

Über die Cobalamine einer Mutante von
Bacillus megaterium DE BARY

Von der
Eidgenössischen Technischen Hochschule
in Zürich

zur Erlangung
der Würde eines Doktors der
Naturwissenschaften

genehmigte
Promotionsarbeit

vorgelegt von
Marcelle Juillard
dipl. Natw. E.T.H. von Sonvilier (BE)

Referent: Herr Prof. Dr. E. Gäumann
Korreferent: Herr Prof. Dr. H. Deuel

1957

in kleinen Mengen zur Verfügung stehen. Die begrenzte Menge, in welcher diese aktiven Faktoren auch durch hohe Zugaben von Faktor δ gebildet werden, bekräftigen diese Vermutung.

Für eine weitere Diskussion dieser Versuche wäre es vermutlich aufschlußreich, den Faktor δ (Aetiocobalamincarbonsäure) in Anwesenheit eines gut verwertbaren Nucleotid-, „Precursors“ — z. B. 5, 6-Dimethylbenzimidazol — dem Wildstamm von *Bac. megaterium* anzubieten und zu untersuchen, ob unter diesen Bedingungen nur das „spezifische“ Cobalamin gebildet wird.

Zusammenfassung.

1. Die verwendeten Methoden für die quantitative Bestimmung von Cobalamingehalten mit Hilfe des *Lactobacillus leichmannii* 313 und des *Escherichia coli* 113—3 (Davis-Mutante) werden erläutert.

2. Die getrennte quantitative Bestimmung von aktiven Faktoren in Cobalamingemischen geschieht mit Hilfe einer speziell ausgearbeiteten Methode für quantitative Papierchromatographie in Verbindung mit Bioautographie.

3. Der Verlauf von Cobalaminaktivität, Wachstum und pH-Wert in Kulturen einer Mutante von *Bacillus megaterium* werden mit dem Verhalten von Kulturen des Wildstammes verglichen.

4. Bioautographisch ausgewertete Papierchromatogramme und -elektropherogramme von Kulturfiltraten der Mutante weisen das Vorhandensein dreier für *E. coli* 113—3 aktiver Cobalamine nach, die vorläufig als Faktoren α , β und γ bezeichnet werden.

5. Versuche zur Isolierung der nachgewiesenen Cobalamine führen zur Darstellung eines vierten, inaktiven Cobalamins, des Faktors δ .

6. Die vier durch Verteilungschromatographie an Zellose säulen getrennt gewonnenen Cobalamine werden mit bekannten Cobalaminfaktoren verglichen. Faktor α läßt sich als Faktor C_1 und Faktor γ als Aetiocobalamin identifizieren. Ob Faktor β mit Faktor C_2 identisch ist, bleibt fraglich.

7. Die Eigenschaften des Faktors δ werden diskutiert. Er erweist sich als eine Aetiocobalamincarbonsäure und als ein kompetitiver Antimetabolit zu den aktiven Cobalaminen.

8. Für die Untersuchung der antimetabolischen Eigenschaften des Faktors δ wird eine Versuchsordnung verwendet und dargestellt, die auf einfachste Weise gestattet, gleichzeitig über die Natur des Antimetabolismus — ob kompetitiv oder inkompetitiv — zu entscheiden und den Inhibitionsindex zu ermitteln.

9. Für den Wildstamm von *Bac. megaterium* wird die biosynthetische Verwertbarkeit des Faktors δ (Aetiocobalamincarbonsäure) untersucht und gezeigt, daß dabei aus der Aetiocobalamincarbonsäure sechs aktive Umwandlungsprodukte entstehen.

10. Die aus den Kulturen der Mutante von *Bac. megaterium* erhaltenen Cobalamine werden hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Biosynthese von Cobalaminen diskutiert.

Schrifttum.

- ARMITAGE, J. B., CANNON, J. R., JOHNSON, A. W., PARKER, L. F. J., LESTER SMITH, E., STAFFORD, W. H., and TODD, A. R., J. Chem. Soc. (Lond.) 1953, 3849 (1953). Association of Official Agricultural Chemists: J. Ass. Off. Agr. Chemists 36, 96 (1953). — BERNHAUER, K., und FRIEDRICH, W., Angew. Chemie 66, 776 (1954). — BLISS, C. I.,

- Science **100**, 577 (1944). — BONNET, R., CANNON, J. R., JOHNSON, A. W., SUTHERLAND, I., TODD, A. R., and LESTER SMITH E., Nature (Lond.) **176**, 328 (1955). — BRINK, C., HODGKIN, D. C., LINDSEY, J., PICKWORTH, J., ROBERTSON, J. H., and WHITE, J. G., Nature (Lond.) **174**, 1169 (1954). — BROWN, F. B., CAIN, J. C., GANT, D. E., PARKER, L. F. J., and LESTER SMITH, E., Biochem. J. **59**, 82 (1955). — BROWN, F. B., and LESTER SMITH, E., Biochem. J. **56**, XXXIV (1954). — CANNON, J. R., JOHNSON, A. W., and TODD, A. R., Nature (Lond.) **174**, 1168 (1954). — COATES, M. E., and FORD, J. E., Biochem. Soc. Symposia No. 13, S. 36. University Press, Cambridge 1955. — DELLWEG, Hw., BECHER, E., und BERNHAUER, K., Biochem. Z. **327**, 422 (1956 a); **328**, 81 (1956 b); **328**, 88 (1956 c); **328**, 96 (1956 d). — FANTES, K. H., and O'CALLAGHAN, C. H., Biochem. J. **59**, 79 (1955). — FORD, J. E., and HOLDSWORTH, E. S., Biochem. J. **53**, XXII (1952); **56**, XXXV (1954). — FORD, J. E., HOLDSWORTH, E. S., and KON, S. K., Biochem. J. **59**, 86 (1955). — FORD, J. E., HOLDSWORTH, E. S., KON, S. K., and PORTER, J. W. G., Nature (Lond.) **171**, 150 (1953). — FORD, J. E., and HUTNER, S. H., Vitamins and Hormones **13**, 101 (1955). — FORD, J. E., KON, S. K., and PORTER, J. W. G., Biochem. J. **50**, IX (1951); **52**, VIII (1952). — FORD, J. E., and PORTER, J. W. G., Biochem. J. **51**, V (1952). — FRIEDRICH, W., und BERNHAUER, K., Angew. Chem. **65**, 627 (1953). — Dies., Z. Naturforsch. **9 b**, 686 (1954); **9 b**, 755 (1954); **10 b**, 6 (1955). — FRIEDRICH, W., GROSS, G., und BERNHAUER, K., Mikrochim. Acta **1956**, 134 (1956). — GANT, D. E., LESTER SMITH, E., and PARKER, L. F. J., Biochem. J. **56**, XXXIV (1954). — GARIBALDI, S. A., ITOHI, K., SNELL, N. S., and LEWIS, J. C., Indus. Engeneer. Chem. **45**, 838 (1953). — HODGKIN, D. C., PICKWORTH, J., ROBERTSON, J. H., TRUEBLOOD, K. N., PROSEN, R. J., and WHITE, J. G., Nature (Lond.) **176**, 325 (1955). — JANICKI, J., and PAWELKIEWICZ, J., Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II, **3**, 5 (1955). — KON, S. K., Biochem. Soc. Symposia No. 13, S. 17. University Press, Cambridge 1955. — LESTER SMITH, E., Biochem. Soc. Symposia No. 13, S. 3. University Press, Cambridge 1955. — MARKHAM, R., and SMITH, J., Biochem. J. **52**, 552 (1952). — PAWELKIEWICZ, J., Bull. Acad. Polon. Sci., Cl. II, **3**, 3 (1955). — PFFIFFNER, J. J., CALKINS, D. G., PETERSON, R. C., BIRD, O. D., MCGLOHON, V., and STIPEK, R. W., Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc. 120th Mtg., 22 C (1951). SHAW, E., Metabolism **2**, 103 (1953). — SJÖSTRÖM, A. G. M., NEUJAHN, H. Y., and LUNDIN, H., Acta chem. scand. **7**, 1036 (1953). — SOMOCYI, J. C., Die Antianeurinfaktoren. Hans Huber, Bern 1952. 120 S. — U. S. Pharmacopeia, 14th revision, 3rd Supplement, p. 15. Mack Printing Co., Easton, Pa., 1951. — WJLMENGA, H. G., Onderzoekingen over vitamine B₁₂ en verwante factoren. Dissertation. Utrecht 1951. — WILLIAMS, W. L., ESPOSITO, R. G., and PIERCE, J. V., Federation Proc. **11**, 458 (1952). — WOOLLEY, D. W., A Study of Antimetabolites. John Wiley, London 1952. 269 S. — YACOWITZ, H., NORRIS, L. C., and HEUSER, C. F., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **71**, 372 (1949).

Anschrift der Verfasserin:

Marcelle Juillard, Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich.