

In protohaemin-haltigen Nährmedien dagegen kann VAR seine Haematinfermente nach dem derzeitigen Stand der Untersuchungen ebenso gut ausbilden wie J1 und hat durch zahlenmäßige Überlegenheit die Oberhand.

Das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten von J1-Bakterien konnte durch diese Untersuchungen geklärt werden. Es gelang aber nicht, einen Anhalt zu finden, warum die gleichzeitig eingepflichten J1-Bakterien bei den Überwachungs-Versuchen in den protohaeminhaltigen Nährböden im Verlaufe weniger Passagen völlig verschwanden. Der Nachweis einer durch VAR produzierten extrazellulären Hemmsubstanz konnte ebenso wenig erbracht werden, wie der einer gegenseitigen Beeinflussung ihres Wachstums bei kreuzweisem Ausstreichen auf der Blutagarplatte.

Die Beeinflussung der J1-Bakterien durch VAR gehört vielleicht in das noch weitgehend ungeklärte Gebiet der Symbiose und Antibiose von Bakterien-Mischkulturen. Eine ähnliche Erscheinung ist auch von Milzbrandbazillen bekannt, die mit *E. coli*-Kulturen zusammen kultiviert werden. Es kommt dabei zum Verschwinden des *Bacillus anthracis* (GILLISEN<sup>5</sup>).

Ferner wird von einer gegenseitigen Beeinflussung zwischen S- und R-Formen von *Brucella abortus* berichtet.

In Kulturen von *Brucella abortus* mit vorwiegend S-Formen kommt es zum Auftreten von R-Formen, die bei längerem Stehen der Kultur die Oberhand gewinnen. Dieses Phänomen ist durch Alanin bedingt. S-Zellen bilden während ihres Wachstums Alanin, das für sie selbst toxisch ist. R-Zellen hingegen sind für Alanin wenig empfindlich und bilden auch weniger Alanin. Durch dieses Stoffwechselprodukt wird die Vermehrung der S-Zellen gebremst, so daß sich die in der Minderzahl vorhandenen R-Zellen entwickeln können. In einer Mischkultur von überwiegend S-Formen wird daher mit dem Anstieg des Alanins gleichzeitig ein Anstieg der R-Zellen, und umgekehrt bei einer Mischkultur von vorwiegend R-Formen ein Anstieg der S-Zellen beobachtet (BRAUN und Mitarb.<sup>3</sup>).

Die Ergebnisse lassen für das Arbeiten mit VAR-Kulturen folgenden Schluß zu:

Um eine gleichmäßige haemin-heterotrophe Population zu erhalten, ist die Fortzüchtung des VAR-Stammes auf protohaemin-haltigen Nährböden erforderlich. Sie allein gewährleisten nach diesen Erfahrungen das Nichtauftreten von haemin-autotrophen Zellen, deren voll ausgebildete Haematinfermente die Versuche über die Komplettierung des Atmungssystems von VAR-Suspensionen in ruhen- dem Zustand nach Protohaemin-Zusatz stören würden.

## Über die Biosynthese von Thymindesoxyribosid bei Bakterien

VON ADOLF WACKER und DÖRTHE PFAHL

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule Berlin, Berlin-Charlottenburg  
(Z. Naturforschg. **12 b**, 506—509 [1957]; eingegangen am 14. Mai 1957)

Wie mit Uridin uniform <sup>14</sup>C markiert gefunden wurde, wandelt *B. coli* 113—3, sowohl mit Vitamin B<sub>12</sub> als auch mit Methionin als Wachstoffsstoff, die Base in Thymin und Cytosin um, dagegen nicht die Ribose in Desoxyribose.

In Fortführung der Arbeiten über die Biosynthese des Thymins<sup>1</sup> mit isoto- pen-markierten Verbindungen haben wir nunmehr auch mit Uridin-[<sup>14</sup>C] uniform markiert die Biosynthese des Thymindesoxyribosids untersucht.

Nachdem wir zeigen konnten, daß Uracil unter Mitwirkung von Folsäure in Thymin umgewandelt

wird, war es nun von Interesse, die Bildung der Desoxyribose näher zu studieren. Es lag nahe, in der Ribose einen Vorläufer der Desoxyribose, bzw. in den Ribosiden Vorläufer der Desoxyriboside<sup>2</sup> zu vermuten.

Bei der Bildung der Desoxyriboside dürfte dem Vitamin B<sub>12</sub> eine besondere Rolle zukommen. Wir

<sup>1</sup> F. WEYGAND, A. WACKER, A. TREBST u. O. P. SWOBODA, Z. Naturforschg. **9 b**, 764 [1954].

<sup>2</sup> P. M. ROLL, H. WEINFELD, E. CAROLL u. G. B. BROWN, J. biol. Chemistry **220**, 439 [1956]; P. M. ROLL, H. WEINFELD u. E. CAROLL, **220**, 455 [1956]; I. A. ROSE u. B. S. SCHWEIGERT, **202**, 635 [1950].

haben daher zu unseren Untersuchungen einen Bakterienstamm ausgewählt, bei dem Vitamin B<sub>12</sub> als Wuchsstoff durch Methionin ersetzbar ist, um damit den Einfluß des Vitamins B<sub>12</sub> näher zu erforschen.

### Methodik

Uridin-<sup>[14C]</sup> uniform markiert: Aktivität: 0,7  $\mu$ C/mg (Schwarz Laboratories, Inc., Mount Vernon, N. Y.).

Uracil-<sup>[2-14C]</sup>: Aktivität: 2 mC/mMol<sup>1</sup>.

#### Kultivierung der Bakterien

*B. coli* 113-3 wurde in Oberflächen-Kulturen auf Stüchagar gehalten und monatlich überimpft. Vor der Beimpfung eines Versuches wurden Vorpässagen in synthetischem Medium durchgeführt.

Die Kultivierung erfolgte in 1000-ml-Erlenmeyerkolben mit 500 ml Kulturmedium. Sterilisation: 30 Min. bei 100°. Beimpfung: 2 Ösen, Durchmesser 2 mm. Bebrütung bei 37°. Die Stärke des Wachstums wurde im lichtelektrischen Kolorimeter Modell IV, nach Lange gemessen. Ablesung an der Extinktionsskala, Skalenteile · 1000; Zusammensetzung des Nährmediums nach DAVIS<sup>3</sup> unter Zusatz der <sup>14</sup>C-markierten Verbindungen.

#### Aufarbeitung der Bakterien

Nach 48 Stdn. Wachstum wurden die Bakterien von 500 ml Kulturmedium abzentrifugiert, 5-mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, in 25 ml chloroform-gesättigtem Wasser suspendiert und 30 Min. bei 4° stehen gelassen. Danach wurde in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert, in 0,4-proz. Kochsalzlösung suspendiert (100 ml/10 g Bakterien-Naßgewicht), kristallisiertes Lysozym<sup>4</sup> (0,5 mg/ml Lösung) zugesetzt und 10 Min. bei 20° inkubiert. Die Einwirkung des Lysozyms wurde durch rasches Abkühlen auf 2° unterbrochen, in einer gekühlten Zentrifuge wurde abzentrifugiert, 2-mal mit dest. Wasser gewaschen und der Rückstand bei -30° eingefroren. Nach 36 Stdn. wurde der gefrorene Rückstand aufgetaut, mit der 10-fachen Menge dest. Wasser sowie der doppelten Menge Glaspulver versetzt, 30 Min. in einem eisgekühlten Mörser zerrieben und danach sofort in einer gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde in der Kälte mit der 3-fachen Menge Alkohol versetzt, wobei die Nucleinsäure fadenförmig ausfällt. Dieser Arbeitsgang wurde mit dem Rückstand noch dreimal wiederholt, die fadenförmigen Niederschläge gesammelt und in dest. Wasser gelöst. Die ungereinigte Nucleinsäurelösung (Desoxyribonucleinsäure (DNS) und Ribonucleinsäure (RNS)) wurde zur Gewinnung der Nucleoside zunächst mit kristallisierter Desoxyribo-

nuclease und Ribonuclease bei  $p_H$  7,0–7,2, danach mit Kälberdarm-Phosphatase bei  $p_H$  9,0 jeweils bei 37° 24 Stdn. lang verdaut. Hierauf wurde von dem ausgefallenen Niederschlag abfiltriert und die Lösung im Vakuum zur Trockne eingengt. Die Nucleoside wurden dreimal mit je 10 ml siedendem Äthanol extrahiert. Nach dem Eindampfen der vereinigten alkoholischen Lösungen im Vakuum bis zur Trockne, wurde in Wasser aufgenommen.

#### Papierchromatographie

Papiersorte: Schleicher & Schüll, 2043 b mit Säure gewaschen. Lösungsmittel-System: Methanol, Äthanol, konz. HCl, H<sub>2</sub>O (50 : 25 : 6 : 19 vol.)<sup>5</sup>.  $R_f$ -Werte der Riboside und Desoxyriboside: Guanosin 0,24, Adenosin 0,31, Cytidin 0,40, Uridin 0,58, Cytosin-desoxyribosid 0,51, Thymin-desoxyribosid 0,73. Sichtbarmachung der Substanzen auf den Papierchromatogrammen erfolgte durch ihre Fluoreszenzlösung im UV-Licht einer Niederdruck-Quecksilberdampf-Lampe<sup>6</sup>.

Zur Isolierung der Basen wurden die Nucleinsäuren bzw. die Bakterien mit 70-proz. Perchlorsäure gespalten und die überstehende Lösung nach der Neutralisation in n-Butanol mit Wasser gesättigt chromatographiert.

Thymin-desoxyribosid, Uridin, Thymin und Uracil wurden quantitativ bestimmt, indem die Flecke auf den Chromatogrammen mit dest. Wasser eluiert und in einem Spektralphotometer (Beckman, Modell DU) die Extinktionen bestimmt wurden.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden ein oder zwei ml dieser Lösungen mit 15 mg inaktiver Substanz versetzt und in Quarzröhrchen zur Trockne eingengt.

#### Messung der Radioaktivität

Bei den Versuchen mit Uridin-<sup>[14C]</sup> wurden alle Verbindungen als CO<sub>2</sub> im Gaszählrohr gemessen<sup>7</sup>. Bei den Versuchen mit Uracil-<sup>[2-14C]</sup> wurde die Radioaktivität auf dem Papier vor der Elution der Flecken unter einem Glockenzählrohr (FHZ 15, 1,2 mg/cm<sup>2</sup> Glimmerfenster) gemessen. Die Meßzeit wurde bei allen Versuchen so gewählt, daß der Fehler unter 2% lag.

Die in den Tabellen aufgeführten Werte sind Mittelwerte von mindestens zwei Bestimmungen.

### Ergebnisse

Wie aus Tab. 1 hervorgeht, hat das aus der DNS der mit Methionin gewachsenen Bakterien isolierte Thymin-desoxyribosid eine Aktivität von 9583 Imp./min/ $\mu$ Mol. Um zu sehen, wie sich diese Radioaktivi-

<sup>3</sup> B. D. DAVIS u. E. S. MINGIOLI, J. Bacteriol. **60**, 17 [1950].

<sup>4</sup> R. VENDRELY, C. PALMADE u. C. VENDRELY, Nature [London] **178**, 1044 [1956].

<sup>5</sup> K. S. KIRBY, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **18**, 575 [1955].

<sup>6</sup> Hersteller: K. Marggraf, Berlin-Charlottenburg, Grollmannstraße.

<sup>7</sup> F. WEYGAND, Naturwissenschaften **44**, 169 [1957].

Im Nährmedium vorhanden		Methionin 10 $\gamma$ /ml		Vitamin B <sub>12</sub> 10m $\gamma$ /ml	
Trübungswert der Bakterienkulturen nach 48 Stdn. Wachstum		92		116	
Aktivität		Imp./min/ $\mu$ Mol	Imp./min/ $\mu$ Mol C	Imp./min/ $\mu$ Mol	Imp./min/ $\mu$ Mol C
Im Nährmedium vorhanden	Uridin- [ <sup>14</sup> C] 2 $\gamma$ /ml	175 290	19 476	175 290	19 476
Nach Perchlorsäure-Spaltung von Uridin erhalten	Uracil- [ <sup>14</sup> C]	76 997	19 294	76 997	19 249
Aus der Differenz der spezifischen Aktivitäten (Imp./min/ $\mu$ Mol) bestimmt	Ribose- [ <sup>14</sup> C]	98 293	19 658	98 293	19 658
Nach enzymatischer Spaltung der Nucleinsäuren erhalten	Thymin-desoxyribosid	9 583	958	4787 (6298)*	478 (629)*
Nach Perchlorsäure-Spaltung der Nucleinsäuren erhalten	Thymin	9 627	1925	5054 (6035)*	1010 (1261)*
Aus der Differenz der spezifischen Aktivitäten (Imp./min/ $\mu$ Mol) bestimmt	Desoxyribose	nicht aktiv		nicht aktiv	
Nach enzymatischer Spaltung der Nucleinsäuren erhalten	Uridin	10 792	1 199	7 138	793
Nach Perchlorsäure-Spaltung der Nucleinsäuren erhalten	Uracil	5 038	1 259	1 970	492
Aus der Differenz der spezifischen Aktivitäten (Imp./min/ $\mu$ Mol) bestimmt	Ribose	5 754	1 150	5 168	1 033

\* Wiederholung des Versuches; gewachsen mit Vitamin B<sub>12</sub>, 10 m $\gamma$ /ml Nährmedium und Uridin- [<sup>14</sup>C] 2,4  $\gamma$ /ml Nährmedium.

Tab. 1. Spezifische Aktivitäten der aus der Bakteriennucleinsäure isolierten Verbindungen.

Im Nährmedium vorhanden		Methionin 10 $\gamma$ /ml	Vitamin B <sub>12</sub> 10 m $\gamma$ /ml
Trübungswert der Bakterienkulturen nach 48 Stdn. Wachstum		167	201
Aktivität		Imp./min/ $\mu$ Mol	Imp./min/ $\mu$ Mol
Im Nährmedium vorhanden	Uracil- [2- <sup>14</sup> C] 2 $\gamma$ /ml	77 635	77 635
Nach Perchlorsäure-Spaltung der Bakterien erhalten	Thymin	6 881	5 958
	Uracil	5 955	4 422

Tab. 2. Spezifische Aktivitäten der nach Perchlorsäure-Spaltung der Bakterien erhaltenen Pyrimidine.

tät auf die Base und den Zucker verteilt, wurde Thymin-desoxyribosid mit Perchlorsäure gespalten, Thymin papierchromatographisch abgetrennt und seine Aktivität bestimmt. Diese betrug 9627 Imp./min/ $\mu$ Mol. Daraus ergibt sich, daß die spezifischen molaren Aktivitäten von Thymin-desoxyribosid und

Thymin gleich sind, und infolgedessen die Desoxyribose nicht radioaktiv ist. Das gleiche trifft auch für die mit Vitamin B<sub>12</sub> gewachsenen Bakterien zu. Da aber die Werte für Thymin-desoxyribosid mit 4787 Imp./min/ $\mu$ Mol und für Thymin mit 5054 Imp./min/ $\mu$ Mol etwas variierten, wurde der Versuch

wiederholt und dabei sichergestellt, daß die Desoxyribose ebenfalls nicht radioaktiv ist.

Die spezifische molare Aktivität des Uridins, gewonnen aus den mit Methionin gewachsenen Bakterien, beträgt 10 792 Imp./min/ $\mu$ Mol, die des Uracils 5038 Imp./min/ $\mu$ Mol. Aus der Differenz errechnet sich für die Ribose 5754 Imp./min/ $\mu$ Mol. Vergleicht man hierbei noch die spezifischen molaren Aktivitäten des Kohlenstoffs mit 1199, 1259 und 1150 Imp./min/ $\mu$ Mol, so folgt, daß Uridin ohne Aufspaltung in die Ribonucleinsäure eingebaut wird. Ein anderes Bild ergibt sich bei den mit Vitamin B<sub>12</sub> gewachsenen Bakterien. Hier findet man, daß die spezifische, molare Aktivität des Uracils 1970 Imp./min/ $\mu$ Mol beträgt, also wesentlich geringer ist als die der Ribose, nämlich 5168 Imp./min/ $\mu$ Mol. Diese Verdünnung des Uracils gegenüber der Ribose zeigt auch deutlich der Vergleich der Aktivitäten des Kohlenstoffs von 492 Imp./min/ $\mu$ Mol für das Uracil und von 1033 Imp./min/ $\mu$ Mol für die Ribose.

Die Bestimmung der Radioaktivität eines ml Nährmediums vor und nach der Bebrütung ergibt, daß die Bakterien rund  $\frac{2}{3}$  des angebotenen Uridins aufnehmen. Die spezifischen molaren Aktivitäten des Kohlenstoffs von Thymin, Uracil und der Ribose zeigen im Vergleich zu denen von dem eingesetzten Uracil und der Ribose, daß die Bakterien den größten Teil der Bausteine der Nucleinsäuren selbst synthetisieren. Auffallend ist, daß in Anwesenheit von Vitamin B<sub>12</sub> die Aktivitäten (Imp./min/ $\mu$ Mol) von Thymin und Uracil wesentlich niedriger sind als in Anwesenheit von Methionin. Diese Verdünnung kann man nicht auf die unterschiedlichen Mengen Bakterien zurückführen, denn die Trübungswerte (vgl. Tab. 1) sind nicht so verschieden. Auch enthalten die mit Vitamin B<sub>12</sub> gewachsenen Bakterien nicht mehr DNS. Die Bestimmung der DNS nach der Methode von WEBB<sup>8</sup> ergab für die mit Methionin gewachsenen Bakterien 5,4 mg/100 mg Trockengewicht, für die mit Vitamin B<sub>12</sub> gewachsenen 5,2 mg/100 mg Trockengewicht. Die Erklärung für den auffallenden Unterschied in den spezifischen, molaren Aktivitäten kann also nur darin zu suchen sein, daß Vitamin B<sub>12</sub> die Synthese von Thymin-desoxyribosid bewirkt. Um dies näher zu klären, wurde ein Versuch mit Uracil-[2-<sup>14</sup>C] angesetzt.

Bietet man *B. coli* 113-3 Uracil-[2-<sup>14</sup>C] im Nährmedium an, so erhält man das gleiche Ergebnis wie bei der Verwendung von Uridin-[<sup>14</sup>C] (s. Tab. 2). In Anwesenheit von Vitamin B<sub>12</sub> sind die spezifi-

schen Aktivitäten geringer, Thymin ist aber wieder stärker radioaktiv als Uracil. Mit Methionin als Wuchsstoff zeigt das papierchromatographisch isolierte Thymin eine spezifische, molare Aktivität von 6881 Imp./min/ $\mu$ Mol, Uracil 5955 Imp./min/ $\mu$ Mol.

Ein Vergleich der spezifischen Aktivitäten des im Nährmedium vorhandenen Uracils-[2-<sup>14</sup>C] mit denen nach der Perchlorsäure-Spaltung erhaltenen von Thymin und Uracil ergibt, daß das Bakterium, wie auch beim Uridin, seine Pyrimidin-Bausteine für die Nucleinsäure zum überwiegenden Teil selbst synthetisiert. Die Bakterien nehmen ungefähr  $\frac{2}{3}$  des im Nährmedium vorhandenen Uracils auf.

### Diskussion

Nach den Befunden von ROLL et al.<sup>2</sup> und ROSE und SCHWEIGERT<sup>2</sup>, die bei der Ratte und auch bei *Lb. Leichmannii* eine geringe Umwandlung von Ribotiden bzw. Ribosiden in Desoxyriboside fanden, hätte man erwarten können, daß Uridin in Thymin-desoxyribosid und Cytosin-desoxyribosid umgewandelt wird. Wie die Ergebnisse zeigen, ist dies sowohl in Anwesenheit von Methionin als auch von Vitamin B<sub>12</sub> nicht der Fall. Durch die Verfeinerung der Bestimmung der Radioaktivität des Kohlenstoffs als CO<sub>2</sub> ließ sich eindeutig der Beweis erbringen, daß keine Umwandlung der an Uracil gebundenen Ribose in Desoxyribose in der Bakterienzelle stattfindet. Wie die Versuche jedoch zeigen, wird die Base des Uridins (wie auch freies Uracil) in Thymin umgewandelt. Im Falle der Umwandlung des an Ribose gebundenen Uracils tritt eine Aufspaltung von Uridin derart ein, daß Ribosephosphat-[<sup>14</sup>C] entsteht. Dieses Ribosephosphat, das dann in den Pentosephosphat-Zyklus eintritt, wird aber ebenfalls, wie die im Zyklus entstehenden Intermediärprodukte, nicht in Desoxyribose umgewandelt.

Aus all diesen Ergebnissen kann man schließen, daß bei *B. coli* 113-3 im Falle der Verwendung von Uridin, keine Beziehungen zwischen der Ribose der Ribonucleinsäure und der Desoxyribose der Desoxyribonucleinsäure vorhanden sind.

Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND sind wir für sein Interesse und seine Hilfe an dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Ebenfalls Herrn BRESSALSKI für die Ausführung der radioaktiven Messungen mit dem Gaszählrohr.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir bestens für die Unterstützung.

<sup>8</sup> J. M. WEBB u. H. B. LEVY, J. biol. Chemistry **213**, 107 [1955].