

schwingung für primäre Alkohole größer als die der sekundären und diese größer als die der tertiären Alkohole, jedoch überschneiden sich die Frequenzbereiche in einzelnen Fällen. Außer n-Hexan und  $\text{CCl}_4$  eignen sich besonders Triäthylamin, Aceton und Acetonitril als Lösungsmittel zur Unterscheidung primärer, sekundärer und tertiärer Alkohole.

Die Dielektrizitätskonstante der Lösungsmittel hat keinen Einfluß auf die Lage der OH-Bande. In polaren Lösungsmitteln und solchen mit  $\pi$ -Systemen liegt die Bande bei niedrigeren Frequenzen als in n-Hexan und  $\text{CCl}_4$ . Diese Verschiebung beruht auf der Bildung von Wasserstoffbrücken. Der Betrag der Verschiebung ist ein Maß für die Länge der Wasserstoffbrücke [2].

Eingegangen am 15. Juli 1964 [Z 787]

[1] G. Habermehl, Angew. Chem. 76, 271 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 309 (1964).

[2] H. E. Hallam in M. Davies: Infrared Spectroscopy and Molecular Structure. Elsevier, Amsterdam 1963, S. 413.

## Explosion bei der Oxydation von Tetralin mit Wasserstoffperoxyd in Aceton

Von Dr. H. Seidl

Institut für Organische Chemie der Universität München

Zur Darstellung von  $\alpha$ -Tetralon wurde Tetralin nach der Vorschrift von W. Treibs und Mitarbb. [1] mit 30-proz. Wasserstoffperoxyd oxydiert. Als beim anschließenden Einengen des Reaktionsgemisches im Vakuum die letzten Reste des Lösungsmittels übergingen, explodierte der Destillationsrückstand äußerst heftig. Es entstand Personen- und Sachschaden. Da die Jodid-Probe auf freies Wasserstoffperoxyd negativ ausgefallen war, vermuten wir als Ursache der Explosion die Bildung von Acetonperoxyden. Es sei vor der Nacharbeitung gewarnt und auf andere Möglichkeiten der Darstellung von  $\alpha$ -Tetralon hingewiesen [2].

Eingegangen am 13. Juli 1964 [Z 785]

[1] W. Treibs, G. Franke, G. Leichenring u. H. Roeder, Chem. Ber. 86, 616 (1953).

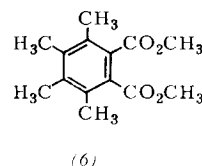
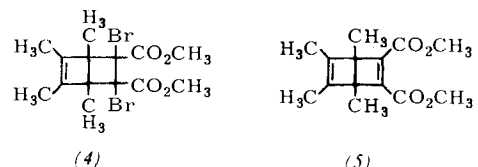
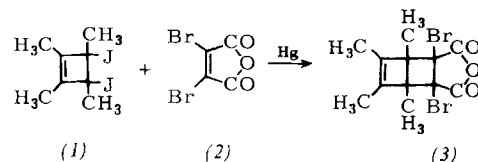
[2] E. L. Martin u. L. F. Fieser in: Organic Syntheses. Wiley, New York 1943, Coll. Vol. II, S. 569; R. B. Wagner u. H. D. Zook in: Synthetic Organic Chemistry, Ketones. Wiley, New York 1953, S. 316ff.

## Ein kristallisiertes Derivat des „Dewar-Benzols“

Von Prof. Dr. R. Criegee und Dipl.-Chem. F. Zanker

Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Karlsruhe

Zweitägiges Rühren einer Lösung von 3,4-Dijodtetramethylcyclobuten (1) [1] und Dibrommaleinsäureanhydrid (2) in Äther mit Quecksilber unter Stickstoff lieferte in 67-proz. Ausbeute das tricyclische Anhydrid (3), das in den Dicarbonsäureester (4),  $\text{Fp} = 104^\circ\text{C}$ , verwandelt wurde. Die Brom-Eliminierung aus (4) gelang mit verkupferten Zinkstaub in siedendem Äther. Der halogenfreie Tetramethyl-„Dewar-Phthalsäure“-Ester (5),  $\text{Fp} = 32-33^\circ\text{C}$ , entstand dabei in 92-proz. Ausbeute; Mengen von 10 g lassen sich leicht herstellen. Im NMR-Spektrum [\*] (in o-Dichlorbenzol) finden sich drei scharfe Singletts gleicher Fläche mit  $\tau$ -Werten von 9,06 (Methyl am Brückenkopf), 8,72 (Methyl an der Doppelbindung) und 6,64 (Ester-Methyl). Kurzes Erhitzen auf  $130^\circ\text{C}$  liefert quantitativ Tetramethylphthalsäure-dimethylester (6) [3],  $\text{Fp} = 127^\circ\text{C}$  (NMR-Spektrum in o-Dichlorbenzol: 3 Singletts gleicher Fläche bei  $\tau$ -Werten von 8,26, 8,08 und 6,06). Die Halbwertszeit der Valenzisomerisierung (5)  $\rightarrow$  (6) in o-Dichlorbenzol beträgt nach NMR-Messungen bei  $90,1^\circ\text{C}$  4,7 Std. (5) ist somit erheblich stabiler als das un-



substituierte „Dewar-Benzol“ von van Tamelen und Pappas [4], für das eine Halbwertszeit von 2 Tagen bei  $20^\circ\text{C}$  angegeben wird. Auch der (5) entsprechende Halbest (Fp = 111 bis  $112^\circ\text{C}$ ) wurde in reiner Form dargestellt.

Eingegangen am 20. Juli 1964 [Z 788]

[1] Erhalten aus dem Diol [2] mit Jodwasserstoff; vgl. auch R. Riemschneider u. U. Becker, Mh. Chem. 90, 524 (1959).

[2] R. Criegee u. G. Louis, Chem. Ber. 90, 417 (1957).

[3] R. Criegee u. P. Ludwig, Chem. Ber. 94, 2038 (1961).

[4] E. E. van Tamelen u. S. P. Pappas, J. Amer. chem. Soc. 85, 3297 (1963).

Wir danken Herrn Dr. H. A. Brune für Aufnahme und Diskussion der NMR-Spektren.

## Bestimmung der Sequenz eines Code-Triplets

Von Prof. Dr. F. Cramer, Dr. H. Küntzel und Dr. J. H. Matthaei [\*]

Medizinische Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen

Für die Entzifferung des genetischen Codes standen bisher nur Polyribonucleotide mit statistischer Basenverteilung zur Verfügung, so daß lediglich die Brutto-Zusammensetzung zahlreicher Code-Triplets bestimmt werden konnte [1,2]. Möglichkeiten zur weiteren Analyse des Codes mit Oligonucleotiden und Polynucleotiden definierter Sequenz haben wir kürzlich aufgewiesen [3].

Wir erhielten auf enzymatischem Wege codierende Polynucleotide mit definierter 3'-terminaler Basensequenz. Diese bewirken – wie erwartet [4] – in einem wesentlich vereinfachten zellfreien System aus *E. coli* [4] eine spezifische Adsorption von Aminoacyl-RNS an Ribosomen. Damit konnte erstmals die Basensequenz eines codierenden Triplets geklärt werden. Gleichzeitig zeigt dieser Befund an, daß die RNS-Matrize vom 3'-terminalen Ende her abgelesen wird.

Mit einer teilweise gereinigten Polynucleotid-Phosphorylase aus *Micrococcus lysodeikticus* [5] wurden folgende Polynucleotide dargestellt: Poly-pApC 50:1 (1), Poly-pApU 50:1 (2), Poly-pApG 100:1 (3), Poly-pUpG 100:1 (4) und Poly-pCpG 100:1 (5). Die Polynucleotide (1) und (2) wurden mit pyrimidin-spezifischer Pankreas-Ribonuclease, (3), (4) und (5) mit guanin-spezifischer Takadiastase-Ribonuclease  $T_1$  gespalten; mit Bakterien-Alkaliphosphatase wurden die 3'-Phosphatgruppen der Spaltprodukte entfernt.

Am Beispiel des so aus (1) entstehenden Polynucleotids Ap...ApApC mit einer durchschnittlichen Kettenlänge von

50 Nucleotiden wurde das 3'-terminale Nucleotid folgendermaßen nachgewiesen: Von dem am Cytosin mit Tritium markierten Ap...ApApC wurde durch Perjodat-Oxydation und Behandlung mit Cyclohexylamin [6]  $^3\text{H}$ -Cytosin abgespalten. Gleichgewichtsdialyse (6 Stunden gegen Wasser) ergab, daß die gesamte Radioaktivität in Form dialysierbarer Nucleobase freigesetzt worden war, der Rest des UV-absorbierenden Materials aber nicht dialysierte. Also waren durch RNase im ursprünglichen Copolymeren (1) alle dem Cytosin benachbarten Phosphodiester-Bindungen und nur diese hydrolysiert worden. Papierchromatographische Analyse der Produkte aus der Perjodat- und Amin-Behandlung ergab Cytosin und kein Adenin.

In Gegenwart der üblichen Puffersalze [7] wurden etwa  $150\ \mu\text{Mol}$  Ribosomen [8] mit  $300\ \mu\text{Mol}$  Polynucleotid und  $1\ \mu\text{Mol}$  Aminoacyl-RNS in  $350\ \mu\text{l}$  Wasser 60 sec bei  $36^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Aminoacyl-RNS war mit jeweils einer markierten und 19 nicht markierten Aminosäuren beladen, d. h. alle 20 Aminosäuren, die normalerweise in Proteinen vorkommen, wurden geprüft. Der Ansatz wurde anschließend mit 30 Volumina einer eiskalten Lösung von  $0,01\ \text{M}$  Tris-HCl ( $\text{pH} = 7,2$ ) und  $0,01\ \text{M}$  Magnesiumacetat verdünnt, 60 min bei  $150000\ \text{g}$  zentrifugiert, der Niederschlag in  $0,1\ \text{M}$  Triäthylammoniumbicarbonat ( $\text{pH} = 7,6$ ) aufgenommen und zur Flüssigkeitsszintillations-Zählung auf Glasfaserpapier (Whatman GFA) getrocknet.

Durch Vergleich der Codierungsfähigkeit von Poly-Up...UpUpG mit der von Poly-Up...UpU ergibt sich UpUpG als codierende Sequenz für *Leucin*. Valin und Cystein, für die ebenfalls Codons aus einem G und zwei U festgestellt worden waren [2], werden durch diese Sequenz nicht codiert (Tabelle, Werte-Mittel aus zwei Experimenten).

Aminosäure	$\mu\text{Mol}$ gebundene Aminoacyl-RNS		
	ohne Polynucleotid	mit Poly-Up...UpU	mit Poly-Up...UpUpG
$^{14}\text{C}$ -Val	139	125	350
$^{35}\text{S}$ -Cys	482	465	480
$^3\text{H}$ -Leu	780	788	716
$^3\text{H}$ -Phe	64	174	70

Durch Hydrolyse der abzentrifugierten Komplexe aus Ribosomen, Polynucleotid und Aminoacyl-RNS bei  $\text{pH} = 9$  und Hochspannungselektrophorese ( $2\ \text{M}$  Essigsäure, Papier) ließ sich zeigen, daß die markierte Aminosäure im Komplex nicht peptidisch gebunden ist. Elektronenmikroskopische Studien [9] mit fraktionierter Polyuridylsäure (Kettenlänge um  $750\ \text{\AA}$ ) haben gezeigt, daß sich 30-S- und 50-S-Untereinheiten der Ribosomen mehr als 12-mal so stark an ein Ende dieser Nucleinsäure anlagern wie an den Rest der Kette. Es dürfte sich nach obigen Beobachtungen um das 3'-terminale Ende handeln.

Eingegangen am 31. Juli 1964 [Z 792]

[\*] Wir danken Fr. E. Gärtner, K. Eckert und G. Keller für wertvolle Mitarbeit.

[1] P. Lengyel, J. F. Speyer u. S. Ochoa, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1936 (1961).

[2] J. H. Matthaei, O. W. Jones, R. G. Martin u. M. W. Nirenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 666 (1962).

[3] J. H. Matthaei, Nova Acta Leopoldina N. F. 26, 45 (1963).

[4] J. H. Matthaei, Vortrag auf der Bunsentagung in Berlin, Mai 1964.

[5] M. F. Singer u. J. K. Guss, J. biol. Chemistry 237, 182 (1962).

[6] P. A. Whittfeld, Biochem. J. 58, 39 (1962).

[7] J. H. Matthaei u. M. W. Nirenberg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1580 (1961).

[8] Um einen Verlust des 3'-terminalen Nucleotids während der Inkubation zu vermeiden, müssen die Ribosomen von nucleolytischer Aktivität so weit wie möglich befreit werden.

[9] F. Amelunxen u. J. H. Matthaei, Vortrag beim VI. International Congress of Biochemistry, New York, Juli 1964.

## Codierung mit Mono- und Poly-trinucleotiden

Von Dr. J. H. Matthaei, Dr. H. Kleinkauf und Prof. Dr. G. Schramm [\*]

Medizinische Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen, Botanisches Institut der Technischen Hochschule Braunschweig und Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen

Poly-trinucleotide sollten die Biosynthese von Poly-amino-säuren codieren [1], während Trinucleotide selbst nur zu einer mehr oder weniger spezifischen Bindung von Aminoacyl-RNS an Ribosomen führen [1-3]. Trinucleotide, die mit sich selbst polymerisiert infolge der Tertiärstruktur der Polymeren inaktiv wären, könnten im Copolymerisat mit einem zweiten Trinucleotid aktiv sein [1]. Wir haben daher mit der chemischen Synthese von Homo-polytrinucleotiden begonnen und ihre Codierungsfähigkeit geprüft. Es haben sich die Codierungseinheiten ApGpC und ApGpU für Asparagin ergeben.

Ein Gemisch von Trinucleotiden wurde durch vollständigen Abbau von käuflicher Hefe-RNS mit pankreatischer Ribonuclease (RNase), fünffache Phenol-Extraktion, dreimaliges Ausäthern und Lyophilisieren gewonnen. 6,5 g dieser Abbauprodukte wurden in vier hintereinandergeschalteten Säulen (je 6 cm Durchmesser, 2 m Länge) an DEAE-Sephadex (A-25 coarse) in die einzelnen Mono- bis Trinucleotide getrennt. Von unten in die Säulen eindringende bewegliche Kolben mit Fritte hielten das Sephadex auch beim Schrumpfen fest zusammen. Eluiert wurde entgegen der Schwerkraft mit Hilfe von  $4 \times 2$  Kanälen einer Durrum-Schlauchpumpe, die in sechs Tagen  $165\ \text{l}$  Ammoniumcarbonat-Lösung ( $\text{pH} = 8,7$ , Konzentration linear von  $0,1$  auf  $1,0\ \text{M}$  steigend) jeweils von einer Säule in die nächste weiterpumpte. Die Trinucleotid-Fractionen enthielten 100 bis  $300\ \text{mg}$ . Sie wurden in vier Stufen durch Sorbieren aus zehnfach verdünnter Lösung an DEAE-Cellulose-Filter von abnehmendem Durchmesser und je  $4\ \text{cm}$  Höhe und Desorbieren mit etwa  $1\ \text{M}$  Ammoniumbicarbonat-Lösung ( $\text{pH} = 7,8$ ) gereinigt und entsalzt. Die konzentrierte Oligonucleotid-Lösung wurde mit Cellulosephosphat (P-cellulose p.a. der Firma Serva, Heidelberg) angesäuert, filtriert, zentrifugiert und lyophilisiert. Die Sequenz der Trinucleotide wurde nach Hydrolyse der Produkte bei  $37^\circ\text{C}$  mit  $0,5\ \text{N}$  KOH oder  $\text{T}_1$ -RNase durch Hochspannungs-Elektrophorese festgestellt.

$75\ \text{mg}$  ApGpCp (oder  $60\ \text{mg}$  ApGpUp) wurden unter Ultraschall in  $1,1\ (0,9)\ \text{g}$  Tetrametaphosphorsäure-äthylester [4a] und  $0,125\ (0,1)\ \text{ml}$   $\text{H}_2\text{O}$ -freiem Tris-dimethylaminophosphat gelöst und unter Drehen und Luftabschluß in 48 Stunden bei  $60^\circ\text{C}$  polymerisiert [4b]. Die Dialyse der Produkte über Nacht ergab einen Verlust von  $44\ (45)\ \%$  des UV-absorbierenden Materials. Die im Dialysierschlauch verbliebene Lösung wurde eingeeengt und an einer Säule von Sephadex G-75 ( $3\ \text{cm}$  Durchmesser,  $150\ \text{cm}$  Länge) in Fractionen verschiedener Kettenlängen getrennt.

Die Codierungsfähigkeit von Fractionen mit einer Kettenlänge um 18 Nucleotide wurde nach der vorbeschriebenen Methode [5] untersucht, jedoch wurde zum Zweck der Peptid-Synthese ein komplettes Proteinsynthese-System [6] einschließlich des  $100000\text{-g}$ -Überstandes aus möglichst RNase-armen *E.coli*-Extrakten verwendet. Inkubiert wurde 3 min bei  $0^\circ\text{C}$  und anschließend 7 min bei  $36^\circ\text{C}$ . In den meisten Experimenten mit Poly-ApGpUp und Poly-ApGpCp zeigte sich eine recht spezifische Erhöhung des Einbaus von Asparagin. In einigen Versuchen mit Poly-ApGpUp wurde auch Methionin eingebaut, was vermutlich auf eine Abspaltung des endständigen Nucleotids zurückzuführen ist. Diesen Befunden entspricht, daß die vom terminalen Phosphat befreiten Trinucleotide ApGpC und ApGpU nach der in der vorangehenden Mitteilung [5] beschriebenen Methode spezifisch die Bindung von Asparaginyln-RNS an Ribosomen vermitteln.

Das komplette Protein-Synthese-System baute in Abhängigkeit von den zugesetzten Polynucleotiden etwa zwanzigmal