

50 Nucleotiden wurde das 3'-terminale Nucleotid folgendermaßen nachgewiesen: Von dem am Cytosin mit Tritium markierten Ap \cdots ApApC wurde durch Perjodat-Oxydation und Behandlung mit Cyclohexylamin [6] ^3H -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 μMol Ribosomen [8] mit 300 μMol Polynucleotid und 1 μMol Aminoacyl-RNS in 350 μl Wasser 60 sec bei 36 °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 M Tris-HCl (pH = 7,2) und 0,01 M Magnesiumacetat verdünnt, 60 min bei 150000 g zentrifugiert, der Niederschlag in 0,1 M Triethylammoniumbicarbonat (pH = 7,6) aufgenommen und zur Flüssigkeitsszintillations-Zählung auf Glasfaserpapier (Whatman GFA) getrocknet.

Durch Vergleich der Codierungsfähigkeit von Poly-Up \cdots UpUpG mit der von Poly-Up \cdots 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	n μMol gebundene Aminoacyl-RNS		
	ohne Polynucleotid	mit Poly-Up \cdots UpU	mit Poly-Up \cdots UpUpG
^{14}C -Val	139	125	350
^{35}S -Cys	482	465	480
^{3}H -Leu	780	788	716
^{3}H -Phe	64	174	70

Durch Hydrolyse der abzentrifugierten Komplexe aus Ribosomen, Polynucleotid und Aminoacyl-RNS bei pH = 9 und Hochspannungselektrophorese (2 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 Å) 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. Whitfield, 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-aminoacäuren 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 Copolymerat 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), fünfmalige 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 4×2 Kanälen einer Durrum-Schlauchpumpe, die in sechs Tagen 165 l Ammoniumcarbonat-Lösung (pH = 8,7, Konzentration linear von 0,1 auf 1,0 M steigend) jeweils von einer Säule in die nächste weiterpumpte. Die Trinucleotid-Fraktionen enthielten 100 bis 300 mg. Sie wurden in vier Stufen durch Sorbieren aus zehnfach verdünnter Lösung an DEAE-Cellulose-Filter von abnehmendem Durchmesser und je 4 cm Höhe und Desorbieren mit etwa 1 M Ammoniumbicarbonat-Lösung (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 °C mit 0,5 N KOH oder T₁-RNase durch Hochspannungs-Elektrophorese festgestellt.

75 mg ApGpCp (oder 60 mg ApGpUp) wurden unter Ultraschall in 1,1 (0,9) g Tetrametaphosphorsäure-äthylester [4a] und 0,125 (0,1) ml H₂O-freiem Tris-dimethylaminophosphat gelöst und unter Drehen und Luftabschluß in 48 Stunden bei 60 °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 eingeeignet und an einer Säule von Sephadex G-75 (3 cm Durchmesser, 150 cm Länge) in Fraktionen verschiedener Kettenlängen getrennt.

Die Codierungsfähigkeit von Fraktionen 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-g-Überstandes aus möglichst RNase-armen *E.coli*-Extrakten verwendet. Inkubiert wurde 3 min bei 0 °C und anschließend 7 min bei 36 °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 Asparaginyl-RNS an Ribosomen vermittelten.

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

soviel Aminosäure ein wie das auf den Aminosäure-Adaptationsschritt beschränkte System [2, 5]. Die vermutlich entstandenen Peptide sollen in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden.

Eingegangen am 4. August 1964 [Z 793]

[*] Wir danken Fr. I. Schürnbrand und K. Eckert für wertvolle Mitarbeit.

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

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

[3] M. W. Nirenberg hat auf dem VI. International Congress of Biochemistry in New York soeben über ähnliche Ergebnisse berichtet.

[4a] W. Pollmann u. G. Schramm, Biochim. biophysica Acta 80, 1 (1964).

[4b] G. Schramm, H. Grötsch u. W. Pollmann, Angew. Chem. 74, 53 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 1 (1962).

[5] F. Cramer, H. Küntzel u. J. H. Matthaei, Angew. Chem. 76, 716 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 589 (1964).

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

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Chemische Informationsspeicherung und -verarbeitung in biologischen Systemen

Die Gesellschaft für Physikalische Biologie veranstaltete gemeinsam mit der Neuroscience Research Foundation am 5. und 6. Mai im Schloß Berlepsch bei Göttingen eine Tagung über „Chemische Möglichkeiten der Informationsspeicherung und -verarbeitung in biologischen Systemen“. Etwa 90 Teilnehmer, davon rund ein Drittel aus dem Ausland, diskutierten über die vier Themen „Molekulare Wechselwirkungen“, „Antigen-Antikörper-Reaktionen“, „RNS-Reduplikation“ und „Beziehungen zum psychischen Gedächtnis“. Unterbrochen wurden die sehr intensiven Gespräche durch eine von den Tagungsteilnehmern selbst improvisierte abendliche Kammermusik mit Werken barocker Komponisten.

Molekulare Wechselwirkungen

M. Eigen (Göttingen) eröffnete die Tagung mit einer Einführung in die Probleme der molekularen Wechselwirkungen. Während man über Wechselwirkungen zwischen einfachen anorganischen Ionen verhältnismäßig gut Bescheid weiß, sind die Wechselwirkungen zwischen großen organischen Ionen und Molekülen noch weitgehend unerforscht. Gerade diese aber sind für biologische Systeme von Bedeutung.

Ionale Wechselwirkungen sind normalerweise unspezifisch, d. h. ein freies Ion befindet sich mit ungefähr gleicher Wahrscheinlichkeit an einer Stelle x oder $x + \Delta x$. Wasserstoffbrücken sind zwar räumlich fixiert, aber gleichfalls strukturell nicht spezifisch, und hydrophobe Wechselwirkungen haben als solche auch keine nennenswerte Spezifität. In biologischen Systemen führt jedoch das Zusammenwirken dieser drei Wechselwirkungen dank einer räumlichen Fixierung der Wechselwirkungspartner zu beträchtlicher Spezifität. Beispiele dafür sind die Tertiärstruktur der Proteine, Antigen-Antikörper-Reaktionen sowie enzymatische Prozesse.

Hydrophobe Wechselwirkungen, beispielsweise zwischen ungeladenen Seitenketten eines Proteins oder zwischen den heterocyclischen Basen der Nucleinsäuren, sind vor allem in polaren Lösungsmitteln, insbesondere also in wäßriger Lösung, für die Molekülstruktur von Bedeutung. Sie bewirken, daß die Struktur des Lösungsmittels zwischen hydrophoben Oberflächen verschwindet. Der damit verbundene Gewinn an freier Energie führt – zusammen mit anderen Effekten, besonders π - π -Wechselwirkungen – zur Stabilisierung.

In zahlreichen biologisch wichtigen Molekülstrukturen sind die beschriebenen Wechselwirkungen kooperativ, d. h. eine Wechselwirkung erleichtert das Auftreten einer weiteren Wechselwirkung gleicher Art. Das hat zur Folge, daß nach Erreichen eines kritischen Wertes eine verhältnismäßig geringe Änderung der äußeren Bedingungen zu einer starken Änderung der Struktur führen kann. So ist beispielsweise der pH- oder Temperatur-Bereich, innerhalb dessen sich eine Nuclein-

säure-Doppelhelix in zwei verknüpfte Stränge umwandelt, viel enger, als man erwarten würde, wenn sich die bekannten Wechselwirkungen lediglich summieren. Systeme mit kooperativen Wechselwirkungen können daher auf äußere Einflüsse mit alles-oder-nichts-Reaktionen antworten.

Alle molekularen Wechselwirkungen, seien sie ionaler, hydrophiler oder hydrophober Art, eignen sich auf Grund ihrer kurzen Halbwertszeiten nur zur vorübergehenden Aufnahme von Informationen. Um Informationen permanent zu speichern, d. h. etwa für die Dauer eines menschlichen Lebens, dürften Reaktionen mit einer Aktivierungsenergie von mindestens 25 kcal/Mol notwendig sein, d. h. Umsetzungen, die zur Bildung kovalenter Bindungen führen.

Der Vortrag basierte im übrigen auf einem zuvor den Teilnehmern der Tagung zugesandten Manuskript [*], in dem der Versuch der Neudeinition einer der Psychologie entlehnten, jedoch auf Molekularvorgänge anwendbaren Begriffsskala unternommen wurde. Diese reicht von der einfachen „Wechselwirkung“ auf Grund eines Kraftgesetzes über die „Unterscheidung“, „Erkennung“ bis zur „Erinnerung“ und umfaßt Funktionen wie „Speichern“, „Übertragen“ und „Herauslesen“ von Information, bis zum „Adaptieren“ und „Lernen“. Molekularvorgänge der Unterscheidung sowie der Speicherung, Übertragung und Erkennung von Information sind uns in der Enzymologie und Molekulargenetik durchaus geläufig. Dagegen sind Lern- und Erinnerungsfunktionen, die über eine bloße Adaptation hinausgehen, erst auf zellulärer Ebene bekannt.

In der von L. Onsager (New Haven, Conn.) geleiteten Diskussion berichtete J. Kendrew (Cambridge) über die Struktur des Myoglobins. 70 % des Moleküls haben Helix-Struktur. Zwischen den so geordneten Bereichen gibt es sieben verhältnismäßig kurze Abschnitte, die nicht helixförmig sind. Der längste dieser Abschnitte besteht aus 8 Aminosäuren. Aus der Aminosäuresequenz (das Myoglobin-Molekül hat insgesamt 153 Aminosäurereste) läßt sich mit den heutigen Kenntnissen die Frage nicht beantworten, warum ein Helix-Bereich anfängt und abbricht. Eine Rolle spielen offenbar die vier Prolin-Reste des Moleküls, die sterisch mit einer α -Helix nicht verträglich sind, sowie die sechs Serin- und fünf Threonin-Reste, deren Seitenketten mit der H-Brückenstruktur der Helix interferieren. Einen Einfluß auf das Ende eines helixförmigen Bereiches haben sicher auch Wasserstoffbrücken zwischen den freien Carboxylgruppen von Asparaginsäure-Resten und Amid-NH-Gruppen in der Hauptkette, denn solche Wechselwirkungen sind nur dort möglich, wo ein helixförmiger Bereich aufhört.

Myoglobin stimmt mit den α - und β -Ketten des Hämoglobins hinsichtlich der Tertiärstruktur weitgehend überein. Die Homologien in der Aminosäuresequenz, d. h. in der Primärstruktur der drei Proteinketten, sind verglichen mit dieser

[*] Veröffentlichung in Vorbereitung.