	$a_{\text{H}2,6}$	$a_{\text{H}3,5}$	a_{N}	a_{NH_2}
I	3,25	1,35	5,1	5,1
II	—	0,57	4,3	3,85

Tab. 1. Kopplungsparameter der Aroxyle aus I und II [Gauß].

Bei den hier untersuchten Verbindungen handelt es sich nicht, wie man auch annehmen könnte, um Ionenradikale vom Typ der Wursterschen Salze oder um die entsprechenden tautomeren Ammoniumverbindungen, da in den EPR-Spektren weder eine Aufspaltung durch das Hydroxyproton noch durch die drei Ammoniumprotonen auftritt. Im Falle der quartären Ammoniumsalze ändert sich das Bild des EPR-Spektrums grundlegend. Außerdem wurde I in seinen Methyläther

übergeführt. Bei seiner Oxydation konnten unter den angewandten Bedingungen keine paramagnetischen Verbindungen aufgefunden werden. Somit dürfte die Formulierung des Radikals als Aroxyl⁴ gesichert sein.

Sterisch ungehinderte Radikale lassen sich ebenfalls durch Oxydation anderer Aminophenole und deren N-substituierten Derivaten darstellen. Die Oxydationsprodukte besitzen gleichfalls eine Lebensdauer, die es bequem gestattet, ihren Radikalcharakter mit Hilfe der Elektronenresonanz nachzuweisen. Wir werden darüber ausführlich an anderer Stelle berichten.

Herrn Professor Dr. EUGEN MÜLLER danken wir für anregende Diskussionen und die fördernde Unterstützung dieser Arbeit. Ebenso gilt unser Dank Fräulein U. SAUTTER und Fräulein H. BÜRK für ihre tatkräftige Hilfe bei diesen Untersuchungen. Das bei dieser Arbeit verwendete EPR-Gerät wurde dem Direktor des Chemischen Instituts der Universität Tübingen in dankenswerter Weise von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellt.

⁴ Entsprechend ihrem Oxydationsgrad lassen sich die vorliegenden Verbindungen auch als ungeladene Semichinone ansprechen (vgl. a. M. v. STACKELBERG, in: Houben-Weyl-Müller, Methoden der organischen Chemie, Bd. III/2,

S. 264 f., Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1955), eine Auffassung, die sich im Prinzip auch auf alle bisher dargestellten Aroxyle ausdehnen lassen würde.

Zur Rolle des Faktors V_{1a} im Vitamin B_{12} -Stoffwechsel des *Propionibacterium shermanii*

Von W. FRIEDRICH und WALTRAUD SANDECK

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Hamburg
(Z. Naturforsch. 19 b, 538—539 [1964]; eingegangen am 10. März 1964)

Faktor V_{1a} kommt in relativ hohen Konzentrationen in manchen Faulschlammern vor¹. Er wurde auch in einer *Nocardia rugosa*-Mutante² sowie in *Propionibacterium shermanii*³ nachgewiesen; dieser Mikroorganismus wandelt ihn zu Vitamin B_{12} um³. Auf Grund all dieser Befunde wird angenommen, daß Faktor V_{1a} eine Vorstufe der Biosynthese des Vitamins B_{12} ist.

Der Beweis, daß Faktor V_{1a} in *P. shermanii* sowohl bei der Synthese als auch beim Abbau des Vitamins B_{12} (bzw. des Cobinamides) eine Zwischenstufe darstellt, gelang uns nun durch Verwendung ⁶⁰Co-markierter Substrate. Unsere Versuche eröffnen gleichzeitig einen Weg zur präparativen Darstellung von ⁶⁰Co-Faktor V_{1a} und zur ⁶⁰Co-Markierung von Alkanolamin-Analoga^{4–6} des Vitamins B_{12} , von denen manche die bisher stärksten Antagonisten des Vitamins B_{12} dar-

stellen⁷. Wir gingen von der Annahme aus, daß — nach Zusatz entsprechender ⁶⁰Co-Verbindungen — der als Zwischenstufe möglicherweise auftretende ⁶⁰Co-Faktor V_{1a} sich durch relativ hohe Mengen an zugesetztem nicht markiertem Faktor V_{1a} abfangen lassen muß.

Zu einem Gäransatz mit *P. shermanii*⁸ (Medium: Maisquellwasser 72 g, Glucose 100 g, aufgefüllt mit Leitungswasser auf 1000 ml) wurden am fünften Gärtag 8 mg (ca. 8000 nMol) Faktor V_{1a} und 100 nC ⁶⁰Co(NO₃)₂ [insgesamt ca. 500 nMol Co(NO₃)₂] zugegeben. Nach Entnahme von 50-ml-Proben zu verschiedenen Zeiten wurde aus den abzentrifugierten Bakterienzellen auf die übliche Weise⁹ das Gemisch der B_{12} -Arten gewonnen, durch Adsorption an Amberlite XE-64 nachgereinigt und durch absteigende Papierchromatographie (Entwickler: wasserges. sec. Butanol mit etwas KCN) getrennt. Analyse der Flecke der B_{12} -Arten ergab (vgl. Abb. 1), daß Faktor V_{1a} am 2. bzw. 3. Tag sowohl die höchste Konzentration in der Bakterienzelle als auch die maximale ⁶⁰Co-Markierung aufweist. Zum Beispiel, daß die gemessene Radioaktivität tatsächlich dem Faktor V_{1a} und nicht einer Verunreinigung vom gleichen R_f -Wert gilt, wurde die

¹ K. BERNHAUER, H. W. DELLWEG, W. FRIEDRICH, G. GROSS, F. WAGNER u. P. ZELLER, Helv. chim. Acta 43, 693 [1960].

² A. DI MARCO, M. P. MARNATI, A. MIGLIACCI, A. RUSCONI u. C. SPALLA, in: „Vitamin B_{12} u. Intrinsic Factor“, 2. Europ. Symp., F. Enke Verlag, Stuttgart 1962, S. 69.

³ K. BERNHAUER, E. BECHER, G. GROSS u. G. WILHARM, Biochem. Z. 332, 562 [1960].

⁴ W. FRIEDRICH, G. GROSS, K. BERNHAUER u. P. ZELLER, Helv. chim. Acta 43, 704 [1960].

⁵ W. FRIEDRICH, in: „Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor“, 2. Europ. Symp., F. Enke Verlag, Stuttgart 1962, S. 8.

⁶ W. FRIEDRICH, Z. Naturforsch. 18 b, 455 [1963].

⁷ H. C. HEINRICH, W. FRIEDRICH u. P. RIEDEL, Biochem. Z. 334, 284 [1961].

⁸ Zu Fermentationen mit Propionsäurebakterien vgl. D. PERLMAN, J. M. BARRETT u. P. W. JACKSON, in: „Vitamin B_{12} und Intrinsic Factor“, 2. Europ. Symp., F. Enke Verlag, Stuttgart 1962, S. 58 sowie K. BERNHAUER, E. BECHER u. G. WILHARM, Arch. Biochem. Biophysics 83, 248 [1959].

⁹ W. FRIEDRICH u. K. BERNHAUER, in: K. F. BAUER, „Medizinische Grundlagenforschung“, Bd. II, S. 661, G. Thieme Verlag, Stuttgart 1959.

Abb. 1. Gehalt der *P. shermanii*-Zellen (aus 50 ml Ansatz) an Faktor V_{1a}, Vitamin B₁₂ und Cobinamid nach Zusatz von 8 mg Faktor V_{1a} und 100 nC ⁶⁰Co (NO₃)₂/1000 ml Medium (—) sowie Markierungsgrad dieser B₁₂-Arten mit ⁶⁰Co (...) abhängig von der Zeit.

Abb. 2. Elektrophoretische Trennung der Produkte der Partialsynthese von Vitamin B₁₂ (—) und 2-Amino-2-methylpropanol-B₁₂-Analog (...). Zur Synthese wurde jeweils mit Hilfe von *P. shermanii* gewonnener ⁶⁰Co-Faktor V_{1a} mitverwendet.

Substanz durch Chromatographie an CM-Zellulose¹⁰ gereinigt, mit nicht markiertem Faktor V_{1a} verdünnt und partialsynthetisch^{4, 5} zu Vitamin B₁₂ umgesetzt. Die Elektrophorese des Reaktionsgemisches in verd. Essigsäure ergab die drei üblichen Zonen (Vitamin B₁₂, C_{2'}-B₁₂-Analog und Faktor V_{1a}), deren Radioaktivität gleichmäßig auf alle Zonen verteilt war (vgl. Abb. 2).

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß *P. shermanii* anorganisch gebundenes Kobalt sehr rasch in Faktor V_{1a} einbaut, aus dem anschließend Cobinamid gebildet wird.

Weitere ähnlich durchgeführte Versuche¹¹ mit *P. shermanii*, bei denen als ⁶⁰Co-Quelle nicht ein anorganisches Salz, sondern ⁶⁰Co-Cobinamid zugesetzt worden war, lieferten ebenfalls ⁶⁰Co-Faktor V_{1a} (Radioaktivitätsverteilung in 50-ml-Proben nach 48 bzw. 60 Stdn., gemessen in I.p.M.: Faktor V_{1a} 688 bzw. 1183, Vitamin B₁₂ 174 bzw. 150, Cobinamid 259 bzw. 218). Der gewonnene ⁶⁰Co-Faktor V_{1a} wurde papierchromatographisch in drei verschiedenen Entwicklern⁹ (wasserges. sec. Butanol; wasserges. sec. Butanol + Eisessig; wasserges. sec. Butanol + NH₃) mit Faktor V_{1a} aus Faulschlamm verglichen (wobei die Substanzen identisch liefen und die Radioaktivität stets den aus *P. shermanii* stammenden Fleck begleitete) und schließlich partialsynthetisch⁵ zu 2-Amino-2-methylpropanol-B₁₂⁷ umgesetzt. Die durch Elektrophorese gewonnenen drei üblichen Zonen (s. oben) trugen die erwartete Radioaktivität (vgl. Abb. 2).

Aus diesem Versuch geht hervor, das *P. shermanii* Cobinamid zu Faktor V_{1a} spaltet. Vermutlich handelt es sich hier um die Einwirkung einer für die f-Säureamidbindung spezifischen Amidase, da keine nennenswerten Mengen an Desamidierungsprodukten des Faktors V_{1a} während der Einwirkungszeit von einigen Tagen beobachtet wurden. Wie weitere Versuche mit *P. shermanii* in Gegenwart von ⁶⁰Co(NO₃)₂ zeigten, läßt sich ⁶⁰Co-markierter Faktor V_{1a} auch durch Amidierung von Mono- und Dicarboxyl-Derivaten des Faktors V_{1a} darstellen¹².

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung dieser Arbeit.

¹⁰ J. PAWELKIEWICZ, W. WALERYCH, W. FRIEDRICH u. K. BERNHAUER, J. Chromatogr. [Amsterdam] **3**, 359 [1960].

¹¹ Vgl. hierzu auch W. FRIEDRICH, E. KÖNIG u. WALTRAUD SANDECK, Angew. Chem. **76**, 272 [1964].

¹² W. FRIEDRICH u. WALTRAUD SANDECK, in Vorbereitung.