

[4] Weitere Einzelheiten über iPA: H. Feldmann, D. Dütting u. H. G. Zachau, noch unveröffentlicht.

[5] Das Spektrum wurde mit einem CEC 21-110 Massenspektrometer durch direktes Verdampfen der Probe in die Ionquelle aufgenommen. 10–20 µg iPA aus dem Fluat eines Papierelektropherogramms wurden verwendet; K. Biemann, P. Bonner u. Desiderio, Tetrahedron Letters 1964, 1725.

[6] K. Biemann u. J. A. McCloskey, J. Amer. chem. Soc. 84, 2005 (1962).

[7] Das Spektrum wurde mit einem A-60 Varian-Spektrometer in Verbindung mit dem C-1024 Time Averaging Computer mit ca. 300 µg iPA in D₂O aufgenommen.

[8] R. H. Hall, M. J. Robins, L. Stasiuk u. R. Thedford, J. Amer. chem. Soc., im Druck.

[9] D. S. Letham, J. S. Shannon u. I. R. McDonald, Proc. chem. Soc. (London) 1964, 230.

[10] H. Q. Hamzi u. F. Skoog, Proc. nat. Acad. Sci. USA 51, 76 (1964).

doppelsträngigen Bereichen befindlichen Nucleotide (und daraus die Zahl der Basenpaare) und trägt diese graphisch gegen die Hyperchromiewerte auf, so ergibt sich zwischen ca. 15 und 40 % Hyperchromie eine nahezu lineare Abhängigkeit.

Die früher [2] unter anderen Bedingungen gewonnenen Daten über N-Oxidierbarkeit und Hyperchromie von s-RNS aus Bäckerhefe gehorchen innerhalb der Fehlergrenze dieser Abhängigkeit. Damit läßt sich die Hyperchromie von s-RNS ganz allgemein in eine direkte Beziehung zum Basenpaarungsgrad setzen, der mit Hilfe der N-Oxidation ermittelt werden kann.

Vermutlich hat s-RNS eine variable Sekundärstruktur, die stark von der Mg²⁺-Konzentration und vielleicht noch von anderen Faktoren abhängt. Es bietet sich nunmehr die Möglichkeit, durch eine Hyperchromiemessung mit geringsten Substanzmengen unter zellähnlichen Bedingungen den Basenpaarungsgrad zu ermitteln.

Eingegangen am 2. Mai 1966 [Z 218]

Untersuchungen zur Sekundärstruktur löslicher Ribonucleinsäuren

Von Dipl.-Chem. H. Doeppner, Dr. H. Seidel und Prof. Dr. F. Cramer

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen

Die N-Oxidation von Adenosin-Einheiten in Polynucleotiden mit Perphthalsäure bei pH = 7,0 wird durch Basenpaarung gehemmt, wodurch man Kenntnisse über die Sekundärstruktur von s-RNS^[1] gewinnen kann^[2]. Wir haben diese Methode auf RNS verschiedener Herkunft und Präparation angewendet. Es wurde von uns s-RNS aus Bierhefe (AMP 19,8 %, UMP 24,5 %, GMP 28,2 %, CMP 27,5 %, terminales A 47 %) und s-RNS aus *E. coli* B (AMP 20,5 %, UMP 18,2 %, GMP 30,2 %, CMP 31,1 %, terminales A 34,0 %) in „nativem“ Zustand und nach Hitzedenaturierung und Abkühlen untersucht. Die Versuchsreihen wurden wie früher^[2] ausgewertet. Als Maß für den Oxidationsgrad diente der Quotient E₂₃₂ mµ/E₂₅₉ mµ. Mit Hilfe einer Eichkurve wurde daraus auf den mittleren Gehalt oxidierten AMP-Einheiten im Molekül und durch Addition der restlichen Basen im analytisch ermittelten Verhältnis auf die mittlere Gesamtzahl der pro Molekül in einsträngigen Bereichen vorhandenen Nucleotide geschlossen.

[1] Abkürzungen: A = Adenosin. – s-RNS = lösliche Ribonucleinsäure. – AMP = Adenosinmonophosphat. – UMP = Uridinmonophosphat. – CMP = Cytidinmonophosphat. – GMP = Guanosinmonophosphat. – T_m-Wert = Temperatur beim halben Extinktionsanstieg. – E = Extinktion.

[2] H. Seidel u. F. Cramer, Biochim. biophysica Acta 108, 367 (1965).

[3] Unter Hyperchromie versteht man den Extinktionsanstieg bei der thermischen Auflösung geordneter Strukturen.

[4] G. L. Brown u. G. Zubay, J. molecular Biol. 2, 287 (1960); J. E. M. Midgley, Biochim. biophysica Acta 108, 340 (1965); T. Lindahl, B. B. Henley u. J. R. Fresco, J. Amer. chem. Soc. 87, 4961 (1965).

Proteinsynthese in Rattenleber-Chromatin und Chromatin-Fraktionen^[1]

Von Doz. C. E. Sekeris, W. Schmid, Dr. D. Gallwitz und Dr. I. Lukacs

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Marburg

Neben der „klassischen“ Protein-Biosynthese an messenger-RNS und Ribosomen, die auch im Zellkern nachgewiesen wurde^[2], gibt es im Zellkern offenbar noch eine anders verlaufende Proteinsynthese. Wir fanden, daß isoliertes Chromatin

	s-RNS aus			
	Bierhefe		<i>E. coli</i> B	
	nativ	erhitzt und abgekühlt	nativ	erhitzt und abgekühlt
Endoxidationsgrad (E ₂₃₂ /E ₂₅₉)	0,825	1,080	0,910	1,025
Oxidierte AMP-Einheiten (Mittel pro Molekül)	2,68	4,93	3,41	4,44
Nucleotideinheiten in einsträngigen Bereichen (Mittel pro Molekül)	13,54 (18 %)	24,93 (32 %)	16,64 (23 %)	21,67 (30 %)
Mittlere Nucleotidzahl pro Molekül	77	77	73	73
Basenpaarungen (Mittel pro Molekül)	$\frac{77-14}{2} = 31,5$	$\frac{77-25}{2} = 26$	$\frac{73-17}{2} = 28$	$\frac{73-22}{2} = 25,5$
Hyperchromie der unbehandelten s-RNS (0,4 M Phosphat; 0,01 M Mg ²⁺)	35 %	19 %	25 %	19 %

Die geringere Oxidierbarkeit von s-RNS aus Bierhefe im Vergleich zur s-RNS aus *E. coli* dürfte auf den höheren UMP-Gehalt zurückzuführen sein und steht in Übereinstimmung mit der höheren Hyperchromie^[3]. Erhitzt man s-RNS längere Zeit über den T_m-Wert^[1] und kühlt dann langsam ab, so steigt die Oxidierbarkeit in beiden Fällen beträchtlich, gleichzeitig sinkt die Hyperchromie.

Bestimmt man durch Subtraktion der im Mittel pro Molekül in einsträngigen Bereichen vorhandenen Nucleotideinheiten von der mittleren Gesamtnucleotidzahl^[4] die Zahl der in

aus Rattenleber-Zellkernen [¹⁴C]-Leucin in Protein einbaut. Das neue Protein synthetisierende System zeigt folgende Eigenschaften (Tabelle):

- Der Einbau von radioaktiv markierter Aminosäure in Protein ist gegen Ribonuclease resistent.
- Die Proteinsynthese ist von der Zugabe aminosäure-aktivierender Enzyme unabhängig.
- Die Proteinsynthese wird durch messenger-RNS nicht stimuliert.

4. Bei der Inkubation mit Desoxyribonuclease verliert das System an Aktivität.

	Einbau von [¹⁴ C]-Leucin in Protein [Imp./min × mg Protein]
Chromatin allein [a]	1840
Chromatin + Ribonuclease (50 γ/ml)	1985
Chromatin + 105 000-g-Überstand (2 mg Protein)	1795
Chromatin + 50 γ messenger-RNS (aus Rattenleber)	1825
Chromatin + Desoxyribonuclease (100 γ/ml)	525

[a] Chromatin (1 mg Protein, Präparat nach Desoxycholatbehandlung, siehe unten), 7,5 μM KCl, 3 μM MgCl₂, 80 μM Tris(2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol), 0,15 μM ATP, 150 μM GTP, 0,5 μM Kreatinphosphat, 10 γ Kreatinphosphokinase, je 0,025 μM von 20 Aminosäuren und 0,1 μC [¹⁴C]-Leucin (spezifische Aktivität 150 mCi/mMol). Volumen: 0,5 ml. Inkubationszeit: 60 min bei 37 °C. Der Einbau wurde wie in [3] beschrieben gemessen.

Das Chromatin wurde aus Rattenleber-Zellkernen nach Weiss^[4] isoliert. Das Präparat („aggregate enzyme“ nach Weiss) baut Ribonucleosid-triphosphate in RNS ein und besteht aus DNS/RNS/Protein im Gew.-Verhältnis 1:2:10 bis 15. Durch Einwirkung von 0,2 % Na-Desoxycholat in 0,065 M Tris-Puffer (pH = 7,9) konnte das Präparat vom Hauptteil (ca. 90 %) der Proteine befreit werden. Das durch niedrigtourige Zentrifugation gewonnene Sediment enthält die volle Aktivität und zeigt ein DNS/RNS/Protein-Verhältnis von 1:0,4:1,5. Es wurde in 0,065 M Tris-Puffer (pH = 7,9) suspendiert und mit 100 μg/ml Desoxyribonuclease und MgCl₂ (2 μM) 30 min bei 37 °C geschüttelt. Dabei verändert sich die glasig-klare Fadenstruktur des Präparats und man erhält ein weißes Pulver. Durch Zentrifugation wird ein weißer Niederschlag und ein leicht getrübter Überstand gewonnen. Der Niederschlag enthält die gesamte Aktivität; der Überstand, in dem freigesetzte Desoxyribonucleotide, RNS und Proteine nachweisbar sind, wirkt dagegen hemmend (die Natur des Hemmfaktors ist noch nicht bekannt; er ist hitzestabil; Molekulargewicht zwischen 3000 und 15000). Behandlung des Niederschlags mit Ribonuclease (100 μg/ml, 20 min, 37 °C) entfernt Proteine und RNS ohne Aktivitätsverlust. Das DNS/RNS/Protein-Verhältnis beträgt nach dieser Behandlung 2:1,5:6,5. Durch partielle Verdauung mit Trypsin wird ein Teil des Enzyms in aktivem Zustand in Lösung gebracht und findet sich nach Zentrifugieren im Überstand.

Die Protein-Synthese wird gehemmt durch Histone aus Rattenleber-Zellkernen (durch 1 mg/ml bis zu 90 %), durch Protamin-Sulfat (1 mg/ml bis zu 98 %) und durch Antibiotika wie Chloromycetin (1 mg/ml → 98 % Hemmung) oder Puromycin (0,4 mg/ml → 80 % Hemmung). Papierchromatographisch (Fingerprint-Methode) ließ sich zeigen, daß das Leucin in Peptide eingebaut wird. 10–15 % der eingebauten Aktivität sind in 0,2 N HCl löslich. Das neu synthetisierte Protein wird vom Enzymkomplex nicht freigesetzt. Von der mit HCl nicht extrahierten Aktivität löst sich ein geringer Teil in 8 M Harnstoff.

Die biologische Bedeutung dieser RNS-unabhängigen Protein-Synthese ist noch unbekannt. Ein Teil des gebildeten Proteins ist wahrscheinlich Strukturprotein des Chromatins, jedoch ist auch eine Regulator-Funktion in Betracht zu ziehen. Hierfür spricht, daß die Protein-Synthese am Chromatin durch hormonell aktive Steroide beeinflußt wird und daß sie nach partieller Hepatektomie ansteigt. Weitere Versuche hierzu sind im Gange.

Eingegangen am 29. April 1966 [Z 224]

[1] 2. Mitteilung zur Proteinsynthese im Zellkern. — 1. Mitteilung: C. E. Sekeris, W. Schmid, D. Gallwitz u. I. Lukacs, Life Sciences, im Druck.

[2] J. H. Frenster, V. G. Allfrey u. A. E. Mirsky, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 432 (1960); T. Y. Wang, Biochim. biophysica Acta 49, 108 (1961).

[3] N. Lang u. C. E. Sekeris, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 339, 238 (1965).

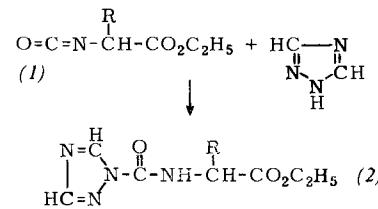
[4] S. B. Weiss, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 1020 (1960).

Peptid- und Azapeptid-Synthesen mit N-[1-(1,2,4-Triazolyl)-carbonyl]-aminoäureestern

Von Dr. J. Gante^[*]

Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin

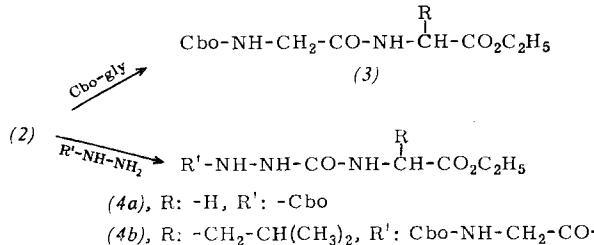
Äquimolare Gemische aus 1,2,4-Triazol und α-Isocyanato-fettsäure-äthylestern (1)^[1] reagieren exotherm zu den bisher unbekannten N-[1-(1,2,4-Triazolyl)-carbonyl]-aminoäure-äthylestern (2). Bei der Reaktion mit den trügeren Isocyanaten (1c) und (1d) wird 1 Std. auf 90 °C erhitzt.



(2)	R	Ausb. [%]	Fp [°C]	opt. Drehung
(a)	—H	84	109–111	
(b)	—CH ₃	79	62	
DL-Form				
(c)	—CH ₂ —C ₆ H ₅	95	103	[α] _D ²⁵ = -15,0 ° (c = 1, Essigester)
(d)	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	75	65–67	[α] _D ²⁵ = -6,1 ° (c = 1, Essigester)
L-Form				

Die Verbindungen (2a)–(2d) sind farblose Substanzen, die aus wasserfreiem Essigester/Petroläther oder aus wasserfreiem Äther/Petroläther gut kristallisiert. Der Substitutionsort am Triazolring ergibt sich aus den NMR-Spektren (aufgenommen in CCl₄) von (2b) und (2d): In Übereinstimmung mit Untersuchungen von H. A. Staab am N-Acetyl-1,2,4-triazol^[2] beweisen jeweils zwei Protonensignale gleicher Intensität bei 2,13 und 1,17 τ bzw. 2,15 und 1,20 τ die unsymmetrische Struktur (2) mit ungleichwertigen Triazol-Protonen.

Die Verbindungen (2a)–(2d) eignen sich wie die entsprechenden Imidazol-Derivate^[3] zu Peptidsynthesen. So erhält man durch Erhitzen (9–12 Std.) mit äquimolaren Mengen Carbobenzoxy-glycin (Cbo-gly) auf 90–110 °C unter CO₂-und Triazol-Abspaltung die Dipeptide (3a)–(3d), die sich durch Umfällen aus Äthanol/Wasser reinigen lassen.



(3)	R	Ausb. [%]	Fp [°C]
(a)	—H	72	80–81
(b)	—CH ₃	59	56–58
DL-Form			
(c)	—CH ₂ —C ₆ H ₅	87	Öl
(d)	—CH ₂ —CH(CH ₃) ₂	76	Öl
L-Form			