

Allgemeine Einleitung

Objektyp: **Chapter**

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

Band (Jahr): **10 (1953)**

PDF erstellt am: **11.08.2024**

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.

ROLF LOUIS

Untersuchungen über die Biosynthese einiger wasserlöslicher Vitamine der B-Gruppe, insbesondere der Pantothersäure

I. Allgemeine Einleitung

Die letzten Jahrzehnte biologischer Forschung brachten uns in den verschiedenen Teilgebieten der Wirkstofflehre ganz bedeutende Fortschritte.

Zu Beginn lag das Hauptgewicht mehr auf der Konstitutionsaufklärung der neuentdeckten Substanzen, später aber versuchte man, in den Wirkungsmechanismus der Wirkstoffe näher einzudringen. Die genaue Kenntnis der Struktur gab dem Forscher die Möglichkeit in die Hand, die einzelnen Wachstumsfaktoren auf ihre Konstitutionsspezifität hin zu prüfen. Darüber hinaus erkannte man in den letzten Jahren, daß unter Umständen chemische Veränderungen am Molekül eines Wirkstoffes dessen günstigen Einfluß auf die Entwicklung von Organismen nicht nur aufheben, sondern Substanzen entstehen lassen, die geradezu das Wachstum unterbinden. Wir gelangen so von einem Wuchsstoff zu einem ausgesprochenen Hemmstoff. In der Forschung werden unter dem Begriff der *Antivamine* alle jene Substanzen zusammengefaßt, die als Antagonisten der Vitamine auftreten können.

Unter der Wirkung eines Antivitamins werden, dank dessen Eigenschaften, das normale Eingreifen des Vitamins in den Stoffwechsel zu verhindern, in der Zelle grundlegende Lebensvorgänge gestört oder blockiert und als Folge davon Entwicklung und Fortpflanzung weitgehend oder vollständig gehemmt. Es ist klar, daß aus diesen Gründen den Antivitaminen eine enorme praktische Bedeutung als bakteriostatische, baktericide und insekticide Stoffe zukommt.

Ein schönes Beispiel für solche Vitamin — Antivitamin-Verhältnisse stellen die Sulfonamide dar. Man bemerkte, daß diese Substanzen auf

Mikroorganismen entwicklungshemmend, also bakteriostatisch, wirkten, und schloß daraus, daß die Sulfonamide in irgendeiner Weise die Ernährung dieser Organismen störten. Später konnte beobachtet werden, daß die Sulfonamide ihre Wirkung *in vitro* nur dann entfalten konnten, wenn sie in kleiner Menge verabreicht wurden oder wenn das Milieu kein Pepton enthielt, und man gelangte zur Überzeugung, daß gewisse Substanzen existieren müssen, die in der Lage sind, die Wirkung der Sulfonamide auszulöschen. 1940 gelang es WOODS und FILDES (1) und WOODS (2), den gesuchten Stoff mit *p*-Aminobenzoesäure (PAB) zu identifizieren, und durch die Isolierung von PAB aus der Hefe durch KUHN und SCHWARZ (3) ließen sich die bisherigen Ergebnisse bestätigen. PAB stellt ein lebensnotwendiges Vitamin dar.

Die Ähnlichkeit in der chemischen Struktur von PAB und dem Grundkörper der Sulfonamide, der *p*-Aminobenzolsulfosäure, fand ihren Niederschlag in der Verdrängungshypothese von WOODS (4). Bald wurden auch noch andere Substanzen mit Antisulfonamidcharakter entdeckt. So erwies sich die *p*-Aminobenzoylglutaminsäure (PABG) als wirksames Antisulfonamid; daneben aber auch Stoffe ohne irgendeine chemische Verwandtschaft mit PAB, wie Purine und Nucleinsäuren. Aus verschiedenen Versuchen über die Wirkung der Purine, vor allem Adenin, als Antisulfonamide (5, 6, 7) schließt SCHOPFER, daß PAB in die Synthese der Purine eingreift; daher wird bei der Verdrängung von PAB deren Synthese gestört. SHIVE und ROBERTS (8) kommen, unabhängig von SCHOPFER, zu den gleichen Schlüssen und fanden außerdem in durch Sulfonamid gehemmten Kulturen eine Vorstufe der Purine angehäuft.

Der erste Versuch über die Sulfonamidwirkung bei höheren Pflanzen stammt von FOURNEAU und Mitarbeitern (9) und betrifft die Keimung von Kressesamen. In einer grundlegenden Arbeit zeigten MANGENOT und CARPENTIER (10), daß die Sulfonamide das Längenwachstum der Wurzel von *Pisum sativum* hemmen und starke histologische Veränderungen hervorrufen. Weitere Ergebnisse stammen von WIEDLING (11), STOLL (12), HAZARD (13), MACHT (14) und SCHOPFER (15).

Alle diese Versuche wurden mit Wurzeln unternommen, die noch mit den Kotyledonen in Verbindung standen. Erst durch die Möglichkeit, isolierte Wurzeln zu kultivieren, wird jeglicher Einfluß durch Wirkstoffe aus den oberirdischen Teilen einer Pflanze ausgeschaltet. Die Untersuchungen von BONNER (16) über die Wirkung von Sulfonamiden auf das Wachstum isolierter Tomatenwurzeln zeigten klar, daß die Wurzel ein außerordentlich günstiges Testobjekt darstellt.

Eine eingehende Arbeit über die Wirkung von Sulfonamiden und ihren Antagonisten auf das Wachstum von *Pisum* Wurzeln in steriler Organkultur wurde 1951 von ANKER (17) veröffentlicht. Er prüfte die wachstumshemmende Wirkung zahlreicher Sulfonamide, die Möglichkeit der Enthemmung durch PAB, PABG, Folsäure, Purine und Nucleinsäuren und die Histologie und Zytologie gehemmter und enthemmter Wurzeln.

Die Sulfonamide verhalten sich recht unterschiedlich: in einer Konzentration von 10^{-5} molar wirken am stärksten Irgafen, Irgamid und Albucid, während Cibazol etwas weniger wirksam ist; Elkosin und Guanicil sind etwa $1/20$ so wirksam wie das Cibazol, und Sulfanilamid und Uliron sind ganz inaktiv.

PAB allein übt in dem verwendeten Konzentrationsbereich (10^{-4} bis 10^{-7} m) keinen Einfluß auf das Längenwachstum der Wurzel aus, desgleichen PABG. Trockengewicht und Zahl der Nebenwurzeln werden nur durch die stärkste Konzentration von PAB (10^{-4} m) etwas gehemmt.

Die Hemmungswirkung des Cibazols wird durch eine Menge von PAB, die 16mal geringer ist als die des Sulfonamids, bis zum 16. Kulturtage vollständig aufgehoben; ebenso gelingt es, durch Irgafen ($6 \cdot 10^{-5}$ m) gehemmte Wurzeln durch PAB, PABG und Folsäure bestimmter Konzentration ganz zu enthemmen. Unter den von ANKER geprüften Purinen und Nucleinsäuren gaben einzig Guanin und Adenosinphosphorsäure eine sichere Enthemmung.

Die Histologie der Wurzelspitzen war nach der Behandlung mit Cibazol deutlich verändert; vor allem erscheint das Periblem deformiert und degeneriert. Die enthemmten Wurzeln weisen im Gegensatz dazu keine morphologischen Veränderungen mehr auf.

ANKER konnte die von SCHOPFER bei *Saccharomyces* beobachtete Tatsache, daß die Ribonucleinsäure der mit Sulfonamid behandelten Zellen bedeutend rascher abgebaut wird als in den Kontrollzellen, bei den isolierten Wurzelspitzen von *Pisum* bestätigen. Die durch Adenosinphosphorsäure enthemmte Wurzel ist nur histologisch und morphologisch wieder normal, während die Ribonucleinsäure sich gleich wie bei den gehemmten Wurzeln verhält. Störungen in den Mitosestadien in mit Irgafen behandelten Zellen wurden vom Autor nicht beobachtet, dagegen ist die Zahl der Mitosen deutlich verringert.

Eine Erweiterung und Ergänzung zu den oben beschriebenen Untersuchungen von ANKER stellt die Arbeit von BEIN (18) über den Einfluß verschiedener Wirkstoffe und von Bodenextrakten auf das Wachstum

der isolierten Wurzel in Organkultur dar. Die Ergebnisse der dort mitgeteilten ausführlichen Versuche geben Aufschluß über das Verhalten eines pflanzlichen Meristems gegenüber einem selektiv herbiziden Phytohormon (2,4—D), einem Insekticid (Gammexan) und gegenüber Antibiotika (Penicillin und Streptomycin). Es stellte sich heraus, daß sich die 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4—D) Wurzelkulturen gegenüber wie ein Phytohormon verhält. Wie mit Heteroauxin ergab sich auch hier ein von der Konzentration abhängiger klarer Übergang von einer fördernden zu einer hemmenden Wirkung. Deutlich kommt die selektive herbicide Wirkung von 2,4—D bei den Wurzelkulturen zum Ausdruck: die Wurzeln von Dikotylen (*Pisum sativum*) werden viel stärker in ihrem Wachstum gehemmt als Wurzeln von Monokotylen (*Zea mays*) (18).

Die Frage, ob den beiden Antibiotika Penicillin und Streptomycin neben ihrer baktericiden Wirksamkeit eine cytotoxische Aktivität gegenüber pflanzlichem Gewebe zukommt, führte zum Ergebnis, daß reines Na-Penicillin G auf Wurzeln von *Zea mays* (150 OE/cc) und von *Pisum* (160 OE/cc) keine Wirkung ausübt. Bei Verwendung der gelben Handelspenicilline der Jahre 1945 bis 1947 an Stelle des reinen konnte der Verfasser eine starke Hemmung des Längenwachstums der Wurzel von *Zea mays* in einer Konzentration von bloß 5 OE/cc feststellen. Durch chromatographische Trennung gelang es, das für die beobachtete Wachstumshemmung wirksame Prinzip von den gelben Farbstoffen des Handelspenicillins abzutrennen und colorimetrisch als Indol-3-Essigsäure zu identifizieren. Dieses Phytohormon tritt als Stoffwechselprodukt in *Penicillium notatum* auf. Streptomycin (sulfat) in einer Konzentration von 12,5 γ /cc beeinträchtigt das Längenwachstum der Pisumwurzel sehr stark, während das Trockengewicht weniger beeinflußt wird (19).

Die isomeren Hexachlorcyclohexane (HCH) üben auf die Wurzel von *Pisum* ungleiche Wirkungen aus: ist das α -HCH inaktiv oder wenig toxisch, so setzen 6 bis 10 γ /cc Gammexan (γ -HCH) Längenwachstum und Trockengewicht erheblich herab; das δ -Isomere gibt schon mit 1 γ /cc denselben Effekt wie das Gammexan. Die Pisumwurzel gehört somit zu einer Gruppe von Organismen, die gegenüber γ - und δ -HCH empfindlich sind, wobei das δ -Isomere viel aktiver ist. Die Analogie im Molekülbau der HCH und der Inosite veranlaßten SLADE (20) zur Hypothese, daß das γ -Isomere (Gammexan) und das meso-Inositol die gleiche Raumkonfiguration besitzen; man müßte also das Gammexan als ein Antivitamin des *m*-Inositols auffassen, das, analog den Verhältnissen Sulfonamid/PAB, seine Wirkung durch Verdrängen des Vitamins entfaltet. In der Folge erschie-

nen dann einige Arbeiten, die diese Annahme bestätigen (21, 22), aber auch solche, die keinen Antagonismus mit dem *m*-Inositol nachweisen konnten (23, 24, 25), was zu ernsthaften Kritiken an der Hypothese von SLADE führte. Die Versuche von BEIN (18) zur Enthemmung mit *m*-Inositol verliefen negativ: *m*-Inositol besitzt im Verhältnis 10 : 1 gegenüber γ - und δ -HCH keine antagonistische Wirksamkeit. 1948 gelang es nun außerdem, die Raumkonfiguration des γ - und δ -HCH aufzuklären. Gammexan weist nicht dieselbe Konfiguration auf wie das *m*-Inositol; vielmehr sind δ -HCH und *m*-Inositol räumlich gleich gebaut (26). Im Jahre darauf konnten BASTIANSEN, ELLEFSEN und HASSEL (27) dieses Ergebnis bestätigen. Auf Grund aller dieser Befunde muß wohl die Hypothese von SLADE, daß Gammexan durch Verdrängung von *m*-Inositol wirkt, endgültig fallengelassen werden.

Der Gehalt der Böden an Wirkstoffen (Vitamine, Hormone, Antibiotika), die das Wurzelwachstum *in vitro* beeinflussen, führte BEIN zu der Frage, welche Rolle diesen Stoffen als exogene Faktoren für die Regulierung des Wurzelwachstums im Boden zukommt und inwiefern sie indirekt durch Wirkung auf die Mikroorganismen des Bodens darauf einwirken. Versuche mit Extrakten aus Böden verschiedener Herkunft zeigten, daß bei gleicher Dosierung die Entwicklung von *Mucorineen* stark gefördert, das Wachstum der Pisumwurzel aber gehemmt wird. Dieser hemmende Einfluß nimmt mit zunehmender Bodentiefe ab; außerdem erwiesen sich Extrakte von Waldböden viel wirksamer als Garten- und Ackererden. Jahreszeitliche Veränderungen, die im Sinne einer Periodizität hätten gedeutet werden können, ergaben sich aber nicht.

Mit den Fortschritten der Forschung drängt sich mehr und mehr die Frage nach dem vitaminischen Gleichgewicht und den Vitaminkorrelationen auf. Diese beiden Begriffe sind im Zusammenhang mit der Antivitaminwirkung durch SCHOPFER (28, 34) geprägt worden. Der Stoffwechsel und die normale Biosynthese der Vitamine verlaufen scheinbar in vorgezeichneten Bahnen. Ein Gleichgewicht stellt sich ein, Produkt einer langen Anpassung, die den auf einem Milieu zum Ausdruck kommenden charakteristischen Stoffwechsel bestimmt. Die Zufuhr eines einzelnen Vitamins von außen im Überschuß oder eines Antivitamins führt zu Störungen mannigfaltiger Art, die sich oft unserer direkten Beobachtung entziehen, deren Kenntnis aber von großer Wichtigkeit ist.

Als Beispiel erinnern wir an *Rhizopus suinus*; dieser Pilz (ein Phycomycet der Gruppe der *Mucorineen*) wird in seiner Entwicklung durch das Aneurin gehemmt, das hier die Rolle eines Inhibitors spielt. In seiner

Gegenwart nimmt, obgleich die Bildung der lebenden Substanz deutlich vermindert ist, die Quantität des synthetisierten Biotins beträchtlich zu. Der gestörte Stoffwechsel eines Vitamins wirkt sich also auf den eines anderen aus (28). Untersuchungen, die mit dem Vitamin K₃ (2-methyl—1,4-Naphtochinon) in unserem Institut durchgeführt wurden, brachten neues Tatsachenmaterial über das vitaminische Gleichgewicht. Vitamin K₃ ist der Grundkörper des Vitamins K₁ (2-methyl—3-phytyl—1,4-Naphtochinon), das durch höhere Pflanzen gebildet wird, und des Vitamins K₂ (2-methyl—3-squalenyl—1,4-Naphtochinon), das sich in Bakterien vorfindet.

Das Vitamin K₃ wird in den Chloroplasten und den Blättern synthetisiert (29). Seine Funktionen im pflanzlichen Stoffwechsel sind noch wenig bekannt; vor allem zeigt es eine antibiotische, hemmende Wirkung, die in Zusammenhang mit seiner Chinonstruktur zu setzen ist: Hemmung der Entwicklung zahlreicher Mikroorganismen, Hemmung der Photosynthese bei *Elodea*, zerstörende Wirkung auf die Semipermeabilität (*Spirogyra*), hemmende Wirkung auf die Aktivität kristallisierter Urease (30, 31, 32, 33). Außerdem übt das Vitamin K₃ eine sehr starke antibiotische Wirkung auf das Wachstum der isolierten Pisumwurzel in vitro aus. 5 γ /cc setzen die Entwicklung gegenüber den Kontrollen bereits um 24 Prozent herab. Die Tätigkeit des Wurzelvegetationspunktes wird blockiert. Der bei Mikroorganismen (*Phycomyces*) beobachtete Antagonismus zwischen K₃ und Nicotinsäure ist bei der Pisumwurzel weniger deutlich und nicht einfach zu zeigen, da die zugefügte Nicotinsäure sehr rasch selbst zum Inhibitor wird; immerhin gelingt mit schwachen Dosen eine teilweise Ent-hemmung des Längenwachstums und der Nebenwurzelbildung.

Die Analyse der durch K₃ in ihrer Entwicklung blockierten Wurzeln zeigt klar, wie der gesamte Vitaminstoffwechsel gestört ist (34):

Das in der Nährlösung enthaltene Aneurin wird bedeutend rascher abgebaut als bei den Kontrollen ohne Vitamin K₃; für Lactoflavin und Adermin stellt sich eine Hypervitaminose, für Biotin und Pantothen-säure eine Hypovitaminose ein. Der Gehalt an Nicotinsäure hingegen bleibt unverändert. Ähnliche tiefgreifende Störungen des vitaminischen Gleichgewichtes konnten nach der Einwirkung eines Antivitamins des Aneurins, des Neopyrithiamins, auf die gleiche Wurzel festgestellt werden (34).

Über die für die normale Gestaltung erforderlichen quantitativen Beziehungen anderer Vitamine sind erst spärliche Kenntnisse vorhanden.

Die grüne Pflanze als Ganzes ist im allgemeinen befähigt, ihren Wirkstoffbedarf durch die eigene Synthese zu decken, und ist somit, was diese

Substanzen betrifft, von der Umwelt weitgehend unabhängig, wobei allerdings nicht zu vergessen ist, daß die im Boden vorhandenen Wirkstoffe nicht ohne jeglichen Einfluß auf die Pflanzen sein werden.

Anders verhalten sich dagegen die einzelnen Teile einer solchen Pflanze. Ihr Synthesevermögen für verschiedene Wirkstoffe ist recht unterschiedlich. Dank der Technik der isolierten Organkultur unter aseptischen Bedingungen hat man in den letzten Jahren einen Einblick in die Wirkstoffbedürfnisse einzelner Pflanzenteile gewinnen können. Ist ein solcher Teil nicht imstande, einen bestimmten Wirkstoff zu bilden, so muß ihm dieser, will man ihn mit Erfolg *in vitro* kultivieren, von außen zugefügt werden. Den Wurzeln fehlt beispielsweise ganz allgemein die Synthesefähigkeit für das Aneurin. *In vivo* wird es ihnen von den oberirdischen grünen Teilen geliefert, *in vitro* muß es dem Kulturmilieu beigelegt werden. Von den für optimales Wachstum nicht benötigten Wirkstoffen nimmt man an, daß sie durch das betreffende Organ selbst gebildet werden.

Die nachstehende Arbeit hatte zum Ziel, nicht die Bedürfnisse eines Organs an Wirkstoffen zu untersuchen, sondern vielmehr seine synthetischen Fähigkeiten für einige Glieder des großen Vitamin-B-Komplexes, und gleichzeitig zu versuchen, deren Stoffwechsel über eine gewisse Zeit hin zu verfolgen. Als Untersuchungsmaterial wählten wir Samen von *Phaseolus vulgaris* und isolierte Wurzeln von *Pisum sativum* in steriler Organkultur.

II. Organkultur und Gewebekultur

Mit zunehmender Organisation eines Organismus spezialisiert sich auch sein Gesamtstoffwechsel, und die Schwierigkeiten, ihn zu überblicken, vergrößern sich rasch. Ein Organismus pflanzlicher oder tierischer Natur ist aus Organen aufgebaut, die oft ganz verschiedene Funktionen ausüben, und aus Geweben, denen je nach Grad und Art ihrer Differenzierung verschiedene Aufgaben zukommen. Weiter ist die Tätigkeit aller dieser Teile genau aufeinander abgestimmt.

Aus diesen Gründen ist es praktisch außerordentlich umständlich, wenn nicht unmöglich, die physiologischen Vorgänge, die sich in einem Organ oder in einer bestimmten Gewebeart abspielen, zu erfassen, solange noch der in Frage kommende Teil mit dem Gesamtorganismus in Verbindung steht. Setzen wir uns beispielsweise zum Ziel, zu untersuchen, ob irgendein Vitamin in allen Organen der Pflanze synthetisiert wird oder nur in ganz bestimmten, so stoßen wir schon auf Schwierigkeiten; denn es ist