

als der des abgeschirmten. Im Dampfstrahl scheinen also elektrische Ladungen transportiert zu werden, die den isolierten Film aufladen, so daß sich ein zusammenhängender, lückenloser Film schwerer auszubilden vermag als bei dem elektrisch abgeschirmten Träger.

Um die Haftkräfte zwischen Film und Träger zu ermitteln, wurden Filme verschiedener Metalle auf (100)-Flächen von Alkalihalogenid-Kristallen aufgebracht. Die Haftkräfte erwiesen sich als klein und konnten auf *van der Waalsche* Kräfte zurückgeführt werden.

Insgesamt brachte die Konferenz einen umfassenden Überblick über eine Anzahl z. Zt. interessanter Probleme auf dem Gebiet der Adsorption an Metallfilmen. Allerdings konnten nur Grundlagen besprochen werden.

[VB 716]

Untersuchungen über das aktive Zentrum der Ribonuclease

E. A. Barnard, London

Basler Chemische Gesellschaft, am 25. April 1963

Der Histidin-Rest Nr. 119 in Pankreas-Ribonuclease ist praktisch die einzige Gruppe im aktiven Zentrum eines Enzyms, die sich bisher mit einiger Sicherheit identifizieren und lokalisieren ließ. Der Beweis ist schwierig, daß eine Gruppe direkt an einem aktiven Zentrum beteiligt ist und nicht nur deshalb wichtig ist, weil sie beispielsweise eine bestimmte Proteinstruktur aufrechterhält. Für das Histidin der Ribonuclease ergibt sich die direkte Beteiligung aus folgenden Beobachtungen:

Die Reaktion des Enzyms mit Bromessigsäure führt zu spezifischer und vollständiger Inaktivierung, wenn eine Carboxymethylgruppe in das Enzym eintritt [1]. Diese Gruppe befindet sich stets am Histidin-Rest Nr. 119 [2].

Vortr. hat das Derivat durch Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt. Es ist nativer Ribonuclease in seinen physikalischen Eigenschaften (z. B. Sedimentationskonstante bei 20°C, UV-Spektrum) sehr ähnlich.

Bromessigsäure reagiert mit dem Enzym viel schneller als mit freiem Histidin. Die Reaktion mit dem Enzym zeigt eine anomale pH-Abhängigkeit (optimales pH = 5,6).

Die Reaktion mit Jodessigsäure verläuft ähnlich [3]. Mit Jodacetamid reagiert das Enzym nicht [4]. Die Reaktion gelingt nur beim nativen Enzym. Oxydierte oder reduzierte Ribonuclease reagieren nicht. In Harnstoff-Lösung kann die Reaktion in begrenztem Umfang eintreten [5], jedoch nicht bei allen Präparaten [4], eine Beobachtung, die weiterer Untersuchungen bedarf.

Cytidin-2'- und -3'-phosphat sind kräftige kompetitive Inhibitoren des Enzyms. Sie schützen die Ribonuclease auch weitgehend gegen den Angriff der Bromessigsäure. Auch die Photooxydation des Enzyms zeigt, daß Histidin für die Wirkung des Enzyms von Bedeutung ist [6].

Die pH-Abhängigkeit der Kinetik der Ribonuclease-Reaktion [7, 8] und der Reaktion des Enzyms mit Halogenessigsäuren spricht dafür, daß zwei Histidin-Reste beteiligt sind. Daß die

- [1] E. A. Barnard u. W. D. Stein, *J. molec. Biol.* 1, 339 (1959).
- [2] W. D. Stein u. E. A. Barnard, *J. molec. Biol.* 1, 350 (1959).
- [3] H. G. Gundlach, W. H. Stein u. S. Moore, *J. biol. Chemistry* 234, 1754 (1959).
- [4] G. R. Stark, W. H. Stein u. S. Moore, *J. biol. Chemistry* 236, 436 (1961).
- [5] E. A. Barnard u. W. D. Stein, *Biochim. biophysica Acta* 37, 371 (1960).
- [6] L. Weil u. T. S. Seibles, *Arch. Biochem. Biophysics* 54, 368 (1955).
- [7] D. G. Herries, A. P. Mathias u. B. R. Rabin, *Biochem. J.* 85, 127 (1962).
- [8] H. Witzel u. E. A. Barnard, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 7, 289, 295 (1962).

zweite basische Gruppe nicht eine NH₂-Gruppe mit niedrigem pK-Wert ist, ergibt sich aus der Umsetzung von guanidinierter [9] Ribonuclease mit Bromessigsäure. Sie zeigt die gleiche pH-Abhängigkeit wie die Reaktion mit nativer Ribonuclease. Kürzlich wurde die Beteiligung des Histidin-Restes Nr. 12 an den Reaktionen des Enzyms direkt nachgewiesen [10].

Ribonuclease mit einer Carboxymethyl-Gruppe am Histidin-Rest Nr. 119 vermag fast kein Cytidin-2'-phosphat mehr zu binden. Das ließ sich durch Messungen in der Ultrazentrifuge zeigen [11] und spricht dafür, daß der Histidin-Rest Nr. 119 an der Stelle des Enzyms steht, die das Substrat bindet. Die Kinetik jedes der beiden Schritte bei der Reaktion zwischen Enzym und Substrat ist für mehrere Substrate gemessen worden. Die Ergebnisse stützen die Annahme, daß zwei Histidin-Reste des Enzyms an der Substrat-Bindung beteiligt sind.

Bromessigsäure ist demnach das einfachste substratähnliche Reagens. Es wird wie die Gruppe $-P-O^-$ der Substrate gebunden und alkyliert eine nucleophile Komponente an der Bindungsstelle des Enzyms. Im Gegensatz zur Ribonuclease wird Lysozym, das Reaktionen mit ungeladenen Substraten katalysiert (wahrscheinlich gleichfalls unter Beteiligung eines Histidin-Restes [12]), durch Bromessigsäure (0,18 M, pH = 4 bis 8,5) nicht inaktiviert. Das aktive Zentrum der Ribonuclease muß weitere Gruppen enthalten. Neuere Untersuchungen [13] zeigten, daß sich ein Lysin-Rest spezifisch acylieren läßt, und ermöglichen die Klärung seiner Beziehungen zum Imidazol-System des Histidins.

[VB 713]

Blitzlichtphotolyse und Fluoreszenz des Ammoniaks

W. Groth, Bonn

GDCh-Ortsverband Mainz-Wiesbaden, am 2. Mai 1963

Nach Arbeiten von Bayes, Becker, Stuhl und Welge wurde eine neue Blitzlichtanordnung für das Vakuum-Ultraviolet bis 1150 Å beschrieben, bei der der Reaktions- vom Entladungsraum durch eine Reihe von LiF-Fenstern getrennt ist und die Gesamtentladungsenergie von 1870 Wsec auf 12 parallele Funkenstrecken verteilt wird, die synchron gezündet werden. Das zeitliche Auflösungsvermögen kann dadurch auf <2 μ sec gesteigert werden. (Eine ähnliche Blitzlichtanordnung für das Quarz-Ultraviolet mit fünf parallelen Funkenstrecken hat bei 1440 Wsec Gesamtenergie eine zeitliche Auflösung von 3,7 μ sec).

Bei der Blitzlichtphotolyse des Ammoniaks wurde außer dem NH₂-Radikal bei Wellenlängen <1550 Å auch das NH-Radical nachgewiesen ((0,0)- und (1,1)-Banden des $^3\Pi \rightarrow ^3\Sigma^-$ -Übergangs), und die Abhängigkeit der NH-Konzentration von der zeitlichen Verzögerung des Analysenblitzes, vom NH₃-Druck und von Zusatzgasen untersucht. Das NH-Radikal entsteht mit Sicherheit als Primärprodukt der Photolyse nach $\text{NH}_3 + h\nu \rightarrow \text{NH} + \text{H}_2$ bzw. $\text{NH} + 2\text{H}$.

Bei Fluoreszenzuntersuchungen mit den Resonanzwellenlängen des Kryptons (1165 Å, 1235 Å) und des Xenons (1295 Å, 1740 Å) wird nur die (0,0)-Bande des $^1\Pi \rightarrow ^1\Delta$ -Übergangs gefunden, nicht aber der von Neuimin und Terenin vermutete $^3\Pi \rightarrow ^3\Sigma^-$ -Übergang. Für die bei der Blitzlichtphotolyse nachgewiesenen NH-Radikale im $^3\Sigma^-$ -Grundzustand gibt es zwei Entstehungsmöglichkeiten: 1. direkter Übergang in diesen Zustand; 2. Übergang in einen Singulett-

- [9] W. A. Klee u. F. M. Richard, *J. biol. Chemistry* 229, 489 (1957).
- [10] A. M. Crestfield, *Fed. Proc.* 22, 419 (1963).
- [11] E. A. Barnard u. A. Ramel, *Nature (London)* 195, 243 (1962).
- [12] H. Fraenkel-Conrat, *Arch. Biochem. Biophysics* 27, 109 (1950).
- [13] E. A. Barnard u. S. Shall, unveröffentl.