

Proteinstrukturen

Ein faszinierendes Kapitel der Chemie behandelten die Vorträge über Proteinstrukturen. Man muß sich vor Augen halten, daß z. B. im Myoglobin die Lage von 1200 Atomen bestimmt werden muß, gegenüber 30 bis 40 in sonstigen organischen Verbindungen. Trotzdem wurde das Problem gelöst. Es genügt hier nicht mehr, nur wie üblich die Absolutwerte der Struktur faktoren zu messen, sondern man muß durch multiplen isomorphen Ersatz die Phasen ebenfalls direkt bestimmen. Das bedeutet, daß etwa fünfmal je 20000 Struktur faktoren zu messen sind. Die Proteinstrukturanalyse wirft auch ganz neue Rechenprobleme auf. Die üblichen kristallographischen Rechenprogramme sind für Proteinstrukturen aus Speicherplatz- und Rechengeschwindigkeitsgründen nicht brauchbar; es mußten also neue Programme entwickelt werden.

Über die Lösung oder Versuche zur Lösung aller dieser Probleme berichteten insbesondere *H. C. Watson, J. C. Kendrew, C. L. Coulter, C. I. Brändén, D. C. Phillips* und *C. F. Blake* (Cambridge, England) in ihrem Vortrag über die 1,4-Å-Auflösung des Myoglobins. Die meisten Aminosäuren sind in der dreidimensionalen Fouriersynthese eindeutig identifizierbar. Viele neue Einzelheiten wurden gegenüber der 2-Å-Auflösung sichtbar, z. B. Hydratwasser, das an polare Aminosäuren gebunden ist, oder die nicht koplanare Lage des Eisens und der Hämingruppe.

H. Muirhead und *M. F. Perutz* (Cambridge, England) berechneten eine dreidimensionale Fouriersynthese der reduzierten Form des Menschen-Hämoglobins bei 6 Å Auflösung. Zur Phasenbestimmung wurden drei isomorphe Schweratom-Verbindungen vermessen. Die Struktur dieses Hämoglobins

und die des Pferde-Hämoglobins sind zwar ähnlich, aber die relative Lage der beiden β -Ketten ist im Menschen-Hämoglobin etwas anders, auch gibt es Unterschiede in der Struktur der β -Kette.

Über Versuche zur Strukturanalyse des β -Lactoglobulins berichteten *D. W. Green, R. Aschaffenburg, J. C. Coppala, R. M. Simmons* und *P. J. Dunnill* (London, England). Sie konnten einige Schweratom-Derivate darstellen und vermessen sowie eine Fouriersynthese niedriger Auflösung berechnen.

Neutronenbeugung

Etwa 30 Beiträge beschäftigten sich mit der Neutronenbeugung, die gegenüber der Röntgenbeugung vor allem zwei bemerkenswerte Unterschiede aufweist:

1. Die Formfaktoren der Elemente unterscheiden sich bei der Neutronenbeugung nur wenig.
2. Die Neutronenbeugung ist abhängig von den magnetischen Eigenschaften der streuenden Atome.

Die erste Eigenschaft wird hauptsächlich zur Bestimmung genauer Leichtatomparameter (vor allem des Wasserstoffs) in Kristallstrukturen, die schwere Atome enthalten, ausgenutzt. Als Beispiel sei der Vortrag von *H. A. Levy, P. A. Aggaron* und *J. H. Burns* (Oak Ridge, USA) genannt, die die Kristallstrukturen von XeF_2 und XeF_4 klärten. XeF_2 ist ein lineares, symmetrisches Molekül mit $\text{Xe}-\text{F} = 2,00$ Å und XeF_4 ein ebenes, quadratisches Molekül mit $\text{Xe}-\text{F} = 1,95$ Å. Die zweite Eigenschaft der Neutronenbeugung gestattet die Festlegung magnetischer Strukturen in ferromagnetischen und antiferromagnetischen Kristallen.

[VB 759]

Symposium: Physikalische Chemie biogener Makromoleküle [1]

vom 18.–21. September 1963 in Schloß Dornburg und Jena

Das Symposium wurde vom Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie veranstaltet. Es gliederte sich in die Sektionen A: Allgemeine Grundlagen und Methoden, B: Polysaccharide, C: Proteine und D: Nucleinsäuren, mit dem Schwergewicht auf Nucleinsäuren.

Allgemeines, Polysaccharide

Grundsätzliches über dringend erforderliche Präzisionsmessungen an Makromolekülen allgemein und Polysacchariden speziell und über den erheblichen apparativen Aufwand brachte *St. Claesson* (Uppsala, Schweden).

Zwei bedeutsame neuartige Techniken erläuterte *K. E. Reiner* (Jena). Die Vielfachreflektion in beiderseits verspiegelten Küvetten dient zur Empfindlichkeitssteigerung bei Diffusions-, Sedimentations- und Elektrophoresemessungen. Die Spiegelbeläge tragen je einen senkrechten Spalt für Ein- und Austritt des Meßlichtes, welches 2- bis 10-mal die Lösung durchstrahlt. Insbesondere für Diffusionsuntersuchungen an Nucleinsäuren in niedriger Konzentration ergeben sich wertvolle Möglichkeiten. – Die Temperatursprung-Methode läßt sich auf Relaxationsphänomene beim Helix-Knäuel-Übergang, z. B. der DNA, anwenden (Registrierung als Streulichtänderungen). In einer Spezial-Streulichtzelle wird durch HF-Aufheizung ein Temperaturhub von 10 °C erzeugt. Die anschließende Änderung der Streuintensität im Verlauf von ca. 30 sec kennzeichnet die Einstellung eines neuen Formgleich-

gewichtes (charakteristische Dimension) unter Verminderung der Steifheit des Moleküls.

W. Burchard (Freiburg/Br.) fand, daß die Carbanilate der Cellulose und Amylose geeignete Modellsubstanzen für Streulicht- und Sedimentations-Untersuchungen des Lösungsmiteleinflusses auf Molekülform und -größe sind. Nach Streulichtmessungen haben Cellulose-carbanilate in Aceton etwa zweimal größere mittlere quadratische Radien und etwa dreimal höhere Viscositäten als die entsprechenden Amylose-Derivate. Da aber auch die 2. Virialkoeffizienten A_2 der Cellulose-Derivate wesentlich größer waren, bestand die Möglichkeit, daß die Unterschiede in der Gestalt nicht nur auf die Bindungsart der Glucose-Einheiten, sondern auch auf den Lösungsmiteleinfluß zurückgehen. Um diesen Einfluß auszuschalten, wurden Messungen am Θ -Punkt ausgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß die beiden Polysaccharid-carbanilate in verschiedenen Θ -Lösungsmitteln unterschiedliche Gestalt haben. Dies deutet darauf hin, daß die Glucose-Einheiten in der Polymerkette verschiedene Konformationen einnehmen können. Das Potential der Rotationsbehinderung scheint jedoch in allen Fällen gleich stark und sehr hoch zu sein, so daß diese beiden Polysaccharid-Derivate zu den steifsten Molekülen gehören, die bisher bekannt sind.

Bestrahlung, Strahlenschutzstoffe

K. Dose (Frankfurt/M.) berichtete über die Bestrahlung von Proteinen mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda \approx 253,7$ nm; sie führt vornehmlich zur Spaltung der S-S-Brücken. Enzyme wie Trypsin, Ribonuclease, Lysozym und Insulin werden da-

[1] Die Symposiumsvorträge erscheinen 1964 in Abh. dtsh. Akad. Wiss. Berlin, Kl. Math. allg. Naturwiss.

bei auch inaktiviert. Insulin ist am leichtesten zu schädigen, und zwar schon durch Bruch der ersten Brücke, während bei Lysozym wenigstens drei gesprengt werden müssen, ehe die Inaktivierung einsetzt. Bemerkenswert ist, daß einige der verbleibenden Brücken beträchtlich stabiler sind.

Die UV-Strahlung von isolierter DNA in wäßriger Lösung führt bekanntlich zu Veränderungen der Basen: Dimerisierung von Thymin, Desaminierung von Cytosin usw. Nach Säurehydrolyse der DNA lassen sich diese Schäden durch Papier- und Ionenaustauschchromatographie nachweisen. Auch durch die Einwirkung von DNase und Schlangengiftphosphatase erhält man darüber Aufklärung. So werden, wie *H. Dellweg* (Frankfurt/M.) ausführte, nach einer Bestrahlung mit $12,9 \cdot 10^4 \text{ erg/mm}^2$ (254 nm) nur noch etwa 90 % der DNA zu den Desoxyribonucleosiden gespalten. Der Rest besteht aus Oligonucleotiden, in denen offenbar alle geschädigten Teile der DNA-Kette enthalten sind. Durch Chromatographie an Sephadex gelang die Abtrennung dieses Nucleotidgemisches von den übrigen Spaltprodukten. Versuche zur chromatographischen Fraktionierung dieses Gemisches scheiterten, was für eine bemerkenswerte Einheitlichkeit dieser Fraktion spricht.

Sehr ausgeprägte ESR-Spektren konnte *G. Löfroth* (Stockholm, Schweden) zur Diskussion stellen. Die Substanzen waren durch γ -Bestrahlung von DNA in Abwesenheit von O_2 erhalten worden; die Spektren ähnelten denen von Thymidin und Thymin. Durch Sauerstoffzufuhr verschwinden einige Linien völlig, andere werden geschwächt. Frühere Angaben über breite Linien im Ausgangsmaterial dürften von Verunreinigungen (Eisen!) herrühren.

Über die Bedeutung von Metall-Ionen in Nucleinsäuren und ihren Nachweis durch Neutronen-Aktivierungsanalyse sprach *H. Altmann* (Wien, Österreich). Nach der Neutronen-Bestrahlung und Trägerzugabe wurden die in Quarzröhrchen verpackten Proben naß verascht, die Metall-Ionen (Cu, Mn, Zn, Ni, Cd, Na, Fe, Mo, Cr, Ag) getrennt und deren Gamma-Spektren gemessen. Besonders günstig erwies es sich, nach Abtrennung der Metall-Ionen im gleichen Arbeitsgang auch den ebenfalls aktivierten Phosphor zu bestimmen, um so noch zusätzlich zur UV-Extinktionsmessung eine Bestimmungsgröße für die Nucleinsäuren zu bekommen.

Über die Auffindung von Strahlenschutzstoffen berichtete *N. Nikolajewa* (Moskau, UdSSR). Die Denaturierung von DNA durch Peroxydbildung konnte durch Zugabe von Propylgallat nahezu völlig verhindert werden. Ähnlich wirken Inhibitoren wie Phenyläthylamin und 3-Hydroxypyridin. Hierbei wird angenommen, daß der Inhibitor Wasserstoff abspaltet und dabei verbraucht wird.

Nucleinsäuren

Mit den Basenkomponenten der Nucleinsäuren befaßte sich *L. Bljumenfeld* (Moskau, UdSSR). Die Konstanten der Dissoziation und Protonisierung von Purinen, Pyrimidinen und den entsprechenden Nucleosiden wurden unter Standardbedingungen im Grundzustand und im niedrigsten angeregten Elektronenzustand spektrophotometrisch gemessen. Die thermodynamischen Parameter ΔH , ΔF und ΔS dieser Prozesse wurden bestimmt. Es zeigte sich, daß die Elektronenanregung zu einer starken Veränderung der Säure-Base-Eigenschaften der Nucleinsäure-Komponenten führt: die pK-Werte im angeregten Zustand unterscheiden sich um mehrere Einheiten vom Grundzustand. Aus den gewonnenen Daten wurden die thermodynamischen Parameter des Protonentransportes zwischen den komplementären Stickstoffbasen für das Gemisch der Nucleotide und für die doppelspiraligen Teile der DNA berechnet. Im Grundzustand ist für die isolierten Nucleotide eine Protonenübertragung thermodynamisch nicht günstig, wohl aber im unteren Anregungszustand. Für die doppelspiraligen Teile der DNA ist der Protonentransport zwischen den komplementären Basen auch im Grundzustand vorteilhaft. Folglich wird die Ladungsverteilung in den doppelspiraligen Abschnitten eindeutig durch die Nucleotidsequenz der

DNA-Kette bestimmt. Diese Schlußfolgerung wird durch die Resultate der Infrarotspektren der Nucleinsäuren und der synthetischen Polynucleotide bestätigt.

Aus Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Verteilungen von thermisch denaturierter *B. subtilis*-Hybrid-DNA schloß *R. Rownd* (Cambridge, Mass., USA) hinsichtlich der biologischen Aktivität, daß einsträngige DNA biologisch inaktiv ist, und daß die Transformationsaktivität sich im Verteilungsdiagramm zwischen der nativen DNA und der denaturierten, jedoch noch zweisträngigen Form findet. Das Fehlen der genetischen Funktion der einsträngigen DNA rührt weniger von einem irreversiblen Verlust der biologischen Aktivität als vielmehr von einer Repression her, da eine Renaturierung bis auf 40 % der ursprünglichen Aktivität möglich ist. Aus der Denaturierung und Renaturierung der Hybrid-DNA kann keine völlig mit schweren Atomen markierte DNA neben unmarkierter gewonnen werden, da die Rekombination statistisch erfolgt. Die zweisträngige denaturierte Form wurde vollständig renaturiert und der zeitliche Verlauf dieses Vorganges in Abhängigkeit von der Temperatur verfolgt.

Als Abschluß gab *G. Helmkamp* (Riverside, USA) einen Überblick über Arbeiten seines Laboratoriums.

1. Monomer-Monomer-Wechselwirkungen: Aus Dampfdruckmessungen wurden die Aktivitätskoeffizienten wäßriger Lösungen von Purin, Uridin und Cytidin berechnet. Daraus ergibt sich Assoziation über die Dimerisation hinaus mit den freien Standardenergien $-0,44$, $+0,29$ bzw. $+0,08 \text{ kcal/Mol}$. Um ein physikalisches Modell für die Assoziation zu entwickeln, wurden die NMR-Spektren von Purinprotonen in Abhängigkeit von der Konzentration ($0,05$ bis 1 M) gemessen. Die Daten sprechen dafür, daß die Purinmoleküle vertikal gestapelt sind, ohne sich direkt zu überlappen.

2. Polymer-Monomer-Wechselwirkungen: Bei Messungen der Schmelztemperatur in Abhängigkeit von der Monomerkonzentration und durch Gleichgewichtsdialyse wurde Assoziation entdeckt. Die T_M -Werte werden in folgender Reihenfolge erniedrigt: Cyclohexanol < Phenol, Pyrimidin, Uridin < Cytidin, Guanidin < Purin, Adenosin, Desoxyguanosin < Coffein, Cumarin, 2,6-Dichlor-7-methylpurin. Thymus-DNA besitzt eine höhere Affinität zu hydrophoben Steroiden und Carcinogenen als zu Basen. Denaturierte Moleküle wiederum addieren stärker als native DNA.

3. Polymer-Polymer-Wechselwirkungen: Durch Rotationsdispersions- und Absorptionsmessungen wurden die Wechselwirkungen von Nucleotiden, synthetischen Polynucleotiden und Nucleinsäuren in Abhängigkeit vom Lösungsmittel untersucht. In Formamidlösung zeigen die Polymeren nur kleine Differenzen gegenüber den Monomeren. In Dimethylsulfoxyd dagegen hat DNA eine abnorm niedrige spezifische Drehung. In Formamidlösungen von DNA bei einer Salzkonzentration von $0,4 \text{ M}$ entsprechen die Eigenschaften dem nichtdenaturierten Zustand. Nach der Denaturierung wird die DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen nicht renaturiert. Allgemein lassen sich die Phänomene am besten als hydrophobe Wechselwirkungen deuten.

Aus den Generaldiskussionen

In der 1. Generaldiskussion „Möglichkeiten und Grenzen der Methoden“ kam zum Ausdruck, daß viele Wünsche des Biochemikers noch offen bleiben müssen, besonders bei den Nucleinsäuren:

Handhabung sehr großer Moleküle ohne Kettenbruch und Festlegung der Massenverteilung ohne vorangegangene Trennungsoption. — Genauere elektronenmikroskopische Abbildung durch geeignetere Präparation und bessere Auflösung zur Festlegung des Einbaus markierter Basen. — Verfolgung der zeitlichen Veränderungen der H-Brücken und der Molekülgestalt (Relaxationsphänomene) bei sprunghafter Änderung von Temperatur, pH-Wert und Salzkonzentration.

In der 2. Generaldiskussion „Die Struktur der Polysaccharide und Proteine“ wurden spezielle Erscheinungen während der Strukturänderung behandelt:

α -Chymotrypsin weist zwei T_M -Werte auf, verursacht durch zwei diskrete Bereiche der Helixauflockerung. – Die zwei-stufige reversible Formänderung von Hämoglobin bei der Sauerstoff-Aufnahme verursacht zwei Viscositätsmaxima und stellt damit ein außergewöhnliches Beispiel für die Umwandlung von chemischer in mechanische Energie dar. – Die unterschiedliche Stabilität von S–S-Brücken ist als Auswirkung von Energiedissipation anzusehen.

In der 3. Generaldiskussion „Nucleinsäuren und die Perspektiven ihrer physikochemischen Untersuchung“ wurden folgende Fragestellungen aufgeworfen:

Ist der T_M -Wert vom Molekulargewicht abhängig? Wie hoch ist maximal das Molekulargewicht von Substanzen, die aus Phagen und aus Zellen isoliert werden können? – Welche Reaktionen erfolgen mit quasitrockener DNA im festen Zustand, die zur bekannten Löslichkeitsverminderung führen? – Welche Methoden eignen sich für Relaxationsmessungen? – Ist der T_M -Wert ein Kriterium für die vollständige Renaturierung (z. B. nach thermischer Vorbehandlung) bei unverändertem Molekulargewicht? – Welche Methoden versprechen die genauesten Aussagen über die Struktur der DNA als isoliertes trockenes Präparat, in der Lösung und in der Zelle (als organisiertem Verband)? [VB 762]

Konstitution der Rifamycine

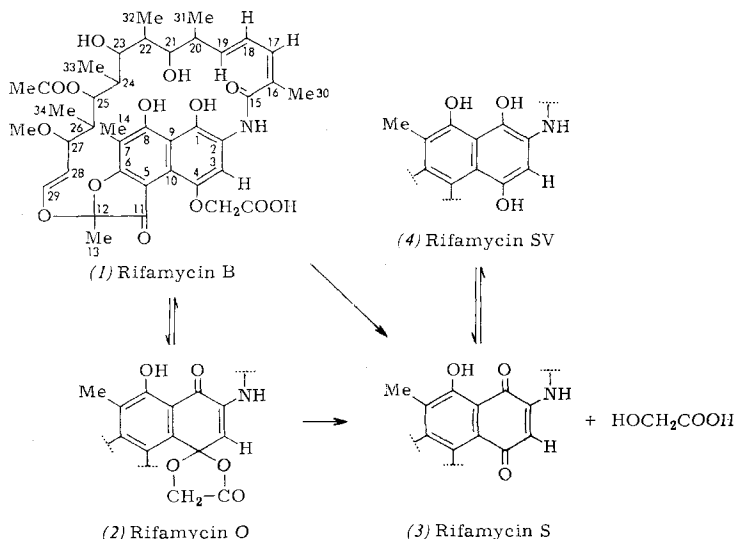
V. Prelog, Zürich (Schweiz)

GDCh-Ortsverband Mannheim-Ludwigshafen,
am 12. Dezember 1963

Rifamycine (früher Rifomycine genannt) sind Stoffwechselprodukte von *Streptomyces mediterranei*. Unter bestimmten Kulturbedingungen ist Rifamycin B das Hauptprodukt. Diese Verbindung ist jedoch instabil und wird in neutraler Lösung bereits durch Luft unter Verlust von zwei Atomen Wasserstoff zum Rifamycin O oxidiert. Dieses gibt mit Säuren in wäßriger Lösung Rifamycin S, wobei ein Molekül Glykolsäure hydrolytisch abgespalten wird. Milde Reduktionsmittel, z. B. Ascorbinsäure, überführen Rifamycin O in Rifamycin B, und Rifamycin S in Rifamycin SV, dessen Natriumsalz unter dem Namen Rifocin® therapeutisch angewendet wird.

Gemeinsam mit W. v. Oppolzer wurden für die genannten vier Rifamycine die Formeln (1) bis (4) abgeleitet. Dies gelang

vor allem durch chemischen Abbau des Rifamycins S (Methanolyse des Iminomethyläthers aus Rifamycin S, Abbau von Rifamycin S mit Ozon und anschließende Behandlung mit Perameisensäure, Oxydation von Tetrahydorrifamycin S mit Salpetersäure) und Analyse der bei diesen und weiteren Reaktionen auftretenden Veränderungen am Molekül und seinen Bruchstücken durch NMR-Spektroskopie.



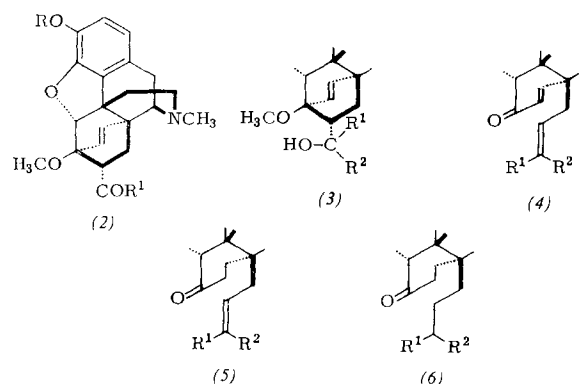
Entsprechend den Formeln (1) bis (4) sind die Rifamycine natürlich vorkommende Ansa-Verbindungen, in denen die aliphatische Brücke ein aromatisches System überspannt. Als Folge dieser Konstitution befinden sich die Methylgruppen an der aliphatischen Brücke im magnetischen Feld des Ringstromes der aromatischen π -Elektronen und sind daher für die NMR-Spektroskopie mehr oder weniger stark abgeschirmt. So kommt es, daß die Dublette für zwei der vier CH_3CH -Gruppen im Rifamycin O und S bei ungewöhnlich hohen magnetischen Feldstärken ($\delta = 0,22$ und $0,67$ ppm) liegen.

Biosynthetisch werden die Rifamycine wahrscheinlich zum großen Teil aus Acetat und Propionat (oder ihren biogenetischen Äquivalenten) aufgebaut.

[VB 773]

RUNDSCHAU

Analgetica der Morphin-Reihe von unerwartet hoher Wirksamkeit erhielten K. W. Bentley und D. G. Hardy. Addition von α,β -ungesättigten Ketonen an Thebain (1) und, in schlechter Ausbeute, Reaktion von Aryl-Mg-Halogeniden mit dem (1)-Acrylnitril-Addukt oder von Alkyl-Mg-Halo-



geniden mit dem (1)-Acrylsäure-äthylester-Addukt gibt Ketone der Tetrahydro-6.14-äthenothebain-Reihe (2) ($\text{R} = \text{CH}_3$). Einwirkung von Grignard-Verbindungen auf solche Addukte (2) ($\text{R}^1 = \text{H}, \text{CH}_3, \text{C}_6\text{H}_5, \text{OC}_2\text{H}_5$) liefert sek. und tert. Alkohole (3) ($\text{R}^1 = \text{CH}_3$), die alkalisch zu den Phenolen (3) ($\text{R} = \text{H}$) entmethylierbar sind. Die Alkohole (3) werden von Säure leicht in 14-Alkenylcodeinone und -morphinone (4) umgelagert, die zu Dihydro- (5) und Tetrahydro-Derivaten (6) reduziert werden können. NaBH_4 -Reduktion der Ketone (4)–(6) liefert die Morphin- und Codein-Derivate. Die Aktivität von (4)–(6) liegt zwischen fast Null und nahezu dem 10000-fachen der von Morphin (Ratte, s.c.). Der therapeutische Index der wirksamsten Verbindungen ist 25000. / Proc. chem. Soc. (London) 1963, 220 / –Ma. [Rd 719]

Heterocyclische Steroide, in denen Ring A zum Pyrimidinring umgewandelt ist, wurden erstmalig von E. Caspi und D. M. Piatak dargestellt. Abbau von 19-Nor-testosteron durch Kondensation mit Äthylformiat und folgende Acetylierung zu 17 β -Acetoxy-2-acetoxymethylen-östr-4-en-3-on, dessen