

Isolierung aus dem Nährmedium entfällt. Die Bakterien können mehrmals verwendet werden. Erst ab der dritten Inkubation tritt eine geringe Ausbeute-Minderung ein.

Bei der Einwirkung von *P. shermanii* auf δ -Aminolaevulin-säure wird nicht nur Porphobilinogen an das Medium abgegeben. Wir prüfen, ob die weiteren Verbindungen^[3] Zwischenprodukte der Porphyrinbildung oder der Biosynthese des Corrin-Ringes sind.

Arbeitsvorschrift:

Man läßt einen kobaltfreien Ansatz (4 Liter) von *P. shermanii* unter bereits beschriebenen Bedingungen^[4] drei Tage wachsen. Die durch Zentrifugieren gewonnene Bakterienfeuchte-masse (ca. 100 g) wird mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan/HCl-Puffer (pH = 8,2)^[5] gewaschen und in 1500 ml des Puffers suspendiert. Nach Zusetzen einer Lösung von 820 mg δ -Aminolaevulin-säure-hydrochlorid in 100 ml Wasser, deren pH-Wert mit NaOH auf 7 eingestellt worden war, inkubiert man 1 Std. bei 70°C unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff. Die durch Zentrifugieren von den Bakterien befreite Lösung wird mit verdünnter Salzsäure auf pH = 7,2 eingestellt und auf eine Säule (10 cm Länge, 4,5 cm Durchmesser) aus DEAE-Cellulose (DEAE-Sephadex A-25) gegeben, deren Chlorid-Form mit Tris(hydroxymethyl)amino-methan/HCl-Puffer (pH = 7,2) so lange gewaschen worden war, bis das Eluat pH = 7,2 hatte. Man eluiert mit Puffer, bis kein Porphobilinogen mehr von der Säule kommt, engt im Vakuum auf ca. 1800 ml ein, stellt mit verdünnter Salzsäure auf pH = 4 ein und fällt mit 20-proz. Quecksilber(II)-acetat-Lösung. Der Niederschlag wird abzentrifugiert, mit 1-proz. Quecksilber(II)-acetat-Lösung gewaschen und in ca. 3 ml Wasser suspendiert. Zur Zersetzung der Quecksilberverbindung leitet man H₂S in die Suspension ein. Man zentrifugiert ab, leitet zur Vertreibung von H₂S Stickstoff durch die Lösung und stellt mit verdünntem Ammoniak auf pH = 4 ein, wobei sich Porphobilinogen als Rohprodukt abscheidet^[6]. Nach 12 Stunden im Kühlschrank wird abzentrifugiert. Im Zentrifugenbecher fügt man die zur Auflösung des Porphobilinogen eben erforderliche Menge 0,5 N Ammoniak hinzu, zentrifugiert vom nicht Gelösten ab, stellt zur Fällung des Porphobilinogen mit Eisessig vorsichtig auf pH = 4 ein und läßt über Nacht im Kühlschrank stehen. Die Kristalle werden abgesaugt, mit eiskalter verdünnter Essigsäure (pH = 4) und gleich anschließend mit wenig kaltem Aceton gewaschen. Man trocknet im Vakuumexsiccator über P₂O₅. Ausbeute: 73 mg Porphobilinogen (12 %).

Eingegangen am 1. August 1967 [Z 588]

[*] Dipl.-Chem. G. Bezold, Dr. G. Müller und Dr. O. Müller Isotopenlaboratorium der Abteilung für Chemie, Geologie und Biologie der Universität
7 Stuttgart, Azenbergstraße 14-16

[1] Literaturzusammenstellung: J. E. Falk: Porphyrins und Metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam 1964.

[2] W. Walerych, Acta Biochim. Polon. 10, 243 (1963).

[3] Die Identifizierung der Substanzen befindet sich ebenfalls in Arbeit.

[4] K. Bernhauer, E. Becher u. G. Wilharm, Arch. Biochem. 83, 248 (1959).

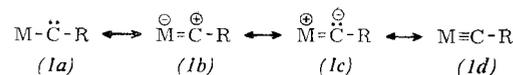
[5] Biochemisches Taschenbuch. 2. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg 1964, 2. Teil, S. 99.

[6] G. H. Cookson u. C. Rimington, Biochem. J. 57, 476 (1954).

Triphenylstannyl- und Trimethylsilyl-äthoxycarbonyl-carben aus Triphenylstannyl- bzw. Trimethylsilyl-diazoessigsäureäthylester

Von U. Schöllkopf und N. Rieber^[*]

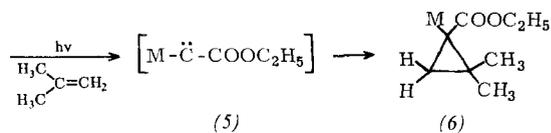
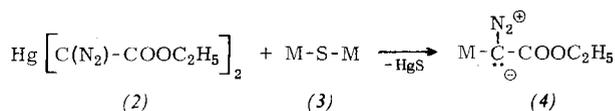
Für metallsubstituierte Carbene sind ungewöhnliche Eigenschaften zu erwarten, weil das Metallatom mit seinen leeren und/oder gefüllten Elektronenbahnen mit den gefüllten und/oder leeren Orbitalen des Carbenkohlenstoffs in Wechselwirkung treten kann [mesomere Grenzstrukturen (1a) bis (1d)].



M=Metall

Als erste metallsubstituierte Carbene konnten wir Triphenylstannyl- und Trimethylsilyl-äthoxycarbonyl-carben (5) darstellen, indem wir Triphenylstannyl- bzw. Trimethylsilyl-diazoessigsäureäthylester (4) [$\nu(\text{N}_2) = 2080 \text{ cm}^{-1}$ für (4a), 2090 cm^{-1} für (4b)], $\nu(\text{CO}) = 1670 \text{ cm}^{-1}$ für (4a), 1685 cm^{-1} für (4b)] in Isobuten bis zur Entfärbung der Lösung photolytisierten^[1]. Dabei entstanden mit 35 bzw. 49 % Ausbeute 1-Triphenylstannyl- bzw. 1-Trimethylsilyl-1-äthoxycarbonyl-2,2-dimethylcyclopropan (6) [$\nu(\text{CO}) = 1710 \text{ cm}^{-1}$ für (6a), 1715 cm^{-1} für (6b)]; NMR: AB-Spektrum der Cyclopropylprotonen; $\tau = 8,7$ (CCl₄), $J_{\text{AB}} = 4,5 \text{ Hz}$ für (6a), $\tau = 9,0$ (C₆D₆), $J_{\text{AB}} = 4 \text{ Hz}$ für (6b)]. Die Addukte (6) wurden durch Chromatographie über Kieselgel (eluiert mit Petroläther/Äther = 5:1) isoliert.

Die Ausgangsstoffe (4a) und (4b) gewannen wir mit 95 bzw. 75 % Ausbeute durch 5- bzw. 3-stündiges Erhitzen von Quecksilber-bis-diazoessigsäure-äthylester (2)^[2] in Benzol (80°C) mit etwas mehr als einem Äquivalent Bis-triphenylstannyl- bzw. Bis-trimethylsilyl-sulfid (3a) bzw. (3b). Zur Isolierung wurde filtriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer (30°C/12 Torr) vom Benzol befreit.



(a), M = Sn(C₆H₅)₃

(b), M = Si(CH₃)₃

Eingegangen am 1. August 1967 [Z 589]

[*] Prof. Dr. U. Schöllkopf und Dr. N. Rieber
Organisch-Chemisches Institut der Universität
34 Göttingen, Windausweg 2

[1] Bedingungen: -7°C, Hanovia Hg-Hochdrucklampe 450 Watt, Pyrexfilter: bei (4a) 0,0025 M, 3 Std.; bei (4b) 0,003 M, 8 Std.

[2] Vgl. F. Gerhart, U. Schöllkopf u. H. Schumacher, Angew. Chem. 79, 50 (1967); Angew. Chem. internat. Edit. 6, 74 (1967).

Thermophile und mesophile Aminopeptidasen aus Bacillus stearothermophilus^[1]

Von H. Zuber und G. Roncari^[*]

Aus mehreren Stämmen von Bacillus stearothermophilus^[2] konnten wir drei Aminopeptidasen isolieren, die sich in Molekulargewicht, Thermostabilität und Substratspezifität unterscheiden. Aminopeptidase I (AP I) ist thermostabil und wird daher als thermophiles Enzym bezeichnet. Die Aminopeptidasen II und III (AP II und AP III) sind mesophile Enzyme und thermolabil. Alle drei Enzyme sind Metallenzyme. In der nativen Form dürften sie als Co²⁺- oder Mn²⁺-Enzyme vorliegen, da Co²⁺ und Mn²⁺ nach Inaktivierung der Enzyme mit EDTA am besten reaktivieren (Co²⁺ = Mn²⁺ >> Mg²⁺ > Ni²⁺ > Cd²⁺). Ca²⁺, Zn²⁺ und Fe²⁺ aktivieren nicht, sondern hemmen in Konzentrationen von 0,001 bis 0,05 M. Das pH-Optimum aller drei Enzyme liegt bei pH = 7,5 bis 9. Die Substratspezifität (Tabelle 2) ist zum Teil stark verschieden von der Spezifität der Leucinaminopeptidase (LAP)^[3] aus Schweineieren.

Tabelle 1. Eigenschaften der Aminopeptidasen I–III.

	AP I	AP II	AP III
Molgewicht [a]	ca. 150 000	ca. 70 000	ca. 80 000
Michaelis-Konstante K_m (60 °C, Leu-Gly) (mmol/l)	95	37	4
Aktivierungsenergie [b] (kcal/mol)	16,3	16,3	
Temperaturoptimum [b] (°C)	90	60	60
Thermostabilität [c] (% der Ausgangsaktivität nach			
3 min		64	81
18 min	120	35	54
120 min	120	0	0
bei 80 °C)			

[a] Bestimmt durch Gelfiltration, Sephadex G-200, 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2, 10^{-3} M Co^{2+} .

[b] Bestimmt durch Hydrolyse einer 0,0075–0,06 M Leu-Gly-Lösung (AP I und AP II) bzw. einer 0,0002–0,002 M Leu-Gly-Lösung (AP III) (0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2, 10^{-3} M Co^{2+} . Inkubationszeit: 10 min bei 20, 40, 60, 80, 90 °C).

[c] Bestimmt durch Hydrolyse einer 0,06 M Leu-Gly-Lösung, 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2, 10^{-3} M Co^{2+} . Inkubationszeit: 10 min bei 65 °C (AP I) oder 37 °C (AP II und III).

AP I hat eine spezifische Aktivität von 1000 Einheiten $mg^{-1} \cdot min^{-1}$, wenn man die Einheit definiert als Hydrolyse von 1 μ mol Substrat/min. Die molekulare Aktivität beträgt $150000 \text{ mol} \cdot (\text{mol Enzym}^{-1}) \cdot \text{min}^{-1}$. Beide Aktivitäten wurden bestimmt durch Hydrolyse einer 0,045 M Lösung von Gly-Leu-Tyr in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2, 10^{-3} M Co^{2+} bei 65 °C.

Tabelle 2. Substratspezifitäten (Substratkonz.: 0,045 M, 65 °C, 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2, $0,001 \text{ M } Co^{2+}$). Die Zahlen (außer in der Spalte C_1) bedeuten % Hydrolyse/5 min.

Peptid	AP I	C_1 [a]	AP II	AP III
Leu-Gly	16	30	1,6	1,6
Gly-Leu	0,8	1,4	0,1	0,09
Leu-amid	5	8,8	9	1,2
Leu-Gly-Gly	30	50	25	80
Gly-Leu-Tyr	36	77	8	18
Pro-Tyr-Lys	3,2	5,6	2,7	25
Glu-Ala-Ala	5,5	9,8	1,2	1,7
Lys-Tyr-Glu	1,5	2,6	1,3	24

[a] $C_1 = k_1/E$; k_1 = Reaktionsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung; E = Proteinkonz. (mg N/ml) bei Annahme eines Stickstoffgehaltes im Protein von 15 %.

AP I wurde durch wiederholte Chromatographie in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (10^{-3} M Co^{2+}) an Sephadex G-150 und DEAE-Sephadex A-50, AP II und III durch wiederholte Chromatographie an Sephadex G-100 und DEAE-Sephadex gereinigt. In der Polyacrylamidgel-Elektrophorese^[4] (pH = 8,9, 45 min) sind AP I, AP II und AP III einheitlich. Erste Versuche in der Ultrazentrifuge ergaben für AP I: $S_{20} = 2,80 \times 10^{-13}$ und $D_{20} = 1,8 \times 10^{-7} \pm 0,16$ (symmetrische Bande). Daraus geht hervor, daß AP I in Lösung als stark hydratisiertes oder sehr langgestrecktes Molekül vorliegt. AP I ist stabil in 8 M Harnstoff-Lösung, wird aber durch wasserstoffbrücken-spaltende Reagentien, wie Ameisensäure oder LiBr, inaktiviert und in Bruchstücke gespalten (Gelelektrophorese).

Alle drei Enzyme findet man schon zu Beginn der log-Phase der Wachstumskurve der Bakterien sowohl in der Zelle als auch im Kulturmedium. Die Ausbeute an Enzym ist am Ende der log-Phase und in der stationären Phase (24–30 Std.) maximal. AP I, AP II und AP III sind in den verschiedenen Stämmen von *Bacillus stearothermophilus* in unterschiedlichen Mengen vorhanden. Obligate thermophile Stämme (Temperaturoptimum 55 °C, kein Wachstum bei 37 °C) produzierten viel AP I und AP II und wenig AP III, während obligate mesophile Stämme (Temperaturoptimum 37 °C, kein Wachstum bei 55 °C) viel AP III und sehr wenig AP I und AP II enthalten. Fakultative Stämme (Wachstum bei 37 °C und 55 °C) können die drei Aminopeptidasen in vergleichbarer Menge enthalten.

Zur Gewinnung des Enzym-Rohgemisches wurden die Bakterien mit Ultraschall oder in der Sandmühle aufgeschlossen. Lysozymbehandlung setzte nur AP II und AP III frei, AP I scheint stärker an Zellmembranen gebunden zu sein. Aus dem Kulturmedium wurden die Aminopeptidasen durch Adsorption an DEAE-Sephadex (pH = 7,2) und Eluierung mit 1 M NaCl-Lösung (0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH = 7,2, 10^{-3} M Co^{2+}) gewonnen.

Eingegangen am 7. Juli und 8. August 1967

[Z 582]

[*] Priv.-Doz. Dr. H. Zuber und Dr. G. Roncari
Laboratorium für Molekularbiologie
der Eidgenössischen Technischen Hochschule
CH-8006 Zürich (Schweiz), Universitätsstraße 6

[1] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung unterstützt (Projekt No. 3426).

[2] ATCC 7953, 7954; NCIB 8924, 8157, 8920, 8222.

[3] E. L. Smith u. D. H. Spackman, J. biol. Chemistry 212, 271 (1955).

[4] B. J. Davis, Ann. New York Acad. Sci. 121, 404 (1964).

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Molekularstrahl-Streuexperimente zur Untersuchung der Reaktion von Kalium mit Methyljodid, Bromwasserstoff und Brom

Von J. P. Toennies[*]

Untersuchungen über die Kinetik von Reaktionen in der Gasphase haben in den letzten Jahren durch neue theoretische und experimentelle Entwicklungen starke Impulse erhalten. Besonders interessant sind Arbeiten zur Ermittlung reaktiver Stoßquerschnitte durch Streuexperimente mit gekreuzten Molekularstrahlen. In der Theorie der chemischen Reaktionen nehmen die reaktiven Querschnitte eine zentrale Stellung ein, weil sie vom Wechselwirkungspotential zwischen

allen an der Reaktion beteiligten Atomen abhängen und damit die einzigen Meßgrößen sind, die Auskunft über das Potential geben. Der Zusammenhang zwischen Potential und Querschnitt wird mit Hilfe von klassischen Trajektorien-Rechnungen hergestellt. Außerdem können aus reaktiven Querschnitten Reaktionskonstanten direkt berechnet werden. Die aus Molekularstrahl-Streuexperimenten gewonnenen Querschnitte ermöglichen also zum erstenmal die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Wechselwirkungspotential und der Reaktionskonstante.

Aus experimentellen Gründen konnten in den in USA von Datz, Herschbach und Bernstein durchgeführten Molekularstrahl-Streuexperimenten bis jetzt nur Reaktionen untersucht werden, an denen mindestens ein Alkaliatom (M) beteiligt ist. Die exotherme Reaktion



[*] Doz. Dr. J. P. Toennies
Physikalisches Institut der Universität
53 Bonn, Nußallee 12