

Makromolekulares Kolloquium der Universität Freiburg i. Br.

Das Makromolekulare Kolloquium fand vom 11. bis 13. März 1965 in Freiburg/Brsg. statt und wurde vom Institut für Makromolekulare Chemie der Universität Freiburg/Brsg. veranstaltet.

Chemische Synthese und Biosynthese von codierenden Nucleinsäuren

F. Cramer, Göttingen

Durch Kondensation von Thymidyl- und Adenylsäure mit Pikrylchlorid, N,N-Dimethylformamid-dichlorid, $(\text{CH}_3)_2\text{NCHCl}_2$, oder Dicyclohexyl-carbodiimid lassen sich Oligothymidylsäuren und Oligoadenylsäuren darstellen, die bis zu 20 Kettenglieder enthalten. Dinucleotide und Trinucleotide der Desoxyreihe können zu Oligo-Dubletts bzw. Oligo-Triplets kondensiert werden. Auf diesem Wege wurden erhalten: $(\text{pCpT})_n$ und $(\text{pGpApT})_n$. Ein Teil der dargestellten Oligonucleotide kann codierend wirken, d. h. im enzymatischen Test als Matrize für die Synthese von kopierter Desoxy-ribonucleinsäure oder von messenger-Ribonucleinsäure dienen.

Bei Verwendung von Schutzgruppen kann man Ribooligonucleotide synthetisieren; das längste bisher dargestellte ist ein Trinucleosid-diphosphat, UpUpC. Mit Hilfe des Enzyms Polynucleotid-Phosphorylase wurden gemischte Polynucleotide hergestellt, z. B. $-(\text{U})_{80}\text{-G-(U)}_{80}\text{-G-(U)}_{80}\text{-G}$. Durch T_1 -Ribonuclease wird diese Ribonucleinsäure ausschließlich neben der Guanylsäure gespalten. Dabei entsteht $(\text{U})_{80}\text{-G}$, d. h. ein Polynucleotid mit dem terminalen Triplett UUG. Wenn dieses als Messenger für die Proteinsynthese verwendet wird, codiert es die Aminosäure Leucin. Damit ist bewiesen, daß UUG das Code-Wort für Leucin ist. Zudem ließ sich so erstmalig zeigen, daß der Messenger vom 3'-Ende her abgelesen wird.

Zur Chemie der Rekombination von Insulinketten zu biologisch aktivem Insulin

H. Zahn, B. Gutte [*] und O. Brinkhoff, Aachen

Kristallisiertes Rinderinsulin wurde in Harnstofflösung mit Mercaptoäthanol bei pH=5 reduziert. Das Gemisch der SH-Ketten wurde bei pH=9 und 4–8 °C mit Luft oxydiert und dialysiert. Gelfiltration an Bio-Gel P 150 in Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer vom pH=8,15 lieferte in 50-proz. Ausbeute eine Fraktion mit einem Molgewicht von ca. 140000. In dieser Fraktion beträgt der Anteil an B-Ketten 70% (Aminosäureanalyse, amperometrische Disulfidanalyse und Lysinanalyse mit der FDNB-Methode [1]). An der Stelle des nativen Insulins befinden sich nur 5% des Rekombinationsproduktes. In der letzten Fraktion ist der Gehalt an A-Ketten erhöht. Der Hauptgrund für die niedrigen Ausbeuten bei der Rekombination von reduzierter A- und B-Kette scheint die Bildung von Polydisulfiden aus B- und A-Ketten zu sein.

Du, Jiang und Tsou [2] erhielten bei der Resynthese Ausbeuten von 50% Insulin. Vermutlich verhindert der hohe pH-Wert 10,6 die Bildung der Polymeren, da nach Fredericq [3] Insulin bei pH=10,6 nicht mehr aggregiert.

[*] B. Gutte, Diplomarbeit, Technische Hochschule Aachen, 1964.

[1] FDNB – Fluordinitrobenzol.

[2] Y.-C. Du, R.-Q. Jiang u. C.-L. Tsou, Scientia Sinica (Peking) 14, 229 (1965).

[3] E. Fredericq, Nature (London) 171, 570 (1953).

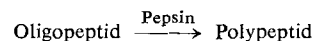
Auf einem anderen Wege wurden ebenfalls Insulinausbeuten bis zu $44 \pm 14\%$ erzielt (bestimmt anhand der Glucoseoxydation im Rattenfettgewebe). Hierzu wurde reduzierte A-Kette allein bei pH=8,8 mit Luft so lange oxydiert, bis die nachträgliche Vereinigung mit der reduzierten B-Kette eine optimale Ausbeute an biologisch aktivem Insulin ergab. In einem Versuch wurde das Optimum der regenerierten Aktivität nach einer Voroxydationszeit der A-Kette von 60 Minuten erreicht, bei einem anderen Versuch nach 100 Minuten.

Diese Resyntheseprodukte liefern bei der Gel-Filtration an Sephadex-G-75 an der Stelle des nativen Insulins eine deutliche Fraktion. Auch läßt sich das Insulin nach der Methode von Du et al. [4] mit saurem sek. Butanol extrahieren. Die Ausbeute an Insulinkristallen betrug etwa 20 bis 25% der gesamten Aktivität.

Oligomerisierung von Peptiden unter enzymatischer Katalyse

H. Determann, Frankfurt/Main

Bei der Rückreaktion der peptischen Proteolyse entstehen nur relativ niedermolekulare Kondensationsprodukte, wenn definierte Oligopeptide zur „Plastein-Reaktion“



eingesetzt werden. Dreißig solche Monomere – meist Penta-peptide – mit saurem, basischem oder neutralem Charakter, mit sehr guter und weniger guter Löslichkeit sowie mit verschiedenen Aminosäuren in der Kette und an den Enden lieferten – wenn sie sich überhaupt kondensieren ließen – ein Gemisch der homologen Oligomeren. Früher jedoch war die Bildung von proteinähnlichen Makromolekülen aus komplex zusammengesetzten Proteinhydrolysaten beschrieben worden. Wir haben jetzt solche Hydrolysate an Sephadex G-25 nach dem Molekulargewicht getrennt und erhielten aus den niedermolekularen Fraktionen durch Pepsineinwirkung ebenfalls nur niedermolekulare Plasteine. Wahrscheinlich sind die in der älteren Literatur angegebenen – und auch dort umstrittenen – hohen Molekulargewichte durch große Bruchstücke im eingesetzten Peptidgemisch oder auch durch Assoziationen zu erklären. – Die Spezifität des Pepsins für Hydrolyse und Kondensation ist bezüglich der beteiligten Carboxylgruppe identisch. Aufgrund von thermodynamischen Überlegungen und anhand einer Annahme über den Mechanismus der Pepsinkatalyse wird versucht, den frühzeitigen Stillstand der Kondensationsreaktion zu erklären.

Stand der Erforschung der spezifischen Polysaccharide von Enterobacteriaceen

O. Westphal, O. Lüderitz, Barbara Jann und K. Jann, Freiburg/Brsg.

Vergleichende Analysen der Zellwand-Lipopolysaccharide der S-Formen von mehr als hundert *Salmonella*- und ebenso vielen *E. coli*-Stämmen ergaben, daß diese Bakterien eine große Zahl von Zuckerbausteinen – darunter bislang unbekannte Desoxy- und Amino-hexosen – synthetisieren und in ihre hochverzweigten Polysaccharide einbauen können. Alle diese Polysaccharide sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut: an eine Grundkette von Polyheptosephosphat sind lange Seitenketten gebunden, die ihrerseits weiterhin verzweigt sein können. Sie

[4] Y.-C. Du, Y.-S. Zhang, Z.-X. Lu u. C.-L. Tsou, Scientia Sinica (Peking) 10, 84 (1961).

sind Träger der immunologischen Species-Spezifität (Serotypen). Die Struktur der Seitenketten wurde mit chemischen, immunochemischen und biochemischen Verfahren aufgeklärt, wobei Untersuchungen an Verlustmutanten (R-Formen) mit Enzymblocks (von Synthetasen oder Transferasen) in der Polysaccharid-Biosynthese sehr aufschlußreich waren. Die serologische und chemische Analyse von R-Formen ergab, daß alle Polysaccharide von *Salmonella*-S-Formen (Wildformen) ein gemeinsames Grundgerüst haben (basales Polysaccharid), in welchem kurze oligosaccharidische Ketten aus Glucose, Galaktose und Glucosamin an Polyheptosephosphat gebunden sind. An die terminale Glucosamin-Einheit (typisch für R_{II}-Mutanten) sind in S-Formen die sich wiederholenden Einheiten der langen O-spezifischen Seitenketten ancondensiert.

Eine chemische und genetische Klassifizierung der *Salmonellen* und anderer enterobakterieller Genera wird in Zukunft aufgrund der Struktur der sich wiederholenden Oligosaccharid-Einheiten und ihrer strukturellen Variation möglich sein. Bei der Einwirkung von Phagen können verschiedene Strukturen in andere übergehen (lysogene Konversionen). Auf diese Weise wird die serologische Klassifizierung (Kauffmann-White-Schema) durch eine biochemisch-genetische Klassifizierung ergänzt.

Viele *E. coli*-Keime bilden außer dem Zellwand-(Lipo)polysaccharid (O-Antigen) noch ein Kapsel-Antigen (K-Antigen), welches an der Zellwand dem O-Antigen aufgelagert ist. Viele, aber nicht alle K-Antigene erwiesen sich als uronsäure-haltige, sehr langkettige Polysaccharide. Das Bauprinzip einiger K-Antigene und die Struktur der determinanten Gruppe(n) wurden ermittelt. — Außer O- und K-Antigenen bilden mucocid *Coli*-Stämme noch eine Schleimsubstanz (M-Antigen; Colanic Acid von *W. F. Goebel*), welche ebenfalls ein saures Polysaccharid darstellt. Mit Hilfe des Phenol/Wasser-Verfahrens kann man aus den Bakterien alle Polysaccharide extrahieren und anschließend mit ¹⁴Cetavlon [5] in die gereinigten K- und M- (saure Polysaccharide) sowie O-Antigene (Lipopolysaccharide) trennen. Am Aufbau des K-, M- und O-spezifischen Polysaccharids des gleichen Keims können sehr verschiedene Zuckerbausteine beteiligt sein.

Eine enzymatische Methode zur kinetischen Untersuchung von Endohydrolasen : Aktivitätsbestimmung von α -Amylase

R. Werner und G. Keilich, Freiburg/Brsg.

Die Kinetik des Abbaus von Polysacchariden durch Endohydrolasen, die das Makromolekül innerhalb der Kette spalten, läßt sich nur dann exakt untersuchen, wenn man die Änderung des Molekulargewichts verfolgt. Die Bestimmung des Molekulargewichts (Zahlenmittel) ist mit Hilfe einer Exohydrolase, die monomere Kettenglieder von einem Ende des Polymeren her abspaltet, möglich, da ihre Reaktionsgeschwindigkeit von der Zahl der Endgruppen abhängt. Da durch die Endohydrolase neue Endgruppen gebildet werden, nimmt die Geschwindigkeit der Exohydrolase-Reaktion zu; ihre Änderung ist also ein quantitatives Maß für die Aktivität der Endohydrolase.

Diese neue Methode zur Aktivitätsbestimmung von Endohydrolasen wird am Beispiel der α -Amylase erläutert. Als Exohydrolase wird eine Polysaccharid-phosphorylase verwendet, deren Reaktionsgeschwindigkeit sich durch Bestimmung des gebildeten Glucose-1-phosphats mit Hilfe von Phosphoglucomutase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase im optisch-enzymatischen Test leicht messen läßt. Die Aktivität der α -Amylase wird dabei direkt in international definierten Einheiten — μ Mol gesplattene glucosidische Bindungen pro Minute — angegeben. Die Methode läßt sich grundsätzlich bei allen Endohydrolasen anwenden, für deren Substrat spezifische Exohydrolasen bekannt sind.

[5] Cetyl-trimethylammoniumbromid.

Für die Molekulargewichte nativer Dextrane hatte man, gestützt auf Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge und mit der Lichtstreuung, außerordentlich hohe Werte von etwa 5×10^8 angenommen. Nach molekularkinetischen Abschätzungen aufgrund der molekularen Wirksamkeit des Enzyms hätten sich so große Moleküle erst nach längeren Reaktionszeiten bilden dürfen.

Es wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, das Zahlenmittel der Molekulargewichte (M_n) von nativen Dextranen zu bestimmen: die endständige Saccharosegruppe wird enzymatisch abgespalten und die resultierende aldehydische Endgruppe wird mit tritiumhaltigem Lithiumborhydrid reduziert; die spezifische Radioaktivität kann dann mit M_n in Beziehung gesetzt werden. Dabei ergeben sich M_n -Werte um 2×10^5 für Dextrane, die bei niedrigen Substratkonzentrationen erhalten wurden. Diese Werte stimmen mit den Ergebnissen der Fraktionierung an einer Baker-Williams-Kolonne überein. Die eingangs erwähnten hohen Werte werden Assoziaten zugeschrieben.

Kinetische Untersuchungen zur Biosynthese der Cellulose

M. Marx-Figini, Mainz

An den Samenhaaren verschieden lang gereifter Baumwollkapseln wurden die Menge synthetisierter Cellulose und deren Polymerisationsgrad in Abhängigkeit von der Reifezeit ermittelt und miteinander in Beziehung gesetzt.

Die Messungen zeigten, daß die Biosynthese der Cellulose deutlich zwei aufeinanderfolgende Phasen aufweist. In der ersten Phase verläuft die Synthese langsam und liefert nur wenig Cellulose. Die Hauptmenge der Cellulose entsteht während der zweiten Phase, die spontan einsetzt und in der die Synthese erheblich schneller verläuft. Die Zuordnung der zwei Reaktionsphasen zur Bildung der als Primär- und Sekundärwand bezeichneten Zellwandschichten wird durch die ermittelten Polymerisationsgrade sowie durch das Quellungsverhalten der Samenhaare, das Längenwachstum und die Menge gebildeter Nichtcelluloseanteile in den verschiedenen Reifestadien gesichert.

Der Polymerisationsgrad nimmt beim Übergang von der ersten zur zweiten Reaktionsphase sprunghaft um nahezu eine Größenordnung zu und bleibt dann während der gesamten Sekundärwandsynthese konstant. Er ist unabhängig von Umsatz und Reaktionsgeschwindigkeit und so gut wie völlig einheitlich. Es muß daher der Schluß gezogen werden, daß bei der Biosynthese der Cellulose in höheren Pflanzen die Herstellung eines konstanten Polymerisationsgrades durch Matrizen gesteuert wird.

Modellvorstellungen zur Cellulosesynthese und zum Aufbau der pflanzlichen Zellwand

G. V. Schulz, Mainz

Durch die von M. Marx-Figini mitgeteilten Untersuchungen (siehe vorangehendes Referat) wurde wahrscheinlich gemacht, daß die Biosynthese der Cellulose durch Matrizen gesteuert wird. Wir haben versucht, aufgrund der Eigenschaften der Cellulose und morphologischer Beobachtungen Vorstellungen über die Struktur des synthetisierenden Systems zu entwickeln. Zunächst ergibt sich aus dem Molekulargewicht, daß die Matrize etwa $5 \times 14000 \text{ \AA} = 7 \mu$ lang sein muß.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellwänden (Frey-Wyssling, Mühlethaler, Preston) zeigen, daß die Sekundärwand aus Fibrillen unbestimmter Länge mit Durchmessern von 50 bis 150 \AA besteht. Diese sind parallel in Lagen angeordnet, die sich unter bestimmten Winkeln kreuzen. Diese Struktur schließt aus, daß das an der Matrize synthetisierte