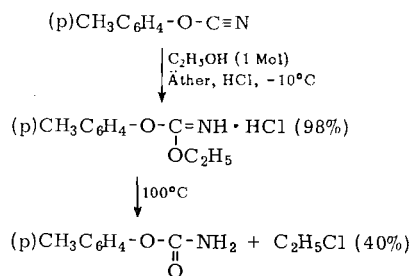
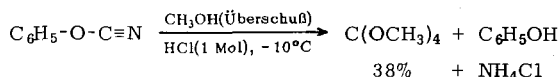


### 3. Anlagerung von Alkoholen

#### a) Überführung von Alkoholen in ihre Halogenide

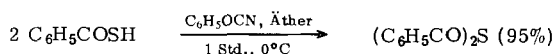
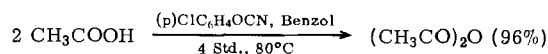


#### b) Synthese von Orthokohlensäureestern

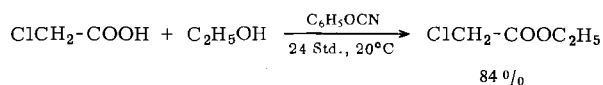


### 4. Anhydrierungsreaktionen

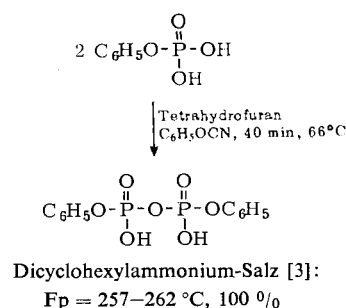
#### a) Säureanhydridbildung



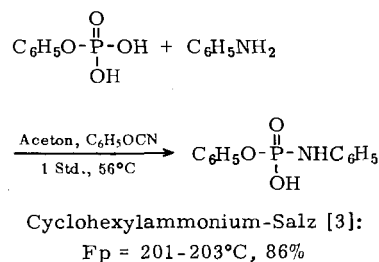
#### b) Veresterung



### c) Pyrophosphatbildung



#### d) Phosphorsäureamidbildung



Eingegangen am 30. November 1964 [Z 869]

[1] D. Martin, Chem. Ber. 97, 2689 (1964); Tetrahedron Letters 1964, 2829.

[2] K. A. Jensen u. A. Holm, Acta chem. scand. 18, 826 (1964).

[3] F. Cramer u. G. Weimann, Chem. Ber. 94, 996 (1961).

## VERSAMMLUNGSBERICHTE

### Sechster Internationaler Kongreß für Biochemie

Der Kongreß fand vom 26. Juli bis zum 1. August 1964 in New York statt. In mehr als 600 Haupt-, Symposiums- und Diskussionsvorträgen entwickelte sich ein teilweise eindrucksvolles Bild vom gegenwärtigen Stand der Biochemie. Besonders die Fortschritte in der Chemie und Biochemie der Nucleinsäuren und Proteine und, damit zusammenhängend, in der Genetik und Evolutionsforschung wurden deutlich. Der folgende Bericht versucht, einige bemerkenswerte Ergebnisse zusammenzufassen.

#### Nucleinsäuren

P. Berg (USA) berichtete über die Anreicherung spezifischer t-RNS-Arten [1] aus *E. coli*. Gradienten-Verteilungschromatographie an 1 bis 4 m langen Dextrangel-Säulen mit Lösungsmittelsystemen, die wäßrige Kaliumphosphat-Lösung,

[1] In diesem Bericht werden folgende Abkürzungen verwendet:  
RNS = Ribonucleinsäure  
t-RNS = Überträger-RNS, transfer-RNS  
m-RNS = Boten-RNS, messenger-RNS  
DNS = Desoxyribonucleinsäure  
DPN = Diphosphopyridinnucleotid (Nicotinadenin-dinucleotid)  
DPNH = reduziertes DPN  
CoA = Coenzym A  
ATP = Adenosintriphosphat  
ADP = Adenosindiphosphat  
P = Phosphat

Äthoxyäthanol, Butoxyäthanol und Triäthylamin enthalten, ermöglicht eine drei- bis siebenfache Anreicherung. Dabei werden auch t-RNS-Arten gleicher Spezifität getrennt. Ein zweites Verfahren besteht in der enzymatischen Umsetzung der t-RNS mit einer Aminosäure, der Perjodsäure-Oxydation unverändert gebliebener t-RNS und der Trennung beider an einer mit Aminoäthyl-dextran gefüllten Säule. Je nach Reinheit des Ausgangsmaterials gelang für valin-spezifische t-RNS eine fünf- bis siebenfache Anreicherung. Da nur wenig t-RNS verlorengeht, können beide Verfahren nacheinander angewendet werden.

M. Staehelin (Schweiz) chromatographierte die Hydrolyseprodukte roher Hefe-t-RNS (Hydrolyse mit Pankreas-RNase) und erhielt Di- und Trinucleotide, in denen die folgenden ungewöhnlichen Nucleoside vorkamen: 1-Methylguanosin, 2-Methylguanosin, 2,2-Dimethylguanosin, Inosin, 6-Methyladenosin, 5-Ribosyluridin, 5-Methylcytidin, Thyminribosid. Zur Identifizierung dieser Komponenten wurde u. a. Ribonuclease T<sub>1</sub> verwendet, die folgende Spezifität aufweist: Phosphodiester-Bindungen am 2-Methylguanosin werden unter Bildung einer 3'-terminalen Phosphatgruppe gespalten; Phosphodiester-Bindungen am 2,2-Dimethylguanosin werden ebenfalls gespalten, doch entstehen hier cyclische Phosphate; Phosphodiester-Bindungen am 1-Methylguanosin bleiben unberührt. Serin-t-RNS weist kein Thyminribosid auf, enthält aber das ungewöhnliche Dublett Guanyl-5-hydroxymethylcytidin.

R. W. Holley et al. (USA) fanden beim Abbau gereinigter t-RNS (alanin-, tyrosin-, valin-spezifisch) mit Takadiastase-RNase T<sub>1</sub> ein ungewöhnliches Tetranucleotid mit der Sequenz TpΨpCpGp. Darin bedeutet Tp Ribothymidylsäure und Ψp Pseudouridylsäure. Die Tatsache, daß dieses Tetranucleotid aus allen drei t-RNS-Arten isoliert wurde, läßt vermuten, daß es generell in t-RNS vorkommt und für die Aktivität dieser Überträger eine Rolle spielt. In alanin-spezifischer t-RNS kommt Ψp auch als Dinucleotid mit 1-Methylinosinsäure vor.

t-RNS, die 8-Azaguanin statt Guanin enthält, untersuchten D. H. Levin und M. Litt (USA). Sie erhielten die RNS durch Inkubation von *Bacillus cereus* mit 8-Azaguanin. Die Chromatographie der t-RNS an Hydroxyapatit ergab Fraktionen, deren Gehalt an 8-Azaguanin zwischen 26 und 62 % lag. Unterschiede in der Sekundärstruktur dieser Fraktionen wurden aus dem Gang der UV-Absorption beim Erhitzen von 20 auf 90°C ermittelt. Mit zunehmendem Gehalt an 8-Azaguanin nahmen die Schmelztemperatur und die Hyperchromie ab. Daraus folgt, daß die Wasserstoffbrücken im Paar 8-Azaguanin-Cytosin schwächer sind als im Paar Guanin-Cytosin, wodurch RNS, die das Guanin-Analog enthält, hitzeempfindlicher wird.

U. Z. Littauer (Israel) untersuchte die Bedeutung methylierter Purin- und Pyrimidinbasen, die stets in geringen Mengen in t-RNS enthalten sind. Methyl-arme t-RNS aus methionin-arm ernährten *E.coli*-Zellen nimmt Aminosäuren etwa in gleichem Maße auf wie normale t-RNS. Dagegen ist die Aktivität der normalen t-RNS bei der Synthese von Poly-Phe und Poly-Leu um etwa 25 % größer als die methyl-armen t-RNS. Außerdem wird methyl-arme t-RNS durch Diesterase aus *E.coli* doppelt so schnell abgebaut wie normale t-RNS. Offenbar bringt die Methylierung also eine größere Beständigkeit der t-RNS im Stoffwechsel mit sich.

Elf Enzyme, die Methylgruppen vom S-Adenosylmethionin auf Nucleinsäuren übertragen, fanden M. Gold und J. Hurwitz (USA) in *E.coli* W. Sechs dieser Enzyme reagieren nur mit t-RNS, vier andere mit t-RNS und Ribosomen-RNS. Eine weitere Enzymfraktion ist für DNS spezifisch. Die Enzyme ließen sich trennen und reinigen. Sie unterscheiden sich auch in der Spezifität für die Basen, auf welche die Methylgruppen übertragen werden.

F. O. Wettstein (USA) beschrieb die Struktur des aktiven Komplexes bei der Protein-Biosynthese: Stets sind drei Moleküle t-RNS am Ribosom gebunden. Von diesen trägt eines die aktivierte Aminosäure, das zweite die wachsende Polypeptidkette, während das dritte weder Protein noch Aminosäure enthält. In einem Puffer mit geringer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration löst sich dieses dritte RNS-Molekül vom Ribosom ab. Die beiden anderen RNS-Moleküle sind fester gebunden.

Um zu prüfen, wie Ribosomen an die Mikrosomen-Membranen gebunden sind, dissoziierte D. Sabatini (USA) Meer-schweinchenleber-Mikrosomen durch Zusatz steigender Mengen EDTA. Ist die EDTA-Konzentration geringer als 10 μMol (bezogen auf die Mikrosomenmenge aus 0,5 g Leber), so tritt keine Dissoziation ein. Zwischen 10 und 20 μMol EDTA werden kleine Untereinheiten (32 S) abgespalten, während große Untereinheiten (47 S) und unversehrte Ribosomen mit den Mikrosomen verbunden bleiben. Oberhalb 20 μMol EDTA (bis zu 200 μMol) dissoziieren weitere Ribosomen, und jetzt werden auch 47-S-Untereinheiten von den Mikrosomen gelöst. Die hohen EDTA-Konzentrationen lassen vermuten, daß Mg<sup>2+</sup>-Ionen an der Bindung zwischen Ribosom und Mikrosom beteiligt sind. Elektronenmikroskopische Aufnahmen negativ gefärbter Mikrosomen lassen erkennen, daß die Kerbe zwischen 32-S- und 47-S-Untereinheit im Ribosom der Mikrosomen-Membran parallel verläuft. Daraus und aus den Dissoziationsdaten folgt, daß Ribosomen über ihre 47-S-Untereinheiten an die Mikrosomen gebunden sind.

Actinomycin bildet mit DNS einen Komplex und hemmt so die RNS-Synthese. Nucleohistone binden wesentlich weniger Actinomycin als reine DNS. Offenbar können die mit Hi-

stonen belegten Teile der DNS keinen Komplex mit Actinomycin bilden. Diesen Zusammenhang nutzten E. Harbers und H. Bujard (Deutschland), um zu zeigen, daß überpflanzte Tumoren von Ratten und Mäusen ein höheres Verhältnis Histon:DNS haben als normale Gewebe dieser Tiere. Möglicherweise läßt sich mit Hilfe dieser Beobachtung die Tumorspezifität des Actinomycins erklären.

Einen Unterschied zwischen Ribosomen-RNS aus normalen und malignen Zellen fand H. Bielka (Deutschland). Er isolierte Ribosomen-RNS aus normaler Rattenleber und aus Hepatomen, die mit Buttersäure oder Diäthylnitrosamin induziert worden waren. Beide RNS-Arten zeigten die gleiche Basen-Zusammensetzung, doch enthält Leber-RNS mehr freie Aminogruppen (ca. 45 % der Gesamtzahl) als Hepatom-RNS (ca. 25 %). Die Helix-Knäuel-Umwandlungstemperatur liegt für Hepatom-RNS höher (57,6°C) als für Leber-RNS (52,8°C). Außerdem wird Hepatom-RNS durch RNase langsamer gespalten als Leber-RNS.

Oxydiertes Spermin, d. h. der Dialdehyd



bildet nach U. Bachrach (Israel) einen Komplex mit der DNS von Coli-Phagen der Reihe T-ungeradzahlig. Der Aldehyd entsteht aus Spermin bei der Einwirkung des Enzyms Serum-Aminoxydase. Mit dem Dialdehyd bei 37°C inkubierte Phagen werden von *E.coli*-Zellen zwar noch adsorbiert und injizieren ihre DNS in die Zellen, die DNS aber ist nicht mehr infektiös und verhindert auch nicht die anschließende Infektion mit virulenten T5-Phagen.

Die Wirkung des Levophanols, eines Wuchshemmstoffes für *E.coli* mit morphin-ähnlicher Struktur, untersuchte E. J. Simon (USA). Die Substanz hemmt den Einbau von <sup>14</sup>C-Uracil in Ribosomen-RNS zu 90 bis 95 %, während die Synthese anderer RNS-Arten wesentlich weniger beeinflusst wird. Beispielsweise geht die Induktion von β-Galaktosidase innerhalb 2 Stunden nach Zugabe des Levophanols noch mit halber Geschwindigkeit weiter, was für eine fortgesetzte Synthese von m-RNS spricht. t-RNS, aus wirkstoff-haltigen Zellen durch Zentrifugation im Dichtegradienten isoliert, enthält 60 bis 70 % weniger <sup>14</sup>C-Uracil als die t-RNS einer normalen Kontrollkultur. Levophanol hemmt die RNS-Synthese in 16-S- und 23-S-Ribosomen-Komponenten etwa im gleichen Maß.

Phosvitin, das wichtigste Phosphoprotein aus Hühnereigelb, wird von der legenden Henne nur in der Leber synthetisiert. P. J. Heald und P. M. McLachlan (England) fanden, daß weder andere Gewebe des reifen Huhns noch die Leber des Küchens Phosvitin bilden. Injiziert man jungen Hähnchen Diäthylstilböstrol, so findet man 48 Std. nach der Hormongabe einen gleichen Phosvitinspiegel in den Plasmaproteinen wie bei legenden Hennen. O. Greengard und G. ACS (USA) fanden, daß die Wirkung des Diäthylstilböstrols anfänglich ein intaktes RNS-synthetisierendes System braucht. Gibt man den Hähnchen nämlich innerhalb 5 Std. nach der Hormonapplikation Actinomycin (das die RNS-Synthese hemmt), so bleibt die Phosvitin-Bildung aus.

Die Zerlegung von Hexa- und Heptaribonucleotid-Fractionen durch Gegenstromverteilung gelang B. P. Doctor und G. J. McCornick (USA). Sie behandelten Hefe-t-RNS mit Pankreas-RNase und trennten die Spaltprodukte nach der Kettenlänge durch Chromatographie an DEAE-Cellulose (7 M Harnstofflösung, NaCl-Gradient). Die Hexa- und Heptanucleotid-Fractionen wurden einer 600-stufigen Gegenstromverteilung in folgendem System unterworfen: 30 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1 ml Eisessig wurden mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt und dieser Lösung 4 ml Formamid + 40 ml 2-Äthoxyäthanol zugegeben. Die Gegenstromverteilung ergab fünf Fractionen bei den Hexanucleotiden und vier bei den Heptanucleotiden. Der Guanylsäure-Gehalt dieser Fractionen nahm mit steigendem Verteilungsquotienten ab, der Adenylsäure-Gehalt nahm in gleicher Richtung zu.

Die Wechselwirkungen zwischen Nucleinsäure-Basen nutzten *H. Tuppy* und *E. Küchler* (Österreich) zur chromatographischen Trennung von Nucleosiden: Guanotin wurde über seinen Zuckerrest covalent an ein feinkörniges Harz gebunden. Eine mit diesem Austauscher gefüllte chromatographische Säule hielt aus einem Gemisch von Desoxycytidin und Thymidin in wäßriger Lösung Desoxycytidin stärker zurück. An einer mit Adenosin statt Guanotin beladenen Säule wird dagegen Thymidin stärker zurückgehalten. Diese Verhältnisse sprechen für eine Spezifität der Wechselwirkungen zwischen den Basen. Daß vor allem Wasserstoffbrücken für den Effekt verantwortlich sind, ergibt sich aus der Tatsache, daß die Methylierung von Positionen, mit denen sich normalerweise H-Brücken bilden, die Trennwirkung vermindert und daß in 7 M Harnstoff-Lösung überhaupt keine Trennung zustandekommt.

Über Verfahren zur Jodierung von Nucleosiden und Nucleotiden berichteten *D. Lipkin* et al. (USA). Am besten bewährten sich Jodchlorid und N-Jodsuccinimid in N-Äthylacetamid oder Dimethylsulfoxid. Die Jodierung von Pyrimidinbasen führt zu den 5-Jod-Verbindungen; aus Guanin- und Xanthin-Derivaten entstehen die 8-Jod-Verbindungen. Bei der alkalischen Hydrolyse von 5-Jodcytidin und -desoxycytidin erhält man unter Umlagerung die 6-Hydroxy-Derivate, wogegen 5-Joduridin bei gleicher Behandlung einen neuen Typ eines Cyclonucleotids ergibt, nämlich 6-Hydroxy-O(6).5'-cyclouridin.

### Proteine, Peptide und Aminosäuren

Mit dem Zusammenhang zwischen der biologischen Wirkung von Peptiden und ihrer Aminosäurezusammensetzung befaßten sich drei Symposiumsvorträge. *V. du Vigneaud* (USA) und *J. Rudinger* (Tschechoslowakei) berichteten über Untersuchungen am Oxytocin. *Rudinger* wies darauf hin, daß wahrscheinlich jede Phase der biologischen Wirkung einer Substanz (Transport, Bindung, Ausscheidung, Inaktivierung) in anderer Weise von den Eigenarten des Moleküls abhängt und die durch verschiedene strukturelle Änderungen erzielten Effekte daher nicht ohne weiteres zu vergleichen sind. *Du Vigneaud* et al. fanden, daß die phenolische OH-Gruppe im Tyrosyl-Rest des Oxytocins zur blutdrucksenkenden und oxytocischen Wirkung erheblich beiträgt, daß beide Effekte sich aber auch bei Abwesenheit dieser OH-Gruppe manifestieren. Bemerkenswerterweise ist die blutdrucksenkende Wirkung geringer, wenn die OH-Gruppe methyliert ist, als wenn sie fehlt. Entfernt man die freie Aminogruppe im Cysteiny-Rest 1, so erhält man eine Substanz, die in mancher Hinsicht wirksamer als das unveränderte Hormon ist. Dagegen führt auch hier die Blockierung der Aminogruppe (Acetylierung, Methylierung) zu fast vollständigem Aktivitätsverlust oder gar zu antihormonaler Wirkung. *Rudinger* et al. substituieren die gleiche Aminogruppe mit Aminosäure-Resten oder kurzen Peptidketten, die enzymatisch wieder abgespalten werden können, und fanden eine protrahierte antidiuretische, uterotonische oder natriuretische Wirkung dieser Präparate, je nach Art des angefügten Restes.

Über die funktionellen Beziehungen beim ACTH, einem aus 39 Aminosäuren bestehenden, geradkettigen Polypeptid berichtete *K. Hofmann* (USA). Corticotropine kommen in der Hypophyse vom Schwein, Schaf, Rind und Menschen vor. Die Aminosäuren 1–24 sind bei allen Arten gleich, Variationen treten in den Positionen 25–32 auf. Das kleinste synthetische Polypeptid, das wie ACTH den Ascorbinsäuregehalt der Nebenniere vermindert und die Steroidsynthese stimuliert, besteht aus den Aminosäuren 1–13. Verlängert man die Peptidkette entsprechend ihrem natürlichen Aufbau, so erreicht sie bei insgesamt 20 Aminosäuren die volle Aktivität (ca. 100 Einheiten/mg) des natürlichen Hormons. Es scheint also, daß das „aktive Zentrum“ des Hormons im N-terminalen Tridecapeptid liegt, während die Aminosäuren 14–20 (besonders 15–18) für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich sind. — Während die N-Acetylierung oder

oxydative Desaminierung des N-terminalen Serinrestes die Aktivität des Hormons deutlich reduziert, hat der Ersatz des Serinrestes durch Glycin praktisch keinen Effekt. Die Hydroxymethylgruppe scheint für die biologische Wirkung also ohne Bedeutung zu sein. Glutaminsäure in Position 5 scheint mit Glutamin gleichwertig zu sein, während die ε-Aminogruppen der Lysinreste 11, 15 und 16 nicht durch Formylgruppen blockiert werden dürfen.

In den Diskussionsvorträgen berichteten *K. Harada* und *S. W. Fox* (USA) über die Bildung von Asparaginsäure, Threonin, Serin, Glutaminsäure, Prolin, Glycin, Alanin, Valin, Alloisoleucin, Isoleucin, Leucin, Tyrosin, Phenylalanin u. a. aus CH<sub>4</sub>, NH<sub>3</sub> und H<sub>2</sub>O bei 900 bis 1100°C an SiO<sub>2</sub> oder Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Da alle Teilnehmer dieser Reaktionen auch auf einer primitiven Erde vorhanden gewesen sein sollten, darf man eine thermochemische Aminosäure-Synthese unter diesen Bedingungen in Betracht ziehen.

Ein Verfahren zur Synthese von C-substituierten Aminosäuren beschrieben *J. Kollonitsch* et al. (USA). Löst man Aminosäuren in starken Säuren (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ClSO<sub>3</sub>H, konz. HCl, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H), so werden die funktionellen Gruppen protoniert und damit geschützt, während die Kohlenstoffkette einer radikalischen Chlorierung zugänglich bleibt. Man erhält in überraschend selektiver Reaktion ohne Racemisierung Chloramino-säuren, die sich als Ausgangsmaterial für weitere Substitutionen eignen. Beispielsweise entsteht aus L-Glutaminsäure je nach den Bedingungen γ- oder β-Chlorglutaminsäure mit einer Ausbeute von 70 bis 80 %. γ-Chlorglutaminsäure ergibt bei der Hydrolyse das γ-Hydroxy-Derivat, und β-Chlorglutaminsäure liefert bei der Ammonolyse β-Amino-L-glutaminsäure, eine neue Diaminodicarbonsäure. Ähnlich erhält man mit 80 % Ausbeute γ-Chlor-L-lysin und daraus durch Hydrolyse γ-Hydroxy-L-lysin. In vielen Fällen ermöglicht die katalytische Deuterolyse der Chloramino-säuren die Synthese spezifisch markierter Aminosäuren.

Über eine nichtenzymatische Synthese von Polypeptiden mit Polyphosphorsäureestern nach der Methode von *Schramm* [2] berichteten *D. W. Nooner* und *J. Oró* (USA). Sie erhitzen Aminosäuren mit Polyphosphorsäureester (1:3) auf 60°C und erhielten Polymere von DL-Leucin, DL-Valin, DL-Serin und DL-Phenylalanin in Ausbeuten bis zu 60 %. Beim Poly-leucin betrug der Polymerisationsgrad 12, doch wurden daneben kleinere Peptide isoliert, die möglicherweise Zwischenstufen sind.

*J. H. Pazur* und *K. Kleppe* (USA) konnten zeigen, daß Glucose-Oxydase aus *Aspergillus niger* ein Glykoprotein ist. Das durch (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Fraktionierung und Chromatographie an DEAE-Cellulose gereinigte Enzym besteht zu etwa 15 % aus D-Mannose, D-Glucose und D-Glucosamin. Weder durch Elektrophorese noch durch Zentrifugieren im Dichtegradienten ließen sich Protein und Kohlenhydrat trennen. Dagegen war nach der Hydrolyse mit Protease ein Glykopeptid durch Chromatographie an Sephadex zu isolieren, dessen weitere Hydrolyse mit Säure D-Mannose, D-Glucosamin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Serin, Threonin und Ammoniak ergab.

Ein Verfahren zur spezifischen Spaltung von Acylprolin-Bindungen mit LiAlH<sub>4</sub> fanden *M. A. Ruttenberg* und *L. C. Craig* (USA). Das in wasserfreiem Tetrahydrofuran gelöste oder suspendierte Peptid wird 1 Std. bei Raumtemperatur oder 0°C mit einem zehn- oder hundertfachen molaren Überschuß an LiAlH<sub>4</sub> behandelt. Unverbrauchtes Reagens zersetzt man mit 6 N HCl, dampft die Lösung im Vakuum zur Trockne und entsalzt den Rückstand durch Chromatographie an einer mit 50-proz. Essigsäure äquilibrierten Sephadex-G-25-Säule. Die Reaktion liefert einen Aldehyd und ein N-terminales Prolin. Die Aldehydgruppe wird mit NaBH<sub>4</sub> oder H<sub>2</sub>/PtO<sub>2</sub> zur Hydroxygruppe reduziert. Gespalten wurden (Ausbeuten in Klammern):

Gly-L-Pro (20 % bei 25°C), L-Leu-L-Pro-Gly (23 % bei 0°C; 98 % bei 25°C), S-Benzyl-L-Cys-L-Pro-L-Leu-Gly (100 % bei

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

25 °C), Gramicidin S (42 % bei 25 °C), Tyrocidin B (30 % bei 0 °C). Nebenreaktionen sind die Reduktion der Carboxamidgruppen von Glutamin und Asparagin sowie die reduktive Spaltung anderer Peptidbindungen, wobei die Reaktionsfähigkeit in der Reihenfolge tert.Amid >> prim.Amid > sek.Amid abnimmt. Das Verfahren hat zur Strukturaufklärung des cyclischen Decapeptids Tyrocidin B nützliche Dienste geleistet: Das Peptid enthält einen Prolinrest und wurde an diesem zu einem offenkettigen Peptid gespalten, dessen Aminosäuresequenz mit Hilfe konventioneller Methoden geklärt werden konnte.

## Biochemische Genetik

Über die Änderung der Struktur von Cytochrom c im Lauf der Evolution berichteten *E. Margoliash* und *E. L. Smith* (USA). Das je nach Vorkommen aus 104 bis 108 Aminosäuren bestehende Protein enthält eine Hämgruppe, die covalent mit der Peptidkette verbunden ist. Cytochrom-c-Moleküle aus 13 Spezies (Hefe, Insekten, Wirbeltiere) stimmen in mehr als 50 % der Aminosäuresequenz überein. Das läßt darauf schließen, daß sich alle heute existierenden Cytochrom-c-Arten aus einer gemeinsamen Vorstufe entwickelt haben. Dies um so mehr, als das Ausmaß des Unterschiedes um so geringer wird, je enger die Lebewesen phylogenetisch verwandt sind. So unterscheiden sich die Cytochrom-c-Moleküle aller untersuchten Säugetiere von denen der Vögel stets nur um 10 bis 15 Aminosäuren. Zwischen Säugetieren und Vögeln auf der einen Seite und Fischen auf der anderen beträgt die Differenz 18 bis 21 Aminosäuren, und Säugetiere, Vögel und Fische unterscheiden sich von der Bäckerhefe in 43 bis 49 Aminosäuren im Cytochrom c. Für Mensch und Rhesusaffe ist der Unterschied nur eine Aminosäure, für Mensch und Thunfische beträgt er bis zu 21. Einige der konstanten Aminosäuresequenzen hängen mit der Funktion des Proteins zusammen, für andere ist ein solcher Zusammenhang mindestens nicht bekannt, möglicherweise auch nicht vorhanden. Am stärksten variieren die Positionen 89 und 92 der Peptidkette. In Position 89 sind sechs verschiedene Aminosäurearten gefunden worden, in Position 92 fünf.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam *V. Rudloff* (Deutschland) bei der Untersuchung von Hämoglobinen verschiedener Tierarten: Zwischen den Hämoglobinen höherer und niederer Wirbeltiere besteht ein erheblicher Unterschied in der Aminosäuresequenz. Das Hämoglobin des Neunauges (*Lampetra fluviatilis*) hat nur noch ein Molekulargewicht von 17000 (andere Wirbeltiere: 64000) und besteht aus nur einer Peptidkette, die weder der  $\alpha$ - noch der  $\beta$ -Kette menschlichen Hämoglobins gleicht, strukturell aber zwischen diesen und dem Myoglobin zu stehen scheint und daher möglicherweise eine entwicklungsgeschichtlich frühe Form ist.

Der Frage, welche chemischen Unterschiede zwischen genetisch aktiven und inaktiven Chromosomenabschnitten bestehen, ging *V. G. Allfrey* (USA) nach. Er fand, daß in einer Säugetierzelle stets etwa nur 20 % des genetischen Materials aktiv sind. Die restlichen 80 % sind zusammengeklumpt und lassen sich aus der Zelle viel leichter entfernen als der aktive Teil. Der Histongehalt beider Teile ist gleich, aber die Histone des aktiven Teils sind stärker acetyliert. Es scheint also, daß die mit der Acetylierung verbundene geringfügige Strukturänderung genügt, um ein Gen aktiv werden zu lassen, ohne daß es die schützende und stabilisierende Wirkung der Histone verliert.

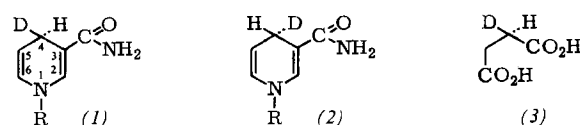
## Mechanismen der Enzymwirkung

„Bildung und Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur der Ribonuclease“ war das Thema des Vortrags von *C. B. Anfinsen* (USA). Reduzierte Ribonuclease enthält 8 SH-Gruppen. In schwach alkalische Lösung bei geringer Konzentration des reduzierten Enzyms bildet sich in Gegenwart von Sauerstoff das native Enzym rasch und quantitativ

zurück. Die Primärstruktur scheint also die Tertiärstruktur des Proteins zu determinieren. Verhindert man die Rückbildung des nativen Enzyms durch Zusatz von (8 M) Harnstoff oder durch die Wahl eines niedrigen pH-Wertes, so führt die Oxydation zu einem inaktiven Protein, das „falsche“ Disulfid-Brücken enthält, aus dem sich aber durch Inkubation mit Spuren einer SH-Verbindung unter Disulfid-Austausch das aktive Enzym zurückgewinnen läßt. Diese Umsetzungen wurden benutzt um zu prüfen, wie weit die Aminosäure-Seitenketten die Bildung der aktiven Tertiärstruktur beeinflussen. Die Angliederung von Polyalanylresten an die  $\epsilon$ -Aminogruppen von 9 der insgesamt 10 Lysinreste ist ohne Effekt, selbst wenn 60 Alaninmoleküle in ein RNase-Molekül eingebaut werden. Daraus läßt sich schließen, daß die Seitenketten dieser Lysinreste so im Molekül stehen, daß sie nach außen weisen. Die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrestes 41 läßt sich in Gegenwart mehrwertiger Anionen (Orthophosphat, Cytidylat, RNS) nicht alanylieren. Ebenso schützen mehrwertige Anionen die Histidinreste 12 und 119 gegen Alkylierung. Möglicherweise befindet sich im aktiven Zentrum des Enzyms also eine (durch Polyanionen induzierte oder stabilisierte) Häufung basischer Reste.

*B. S. Hartley* (England) teilte die Primärstruktur des Rinder-Chymotrypsinogens A mit. Das Molekül besteht aus 245 Aminosäureresten und enthält 5 Disulfidbrücken (Cys 1-Cys 122, Cys 42-Cys 58, Cys 135-Cys 200, Cys 167-Cys 181, Cys 190-Cys 219). Bei der Aktivierung des Moleküls wird die Bindung zwischen Arg 15 und Ileu 16 tryptisch gespalten. Anschließend chymotryptische Spaltung der Bindungen an den Resten Leu 13, Tyr 145 und Asp-NH<sub>2</sub> 147 haben nur geringen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms und wirken allein nicht aktivierend. Alle 14 Lysinreste sowie Cys 1, N-terminales Ala 148 und C-terminales Tyr 145 können ohne Aktivitätseinbuße modifiziert werden. Diese Reste sitzen also offenbar „außen“ am Molekül und tragen nur wenig zur Katalyse oder zur Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur bei. Dagegen läßt sich N-terminales Ileu 16 im nativen Zustand des Enzyms mit Fluordinitrobenzol nicht phenylieren, und Modifikationen dieses Aminosäurerestes können die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität ändern. Auch C-terminales Asparagin 245 scheint „innerhalb“ des Moleküls zu liegen. Viel spricht dafür, daß His 57 am aktiven Zentrum beteiligt ist. In diesem Zusammenhang scheint bemerkenswert, daß die beiden einzigen Histidinreste des Moleküls in den Positionen 40 und 57 durch die Disulfidbrücke Cys 42 – Cys 58 in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden und daß man ähnliche Sequenzen auch im Trypsin und Chymotrypsinogen B findet.

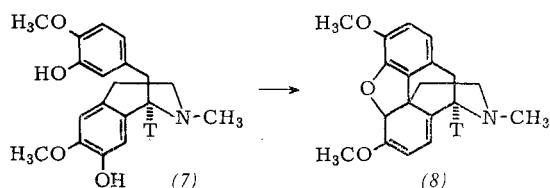
Über die Stereochemie der Wasserstoffübertragung auf Pyridinnucleotide berichtete *C. Donninger* (England). Bei der Oxydation von Substraten mit Pyridin-Coenzymen wird der Wasserstoff vom Substrat auf das C-Atom 4 des Pyridinringes übertragen. Die Reaktion ist stereospezifisch; der neu eingetretene Wasserstoff kann oberhalb (1) oder unterhalb (2) der Ringebene stehen. Die absolute Konfiguration des neu eingetretenen H-Atoms ließ sich jetzt mit Hilfe der Deuterium-Markierung und einer neuen, von *J. W. Cornforth* entwickelten Abbaureaktion klären, die darauf beruht, daß man an die 5.6-Doppelbindung Methanol anlagert, die 2.3-Doppelbindung ozonisiert und das Produkt mit Peroxyessigsäure oxydiert. Es entsteht Deuteriobernsteinsäure (3), die mit synthetischer Deuteriobernsteinsäure bekannter absoluter Konfiguration an C-2 verglichen wurde. So ergab sich, daß Enzyme wie Alkoholoxydase, die Wasserstoff auf die „A“-Seite des Pyridinringes übertragen, (4R)-[4-D]-DPNH (1) erzeugen, d. h. den Wasserstoff von derjenigen Seite des Pyridinringes her anlagern, von der aus gesehen die Atome 1 bis 6 entgegen dem Uhrzeigersinn angeordnet sind.



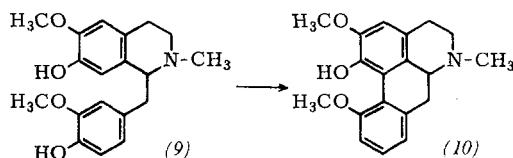


führt auf die geringe Spezifität der beteiligten Enzyme und steht ebenfalls in Gegensatz zur absoluten Spezifität dieser Reaktionen bei der Protein-Biosynthese.

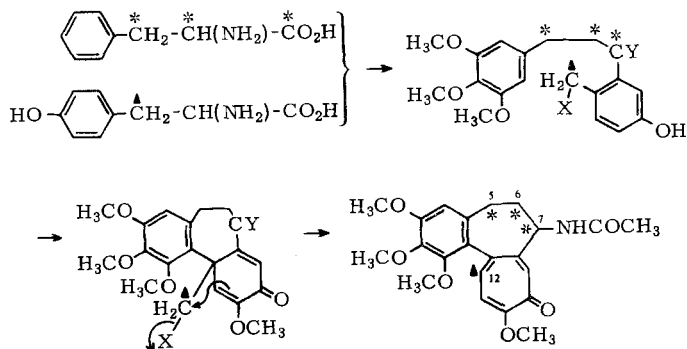
A. R. Battersby (England) berichtete über neue Ergebnisse zur Biosynthese der Morphinalkaloide und des Colchicins. Ein an C-1 mit Tritium markiertes Reticulin wurde in die Antipoden getrennt und der Einbau beider Antipoden bei Mohnpflanzen in das Thebain verglichen. Es zeigte sich, daß nur das (-)-Reticulin (7), welches das Tritium an C-1 in der gleichen sterischen Anordnung wie das entsprechende H-Atom im Thebain (8) besitzt, unter Erhaltung von 60 % des Tritiums in das Thebain eingebaut wird. Beim Einbau von (+)-Reticulin geht dagegen alles Tritium verloren, da vor dem Einbau ein Übergang in die (-)-Verbindung erfolgt.



Der Einbau in das Thebain hängt ferner vom Methylierungsmuster in der Vorstufe ab. Die Verbindung (9), bei der Hydroxy- und Methoxygruppe im Benzylrest vertauscht sind, wird nicht in das Thebain eingebaut; sie ist dagegen eine Vorstufe für das Isothebain (10).

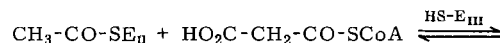
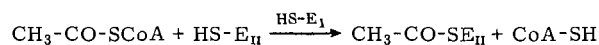


Während durch frühere Arbeiten bekannt war, daß Phenylalanin den Phenylrest und die C-Atome 5, 6 und 7 des Colchicins liefern kann, war die Bildung des Tropolonringes noch unklar. Versuche mit [3-<sup>14</sup>C]-Tyrosin zeigten nun, daß sich nach Gabe dieser Verbindung an *Colchicum autumnale* 81 % der Aktivität beim C-12 des Colchicins befinden. Daraus läßt sich schließen, daß Colchicin aus Phenylalanin und Tyrosin aufgebaut wird, wobei das β-C-Atom des Tyrosins durch Ringerweiterung zum C-12 des Tropolonringes wird. Tyrosin und Phenylalanin sind also in dieser Pflanze keine äquivalenten Vorstufen.



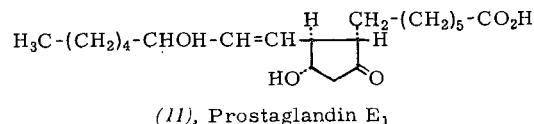
Die Biosynthese von Didesoxyhexosen in Bakterien untersuchten J. L. Strominger et al. (USA). Ascarylose (3,6-Didesoxy-L-mannose) wird von einem Extrakt aus *Pasteurella pseudotuberculosis*, Typ V, wie folgt gebildet: CTP + D-Glucose-1-phosphat → CDP-D-Glucose → CDP-4-Keto-6-desoxy-D-glucose → CDP-Ascarylose. Im letzten Schritt ist TPNH das Reduktionsmittel. Ähnlich entsteht in einem Extrakt aus *P. pseudotuberculosis*, Typ III, CDP-3,6-Didesoxy-D-glucose (CDP-Paratose).

P. R. Vagelos et al. (USA) und F. Lynen et al. (Deutschland) berichteten über den Verlauf der Fettsäure-Biosynthese. Während die Fettsäure-Synthetase der Hefe ein Multienzymkomplex ist, läßt sich die Synthetase von *E. coli* in ihre Komponenten zerlegen. Drei davon (E<sub>I</sub>–E<sub>III</sub>) werden für die Kondensation von Acetyl-CoA mit Malonyl-CoA benötigt:



Die Transacylase (E<sub>I</sub>) ist gegen SH-Inhibitoren sehr empfindlich. E<sub>III</sub> ist der hitzebeständige Acyl-Überträger im Fettsäure-Synthetase-Cyclus. Sein Molgewicht beträgt etwa 9500. Es konnte bis zu chromatographischer und elektrophoretischer Einheitlichkeit gereinigt werden. Auch in der analytischen Ultrazentrifuge ist es homogen. E<sub>I</sub> enthält einen Cystein-Rest. Das Enzym E<sub>III</sub> kann auch transacylierend wirken, d. h. den Malonylrest von Malonyl-CoA auf E<sub>I</sub> übertragen. – Hauptprodukt der Fettsäure-Synthetase in *E. coli* ist cis-Vaccensäure. Deren CH<sub>3</sub>-endständige C-Atome stammen aus Acetyl-CoA, die restlichen C-Atome der Ketten werden in C<sub>2</sub>-Einheiten vom Malonyl-CoA geliefert. Lynen et al. reicherten Fettsäure-Synthetase aus Bäckerhefe mehr als hundertfach an. Das elektrophoretisch und elektronenmikroskopisch homogene Präparat hatte ein Molgewicht von 2,3 × 10<sup>6</sup>, enthielt sieben Enzymaktivitäten und synthetisiert Stearyl-CoA aus Acetyl-CoA + 8 Mol Malonyl-CoA. Die Analyse auf endständige Aminogruppen ergibt sieben Polypeptid-Einheiten im Komplex. Alle Zwischenstufen der Fettsäuresynthese sind covalent an den Komplex gebunden. Die Bindung vermittelt SH-Gruppen, die als „peripher“ (reagieren leicht mit N-Jodacetamid oder N-Äthylmaleinimid) und „zentral“ (relativ beständig gegen diese Reagentien) unterschieden werden können. Wenn gesättigte Fettsäuren mit 16 bis 18 C-Atomen am Komplex synthetisiert worden sind, wandern sie von einer zentralen an eine periphere SH-Gruppe und werden von dort auf CoA übertragen, d. h. vom Komplex abgegeben.

Die Prostaglandine sind komplizierte Carbonsäuren der Struktur (11). Sie kommen als Gemische u. a. im Spermplasma des Menschen und der Schafe vor, stimulieren die glatte Muskulatur und senken den Blutdruck. Daneben beeinflussen sie – wie S. Bergström (Schweden) zeigte – auch den Lipoid-Stoffwechsel: Prostaglandin E<sub>1</sub> hebt bei der Ratte in einer Konzentration von 2,8 × 10<sup>-7</sup> M die fett-mobilisierende Wirkung des Adrenalins, Noradrenalins, Glucagons und des ACTH auf. Offenbar hemmt das Prostaglandin die vom Adrenalin verursachte Aktivierung einer Lipase im Fettgewebe. Beim Menschen dagegen steigt nach der Injektion von Prostaglandin E<sub>1</sub> der Gehalt freier Fettsäuren im arteriellen Blut, und die fett-mobilisierende Wirkung infundierten Noradrenalins wird nicht aufgehoben.



Nach W. L. Byrne und M. C. Ganoza (USA) werden Aktivität, Stabilität und Substrat-Spezifität der Glucose-6-phosphatase durch die im Enzym enthaltenen Phospholipide beeinflusst. Entfernt man die Lipide, so kommt man schließlich zu einer inaktiven Form des Enzyms, der man durch Zusatz von Phospholipiden die Aktivität zurückgeben kann, ohne daß völlig Übereinstimmung mit der nativen Form des Enzyms erreicht würde.

S. Granick (USA) berichtete über ein reprimiertes Enzym-system in Hühnerleber: Gibt man zu einer 16 Tage alten Primärkultur von Hühnerleberzellen 3.5-Diäthoxycarbonyl-1.4-dihydrocollidin, so lassen sich nach 3 Std. in den Zellen Porphyrine nachweisen. Die Ursache dafür ist eine de-novo-Synthese der geschwindigkeitsbestimmenden  $\delta$ -Aminolaevulin-säure-Synthetase. Inhibitoren der Proteinsynthese wie Mitomycin C und Actinomycin D hemmen die Enzymbildung.

W. E. Knox (USA) bestimmte den Einbau von  $[^{14}\text{C}]$ -Arginin in Tryptophan-Pyrrolase nach Induktion des Enzyms mit Tryptophan oder Cortisol. Das Enzym wurde mit Antikörper niedergeschlagen und sein  $^{14}\text{C}$ -Gehalt ermittelt. Während die Enzymmenge nach beiden Arten der Induktion anstieg, ergab nur die Induktion mit Cortisol auch eine höhere spezifische Radioaktivität des Proteins. Daraus folgt, daß nur Cortisol eine de-novo-Synthese des Enzyms hervorruft, wogegen Tryptophan offenbar nur den Abbau der Pyrrolase verlangsamt.

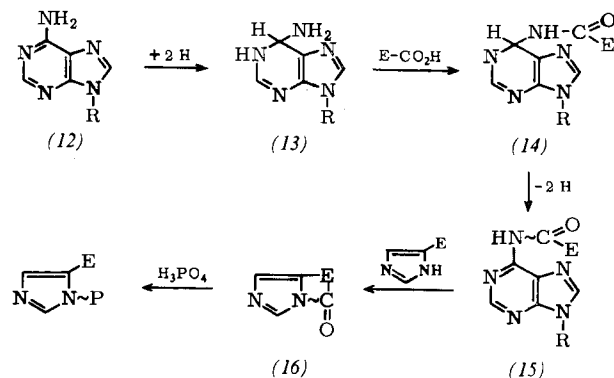
Wirkungen des Insulins auf den Kohlenhydratstoffwechsel der Leber untersuchten J. S. Bishop et al. (USA). Sie fanden, daß intravenös infundiertes Insulin (0.08–0.2 Einh./kg-Std.) beim Hund die Abgabe von Glucose aus der Leber ins Blut um 62 % verringert, die Glucose-Aufnahme aller Gewebe auf das dreifache erhöht und in der Leber die Synthese von Glykogen aus Blutglucose auf das achtfache steigert. Auch der Einbau von Glucose in nicht-glykogene Leberbestandteile nimmt zu.

Schilddrüsenhormone beeinflussen die Aktivität mitochondrialer Enzyme. B. Kadenbach (Deutschland) fand in Mitochondrien aus Rattenleber, -niere, -herz, -muskel, -hirn und -milz eine Zunahme der Aktivität von Glycerophosphat-Oxydase und Succinat-Dehydrogenase beim Übergang vom hypo- zum hyperthyroiden Zustand. Auch die Cytochrome a, b und c (1,3- bis 2-fach) und die DPN-spezifische Isocitrat-Dehydrogenase (1,4- bis 2,4-fach) nehmen zu, jedoch nicht im Hirn und in der Milz. Dagegen zeigten TPN-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase in Leber, Niere, Herz und Muskel geringere Aktivitäten im hyperthyroiden Zustand. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß Schilddrüsenhormone die Aktivität des oxydierenden Systems der Mitochondrien durch Induktion der Enzyme des Citrat-Cyclus und der Atmungskette erhöhen, während sie die Enzyme synthetischer Reaktionen hemmen.

## Bioenergetik

V. P. Skulacher (UdSSR) berichtete über die Funktion der Adeninnucleotide in der Atmungskette. Danach scheinen Adeninnucleotide (12) nicht nur als energiereiche Verbindungen (ATP) eine Rolle zu spielen, sondern, wie die Formeln zeigen, auch gleichzeitig Substrate für Redoxreaktionen zu sein, derart daß zunächst der Pyrimidinring reduziert (13), durch die freie Carboxylgruppe eines Enzyms ( $\text{E}-\text{CO}_2\text{H}$ ) an der Aminogruppe acyliert (14) und dann reoxydiert (15) wird. Der aromatische Ring zieht vom Amidstickstoff Elek-

tronen ab und erhöht so den Energieinhalt der Amidbindung. Durch Imidazolkatalyse (16), könnte die Energie dieser Bindung zur Bildung von ATP genutzt werden.



Über Kopplungsfaktoren der oxydativen Phosphorylierung berichtete G. Webster (USA). Er konnte aus der löslichen Proteinfraction der Mitochondrien drei Proteine isolieren, die als Kopplungsfaktoren wirken und deren jedes für eine Kopplungsstelle spezifisch ist. Der DPNH-Kopplungsfaktor, der für die Phosphorylierung im DPNH-Flavoprotein-Abschnitt notwendig ist, wurde in kristalliner Form isoliert, ist homogen und hat ein Molgewicht von etwa 30000. Der  $\text{QH}_2$ -Faktor (spezifisch für die Phosphorylierung im Coenzym Q-Cytochrom b-Abschnitt) wurde weitgehend gereinigt und besteht in der Ultrazentrifuge aus zwei Komponenten. Der Kopplungsfaktor für reduziertes Cytochrom c ist homogen und hat ein Molgewicht von etwa 35000.

Es scheint, daß alle diese Faktoren in Reaktionsfolgen eine Rolle spielen, die sich etwa wie folgt gliedern lassen:

- Substrat + Partikel  $\rightarrow$  Partikel~Substrat
- Partikel~Substrat + Faktor  $\rightarrow$  Faktor~Substrat + Partikel
- Faktor~Substrat + Phosphat  $\rightarrow$  Faktor~P + oxydiertes Substrat
- Faktor~P + ADP  $\rightarrow$  Faktor + ATP

Die Verbindungen Faktor~Substrat (= DPNH~Faktor) und Faktor~P aus der mit der Oxydation von DPNH gekoppelten Phosphorylierung konnten isoliert werden. Für die mit der Oxydation von Cytochrom c gekoppelten Phosphorylierung wurde auch die Komponente Substrat~Partikel isoliert. Sie ist oberhalb 5 °C labil. Die Verbindung Faktor~Substrat (beim Cytochrom c) ist rot, hat ein Molgewicht von etwa 50000 und scheint aus je einem Mol Faktor und reduziertem Cytochrom c zu bestehen. Sie reagiert mit Orthophosphat zum farblosen Faktor~P, wobei Cytochrom c freigesetzt wird. Faktor~P ist bei neutralem pH beständig, bei saurem und alkalischen pH labil. Mit ADP reagiert die Verbindung zu ATP. Inhibitoren der oxydativen Phosphorylierung beeinflussen verschiedene Schritte in der vierstufigen Reaktionsfolge: 2,4-Dinitrophenol und Dicumarol führen zum raschen Zerfall des Partikel~Substrat-Komplexes, während Oligomycin die Bildung von ATP aus Faktor~P hemmt.

[VB 868]