

## Verlaufsformen und quantitative Auswertung des Horizontalwuchstestes mit *Neurospora crassa*\*

Von

H. M. Rauen, G. Hess und J. Mechery

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Münster

(Der Schriftleitung zugegangen am 17. Dezember 1958)

Adaptation an und Resistenz gegen Antimetaboliten bzw. Chemotherapeutika bei den pathogenen Mikroorganismen<sup>1</sup> gehören mit zu den seit mehr als zwei Jahrzehnten intensiv bearbeiteten, doch auch heute noch nicht gelösten Problemen der Biochemie. Die Erforschung der diesen Verhaltensweisen zugrunde liegenden Stoffwechselprozesse koinziiert in vielen Punkten mit den für die Kausaltherapie bakterieller Erkrankungen und maligner Tumoren gleich bedeutungsvollen Fragen der Aufklärung von Stoffwechselhaupt- und -nebenwegen in Mikroorganismen und entarteten Geweben sowie der Wirkungsweise und -orte von Antimetaboliten im intermediären Stoffwechsel.

Zur Bearbeitung solcher Fragen bediente man sich der pathogenen Mikroorganismen selbst; man verwendete aber auch einfacher zu handhabende „Modell-Lebewesen“, wobei man in Kauf nehmen mußte, daß Ergebnisse mit diesen nicht ohne nähere Prüfung für jene gelten.

*Neurospora crassa* ist ein in seiner Genetik und seinen Stoffwechselvorgängen bekanntes und experimentell gut zu verwendendes Lebewesen. Es reagiert empfindlich auf die Gegenwart von Antimetaboliten. Da es mit vielen Ascomyceten die Eigenschaft teilt, auf der Oberfläche eines geeigneten Agarnährmediums horizontal zu wachsen, ließ sich ein Horizontalwuchstest ausarbeiten, der, obgleich 1943 beschrieben<sup>2</sup>, bis heute zur Hemmungsanalyse wenig und dann nur in qualitativer Beziehung verwendet wurde<sup>3</sup>. Die Vorzüge von *N. crassa* als biologischem Testobjekt und des Horizontalwuchstestes als Arbeitsmethode veranlaßten uns, damit eine Reihe neuerer Antimetaboliten und Cytostatika zu prüfen. Wir beobachteten hierbei mehrere Verlaufsformen der Hemmung

\* Ausgeführt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Gesellschaft zur Förderung der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster.

<sup>1</sup> E. F. Gale u. R. Davies, *Adaptation in Microorganisms*, University Press, Cambridge 1953; R. J. Schnitzer u. E. Greenberg, *Drug Resistance of Microorganisms*, Academic Press, New York 1957.

<sup>2</sup> F. D. Ryan, G. W. Beadle u. E. L. Tatum, *Amer. J. Bot.* **30**, 784 [1943].

<sup>3</sup> Vgl. z. B. die Wirkung von Sulfonamiden: S. Emerson u. J. E. Cushing, *Federation Proc.* **5**, 379 [1946].

des Horizontalwuchses von *N. crassa* und teilten sie in Gruppen typischer Hemmungsformen ein. In der vorliegenden Arbeit werden diese Verlaufsformen sowie das Verfahren zu ihrer quantitativen Auswertung beschrieben.

### Allgemeines zum Wuchstest mit *N. crassa*

*N. crassa* wächst apikal, d. h. nur von den Mycelspitzen aus<sup>4</sup>. Einmal gebildete Zellen wachsen nicht mehr in der Längsachse, sondern nur noch geringfügig in der Querrichtung und verdicken ihre Chitinwände. Die Zellen sind nicht völlig gegeneinander abgeschlossen und die Trennwände besitzen Foramina, durch die nicht nur agranuläre Zellsubstanzen, sondern auch Zellkerne ausgetauscht werden, von denen jede Zelle viele enthält. Das in einem Horizontalrohr nach Ryan, Beadle und Tatum<sup>2</sup> eingeschlossene, darin vorwärts wachsende Mycel ist somit als ein einheitlicher Organismus anzusehen.

Die in das Testrohr vordringenden Mycelspitzen treffen stets auf die gleichen Konzentrationen an Metaboliten und Antimetaboliten im Nährmedium. Die Verhaltensweise dieses Organismus während des Horizontalwuchses ist also die Antwort auf eine über Wachstumsstrecke und Versuchszeit konstante Dosis der Wirksubstanz. Variiert man von Ansatz zu Ansatz kontinuierlich die Wirkstoffdosis, so erhält man als Versuchsergebnis eine dreidimensionale Dosis-Wirkung-Zeit-Beziehung.

Die Konstanz der Wirkstoffdosis über Strecke und Zeit gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, daß die Substanzen bei  $p_H$  5,6 des Mediums, der Anwesenheit von Schwermetallspuren und Luftsauerstoff beständig sind. Diese Konstanz ist unbestreitbar ein Vorzug des Horizontalwuchstestes mit *N. crassa* gegenüber anderen biologischen Testverfahren, z. B. den Flüssigkulturverfahren mit Lactobazillen oder *Escherichia coli*, ein Nachteil dafür das schwach saure Milieu, das die Ionenaktivitäten von Hemmsubstanzen und Enthemmsubstanzen determiniert. Wie viele Schimmelpilze wächst auch *N. crassa* optimal nur im  $p_H$ -Bereich von 4—6,5<sup>2</sup>, so daß nicht viele Möglichkeiten bestehen, die Ionenaktivitäten der Testsubstanzen durch  $p_H$ -Änderung zu variieren. Daß z. B. die Resorption von Antimetaboliten vom  $p_H$  des Milieus abhängen kann, wurde für Sulfonamide festgestellt und eingehend untersucht<sup>5</sup>. Die undissoziierte Form penetriert die Zellwand und das Anion ist die eigentliche Hemmform<sup>6</sup>. Die stärkste Hemmwirkung wird daher bei einem  $p_H$  des Nährmediums erhalten, das seinem  $p_K$ -Wert entspricht<sup>7</sup>.

Im Gegensatz zum nur wenig variierbaren  $p_H$  des Nährmediums ist die Temperatur ein veränderbarer Parameter. Ryan, Beadle und Tatum<sup>2</sup> beobachteten mit Wildstämmen von *N. crassa* zwischen 4° und 35° eine lineare Beziehung zwischen Temperaturanstieg und Zunahme der Wuchsgeschwindigkeit. Oberhalb von 35° fiel die letztere wieder steil ab. Allgemein wird beim Arbeiten mit *N. crassa* 25° als Optimaltemperatur empfohlen, da hierbei das Mycel dichter wächst und sich nicht so schnell Conidiophoren bilden, wie bei höherer Temperatur. Da die einzelnen Stoffwechselforgänge verschiedene Temperaturkonstanten besitzen, können Hemmwirkungen bei anderen Temperaturen als der gewöhnlichen Arbeitstemperatur durchaus verschieden ausfallen.

<sup>4</sup> Zur Biologie von *N. crassa* s. z.B. S. Emerson in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handbuch d. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse, Bd. II, S. 443, Springer-Verlag, Heidelberg 1955.

<sup>5</sup> A. Lwoff, F. Nitti, J. Tréfouél u. V. Hamon, Ann. Inst. Pasteur 67, 9, 19 [1941].

<sup>6</sup> C. L. Fox, jr. u. H. M. Rose, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 50, 142 [1942]; F. C. Schmelkes, O. Wyss, H. C. Marks, B. J. Ludwig u. F. B. Strandskow, ebenda 40, 145 [1942]; F. C. Schmelkes, J. Bacteriol. 45, 67 [1943].

<sup>7</sup> A. H. Bruckner, Yale J. Biol. Med. 15, 813 [1945]; P. B. Cowles, ebenda 14, 599 [1942]; s. auch analoge Befunde mit einer *N. crassa*-Mutanten: O. Wyss, V. G. Lilly u. L. H. Leonian, Science [New York] 99, 18 [1944].

Die Variationsmöglichkeit dieses Tests wird fast unbegrenzt, wenn man nicht nur Wildstämme, sondern auch stabile biochemische Mutanten als Testobjekte verwendet, von denen man gerade bei *N. crassa* eine sehr große Anzahl kennt<sup>8</sup>.

Die Mehrzahl der Hemmungsanalysen mit *N. crassa* wurden seither in der Flüssigkultur durchgeführt. Da hierbei die Mycelgewichte der Ansätze mit und ohne Antimetabolitzusatz nach 3—5 Tagen Inkubation bei 25° als Maß dienen, erhält man nur einzelne Zahlen zur Versuchsbewertung. Zur Überwindung dieses Mangels, sowie zur Prüfung des Charakters der Stoffwechselwirkungen sind viele Einzelversuche unter kontinuierlicher Variation der Parameter erforderlich, die Zeit, Arbeit und Material kosten<sup>9</sup>. Der größte Nachteil des Flüssigkulturtestes dürfte jedoch darin bestehen, daß sich das Medium durch die Stoffwechselwirkung des wachsenden Mycels verändert, vor allem saurer wird, was die Permeation von Hemmsubstanzen und Enthemmsubstanzen durch die Zellwand unkontrolliert beeinflussen kann.

Einige dieser Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten werden durch Plattenmethoden überwunden, die z. B. zur Bestimmung des Metabolitbedarfs von *Neurospora*-Mutanten<sup>10</sup> und zum Austesten von Carcinostatika<sup>11</sup> sowie Antibiotika<sup>12</sup> verwendet wurden. Sie erfordern zwar weniger Substanz als Flüssig- und Horizontalwuchsverfahren und dauern kürzer, doch ergeben auch sie nur eine oder wenige Zahlen je Versuchsansatz und sagen nichts über den zeitlichen Verlauf von Wirkungen, wie zunehmende Intoxikationen oder Adaptationen aus. Gerade dies geht aber aus den Verlaufsformen des Horizontalwuchses mit *N. crassa* eindeutig hervor.

### Methodik

Verwendete Substanzen: 2-Chlor-4-amino-benzoesäure (Sigma Chemicals, St. Louis); *N,N',N''*-Triäthylen-thiophosphorsäure-triamid (Thiotepa, Cyanamid Company, New York) verdanken wir Herrn Prof. Dr. G. Domagk, Wuppertal. 4-Äthylenimino-buten-(1)-ol-(3) (Tetramin, Versuchspräparat IV/148 E. Merck & Co., Darmstadt)\*. Als Sulfonamide wurden verwendet: Marfanil (4-Aminomethyl-benzolsulfonamid-hydrochlorid), Marbadal (Salz aus *N*-[4-Amino-benzol-sulfonyl]-thioharnstoff und Marfanil), Eubasin (*N'*-[Pyridyl-(2)]-sulfanilamid), Debenal (*N'*-[Pyrimidyl-(2)]-sulfanilamid), Methyl-Debenal (*N'*-[4-Methyl-pyrimidyl-(2)]-sulfanilamid), Eleudron (*N'*-[Thiazolyl-(2)]-sulfanilamid) und Globucid (*N'*-[5-Äthyl-1.3.4-thiadiazolyl-(2)]-sulfanilamid).

Testverfahren: Methodische Einzelheiten wurden früher ausführlich beschrieben<sup>2</sup>. Glasröhren von 18 mm Außendurchmesser, 300 mm lang im Horizontalteil mit beidseitig 50 mm langen, um 45° aufgewinkelten Ansätzen werden mit Kapsenberg-Kappen verschlossen und trocken sterilisiert. Man füllt sie mit je 15 ml steriler warmer Minimalnährlösung nach Fries<sup>2,4</sup> + 3% Agar, pH 5,6, der nach dem Sterilisieren die Lösungen der Testsubstanzen in sterilem Wasser zugesetzt worden waren und befestigt sie bis zum Erstarren des Nährbodens genau horizontal.

<sup>8</sup> S. z. B. B. P. Karlson, *Ergebn. Enzymforsch.* **13**, 85 [1954]; R. W. Barratt, D. Newmeyer, D. D. Perkins u. L. Garnjobst, *Advances in Genetics* **6**, 1 [1954].

<sup>9</sup> Vgl. z. B. D. W. Visser, G. Barron u. R. Beltz, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 2017 [1952]; R. Fuerst, C. Somers u. T. C. Hsu, *Antibiotics and Chemotherapy* **7**, 363 [1957].

<sup>10</sup> G. Pontecorvo, *J. gen. Microbiol.* **3**, 122 [1949]; H. Haenel u. W. Müller-Beuthow, *Vitamins and Hormones* **6**, 255 [1954].

<sup>11</sup> R. Fuerst u. W. M. Skellenger, *Antibiotics and Chemotherapy*, **8**, 76 [1958].

<sup>12</sup> J. H. Humphrey u. J. W. Lightbown, *J. gen. Microbiol.* **7**, 129 [1956]; T. D. Brock, *Antibiotics and Chemotherapy* **7**, 243 [1957].

\* Herrn Prof. Dr. Domagk, sowie der Fa. E. Merck danken wir auch an dieser Stelle für die Substanzen.

Dann beimpft man die Röhren an einem Ende mit einer Conidiensuspension aus einer 5 Tage alten *N. crassa*-Kultur, die die keimfähigsten Conidien ergibt<sup>13</sup>. Man markiert die Impfstelle, inkubiert bei 25° und mißt zweimal täglich die Mycellänge von der Impfstelle aus.

*N. crassa*-Stamm: Herrn Prof. Dr. H. K. Mitchell, Pasadena, verdanken wir den hier verwendeten Wildstamm 3177-4A. Er wird auf Malzagar (4 g Malzextrakt, 0,5 g Casein-Pepton, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>, 0,05 g Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 2 g Agar und Wasser ad 160 ml) gezüchtet\*.

## Ergebnisse

### Vorbemerkungen

Man kann verschiedene Stadien des Wachstumsverlaufs von *N. crassa* im Horizontalrohr unterscheiden: a) Induktions- und Auskeimperiode. Die Conidien benötigen mehrere Stunden der Ruhe, bis sie Keimschläuche austreiben, die sich dann zum ersten feinen Mycel verzweigen. Die Induktionszeit hängt von vielen zum Teil nicht übersehbaren Faktoren ab, z. B. Alter der Conidien, Vorgeschichte des Stammes<sup>2</sup> und andere. Zusatz von ATP verkürzt die Induktionszeit<sup>13</sup>. b) Periode zunehmenden Mycelwachstums. Von der Auftraglinie der auskeimenden Conidien wächst das erste feine Mycel radiär aus, auch in den Nährboden, verdichtet sich auf der Oberfläche und wächst dann in Richtung des offenen Rohres mit steigender Geschwindigkeit. a + b benötigen etwa 25 Stdn. c) Periode des konstanten Mycelwachstums. Die scharfe Front des Mycels verschiebt sich nun mit konstanter Geschwindigkeit etwa 4 mm/Stde. nach dem Rohrende hin. Trägt man den Längenwuchs des ungehemmten Mycels gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade (c-Periode), die unten nach links umbiegt (b-Periode) und sich nicht aus dem Koordinaten-Nullpunkt erhebt (a-Periode).

Wird der Horizontalwuchs von *N. crassa* durch Antimetaboliten gehemmt, so ergeben sich verschiedene Möglichkeiten des Hemmungsverlaufs:

- |              |  |
|--------------|--|
|              | a) Conidienkeimung                               |
| a1 ungehemmt | a2 gehemmt                                       |
|              | c) Mycelwachstum                                 |
| c1 ungehemmt |  |
| c2 gehemmt   | — Hemmverlauf konstant                           |
| c3 gehemmt   | — Hemmverlauf zunehmend (steigende Intoxikation) |
| c4 gehemmt   | — Hemmverlauf abnehmend (Adaptation)             |

Die oben unter b beschriebene Wachstumsperiode bleibt unberücksichtigt, da sie als Übergangsperiode nicht eindeutig verläuft und die Hemmwirkung durch a und c befriedigend zu kennzeichnen ist.

<sup>13</sup> F. J. Ryan, Amer. J. Bot. **35**, 497 [1948].

\* Herrn Dr. Hagedorn, Botanisches Institut der Universität Münster, danken wir für den Hinweis auf dieses für *N. crassa* ausgezeichnete einfache Maximalnährmedium.

Durch Kombination der Verhaltensweisen des wachsenden Mycels in den Perioden a und c ergeben sich folgende Verlaufsformen der Hemmkurven, deren Analyse für die Beurteilung des biochemischen Hemmungsmechanismus von Bedeutung sein kann:

Hemmtyp	Beschreibung	Beispiel
alc1	normaler Wachstumsverlauf . . . . .	Kurve 0 in Abb. 1
alc2	vom Abszissenpunkt der alc1-Kurve abzweigende Geraden, mit dieser spitze Winkel bildend . . . . .	Kurvenschar in Abb. 1
alc3	vom Abszissenpunkt der alc1-Kurve abzweigende, zu dieser divergent verlaufende Kurven . . . . .	Abb. 2
alc4	vom Abszissenpunkt der alc1-Kurve abzweigende, zu dieser konvergent verlaufende Kurven . . . . .	Abb. 3
a2c1	gegenüber der alc1-Kurve parallel verschobene Kurven	—
a2c2	ähnlich alc1, nur mit ungleichen Abszissenpunkten der Geraden . . . . .	Abb. 4
a2c3	ungleiche Abszissenpunkte, divergierende Kurvenober- teile . . . . .	—
a2c4	ungleiche Abszissenpunkte, konvergierende Kurven- oberteile . . . . .	Abb. 5

Diese Verlaufstypen sind theoretische Idealformen, denen sich die experimentellen Realformen jedoch gut annähern. Geringe Abweichungen und Unsicherheiten beobachtet man mehr in der a- als in der c-Periode.

### 1. Analyse der Wachstumshemmung

Die Hemmwirkung von 2-Chlor-4-amino-benzoesäure:  
alc2-Typ

Abb. 1 zeigt, daß die a-Periode in allen Versuchen gleich ist. Nach  $a + b = 27$  Stdn. beginnt die c-Periode mit zeitlich konstantem, doch proportional der Hemmstoffkonzentration gehemmtem Wachstum. Zur Beurteilung des Hemmverlaufs wird die dreidimensionale Dosis-Zeit-Wirkung-Beziehung zweidimensional aufgelöst, indem einmal die Wuchszeitverzögerung für eine bestimmte Wachstumsstrecke (Dosis-Zeit-Beziehung für 150 mm), das andere Mal die Hemmwirkung für eine bestimmte Wuchszeit (Dosis-Wirkung-Beziehung für 90 Stdn.) gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen wird (s. Beidiagramm der Abb. 1).

Zur Dosis-Zeit-Beziehung setzt man  $AA' = 100$  und berechnet  $AB_1, AB_2 \dots AB_6$  als Prozentwerte. Diese gegen die Dosen aufgetragen ergeben, wie das Beidiagramm zeigt, eine Kurve aus zwei geraden Schenkeln mit einem Knickpunkt beim Abszissenpunkt 1,1 mg/ml.

Zur Dosis-Wirkung-Beziehung setzt man  $CC' = 100$  und berechnet  $CD_1, CD_2 \dots CD_6$  als Prozentwerte. Diese gegen die Dosen aufgetragen ergeben eine Gerade.

Nach dem gleichen Typus hemmt z. B. auch das Antimalariamittel 2,4-Diamino-5-[p-chlor-phenyl]-6-äthyl-pyrimidin (Daraprim, Pyrimethamin).

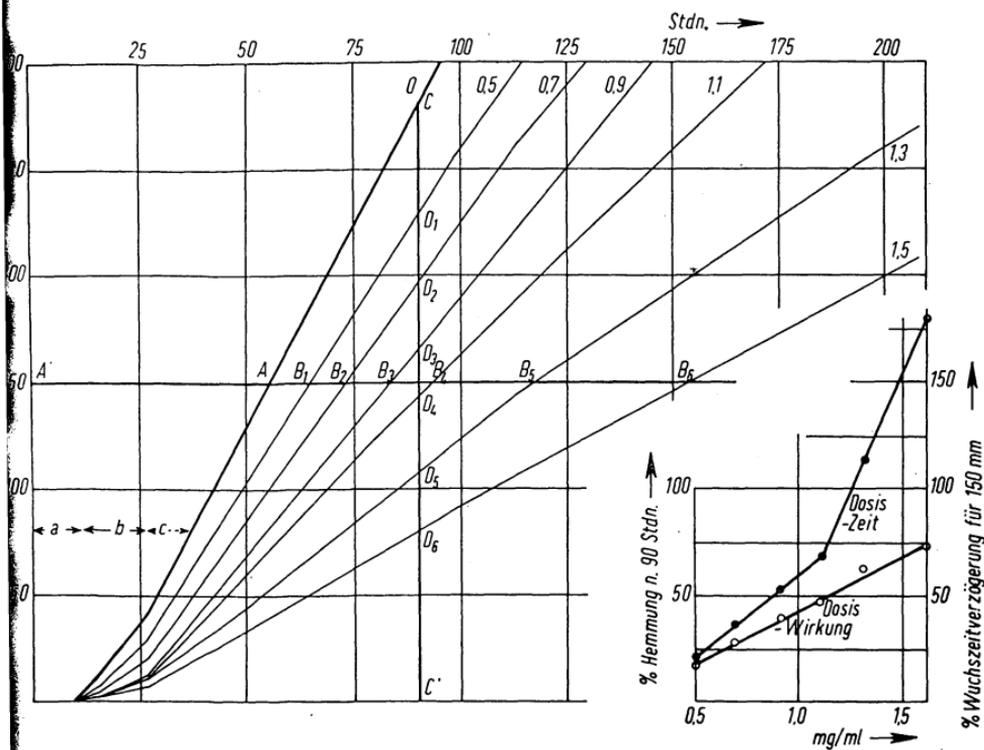


Abb. 1. Hemmung des Horizontalwuchses von *N. crassa* durch 2-Chlor-4-amino-benzoessäure.

Die Zahlen an den Kurven geben die im Nährmedium gelöste Menge Hemmstoff in mg/ml an. Das Beidiagramm zeigt die daraus erhaltene Dosis-Zeit- (●) und die Dosis-Wirkung-Beziehung (○).

### Die Hemmwirkung von Triäthylen-thiophosphorsäure-triamid (Thiotepa): alc3-Typ

Nach Abb. 2 divergieren die drei Hemmkurven nach Verlassen des gemeinsamen Abszissenpunktes zunehmend gegen die Nullkurve.

Die Verlaufsanalyse ist hierbei schwieriger. Man setzt in regelmäßigen Abständen jeweils AA', BB'... EE' = 100 und berechnet die prozentualen Hemmungen der Dosis-Zeit-Beziehung aus den zugehörigen Werten AA<sub>1</sub>, AA<sub>2</sub> usw., d. h. für mehrere festgelegte Wirkungen. Das Beidiagramm zeigt, daß die Zunahme des Steigungswinkels und der Ansatzhöhe der Dosis-Zeit-Kurvenschar ein Maß für die zunehmende Intoxikation des Organismus ergibt.

Die Dosis-Wirkung-Beziehung für z. B. drei Abgriffe bei 58, 78 und 98 Stdn., wobei man ähnlich dem vorher erwähnten Beispiel BJ oder GK oder EL = 100 setzt und dann die Prozentwerte für BH<sub>1</sub>, BH<sub>2</sub> und so fort berechnet, ergeben keine so eindeutige Fächerung.

Dieser Hemmtyp wird z. B. noch mit *p*-Hydroxy-benzoessäure, Salicylsäure, *p*-Amino-salicylsäure, *m*-Amino-salicylsäure oder toxischen Konzentrationen von *p*-Amino-benzoessäure beobachtet.

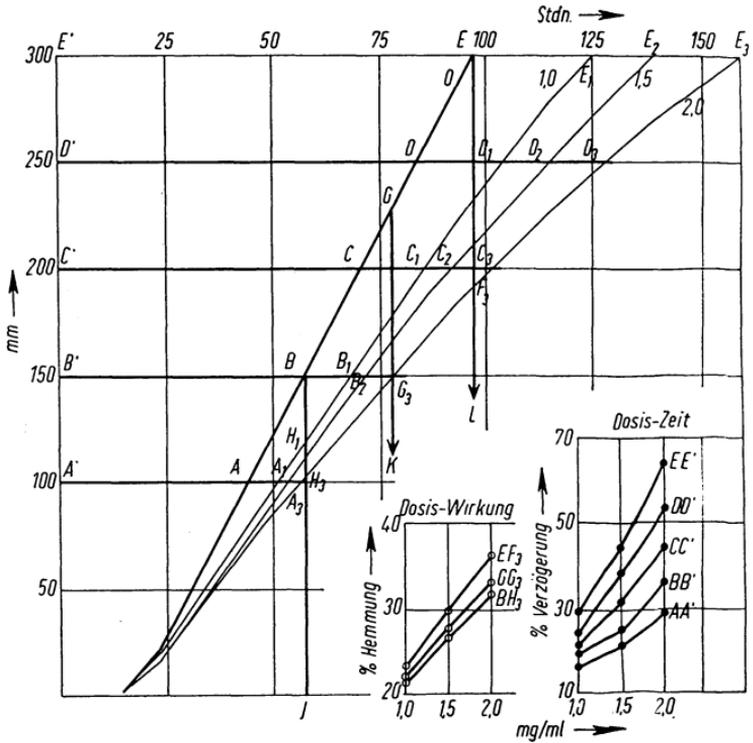


Abb. 2. Hemmwirkung von Triäthylen-thiophosphorsäure-triamid auf *N. crassa*. Erläuterung s. Abb. 1.

### Die Hemmwirkung von Sulfathiazol: a1c4-Typ

Die Conidienkeimung wird durch Sulfathiazol in den angewandten Konzentrationen nur wenig gehemmt, so daß die Hemmkurven nahezu den gleichen Abszissenpunkt wie die Nullkurve haben (Abb. 3). Gegen niedrige Inhibitor-Konzentrationen wird *N. crassa* im Verlauf des Wachstums völlig resistent, so daß die Kurven mit 0,6 und 0,8 mg Sulfathiazol/ml im oberen Teil parallel, die folgenden Kurven nahezu parallel zur Nullkurve verlaufen. Von 1,4 bis 1,8 mg Sulfathiazol/ml an zeigen die oberen Kurventeile zunehmende Neigungswinkel zur Nullkurve.

Zur Dosis-Zeit-Beziehung berechnet man wieder die Prozentwerte von AB<sub>1</sub>, AB<sub>2</sub>... AB<sub>7</sub> gegen AA' = 100. Die Zeitprozente, gegen die Dosen aufgetragen, ergeben im Dosis-Bereich von 0,6 bis 1,3 mg/ml eine Gerade, im Dosis-Bereich von 1,3 bis 1,8 mg/ml eine zur Abszisse schwach divergierend verlaufende Kurve. Der gerade Teil zeigt an, daß in seinem Dosis-Bereich die zunächst zur Dosis linear verlaufende Hemmung durch Adaptation völlig überwunden wurde. Wendepunkt und Divergenzgrad geben Grenzkonzentration und zunehmende Wachstumsschädigung, d. h. zunehmendes Adaptationsunvermögen unter den gegebenen Versuchsbedingungen an.

Zur Dosis-Wirkung-Beziehung verfährt man nach den obigen Mustern, d. h. man setzt  $CC' = 100$  und berechnet  $CD_1, CD_2 \dots CD_7$  als Prozentwerte. Die so erhaltene Kurve verläuft zur Abszisse schwach konvergent.

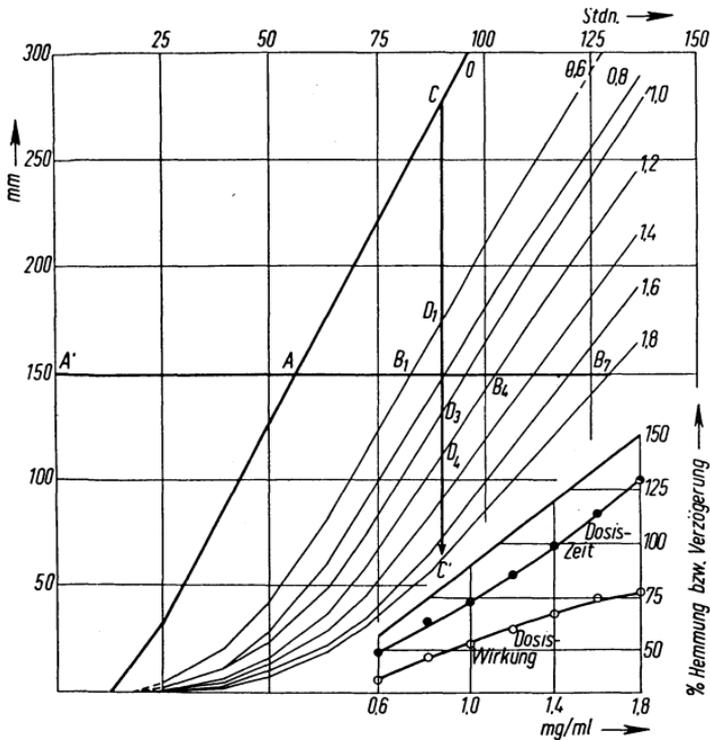


Abb. 3. Hemmwirkung von Sulfathiazol auf *N. crassa*. Erläuterung s. Abb. 1.

Nach diesem Typus verlaufen auch die Hemmkurven mit Aminopterin, Amethopterin und anderen Folsäureantagonisten.

### Die Hemmwirkung von 4-Äthylenimino-buten-(1)-ol-(3): a2c2-Typ

Der Unterschied zwischen a1 und a2 ergibt sich aus den Abbildungen 1—3 einerseits und 4 andererseits. Während dort die Ansatzpunkte völlig (1—2) bzw. nahezu (3) zusammenfallen, sind sie hier proportional zur Hemmsubstanz-Konzentration auf der Abszisse verschoben. Ist auch die Conidienkeimung und auch das anfängliche Mycelwachstum in der b-Periode überwunden, dann wächst das Mycel mit proportional der Inhibitor-Konzentration verringerter konstanter Geschwindigkeit. Zur Verlaufsanalyse verfährt man wie bei den vorherigen Beispielen. Die Dosis-Zeit-Kurve ist hier eine Gerade, die Dosis-Wirkung-Kurve zeigt einen exponentiellen Verlauf.

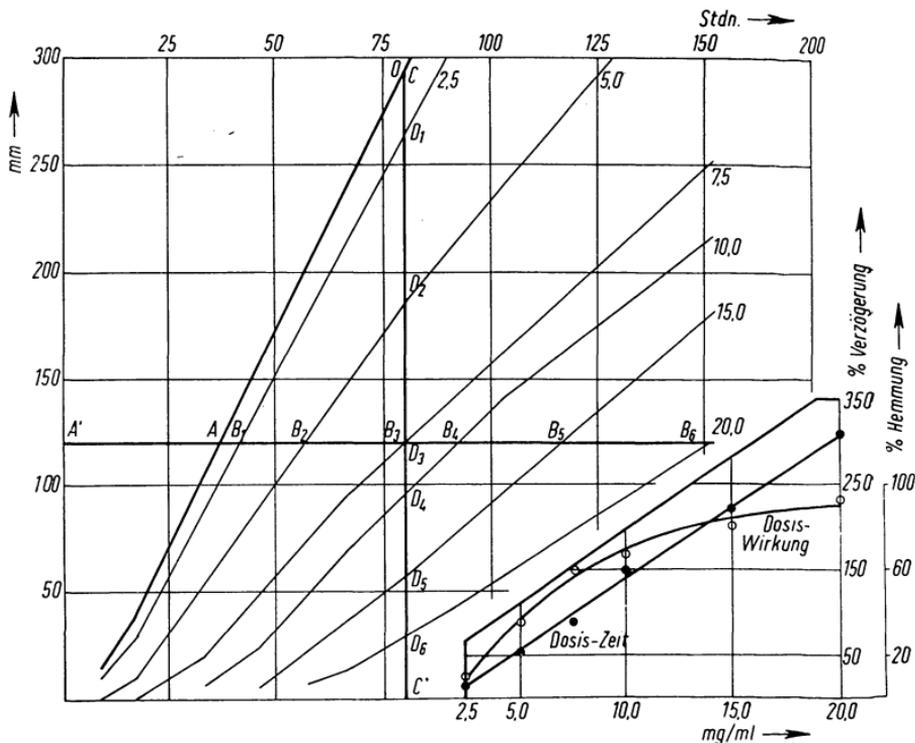


Abb. 4. Hemmwirkung von 4-Äthylenimino-buten-(1)-ol-(3) auf *N. crassa*.  
Erläuterung s. Abb. 1.

### Vergleich der Hemmwirkungen von Sulfonamiden: a2c4-Typ

Für diesen zunächst logisch gefolgerten Hemmtyp wurden noch keine ganz eindeutigen Beispiele gefunden, doch dürften die Verlaufsformen mit einigen Sulfonamiden am ehesten hierher zu zählen sein. Abb. 5 zeigt den Hemmverlauf mit äquimolaren Sulfonamidkonzentrationen. Während Marfanil nicht hemmt, gehören die Verlaufsformen mit Eleudron (Sulfathiazol) und Eubasin eindeutig zum a1c4-Typ, und die Hemmwirkungen von Methyl-Debenal und Marbadal lassen sich wohl auch noch zu diesem Typus zählen. Die Conidienkeimung in Gegenwart von Debenal und Globucid ist sicher verzögert, so daß wir die Hemmwirkungen dieser Substanzen zum a2c4-Typ zählen müssen. Interessant ist, daß die Adaptation von *N. crassa* an die einzelnen Verbindungen ganz verschieden ist; obgleich der Organismus unter Marbadal in der a- und b-Periode sich wie unter Eleudron und Eubasin verhält, wächst er in der c-Periode sehr viel langsamer. a- und b-Periode unter Methyl-Debenal sind gegenüber den gleichen Perioden unter Eleudron, Eubasin und Marbadal etwas verzögert, doch wächst das Mycel in der c-Periode schneller als unter Marbadal. Bei gleichem Anfangsverhalten adaptiert sich *N. crassa* in der c-Periode besser an Debenal als an Globucid.

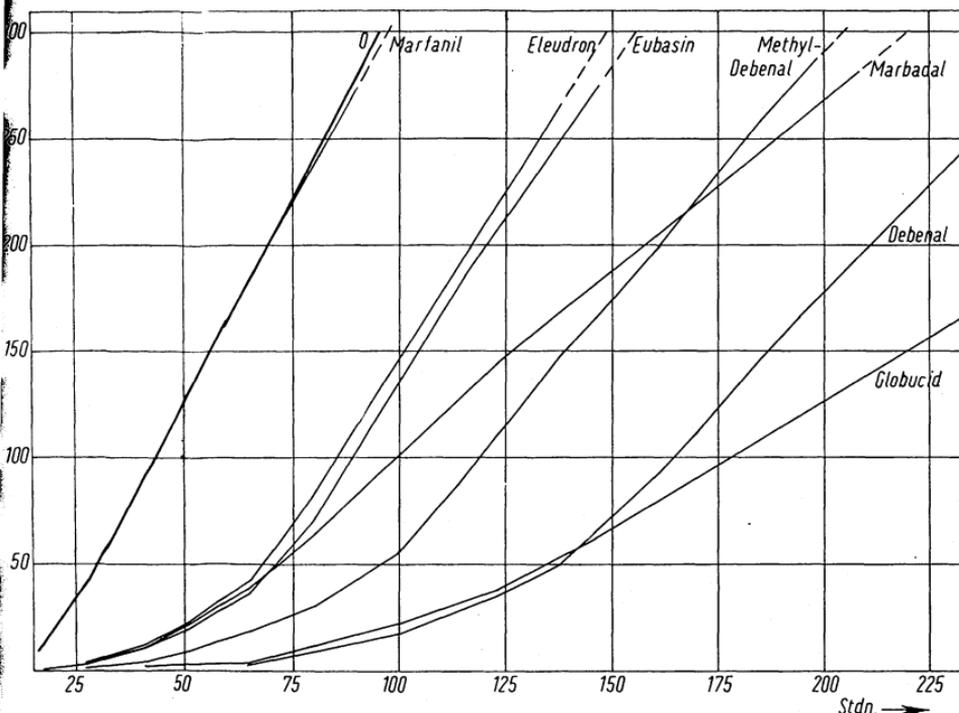


Abb. 5. Hemmwirkungen verschiedener Sulfonamide gleicher Konzentrationen ( $3,5 \mu\text{Mol/ml}$  Nährmedium) auf *N. crassa*.

## 2. Analyse der Enthemmung

### Der Wirkungsantagonismus Sulfathiazol-Pteroinsäure

Bei der partiellen Hemmung des Mycelwachstums durch Sulfathiazol in Abb. 6 liegt die Hemmstoff-Konzentration von  $1 \text{ mg/ml}$  (Kurve I) an der oberen Grenze des Bereiches, in dem die Dosis-Zeit-Beziehung geradlinig verläuft. Bei  $150 \text{ mm}$  Wuchsstrecke setzen wir  $AB = 100$  und berechnen für die Kurven mit steigender Konzentration der enthemmenden Substanz Pteroinsäure aus den Strecken ihrer Schnittpunkte mit  $AB$  von  $B$  aus die Prozentwerte für die Enthemmung. Im Beidiagramm zeigt die Dosis-Zeit-Kurve II eine den Enzymsättigungskurven nach Michaelis-Menten korrespondierende ideale Form. Unter dem Punkt  $C$  liest man auf der Abszisse einen der Michaelis-Konstanten korrespondierenden Wert von  $4,5 \gamma/\text{ml} = 1,44 \times 10^{-5} m$  ab. D. h., daß diese Pteroinsäurekonzentration das durch  $1 \text{ mg/ml} = 3,5 \times 10^{-3} m$  Sulfathiazol partiell gehemmte Mycelwachstum um  $50\%$  enthemmt. Trägt man die reziproken Pteroinsäure-Konzentrationen gegen die reziproken Wirkung-(Enthemmung)-Prozente auf, so erhält man eine Gerade (Kurve III), die durch den Koordinaten-Schnittpunkt geht. Beim Punkt  $C'$  liest man den reziproken Wert des oben erwähnten Wertes ab.

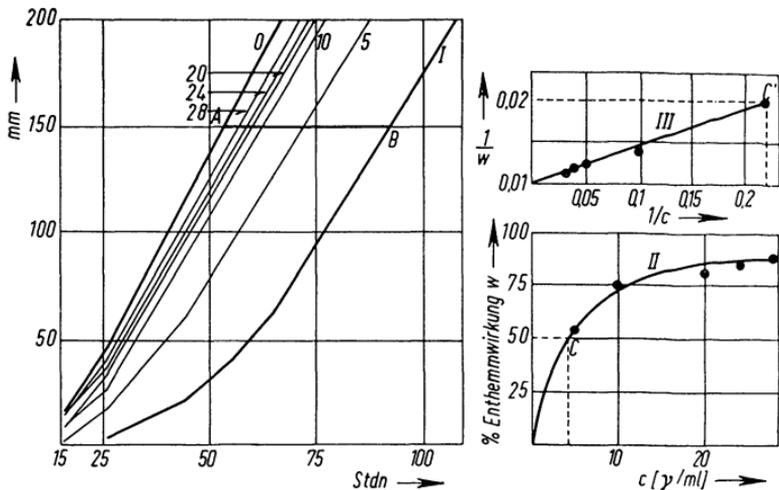


Abb. 6. Enthemmwirkungen steigender Konzentrationen von Pteroinsäure auf die Wuchshemmung durch 1 mg Sulfathiazol/ml bei *N. crassa*. 0: Ungehemmtes Wachstum; I: Wachstum mit 1 mg Sulfathiazol/ml. Bei den übrigen Versuchen wurden außerdem die jeweils in  $\gamma/ml$  an den Kurven angegebenen Mengen Pteroinsäure zugegeben. II: Dosis-Zeit-Kurve, III: reziproke Werte von II.

### 3. Mischtypen und atypischer Wachstumsverlauf

Zuweilen ist der Wachstumsverlauf die Resultante zeitlich wechselnder Reaktionen des Organismus auf Hemmsubstanzen. Jodessigsäure hemmt nach dem a2c4-Typ, d. h. *N. crassa* adaptiert sich in der b- und im ersten Teil der c-Periode an diese Verbindung. Mit 1,1 mg Jodacetat/ml ermüdet diese Adaptation nach etwa 110 Stdn. (Kurve I in Abb. 7), und das Wachstum verlangsamt sich. Bernsteinsäure hebt die Jodacetat-Hemmung auf, jedoch nur beim Mycelwachstum (b- und c-Periode), nicht bei der Conidienkeimung (a-Periode). Im letzten Teil der c-Periode verliert sich diese Enthemmung, so daß Kurven I und 5—7 sich parallel verlaufend neigen. Citronensäure dagegen hemmt zusätzlich zur Jodacetat-Hemmung gemäß den Kurven 8—12, und zwar bereits in der a-Periode, sodann systematisch in der b- und im ersten Teil der c-Periode. Im späteren Teil der c-Periode geht das Wachstum atypisch weiter. Solche Verlaufsformen sind nach der Dosis-Zeit-Beziehung nur bei etwa 50 mm Wachstum auszuwerten und nach der Dosis-Wirkung-Beziehung bei etwa 90 Stdn. Wachstumsdauer.

### Diskussion

Vom Beginn der Induktionszeit bis zum Ende des Mycelwuchses am anderen Rohrende ist *N. crassa* ein einheitlicher Organismus und steht unter dem Einfluß zeitlich und örtlich gleichbleibender Milieubedingungen, insbesondere gleicher Konzentrationen an Hemm- und Enthemm-substanzen.

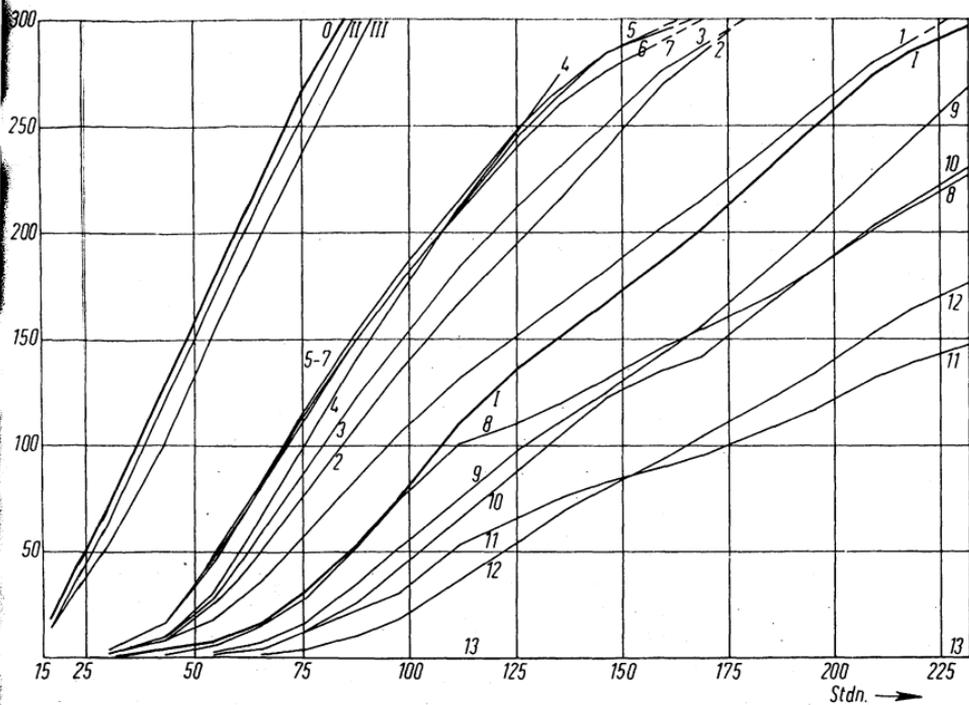


Abb. 7. Hemmwirkung von Jodacetat auf *N. crassa*, enthemmende Wirkung von Succinat und zusätzliche Hemmung durch Citrat. 0: Ohne Zusätze; I: 1,1 mg Jodacetat/ml; II: 0,25 mg Citrat/ml; III: 1,75 mg Succinat/ml. 1—13: Je 1,1 mg Jodacetat/ml und 1: 0,25 mg, 2: 0,5 mg, 3: 0,75 mg, 4: 1,0 mg, 5: 1,25 mg, 6: 1,5 mg, 7: 1,75 mg Na-Succinat/ml; 8: 0,025 mg, 9: 0,1 mg, 10: 0,175 mg, 11: 0,2 mg, 12: 0,225 mg, 13: 0,25 mg Na-Citrat/ml.

Die Stoffwechselfvorgänge während der Conidienkeimung sind in einigen Reaktionen entweder prinzipiell oder nur graduell<sup>14</sup> von denen während des Mycelwuchses verschieden, denn gleiche Konzentrationen einiger Substanzen hemmen Conidienkeimung und Mycelwuchs verschieden stark (2-Chlor-4-amino-benzoesäure, Abb. 1; 4-Äthylenimino-buten-(1)-ol-(3), Abb. 4; — *N. crassa*-Conidien sind gegen Sulfanilamid empfindlicher als Mycel<sup>15</sup>, gegen Jodacetat dagegen weniger empfindlich<sup>16</sup>). Die Verhaltensunterschiede von Conidien und Mycel können auf Permeabilitätsunterschieden gegenüber den Hemmsubstanzen beruhen, doch wahrscheinlich sind sie Ausdruck von Intensitätsunterschieden der gehemmten Stoffwechselreaktionen.

Vom beginnenden Mycelwuchs ab (b-Periode) reagiert der Organismus in dreifacher Weise auf Hemmsubstanzen:

<sup>14</sup> E. L. Tatum u. A. C. Giese, Arch. Biochemistry 9, 15 [1946].

<sup>15</sup> E. L. Tatum u. G. W. Beadle, Proc. nat. Acad. Sci. USA 28, 234 [1942].

<sup>16</sup> F. J. Ryan, E. L. Tatum u. A. C. Giese, J. cellular comparat. Physiol. 23, 83 [1944].

1. Ein den Mycelwuchs limitierender Stoffwechselprozeß wird, der Dosis direkt proportional, partiell blockiert und der Organismus kann weder den Block vermindern, noch wird er zunehmend geschädigt [z. B. 2-Chlor-4-amino-benzoesäure, 4-Äthylenimino-buten-(1)-ol-(3)]. Die primäre Frage nach Permeabilitäts- oder Reaktionsblock wird durch Variation des  $p_H$  des Nährmediums innerhalb der oben erwähnten Grenzen zu klären sein.

2. Der Organismus verlangsamt in der c-Periode seinen Horizontalwuchs zunehmend, als Ausdruck zunehmender Schädigung eines Stoffwechselvorganges oder der Permeabilität (abnorme Wasseraufnahme, Vacuolenbildung; z. B. Triäthylen-thiophosphorsäure-triamid, Abb. 2, und toxische Konzentrationen an *p*-Amino-benzoesäure).

3. Der Organismus adaptiert sich in der b-Periode an die Hemmsubstanz derart, daß in der c-Periode die Wuchsgeschwindigkeit normal oder nahezu normal wird. Dies ist die Folge einer Reaktions- und nicht einer Permeabilitätsveränderung (z. B. Sulfathiazol, Abb. 3, Jodacetat, Abb. 7, und andere Sulfonamide, Abb. 5).

Über Adaptationsprozesse ist viel Empirisches bekannt, doch wenig über die ihnen zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen<sup>1</sup>. Der Entgiftungs- und Adaptationsvorgang gegen Sulfonamide ist am besten untersucht. Er beruht im wesentlichen auf der Acetylierung einer enzymatisch freigesetzten Aminogruppe<sup>17</sup>. Bei *N. crassa* geht die Adaptation an Sulfanilamid mit zunehmender Biosynthese von Coenzym A parallel, das nicht nur zur verstärkten Acetylierung der Fremdsubstanz, sondern auch zur erhöhten Biosynthese körpereigener Stoffe, z. B. von Steroiden verwendet wird<sup>18</sup>. Daß sich *N. crassa* an die chemisch verschiedenen Sulfonamide ganz unterschiedlich adaptiert, zeigt Abb. 5. Es bleibt zu untersuchen, ob dies nicht nur der Ausdruck unterschiedlicher Resorption, sondern viel mehr unterschiedlich gehemmter enzymatischer Aufspaltung der Sulfonamide unter der Wirkung ihrer „Seitenketten“ oder partiell blockierter Biosynthese von CoA ist.

Zur Aufklärung der Wirkungsweise von Hemmsubstanzen dienen aber neben dem Gesamtverhalten des Organismus (a- bis c-Periode) auf deren Gegenwart auch das Gesamtverhalten auf gleichzeitige Anwesenheit von synergistisch oder antagonistisch wirkenden Verbindungen. Diese wirken nun wieder in den a- bis c-Perioden qualitativ und quantitativ verschieden. So wird die Conidienkeimung durch Citrat zusätzlich zur Hemmung durch Jodacetat gehemmt, während Succinat die durch Jodacetat gehemmte Conidienkeimung nicht enthemmt, wohl aber den gehemmten Mycelwuchs (Abb. 7). Ganz eindeutig zeigt sich der Antagonismus Sulfathiazol—Pteroinsäure in Abb. 6 zunächst qualitativ betrachtet als „Linksverschiebung“ der Wuchskurven.

<sup>17</sup> F. Lipmann, *J. biol. Chemistry* **160**, 173 [1945]; N. O. Kaplan u. F. Lipmann, *J. biol. Chemistry* **174**, 37 [1948].

<sup>18</sup> K. V. Rajagopalan u. P. S. Sarma, *Biochem. J.* **69**, 53 [1958].

Qualitative Aussagen über Hemmungs- und Entthemungsvorgänge genügen meist nicht zur Klärung ihrer Wirkungsmechanismen. Die Grundlage für quantitative Aussagen ist aber, daß das Gesamtverhalten des Organismus in den a- bis c-Perioden durch Blockierung oder Freigabe eines Enzymsystems in gesetzmäßiger Weise beeinflußt wird. Nach den Beispielen in den Abb. 1—4 und 6 ist dies der Fall. Die verschiedenen Verhaltensweisen des Organismus ergeben mehrere Verlaufstypen der Wuchskurven, die sich in die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Gruppen a1c1 bis a1c4 und a2c1 bis a2c4 einteilen und nach einheitlichem Plan graphisch analysieren lassen.

### Zusammenfassung

1. Die Verlaufsformen der Wuchshemmung von *Neurospora crassa* im Horizontalwuchstest durch Cytostatika (Agonisten) werden in Hemmtypen eingeteilt.
2. Die graphische Auswertung dieser Verlaufsformen nach einheitlichem Plan ergibt charakteristische und gesetzmäßige Dosis-Zeit- bzw. Dosis-Wirkung-Beziehungen.
3. Ebenso charakteristisch und gesetzmäßig verlaufen auch die Enthemungen durch kompetitive oder nichtkompetitive Antagonisten.

### Summary

1. In a horizontal growth test, the forms of growth inhibition of *Neurospora crassa* by cytostatica (agonists) are divided into inhibition types.
2. The graphic evaluation of these courses of inhibition follows a standard plan and yields characteristic and reproducible dose-time and dose-action relationships.
3. The release of inhibition by competitive and non-competitive antagonists follows an equally characteristic and regular course.