

XIV. Ausblick

Die photochemische Umsetzung von Metallcarbonylen und Metallcarbonyl-Derivaten mit n - und π -Donatoren ermöglicht die Herstellung einer großen Zahl bisher unbekannter Verbindungen. Der hauptsächliche Vorteil des photochemischen Verfahrens liegt darin, instabile Derivate zu synthetisieren. Da andererseits bekannt ist,

daß Metallcarbonyle als Katalysatoren eine bedeutende Rolle spielen, wobei sicher deren instabile Derivate als Zwischenprodukte in den Reaktionsmechanismus eingreifen, kann dieser jetzt näher untersucht werden, wenn nicht das Metallcarbonyl, sondern seine photochemisch hergestellten Derivate direkt als Reaktionspartner eingesetzt werden.

Eingegangen am 28. Februar 1964 [A 391]

Die Funktion der Ribonucleinsäuren im Organismus

Biochemische und cytologische Aspekte
der Übertragung genetischer Information

VON DR. C. PELLING

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR BIOLOGIE, TÜBINGEN
UND

DR. C. SCHOLTISSEK

MAX-PLANCK-INSTITUT FÜR VIRUSFORSCHUNG, TÜBINGEN

Erst durch die Vermittlung der Ribonucleinsäuren kann die genetische Information für die Zelle nutzbar gemacht werden. Im vorliegenden Aufsatz werden die biochemischen Untersuchungen über ihre Rolle im Stoffwechsel kurz zusammengefaßt. Eingehender wird dann über die Struktur und die Funktion der Chromosomen gesprochen: Am Beispiel der Riesenchromosomen wird besonders klar erkennbar, wie die Stoffwechselvorgänge in differenzierten Zellen höherer Organismen von den Chromosomen kontrolliert werden.

A. Einleitung

Die Desoxyribonucleinsäure (DNS) erfüllt im Organismus zwei entscheidende Funktionen: Einmal wird sie nach ihrer identischen Verdoppelung als genetisches Material von Zelle zu Zelle und von Individuum zu Individuum unverändert auf die folgenden Generationen weitergegeben; zum anderen beherrscht sie den Stoffwechsel der Zelle. Zwar hat sie selbst keinen unmittelbaren Anteil an den Stoffwechselvorgängen, sie konserviert aber die Information für die Synthese der Enzym- und Strukturproteine. Diese Information ist in der Nucleotidsequenz verschlüsselt niedergelegt. Schlüsselsubstanz bei der Auswertung der genetischen Information ist die Ribonucleinsäure (RNS). Die Synthese der RNS ist gleichbedeutend mit der Übertragung des Informationsgehaltes bestimmter DNS-Abschnitte des Genoms auf RNS-Moleküle. Von dem meist nur doppelt in der Zelle enthaltenen genetischen Material (diploider Chromosomensatz) können auf diese Weise sehr viele RNS-Kopien hergestellt werden. Diese Kopien gelangen vom Zellkern, dem Ort der RNS-Synthese, in das Cytoplasma, wo die Information bei der Synthese spezifischer Proteine verwertet wird. Drei biochemisch gut charakterisierbare RNS-Typen wirken dabei zusammen, die messenger-RNS, die lösliche oder transfer-RNS und die ribosomale RNS [1–3].

B. Molekulare Grundlagen

1. RNS-Synthese — Übertragung der genetischen Information auf die Ribonucleinsäure

Wie die Information der DNS auf die RNS übertragen wird, folgt aus der DNS-Struktur [4, 5]. Die DNS-Moleküle bestehen aus zwei sich umwindenden Nucleotidketten, die durch Wasserstoffbrücken verbunden sind. Die Teilstränge können sich jedoch nur dann vereinigen, wenn der Purinbase Adenin (A) im anderen Partner jeweils die Pyrimidinbase Thymin (T) und der Purinbase Guanin (G) die Pyrimidinbase Cytosin (C) gegenüberliegt. Da in der Längsrichtung des DNS-Moleküls, in der die Information aufgezeichnet zu denken ist, alle vier Basen beliebig abwechseln können, muß jeder Strang ein strenges — komplementäres — Gegenstück seines Partners sein.

Die Umkopierung der Information auf die Ribonucleinsäure stellt man sich so vor, daß entlang der DNS-Matrize die passenden (wiederum komplementären) RNS-

[1] J. D. Watson, Angew. Chem. 75, 439 (1963).

[2] F. H. C. Crick, Angew. Chem. 75, 425 (1963).

[3] H. G. Wittmann, Naturwissenschaften 50, 76 (1963).

[4] J. D. Watson u. F. H. C. Crick, Nature (London) 171, 737, 964 (1953).

[5] M. H. F. Wilkins, Angew. Chem. 75, 429 (1963).

Nucleotide zu einem Strang verknüpft werden. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß nur einer der beiden komplementären DNS-Stränge bei diesem Vorgang in vivo beteiligt ist [6,7].

Die exakte Übertragung der Nucleotidsequenz läßt sich schwer direkt nachweisen. Die wichtigsten Befunde, die dennoch die Informationsübertragung in der oben angegebenen Weise sicher erscheinen lassen, sind folgende: Die Ribonucleinsäure der Zelle wird im Zellkern synthetisiert, obwohl der größte Teil der RNS der Zelle im Cytoplasma lokalisiert ist [8–11]. Eine autonome cytoplasmatische RNS-Synthese ließ sich dagegen nicht sicher nachweisen. „Entkernte“ Amöben z. B. sind offensichtlich zu einer Synthese von RNS nicht mehr fähig [12,13]. Gegenteilige Befunde [14] haben sich durch die Anwesenheit von Mikroorganismen im Cytoplasma erklären lassen [15,16]. Auch Versuche mit Actinomycin, nach dessen Verwendung die DNS nicht mehr als Matrize funktionieren kann [17–19], machen es wahrscheinlich, daß die gesamte RNS an der DNS im Zellkern synthetisiert wird [20–22]. Wir werden später noch sehen, an welchen Strukturen im Zellkern die RNS-Synthese abläuft.

Die erste Synthese von Ribonucleinsäure in vitro widersprach jedoch zunächst der Vorstellung, daß die RNS-Synthese an die Gegenwart von DNS gebunden sei. *Grunberg-Manago* und *Ochoa* [23] hatten ein Enzym entdeckt, mit dem sie die Diphosphate der vier Nucleoside, deren Monophosphate die Bausteine (Nucleotide) der RNS sind, unter Austritt von Phosphat polymerisieren konnten. Diese Synthese verlief ohne Beisein der DNS, und sie gelang auch mit jedem einzelnen der vier Diphosphate.

In Rattenleberkernen [24] und in Bakterien [25–29] wurde jedoch ein System gefunden, das RNS nur in Gegenwart von DNS lieferte. Als Vorstufen dienten die

vier Nucleosidtriphosphate: War nur eines der Triphosphate vorhanden, trat keine Polymerisation ein. Die entstandene RNS und die zur Synthese verwendete DNS hatten die gleiche Basenzusammensetzung. Die Übereinstimmung des Basenverhältnisses in beiden Nucleinsäuren, die sich auch für manche der in vivo synthetisierten RNS-Fractionen nachweisen ließ, ist aber kein spezifisches Indiz dafür, daß auch die Basensequenz der neusynthetisierten RNS und der DNS-Matrize gleich sind. Verlässlichere Angaben liefern Untersuchungen über die Nachbarschaftsbeziehungen der Nucleotide (nearest neighbour-Methode) [30] und vor allem die künstliche Vereinigung von DNS- und RNS-Strängen. Dabei entstehen Hybridmoleküle, die zunächst aus synthetisierten Molekülen [31], später auch aus natürlich vorkommenden hergestellt wurden. Bei Bakterien hat sich die Hybridbildung zwischen jedem der drei Ribonucleinsäuretypen – der messenger-RNS [32,33], der ribosomalen RNS [34–36] und der transfer-RNS [37] – und den entsprechenden Genomabschnitten (DNS) durchführen lassen.

2. Informationsverwertung bei der Proteinbiosynthese

Nicht allen RNS-Molekülen kommt für die Synthese spezifischer Proteinmoleküle die gleiche Bedeutung zu. Man unterscheidet einen RNS-Typ, dem die Rolle des Informationstransportes vom Genom zum Ribosom zufällt, die messenger-RNS – sie bestimmt die Aminosäure-Sequenz in der wachsenden Polypeptidkette –, von anderen RNS-Fractionen, die Hilfsfunktionen bei der Informationsübertragung haben – der löslichen oder transfer-RNS und der ribosomalen RNS.

Die ribosomale RNS ist Strukturbestandteil der Ribosomen, an denen die Proteinsynthese abläuft. Der Stoffwechsel der beiden definierten ribosomalen RNS-Fractionen (Sedimentationskonstanten 16 S und 23 S; Molekulargewichte $\approx 5 \cdot 10^5$ bzw. $\approx 1 \cdot 10^6$) ist gering [38]. Der Beitrag dieses RNS-Typs zur Proteinsynthese ist noch nicht geklärt. Er mag die strukturellen Voraussetzungen

- [6] J.-E. Edström u. W. Beermann, J. biophysic. biochem. Cytol. 14, 371 (1962).
- [7] M. Hayashi, M. N. Hayashi u. S. Spiegelman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 50, 664 (1963).
- [8] L. Goldstein u. W. Plaut, Proc. nat. Acad. Sci. USA 41, 874 (1955).
- [9] R. McMaster-Kaye u. J. H. Taylor, J. biophysic. biochem. Cytol. 4, 5 (1958).
- [10] M. Zalokar, Nature (London) 183, 1330 (1959).
- [11] C. Pelling, Nature (London) 184, 655 (1959).
- [12] D. M. Prescott, J. biophysic. biochem. Cytol. 6, 2, 203 (1959).
- [13] D. M. Prescott, Exp. Cell Res. 19, 29 (1960).
- [14] W. Plaut u. R. C. Rustad, Biochim. biophysica Acta 33, 59 (1959).
- [15] M. Rabinovitch u. W. Plaut, J. Cell Biol. 15, 525, 535 (1962).
- [16] D. R. Wolstenholme, J. Cell Biol., im Druck.
- [17] W. Kersten u. H. Kersten, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 330, 21 (1962).
- [18] J. Hurwitz, J. J. Furth, M. Malamy u. M. Alexander, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1222 (1962).
- [19] J. A. Goldberg, M. Rabinowitz u. E. Reich, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 2094 (1962).
- [20] E. Harbers u. W. Müller, Biochem. biophysic. Res. Commun. 7, 107 (1962).
- [21] V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1590 (1962).
- [22] M. Izawa, V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 544 (1963).
- [23] M. Grunberg-Manago u. S. Ochoa, J. Amer. chem. Soc. 77, 3165 (1955).
- [24] S. B. Weiss, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1020 (1960).
- [25] J. Hurwitz, A. Bresler u. R. Diringier, Biochem. biophysic. Res. Commun. 3, 15 (1960).

- [26] A. Stevens, Biochem. biophysic. Res. Commun. 3, 92 (1960).
- [27] S. Ochoa, D. P. Burma, H. Kröger u. J. D. Weill, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 670 (1961).
- [28] M. Chamberlain u. P. Berg, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 81 (1962).
- [29] W. Doerfler, W. Zillig, E. Fuchs u. M. Albers, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 330, 96 (1962).
- [30] S. B. Weiss u. T. Nakamoto, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1400 (1961).
- [31] C. L. Schildkraut, J. Marmur, J. R. Fresco u. P. Doty, J. biol. Chemistry 236, PC 2 (1961).
- [32] B. D. Hall u. S. Spiegelman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 137 (1961).
- [33] M. Hayashi u. S. Spiegelman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 47, 1564 (1961).
- [34] S. A. Yankofsky u. S. Spiegelman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1069 (1962).
- [35] S. A. Yankofsky u. S. Spiegelman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1466 (1962).
- [36] S. A. Yankofsky u. S. Spiegelman, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 538 (1963).
- [37] H. M. Goodman u. A. Rich, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 2101 (1962).
- [38] C. J. Davern u. M. Meselson, J. molecular Biol. 2, 153 (1960).

für die Anheftung anderer Ribonucleinsäuretypen am Ribosom bieten oder auch die Information für die Synthese ribosomaler Strukturproteine enthalten. Jedenfalls legt er nicht die Aminosäuresequenz der am Ribosom synthetisierten Proteine fest, wie man früher annahm.

Diese Eigenschaft haben *Brenner* [39] und *Gros* [40] der messenger-RNS zugeschrieben [41]. Sie bildet mit den Ribosomen Komplexe (Polysomen), an denen die Proteinsynthese abläuft [42–44]. Im allgemeinen ist dieser RNS-Typ wenig stabil [45] und heterogen.

Um die Proteinsynthese zu unterhalten, muß die messenger-RNS in den meisten Fällen ständig nachgeliefert werden. Dementsprechend verarmen protein-synthetisierende Systeme *in vitro* sehr rasch an diesen Fraktionen und werden erst wieder stimuliert, wenn erneut messenger-RNS zugeführt wird. Diese Wirkung haben auch künstlich hergestellte RNS-Typen. Deren einfache Zusammensetzung erlaubt auch den einwandfreien Nachweis, daß die Art der verwendeten Ribonucleinsäure die Aminosäurezusammensetzung der *in vitro* synthetisierten Polypeptide bestimmt [46, 47].

Die Eigenschaften der messenger-RNS erforschte man im wesentlichen an Bakterien [48–50]. Grundsätzlich

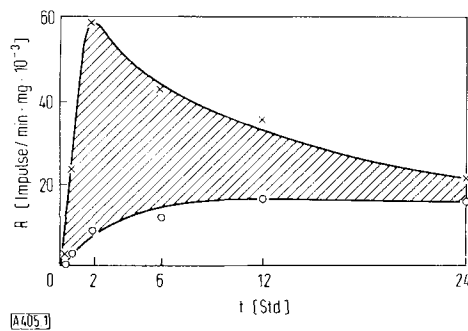


Abb. 1. Änderung der spezifischen Radioaktivität (R) der während der Inkubation *in vitro* aus den Rattenleberkernen austretenden RNS in Abhängigkeit von der Markierungszeit *in vivo* (t). Die Kerne wurden mit 1 mg ^{14}C -Orotsäure (0,95 mC/mMol) pro Ratte *in vivo* verschieden lang markiert und anschließend inkubiert. Etwa 5 % der Zell-RNS verlassen die Kerne [53]. (—x—x—): Spezifische Radioaktivität vor der Inkubation. (---o---o---): Spezifische Radioaktivität der in den Kernen zurückbleibenden RNS nach 4 Std. Inkubationszeit. Die Schraffur veranschaulicht die Synthese dieser RNS-Fraktion und ihr Verschwinden aus dem Kern.

- [39] S. Brenner, F. Jacob u. M. Meselson, *Nature* (London) 190, 576 (1961).
- [40] F. Gros, H. Hiatt, W. Gilbert, C. G. Kurland, R. W. Risenbrough u. J. D. Watson, *Nature* (London) 190, 581 (1961).
- [41] F. Jacob u. J. Monod, *J. molecular Biol.* 3, 318 (1961).
- [42] F. O. Wettstein, T. Staehelin u. H. Noll, *Nature* (London) 197, 430 (1963).
- [43] J. R. Warner, P. M. Knopf u. A. Rich, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 49, 122 (1963).
- [44] A. Gierer, *J. molecular Biol.* 6, 148 (1963).
- [45] C. Levinthal, A. Keynan u. A. Higa, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 1631 (1962).
- [46] J. H. Matthaei u. H. W. Nirenberg, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 1580 (1961).
- [47] H. W. Nirenberg u. J. H. Matthaei, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 1588 (1961).
- [48] A. Ishihama, N. Mizuno, M. Takai, E. Otaka u. S. Osawa, *J. molecular Biol.* 5, 251 (1962).
- [49] B. P. Sagik, M. H. Green, M. Hayashi u. S. Spiegelman, *Biophysic. J.* 2, 409 (1962).
- [50] R. Monier, S. Naono, D. Hayes, F. Hayes u. F. Gros, *J. molecular Biol.* 5, 311 (1962).

aber gelten dieselben Charakteristika für die Informationsübertragende RNS höherer Organismen. So konnte *Scholtissek* [51–53] in Rattenleberkernen eine RNS markieren, die schon bei kurzer Inkubation *in vitro* aus den Kernen austrat (s. Abb. 1). Im Gegensatz zur kaum markierten cytoplasmatischen RNS zeigt die aktive Fraktion einen hohen Umsatz. Diese Fraktion, die sich in ihrem Oligonucleotidmuster nach RNase-Abbau charakteristisch von anderen RNS-Fractionen unterscheidet, kann einige Zeit nach der Markierung *in vivo* noch teilweise in einer Ribosomenfraktion des Cytoplasmas („Post-mikrosomen“) wiedergefunden werden. Nach 24 Std. ist sie jedoch nicht mehr nachzuweisen. Andere Autoren zeigten, daß gerade Leberkern-RNS die Protein-Synthese eines *in vitro*-Systemes besonders stark zu stimulieren vermag [54]. Ob dabei auch leber-spezifische Proteine synthetisiert werden, ist nicht bekannt. Instabile, unterschiedlich sedimentierende RNS-Fractionen sind inzwischen in vielen Säugetierzellen gefunden worden [55–59].

Die lösliche oder transfer-RNS überträgt die auf der messenger-RNS enthaltene Information von der Ebene der Nucleinsäure auf die Ebene des Proteins. Dieser Vermittlungsfunktion entspricht ihr Zwittercharakter: Die relativ kurze Nucleinsäure von durchschnittlich etwa 80 Nucleotiden kann an einem Ende covalent eine Aminosäure binden [60]. Für jede Aminosäure gibt es mindestens eine spezifische transfer-RNS [61]. Die „richtigen“ transfer-RNS-Moleküle und damit zugleich die „richtigen“ Aminosäuren werden von der messenger-RNS an das NH_2 -Ende [62, 63] der wachsenden Peptidkette dirigiert. Man stellt sich vor, daß jeweils eine Gruppe von drei Nucleotiden (Triplett oder Codon) der messenger-RNS durch eine spezifische Paarung mit einem komplementären Triplett (Anticodon) der transfer-RNS die endständige Aminosäure in die zur Verknüpfung geeignete Position bringt [64]. Nacheinander werden so aufeinanderfolgende Triplets der messenger-RNS in die dazugehörigen Aminosäuren der Proteine übersetzt.

- [51] C. Scholtissek, J. H. Schneider u. V. R. Potter, *Federat. Proc.* 17, 306 (1958).
- [52] C. Scholtissek u. V. R. Potter, *Z. Naturforsch.* 15b, 453 (1960).
- [53] C. Scholtissek, *Nature* (London) 194, 353 (1962).
- [54] S. H. Barondes, C. W. Dingman u. M. B. Sporn, *Nature* (London) 196, 145 (1962).
- [55] H. H. Hiatt, *J. molecular Biol.* 5, 217 (1962).
- [56] A. Sibatani, S. R. deKloet, V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 471 (1962).
- [57] P. A. Marks, C. Willson, J. Kruh u. F. Gros, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 8, 9 (1962).
- [58] K. Scherrer u. J. E. Darnell, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 7, 486 (1962).
- [59] D. T. Tamaoki u. G. C. Mueller, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* 9, 451 (1962).
- [60] M. B. Hoagland, P. C. Zamecnik u. M. L. Stephenson, *Biochim. biophysica Acta* 24, 215 (1957).
- [61] P. Berg, *Annu. Rev. Biochem.* 30, 293 (1961).
- [62] J. Bishop, J. Lealey u. R. Schweet, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 1030 (1960).
- [63] H. Dintzes, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 47, 247 (1961).
- [64] F. Chapeville, F. Lipmann, G. v. Ehrenstein, B. Weisblum, W. J. Ray u. S. Benzer, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 48, 1086 (1962).

C. Cytologische Aspekte der Informationsübertragung

Nicht alles, was wir heute über die Informationsübertragung wissen, verdanken wir biochemischen Untersuchungen. RNS- und Proteinsynthese lassen sich in den Zellen höherer Organismen auch ohne Zerstörung der Gewebe und die anschließende Isolierung und Charakterisierung einzelner Substanzen verfolgen. Detaillierte und zugleich anschauliche Ergebnisse liefert besonders das cytologische Studium der RNS-Synthese.

1. Riesenchromosomen als Studienobjekt

An Indizien für eine physiologische Aktivität der Chromosomen hat es lange Zeit ganz gefehlt, denn gerade in ihrer stoffwechselaktiven Phase – der Interphase – sind die Chromosomen nicht als diskrete Einheiten zu erkennen, sondern erfüllen den Zellkern als glasig-gequollenes Material. Das morphologische Studium von ausgestreckten (entspiralisierten) Interphasechromosomen wäre erfolglos geblieben, wenn man nicht in Gestalt der Riesenchromosomen besonders günstige Objekte gefunden hätte.

In den großen Zellkernen von Dipteren (Fliegen und Mücken) wurden von *Balbani* schon 1881 riesige, unregelmäßig quer-gestreifte „Kernfäden“ entdeckt [65], deren Chromosomen-natur man erst 50 Jahre später erkannt hat [66]. Diese Riesenchromosomen entstehen in Zellen, die sich nicht mehr teilen, durch viele Verdoppelungsschritte aus einfachen Chromosomen. Die Chromosomenfäden bleiben nach der Neubildung miteinander verbunden, so daß allmählich kabel-artige Fibrillenbündel von mehr als 10000 Einzelementen entstehen, die bis zu 300 μ lang und bis zu 20 μ breit sein können.

2. Chromomeren als Einheiten chromosomaler Struktur

Die DNS verteilt sich über das Chromosom nicht gleichmäßig, sondern besitzt in unregelmäßigen Abständen Schwerpunkte, die Chromomeren. Durch sie erhält der Chromosomenfaden das Aussehen einer unregelmäßigen Perlenkette. Im Riesenchromosom erscheint jedoch jedes Chromomer als Querscheibe, denn an Stelle des Einzelementes sind durch die wiederholten Vermehrungsschritte viele homologe, in einer Ebene angeordnete Chromomeren getreten. Ein Chromomer ist zunächst nur morphologisch definiert als eine DNS-Ansammlung bestimmter Größe an einem bestimmten Ort längs des chromosomalen Fadens, die lichtmikroskopisch nicht in Untereinheiten aufzulösen ist. Die Anzahl der in einem Chromosomensatz enthaltenen Chromomeren läßt sich nicht genau angeben. Immerhin kann man bei *Chironomus* etwa 1900, bei *Drosophila* 5149 Querscheiben abzählen.

Eine der beiden entscheidenden Syntheseleistungen, die das Chromosom zu bewältigen hat, die DNS-Synthese, wird weder vom Chromosom als Gesamtheit noch von cytologisch nicht mehr faßbaren Strukturen, sondern von Untereinheiten geleistet, die genau den Chromo-

meren entsprechen. Durch radioaktive Markierung kann nachgewiesen werden, daß die einzelnen Chromomeren während eines Replikationszyklus unterschiedlich lange Zeit brauchen, um ihre DNS zu verdoppeln, gestaffelt – soweit man dies morphologisch beurteilen kann – nach ihrem DNS-Gehalt: Querscheiben mit dem höchsten DNS-Gehalt benötigen die längste Zeit [67]. In diesem Befund kommt ein wesentlicher Unterschied zwischen der Konstruktion des Bakteriengenoms und dem der höheren Organismen zum Ausdruck. Das Bakterien-„Chromosom“ ist eine Replikationseinheit für sich [68,69]. Das Chromosom höherer Organismen dagegen besteht aus Tausenden solcher Einheiten – den Chromomeren. Die Bedeutung des Chromomers als chromosomale Struktureinheit wird durch cytophotometrische Untersuchungen von *Keyl* besonders hervorgehoben [70]: Die einfache oder mehrfache Verdoppelung des DNS-Gehaltes von Chromomeren scheint ein wichtiges Prinzip für die Evolution des genetischen Materials überhaupt zu sein.

Ob die Chromomeren, wie es scheint, voneinander getrennt angeordnete DNS-Moleküle sind, oder ob es sich bei ihnen nur um lokal aufgefaltete Strukturen eines durch das ganze Chromosom laufenden kontinuierlichen DNS-Stranges handelt [71,72], soll nicht diskutiert werden.

3. Chromomeren als Funktionseinheiten

Jedes Speicheldrüsenpräparat von *Chironomus tentans* (Abb. 2) enthält das nach Anordnung und DNS-Gehalt artspezifische Chromomeren- (Querscheiben-)muster in den vier Chromosomen seiner Kerne. Stark anfärbbare

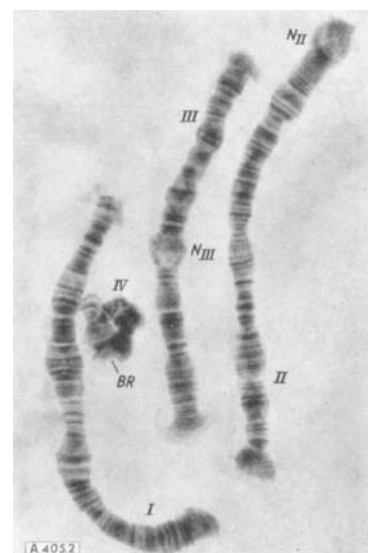


Abb. 2. Riesenchromosomen einer Speicheldrüsenzelle von *Chironomus tentans*. Chromosomen I–IV, Bereiche der beiden Nucleolen (NII und NIII), größter Balbianiring (BR). Anfärbt mit Carmin-Orcein-Essigsäure. Nach [95], verändert.

[67] H.-G. Keyl u. C. Pelling, *Chromosoma* 14, 347 (1963).

[68] J. Cairns, *J. molecular Biol.* 6, 208 (1963).

[69] F. Bonhoeffer u. A. Gierer, *J. molecular Biol.* 7, 534 (1963).

[70] H.-G. Keyl, *Naturwissenschaften* 51, 46 (1964).

[71] H. Swift in *John M. Allen: The Molecular Control of Cellular Activity*. McGraw-Hill, New York 1962, S. 73–125.

[72] J. G. Gall in: *Cytodifferential and Macromolecular Synthesis*. Academic Press, New York 1963, S. 119–143.

[65] E. G. Balbiani, *Zool. Anz.* 4, 637 (1881).

[66] E. Heitz u. H. Bauer, *Z. Zellforsch.* 17, 67 (1933).

und scharf konturierte Scheiben wechseln mit kaum gefärbten Zwischenscheiben ab. Bestimmte Querscheiben zeigen jedoch einen spezifischen und reversiblen Formwandel, indem sie sich auflockern und ihre scharf begrenzte Struktur verlieren. Diesem „puffing“ (to puff = sich aufblähen) schrieb *Beermann* funktionelle Bedeutung zu [73]. Besonders die Tatsache, daß jedes Organ durch ein spezifisches „puff“-Muster charakterisiert ist,

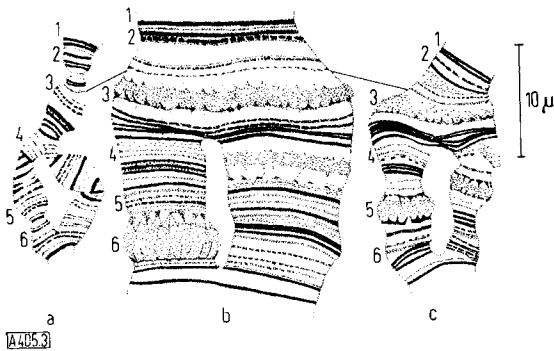


Abb. 3. Gewebespezifische Ausbildung aktiver Querscheiben (1–6) von *Chironomus tentans*; Region 14 des 3. Chromosoms (mit Inversion) in: a) Mitteldarm; b) Speicheldrüse; c) Malpighigefäß. Nach [73], verändert.

war Grund für die Vermutung, daß die Aktivität des Genoms an diesen Orten sichtbar wird (Abb. 3). Das diesen Beobachtungen entsprechende Konzept der differentiellen Genaktivierung besagt, daß die unterschiedlichen Leistungen der Zellen innerhalb der Gewebe eines Organismus auf die Aktivierung einer unterschiedlichen



Abb. 4. Ribonucleinsäure-Nachweis im Speicheldrüsenkern von *Chironomus tentans*. Toluidinblau. Orthochromatischer Farbton (Blau) für DNS, metachromatischer Farbton (Rot) für RNS charakteristisch. Zahlreiche aktive Querscheiben unterschiedlicher Größe, darunter der Nukleolenbildungsort des 2. Chromosoms (rechts unten im Bild). Aus *Chromosoma* 15, 77 (1964), Springer-Verlag [74].



Abb. 5. Vergleich zwischen DNS- und RNS-synthetisierenden Strukturen im Speicheldrüsenkern von *Chironomus tentans*. a) DNS-Markierung, Autoradiogramm 3 Tage nach Gabe von ^3H -Thymidin. Nach *Pelling* aus [94], verändert. b) RNS-Markierung, Autoradiogramm 30 min nach Gabe von ^3H -Uridin. Nach [74], verändert. Zeichenerklärung siehe Abbildung 2.

Auswahl von Genen zurückgehen. Diese Vorstellungen haben sich als überaus fruchtbar für das Verständnis der Differenzierung von Zellen erwiesen.

Histochemisch läßt sich nachweisen, daß gerade diese morphologisch so auffallenden Plätze des Genoms als einzige RNS enthalten (Abb. 4). Die Synthese-Funktion kann autoradiographisch demonstriert werden [11, 74].

[73] *W. Beermann*, *Chromosoma* 5, 139 (1952).

Schon wenige Minuten nach Gabe von tritiummarkierten Ribonucleinsäurevorstufen kann man dort eine starke radioaktive Markierung beobachten. Die örtliche Selektivität der RNS-Synthese des Genoms kommt besonders zum Ausdruck, wenn man die Verteilung radioaktiv markierter RNS mit der DNS-Verteilung vergleicht (Abb. 5 a und 5 b).

[74] *C. Pelling*, *Chromosoma* 15, 71 (1964).

Die aktiven Querscheiben des Genoms stellen zu keiner Zeit ein statisches System dar. Auch innerhalb eines Zelltyps ändert sich die Auswahl aktiver Querscheiben ständig. Bestimmte Querscheiben hören mit der Synthese auf, andere werden dafür aktiv. Bei den Speicheldrüsen der Zuckmücke *Chironomus tentans* können von insgesamt etwa 1900 lichtmikroskopisch identifizierbaren Querscheiben etwa 300 aktiv sein, jedoch höchstens zwei Drittel von ihnen gleichzeitig [74]. Die Funktion jeder einzelnen aktiven Querscheibe ist noch nicht bekannt. Man weiß weder, ob die Gesamtinformation der in einer Querscheibe enthaltenen DNS auf die RNS übertragen wird, oder ob nur bestimmte Abschnitte „gelesen“ werden. Die Anzahl der von einer aktiven Querscheibe synthetisierten RNS-Fractionen ist ebenso unbekannt wie die Anzahl der von einer RNS-Fraction codierten Proteine. Aus der Abzählung der aktiven Querscheiben geht lediglich hervor, daß mindestens 200 – verschiedene [75] – RNS-Fractionen gleichzeitig in den Speicheldrüsen der Zuckmücke synthetisiert werden. Eine Aufgliederung dieser 200 Fractionen nach den drei RNS-Typen macht wiederum Schwierigkeiten. Die einzige Zuordnung von einer aktiven Querscheibe und einer definierten RNS, die sich gegenwärtig abzeichnet, betrifft den Nucleolus (s. Abbildungen), eine auffällige Nucleoproteidkugel, die in allen Zellen des Tier- und Pflanzenreiches vorkommt und jeweils an bestimmte Chromosomenorte genetisch gebunden ist. Der Nucleolus enthält besonders viel RNS. Er besitzt eine eigene RNS-Syntheseleistung [11, 76–79]; seine RNS unterscheidet sich in ihrer Basenzusammensetzung beträchtlich von allen übrigen chromosomalen RNS, ähnelt darin aber auffallend der cytoplasmatischen RNS [75, 80]. Dieser Befund ließ bereits eine Beziehung von nucleolärer und ribosomaler RNS vermuten (mindestens 80 % der cytoplasmatischen RNS sind ribosomale RNS).

Perry [81] sowie Chipchase und Birnstiel [82] haben mehrere übereinstimmende Merkmale von ribosomaler und nucleolärer RNS festgestellt. Der Syntheseort nucleolärer RNS läßt sich im Speicheldrüsen-Autoradiogramm genauer erkennen. Der Nucleolus fällt nämlich nicht nur durch die eingebaute Menge, sondern durch das merkwürdige Markierungsschema auf: Die radioaktiven Substanzen gelangen von der Ansatzstelle des Chromosoms in den Nucleolus (Abb. 6), so daß man den Eindruck gewinnt, das Chromosom synthetisiere die nucleoläre RNS selbst. Für diese Annahme gibt es weitere Stützen. Man kann in der Region, die zuerst markiert wird, DNS nachweisen, die vom Chromosom ausgehend in den Nucleolus ausstrahlt (s. Abb. 5a, N_{II}). Dieser DNS des „Nucleolenbildungsortes“ wird man die Synthese zu-

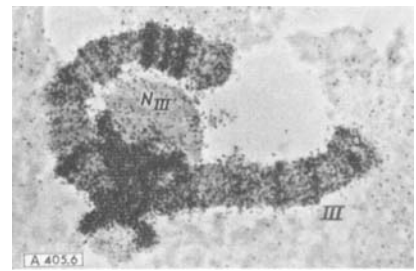


Abb. 6. RNS-Synthese im Bereich des Nucleolus (N_{III}) des Chromosoms III von *Chironomus tentans*. Autoradiogramm 30 min nach Gabe von ³H-Uridin (Original).

mindest eines großen Teiles der nucleolären und damit wahrscheinlich der ribosomalen RNS zuzuschreiben haben.

An den meisten anderen aktiven Genorten wird wahrscheinlich messenger-RNS synthetisiert. Dafür spricht die zuvor erwähnte Heterogenität der messenger-RNS. Die zahlreichen unterschiedlichen RNS-Fractionen, für die Codierung der verschiedenartigsten Peptidketten bestimmt, sollten ihre Herkunft auch zahlreichen unterschiedlichen Genorten verdanken.

Die Herkunft der transfer-RNS bleibt jedoch ganz unklar. Bei Bakterien kommt für ihre Synthese nur ein sehr kleiner Teil des Genoms (0,025 %) in Frage [37]. Wenn man dieses Ergebnis auch auf höhere Organismen übertragen darf, kann man damit rechnen, daß sich nur wenige Genorte, vielleicht nur einer, an der Synthese dieses RNS-Typs beteiligen.

4. Regulation der RNS-Synthese

Die Untersuchungen über die RNS-Synthese der Riesenchromosomen haben gezeigt, daß im Prinzip jede aktive Querscheibe alle Zustände zwischen Syntheseruhe und einer individuellen Maximalleistung einnehmen kann: Am Genom findet eine Regulation der RNS-Synthese statt. Freilich ist eine Steuerung der RNS-Synthese nicht der einzige denkbare Weg, die Informationsübertragung zu beeinflussen und dadurch die Stoffwechselvorgänge unter Kontrolle zu halten. Die genetische Information könnte auch auf dem Wege vom Zellkern ins Cytoplasma selektiv zerstört oder stabilisiert werden [54, 83]. In diesen Zusammenhang gehört die Frage nach der Lebensdauer von messenger-RNS-Molekülen im Stoffwechsel [45]. Es scheint außerdem, daß der Transkriptionsvorgang an den Ribosomen während der Proteinsynthese regulierbar ist [84]. Tatsächlich ist das Genom aber der zentrale Angriffspunkt für einen Regulationsmechanismus. Wir beschränken uns daher darauf, von den Befunden an Riesenchromosomen ausgehend, Vorstellungen über die Regulation der RNS-Synthese in höheren Organismen zu gewinnen.

Die Syntheseleistung der aktiven Querscheiben geht mit ihrer Auflockerung einher. Kehrt die Querscheibe in ihren inaktiven Zustand zurück, so konzentriert sich die DNS zunehmend auf engstem Raum. Wenn man ver-

[83] C. Scholtissek, Biochem. Z. 332, 467 (1960).

[84] Y. Ohtaka u. S. Spiegelman, Science (Washington) 142, 493 (1963).

[75] J.-E. Edström u. W. Beermann, J. biophysic. biochem. Cytol. 14, 371 (1962).

[76] J. L. Sirlin, Exp. Cell Res. 19, 177 (1960).

[77] R. P. Perry, Exp. Cell Res. 20, 216 (1960).

[78] R.-J. McMaster-Kaye, J. biophysic. biochem. Cytol. 8, 365 (1960).

[79] R. P. Perry, J. biophysic. biochem. Cytol. 11, 1 (1961).

[80] J.-E. Edström, W. Grampp u. N. Schor, J. biophysic. biochem. Cytol. 11, 549 (1961).

[81] R. P. Perry, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 2179 (1962).

[82] M. I. H. Chipchase u. M. L. Birnstiel, Proc. nat. Acad. Sci. USA, im Druck.

nachlässigt, daß die Querscheiben der Riesenchromosomen während dieser Strukturveränderung ihre RNS-Syntheseleistung auch quantitativ über mindestens zwei Zehnerpotenzen hinweg regulieren können – dies scheint eine spezielle Eigenschaft der Riesenchromosomen zu sein [74] – bleiben zwei Hauptfragen übrig:

1. Worin besteht die Aktivierung oder Inaktivierung des Genoms? und

2. Durch welche Mechanismen wird diese Aktivierung oder Inaktivierung gesteuert?

Bakteriengenetische Untersuchungen und Beobachtungen an höheren Organismen führten zu zwei formal ähnlichen Modellvorstellungen. Bei Bakterien beeinflussen nach *Jacob* und *Monod* spezifische Repressorstoffe, deren Synthese unter ständiger Kontrolle bestimmter Gene steht, über Schlüsselabschnitte (Operatorgene) die Synthese-Aktivität eines oder mehrerer zusammenhängender informatorischer Gene. Diese Wirkung ist steuerbar; bestimmte Effektor-Substanzen (Induktoren oder Corepressoren) sollen imstande sein, den spezifischen Einfluß des Repressors am Genom zu ermöglichen (Repression) oder aufzuheben (Induktion) [41, 85].

Bei höheren Organismen werden für die Inaktivität bestimmter Chromosomenabschnitte die Histone verantwortlich gemacht, basische Proteine, die mit der DNS vergesellschaftet sind. Zu einer RNS-Synthese kommt es erst nach Freilegung der DNS, wie Versuche *in vitro* gezeigt haben [86–88]. Die beobachtete Auflockerung aktiver Querscheiben und die ebenfalls von einzelnen Chromomeren ausgehende Schleifenbildung bei Lampenbürstenchromosomen [72, 89] lassen sich ausgezeichnet in diese Befunde einordnen. Auch bei höheren Organismen sind Stoffe bekannt, mit denen die RNS-Synthese spezifischer Loci des Genoms induziert werden kann. *Clever* und *Karlson* gelang es, bei *Chironomus tentans* durch das Häutungshormon Ecdyson definierte Chromomeren zu aktivieren [90].

Die Ergebnisse, die man an höheren Organismen gewonnen hat, lassen sich trotz der scheinbaren Analogie von Repressorsubstanz und Histon sowie von bakteriellem Induktor und dem Induktionshormon Ecdyson durchaus nicht zwanglos in das Regulationsmodell der Bakterien einfügen.

Dies zeigt sich zum Beispiel, wenn wir das Repressormodell konsequent auf höhere Organismen anwenden. Für den Repressor der Bakterien wird gefordert, daß er unter ständiger genetischer Kontrolle steht. Das bedeutet, daß die RNS-Synthese des Repressorgens in Gang bleiben muß, um die RNS-Synthese eines anderen Gens oder einer operativen Einheit zu regulieren. Vereinfachend kommt man zu der Schlußfolgerung, daß man höchstens die Hälfte aller Gene oder operativen Einheiten auf diese Weise regulieren oder blockieren

könnte, weil die andere Hälfte zur Herstellung der Repressoren aktiv bleiben müßte. (Unberücksichtigt bleibt dabei die Frage, womit, wenn erforderlich, die regulatorischen Gene reguliert werden sollen.) Ein solches Regulationsystem wäre überfordert, wenn man von ihm verlangt, was im Falle ausdifferenzierter Zellen der höheren Organismen offensichtlich verwirklicht ist, nämlich 90 % der Gene inaktiv zu halten und die RNS-Synthese der restlichen 10 % dennoch zu regulieren. Eine „aktive“ Stilllegung wäre auch für solche Organismen, die in ihren Geweben die Mehrzahl der Gene ständig blockiert halten, ein unökonomisches Prinzip – selbst, wenn man verschiedene Gengruppen zu regulierten Einheiten zusammenfaßte.

So gibt es keine Anhaltspunkte dafür, daß die Histone äußerst spezifische, unter ständiger genetischer Kontrolle synthetisierte Verbindungen sind. Sie scheinen vielmehr auf unspezifische Weise den Normalzustand der Gene in den höheren Organismen zu garantieren, den Zustand der Inaktivität. In dieses Bild paßt, daß nur die DNS höherer Organismen als DNS-Histon-Komplex vorliegt, nicht aber die bakterielle DNS [91, 92].

Weiterhin kann man die Dimensionsunterschiede betrachten. Eine regulierte Einheit im Bakterien-„Chromosom“ ist so klein, daß Hunderte oder Tausende auf dem Bakteriengenom Platz haben. Die regulierten Einheiten des Chromosoms höherer Organismen sind nach Untersuchungen an Riesen- und Lampenbürstenchromosomen Strukturen von der Größe eines Chromomers, dessen durchschnittliche DNS-Menge nur um etwa eine Größenordnung unter derjenigen eines Bakterien-„Chromosoms“ liegt. – Unberührt bleibt dabei das Problem, ob das ganze Material oder nur Teile des Chromomers zur RNS-Synthese herangezogen werden und ob innerhalb einer solchen Einheit weitere Regulationsmechanismen am Werke sind.

Auch zwischen den bakteriellen Induktoren einerseits und dem Induktionshormon Ecdyson andererseits, fällt ein Unterschied auf: Die äußerst geringe Konzentration von Ecdyson, die zur Induktion der lokusspezifischen RNS-Synthese ausreicht, sowie der über lange Zeit in der Larve aufrechterhaltene Hormontiter lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß das Ecdyson ein Induktor im Sinne eines Substrates oder Substratanalogen für ein von der lokusspezifischen RNS codiertes Enzym ist. Dies müßte aber gefordert werden, wenn man den einfachen Fall des bakteriellen Induktionsmechanismus zum Vergleich heranzieht. Die weitreichende Verallgemeinerung einer allosterischen Veränderung des Repressors [93] wollen wir dabei außer Betracht lassen.

Man sollte die Genaktivierungen am Genom höherer Organismen (Chromomerenaktivierung) nicht nur unter dem Eindruck diskutieren, daß sie möglicherweise den hypothetischen Regulationsmechanismen der Bakterien ähneln, auch wenn wir noch keine Kenntnis von den eigentlich regulierenden Mechanismen besitzen.

[85] P. Starlinger, Angew. Chem. 75, 71 (1963).

[86] R.-c.C. Huang u. J. Bonner, Proc. nat. Acad. Sci. USA 48, 1216 (1962).

[87] V. G. Allfrey, V. C. Littau u. A. E. Mirsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 49, 414 (1963).

[88] J. Bonner u. R.-c.C. Huang, J. molecular Biol. 6, 169 (1963).

[89] J. G. Gall in W. D. McElroy u. B. Glas: Chemical Basis of Development. Johns Hopkins Press, Baltimore 1958, S. 103–135.

[90] U. Clever u. P. Karlson, Exp. Cell Res. 20, 623 (1960).

[91] G. Zubay u. M. R. Watson, J. biophysic. biochem. Cytol. 5, 51 (1959).

[92] M. H. F. Wilkins u. G. Zubay, J. biophysic. biochem. Cytol. 5, 55 (1959).

[93] F. Jacob u. J. Monod in: Cyto-differential and Macromolecular Synthesis. Academic Press, New York 1963, S. 30–63.

D. Schlußbemerkung

Das weitere Schicksal der RNS im Stoffwechsel ist cytologisch nicht mehr im einzelnen zu verfolgen. Man kann zwar beobachten, daß die Radioaktivität, die kurze Zeit nach der Gabe tritium-markierter Nucleoside die Anwesenheit neugebildeter RNS im Zellkern beweist, später mehr und mehr ins Cytoplasma eindringt. Durch Injektion radioaktiver Aminosäuren läßt sich auch demonstrieren, daß die Proteine hauptsächlich im Cytoplasma synthetisiert werden (Abb. 7). Im Gegensatz zur RNS-Synthese aber, die an lichtmikroskopisch noch gut analysierbaren Strukturen des Zellkerns abläuft, spielt sich die Proteinsynthese an wesentlich kleineren Partikeln ab, z.B. den Polysomen. Wir dürfen jedoch erwarten, daß die weitere Entwicklung der elektronenmikroskopischen Technik, insbesondere einer elektronenmikroskopischen Histochemie, tiefere Einblicke auch in die Funktion plasmatischer Strukturen erlauben wird.

[94] W. Beermann in: Ber. 7. Tagung Dtsch. Ges. Anthropol. Musterschmidt Verlag, Göttingen 1961, S. 13–35.

[95] C. Pelling in: Tritium in the Physical and Biological Sciences 2, IAEA, Wien 1962, S. 327–334.

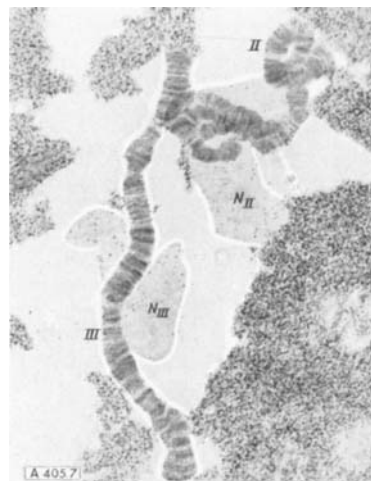


Abb. 7. Proteinsynthese in den Speicheldrüsenzellen von *Chronomus tentans*: Starke Markierung des Cytoplasmas bei sehr geringer Markierung der Chromosomen. Autoradiogramm 2 Std. nach Gabe von ^3H -Leucin. Nach Pelling aus [94], verändert. Zeichenerklärung siehe Abb. 2.

Dem Springer-Verlag danken wir für die Überlassung der Farbklichschees zu Abbildung 4 sowie Herrn Freiberg für die sorgfältige Ausführung der Abbildungsvorlagen.

Eingegangen am 17. Februar 1964 [A 405]

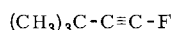
ZUSCHRIFTEN

1.2.3-Tri-*t*-butyl-trifluorbenzol durch spontane Trimerisierung von *t*-Butyl-fluoracetylen [1]

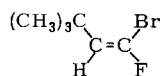
Von Dr. H.-G. Viehe, Dipl.-Ing. R. Merényi,
Dr. J. F. M. Oth und P. Valange [2]

Union Carbide European Research Associates,
Brüssel (Belgien)

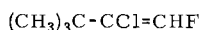
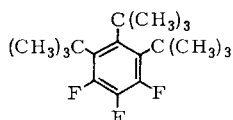
t-Butylfluoracetylen (1) konnte als erstes alkyl-substituiertes Fluoracetylen aus den Fluor-halogenäthylenen (2a) und (2b) durch Dehydrohalogenierung mit festem Kaliumhydroxyd bei etwa 120°C und 35 Torr dargestellt werden. Es ist unverdünnt nur bei tiefen Temperaturen haltbar, bei Zimmertemperatur läßt es sich nur als Gas oder in verdünnter Äther-



(1)



(2a)



(2b)

(3), $T_p = 112-114^\circ\text{C}$

IR: $\text{C}=\text{C}$ bei $6,28 \mu$

UV: $\lambda_{\text{max}} = 209; 228; 266; 319 \text{ m}\mu$

$\epsilon \cdot 10^{-3} = 14,7; 19,1; 4,1; 0,79$

lösung kurze Zeit unzersetzt handhaben. Als Flüssigkeit liefert (1) schon unterhalb 0°C spontan und exotherm verschiedene Oligomere, hauptsächlich Trimere. Der zuerst untersuchte Hauptbestandteil der bei der Auftrennung an-

fallenden kristallinen Fraktion hat auf Grund der Meßdaten, besonders zufolge des charakteristischen Kernresonanzspektrums, die Struktur (3). Offenbar ist das Fluoratom für diese Reaktion von Bedeutung, denn das zu (1) analoge *t*-Butylchloracetylen ist thermisch stabil.

NMR-Fluorsignale (Bezugssubstanz CCl_3F): Dublett bei +127,7 ppm mit relativer Intensität 2; Triplett bei +154,8 ppm mit relativer Intensität 1 ($J_{\text{FFortho}} = 19,5 \text{ Hz}$).

NMR-(*t*-Butyl)-Protonensignale (Bezugssubstanz Tetramethylsilan): Multiplett bei -1,45 ppm mit relativer Intensität 2; Singlett bei -1,39 ppm mit relativer Intensität 1. Das Multiplett erklärt sich durch „long range“-Koppelung [3] zwischen Protonen der äußeren *t*-Butylgruppen und den benachbarten Fluoratomen.

Bei einer Koppelungskonstante $J_{\text{FFmeta}} = (J_{\text{XX}}) = 4 \text{ Hz}$ wäre das Multiplett Teil A eines A_2X_2 -Systems mit einer Koppelungskonstante $J_{\text{HF}} = (J_{\text{AX}}) = 1,3 \text{ Hz}$. Diese Koppelung zeigt sich im Dublett des Fluorspektrums wegen der zu erwartenden hohen Multiplizität nur als Linienverbreiterung, während die F-F_{meta}-Koppelung nicht beobachtet wird.

Die Spektraldaten schließen mit Sicherheit das 1.2.4- oder 1.3.5-Isomere aus. Mit der Bildung von (3) wurde erstmalig eine Acetylen-Trimerisierung zu einem 1.2.3-substituierten Benzol gefunden, obwohl die drei benachbarten *t*-Butylgruppen eine erhebliche Spannung im Molekül verursachen müssen [4].

Eingegangen am 4. Juni 1964 [Z 834]

Auf Wunsch der Autoren erst jetzt veröffentlicht

[1] X. Mitteilung über Heterosubstituierte Acetylene. — IX. Mitteilung: R. Buijle u. H.-G. Viehe, Angew. Chem. 76, 572 (1964); Angew. Chem. internat. Edit. 3, 582 (1964).

[2] Für den experimentellen Teil.

[3] B. Rickborn, D. A. May u. A. A. Thelen, J. org. Chemistry 29, 91 (1964); dort weitere Literaturangaben.

[4] Siehe auch: C. Hoogzand u. W. Hübel, Tetrahedron Letters 1961, 637.