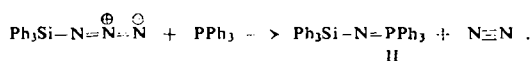


werden. Dagegen zerfällt I in Gegenwart von Triphenylphosphin bereits bei 50 °C langsam nach:



Die Stickstoffentwicklung folgt in ihrer Kinetik nicht der ersten Ordnung. II (Triphenylsilyl-triphenylphosphinimin), das erste Beispiel eines N-silylierten Phosphinimins, fällt in gut kristallisierten, farblosen Rhomben an (Fp -213

bis 215 °C, unlöslich in Petroläther, Benzol, Äther; löslich in Tetrahydrofuran).

Eingegangen am 2. Mai 1962 [Z 268]

[1] Vgl. L. Birkofer, A. Ritter u. P. Richter, Angew. Chem. 74, 293 (1962).

[2] In der angegebenen Weise siliciumorganische Azide mit mehr als einem Azidrest darzustellen, war nicht möglich. Es ist uns jedoch vor kurzem auf andere Weise gelungen, Diphenyldiazidosilan, $\text{Ph}_2\text{Si}(\text{N}_3)_2$, in reiner Form darzustellen.

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Gesellschaft für Physiologische Chemie

3. bis 5. Mai 1962 in Mosbach

Das diesjährige 13. Mosbacher Colloquium stand unter dem Thema „Induktion und Morphogenese“. E. Klenck, Köln, erinnerte einleitend daran, daß dieses Grenzgebiet zwischen Biologie und Biochemie bisher vor allem unter morphologischem Aspekt gesehen wurde, daß die Entwicklung aber neuerdings durch eine mehr chemische Betrachtung bestimmt ist.

Dies zeigte bereits der erste Vortrag: F. Lehmann, Bern, sprach über „Zellbiologische und biochemische Probleme der Morphogenese“. Erste Strukturierungs- und Sonderungsprozesse vollziehen sich (bei Spiraliern und Ascidien) schon in der ungeteilten Eizelle. Bei anderen Tiergruppen (Wirbeltiere, Echinodermata) beginnt die Morphogenese erst nach der Teilung der Eizelle. Zwischen morphogenetischer und biochemischer Sonderung gibt es bis heute aber nur wenige Beziehungen. Gustafson, Lénique und Hörstadius fanden, daß bei jungen Seeigelkeimen je nach Stadium der vegetativen Entwicklung die Zone eines bestimmten Redoxpotentials (durch Anfärbung mit einem Redoxfarbstoff nachgewiesen) vom vegetativen Pol verschieden weit entfernt ist. Hier scheint sich also ein Bereich ausgezeichneter biochemischer Aktivität im gleichen Sinne zu verschieben wie ein Bereich besonderer morphologischer Aktivität.

Auch regenerierende Zellverbände können Aufschluß über einen Zusammenhang zwischen der Bildung morphologischer und biochemischer Muster geben. Es wurden Stoffe gefunden, welche die Regeneration des Schwanzes der *Xenopus*-Larve hemmen, ohne die Vitalität der Larve wesentlich zu beeinträchtigen. Solche Stoffe (Morphostatika) sind u. a. Colchicin, β -Mercaptoäthanol, 1-Amino-3-methyl-butyl-äthylketon (I), 2-Methyl-3-oxo-6-äthoxy-chinoxalin (II), 2,6-Diäthylenimino-3,5-diäthoxy-p-benzochinon (III) sowie (IV). Auch Liponsäure (V) und Nicotinsäureamid können morphostatisch wirken.

Bei normaler Regeneration der Schwanzspitze nimmt die Kathepsin-Aktivität zu und fällt später wieder auf das normale Maß ab. Kathepsine sind proteinspaltende Enzyme, und die Steigerung ihrer Aktivität während der Regeneration

dürfte mit der Bereitstellung von Protein-Bruchstücken in Zusammenhang stehen. Das Aminoketon (I) steigert nun die Kathepsin-Aktivität ganz erheblich, was wohl zu einer so weitgehenden Verminderung der Schwanzproteine führt, daß die Regeneration des Schwanzes unterbleibt. Dagegen hemmt die Kombination Chinoxalin (II) (1:250000) + Colchicin (1:10⁶) die Regeneration zu 40%, ohne die Kathepsin-Aktivität zu ändern. Offenbar ist für die Morphogenese also ein System von Enzymen verantwortlich, von dem man mit der Bestimmung der Kathepsin-Aktivität nur einen Teil erfaßt. Es ist anzunehmen, daß verschiedene Morphostatika verschiedene Teile dieses Enzymsystems treffen.

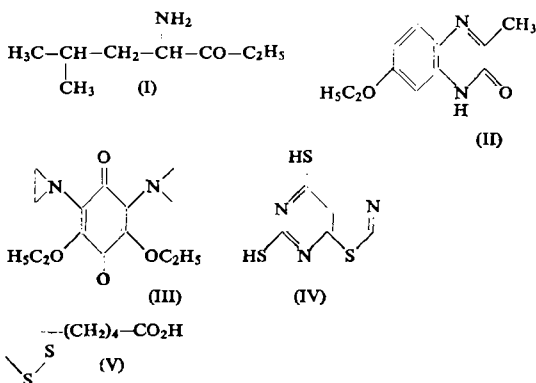
J. Brachet, Brüssel, behandelte den „Einfluß freier SH-Gruppen auf die Morphogenese“. In geringer Konzentration (10⁻³ bis 3·10⁻³ M) verlangsamt β -Mercaptoäthanol die Entwicklung von *Xenopus*-Embryonen: sie bekommen zu kleine Köpfe und zu kurze Schwänze. Die Melanin-Bildung ist vollständig gehemmt. Dithiodiglykol, das Oxydationsprodukt des Mercaptoäthans hat die entgegengesetzten Wirkungen (die Pigmentbildung beeinflußt es nicht), so daß anzunehmen ist, die genannten Vorgänge hängen von der Lage des Sulfhydryl/Disulfid-Gleichgewichtes in den Zellen des Embryo ab.

In höherer Konzentration (3·10⁻³ bis 10⁻² M) hemmt β -Mercaptoäthanol auch die Entwicklung des Nervensystems: die Höhle, in der sich die Neuralplatte befindet, schließt sich nicht. Dieser Effekt läßt sich mit Adenosintriphosphat (0,1 mg/ml) rückgängig machen, doch hat ATP auf die Hemmung der Schwanzentwicklung und der Melaninbildung keinen Einfluß.

Bei der pilzförmig gestalteten Alge *Acetabularia mediterranea* verhindert β -Mercaptoäthanol (3·10⁻³ bis 5·10⁻³ M) die Bildung des Hutes. Dagegen bildet sich der sterile Stamm, aus dem normalerweise der Hut wachsen würde, ungehemmt. Auch hier hat Dithiodiglykol (10⁻⁴ M) die entgegengesetzte Wirkung: es fördert die Hutbildung und es hemmt die Bildung des Stammes. Mit SH-Reagentien (p-Chlormercuribenzoat, 10⁻⁷ M, und p-Jodosobenzoat, 10⁻⁵ M) ließ sich die Folgerung bestätigen, daß freie SH-Gruppen der Hutbildung abträglich sind.

α -Liponsäure hemmt bei Amphibien-Embryonen in geringer Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$) nur das Wachstum des Schwanzes (um ca. 30%). In höherer Konzentration (15–30 $\mu\text{g/ml}$) zeigt sie die gleichen Wirkungen wie Mercaptoäthanol in hoher Konzentration, beeinflußt aber die Pigmentbildung nicht. Auch hier läßt sich die Entwicklung des Nervensystems mit ATP normalisieren. Auf das Schwanzwachstum hat ATP keinen Einfluß. Dagegen machen Oxalacetat oder Succinat in Embryos, die mit Liponsäure behandelt wurden, die Unterentwicklung des Schwanzes rückgängig. Sie tun das nicht bei Embryonen, die mit Mercaptoäthanol behandelt wurden. Der Bildung des Nervensystems und der Differenzierung des Schwanzgewebes liegen also verschiedene biochemische Mechanismen zugrunde.

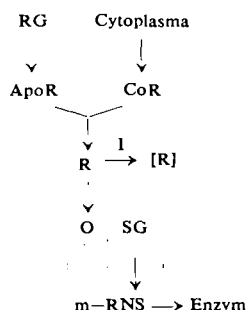
In Versuchen mit ³⁵S-Mercaptoäthanol wurde gefunden, daß 25% der in die Zellen gelangenden Radioaktivität an Protein



gebunden werden, vermutlich unter Bildung gemischter Disulfide. Es scheint also, daß die Proteine Angriffspunkt des Mercaptoäthanol sind.

„Regelung der Enzymsynthese in Mikroorganismen“ war das Thema des Vortrags von *H. O. Halvorson*, Madison, Wisc., USA. An Zellen von *Escherichia coli* sind drei Möglichkeiten zur Regelung der enzymatischen Aktivität nachgewiesen worden:

- Ein Enzym wird durch das Endprodukt einer Synthesekette gehemmt. Beispiel: *E. coli* enthält zwei β -Aspartokinasen, von denen eine durch Threonin, die andere durch Lysin gehemmt wird.
- Die Struktur eines Enzyms wird so verändert, daß seine Spezifität wechselt. Beispiel: die hormon-beeinflußte Umwandlung von Glutamat-Dehydrogenase in Alanin-Dehydrogenase.
- Hemmung der Enzymsynthese durch einen Repressor: Ein Regulatorgen (RG) lenkt die Synthese eines Apo-Repressors (ApoR, vermutlich Ribonucleinsäure). Dieser kombiniert sich mit einem cytoplasmatischen Co-Repressor (CoR) zum vollständigen Repressor, der das Operatorgen (O) reversibel blockiert. Infolge dieser Blockade können die dem Operatorgen benachbarten Strukturgene (SG) nicht die Synthese von messenger-RNS veranlassen, die zur Protein-Synthese notwendig ist. Induktoren (I) inaktivieren den Repressor, z. B. indem sie mit dem Co-Repressor einen Komplex bilden [1].



Konstitutive Enzymsynthese ist in diesem Bild das Ergebnis entweder einer Mutation des Regulatorgens (Synthese eines unwirksamen Apo-Repressors) oder des Operatorgens (keine Paarung des Gens mit dem Repressor).

Die unter c) genannte Hypothese ist bisher nur an Bakterien geprüft worden. An Hefezellen wurde nun gezeigt, daß andere Organismen für dasselbe Enzym mehrere identische und voneinander unabhängige Strukturgene besitzen können. Zu jedem Strukturgen gehört dann vermutlich ein eigenes Operatorgen. Ein Strukturgen kann durch mehrere Regulatorgene kontrolliert werden.

Darüber hinaus gibt es bei der Hefe offenbar noch eine vierte Möglichkeit zur Regelung der enzymatischen Aktivität: bei ihr wird die Ablösung des fertig synthetisierten Enzyms vom Ribosom beeinflusst.

Über „cytologische Aspekte der Informationsübertragung von den Chromosomen zum Cytoplasma“ berichtete *W. Beermann*, Tübingen. In den Zellkernen von Dipteren-Larven findet man Riesenchromosomen, die sich durch Zusammenlagerung von vielen tausend Einzelchromosomen bilden. Diese Riesenchromosomen weisen ein Scheibenmuster (Chromomerenmuster) auf, das durch die Aufeinanderfolge von DNS-reichen und DNS-armen Schichten entsteht. An einigen Stellen sind die Riesenchromosome bis zum doppelten Durchmesser aufgebläht (puffs). Die vorher kompakten Querscheiben werden an diesen Stellen locker, DNS läßt sich häufig nur noch autoradiographisch und nicht mehr mit der Feulgenfärbung nachweisen. Die Färbung mit Lichtgrün ist positiv, d. h. die puffs enthalten Protein.

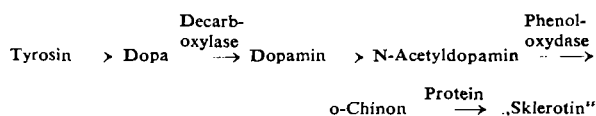
Während das Chromomerenmuster für verschiedene Organe weitgehend gleich ist, wechselt das puff-Muster spezifisch von

[1] *F. Jacob u. J. Monod*, Cold Spring Harbor Sympos. quantitativ. Biol. 26, 193 (1962).

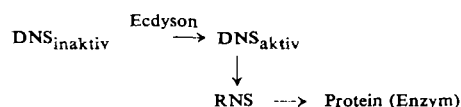
Organ zu Organ und ändert sich auch während der Metamorphose. Mit radioaktiv markiertem Uridin ließ sich zeigen, daß in den puffs RNS synthetisiert wird. Möglicherweise handelt es sich dabei um die messenger-RNS, die in einer späteren Phase als Matrize für die Protein-Synthese dient. Es scheint, daß die Größe eines puffs proportional zur Menge der in ihm synthetisierten RNS ist. Offenbar ist das von Organ zu Organ und von Metamorphosestadium zu Metamorphosestadium wechselnde puff-Muster als Ausdruck unterschiedlicher Genaktivierung zu verstehen, die zur Synthese der für ein Organ oder Metamorphosestadium typischen Enzyme führt. Für einen puff im Chromosom der Speicheldrüse von *Chironomus* konnte dieser Zusammenhang genetisch bewiesen werden.

Die Entstehung und Rückbildung des puffs läßt sich mit mehreren Mitteln hervorrufen (Inkubationsmedium, Temperaturänderung, Transplantation). Besonders interessant ist die Beobachtung, daß die Injektion des Häutungshormons Ecdyson in *Chironomus*-Larven die Bildung zweier puffs induziert. Erst einige Stunden nach der puff-Bildung werden erste Anzeichen der Metamorphose sichtbar.

Eine der Wirkungen, die das Häutungshormon Ecdyson hervorruft, ist die Sklerotisierung (Verhärtung) der Haut bei der Umwandlung der Larve in die Puppe. Dieser Prozeß ist nach *P. Karlson*, München, einer Chinongerbung vergleichbar: ein aus Tyrosin gebildetes o-Chinon vernetzt die Proteine der Haut durch Reaktion mit freien Aminogruppen. Ecdyson stimmt den Tyrosin-Stoffwechsel der Larve durch Bildung einer Decarboxylase und einer Phenoloxylase so um, daß über Dihydroxyphenylalanin (Dopa) und Dopamin schließlich ein o-Chinon entsteht:



Die Phenoloxylase konnte kristallisiert werden. Sie bildet sich unter dem Einfluß des Ecdysons aus einer in der Larve enthaltenen inaktiven Vorstufe. Diese Aktivierung scheint in einer begrenzten Proteolyse zu bestehen, und es ließ sich zeigen, daß Ecdyson die Bildung des dafür notwendigen Enzyms bewirkt. Zusammen mit der Beobachtung, daß sich unter dem Einfluß von Ecdyson an den Chromosomen puffs bilden (vgl. den Vortrag von *Beermann*), ergibt sich für die Wirkung des Ecdysons bei der Sklerotisierung das Schema:



H. Holtzer, Philadelphia, USA, fand, daß das Rückenmark des Hühnerembryos undifferenzierte Mesenchymzellen (Somite) des gleichen Embryos dazu veranlaßt, sich zu Knorpelzellen zu entwickeln. Dies gilt sowohl in vivo (Verpflanzung von Rückenmark ins Mesenchymgewebe) als auch in vitro, d. h. in einer Gewebekultur. Trennt man in vitro Mesenchymgewebe und Rückenmark durch ein dünnes Filter (Porengröße ca. 40 μ), so gelingt die Induktion gleichfalls. Zwischen dem Beginn der gemeinsamen Inkubation beider Gewebe und dem ersten Auftreten von Knorpelzellen vergehen drei Tage. Vermutlich wird diese Zeit benötigt, um die zur Knorpelbildung nötigen Enzyme und Cofaktoren bereitzustellen.

F. Zilliken, Nijmegen, Holland, gelang es, aus dem Rückenmark von 4 Tage alten Hühnerembryonen eine Substanz zu isolieren, die Somite aus Hühnerembryo zur Bildung von Knorpelzellen veranlaßt. Das Rückenmark wird mit 0,25 M HClO_4 bei 0 °C homogenisiert, neutralisiert und zentrifugiert. Den Überstand adsorbiert man an Kohle und eluiert mit 10-proz. Pyridin. Die weitere Reinigung gelingt an Dowex I-X 8 durch Gradientenelution mit Ameisensäure und Ammoniumformiat. Die so gereinigte Substanz ist bei pH = 5,5 bis 6 am stabilsten. Sie findet sich weder in Hefe noch in Ge-

weben, die nicht die Bildung von Knorpelzellen veranlassen können. Die Substanz besteht aus Guanosinmonophosphat (GMP), aus Glucose, Galaktose, Mannose, Ribose und einem noch nicht identifizierten, chromatographisch rasch wandernden Zucker (Idose?). Außerdem enthält sie zwei Uronsäuren, Glucosamin, N-Acetylneuraminsäure und einen aus 15 Aminosäurearten bestehenden Peptidteil (Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Hydroxy-pro, Gly, Ala, Val, Meth., Ileu, Leu, Tyr, Phe). Über die gegenseitige Verknüpfung dieser Bausteine gibt es bisher nur Hypothesen.

Stoffe, die in Molch-Embryonen Vorderköpfe (Vorderhirn, Zwischenhirn und Augen), Hinterköpfe (Hinterhirn, Gehör-

blasen und Kopfmuskulatur) oder Rumpf und Schwanz induzieren können, gewann *H. Tiedemann*, Heiligenberg, aus 9 Tage alten Hühnerembryonen. Der Rumpf und Schwanz induzierende „mesodermale Faktor“ ist ein Protein vom Molekulargewicht 50000 bis 100000. Vorderköpfe werden durch den „neutralen Faktor“ induziert, bei dem es sich um ein Nucleoprotein handelt. Beide Faktoren werden durch Trypsin oder Pepsin inaktiviert. Gegenüber Thioglykolsäure, Perameisensäure oder Erhöhung der Temperatur verhalten sich die beiden Faktoren verschieden. Der mesodermale Faktor wird in allen Fällen rasch inaktiviert. Zur Induktion von Hinterköpfen ist offenbar eine Kombination beider Faktoren notwendig. [VB 583]

Anwendung von paramagnetischer Resonanzspektroskopie auf das Studium oxydativer Enzyme

H. Beinert, Madison/Wisc. (USA)

Max-Planck-Institut Heidelberg, am 26. März 1962

Vortr. gab zunächst eine Einführung in die Grundlagen der Elektronen-Resonanz-(EPR)-Spektroskopie und wies auf Möglichkeiten und Schwierigkeiten der Anwendung auf biologische Probleme hin. Die Anwendung ist hauptsächlich beschränkt durch die relativ geringe Empfindlichkeit der Methode in Gegenwart von Wasser, das die zu messende Mikrowellenenergie stark absorbiert. Vortr. erläuterte dann an eigenen neueren Arbeiten, wo in der Enzymologie die Elektronen-Resonanz-Spektroskopie einzigartige Informationen liefert, wie sie heute auf keine andere Weise erhalten werden können. Das erste Beispiel war die Entdeckung einer neuen Gruppe von Oxydations-Reduktionskatalysatoren in Rinderherzmitochondrien, die bis jetzt nur durch ihre charakteristischen EPR-Signale erkennbar sind [1]. Die typischen asymmetrischen Signale ($g_{II} = 2,00$, $g_{\perp} = 1,94$) sind schon in Stücken von frisch gefrorenem Herzmuskel und von Leber sichtbar und werden dann in isolierten Mitochondrien und in submitochondrialen Partikeln (erhalten durch Beschallung) wiedergefunden. Die Signale erscheinen, wenn die Redox-Katalysatoren im reduzierten Zustand sind und zeigen Unterschiede in ihrer Struktur je nach dem Substrat, das Reduktion verursacht. Wenn dann die für ein spezielles Substrat (Succinat, DPNH) charakteristische Dehydrogenase isoliert wird, wird das für Reduktion mit diesem Substrat spezifische Signal in dem betreffenden Enzym wiedergefunden. Signale desselben Typs sind auch in Bakterien, in Milch-Xanthinoxidase, Leber-Aldehydoxydase und Orotsäure-Dehydrogenase gefunden worden. Vortr. nimmt an, daß es sich bei den neuen Katalysatoren um eiweißgebundene Eisenkomplexe handelt, die kein Porphyrin enthalten. Chemische und spektroskopische Analyse schließen andere Metalle aus und ein direkter Hinweis, daß es sich um Eisen handelt, wurde in Isotopenexperimenten mit ^{57}Fe erhalten. Vortr. beschrieb kinetische Studien in denen der Redox-Status der Cytochromkomponenten durch optische Reflexionsspektroskopie an gefrorenen Proben ermittelt wurde, während die neuen Katalysatoren durch EPR-Spektroskopie an den Proben im gleichen Zustand verfolgt wurden. In diesen Experimenten reagierten die neuen Katalysatoren mit derselben Geschwindigkeit wie die Cytochrome. Außerdem konnte auch die Reduktion des Kupfers der Cytochromoxydase unter diesen Bedingungen beobachtet werden. Die EPR-Spektroskopie erlaubt es, den Zustand des Kupfers bei der Isolierung dieses Enzyms zu verfolgen. Eine Abweichung vom nativen Zustand im Ligandenbereich des Kupfers läßt sich leicht erkennen. Die quantitative Auswertung der Spektren deutet darauf hin, daß in der Cytochromoxydase ein Paar von benachbarten Kupferatomen vorliegt, dessen Reaktion mit O_2 eine plausible Hypothese darstellt.

[1] *H. Beinert u. W. Lee*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 5, 40 (1961).

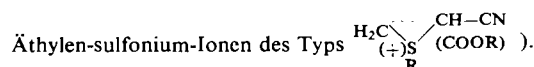
Schließlich bestätigte der Vortr. am Beispiel der Orotsäuredehydrogenase – wiederum mit kombinierter optischer und EPR-Spektroskopie – seine frühere Vermutung, daß Flavoprotein-semichinone Absorptionsbanden um 600 m μ besitzen und daß Flavoproteine von ihren Substraten nicht unter allen Umständen zur Leukostufe reduziert werden, sondern zur Semichinonstufe, so daß also bei der Katalyse hauptsächlich ein Wechsel zwischen oxydiert und semichinoid zu erwarten ist. [VB 579]

Nachbargruppen- und Substituenten-Effekte bei organischen Schwefelverbindungen

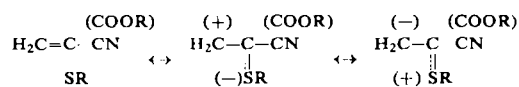
K. D. Gundermann, Münster/Westf.

GDCh-Ortsverband Krefeld am 5. April 1962

Die experimentellen Befunde an α -Chlor- β -alkylmercapto-propionsäure- und Alkylmercapto-acrylsäure-Derivaten [1] wurden zunächst unter dem Gesichtspunkt der Nachbargruppeneffekte der Thioäthergruppe behandelt. (Bildung von



Deren intermediäres Auftreten erklärt z. B. auch, daß bei der Addition von Alkyl-sulfonylchloriden (RSCl) an Acrylsäure-Derivate [2] nicht nur die nach den Polaritäten der Reaktionspartner zu erwartenden α -Alkylmercapto- β -chlor-, sondern auch die isomeren α -Chlor- β -alkylmercapto-propionsäure-Derivate entstehen. Andererseits ließen sich an α -Dialkylamino-acrylsäure-Derivate, die analog den entspr. Thioäther-Derivaten reagieren sollten, weder Mercaptane oder Malonester noch Diazomethan präparativ brauchbar addieren. Unter Berücksichtigung der Befähigung des S-Atoms zur Okteterweiterung [3] wurden daher folgende mesomeren Grenzstrukturen diskutiert, die insbesondere einen polaren Mechanismus für die „Kopf-Kopf“-Dimerisierungen ermöglichen:



Versuche zur Darstellung von α -Nitro-acrylsäure-estern (zum Studium der Wirkung eines besonders stark elektronenziehenden Substituenten in der α -Stellung des Acrylsäure-Bindungssystems) aus α -Brom- β -methoxy-propionsäure-ester nach dem Verf. von *N. Kornblum* [4] führten zu α, α' -Dinitro- α -methoxymethyl-glutarsäure-ester, der durch Michael-Addition von α -Nitro- β -methoxy-propionsäure-ester an während der Reaktion gebildeten α -Nitro-acrylester entsteht und dessen Struktur durch energische Reduktion zu α -Methyl- α, α' -diaminoglutarsäure bewiesen wurde. [VB 580]

[1] Vgl. Angew. Chem. 74, 355 (1962).

[2] Chem. Ber. 87, 325 (1954).

[3] *G. Cilento*, Chem. Reviews 60, 147 (1960).

[4] J. Amer. chem. Soc. 79, 2507 (1957).