

Über die Hemmwirkung des Aminobiopterins und Tetraaminopyrimidins bei Mikroorganismen

Von ADOLF WACKER und LOTHAR TRÄGER *

Aus dem Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt am Main
(Z. Naturforschg. 17 b, 369—370 [1962]; eingegangen am 14. Februar 1962)

Es wurden mehrere unkonjugierte 2,4-Diaminopteridine erstmals synthetisiert. Die Wachstumshemmung verschiedener Mikroorganismen durch 2,4-Diamino-6-[1,2-dihydroxypropyl-(L-erythro)] pteridin (Aminobiopterin) und anderer unkonjugierter 2,4-Diamino-pteridine läßt sich nur mit Folsäure oder Thymin, nicht dagegen mit Biopterin aufheben.

Ersetzt man bei Folsäure die Hydroxyl-Gruppe in 4-Stellung des Moleküls durch eine Amino-Gruppe, so wird aus einem Wuchsstoff ein Hemmstoff (Aminopterin). In naher Beziehung zu der Folsäure steht sowohl chemisch als auch biologisch das Biopterin (2-Amino-4-hydroxy-6-[1,2-dihydroxypropyl-(L-erythro)]-pteridin). Es war daher interessant, zu sehen, wie sich die biologische Wirkung des Biopterins verändert, wenn in 4-Stellung des Moleküls an Stelle der Hydroxyl-Gruppe eine Amino-Gruppe tritt (Aminobiopterin). — Außer bei *Crithidia fasciculata*, einem Mikroorganismus, der Biopterin zum Wachstum benötigt, haben wir die Wirkung des Aminobiopterins noch bei einem folsäurebedürftigen Organismus (*Sc. faecalis* R) und einem Folsäure nichtbedürftigen (*Enterococcus* Stei) geprüft. — In früheren Untersuchungen¹ mit *Sc. faecalis* R fanden wir, daß 2-Amino-4-hydroxy-6-formyl-pteridin (Pteridin-aldehyd) und 2-Amino-4-hydroxy-6-[1,2,3,4-tetrahydroxybutyl-(D-arabo)]-pteridin (Tetrahydroxybutyl-pteridin) — beides Verbindungen, die in ihrer Struktur dem Biopterin sehr ähnlich sind — das Bakterienwachstum hemmen. Man konnte nun annehmen, daß die Hemmwirkung dieser Verbindungen durch Einführung einer Amino-Gruppe in 4-Stellung noch verstärkt wird. Gleichzeitig wurde auch die Hemmstoffaktivität des für die Synthese der 4-Amino-pteridine notwendigen Grundkörpers, 2,4,5,6-Tetraamino-pyrimidin (Tetraaminopyrimidin), näher untersucht.

Methodik

Synthese von 2,4-Diamino-6-[1,2-dihydroxypropyl-(L-erythro)]-pteridin (Aminobiopterin): 350 mg 5-Desoxy-L-arabinose und 100 mg *p*-Toluidin wurden in 6 ml Wasser und 0,5 ml 2-n. HCl 20 Min. unter Rückfluß erhitzt. Nach dem Erkalten wurde filtriert und dem Filtrat 150 mg Tetraaminopyrimidin, 1 ml 24-proz. Hydrazinhydrat und 0,5 ml Eisessig hinzugegeben und 60 Min. auf 80° erwärmt. Nach dem Neutralisieren fällt Aminobiopterin aus. Ausbeute: 28 mg (Rohprodukt). Chromatographische Reinigung im Lösungsmittelsystem sek. Butanol (wassergesättigt) mit 3% Eisessig: R_f 0,58 (Biopterin R_f 0,48).

Synthese von 2,4-Diamino-6-[1,2,3,4-tetrahydroxybutyl-(D-arabo)]-pteridin (Aminotetrahydroxybutyl-pteridin): 18 g *p*-Tolyl-D-isoglucosamin² wurden in 84 ml Wasser, 8,4 ml Eisessig und 14 ml 24-proz. Hydrazinhydrat 30 Min. unter Rückfluß zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde dreimal das ausgeschiedene *p*-Toluidin ausgeäthert und zur wäßrigen Lösung 9 g Tetraaminopyrimidinsulfat in 70 ml Wasser und 1 ml Eisessig gegeben. Die Mischung wurde 30 Min. am Rückfluß erhitzt und anschließend die noch warme Lösung mit verd. Ammoniaklösung auf p_H 7,5 eingestellt. Ausbeute 425 mg (nach sechs-maligem Umfällen).

Synthese von 2,4-Diamino-6-formyl-pteridin (Aminopteridin-aldehyd): 100 mg Aminotetrahydroxybutyl-pteridin werden in wenig 0,5-n. Schwefelsäure gelöst und in der Kälte einige Stdn. mit einem Überschuß von $NaJO_4$ geschüttelt. Der Aldehyd fällt in braunen Flocken aus und wird durch Umkristallisieren von Perjodat befreit. Ausbeute: 35 Milligramm.

Die Kultivierung und die Zusammensetzung der Nährmedien für *Crithidia fasciculata*³, *S. faecalis* R

* Teil der Dissertation L. TRÄGER, D 83, Technische Universität Berlin 1960.

¹ F. WEYGAND, E.-F. MÖLLER u. A. WACKER, Z. Naturforschg. 4b, 269 [1949].

² F. WEYGAND, A. WACKER u. V. SCHMIED-KOWARZIK, Chem. Ber. 82, 25 [1949].

³ H. A. NATHAN u. J. COWPERTHWAITTE, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 85, 117 [1954].

und *Enterococcus* Stei erfolgte nach früheren Angaben⁴.

Ergebnisse und Diskussion

Aminopterin hemmt in einer Konzentration von etwa 1 μ g/ml das Wachstum von *Crithidia fasciculata* halbmaximal. Merkwürdigerweise wird diese Hemmung nicht durch Biopterin, sondern nur durch Folsäure oder Thymin aufgehoben. — Wie aus Tab. 1 hervorgeht, hemmt Aminopterin das Wachstum von *Sc. faecalis* R. Im Vergleich zur Aminofolsäure benötigt man jedoch für halbmaximale Hemmung mehr Aminopterin. Bei *Sc. faecalis* R ist die Hemmwirkung des Aminoptेरins der von Amino-tetrahydroxybutyl-pteridin und Amino-pteridin-aldehyd überlegen, ebenso wie der von Tetrahydroxybutyl-pteridin und dem Pteridin-aldehyd. Man findet hier eine interessante Parallele zu der Wuchsstoffaktivität der entsprechenden 4-Hydroxy-pteridine bei *Crithidia fasciculata*; Biopterin ist mit Abstand der beste Wuchsstoff gefolgt von Tetrahydroxybutyl-pteridin und dem Pteridin-aldehyd⁵. Beim Tetrahydroxybutyl-pteridin wird durch die Einführung einer Amino-Gruppe in 4-Stellung des Moleküls die Hemmwirkung um ungefähr das 10-fache verstärkt. Interessant ist, daß das Tetraaminopyrimidin, der Grundkörper für die Synthesen der Aminoptेरidine, ein guter Hemmstoff ist. — *Enterococcus* Stei, ein Organismus, der keine Folsäure zum Wachstum benötigt, wird ebenfalls durch Aminopterin in seinem Wachstum gehemmt. Jedoch sind beim Aminopterin wie auch bei den anderen 4-Amino-Verbindungen höhere Konzentrationen für halbmaximale Hemmung notwendig. — Züchtet man *Sc. faecalis* R im Laufe mehrerer Passagen in Anwesenheit von Aminofolsäure resistent gegenüber Aminofolsäure und untersucht dann die Hemmwirkung der aufgeführten Verbindungen, so sieht man (s. Tab. 1), daß der Stamm von allen 4-Amino-Verbindungen und auch von Tetraaminopyrimidin nicht mehr so gut gehemmt wird.

Versucht man die Wachstumshemmung des Aminoptेरins bei *Sc. faecalis* R und *Enterococcus* Stei aufzuheben, so zeigt sich, wie schon bei *Crithidia fasciculata*, daß Biopterin unwirksam ist; dagegen enthemmt *Folsäure kompetitiv* und *Thymin nicht-kompetitiv*.

⁴ F. WEYGAND, A. WACKER, A. TREBST u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **11 b**, 689 [1956].

⁵ A. WACKER u. E.-R. LOCHMANN, Z. Naturforschg. **14 b**, 222 [1959].

	<i>Sc. faecalis</i> R	<i>Sc. faecalis</i> R resistent gegen Aminofolsäure	<i>Enterococcus</i> Stei
Aminofolsäure	0,0006	0,2	0,1
Aminopterin	0,03	0,2	0,2
Tetrahydroxybutylpteridin	30		
Amino-tetrahydroxybutylpteridin	3	8	8
Pteridin-aldehyd	3		
Amino-pteridin-aldehyd	6		40
Tetraaminopyrimidin	0,8	110	130

Tab. 1. Halbmaximale Hemmung von *Streptococcus faecalis* R, *Sc. faecalis* R gegen Aminofolsäure resistent und *Enterococcus* Stei durch verschiedene Pteridine sowie Tetraaminopyrimidin im Vergleich zur Aminofolsäure. Zahlenwerte: γ Hemmstoff pro ml Nährmedium. *Sc. faecalis* R und *Sc. faecalis* R gegen Aminofolsäure resistent waren mit 1 μ g Folsäure/ml gewachsen.

Wie Versuche mit radioaktivem Biopterin bei *Sc. faecalis* R und *Enterococcus* Stei⁶ erbracht haben, spielt vermutlich Biopterin im Stoffwechsel dieser Bakterien keine besondere Rolle. Die vorliegenden Hemm- und Entthemmungsversuche mit Aminopterin zeigten, daß Aminopterin hemmend in das Folsäure-System eingreift. Wichtig ist dabei, daß bei dem gegen Aminofolsäure resistenten Stamm die Zunahme der Resistenz gegenüber Aminopterin im Vergleich zur Aminofolsäure nicht so ausgeprägt ist. — Die gute Hemmwirkung des Tetraaminopyrimidins, dessen Hemmung wie die des Aminoptेरins kompetitiv durch Folsäure und nicht-kompetitiv durch Thymin aufgehoben wird, kann man so erklären, daß dieser Antimetabolit dem Pyrimidin-Metaboliten bei der Folsäure-Biosynthese nahesteht. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß der gegen Aminofolsäure resistente Stamm gleichzeitig gegenüber Tetraaminopyrimidin resistent geworden ist.

Fräulen DÖRTHE PFAHL danken wir für ihre Mithilfe bei den Versuchen, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Verband der Chemischen Industrie — Fonds der Chemie — für finanzielle Unterstützung.

⁶ A. WACKER, E.-R. LOCHMANN u. S. KIRSCHFELD, Z. Naturforschg. **14 b**, 150 [1959].