt, wie wir es bei der Hemmung der Glykogenbildung beobachten konnten. Es besteht einige Wahrscheinlichkeit, daß Sterine von den Mikroorganismen aus C_2 -Körpern aufgebaut werden¹³. Ein Kausalzusammenhang zwischen der erhöhten Sterinbildung, der Gärungsförderung und der verringerten Glykogenproduktion ließe sich dann etwa so vorstellen, daß die entsprechend der geringeren Bildung des Reservekohlenhydrats vermehrte Gärung natürlich auch eine erhöhte Bildung von Acetaldehyd mit sich bringt, welcher aber nicht vollständig zu Äthylalkohol reduziert wird, sondern teilweise vielleicht über einen zweiten noch unbekanntes C_2 -Körper zu Sterinen aufgebaut wird. —

Wenn wir nun nach dieser Gesamtübersicht über unsere Resultate versuchen, Beziehungen zwischen ihnen und unseren früheren Ergebnissen aufzufinden, so müssen wir vor allem feststellen, daß wir bisher einzig allein für die verschiedenen Effekte der Chinone bei hohen Konzentrationen (größer als $5 \cdot 10^{-4}$ -molar) mit einiger Wahrscheinlichkeit einen einheitlichen Mechanismus der Wirkungen feststellen können. Für diesen Konzentrationsbereich dürften die eiweißkoagulierenden Wirkungen der Substanzen verantwortlich sein.

Bei niedrigeren Konzentrationen liegen die Verhältnisse unvergleichlich komplizierter. Keines der hier untersuchten Systeme zeigt irgendwelche deutlichen Zusammenhänge mit den in der vorhergehenden Mit-

¹³ Vgl. hierzu *A. Kleineller, Adv. Enzymology* 8, 331 (1948).

teilung berichteten Wachstumshemmungen. Auch zwischen den bisher durchgeführten Versuchen an isolierten Fermentsystemen und den hier beschriebenen Versuchsreihen lassen sich kaum Übereinstimmungen finden. Hingegen wurde durch die Beobachtung, daß die Chinone die Gärung fördern, unsere seinerzeitige Annahme³ bestätigt, daß die Phosphatresorption der Hefezelle unter Chinoneinfluß deswegen erhöht wird, weil die Gärung und damit der Phosphatverbrauch gesteigert werden. Eine weitere, den Phosphatverbrauch steigernde Komponente dürfte auch die Verringerung der Glykogenbildung sein, denn der Endprozeß der zum Glykogen führenden Reaktionsreihe verläuft unter Abspaltung anorganischen Phosphats, das also bei einer Hemmung der Polysaccharidbildung der Zelle nicht mehr im gleichen Ausmaß zur Verfügung steht.

Wir sind zur Zeit dabei, unsere damaligen Versuche unter Verwendung radioaktiven Phosphors zu wiederholen und hoffen, auf diese Art Resultate zu erhalten, welche uns gestatten, eine überschlagsmäßige Phosphatbilanz aufzustellen, um damit unsere Vorstellungen weiter zu bekräftigen.

Was nun die mangelnde Übereinstimmung der hier berichteten Ergebnisse mit denjenigen der Wachstumsversuche betrifft, so erscheint uns dieses Resultat durchaus nicht als verwunderlich. Wir haben schon seinerzeit¹⁴ in einer kurzen Mitteilung betont, daß die Chinone sehr reaktionsfreudige und daher recht unspezifisch wirkende Substanzen sind, welche eine große Anzahl von Fermentsystemen zu beeinflussen vermögen. Welches System nun für eine bestimmte Wirkung auf eine biologische Funktion, wie z. B. Wachstum, Kohlenhydratstoffwechsel, Atmung oder Reservestoffbildung, maßgeblich beeinflußt wird und somit den dominanten Faktor für den Effekt darstellt, scheint bei jeder einzelnen Lebensfunktion und wahrscheinlich auch bei Verwendung verschiedener Chinone verschieden zu sein. Es dürfte also tatsächlich so sein, daß in jedem einzelnen Falle einer Chinonwirkung — in subletaler Konzentration — der beobachtete Effekt die Resultierende einer Anzahl von Fermentbeeinflussungen ist. Nur ein sehr weitgehendes Studium der Einwirkung auf verschiedene Einzelsysteme aus einem Organismus unter weitgehend gleichartigen Versuchsbedingungen kann eine Aufklärung über die Beteiligung der einzelnen Komponenten an der zu untersuchenden Erscheinung ermöglichen.

Jedenfalls spricht alles dagegen, daß die antibiotischen Effekte von Chinonen das Resultat einer einzelnen Wirkung auf spezifische Akzeptorgruppen der Zelle sind, wie es seinerzeit *Cowell* und *McCall*¹⁵ annahmen,

¹⁴ Science (New York) **105**, 549 (1947).

¹⁵ Science (New York) **101**, 592 (1945); J. Bacteriol. **51**, 659 (1946).

welche die Reaktion der Substanzen mit den Sulphydrylgruppen der Enzymproteine für die Effekte allein verantwortlich machten.

Zusammenfassung.

In der vorliegenden Mitteilung werden Untersuchungen über die Wirkung von Chinonen auf verschiedene Zellfunktionen der lebenden Hefe berichtet. Hiernach werden die Glykogenassimilation und die Atmung der Hefe durch bestimmte, auch subletale Konzentrationen der Substanzen wesentlich gehemmt, wohingegen die Gärung, die Bildung von Lipoiden — und hier besonders des Sterinanteils — von den meisten Chinonen in analogen Konzentrationen merklich gefördert werden.

In der Diskussion wird versucht, Zusammenhänge zwischen den hier berichteten Resultaten untereinander und mit den in früheren Versuchen erhaltenen Ergebnissen aufzufinden.