

1:2 glycol group in the protein. These results are in agreement with similar observations made by GERSH⁹ and McMANUS¹⁰ in some other cases. The absence of a γ -metachromasia reaction with Toluidine blue, supported by a negative Methylene blue binding below pH 4, would suggest the presence of muco or glycoprotein containing 1:2 glycol group. As stated by PEARSE⁵, the glycoproteins having hexosamine content of less than 4% stain weakly by P.A.S. (usually paler red or pink) while the mucoproteins stain deep purplish-red. Since the colour obtained by P.A.S. reaction was pink, the cuticle of *Fasciola indica* possibly does contain glycoproteins.

The results of the other histochemical tests given in the Table show absence of phenols, -S-S- bonds and unsaturated lipids.

M. B. LAL and S. C. SHRIVASTAVA

Department of Zoology, The University, Lucknow (India), September 15, 1959.

Résumé

Les essais histochimiques pour la présence des protéines, graisses, phénols et réticulation aromatique (aromatic cross linkage) et des liaisons -S-S ont été faits sur le cuticule de *Fasciola indica* Verma, 1953, trematode se trouvant dans le foie du buffle indien. Des résultats positifs pour les protéines (le groupe glycol) et négatifs pour les graisses, phénols et réticulation aromatique et les liaisons -S-S ont été obtenus.

⁹ I. GERSH, Arch. Path. 47, 99 (1949).

¹⁰ J. F. A. McMANUS and J. E. CASON, J. exp. Med. 91, 651 (1950).

Quantitative Unterschiede der Serummukoproteine bei verschiedenen Spezies

Unter Serummukoproteinen (SMP) versteht man eine Fraktion der Glykoproteine, die saure Mukopolysaccharide in polarer oder anderer leicht trennbarer Bindung an Proteine enthält. Saure Mukopolysaccharide sind Substanzen, die sich aus Hexosaminen, Uronsäuren und Schwefelsäureestern zusammensetzen¹. Die SMP sind chemisch unter anderem dadurch charakterisiert, dass sie mit Perchlorsäure nicht fällbar sind, durch Phosphor-Wolframsäure jedoch präzipitiert werden. Man findet in der Literatur² allerdings auch die Annahme, dass diese chemischen Eigenschaften vor allem den sogenannten Serummukoiden zustünden, Glykoproteinen, welche Hexosamine in relativ grosser Menge von mehr als 4% in fester Bindung an Proteine enthalten. Die genaue Konstitution dieser Körper sowie ihre Herkunft ist noch nicht geklärt.

Eine ausgeprägte Erhöhung der SMP wird bei Gewebszerfall, vor allem im Verlauf von Entzündungen sowie bei malignen Tumoren gefunden, weshalb die quantitative Bestimmung der SMP in die klinische Laboratoriumsdiagnostik eingeführt wurde. Die Serumwerte sind bei gesunden Individuen sehr konstant.

Im Verlauf unserer Untersuchungen konnten wir bemerkenswerte quantitative Unterschiede zwischen den einzelnen Spezies finden, die wir nachstehend wiedergeben. Möglicherweise lassen sich daraus Hinweise auf die physiologische Bedeutung dieser Substanzen ableiten.

Methodik und Ergebnisse. 3–5 ml Blut werden sofort nach Entnahme abzentrifugiert und 0,5 ml Serum mit 4,5 ml einer 0,85% NaCl-Lösung versetzt. Nach Hinzufügen von 2,5 ml einer 1,8 n Perchlorsäure und Mischen durch zweimaliges Wenden werden die Proben 15 min stehengelassen. Nach Präzipitation wird durch ein Filterpapier (SS-Blaubandfilter) filtriert und 5 ml des Filtrats mit 1 ml einer 5% Phosphor-Wolframsäure versetzt. Die durch die neuerliche Präzipitation aufgetretene Trübung wird nach 30 min quantitativ im Rouy-Photrometer von Leitz bei Filter A und Wasser als Vergleichswert abgelesen. Bei dieser Methode gibt eine wässrige Lösung, die 200 μ g Rinderalbumin-N in 5 ml enthält, die gleiche Trübung wie Serum, welches 252 mg% Mukoproteine enthält³.

n	Ratten SMP in mg%	Menschen SMP in mg%	Kaninchen SMP in mg%	Hühner SMP in mg%
1	61	56	27	22
2	61	51	32	27
3	51	41	27	22
4	61	41	32	22
5	51	46	41	34
6	61	46	34	36
7	71	61	36	
8	61	56	32	
9	66	66	41	
10	66	61		
11	56	66		
12	56	66		
13	66			
14	56			
—	60,2	54,8	33,5	27,1

Die angeführten Spezies unterscheiden sich untereinander hoch signifikant ($p < 0,01$) mit Ausnahme der Kaninchen und Hühner, zwischen denen ein Unterschied nur wahrscheinlich ist ($p > 0,1$).

Diskussion. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass Kaninchen und Hühner im Vergleich zu Ratten und Menschen sehr niedrige Normalwerte aufweisen. Diese Korrelation ist insofern bemerkenswert, als bekanntlich Kaninchen und Hühner sehr wenig Gewebsmastzellen, hingegen reichlich Blutbasophile aufweisen. Diese beiden Tierarten sind auch die einzigen, bei denen sich durch Fettmast eine ausgeprägte Arteriosklerose erzielen lässt. Ratten weisen zahlreiche Gewebsmastzellen, jedoch kaum Blutbasophile auf. Eine Korrelation zwischen Mastzellzahl und Arteriosklerose wurde postuliert⁴. Da die Gewebsmastzellen unter anderem die Hauptträger von Heparin bzw. heparinoiden Substanzen sein dürften, wäre es denkbar, dass ein Mangel an diesen Substanzen sich einerseits in einem niedrigen Mukoproteinspiegel anzeigt, andererseits aber auch durch ein vermindertes Fettklärungsvermögen zur Arteriosklerose bei Belastung führt.

H. BRAUNSTEINER, P. NIEDERBERGER und S. SAILER

II. Medizinische Universitätsklinik in Wien, 29. Februar 1960.

¹ R. J. WINZLER, *Glykoproteins of Plasma*, CIBA-Foundation, Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharids (London 1958), p. 246.

² R. WINZLER, *Glykoproteins of Plasma*, CIBA-Foundation, Symposium on the Chemistry and Biology of Mucopolysaccharids (London 1958), p. 251.

³ J. DE LA HUERGA, A. DUBIN, D. S. KUSHNER, H. A. DYNIEWICZ und H. POPPER, J. Lab. clin. Med. 47, 403 (1956).

⁴ P. CONSTANTINIDES, Science 117, 505 (1953).

Summary

Rabbits and chicken which easily get experimental arteriosclerosis, have very low values of serum mucoproteins. High values are found in rats, where they are significantly higher than in men.

Elaboration of Vitamin B₁₂ by *Escherichia coli*¹

Uncertainties regarding the role played by cyanocobalamin (B₁₂) and methionine in the metabolism of microorganisms induced us to study the elaboration of B₁₂-active material by *Escherichia coli* which would satisfy the B₁₂-requirement of *Euglena gracilis*, *Ochromonas malhamensis*, and *Lactobacillus leichmannii*. For this purpose we used the mutant strain, *E. coli* 113-3, its parent strain (ATCC No. 9637) and a wild type *E. coli* isolated from normal human feces.

Since the mutant *E. coli* 113-3 has a nutritional requirement alternatively satisfied by B₁₂ or methionine², the experiments reported below were designed to permit inferences as to the role of methionine in biosynthesis of B₁₂-like metabolites.

Methods: *E. coli*. For the experiments reported here we used a wild type *E. coli* ATCC 9637, the parent of 113-3, which served as prototrophic control for the mutant *E. coli* 113-3. These organisms were grown for 3 days in Burkholder's medium³; the cells were collected by centrifugation, resuspended in distilled water, and lyophilized. Supernatants from each organism were concentrated 10-fold under reduced pressure. Their B₁₂ content was assayed.

B₁₂ assays: Methods for the determination of B₁₂ using *E. gracilis* Z., *O. malhamensis*, and *L. leichmannii* as test organisms have been outlined⁴. Samples of the supernatants and lyophilized organisms were autoclaved at pH 4.5 with metabisulfite to liberate and stabilize B₁₂. This hydrolysis is insufficient to break down deoxyribosides.

Results: The concordant low values by the *Ochromonas* and *Euglena* assays (Table), show little assayable B₁₂ in the bodies and the supernatant of methionine-grown *E. coli* 113-3; the high initial values obtained with *L. leichmannii* for the culture fluids of methionine-grown *E. coli* 113-3 are almost certainly attributable to deoxyribosides. We assume that the *O. malhamensis* assay yields values closest to the true B₁₂-content⁴.

Very little B₁₂ was found in both wild type *E. coli* strains grown with neither methionine nor B₁₂. The stimulation by methionine of B₁₂-production (see supernatant values Table) in wild type *E. coli* (from feces) supports BRAY and SHEMIN's⁵ finding that most of the angular methyl groups of B₁₂ can originate from methionine. Not all *E. coli* strains show this effect, as demonstrated by the failure of methionine to stimulate B₁₂-production in *E. coli* 9736 and its mutated strain.

When B₁₂-activity of cells, as assayed with either *O. malhamensis* or *E. gracilis*, is deducted from the *L. leichmannii* results, the difference may be attributed to the presence of deoxyribosides. Supplementation for all three *E. coli* strains with B₁₂, but not with methionine, resulted in striking increases of deoxyribosides.

The low content of assayable B₁₂ in supernatants from *E. coli* 113-3 cells grown on methionine, implies that B₁₂-by-passing factors for the assay organisms are absent here. Further analysis of the B₁₂-by-passing problem may

Vitamin B₁₂-content of *Escherichia coli*.
'B₁₂' of the culture medium = cyanocobalamin; 'meth.' = methionine. B₁₂ content is expressed as μg/ml for culture supernatants and μg/mg for dried cells

A. Dried Cells (μg/mg)				
Metabolite		Assay System		
Organism	added/liter	<i>L. leichmannii</i>	<i>O. malhamensis</i>	<i>E. gracilis</i>
<i>E. coli</i> wild-type	no B ₁₂ , no meth.	16	0.6	0.65
	meth. 0.1 g	7	10	10
<i>E. coli</i> 113-3	B ₁₂ 0.1 μg	600	50	26
	meth. 0.1 g	39	3	3
<i>E. coli</i> 9736	B ₁₂ 0.1 μg	850	130	306
	no B ₁₂ , no meth.	27	3	6.6
	meth. 0.1 g	30	3.7	4.0
	B ₁₂ 0.1 μg	300	75	70

B. Supernatants (μg/ml)				
Organism	added/liter	<i>L. leichmannii</i>	<i>O. malhamensis</i>	<i>E. gracilis</i>
<i>E. coli</i> wild-type	no B ₁₂ , no meth.	104	6	1
	meth. 0.1 g	298	200	235
<i>E. coli</i> 113-3	B ₁₂ 0.1 μg	1500	463	800
	meth. 0.1 g	563	10	9
<i>E. coli</i> 9736	B ₁₂ 0.1 μg	740	175	604
	no B ₁₂ , no meth.	100	20	6
	meth. 0.1 g	60	6	10
	B ₁₂ 0.1 μg	130	2	10

require the use of natural B₁₂-free materials, prepared biologically, perhaps by microorganisms. These compounds may be of restricted distribution and could embody 1-carbon fragments such as the methyl purines and methyl pyrimidines recently described by LITTLEFIELD and DUNN⁶. The lack of B₁₂ activity in yeast and higher plants originally signalled that B₁₂ has a restricted distribution compared with other B vitamins; the present results suggest that B₁₂ by-passing compounds are even more restricted in distribution.

H. BAKER, O. FRANK, I. PASHER, H. SOBOTKA,
H. A. NATHAN, S. H. HUTNER, and S. AARONSON

Department of Chemistry, Mount Sinai Hospital,
New York and Haskins Laboratories, New York, December
24, 1959.

Résumé

Les auteurs ont constaté l'absence de la vitamine B₁₂ dans le corps 1° de *E. coli* 113-3, 2° de son parent prototrophique et 3° dans la souche sauvage. Le titre de B₁₂ dans le milieu de culture s'est trouvé fortement augmenté par la méthionine, dans le cas de la souche sauvage uniquement. En ajoutant de la cyanocobalamine on a obtenu dans les trois cas une augmentation de désoxyribosides.

¹ This work was supported by Grants A-1800 and A-1231 from the U. S. Public Health Service and Grants-in-Aid from the Loomis Foundation, the American Cancer Society, and the Nat. Ass. for Mental Health.
² J. E. FORD and S. H. HUTNER, *Vitamins and Hormones*, vol. 13 (Academic Press Inc., New York 1955), p. 101.
³ P. R. BURKHOLDER, *Science* 114, 459 (1951).
⁴ H. BAKER, H. SOBOTKA, I. PASHER, and S. H. HUTNER, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. 91, 636 (1956).
⁵ R. BRAY and D. SHEMIN, *Biochim. biophys. Acta* 30, 647 (1958).
⁶ J. W. LITTLEFIELD and D. B. DUNN, *Biochem. J.* 70, 642 (1958).