

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

## Inhalt.

Einleitung . . . . .	701
Experimenteller Teil . . . . .	702
I. Herkunft des Untersuchungsmaterials . . . . .	702
II. Nachweis und Trennung von Cobalaminen . . . . .	702
1. Mikrobiologische Bestimmung von Cobalamingehalten . . . . .	702
a) Test mit <i>Escherichia coli</i> 113-3 (Davis-Mutante ATCC 11 105) . . . . .	702
b) Test mit <i>Lactobacillus leichmannii</i> 313 (ATCC 7830) . . . . .	703
c) Quantitative Auswertung der Tests . . . . .	703
d) Spezifität der mikrobiologischen Tests . . . . .	703
2. Trennung von Cobalamingemischen . . . . .	704
a) Papierchromatographie . . . . .	704
b) Papierelektrophorese . . . . .	705
c) Bioautographie . . . . .	705
3. Quantitative Papierchromatographie von mikrobiologisch aktiven Cobalaminen . . . . .	705
III. Vergleiche zwischen Mutante und Wildstamm . . . . .	708
1. Morphologisch . . . . .	708
2. Physiologisch . . . . .	708
a) Allgemeine Kulturbedingungen . . . . .	708
b) Verlauf von Wachstum und pH . . . . .	709
c) Verlauf der „ <i>E. coli</i> -Aktivität“ und der „ <i>L. leichmannii</i> -Aktivität“ . . . . .	710
IV. Die aktiven Faktoren in Kulturen der Mutante . . . . .	711
1. Papierchromatographische und -elektrophoretische Analyse . . . . .	711
2. Vergleich der Faktoren $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ mit bekannten Faktoren . . . . .	712
3. Das zeitliche Auftreten der Faktoren in Kulturen der Mutante . . . . .	712
V. Die präparative Gewinnung der einzelnen Cobalamine . . . . .	713
1. Gewinnung gereinigter Cobalaminkonzentrate . . . . .	713
2. Verteilungschromatographie des Cobalamingemisches . . . . .	714
a) Methode . . . . .	714
b) Resultat der Säulenchromatographie . . . . .	715
3. Aufarbeitung von Kulturen des Wildstammes . . . . .	715
VI. Die Identität der Faktoren $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ und $\delta$ . . . . .	715
1. Faktor $\alpha$ . . . . .	716
2. Faktor $\beta$ . . . . .	716
3. Faktor $\gamma$ . . . . .	716
4. Faktor $\delta$ . . . . .	716
a) Reinigung der aus der Zellulosesäule erhaltenen Fraktionen . . . . .	716
b) Aussehen der wässrigen Lösungen . . . . .	717
c) Papierchromatographisches und elektrophoretisches Verhalten . . . . .	717
d) Absorptionsspektrum . . . . .	717
e) Antimetabolitische Eigenschaften . . . . .	718
f) Die wahrscheinliche Natur des Faktors $\delta$ . . . . .	721
VII. Biosynthetische Versuche . . . . .	721
1. Der Einfluß von Zugaben von Vitamin B <sub>12</sub> zu Kulturen der Mutante . . . . .	722
2. Der Einfluß von Zugaben von Aetiocobalamin zu Kulturen der Mutante . . . . .	722
3. Der Einfluß von Zugaben von Faktor $\delta$ zu Kulturen des Wildstammes . . . . .	723
VIII. Diskussion . . . . .	723
Zusammenfassung . . . . .	726
Schrifttum . . . . .	726

[Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich (Direktor: Prof. Dr. E. G ä u m a n n).]

## Über die Cobalamine einer Mutante von *Bacillus megaterium* DE BARY.

Marcelle Juillard.

Mit 8 Abbildungen im Text.

### Einleitung.

Die Cobalamine sind dem Vitamin B<sub>12</sub> verwandte Verbindungen. Sie enthalten als Hauptbestandteil einen gemeinsamen Grundkörper, der gemäß einem Nomenklaturvorschlag von BERNHAUER und FRIEDRICH (1954) als Aetiocobalamin bezeichnet wird, und der im englischen Sprachgebrauch als „Factor B“ (FORD, KON und PORTER, 1951) bekannt ist. Aetiocobalamin ist eine porphyrinähnliche Substanz (BONNET et al., 1955; BRINK et al., 1954; CANNON et al., 1954; HODGKIN et al., 1955), die als solche in der Natur vorkommt (BERNHAUER und FRIEDRICH, 1954; FORD und PORTER, 1952; JANICKI und PAWELKIEWICZ, 1955) und ferner durch hydrolytischen Abbau aus natürlichen „kompletten“ Vitamin B<sub>12</sub>-Arten, so aus Vitamin B<sub>12</sub> selbst, gewonnen werden kann (ARMITAGE et al., 1953; FRIEDRICH und BERNHAUER, 1954; GANT, LESTER SMITH und PARKER, 1954). Als zweites Spaltstück der „kompletten“ Cobalamine erhält man ein Nucleotid, bestehend aus d-Ribose, Phosphorsäure und einer Base.

Die Cobalamine lassen sich nach BERNHAUER und FRIEDRICH (1954) in „komplette“, d. h. nucleotidhaltige, und „inkomplette“, d. h. nucleotidfreie B<sub>12</sub>-Arten einteilen. Verschiedene „komplette“ Cobalamine wurden aus natürlichen Quellen isoliert (BROWN et al., 1955; BROWN und LESTER SMITH, 1954; FORD, KON und PORTER, 1951; FORD und PORTER, 1952; FRIEDRICH und BERNHAUER, 1953), die sich dadurch von Vitamin B<sub>12</sub> unterscheiden, daß sie als Nucleotidbase an Stelle von 5,6-Dimethylbenzimidazol andere Basen aus der Benzimidazol- oder Purinreihe enthalten. Weitere „komplette“ Cobalamine ließen sich auf biosynthetischem Wege gewinnen, indem geeigneten Organismen Aetiocobalamin und eine geeignete Base als Vorstufen angeboten wurden. BERNHAUER und FRIEDRICH (1954), DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 a, c, d), FORD und HOLDSWORTH (1954), FORD, HOLDSWORTH und KON (1955) zeigten durch Versuche mit *Escherichia coli*, daß bestimmte Basen als solche durch den betreffenden Organismus zur Biosynthese neuer Vitamin B<sub>12</sub>-Analoge verwertet werden, d. h. die Bildung „spezifischer“ Cobalamine induzieren.

Zu den „inkompletten“ Cobalaminen gehören das Aetiocobalamin und die Aetiocobalamincarbonsäuren (BERNHAEUER und FRIEDRICH, 1954). Aetiocobalamincarbonsäuren wurden von ARMITAGE et al. (1953) durch Hydrolyse von Aetiocobalamin gewonnen, wobei je nach Intensität der Reaktion eine oder mehrere der freien Amidgruppen am Molekül verseift werden konnten. In der Natur fanden FRIEDRICH und BERNHAEUER (1953) Aetiocobalamincarbonsäuren im Faulschlamm, und sie entstehen nach DELLWEG, BECHER und BERNHAEUER (1956 b) bei der Einwirkung von *Escherichia coli* auf Aetiocobalamin allein.

In der vorliegenden Arbeit soll eine Mutante eines Vitamin B<sub>12</sub> synthetisierenden Organismus auf seine Cobalaminproduktion untersucht werden. Es wird über Versuche berichtet, die einzelnen gebildeten Cobalamine zu isolieren und ihnen eine Bedeutung für die Biosynthese von Vitaminen der B<sub>12</sub>-Gruppe zuzuschreiben.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN, möchte ich für die großzügige Förderung dieser Arbeit herzlich danken.

Frl. P. MARTHAUER und Frl. A. KRAFT danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der zahlreichen Tests und Bestimmungen.

## Experimenteller Teil.

### I. Herkunft des Untersuchungsmateriales.

Der für die vorliegenden Untersuchungen verwendete Organismus ist eine Mutante von *Bacillus megaterium*, die aus eigenen Mutationsversuchen mit Röntgenstrahlen hervorging. Diese Mutante, Stamm E.T.H. Nr. M 3001, entstand bei der Bestrahlung einer Sporensuspension von *Bac. megaterium* Stamm NRRL B—938 mit 750 000 r.

Für die Ermöglichung der Bestrahlungen sei auch an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. H. R. SCHINZ und Frau P. D. Dr. H. FRITZ-NIGGLI von der Universität Zürich der beste Dank ausgesprochen.

### II. Nachweis und Trennung von Cobalaminen.

#### I. Mikrobiologische Bestimmung von Cobalamingehalten.

Für die quantitative Bestimmung von Cobalamingehalten verdünnter Lösungen wurden zwei Testorganismen verwendet. Bei beiden gelangte die Methode des Platten-Diffusionstestes zur Anwendung.

##### a) Test mit *Escherichia coli* 113—3 (Davis-Mutante, ATCC 11 105).

Die Methode von WILLIAMS, ESPOSITO und PIERCE (1952) wurde in der folgenden etwas abgeänderten Form ausgeführt:

Die Stammkulturen von *E. coli* werden auf Nähragar 48 Std. bei 33° C inkubiert, dann bei 4° C aufbewahrt und monatlich erneuert.

Das Testmedium hat folgende Zusammensetzung:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	7 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	3 g	Glucose . . . . .	2 g
Na <sub>3</sub> -citrat · 3 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,5 g	Agar . . . . .	15 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O . . . . .	0,1 g	Wasser . . . . .	1 Liter

pH 6,8 vor dem Autoklavieren (15 Min. bei 120° C).

Zum besseren Erkennen der Wachstumszonen wird dem Medium nach dem Autoklavieren 0,015% 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zugegeben (FORD und

HOLDSWORTH, 1952), welches während des Wachstums des Testorganismus zu einem roten Formazanpigment reduziert wird.

Als Impfmateriale dient eine Aufschwemmung der Zellen von Stammkulturröhren in steriler isotonischer Kochsalzlösung, die ohne jegliche Waschung direkt dem 45—48° C warmen Agar zugegeben wird. Als Testplatten werden Petrischalen von 9 cm Durchmesser benutzt, die mit je 20 ccm Testagar versehen werden. Die Testplatten sind bei 4° C eine Woche haltbar.

#### b) Test mit *Lactobacillus leichmannii* 313 (ATCC 7830).

Die Stammkulturen des *L. leichmannii* ATCC 7830 werden auf „Bacto Assay Culture Agar“ als Stiehkulturen bei 33° C inkubiert und dann bei 4° C nicht länger als einen Monat aufbewahrt. Bevor eine neue Stammkultur für den Test eingesetzt wird, wird sie mindestens zehnmal innerhalb von 2 Wochen frisch auf „Bacto Assay Culture Agar“ überimpft (U. S. Pharmacopeia).

Das Inokulum wird durch Subkultur einer 24—48 Std. alten Stiehkultur des *L. leichmannii* in 9 ccm „Bacto Micro Inoculum Broth“ hergestellt. Nach 16—24-stündiger Inkubation bei 33° C werden die Zellen steril zentrifugiert, dreimal mit 9 ccm steriler isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und schließlich in 9 ccm steriler isotonischer Kochsalzlösung suspendiert. 1 ccm dieser Suspension dient als Inokulum für 1 Liter 45° warmen Testagar, der in Portionen von 20 ccm in Petrischalen von 9 cm Durchmesser verteilt wird. Die Testplatten sind bei 4° C eine Woche haltbar.

Die Zusammensetzung des Testagars wurde aus der Methode der Association of Agricultural Chemists (1952) für die turbidimetrische Bestimmung von Vitamin B<sub>12</sub> mit Hilfe des *L. leichmannii* ATCC 7830 übernommen und mit 0,1% (Cysteinhydrochlorid und 1,5% Agar („Bacto“) supplementiert.

#### Zusammensetzung des Testmediums für *Lactobacillus leichmannii* 313<sup>1)</sup>:

Glucose . . . . .	20,0 g	p-Aminobenzoesäure . . . . .	1 mg
Casamino acids (Bacto) . . . . .	5,0 g	Ca-Pantothenat . . . . .	0,5 mg
Asparagin . . . . .	0,1 g	Pyridoxinhydrochlorid . . . . .	2 mg
Na-acetat . . . . .	10,0 g	Pyridoxalhydrochlorid . . . . .	2 mg
Ascorbinsäure . . . . .	2,0 g	Pyridoxaminhydrochlorid . . . . .	0,4 mg
L-Cystin . . . . .	0,2 g	Folsäure . . . . .	0,1 mg
Cysteinhydrochlorid . . . . .	1,0 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	0,5 g
DL-Tryptophan . . . . .	0,2 g	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . . . . .	0,5 g
Adeninsulfat . . . . .	10 mg	MgSO <sub>4</sub> . . . . .	0,2 g
Guaninhydrochlorid . . . . .	10 mg	NaCl . . . . .	10 mg
Uracil . . . . .	10 mg	FeSO <sub>4</sub> . . . . .	10 mg
Xanthin . . . . .	10 mg	MnSO <sub>4</sub> . . . . .	10 mg
Riboflavin . . . . .	0,5 mg	Tween 80 . . . . .	1 g
Aneurin . . . . .	0,5 mg	Bacto Agar . . . . .	15 g
Biotin . . . . .	2 $\gamma$	Dest. Wasser . . . . .	ad 1 Liter
Nicotinsäure . . . . .	1 mg	pH 6,0	

#### c) Quantitative Auswertung der Tests.

Die zu testenden Lösungen und die Vergleichssubstanzen werden mit Hilfe von Filterrondellen von 6 mm Durchmesser auf den Testagar gebracht. Nach der Inkubation (bei *E. coli* nach 12 Std., bei *L. leichmannii* nach 18 Std.) werden die Wachstumshöfe ausgemessen und nach der für die Bestimmung von Antibiotica ausgearbeiteten Methode von BLISS (1944) ausgewertet. Als Standard dient im Test mit *E. coli* eine Vitamin B<sub>12</sub>-Lösung von 0,1  $\gamma$ /ccm, welche eine Wachstumszone von durchschnittlich 18 mm Durchmesser ergibt. *L. leichmannii* ist etwa zehnmal empfindlicher, und die Lösungen müssen entsprechend verdünnt werden.

#### d) Spezifität der mikrobiologischen Tests.

Beide verwendeten Testorganismen sind für Vitamin B<sub>12</sub> nicht spezifisch, sie vermögen beide neben Vitamin B<sub>12</sub> noch andere Cobalamine zu verwerten.

<sup>1)</sup> Die verschiedenen Vitamine und weiteren Substanzen wurden uns in dankenswerter Weise von der Firma F. Hoffmann-La Roche in Basel zur Verfügung gestellt.

Für *E. coli* sind fast alle natürlich vorkommenden Cobalamine Wachstumsfaktoren. Der Cobalaminbedarf dieses Organismus scheint durch einen Defekt in der Biosynthese von Aetiocobalamin verursacht zu sein. Gibt man *E. coli* Aetiocobalamin und eine geeignete Nucleotidbase als „Precursor“, so vermag es, die Biosynthese des betreffenden kompletten Cobalamines auszuführen (DELLWEG, BECHER und BERNHAUER, 1956 a; FORD und HOLDSWORTH, 1954; FORD, HOLDSWORTH und KON, 1955).

Aetiocobalamin ist nur für *E. coli* aktiv, nicht für *L. leichmannii*. Die meisten bekannten nucleotidhaltigen Cobalamine sind für beide Organismen aktiv, jedoch in verschiedenem Ausmaß (COATES und FORD, 1955). Die Aktivität des Aetiocobalamins gegenüber *E. coli* ist nach DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 a; 1956 b) darauf zurückzuführen, daß dieser Organismus das Aetiocobalamin in Vitamin B<sub>12</sub> umzuwandeln vermag; im Gegensatz dazu scheinen die kompletten Cobalamine als solche für verschiedene Mikroorganismen aktiv zu sein und als auswechselbare Wachstumsfaktoren zu fungieren. Die mikrobiologische Aktivität der einzelnen Cobalamine, verglichen mit derjenigen des Vitamins B<sub>12</sub>, hängt sehr von den Testbedingungen ab. Im Plattentest mit *E. coli* erweisen sich die meisten als ebenso aktiv wie Vitamin B<sub>12</sub> selbst, während im Röhrentest (turbidimetrische Bestimmungen) beträchtliche Aktivitätsunterschiede beobachtet werden (BROWN, CAIN, GANT, PARKER und LESTER SMITH, 1955; COATES und FORD, 1955).

Bei den eigenen Versuchen hatte Aetiocobalamin, auf Gewichtsbasis gerechnet, gegenüber *E. coli* die gleiche Aktivität wie Vitamin B<sub>12</sub> und gegenüber *L. leichmannii* in Übereinstimmung mit den obenerwähnten Befunden keine Aktivität.

## 2. Trennung von Cobalamingemischen.

Die Papierchromatographie erwies sich seit Beginn der Arbeiten über Vitamin B<sub>12</sub> als nützliches Hilfsmittel. YACOWITZ, NORRIS und HEUSER (1949) verwendeten sie auch in Verbindung mit dem mikrobiologischen Test mit *L. leichmannii* zur eindeutigen Bestimmung von Vitamin B<sub>12</sub>. Für die Trennung von B<sub>12</sub>-Analogen wurde die Papierchromatographie von WLMENGA (1951), FORD, KON und PORTER (1951) erfolgreich angewandt, und sie stellt seither wohl die wichtigste Methode zur Analytik von Cobalamingemischen dar (vgl. auch FRIEDRICH und BERNHAUER, 1955). Die Untersuchung sehr komplexer Cobalamingemische ist jedoch mit der Papierchromatographie allein nicht befriedigend. Erst eine Kombination mit Papierelektrophorese (FORD, HOLDSWORTH, KON und PORTER, 1953) liefert einwandfreie Auftrennungen.

### a) Papierchromatographie.

In den vorliegenden Versuchen erfolgte die Papierchromatographie durchweg absteigend, bei 30°, auf Bogen von Whatman Nr. 4 oder Whatman 3 MM. Die Proben wurden in Quantitäten von 3 bis 9 cmm und in Konzentrationen zwischen 0,01 und 1  $\gamma$ /cmm punktförmig aufgetragen.

Als Vergleichssubstanzen dienten Vitamin B<sub>12</sub> und Aetiocobalamin, welches uns von Herrn Dr. E. LESTER SMITH der Glaxo Laboratories, Greenford, Middlesex, freundlicherweise überlassen wurde. Wir möchten ihm an dieser Stelle dafür bestens danken.

Die verwendeten Entwicklersysteme waren folgende:

A. sec. Butanol — Eisessig — Wasser — 5% KCN  
(100 : 1 : 50 : 0,25)

(FORD, HOLDSWORTH und KON, 1955)

B. sec. Butanol — Ammoniak (spez. Gew. 0,88) — Wasser — 5% KCN  
(100 : 1 : 50 : 0,25)  
(FORD, HOLDSWORTH und KON, 1955.)

C. sec. Butanol —  $\text{KClO}_4$  — Wasser — 0,01% KCN wasser- und Kalium-  
perchlorat-gesättigt (FRIEDRICH und BERNHAUER, 1955; FRIEDRICH, GROSS  
und BERNHAUER, 1956).

#### b) Papierelektrophorese.

Für die papierelektrophoretischen Untersuchungen stand eine Hochspannungs-  
elektrophoreseanlage nach der Versuchsanordnung von MARKHAM und SMITH (1952)  
zur Verfügung.

Es wurde bei Spannungen von 500 bis 1000 Volt und Stromstärken von 10 bis  
20 Milliamp. gearbeitet. Die Versuche dauerten 2 bis 4 Stunden. Als Kühlmittel diente  
Tetrachlorkohlenstoff.

Die verwendeten Puffersysteme waren:

0,5 m Essigsäure + 0,005% HCN, pH 2,7  
(DELLWEG, BECHER und BERNHAUER, 1956 a).

0,05 m Phosphatpuffer + 0,005% HCN, pH 6,5  
(DELLWEG, BECHER und BERNHAUER, 1956 a).

Proben und Vergleichssubstanzen wurden in gleichen Quantitäten und Konzen-  
trationen wie für die Papierchromatographie auf Streifen von Whatman 3 MM von  
8×58 cm aufgetragen.

#### c) Bioautographie.

Der Nachweis von aktiven Cobalaminen auf Papierchromatogrammen und Elektro-  
pherogrammen erfolgte durch Bioautographie mit *E. coli*, ähnlich dem von FORD und  
HOLDSWORTH (1953) dargestellten Verfahren.

Als Testplatten dienten Pyrexschalen von 18×30 cm, die mit einer ca. 2 mm  
dicken Schicht von mit *E. coli* inokuliertem Testagar ausgegossen waren. Auf diese  
wurden die zu untersuchenden Papiere nach dem Trocknen ausgelegt und während  
der ganzen Inkubationszeit auf dem Agar belassen. Die durch TTC rotgefärbten Wachstumszonen konnten auf diese Weise nach  
beendeter Inkubation direkt mit Hilfe eines Aquarellstiftes auf das Papier nach-  
gezeichnet werden, was das Ausmessen der Flecke und die Bestimmung von  
Wanderungswegen wesentlich erleichtert.

### 3. Quantitative Papierchromatographie von mikro- biologisch aktiven Cobalaminen.

Bei der quantitativen Bestimmung von Cobalaminen mit Hilfe des  
Plattendiffusionstestes erfaßt man bei Lösungen, welche Cobalamingemische  
enthalten, bekanntlich die Gesamttaktivität aller vorhandenen  
Cobalamine. Oft ist es aber wichtig, Gemische von aktiven Cobalaminen  
hinsichtlich der einzelnen Komponenten zu analysieren.

Will man z. B. den Erfolg von Reinigungs- oder Extraktionsprozessen  
eines Cobalamingemisches ermitteln, so gibt der Vergleich der Gesamttakti-  
vität der Probe vor und nach dem Prozeß nur dann ein korrektes Bild, wenn  
alle vorhandenen Cobalamine auf die betreffende Behandlung gleich  
reagieren. Dies ist aber meist nicht der Fall.

FRIEDRICH und BERNHAUER (1954) wiesen nach, daß das Verhalten der einzelnen  
 $\text{B}_{12}$ -Faktoren gegenüber Phenolen sehr unterschiedlich ist; so braucht es zur Extraktion  
von Faktor III aus einer wässrigen Lösung eine beträchtlich höhere Phenolkonzent-  
ration, als sie für Vitamin  $\text{B}_{12}$  benötigt wird.

Wir wünschten deshalb, bei Aufarbeitungen das Verhalten der ein-  
zelnen Cobalamine chromatographisch zu verfolgen.

Ferner hilft die Anwendung der Papierchromatographie über die Schwierigkeit  
hinweg, die für den Testorganismus meist toxischen Extraktionsmittel  
eliminieren zu müssen.

Bei biosynthetischen Versuchen schien es ebenfalls wichtig, über eine Methode zu verfügen, die es erlaubt, direkt in Kulturfiltraten die Konzentration an einzelnen aktiven Cobalaminen zu erfassen.

FANTES und O'CALLAGHAN (1955) verwendeten bei ihren Untersuchungen über den Einfluß von *o*-Phenylendiamin auf die Bildung von Vitamin B<sub>12</sub> durch *Streptomyces griseus* innerhalb eines Konzentrationsgebietes von etwa 0,01 bis 0,5  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/ccm eine quantitative Papierchromatographie. Sie photographierten die Bioautogramme, schnitten aus den Aufnahmen die abgebildeten Wachstumszonen aus und bestimmten deren Gewicht. Sie fanden dabei, daß diese Gewichte den Logarithmen der Konzentrationen direkt proportional waren.

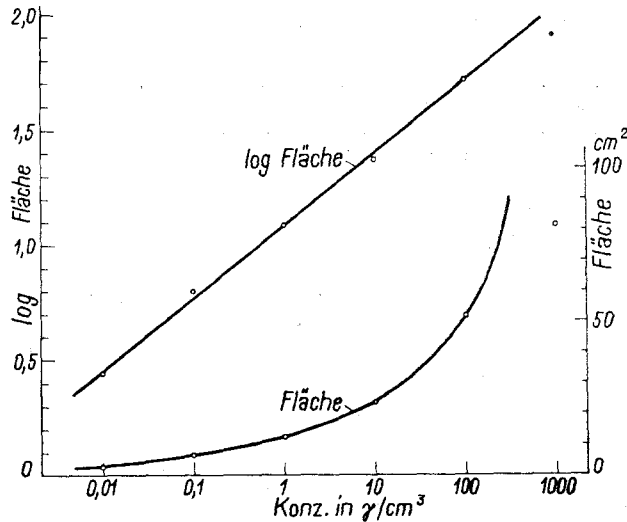


Abb. 1. Abhängigkeit der Wachstumsflächen im Bioautogramm vom Logarithmus der Cobalaminkonzentration.

Wir fragten uns, ob auch für größere Konzentrationsbereiche eine einfache Relation zwischen Konzentration und Wachstumszonen auf dem Bioautogramm ermittelt werden kann.

Um die Anwendungsmöglichkeit der Papierchromatographie für die quantitative Bestimmung der Cobalamine zu untersuchen, wurde die Abhängigkeit der Fleckengröße im Bioautogramm von der Menge des auf dem Chromatogramm applizierten Cobalamins bestimmt.

Zu diesem Zweck wurden in Parallelen auf jeden Papierbogen je 5 cmm Vitamin B<sub>12</sub>-Lösung in den Konzentrationen 0,01  $\gamma/cm$ , 0,1  $\gamma/cm$ , 1,0  $\gamma/cm$ , 10,0  $\gamma/cm$ , 100,0  $\gamma/cm$  und 1000,0  $\gamma/cm$  aufgetragen, die Chromatogramme entwickelt und bioautographisch ausgewertet. Die durch 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid rotgefärbten Wachstumszonen wurden mit Hilfe eines Aquarellstiftes genau auf die Chromatogramme kopiert und die gezeichneten Flächen mit einem Polarplanimeter ermittelt.

Die Abhängigkeit der Oberflächen von der Konzentration ist in Abb. 1 graphisch dargestellt. Daraus ist ersichtlich, daß über den großen Konzentrationsbereich von 1 bis 10<sup>5</sup> der Logarithmus der Fläche dem Logarithmus der Konzentration direkt proportional ist.



Der Proportionalitätsfaktor entspricht der „Steigung“ im Plattendiffusionstest (BLISS, 1944) und ist im wesentlichen abhängig von der Diffusion der Substanz, der Schichtdicke des Testagars und der Menge der eingesäten Testzellen. Für die Anwendung der Methode wurde zuerst durch Versuche festgestellt, daß Vitamin B<sub>12</sub> und Aetiocobalamin die gleiche Diffusion besitzen. Es darf angenommen werden, daß dies für alle Cobalamine richtig ist, denn es handelt sich um Moleküle von sehr verwandter Struktur, die auch alle sehr gut wasserlöslich sind. Der Proportionalitätsfaktor muß für zuverlässige Resultate bei jeder Probe ermittelt werden. Es ist deshalb zweckmäßig, die zu untersuchenden Substanzen in zwei verschiedenen Konzentrationen aufzutragen.

Gestützt auf diese Grundlagen läßt sich in Anlehnung an die für Antibioticabestimmungen entwickelte Vierpunktmethode (BLISS, 1944) folgendes Verfahren für die Ermittlung unbekannter Cobalaminkonzentrationen im Bioautogramm ableiten:

Die Ausgangsformel lautet:

$$\log K = a \cdot \log F,$$

wobei K = Konzentration des aufgetragenen Cobalamins

F = Oberfläche des auf dem Bioautogramm verursachten Fleckens

a = Proportionalitätsfaktor („Steigung“).

Wir bezeichnen die als Vergleichslösung dienende Standardkonzentration mit A<sub>1</sub> und ihre n-fach verdünnte Lösung mit A<sub>2</sub>, ferner die Oberfläche der durch Auftragen von gleichen Volumina obiger Lösungen hervorgerufenen Bioautogrammflecken mit S<sub>1</sub> resp. S<sub>2</sub>. Analogerweise entspricht der unbekanntem Konzentration K<sub>1</sub> die Fläche U<sub>1</sub>, und ihrer n-fachen Verdünnung K<sub>2</sub> die Fläche U<sub>2</sub>.

Es ist also:

1.  $\log K_1 = a \cdot \log U_1$
2.  $\log K_2 = a \cdot \log U_2$
3.  $\log A_1 = a \cdot \log S_1$
4.  $\log A_2 = a \cdot \log S_2$

Durch geeignete Kombination dieser vier Gleichungen erhält man unter Benutzung der Beziehung

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{A_1}{A_2} = n$$

$$\log K_1 = \log A_1 + \log n \cdot \frac{\log \frac{U_1 \cdot U_2}{S_1 \cdot S_2}}{\log \frac{U_1 \cdot S_1}{U_2 \cdot S_2}}$$

Setzt man für die praktische Anwendung der Methode A<sub>1</sub> = 100% und wählt die Verdünnung n = 10, so erhält man:

$$\log K_1 = 2 + \frac{\log \frac{U_1 \cdot U_2}{S_1 \cdot S_2}}{\log \frac{U_1 \cdot S_1}{U_2 \cdot S_2}}$$

Auf diese Weise erhält man K<sub>1</sub> ausgedrückt als Prozente von A<sub>1</sub>.

Es ist interessant, hier die Empfindlichkeit der Ergebnisse der Methode hinsichtlich der Fehlermöglichkeit der einzelnen Bestimmungselemente näher zu prüfen. Die verschiedenen Flächen können systematische und zufällige Fehler aufweisen. Die letzteren sind durch Vergleich mehrerer Parallelen unter identischen Versuchsbedingungen zu beurteilen.

Hingegen läßt die Formel den Einfluß von systematischen Fehlern nicht ohne weiteres erkennen. In erster Linie ist festzustellen, daß der Proportionalitätsfaktor, der von den Versuchsbedingungen stark abhängen kann, eliminiert ist und in der

Schlußformel nur noch Oberflächen figurieren. Der Einfluß eines Fehlers in der Bildung oder im Messen dieser Oberflächen ergibt sich durch Differenzierung von  $\log K_1$  nach  $U_1$ ,  $U_2$ ,  $S_1$  und  $S_2$ .

Die Ausrechnung zeigt, daß die rein systematischen Fehler, welche definitionsgemäß alle gleichgerichtet sein müssen und von welchen wir hier annehmen dürfen, daß sie den Flächen proportional sind, automatisch eliminiert werden.

Der rein experimentelle Fehler betrug in unseren Versuchen, bei welchen Standarde und zu untersuchende Proben je im Doppel bestimmt wurden, 10 bis 15%.

Der große Konzentrationsbereich, für welchen die dargestellten Beziehungen stimmen, bietet bei der praktischen Anwendung des Verfahrens den Vorteil, daß auch bei der Bestimmung relativ hoher Cobalamingehalte die zeitraubenden Verdünnungen von Extrakten auf Bruchteile von  $\gamma/\text{ccm}$  erspart bleiben.

### III. Vergleiche zwischen Mutante und Wildstamm.

#### 1. Morphologisch.

Mikroskopische Untersuchungen von vegetativen Zellen sowie von Sporen des Stammes B—938 einerseits und des Stammes M 3001 andererseits zeigten keine Unterschiede. Ebenso sind die Kolonien der beiden Stämme auf Nähragar nicht voneinander zu unterscheiden.

#### 2. Physiologisch.

##### a) Allgemeine Kulturbedingungen.

Die Kulturbedingungen von *Bac. megaterium* Stamm B—938 sind von GARIBALDI, IJICHI, SNELL und LEWIS (1953) ausführlich untersucht worden. Die eigenen Versuche bestätigten die Befunde von GARIBALDI et al. über Nährstoffansprüche, Temperaturbedingungen und Durchlüftungsverhältnisse für bestes Wachstum und Vitamin  $B_{12}$ -Produktion. Unter optimalen Verhältnissen bildet der Stamm B—938 0,45  $\gamma$  Vitamin  $B_{12}/\text{ccm}$ . Dieser Stamm produziert nur Vitamin  $B_{12}$ .

In den vorliegenden Untersuchungen wurden folgende Kulturmethoden verwendet:

**Tastversuche** in Röhren von  $25 \times 120$  mm mit 7 ccm Nährlösung auf einer rotierenden Schüttelmaschine. Um eine genügende Durchlüftung zu erzielen, waren die Röhren etwa  $60^\circ$  zur Horizontalen geneigt.

**Allgemeine Versuche** in Erlenmeyern von 500 ccm Inhalt mit 100 ccm Nährlösung auf einer rotierenden oder hin- und hergehenden Schüttelmaschine.

**Großversuche** in Gärtanks von 20 Liter Inhalt mit 12 Liter Nährlösung, Rührwerk und Belüftung.

Als Impfmaterial dienten für Kolben und Röhren Sporensuspensionen in sterilem destilliertem Wasser, während die Gärtanks mit 10% Schüttelkulturen beimpft wurden.

Die für den Stamm B—938 geltenden Kulturbedingungen ließen sich ausnahmslos auf den Stamm M 3001 übertragen.

In den folgenden Versuchen wurde durchweg eine Nährlösung (Nr. 1001) verwendet, die von der Nährlösung „B“ von GARIBALDI et al. (1953) abgeleitet ist. Sie zeichnete sich dadurch aus, daß sie unter den gewählten Bedingungen die gleichmäßigsten Resultate lieferte. Ihre Zusammensetzung ist die folgende:

Nährlösung 1001:

Saccharose . . . . .	50 g	CaCl <sub>2</sub> . . . . .	20 mg
Hefeextrakt . . . . .	2,5 g	MnCl <sub>2</sub> . . . . .	15 mg
Citronensäure . . . . .	6 g	FeCl <sub>3</sub> . . . . .	5 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . . . . .	2,1 g	ZnCl <sub>2</sub> . . . . .	5 mg
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . . . . .	2 g	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> . . . . .	2 mg
KCl . . . . .	0,8 g	pH 7,0 mit Ammoniak	
MgCl <sub>2</sub> . . . . .	50 mg	Wasser . . . . .	1 Liter

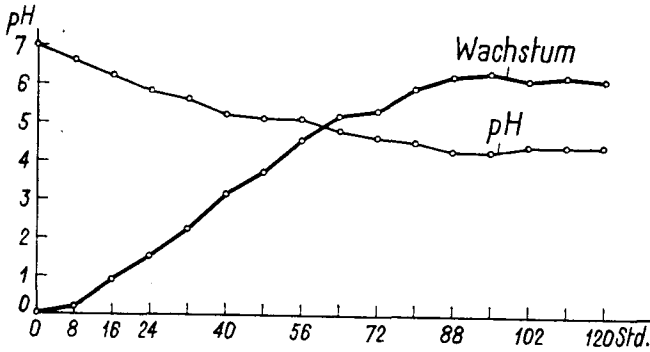


Abb. 2. Verlauf von Wachstum und pH in Kulturen von B-938.

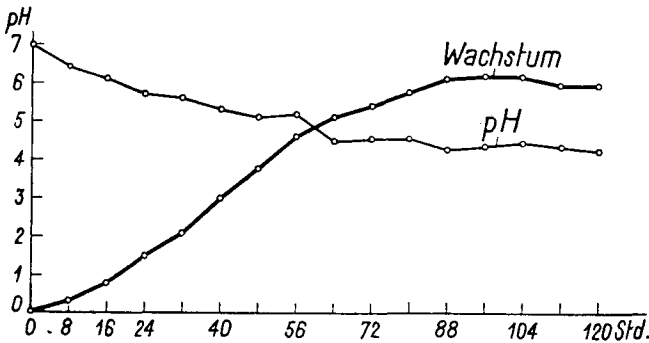


Abb. 3. Verlauf von Wachstum und pH in Kulturen von M 3001.

b) Verlauf von Wachstum und pH.

Versuchsordnung: Erlenmeyer von 500 cem Inhalt wurden mit je 100 cem Nährlösung 1001 versehen, autoklaviert und mit Sporensuspensionen von B-938 beziehungsweise M 3001 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27° C auf einer hin- und hergehenden Schüttelmaschine. Alle 8 Std. gelangten je fünf Kolben zur Untersuchung.

Die Messung der pH-Werte erfolgte in jedem einzelnen Kolben mit Hilfe einer Glaselektrode.

Das Zellwachstum wurde turbidimetrisch ermittelt und mit Hilfe einer Eichkurve als relative Zellenzahl ausgedrückt.

Die Resultate sind in den Abb. 2 und 3 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß der Verlauf der beiden Kurven für beide Stämme der gleiche ist. Das Wachstum nimmt bis zur 96. Stunde stetig zu, während gleichzeitig das pH von 7,0 auf 4,3 sinkt.

c) Verlauf der „*E. coli*-Aktivität“ und der „*L. leichmannii*-Aktivität“.

Bei gleicher Versuchsanordnung wurden hier in den erwähnten Zeitabständen die Aktivitäten der Kulturen von B-938 einerseits und von M 3001 andererseits gegenüber zwei Testorganismen untersucht. Es erwies sich dabei als zweckmäßig, die Kulturen vor dem Testen zur völligen Frei-

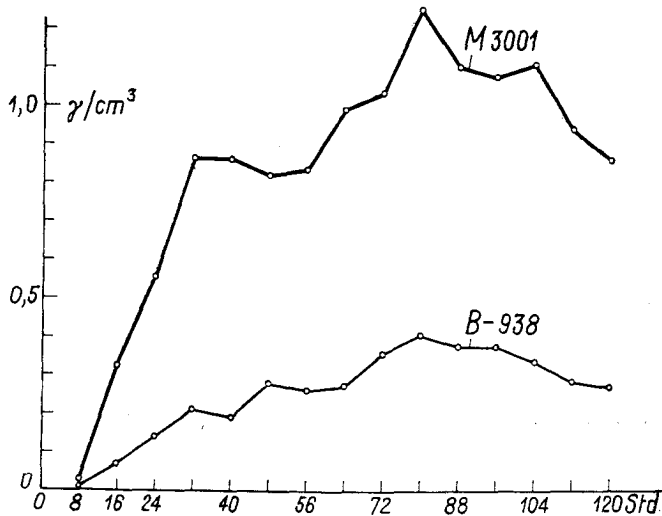


Abb. 4. Verlauf der „*E. coli*-Aktivität“ in Kulturen der Stämme B-938 und M 3001, ausgedrückt als  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/ccm.

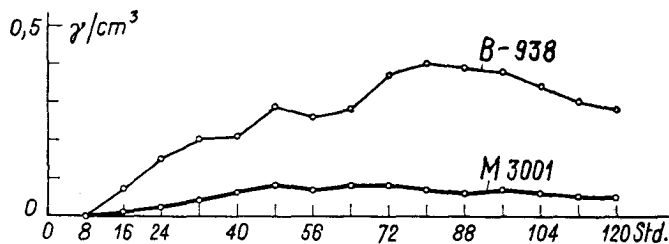


Abb. 5. Verlauf der „*L. leichmannii*-Aktivität“ in Kulturen der Stämme B-938 und M 3001, ausgedrückt als  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/ccm.

setzung der Vitamine aus den Zellen 30 Min. lang zu dämpfen. Der Verlauf der „*E. coli*-Aktivität“ der beiden Stämme ist in Abb. 4 wiedergegeben, derjenige der „*L. leichmannii*-Aktivitäten“ in Abb. 5.

Der Stamm B-938 produziert nur Vitamin B<sub>12</sub>; es ist deshalb richtig, daß die Aktivitätskurve der Kulturen nach beiden Testmethoden den gleichen Verlauf nimmt. Die Aktivität des Stammes M 3001 dagegen weist gegenüber den beiden Testorganismen ganz verschiedene Werte auf. Am Wachstum von *E. coli* gemessen, erreicht der Stamm M 3001 ein Aktivitätsmaximum entsprechend 1,5  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/ccm. Im Test mit *L. leichmannii* entspricht das Maximum aber bloß einer Konzentration von 0,08  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/ccm.

Es sei jedoch bemerkt, daß die Kurven der „*E. coli*-Aktivitäten“ bei den beiden Stämmen qualitativ ungefähr gleich aussehen. Die Aktivität tritt gleichzeitig auf und erreicht in beiden Fällen etwa nach 80 Std. das Maximum.

#### IV. Die aktiven Faktoren in Kulturen der Mutante.

Aus dem Aktivitätsunterschied der Kulturen von M 3001 gegenüber den beiden Testorganismen folgt, daß die beobachtete Vitaminaktivität auf mindestens ein von Vitamin B<sub>12</sub> verschiedenes Cobalamin zurückzuführen ist. Um dies zu untersuchen, wurden Kulturfiltrate von M 3001 den früher beschriebenen Trennungsmethoden unterworfen.

##### 1. Papierchromatographische und -elektrophoretische Analyse.

Die papierchromatographischen Untersuchungen erfolgten in drei verschiedenen Entwicklersystemen, deren Zusammensetzung im Abschnitt über die Trennung von Cobalaminen gegeben wurde. Um eine genügende Trennung der Faktoren zu erzielen, mußten die Chromatogramme „durchlaufend“ entwickelt werden, so daß R<sub>f</sub>-Werte nur relativ zu Vitamin B<sub>12</sub> zitiert werden können. Die dazu verwendeten Kulturfiltrate stammten aus drei Tage alten gedämpften Kulturen. Die Ergebnisse, wie sie die Bioautographie mit *E. coli* der entwickelten Papiere lieferte, sind in Tab. I zusammengestellt.

Tab. I. R<sub>f</sub>-Werte relativ zu Vitamin B<sub>12</sub> der aktiven Faktoren aus Kulturen von M 3001.

Faktor	R <sub>f</sub> in den Entwicklersystemen		
	A	B	C
$\alpha$	0,12	0,17	0,05
$\beta$	0,19	0,25	0,11
$\gamma$	1,34	1,51	1,64

Die Chromatographie zeigt also das Vorhandensein dreier für *E. coli* aktiver Cobalamine. Im folgenden werden diese drei Faktoren mit  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet. Die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  laufen sehr langsam, sie werden in den verwendeten Entwicklersystemen selten vollständig voneinander getrennt, sondern erscheinen meist nur als Doppelflecke. Der R<sub>f</sub>-Wert des Faktors  $\gamma$  stimmt mit demjenigen von Aetiocobalamin überein.

Die elektrophoretische Untersuchung der gleichen Kulturfiltrate lieferte die folgenden Bioautogrammflecke:

Bei pH 2,7 (0,5 m Essigsäure + 0,005% HCN) zeigen sich nach 2 Std. bei 20 Volt/cm ein saurer und ein basischer Fleck.

Bei pH 6,5 (0,05 m Phosphatpuffer + 0,005% HCN) unter sonst gleichen Bedingungen erscheinen zwei saure und ein neutraler Fleck.

Durch eine Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie nach HOLDSWORTH (unpubl., vgl. KON, 1955) ließen sich die auf den Elektropherogrammen nachgewiesenen Flecke nach der Darstellung in Tab. 2 den Faktoren  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  zuordnen.

Bei pH 2,7 ließen sich die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  durch Elektrophorese allein nicht voneinander trennen, jedoch bei pH 6,5 verhält sich der Faktor  $\alpha$  etwas stärker sauer als der Faktor  $\beta$ . Faktor  $\gamma$  reagiert bei pH 2,7 gleich basisch wie Aetiocobalamin.

Tab. 2. Elektrophorese von Kulturflüssigkeiten von M 3001 bei pH 2,7 und pH 6,5, gefolgt von Papierchromatographie im Entwicklersystem A.

Faktor	R <sub>f</sub> <sup>1)</sup>	Elektrophoretisches Verhalten bei	
		pH 2,7	pH 6,5
$\alpha$	0,12	sauer	sauer
$\beta$	0,19	sauer	sauer
$\gamma$	1,34	basisch	neutral

<sup>1)</sup> R<sub>f</sub>-Werte relativ zu Vitamin B<sub>12</sub>.

## 2. Vergleich der Faktoren $\alpha$ , $\beta$ und $\gamma$ mit bekannten Faktoren.

Das papierchromatographische und elektrophoretische Verhalten der Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  läßt vermuten, daß es sich hier um die von FORD und PORTER (1952) nachgewiesenen Faktoren C, beziehungsweise C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> von FORD, HOLDSWORTH, KON und PORTER (1953) handelt.

Faktor C ist dadurch gekennzeichnet, daß er bei der Papierchromatographie sehr langsam wandert und bei der Elektrophorese sowohl bei neutralem wie bei saurem pH anodisch wandert. Später (FORD, HOLDSWORTH, KON und PORTER, 1953) wurde nachgewiesen, daß zwei Faktoren vorhanden sind, die papierchromatographisch und elektrophoretisch bei neutralen und alkalischen pH-Werten getrennt werden können (BROWN, CAIN, GANT, PARKER und LESTER SMITH, 1955). Diese Faktoren wurden bis jetzt nur in  $\gamma$ -Mengen erfaßt und demzufolge auch nur wenig charakterisiert.

Auf Grund dieser einzigen vorläufig bekannten Merkmale erscheint die Identität der Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  mit den Faktoren C<sub>1</sub> und C<sub>2</sub> möglich.

Der Faktor  $\gamma$  verhält sich in den geschilderten Untersuchungen gleich wie Aetiocobalamin. Seine Identität mit Aetiocobalamin ist wahrscheinlich.

Durch bloße Untersuchung von Kulturfiltraten auf chromatographischem und elektrophoretischem Wege in Verbindung mit Bioautographie läßt sich der Identitätsbeweis jedoch nicht einwandfrei erbringen. Durch die vielen Verunreinigungen in Kulturfiltraten können die ermittelten Wanderungsgeschwindigkeiten unter Umständen erheblich modifiziert sein. Ein eindeutiger Vergleich wird erst mit gereinigten Präparaten geliefert.

## 3. Das zeitliche Auftreten der einzelnen Faktoren in Kulturen der Mutante.

Um abzuklären, ob die verschiedenen Faktoren gleichzeitig oder nacheinander erscheinen, wurden nach der früher beschriebenen Versuchsanordnung die Kulturen auf ihren Gehalt an einzelnen Faktoren untersucht. Dabei gelangten die Zellen und die Kulturflüssigkeiten getrennt zur Untersuchung.

Alle 8 Std. wurden vier Kolben geerntet, die Kulturen einzeln zentrifugiert, die klare Lösung dekantiert und das Zellsediment in 10 ccm m/100 Phosphatpuffer von pH 7,0 + 0,1% KCN während 30 Min. im strömenden Dampf erhitzt und filtriert. Die Kulturflüssigkeiten einerseits und die Pufferextrakte andererseits wurden dann papierchromatographisch auf ihre Cobalamingehalte untersucht.

Die Resultate sind in Tab. 3 dargestellt.

Es ist ersichtlich, daß die Faktoren nacheinander in den Zellen gebildet werden und auch nacheinander in die Kulturflüssigkeit abgegeben werden. Mengenmäßig nimmt der Gehalt an einzelnen Faktoren regelmäßig bis zur 72. Stunde zu und bleibt dann lange konstant, was mit dem Verlauf des Total-Cobalamingehaltes (vgl. Abb. 4) übereinstimmt. Nach 80 Std. Inkubationszeit blieb der Gehalt an einzelnen Faktoren mindestens bis 120 Std. unverändert.

Tab. 3. Zeitliches Auftreten der Faktoren  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  in den Zellen und in der Kulturflüssigkeit von M 3001.

(+) = Spur; + = 0,001—0,01  $\gamma$ /ccm; ++ = 0,01—0,1  $\gamma$ /ccm; +++ = 0,1 bis 0,5  $\gamma$ /ccm.

Inkubationszeit, Std.	Ausbildung der Flecke auf den Chromatogrammen					
	Kulturflüssigkeit			Zellen		
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
0	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	(+)	—	—
16	—	—	—	+	+	—
24	+	—	—	++	++	(+)
32	++	(+)	—	+++	+++	++
40	++	+	—	+++	+++	+++
48	+++	++	(+)	+++	+++	+++
56	+++	++	+	+++	+++	+++
64	+++	+++	++	+++	+++	+++
72	+++	+++	+++	+++	+++	+++
80	+++	+++	+++	+++	+++	+++

## V. Die präparative Gewinnung der einzelnen Cobalamine.

Die Versuche zur Isolierung der in Kulturen nachgewiesenen Cobalamine führten zur Darstellung eines weiteren Faktors, der mikrobiologisch inaktiv ist und deshalb den bisherigen Untersuchungen entgangen war.

Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden zur Reinigung und Trennung von Cobalaminen stammen in den wesentlichen Partien aus dem von DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 a) veröffentlichten Verfahren.

### 1. Gewinnung gereinigter Cobalaminkonzentrate (Kieselgurprodukt).

**Ansatz:** 20 Liter Nährlösung wurden mit M 3001 beimpft und bis zum Erreichen des Maximums an Cobalaminaktivität inkubiert.

**Ernte:** Zur Freisetzung der Cobalamine aus den Zellen wurde die Gärbrühe nach Zusatz von 0,1% KCN während 30 Min. auf 80° erhitzt, die Schleimstoffe mit 1% FeCl<sub>3</sub> gefällt und bei pH 2,5 durch eine Porzellannutsche filtriert.

**Adsorption:** Die Adsorption der Cobalamine erfolgte durch langsames Einrühren von 1% Frankonit in das auf etwa 5° abgekühlte Kulturfiltrat. Frankonit-adsorbat abgesaugt.

**Elution:** Durch portionenweises halbstündiges Erwärmen auf 50° mit einer Mischung von insgesamt 6 Liter Isopropanol und KCN-haltigem Wasser im Verhältnis 1:1 ließen sich die Cobalamine aus dem Frankonit eluieren.

**Extraktion:** Die auf pH 6,5 eingestellten Eluate wurden im Vakuum auf 600 ccm konzentriert und dann zehnmal mit je  $\frac{1}{20}$  Volumen einer Mischung von 40 Teilen Phenol und 60 Teilen o-Dichlorbenzol extrahiert. Durch Zugabe von 15% n-Butanol zu den roten Phenolextrakten konnten die Cobalamine wieder in wässrige Lösung übergeführt werden.

**Kieselgurprodukt:** Die vereinigten Wasserextrakte wurden im Vakuum zum Beseitigen aller Alkoholspuren eingedampft, auf pH 3,8 eingestellt, Kieselgur in die Lösung eingetragen und nach Zusatz von 2,4% p-Chlorphenol so lange gerührt, bis sich die Lösung völlig entfärbt hatte und sich unten das rosarote Kieselgur absetzte. Nach gutem Absaugen der Lösung ließ sich das so erhaltene Kieselgurprodukt durch wiederholtes Waschen mit Aceton und Aether vom p-Chlorphenol befreien und konnte im Vakuum getrocknet werden.

Die einzelnen Aufarbeitungsschritte wurden mit Hilfe der quantitativen Papierchromatographie hinsichtlich der Wirksamkeit der einzelnen Extraktions- und Reinigungsschritte verfolgt.

Dabei ergab sich, daß nach zehnmaliger Extraktion der Eluatkonzentrate mit der Mischung von 40 Teilen Phenol und 60 Teilen o-Dichlorbenzol die wässrige Phase immer noch beträchtliche Mengen der Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  enthielt, während der Faktor  $\gamma$  schon nach fünfmaligem Ausschütteln quantitativ in die organische Phase überging. Eine vollständige Extraktion der Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  gelang erst mit 60 proz. Phenol. Dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden von FRIEDRICH und BERNHAUER (1954) überein, die an Hand der Verteilungskoeffizienten für das System p-Chlorphenol-Trichloräthylen und Wasser zeigten, daß zur Extraktion der papierchromatographisch im Entwicklersystem Butanol-Wasser schnell laufenden Faktoren weniger Phenol benötigt wird als für die langsam wandernden.

Ferner zeigt die ständige Kontrolle der Aufarbeitungsprozesse, daß die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  sich recht *i n s t a b i l* verhalten. Besonders empfindlich sind sie auf Eindampfungsprozesse, bei welchen, auch wenn sie im Vakuum stattfinden, eine schwache Erwärmung nicht vermieden werden kann. Sie zersetzen sich aber auch ganz allgemein mit der Zeit, und das um so schneller, je weiter die Reinigung fortgeschritten ist. Im Maße wie diese Faktoren verschwanden, konnte eine Zunahme des Faktors  $\gamma$  in den Extrakten nachgewiesen werden, was mit den Beobachtungen von SjöSTRÖM, NEUJAHN und LUNDIN (1953), FORD und HUTNER (1955) über die *U m w a n d l u n g* der Faktoren C in Aetiocobalamin übereinstimmt.

## 2. Verteilungschromatographie des Cobalamin-gemisches.

### a) Methode.

Die Auftrennung der einzelnen Cobalamine vom Kieselgurprodukt ausgehend erfolgte durch Verteilungschromatographie an Zellulosesäulen nach der Methode von FRIEDRICH und BERNHAUER (1955).

Folgende Entwicklersysteme wurden verwendet:

D. sec. Butanol — 23% Wasser — 0,01% KCN,

E. sec. Butanol — 23% Wasser — 0,01% KCN, mit  $\text{KClO}_4$  gesättigt,

F. n-Butanol — wassergesättigt — 0,01% KCN (FRIEDRICH und BERNHAUER, 1955; DELLWEG, BECHER und BERNHAUER, 1956 a).

Für die Zubereitung der Zellulosesäulen wurde 1 Gewichtsteil Zellulosepulver Whatman Standard Grade mit 10 Volumenteilen Entwickler zu einem homogenen Brei verrührt und unter langsamem Durchlauf in die bereits mit Entwickler halbgefüllte Säule eingetragen und die Zellulose sich setzen gelassen. Die Säulen hatten meist einen Durchmesser von 2,5 bis 3,0 cm, waren unten mit einem Glashahn und Wattlebenschlauch versehen, und die Höhe der Zellulosepackung betrug 10 bis 12 cm.



In die auf diese Weise vorbereiteten Säulen, in welchen sich über der Zellulosepackung eine 2 bis 3 cm hohe Schicht Entwickler befand, wurde das Kieselgurprodukt trocken eingetragen. Sobald es sich gleichmäßig gesetzt hatte, begann die Entwicklung. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug bei Säulen der erwähnten Dimensionen durchschnittlich 10 ccm pro Stunde.

#### b) Resultat der Säulenchromatographie.

Bei geeignetem Entwickler erscheinen in der Säule vier Zonen (vgl. Tab. 4).

Tab. 4. Chromatographische Trennung der Cobalamine an Zello-säulen.

Zone	R-Werte der Zonen im Entwickler		
	D	E	F
I	0,77	0,80	0,50
II	0,21	0,11	0,15
III	0,07	0,08	0,10
IV	0,02	nicht gewandert	0,02

Die Zonen III und IV waren sehr schwach vertreten, die Zone I etwas stärker und die Zone II erschien als etwa 2 cm hohe stark purpur gefärbte Bande. Die einzelnen Zonen wurden eluiert, konzentriert und mit Hilfe von Papierchromatographie und Elektrophorese in Verbindung mit Bioautographie auf ihre Einheitlichkeit geprüft. Häufig waren die einzelnen Faktoren durch die in der Säule benachbarten Zonen kontaminiert. In diesem Fall wurden die Eluate erneut zu einem Kieselgurprodukt verarbeitet und nochmals chromatographiert.

Die Zonen I, III und IV erwiesen sich nach ihrem papierchromatographischen Verhalten, wie es zu erwarten war, als identisch mit den in Kulturfiltraten nachgewiesenen Faktoren  $\gamma$ ,  $\beta$  resp.  $\alpha$ .

Das als Zone II erscheinende Cobalamin ist mikrobiologisch inaktiv. Es wird im folgenden als Faktor  $\delta$  bezeichnet.

### 3. Aufarbeitung von Kulturen des Wildstammes.

Nachdem die Aufarbeitung von Kulturen der Mutante (M 3001) einen mikrobiologisch inaktiven Faktor geliefert hatte, fragten wir uns, ob dieses Cobalamin auch vom Wildstamm (B-938) produziert werde und ob seine Anwesenheit bei den fast ausschließlich bioautographischen Untersuchungsmethoden den Forschungen entgangen sei. Mit gleichen Methoden ausgeführte Extraktionen und Reinigungen lieferten jedoch aus den Kulturen von B-938 kein anderes Cobalamin als Vitamin B<sub>12</sub>.

## VI. Die Identität der Faktoren $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ und $\delta$ .

Die als einheitlich befundenen Eluate der Zonen I, III und IV, d. h. die Faktoren  $\gamma$ ,  $\beta$  und  $\alpha$ , wurden konzentriert und zur Überprüfung der früher vermuteten Identität mit den Faktoren C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und Aetiocobalamin auf ihre papierchromatographischen und elektrophoretischen Wanderungseigenschaften untersucht.

Auf eine Reindarstellung dieser Faktoren mußte verzichtet werden. Die erhaltenen Mengen waren zu klein, und die Untersuchungen mußten sich deshalb auf einheitliche Fraktionen, wie sie die Zello-säule lieferte, beschränken.

1. Faktor  $\alpha$ . Der Faktor  $\alpha$  wies in jeder Beziehung die früher beschriebenen Eigenschaften (vgl. IV/1) auf, und seine Identität mit dem Faktor C<sub>1</sub> darf angenommen werden.

2. Faktor  $\beta$ . Der Faktor  $\beta$  wich in einem wichtigen Merkmal von den früher (vgl. IV/1) aufgestellten Charakteristiken ab. Bei der Elektrophorese bei pH 2,7 verhielt er sich neutral statt sauer, während bei pH 6,5 sowie bei der Papierchromatographie in verschiedenen Entwicklersystemen seine Wanderungsgeschwindigkeiten unverändert waren. Woher dieser Unterschied kommt, ist unklar. Es ist möglich, daß das elektrophoretische Verhalten durch Verunreinigungen (Komplexe?) beeinträchtigt wird. Es wäre aber auch denkbar, daß der Faktor  $\beta$ , der nachgewiesenermaßen instabil ist, während der Aufarbeitung eine Modifikation erfährt, wodurch seine bei pH 2,7 sauren Eigenschaften verloren gehen.

Die Einordnung des Faktors  $\beta$  zu den bekannten Faktoren ist deshalb nicht möglich. Es darf aber vermutet werden, daß es sich um ein den Faktoren C nahestehendes Cobalamin handelt.

3. Faktor  $\gamma$ . Der Faktor  $\gamma$  ließ sich ohne weiteres mit Actio-balamin gleichsetzen. Die Identität konnte ferner durch zweidimensionale Papierchromatographie eines Gemisches von Vergleichssubstanz und einer aus den Kulturen von M 3001 isolierten Probe einwandfrei bewiesen werden.

4. Faktor  $\delta$ . Die Ausbeuten an Faktor  $\delta$  waren bedeutend höher als diejenigen der drei anderen Faktoren, und weitere Reinigungsprozesse waren deshalb durchführbar.

#### a) Reinigung der aus den Zello-säulen erhaltenen Fraktionen.

Chromatographisch und elektrophoretisch als einheitlich befundene Eluate von Faktor  $\delta$  wurden im Vakuum zur Trockene eingedampft und mehrmals mit absolutem Methanol extrahiert, filtriert, der Alkohol im Vakuum entfernt und der Rückstand im Vakuum-exsikkator getrocknet. Bei jeder Wiederholung des Prozesses konnten beträchtliche Mengen farbloser Verunreinigungen eliminiert werden. Zum Schluß wurde die dunkelrote trockene Methanolfraktion in wenig Wasser gelöst (1 bis 2 ccm) und Aceton bis zur bleibenden Trübung zugesetzt. Beim Zusatz von Aceton fiel der Faktor  $\delta$  als amorpher bis öligler Niederschlag aus. Auch wiederholtes Umfällen aus Aceton-Wasser, versuchsweise mit Zusatz von Petroläther, konnten den Faktor  $\delta$  nicht zum Kristallisieren bringen, es bildeten sich stets nur amorphe Präzipitate. Der Reinheitsgrad der auf diese Weise gewonnenen Präparate war entsprechend unbefriedigend. Es wurde deshalb später vorgezogen, die obenerwähnte Methanolfraktion zur weiteren Reinigung der Elektrophorese in 0,5 m Essigsäure zu unterwerfen. Zu diesem Zweck wurde die Substanz in wenig Methanol gelöst und auf 8 cm breite Streifen Whatman 3 MM-Papier strichförmig aufgetragen.

Die Elektrophorese bei 1000 V (20 Volt/cm) und einer Stromstärke von 5—7 mA lieferte nach zweistündiger Versuchsdauer eine orange kathodisch wandernde Bande, die nach sorgfältiger Trocknung und vollständiger Entfernung aller Essigsäurespuren aus dem Papier mit Wasser eluiert werden konnte.

b) Aussehen der wässrigen Lösungen.

Wässrige Lösungen von Faktor  $\delta$  sind bei neutralem pH-Wert in Gegenwart von CN<sup>-</sup>-Ionen violett und färben sich beim Ansäuern auf pH 4,0 allmählich über rot nach orange um. Beim Verschieben des pH-Wertes nach der alkalischen Seite ist kein Farbwechsel festzustellen. Der Faktor  $\delta$  verhält sich in dieser Beziehung ähnlich dem Aetiocobalamin und nach BERNHAUER und FREDRICH (1954) den inkompletten Cobalaminen überhaupt (vgl. auch LESTER SMITH, 1955). Lösungen von kompletten Cobalaminen sind bei neutralem pH in Gegenwart von CN<sup>-</sup>-Ionen rotgefärbt.

c) Papierchromatographisches und elektrophoretisches Verhalten.

In der Papierchromatographie weist der Faktor  $\delta$  in drei verschiedenen Entwicklersystemen folgende R<sub>F</sub>-Werte relativ zu Vitamin B<sub>12</sub> auf:

Entwickler A	1,05
B	0,52
C	0,35

Auffallend ist die wesentlich größere Wanderungsgeschwindigkeit des Faktors  $\delta$  im Essigsäure enthaltenden Entwickler. Die Flecke auf den Chromatogrammen trocknen entsprechend dem beschriebenen Verhalten der wässrigen Lösungen auf dem Papier orange.

Das elektrophoretische Verhalten des Faktors  $\delta$  ist folgendes:

Bei pH 2,7 (0,5 m Essigsäure + 0,005% HCN) bei 1000 Volt (20 Volt/cm) und einer Stromstärke von 5—7 mA wandert der Faktor  $\delta$  etwa gleich basisch wie Aetiocobalamin.

Bei pH 6,5 (0,05 m Phosphatpuffer + 0,005% HCN) bei 1000 Volt (20 Volt/cm) und 12—15 mA verhält sich der Faktor  $\delta$  sauer.

d) Absorptionsspektrum.

Zur Aufnahme des Absorptionsspektrums von Faktor  $\delta$  im UV- und sichtbaren Bereich diente eine nach der im vorhergehenden Abschnitt erwähnten Reinigung durch Elektrophorese gewonnene Probe. Die Aufnahme des Spektrums erfolgte in m/100 Phosphatpuffer von pH 7,0, in Gegenwart von CN<sup>-</sup>-Ionen.

Das Spektrum weist die von DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 a) hervorgehobenen Eigenschaften eines inkompletten Cobalamins auf. Nach diesen Autoren bilden die kompletten Cobalamine in wässrigen Lösungen von pH 7,0 in Anwesenheit von CN<sup>-</sup>-Ionen rotgefärbte Monocyanokomplexe mit Hauptabsorptionsmaxima bei 548 und 361 m $\mu$ , während die inkompletten Cobalamine unter den gleichen Bedingungen als violette Dicyanokomplexe mit Hauptabsorptionsmaxima bei 580 und 367 m $\mu$  vorliegen.

Die von uns beobachteten Hauptabsorptionsmaxima des Faktors  $\delta$  sind bei 367 und 585 m $\mu$ . Auf die Farbe der Lösungen wurde bereits hingewiesen. Weitere Maxima treten bei 278, 308 und 547 m $\mu$  auf.

Auf die Wiedergabe des aufgenommenen Spektrums muß verzichtet werden, da der Reinheitsgrad des isolierten Faktors  $\delta$  noch unbekannt ist. Es sei aber darauf hingewiesen, daß der Verlauf qualitativ mit dem unter

den gleichen Bedingungen aufgenommenen Spektrum des uns von Dr. E. LESTER SMITH zur Verfügung gestellten Aetiocobalamins in allen Punkten übereinstimmt.

e) Antimetabolitische Eigenschaften.

Bei der Bioautographie von Papierchromatogrammen, die Proben aus Extraktionsprozessen enthielten und relativ kurze Zeit entwickelt worden waren, fiel auf, daß die Ausbildung der von Faktor  $\alpha$  und  $\beta$  hervorgerufenen Wachstumszonen durch die Anwesenheit von Faktor  $\delta$  gehemmt war. Die Abb. 6 zeigt die photographische Aufnahme eines solchen Bioautogramms.

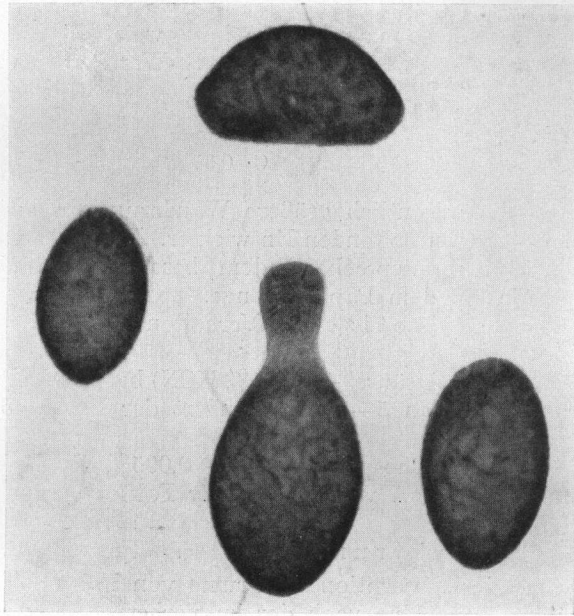


Abb. 6. Photographische Aufnahme eines Bioautogrammes. Erklärung im Text. Aufnahme K. H. RICHLE.

Das Chromatogramm wurde im Entwickler C entwickelt. Links und rechts waren Vitamin  $B_{12}$  beziehungsweise Aetiocobalamin aufgetragen, in der Mitte ein Gemisch der Faktoren  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , dem noch eine Spur Vitamin  $B_{12}$  beigemischt war. Der oberste Fleck stellt die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  dar, die bei der in diesem Versuch speziell kurz gewählten Entwicklungsdauer (6 Std.) überhaupt nicht voneinander getrennt werden. Unten, unvollständig getrennt, erscheint die Spur Vitamin  $B_{12}$  über dem Aetiocobalamin. An der dazwischenliegenden, leeren Stelle ist der Faktor  $\delta$  lokalisiert, und seine antagonistische Wirkung kommt durch die scharfe gerade Begrenzung der obersten Wachstumszonen deutlich zum Ausdruck.

Die Vermutung, der Faktor  $\delta$  sei für *E. coli* 113—3 ein Antimetabolit zu den aktiven Cobalaminen, lag nahe. Um die Verhältnisse näher zu prüfen, wurden Versuche nach der in Abb. 7 dar-

gestellten Versuchsanordnung ausgeführt. Auf Testplatten wurden 5 mm breite Filterpapierstreifen kreuzweise übereinandergelegt, die in Lösungen von Faktor  $\delta$  beziehungsweise Vitamin B<sub>12</sub> getränkt worden waren. Im einzelnen war das Vorgehen folgendes: Die in der Abbildung horizontal liegenden, durchgehenden Streifen waren beide mit einer Lösung von 25 opt. Einheiten<sup>1)</sup> Faktor  $\delta$ /ccm gesättigt, die dazu vertikal aufgelegten Streifen mit abgestuften Konzentrationen Vitamin B<sub>12</sub> variierend zwischen 1/40 (Nr. 1) und 1/1200 (Nr. 10) opt. Einheiten/ccm.

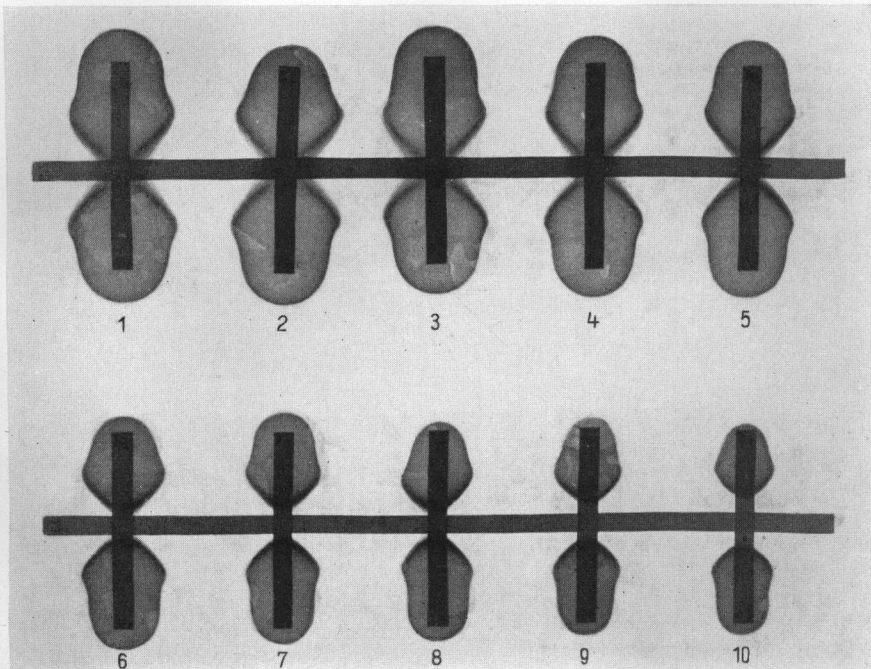


Abb. 7. Antimetabolismus zwischen Faktor  $\delta$  und Vitamin B<sub>12</sub>. Erklärung im Text. Aufnahme K. H. RICHLER.

Es wurde also in diesem Versuch die Konzentration an Faktor  $\delta$  konstant gehalten und die Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentration variiert.

Der Versuch zeigt folgendes:

1. Das durch Vitamin B<sub>12</sub> hervorgerufene Wachstum von *E. coli* 113—3 wird durch den Faktor  $\delta$  gehemmt. Das Hemmungsbild ist dasjenige eines Antimetaboliten. Unter einem Antimetaboliten versteht man nach SOMOGYI (1952) „eine Verbindung biologischen Ursprungs,

<sup>1)</sup> Da wir den Faktor  $\delta$  nicht in kristallisiertem Zustand gewinnen konnten, erschien es uns zweckmäßig, nach dem Vorschlag von DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 a) die in die Versuche eingesetzten Substanzmengen in „optischen Einheiten“ auszudrücken. Eine opt. Einheit ist nach den genannten Autoren definiert als „jene Substanzmenge, die in 1 ccm Lösung bei einer Schichtdicke von 1 cm die Extinktion von 1,00 beim Maximum von 361 bzw. 367 m $\mu$  aufweist“. Eine opt. Einheit ist bei Vitamin B<sub>12</sub> 48  $\gamma$ .

die die Wirkung eines Metaboliten verringert oder aufhebt“. (Im Falle eines Giftes wären die Wachstumszonen parallel zu den Faktor  $\delta$  enthaltenden Streifen begrenzt und nicht wie hier gegen die Mitte zugespitzt.)

2. Die Versuchsanordnung erlaubt eine direkte Bestimmung derjenigen Konzentration Vitamin  $B_{12}$  (Metabolit), die bei der gegebenen Konzentration Faktor  $\delta$  (Antimetabolit) gerade noch das Wachstum von *E. coli* erlaubt. Dieser Fall ist bei einer Konzentration von  $1/120$  opt. Einh. Vitamin  $B_{12}/\text{ccm}$  realisiert (in Abb. Nr. 5). Das Verhältnis zwischen der Konzentration des Antimetaboliten und derjenigen des Metaboliten an diesem

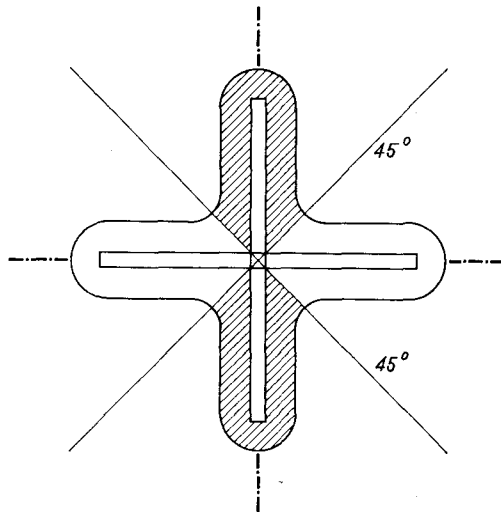


Abb. 8. Erklärung im Text.

Punkte stellt den Inhibitionsindex (WOOLLEY, 1952) dar. Er beträgt in unserem Falle 3000.

3. Der Antimetabolismus ist kompetitiv. Als kompetitiv wird ein Antimetabolismus dann bezeichnet, wenn über einen weiten Konzentrationsbereich der Inhibitionsindex konstant bleibt (WOOLLEY, 1952), d. h., wenn zur Erzeugung der antagonistischen Symptome immer das gleiche Konzentrationsverhältnis erfordert wird.

Daß dieser Fall in unserem Versuch realisiert ist, kommt durch die Begrenzungsform der Wachstumszonen zum Ausdruck. Es fällt auf, daß durch die Wirkung des Faktors  $\delta$  das Zellwachstum längs  $45^\circ$  verlaufender Geraden inhibiert ist. Wir möchten dies an Hand der Abb. 8 erklären.

Bringen wir mit Hilfe von Filterpapier längs der senkrecht zueinander stehenden Achsen zwei Lösungen derselben Konzentration auf die Platte, so werden die beiden Substanzen unter der Bedingung, daß sie gleiche Diffusionskonstanten besitzen, nach dem gleichen Gesetz diffundieren und sich über eine Fläche in der abgebildeten Kreuzform ausbreiten. Daß in unserem Fall der Faktor  $\delta$  und das Vitamin  $B_{12}$  gleiche Diffusion besitzen, darf angenommen werden, handelt es sich doch um annähernd gleichgroße Moleküle derselben Bauart.

In dem Bereich, in welchem die beiden Lösungen sich treffen und überlagern, werden diejenigen Punkte, wo die Konzentrationen der von den beiden Achsen herkommenden Lösungen gleich sind, dann auf den 45° verlaufenden Winkelhalbierenden zu finden sein. Besitzen die Lösungen verschiedene Konzentrationen, so wird auf den Winkelhalbierenden das gleiche Konzentrationsverhältnis vorliegen. Im Falle von Metabolit und Antimetabolit entsteht unter der Bedingung, daß das Konzentrationsverhältnis gerade dem Inhibitionsindex entspricht, demnach das durch die Schraffierung in der Abb. 8 angedeutete Bild, welches auch in der Abb. 7 durch die Fig. 5 dargestellt ist. Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß im Falle einer Konkurrenz der Antimetabolit die Wirkung des Metaboliten bei dieser Versuchsanordnung längs 45° geneigter Geraden aufheben wird. Durch Variieren der Konzentration eines Partners (hier des Metaboliten) entsteht eine Parallelverschiebung zu einer Achse, die sich dadurch ausdrückt, daß die Linien mit gleichem Konzentrationsverhältnis wohl noch in 45° verlaufen, aber sich nicht mehr im Achsenkreuz schneiden.

Der Faktor  $\delta$  entspricht in den hier diskutierten Eigenschaften den drei Forderungen, die SHAW (1953) an einen Antimetaboliten stellt:

1. Er weist eine dem Metaboliten ähnliche Struktur auf.
2. Seine Wirkung manifestiert sich wie ein Mangel an Metabolit.
3. Seine Wirkung konkurriert mit derjenigen des Metaboliten.

#### f) Die wahrscheinliche Natur des Faktors $\delta$ .

Aus den in den Abschnitten b) bis e) geschilderten Eigenschaften des Faktors  $\delta$  lassen sich einige Schlüsse ziehen. Sein Verhalten deckt sich in jeder Beziehung mit demjenigen der Aetiocobalamincarbonensäuren. Das Fehlen eines Nucleotides ergibt sich aus dem Absorptionsspektrum. Die saure Natur tritt bei der Elektrophorese zutage. Bei pH 6,5 ist Aetiocobalamin als neutraler Dicyanokomplex vorhanden, wandert also nicht, während seine Carbonsäuren infolge der Dissoziation sauer reagieren. Bei pH 2,7 jedoch sind die Carboxylgruppen nicht dissoziiert, tragen also zur Wanderung nicht bei; dafür verlieren sowohl das Aetiocobalamin wie die Aetiocobalamincarbonensäuren bei diesem pH Cyanid-Ionen. Dadurch resultiert eine positive Ladung am Cobaltatom, wodurch die genannten Verbindungen kathodisch wandern (ARMITAGE et al., 1953; vgl. auch LESTER SMITH, 1955).

Auch die antimetabolitische Wirksamkeit der Aetiocobalamincarbonensäuren ist bekannt (ARMITAGE et al., 1953).

Es darf deshalb mit höchster Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß der Faktor  $\delta$  eine Aetiocobalamincarbonensäure ist. Versuche, die darüber entscheiden sollen, wieviele der möglichen Carboxylgruppen vorliegen, sind im Gange. Wir hoffen, nächstens darüber berichten zu können.

## VII. Biosynthetische Versuche.

Die nun folgenden Versuche sollten uns helfen, einen Einblick in die mögliche Rolle der erhaltenen Faktoren für die Biosynthese von Cobalaminen zu gewinnen. Wir fragten uns, welches der Einfluß von Zugaben von Vitamin B<sub>12</sub> einerseits und Aetiocobalamin andererseits zu Kulturen von M 3001 sei. Ferner interessierte uns die Wirkung des Faktors  $\delta$  auf den Wildstamm B—938.

### 1. Der Einfluß von Zugaben von Vitamin B<sub>12</sub> zu Kulturen der Mutante.

Die Versuche wurden, um Material zu sparen, als Kleinversuche in Schüttelröhrchen mit 7 ccm Nährlösung ausgeführt. Die Röhrchen erhielten nach dem Autoklavieren abgestufte Mengen Vitamin B<sub>12</sub>, so daß die Endkonzentrationen der Nährlösung 1, 2, 4 und 8  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/ccm betragen. Als Impfmateriale dienten mit sterilem destilliertem Wasser gewaschene Sporensuspensionen von M 3001. Nach einer Inkubationszeit von 3 Tagen gelangten die 30 Min. gedämpften Kulturen zu einer Untersuchung, welche die Bestimmung des Totalcobalamingehaltes mit *E. coli* und die quantitative Papierchromatographie der einzelnen aktiven Cobalamine umfaßte.

Das Resultat war das folgende: Der Totalgehalt an aktiven Cobalaminen entsprach genau der zugegebenen Vitamin-B<sub>12</sub>-Menge. Auf dem Papierchromatogramm erschienen neben dem in unveränderter Konzentration erhaltengebliebenen Vitamin B<sub>12</sub> die Faktoren  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  höchstens in Spuren. Offenbar wird die Bildung dieser drei Faktoren durch die Anwesenheit von Vitamin B<sub>12</sub> unterdrückt. Wie man sich dies vorzustellen hat, ist nicht klar. Interessant ist aber die Tatsache, daß das zugegebene Vitamin B<sub>12</sub> in den Kulturen erhalten bleibt und nicht etwa abgebaut wird.

Leider konnte der Einfluß von Vitamin B<sub>12</sub> auf die Bildung des inaktiven Faktors  $\delta$  nicht studiert werden. Diese Untersuchungen sind nur durch größer angelegte Versuche möglich.

### 2. Der Einfluß von Zugaben von Aetiocobalamin zu Kulturen der Mutante.

Unter sonst gleichen Versuchsbedingungen wurden die Kulturen in Anwesenheit von 1, 2, 4 und 8  $\gamma$  Aetiocobalamin/ccm inkubiert. Die Resultate gehen aus Tab. 5 hervor.

Bei diesen Versuchen wurden die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  (die wegen der unvollständigen Trennung gemeinsam bestimmt werden mußten) in der üblichen Konzentration gebildet. Die Werte liegen eher etwas höher als die Kontrollen, doch sind sie in Anbetracht des durchschnittlich 10% betragenden Versuchsfehlers nicht gesichert.

Tab. 5. Der Einfluß von Aetiocobalaminzugaben auf die Bildung der Faktoren  $\alpha + \beta$  und Faktor  $\gamma$  (id. Aetiocobalamin).

Aetiocobalaminzugabe $\gamma$ /ccm	1,0	2,0	4,0	8,0	0 = Kontrolle
gefundene Faktoren:					
Faktoren $\alpha + \beta$ . . . . .	0,61	0,65	0,58	0,67	0,60
Faktor $\gamma$ . . . . .	1,29	2,35	4,15	7,80	0,30
(theoretisch: Kontrolle + Zugabe Aetiocobalamin)	(1,30)	(2,30)	(4,30)	(8,30)	

Der Gehalt an Aetiocobalamin entspricht demjenigen, der zu erwarten ist, wenn der Organismus von der künstlichen Zugabe dieser Substanz nicht beeinflußt wird. Hier liegen die Werte gegenüber der Kontrolle eher tiefer, doch auch diese Differenzen sind nicht gesichert.



3. Der Einfluß von Zugaben von Faktor  $\delta$  zu Kulturen des Wildstammes.

Die Versuchsanordnung war dieselbe wie in den vorhergehenden Versuchen. Die Röhren erhielten  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{5}$  und 1 opt. Einh. Faktor  $\delta$ /cem, was Konzentrationen von 2, 4, 8 und 40  $\gamma$ /cem entsprechen dürfte.

Die Resultate, wie sie der Plattentest mit *E. coli* einerseits und die Papierchromatographie in den Entwicklersystemen A und C lieferten, sind in Tab. 6 dargestellt.

Der Versuch zeigt:

1. Der für *E. coli* inaktive Faktor  $\delta$  führt unter der Einwirkung des Wildstammes zur Bildung von aktiven Faktoren.

2. Diese aktiven Faktoren werden nur in begrenzten Mengen gebildet, ihre Konzentration hat bereits bei Zugabe von 2  $\gamma$  Faktor  $\delta$ /cem das unter diesen Verhältnissen mögliche Maximum erreicht.

3. Neben Vitamin B<sub>12</sub>, dessen Konzentration um 50% erhöht wird, treten fünf weitere aktive Cobalamine auf. Ihre adierte „*E. coli*-Aktivität“ entspricht einer Konzentration von 0,25  $\gamma$  Vitamin B<sub>12</sub>/cem. Auf die Ermittlung der Konzentration an einzelnen Faktoren wurde verzichtet.

Tab. 6. Der Einfluß von Faktor  $\delta$  auf die Bildung von Cobalaminen durch den Wildstamm B-938.

Das gebildete Vitamin B<sub>12</sub> wurde mit quantitativer Papierchromatographie ermittelt, die Totalaktivität mit dem Plattentest mit *E. coli* 113-3.

Zugabe Faktor $\delta$ $\gamma$ /cem	gebildetes Vitamin B <sub>12</sub> $\gamma$ /cem	Total-Aktivität $\gamma$ /cem	Aktivitäts-differenz $\gamma$ /cem	weitere Bioautogrammeflecke bei R <sub>f</sub> -Werten <sup>1)</sup> in Entwickler A (obere Zahl) u. C (untere Zahl)				
				<sup>2)</sup> 0,12 0,05	<sup>3)</sup> 0,19 0,11	0,36 0,59	0,51 0,65	<sup>4)</sup> 1,34 1,64
0	0,20	0,20	0	—	—	—	—	—
2	0,30	0,55	0,25	+	+	+	+	(+)
4	0,28	0,56	0,28	+	+	+	+	(+)
8	0,28	0,51	0,23	+	+	+	+	(+)
40	0,31	0,54	0,23	+	+	+	+	(+)

<sup>1)</sup> Die R<sub>f</sub>-Werte verstehen sich relativ zu Vitamin B<sub>12</sub>.

<sup>2)</sup> Faktor  $\alpha$ , <sup>3)</sup> Faktor  $\beta$ , <sup>4)</sup> Faktor  $\gamma$ .

Unter den zusätzlich auftretenden Cobalaminen befinden sich die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$ , ferner Spuren von Faktor  $\gamma$  (Aetiocobalamin). Die zwei weiteren Faktoren konnten wir noch nicht näher charakterisieren.

Die Wirkung des Faktors  $\delta$  resultiert also in der Bildung einer ganzen Serie von aktiven Cobalaminen. Dieses Ergebnis ähnelt in gewissen Beziehungen den Untersuchungsbefunden von DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 b) über die „unspezifische“ Umwandlung von Aetiocobalamin durch *E. coli*.

VIII. Diskussion.

Aus einem Vitamin B<sub>12</sub> bildenden Organismus, einem Stamm von *Bacillus megaterium* (Nr. B-938), entstand unter der Einwirkung von Röntgenstrahlen eine Mutante, die nunmehr an Stelle von Vitamin B<sub>12</sub> vier andere Co-

balamine produziert. Diese sind: eine Aetiocobalamincarbonsäure (= Faktor  $\delta$ ), Aetiocobalamin (= Faktor  $\gamma$ ), Faktor  $C_1$  (= Faktor  $\alpha$ ) und eine nicht identifizierbare Substanz (= Faktor  $\beta$ ), deren Zugehörigkeit zu den Faktoren C zwar nicht bewiesen werden kann, aber doch wahrscheinlich ist.

Es stellt sich nun die Frage, ob diese vier Cobalamine in den Kulturen der Mutante von *Bac. megaterium* (Nr. M 3001) Aufbau- oder Abbauprodukte von Vitamin  $B_{12}$  darstellen. Wären es Abbauprodukte, so müßte man sich vorstellen, daß die Mutante gleich wie der Wildstamm Vitamin  $B_{12}$  synthetisiert, es aber mit Hilfe eines durch die Mutation losgelösten Mechanismus zu den vier gefundenen Cobalaminen abbaut. Unter diesen Bedingungen sollten während des Wachstums der Mutante mindestens Spuren von Vitamin  $B_{12}$  auftreten. In den Versuchen, bei welchen in kurzen Zeitabständen sowohl die Kulturflüssigkeiten wie die Zellen auf ihren Gehalt an einzelnen Faktoren untersucht wurden, erschien aber nie Vitamin  $B_{12}$ . Ferner wird das zur Nährlösung zugegebene Vitamin  $B_{12}$  durch die Mutante nicht abgebaut (vgl. VII/1).

Nach diesen Versuchen scheinen die von der Mutante M 3001 gebildeten Cobalamine Zwischenstufen des Aufbaus von Vitamin  $B_{12}$  zu sein. Man hätte sich offenbar vorzustellen, die Mutation manifestiere sich in der Blockierung eines ziemlich am Schluß der Biosynthese von vollständigem Vitamin  $B_{12}$  stehenden Schrittes. Daß es dem Organismus nicht nur an der Bildung des nötigen 5,6-Dimethylbenzimidazols fehlt, zeigten Versuche, bei welchen diese Base zur Nährlösung zugegeben wurde. Auch unter diesen Bedingungen entstand kein Vitamin  $B_{12}$ .

Als Zwischenstufen der Biosynthese müssen die gefundenen Faktoren durch einen Organismus, der ein nucleotid-haltiges Cobalamin zu bilden vermag, als Substrat verwertet werden können.

Daß Aetiocobalamin als Vorstufe zur Bildung „kompletter“ Cobalamine verwertbar ist, haben die zahlreichen in der Einleitung erwähnten biosynthetischen Versuche bewiesen.

Über die Rolle der Faktoren C ist nichts Sicheres bekannt. DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 b) halten sie für mögliche Zwischenstufen bei der Synthese von „kompletten“ Cobalaminen. Nach FORD, KON und PORTER (1952) entstehen sie neben anderen Faktoren (DELLWEG, BECHER und BERNHAUER, 1956 b) bei der Einwirkung von *E. coli* auf Aetiocobalamin allein oder beim gleichzeitigen Anbieten von schlecht verwertbaren Nucleotidbasen (FORD, HOLDSWORTH und KON, 1955) als „unspezifische“ Cobalamine. Sie scheinen nicht oder höchstens in Spuren aufzutreten, falls *E. coli* Aetiocobalamin und eine gut verwertbare Base als Vorstufen zugegeben werden. Sie wurden noch nicht in genügenden Mengen isoliert, um in biosynthetische Versuche eingesetzt werden zu können. Über ihre Struktur ist auch nichts bekannt.

Über die biosynthetische Verwertbarkeit der Aetiocobalamincarbonsäure ergeben die beschriebenen Versuche mit dem Wildstamm (vgl. VII/3) einigen Aufschluß. Es ist anzunehmen, daß dieser Faktor als solcher für die Bildung von aktiven Cobalaminen verwertet wird. Bemerkenswert ist bei denselben Versuchen das Auftreten von fünf weiteren aktiven Cobalaminen neben dem Vitamin  $B_{12}$ . Die Zugabe von 2  $\gamma$  Faktor  $\delta$  (Aetiocobalamincarbonsäure) pro ccm Nährlösung erhöht die Bildung von aktiven Cobalaminen durch den Wildstamm von 0,20  $\gamma$  Vitamin  $B_{12}$ /ccm auf 0,54  $\gamma$  Cobalamingemisch/ccm; höhere Gaben bewirken keine weitere

Aktivitätssteigerung. Die Produktion von Vitamin B<sub>12</sub> selbst wird dabei etwa um 50% erhöht; das heißt offenbar, daß die Zelle noch so viel verfügbares 5,6-Dimethylbenzimidazol besitzt, um mit Hilfe der ihr angebotenen Vorstufe ihre Vitamin-B<sub>12</sub>-Synthese um 50% zu steigern.

DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 b) fanden, daß ein Wildstamm von *E. coli* A e t i o c o b a l a m i n auf eine „unspezifische“ Art umwandelt, indem sie unter den Reaktionsprodukten Vitamin B<sub>12</sub>, zwei Purincobalamine, zwei Faktoren C und zwei Aetiocobalamincarbonsäuren fanden. In unseren Versuchen über den Einfluß einer A e t i o c o b a l a m i n c a r b o n s ä u r e auf die Bildung von Cobalaminen durch einen Wildstamm von *Bac. megaterium* erscheinen neben Vitamin B<sub>12</sub> (dessen Menge erhöht wird!) die Faktoren  $\alpha$  und  $\beta$  (= Faktor C<sub>1</sub> und Faktor C<sub>2</sub>?), eine Spur Aetiocobalamin und zwei noch nicht identifizierte Cobalamine. Es scheint aber nicht unmöglich, daß die beiden noch nicht identifizierten Faktoren auch Purincobalamine sind. In diesem Falle ließen sich interessante Vergleiche zu den Versuchen von DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 b) anstellen. Diese Autoren erhielten Aetiocobalamincarbonsäuren als A b b a u p r o d u k t e von Aetiocobalamin; in unseren Versuchen scheinen die Verhältnisse jedoch eher umgekehrt zu sein. Jedenfalls wird zu den Kulturen der Mutante zugegebenes Aetiocobalamin nicht abgebaut (vgl. VII/2), es entsteht vielmehr in Spuren unter der Einwirkung des Wildstammes auf den Faktor  $\delta$  (Aetiocobalamincarbonsäure). Parallele zwischen den Versuchen von DELLWEG, BECHER und BERNHAUER (1956 b) und den eigenen lassen sich zwar kaum ziehen, bevor wir die isolierte Aetiocobalamincarbonsäure näher identifiziert haben. Es wäre immerhin denkbar, daß zwischen dem Aetiocobalamin und seinen Carbonsäuren Gleichgewichtsreaktionen bestehen, wodurch sich auch erklären ließe, weshalb die beiden Verbindungen in den Kulturen der Mutante von *Bac. megaterium* (M 3001) nebeneinander vorkommen.

Über die Beziehungen zwischen den Faktoren C und dem Aetiocobalamin oder den Aetiocobalamincarbonsäuren soll bloß hervorgehoben werden, daß in den Kulturen von M 3001 die Faktoren C vor dem Aetiocobalamin erscheinen. Die Frage, ob sie auch in der Biosynthese vor dem Aetiocobalamin stehen, kann durch diese Versuche nicht beantwortet werden. Bemerkenswert ist ihre Entstehung aus Faktor  $\delta$  (Aetiocobalamincarbonsäure) unter der Einwirkung des Wildstammes von *Bac. megaterium*, indem sie auch hier dann zu entstehen scheinen, wenn es den Zellen nicht möglich ist, ein Nucleotid mit der angebotenen Cobalaminvorstufe zu verbinden. Ob der Faktor  $\delta$  durch den Wildstamm zuerst in Aetiocobalamin umgewandelt wird und dann erst in die verschiedenen anderen Cobalamine, kann nicht sicher beurteilt werden. Durch das Auftreten in Spuren während des Wachstums des Wildstammes in Gegenwart von Faktor  $\delta$  ist die Bedeutung des Aetiocobalamins als Intermediärprodukt zwischen Aetiocobalamincarbonsäure und den aktiven Cobalaminen wahrscheinlich gemacht, mit Sicherheit kann aber nur ausgesagt werden, daß es unter diesen Bedingungen entstehen kann.

Die Bildung der zwei weiteren Cobalamine (von welchen vermutet wird, daß sie „komplette“ Cobalamine sind) durch den Wildstamm von *Bac. megaterium* aus Faktor  $\delta$  könnte als das Resultat eines Überangebotes an „Precursor“ interpretiert werden und ließe sich dadurch erklären, daß den Zellen offenbar die zur Biosynthese erforderlichen Nucleotidbasen

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

Für eine weitere Diskussion dieser Versuche wäre es vermutlich aufschlußreich, den Faktor  $\delta$  (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  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bezeichnet werden.

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

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

7. Die Eigenschaften des Faktors  $\delta$  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  $\delta$  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  $\delta$  (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). — PFIFFNER, 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 B<sub>12</sub> 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.

### **Curriculum vitae.**

Geboren am 7. Januar 1931 in Innertkirchen. Eintritt in die Primarschule 1938 in Bern. Besuch des Städtischen Progymnasiums und Gymnasiums in Bern. Herbst 1950: Maturität, Typus C. Anschließend Eintritt in die Abteilung für Naturwissenschaften der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich. Frühjahr 1954: Diplom in biologisch-chemischer Studienrichtung. Seither als Doktorandin und wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN am Institut für spezielle Botanik der E. T. H. tätig.