

Wir haben mit der zur damaligen Zeit noch nicht bekannten Dünnschichtchromatographie Musennin erneut untersucht und festgestellt, daß es sich bei ihm um ein Gemisch verschiedener Glykoside handelt. Mit dem Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 35 : 10<sup>3</sup> erhielt man an Kieselgel G zwei Hauptflecke (Substanz A,  $R_f = 0,19$  und Substanz B,  $R_f = 0,13$ ) und zwei Nebenflecke (Substanz C,  $R_f = 0,09$  und Substanz D,  $R_f = 0,05$ ).

Aus 50 kg Wurzelrinde erhielten wir (nach vorherigem Entfetten) durch Methanolextraktion\*, Verteilen des eingedampften Extraktes zwischen n-Butanol und Wasser und Digerieren des eingeeengten Butanolextraktes mit Äther (um unpolare Farbstoffe herauszulösen) 660 g schwach gelb gefärbten Rohsaponins mit den Glykosiden A, B, C und D. Durch Cholesterinfällung ließen sich daraus die beiden Hauptsaponine A und B anreichern, die dann durch Verteilungschromatographie an Kieselgel mit dem Lösungsmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser 65 : 35 : 10 in dünn-schicht-chromatographisch einheitlicher Form im Verhältnis 1 : 1,4 (A : B) erhalten werden konnten. Es gelang nicht, die Verbindungen A und B zu kristallisieren.

Nach saurer Hydrolyse erhielt man aus beiden Verbindungen als Aglykon Echinocystensäure (I), die auch in Form des Methylesters und des 3-Acetyl-16-ketomethylesters identifiziert wurde. Zur Bestimmung der Zucker wurden die Substanzen A und B je mit methanolischer HCl hydrolysiert, die Methylglykoside der Zucker silyliert und gaschromatographisch quantitativ bestimmt<sup>4</sup>. Dabei ergab sich für die Substanz B ein molares Zuckerverhältnis L-Arabinose : D-Glucose von 3,06 : 1,00, während Substanz A nur drei Moll. L-Arabinose enthielt. Substanz B geht bei enzymatischer Hydrolyse mit  $\beta$ -Glucosidase (Emulsin) in Substanz A über. Substanz B ist demnach das eigentliche Musennin, während Substanz A Desgluco-musennin darstellt. Desgluco-musennin ist in geringer Menge noch mit einem Glykosid verunreinigt, das D-Glucose enthält.

Zur Klärung der Frage, an welcher funktionellen Gruppe (OH in 3 $\beta$  oder 16 $\alpha$ , COOH in 17 $\beta$ ) die Zuckerkette oder die Zuckerketten gebunden sind, wurden Musennin und Desgluco-musennin mit Diazomethan behandelt, beide bildeten dabei einen Methylester (IV). Demnach liegt die Carboxylgruppe in 17 frei vor und kommt als Verknüpfungsort nicht in Frage.

Zur weiteren Klärung wurden die Methylester der Musennine jeweils mit Acetanhydrid/Pyridin bei Raumtemperatur acetyliert. Unter diesen Bedingungen wird das 16 $\alpha$ -OH nicht acetyliert. Darauf wurde mit Chromsäure in Aceton<sup>5</sup> oxidiert, anschließend mit methanolischer HCl hydrolysiert und das Aglykon isoliert. Bei beiden Saponinen erhielt man den 16-Keto-echinocystensäure-methylester, der in allen untersuchten Eigenschaften (chromatographisches Verhalten, Schmelzpunkt, Mischprobe, IR-Spektrum) mit authentischem Material identisch war. Der Circular dichroismus dieser Substanz zeigte einen starken negativen Cotton-Effekt:  $\lambda(\Delta E) = 315 (-2,36)$ ,  $305 (-3,97)$ ,  $295,5 \mu\mu (-3,94)$ , wie es für 16-Ketone typisch ist<sup>1</sup>. Demnach ist die Zuckerkette des Musennins und des Desgluco-musennins wie üblich über die 3 $\beta$ -OH-Gruppe und nicht wie früher angenommen wurde über die 16 $\alpha$ -OH-Gruppe mit dem Aglykon verknüpft (III).

Die Methylierung und nachfolgende Hydrolyse des methylierten Musennins zeigte unter den Spaltprodukten die 2.3.4.6-Tetramethylglucose, die demnach endständig gebunden sein muß. Aus dem methylierten Desgluco-musennin wurde als endständiger Zucker die 2.3.4- oder 2.3.5-Trimethyl-arabinose erhalten. Mit der Aufklärung der Verknüpfung der Arabinosemoleküle im Musennin und im Desgluco-musennin sind wir beschäftigt, da deren Struktur gegenüber den früheren Angaben<sup>2</sup> ebenfalls einer Revision bedarf.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und der Stiftung Volkswagenwerk e. V. für ein Stipendium (für F.-J. K.).

<sup>3</sup> T. KAWASAKI u. K. MIYAHARA, Chem. pharmac. Bull. [Tokyo] **11**, 1546 [1963].

\* Herrn Dr. W. HEROLD von der Fa. H. Finzelberg's Nachf., Andernach, danken wir sehr für die Extraktion der Droge.

<sup>4</sup> G. WULFF, J. Chromatogr. **18**, 285 [1965].

<sup>5</sup> K. BOWDEN, I. HELLBRON, E. R. H. JONES u. B. C. L. WEEDON, J. chem. Soc. [London] **1946**, 39.

## Dichte einiger Mutanten des Serratiaphagen KAPPA ( $\lambda$ ) im CsCl-Dichtegradienten

F. W. PONS\*

Institut für Mikrobiologie Frankfurt am Main

(Z. Naturforsch. **21 b**, 597–598 [1966]; eingegangen am 9. März 1966)

Von Coliphagen LAMBDA ( $\lambda$ ) wurden Mutanten beschrieben, die im CsCl-Dichtegradienten eine vom Wild-

typ verschiedene Dichte haben (KELLENBERGER, ZICHICHI und WEIGLE<sup>1</sup>). Eine dieser Mutanten ( $\lambda/b 2$ ) enthält ca. 17% weniger DNS als der Wildtyp (KELLENBERGER, ZICHICHI und WEIGLE<sup>2</sup>). Sie kann *E. coli* K 12 nicht mehr stabil, sondern nur noch abortiv lysogenisieren (ZICHICHI und KELLENBERGER<sup>3</sup>). Es wurde vermutet, daß die b 2-Region des Phagen  $\lambda$  derjenigen Region des Coligenoms homolog ist, an die sich der Phage bei der Lysogenisierung anheftet, und daß ihr Ausfall die Integration des Prophagen verhindert.

\* Teil der Dissertation des Autors bei der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Frankfurt/Main 1965, unter Leitung von Prof. Dr. R. W. KAPLAN.

<sup>1</sup> G. KELLENBERGER, M. L. ZICHICHI u. J. WEIGLE, Nature [London] **187**, 161 [1960].

<sup>2</sup> G. KELLENBERGER, M. L. ZICHICHI u. J. WEIGLE, J. molecular Biol. **3**, 399 [1961].

<sup>3</sup> M. L. ZICHICHI u. G. KELLENBERGER, Virology **19**, 450 [1963].

Im Serratiaphagen  $\lambda$  werden durch UV- und Röntgenstrahlen (ELLMAUER und KAPLAN<sup>4</sup>; KAPLAN, WINKLER und WOLF-ELLMAUER<sup>5</sup>) sowie durch Behandlung mit verschiedenen Chemikalien (KAPLAN und BOSE<sup>6</sup>; KAPLAN, BECKMANN und RÜGER<sup>7</sup>) c-(clear-plaque)-Mutationen induziert. Diese c-Mutanten können *Serratia marcescens* HY ebenfalls nur noch abortiv lysogenisieren (STEIGER und KAPLAN<sup>8</sup>). Es sollte nun geprüft werden, ob diese Unfähigkeit zu lysogenisieren mit dem Verlust eines Stücks DNS gekoppelt ist; dies könnte sich in einer geringeren Dichte des Phagen im CsCl-Dichtegradienten bemerkbar machen.

Die Dichte wurde mit der präparativen Spinco-Ultrazentrifuge (L 50) bestimmt. Als Dichtereferenz lief jeweils der Phage  $\lambda$  ( $\rho = 1,508 \text{ g/cm}^3$ ) mit. Die Tabelle zeigt die Dichten von 2 verschiedenen  $\lambda+$  (Wildtyp)-Präparationen, von 6 durch verschiedene Mutagene induzierten c-Mutanten sowie von einer b- und einer t-Mutante (mit blässerem Farbhof bzw. stark trübendem Loch). Der c-Phänotyp ist bei den untersuchten  $\lambda/c$ -Mutanten in keinem Fall mit einer merklich verminderten Dichte des Phagen im CsCl-Dichtegradienten verbunden. Zwar wurden kleine Dichte-Unterschiede zwischen den Mutanten, aber ebensolche auch zwischen den beiden Wildtyp-Präparationen gefunden; sie sind jedoch bei der angewandten Bestimmungsmethode nicht signifikant. Wären Unterschiede wie zwischen  $\lambda+$  und  $\lambda/b$  2 aufgetreten, so hätte man sie mit der Methode erkennen müssen. Der Verlust der Lysogenisierfähigkeit der c-Mutanten des Phagen  $\lambda$  ist also nicht verursacht durch das Fehlen eines Stücks DNS von etwa der Größe wie bei  $\lambda/b$  2.

<sup>4</sup> H. ELLMAUER u. R. W. KAPLAN, *Naturwissenschaften* **46**, 150 [1959].

<sup>5</sup> R. W. KAPLAN, U. WINKLER u. H. WOLF-ELLMAUER, *Nature* [London] **186**, 330 [1960].

<sup>6</sup> R. W. KAPLAN u. S. K. BOSE, *Z. allgem. Mikrobiol.* **1**, 274 [1961].

Phage	Mutagen	Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]
$\lambda + 1$	— · —	1,471
$\lambda + 2$	— · —	1,469
$\lambda/c_{106}$	UV	1,469
$\lambda/c_{139}$	UV	1,470
$\lambda/c_{147}$	EMS	1,470
$\lambda/c_{148}$	N	1,472
$\lambda/c_{149}$	HA	1,469
$\lambda/c_{150}$	TEM	1,469
$\lambda/t_{140}$	N	1,472
$\lambda/b_{141}$	AP	1,471

Tb. 1. Dichte der  $\lambda$ -Mutanten. Abk.: EMS = Äthylmethansulfonat; N = Nitrit; HA = Hydroxylamin; TEM = Triäthylmelamin; AP = 2-Aminopurin.

Am Lysogenisierungsprozeß von *E. coli* K 12 durch  $\lambda$  ist mindestens ein enzymatischer Schritt beteiligt (ZICHI und KELLENBERGER). Das Gen für dieses Enzym im  $\lambda$ -Genom liegt möglicherweise in der b 2-Region. Damit könnte die Unfähigkeit der b 2-Mutante zur Lysogenisierung von *E. coli* K 12 auf dem Ausfall dieses Enzyms beruhen. Der gleiche Enzymausfall könnte jedoch auch erzielt werden durch eine Punktmutation in diesem Gen, ohne daß sich dabei der DNS-Gehalt (und damit die Dichte) des Phagen ändern müßte. Die c-Mutanten des Phagen  $\lambda$  beruhen möglicherweise auf Punktmutationen dieser Art.

Herrn Professor Dr. R. W. KAPLAN danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und seine ständige Bereitschaft zur Diskussion. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die diese Arbeit durch Mittel an Herrn Prof. Dr. R. W. KAPLAN finanziell unterstützte, sei herzlich gedankt.

<sup>7</sup> R. W. KAPLAN, H. BECKMAN u. W. RÜGER, *Nature* [London] **199**, 932 [1963].

<sup>8</sup> H. STEIGER u. R. W. KAPLAN, *Z. allgem. Mikrobiol.* **4**, 367 [1964].

## Enzymtrennungen in der vertikalen Stärkegelelektrophorese

W. POLLMANN und R. QUAST

Hygiene-Institut der Universität Marburg/Lahn

(Z. Naturforsch. **21 b**, 598—600 [1966]; eingegangen am 12. März 1966)

Bei der Mischung von Myxoviren mit Granulozyten aus Kaninchen wird ein endogener Fieberstoff induziert, der nach Säulentrennungen auf verschiedenen Typen der Sephadex- bzw. Biogel-Reihe ein Mol.-Gew. von 30 000—40 000 besitzt (SIEGERT, POLLMANN und SHU 1965<sup>1</sup>). Hierbei fällt auf, daß die Fraktion mit

der pyrogenen Wirkung stets Peroxydase- sowie Lipase/Esterase-Aktivität enthält.

Zur Klärung der Frage, inwieweit das Pyrogen ein Enzym darstellt, wurde die isolierte Fraktion in der Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES<sup>2-5</sup> mit einem nach eigenen Angaben gebauten Gerät (Abb. 1) untersucht.

Im Vordergrund ist das Haltegestell zusammen mit der Kühlkammer zu sehen. Die Spannungsquelle befindet sich mit dem Spannungskonstanthalter rechts auf dem Kühlaggretat. Die Spannung läßt sich kontinuierlich bis auf 3000 V einstellen. Als Elektrolytlösung wird ein Boratpuffer bzw. Trispuffer verwandt. Hierbei

<sup>1</sup> R. SIEGERT, W. POLLMANN u. H. L. SHU, *Nature* [London], im Druck.

<sup>2</sup> O. SMITHIES, *Biochem. J.* **61**, 629 [1955].

<sup>3</sup> O. SMITHIES, *Biochem. J.* **72**, 121 [1959].

<sup>4</sup> O. SMITHIES, *Nature* [London] **175**, 307 [1955].

<sup>5</sup> O. SMITHIES, *Nature* [London] **176**, 1265 [1955].