

HANS GEORG ZACHAU

Reaktionsfähige Aminosäureester als Modelle der Aminoacyl-ribonucleinsäure, I¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 24. März 1960)

Es werden Versuche zur Deutung des besonderen Charakters der reaktionsfähigen und energiereichen Esterbindung in der Aminoacyl-ribonucleinsäure beschrieben. Aminosäureester der Ribonucleotide und -nucleoside wurden synthetisiert, alkalisch verseift und mit Hydroxylamin umgesetzt. Die gleichen Reaktionen wurden mit dem Aminosäureester der RNA^{*)} durchgeführt. Der Vergleich der kinetischen Daten ergab: 1. Die makromolekulare Struktur der RNA übt keinen wesentlichen Einfluß auf die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung aus. — 2. Der Einfluß der verschiedenen Purin- und Pyrimidinbasen auf die Reaktionsfähigkeit ist etwa gleich. — 3. Die Phosphorsäure der Nucleotide beeinflusst die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung.

In einer Zwischenstufe der Proteinbiosynthese²⁾ tritt eine Aminosäure-Ribonucleinsäure-Verbindung auf. Die Spaltung der Bindung zwischen Aminosäure und RNA ist von einer Änderung der freien Energie begleitet^{3,7)}, die in der Größenordnung derjenigen der ATP-Spaltung liegt ($\Delta F = -7$ bis -8 kcal⁴⁾). In früheren Arbeiten war gefunden worden, daß in der Aminoacyl-RNA die Aminosäure mit der 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe eines endständigen Adenosins der RNA verestert ist⁵⁻⁷⁾. Es liegt hier also eine Esterbindung vor, die etwa so „energiereich“ ist, wie die Phosphorsäure-Anhydrid-Bindung des ATP. Die Aminoacyl-RNA spielt in der Proteinbiosynthese die Rolle einer reaktionsfähigen, die Aminosäuren übertragenden Verbindung.

Zur Beantwortung der Frage, welche Strukturelemente im Aminoacyl-RNA-Molekül den besonderen Charakter der Esterbindung bedingen, werden in dieser Arbeit synthetische Nucleosid- und Nucleotidester und in der folgenden Ester cyclischer Alkohole und Dirole herangezogen. Die bei der alkalischen Verseifung dieser Substanzen und bei der Reaktion mit Hydroxylamin gewonnenen kinetischen Daten werden

^{*}) Verwendete Abkürzungen: RNA = „lösliche“ Ribonucleinsäure; ATP = Adenosin-triphosphat; AMP, IMP, GMP, UMP, CMP = 5'-Phosphate des Adenosins, Inosins, Guanosins, Uridins und Cytidins.

¹⁾ H. Mitteil.: H. G. ZACHAU und W. KARAU, Chem. Ber. **93**, 1830 [1960], nachstehend.

²⁾ Zusammenfassende Darstellungen: R. B. LOFTFIELD, Progr. in Biophys. **8**, 348 [1957]; J. L. SIMKIN, Annu. Rev. Biochem. **28**, 145 [1959].

³⁾ E. GLASSMAN, E. H. ALLEN und R. S. SCHWEET, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4427 [1958]; F. LIPMANN, W. C. HÜLSMANN, G. HARTMANN, H. G. BOMAN und G. ACS, J. cellular comparat. Physiol. **54**, Suppl. 1, 75 [1959].

⁴⁾ C. KITZINGER und T. BENZINGER, Z. Naturforsch. **10b**, 375 [1955].

⁵⁾ H. G. ZACHAU, G. ACS und F. LIPMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **44**, 885 [1958].

⁶⁾ L. I. HECHT, M. L. STEPHENSON und P. C. ZAMECNIK, Proc. nat. Acad. Sci. USA **45**, 505 [1959].

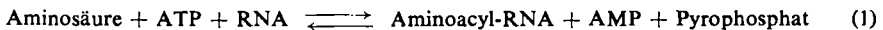
⁷⁾ J. PREISS, P. BERG, E. J. OFENGAND, F. H. BERGMANN und M. DIECKMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA **45**, 319 [1959].

verglichen. Die Ursachen des „Energereichtums“ der Bindung werden nicht erörtert, da Gleichgewichtsmessungen oder kalorimetrische Daten für die Vergleichssubstanzen noch nicht vorliegen und eine Abschätzung thermodynamischer Daten auf Grund kinetischer Messungen⁸⁾ nur in bestimmten Fällen möglich ist. Man kann aber auf Grund der kinetischen Daten Aussagen über die Strukturelemente machen, die die Reaktionsfähigkeit des Aminoacyl-RNA-Esters bedingen. Es ist an einen Einfluß des RNA-Makromoleküls auf die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung zu denken, ferner an Einflüsse der Phosphorsäure und der Purin- bzw. Pyrimidinbasen; bekannt sind z. B. elektrostatische Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen der Base und Substituenten der Ribose⁹⁾, ferner Wasserstoffbrücken zu den Hydroxylgruppen der Ribose¹⁰⁾.

AMINOSÄUREESTER DER RIBONUCLEINSÄURE

Der angestrebte Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten geht von dem Aminosäureester der löslichen Ribonucleinsäure aus. Daher seien zunächst einige Tatsachen erwähnt, die für die Reaktionen dieser Substanz von Bedeutung sind.

Nach ZAMECNIK, HOAGLAND und vielen anderen Autoren verläuft die biologische Proteinsynthese bzw. der Einbau von Aminosäuren ins Protein¹¹⁾ in der folgenden Weise: In einem Aktivierungsschritt¹²⁾ entstehen aus Aminosäuren und ATP mit Hilfe der aktivierenden Enzyme die Aminosäure-AMP-Anhydride, deren Aminosäureanteil dann auf eine lösliche Ribonucleinsäurefraktion (Mol.-Gew. 20–40000¹³⁾) übertragen und anschließend in die Ribonucleoprotein-Partikel der Zelle eingebaut wird. Die beiden ersten Reaktionsschritte lassen sich zu Gl. (1) zusammenfassen:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt etwa in der Mitte^{1,7)}; daraus geht hervor, daß die Aminosäure-RNA-Bindung energiereich ist. — Aus in-vitro- und in-vivo¹⁴⁾-Versuchen weiß man, daß die RNA die Funktion hat, die durch Reaktionen im Cytoplasma — also „in Lösung“ — aktivierten Aminosäuren den folgenden strukturgebundenen Reaktionen zuzuführen, und man diskutiert, daß sie selbst zur Bildung einer hochmolekularen „Matrizen“-Ribonucleinsäure beiträgt¹⁵⁾.

L. I. HECHT, M. L. STEPHENSON und P. C. ZAMECNIK¹⁶⁾ hatten aus Präinkubations-Experimenten mit RNA aus tierischem Material geschlossen, daß die für den Aminosäure-Einbau erforderliche Wirkgruppe der löslichen RNA CMP und AMP enthält. Diese Befunde konnten von ZACHAU, ACS und LIPMANN⁵⁾ bestätigt und erweitert werden: Durch Isolierung und eindeutige chemische Charakterisierung eines RNA-Spaltstückes als 2'-(oder 3')-Amino-

⁸⁾ L. P. HAMMETT, *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill Book Comp. Inc., New York 1940.

⁹⁾ L. F. CAVALIERI, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 5804 [1952].

¹⁰⁾ J. J. FOX, L. F. CAVALIERI und N. CHANG, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4315 [1953]; H. WITZEL, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck.

¹¹⁾ vgl. z. B. P. C. ZAMECNIK, M. L. STEPHENSON und L. I. HECHT, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **44**, 73 [1958].

¹²⁾ Zusammenfassung: TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, *Advances in Enzymol.* **19**, 235 [1957].

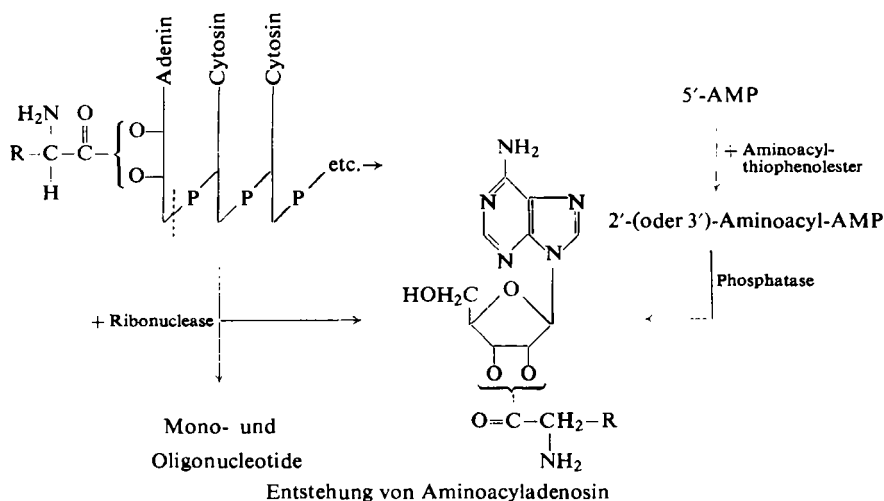
¹³⁾ W. ZILLIG, D. SCHACHTSCHABEL und W. KRONE, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **318**, 100 [1960].

¹⁴⁾ F. GROS, 10. Colloquium der Deutschen Ges. f. Physiol. Chem. Mosbach, April 1959.

¹⁵⁾ M. B. HOAGLAND, 12. Brookhaven Symposium, Upton N. Y. 1959, S. 40.

¹⁶⁾ *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **29**, 460 [1958].

acyl-adenosin wurde bewiesen, daß die eine Endgruppe der RNA Adenosin ist und daß die Aminosäuren mit der 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe seines Riboseanteils verestert sind. Oxydationsversuche⁶⁾ führten zum gleichen Ergebnis, desgl. Versuche mit einer Bakterien-RNA⁷⁾. Quantitative Analysen¹⁷⁾ ergaben, daß in der isolierten Aminoacyladenosen-Endgruppe alle Aminosäuren enthalten sind bis auf Tryptophan, Cystein und Glutaminsäure, die bei 0.15 mg Gesamteinwaage unter der Nachweisgrenze der Methode liegen. Daraus und aus den Präinkubationsexperimenten¹⁶⁾ ist zu schließen, daß die meisten oder wahrscheinlich alle Aminosäuren durch RNA mit Adenosin als Endgruppe übertragen werden; Cytidin ist



in allen Fällen das auf Adenosin folgende Nucleosid der RNA-Kette^{6,16)}. Da früher bereits die Additivität des Aminosäure-Einbaues in die RNA bewiesen wurde¹⁾, muß man annehmen, daß in der löslichen RNA mehrere Ribonucleinsäuren — mit der gleichen Endgruppe — enthalten sind, die jeweils für eine Aminosäure spezifisch sind. Eine teilweise Trennung solcher Komponenten ist gelungen¹⁸⁾. Wenn im folgenden von Aminoacyl-RNA gesprochen wird, so handelt es sich um die Gesamt-RNA, die mit einem Gemisch aller Aminosäuren beladen, aus natürlichem Material isoliert wurde. Auch bei „¹⁴C-Valyl-RNA“ handelt es sich um die Gesamt-RNA, doch ist das Valin radioaktiv markiert, und es werden nur die Reaktionen dieser Komponente verfolgt.

¹⁴C-Valyl-RNA wurde in Anlehnung an bekannte Vorschriften auf enzymatischem Wege hergestellt. Die Geschwindigkeit der Verseifung der Valin-Esterbindung wurde bei p_H 9.8 und 30° gemessen. Der p_H -Wert wurde mit Hilfe eines Autotitrationsgerätes konstant gehalten, so daß mögliche störende Effekte von Puffersubstanzen wegfelen. Von Zeit zu Zeit wurden aliquote Teile entnommen, aus denen die RNA durch Säurefällung isoliert wurde; die im Niederschlag bestimmte Radioaktivität

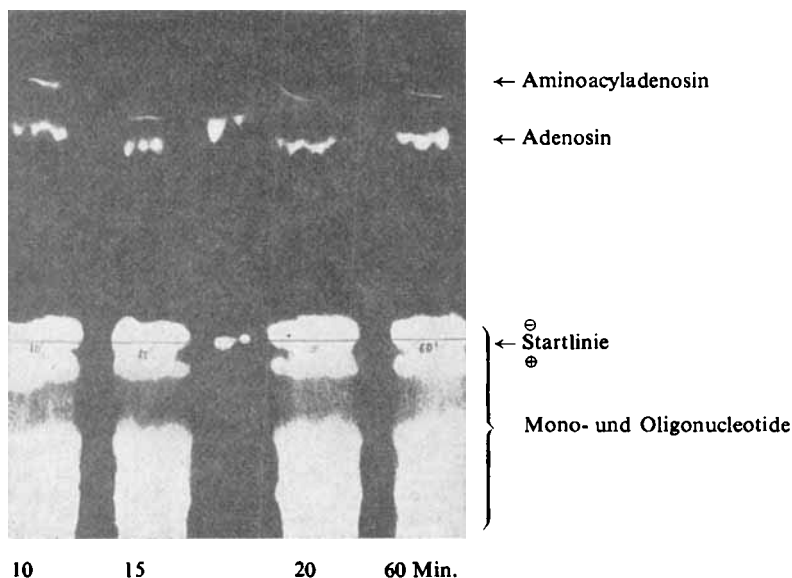
¹⁷⁾ Eine analytische Bestimmung durch die Autoren der Arbeit⁵⁾ wurde durch die Ergebnisse einer zweiten Analyse voll bestätigt. Herrn Dr. G. BRAUNITZER danke ich für die Ausführung der Analyse.

¹⁸⁾ K. C. SMITH, E. CORDES und R. S. SCHWEET, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] **33**, 286 [1959]; R. W. HOLLEY, B. P. DOCTOR, S. H. MERRILL und F. M. SAAD, ebenda **35**, 272 [1959]; G. L. BROWN, A. V. W. BROWN, J. GORDON, 12. Brookhaven Symposium 1959, Upton N. Y., S. 47; P. C. ZAMECNIK, M. L. STEPHENSON und J. F. SCOTT, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* **46**, 811 [1960].

war ein Maß für die Menge esterartig gebundenen, noch nicht verseiften Valins. — Die Verseifung folgt einem Zeitgesetz 1. Ordnung ($k = 4.0 \cdot 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$)¹⁹⁾; die Halbwertszeit beträgt 29 Min. (Mittelwert aus 28, 29.5 und 30 Min. in 3 Versuchen).

Dieses Ergebnis war überraschend, da in einem früheren Versuch²⁰⁾ aus einer ¹⁴C-Aminoacyl-RNA bei p_H 8.6 und 37° bereits nach 5 Min. die Hälfte der Aminosäure abgespalten war.

Da der Unterschied zwischen diesen beiden Werten beträchtlich ist, wurde die Verseifungsgeschwindigkeit noch mit einer anderen Methode gemessen. Es wurde jetzt die RNA eingesetzt, die bereits bei der Isolierung mit einem Gemisch aller Aminosäuren verestert war. Verseift man diese — nicht radioaktive — Aminoacyl-RNA unter den gleichen Bedingungen wie oben und spaltet dann in den aliquoten Teilen die RNA mit Ribonuclease, so kann man neben Nucleotiden Adenosin und Aminoacyladenosin papieroelektrophoretisch isolieren; das Adenosin stammt aus der freien, das Aminoacyladenosin aus der mit Aminosäuren veresterten RNA-Endgruppe. Die in den Flecken des Elektropherogramms enthaltenen Nucleosid-Mengen lassen sich nach Elution bestimmen, so daß man auf diese Weise die Verseifung der Aminoacyl-RNA verfolgen kann.



UV-Photographie eines Elektropherogramms von Aminoacyl-RNA-Hydrolysaten (s. Text)

Aus der Abbild. ersieht man, daß auch in dem nach 1 Stde. bei p_H 9.8 entnommenen aliquoten Teil Aminoacyladenosin noch deutlich nachweisbar ist. Die quantitative

¹⁹⁾ Die Kurve wurde ausgewertet nach: E. A. GUGGENHEIM, *Philos. Mag.* [7] 2, 538 [1926], zitiert nach R. HUISGEN, *Methoden der Organischen Chemie* (Houben-Weyl), Bd. III/1, 131, Thieme Verlag, Stuttgart 1955.

²⁰⁾ P. BERG und E. J. OFENGAND, *Proc. nat. Acad. Sci. USA* 44, 78 [1958].

Auswertung des Abfalls der Aminoacyladenosen-Menge in den aliquoten Teilen und des Anstiegs der Adenosin-Menge ergab, daß auch für die mit einem Gemisch aller Aminosäuren beladene RNA die Halbwertszeit der Verseifung bei p_{H} 9.8 und 30° etwa $1/2$ Stde. betrug. Der Unterschied zwischen den Ergebnissen dieser und denen der zitierten Arbeit²⁰⁾ beruht möglicherweise auf der verschiedenen Ionenstärke des Verseifungsmediums.

Die papierelektrophoretische Trennung, die bei Mengen bis zu 2 mg RNA-Hydrolysat leicht gelingt, wird bei den hier erforderlichen größeren Hydrolysat-Mengen schwierig. Es stellte sich heraus, daß die Hauptmenge der Nucleotide durch eine Verteilung zwischen Phenol und Wasser abgetrennt werden kann (Verteilungskoeffizienten s. u.); anschließend lassen sich die Endgruppen-Substanzen papierelektrophoretisch gut trennen. — Die Verteilung im System Phenol/Wasser hat sich auch in anderen Fällen zur Fraktionierung von RNA-Hydrolysaten bewährt.

VALYLNUCLEOTIDE UND -NUCLEOSIDE

Aminosäureester des 5'-AMP sind von TH. WIELAND, F. JAENICKE, H. MERZ und M. OSSORIO²¹⁾ durch Erhitzen des Nucleotids mit dem Aminosäure-thiophenylester in Dimethylsulfoxyd erstmals dargestellt worden. Die Methode wurde jetzt zur Synthese der Valylester des AMP, IMP, GMP, UMP und CMP benutzt. Beim GMP erwies es sich als notwendig und bei den anderen Nucleotiden als zweckmäßig, zunächst durch Gefrier Trocknung ein fein verteiltes und in Dimethylsulfoxyd leichter lösliches Material herzustellen. Außerdem mußten beim GMP- und CMP-Ester die Reaktionsbedingungen abgewandelt werden. Der Umsatz ließ sich nicht über 18% steigern, doch wurden die nicht umgesetzten Nucleotide durch Austauschchromatographie wiedergewonnen.

Bereits früher hatten wir aus Leucyl-AMP-Ester mit saurer Phosphatase eine analytische Menge des 3'-(oder 2')-Leucyladenosins hergestellt⁵⁾ und durch Papier-elektrophorese gereinigt. Jetzt wurde die Phosphatase-Reaktion in präparativem Maßstab durchgeführt. Der Nucleotidester aus der Thiophenylester-Reaktion wurde über eine Austauschersäule filtriert und konnte dann ohne weitere Reinigung eingesetzt werden. Die besten Ausbeuten an reinem Nucleosidester (85–90%, bezogen auf Nucleotidester) wurden erzielt, wenn die Phosphatase-Reaktion bei p_{H} 5.5 und 0–5° ausgeführt und der Nucleosidester durch Chromatographie an einem schwach sauren Austauscher isoliert wurde²²⁾.

Die dargestellten 3'-(oder 2')-Valylester des Adenosins, Inosins, Guanosins, Uridins und Cytidins wurden auf folgende Weise charakterisiert: Die Verbindungen sind elektrophoretisch einheitlich. Das Verhältnis Nucleosid zu Aminosäure beträgt 1.0 zu 1.0–1.15. — Die Nucleosidester sind gegen Perjodsäure²³⁾ beständig; daraus wird geschlossen, daß in der 2'.3'-Diolgruppierung eine der Hydroxylgruppen mit der Aminosäure verestert ist.

²¹⁾ Liebigs Ann. Chem. 613, 95 [1958]; vgl. auch TH. WIELAND, H. MERZ und G. PFLEIDERER, Chem. Ber. 93, 1816 [1960], vorstehend.

²²⁾ H. G. ZACHAU, W. KARAU und M. TADA, Vortrag Dtsch. Physiol. Chem. Ges., Berlin, 1959 (Ber. ges. Physiol. exp. Pharmakol., im Druck).

²³⁾ H. T. GORDON, W. THORNBURG und L. N. WERUM, Analytic. Chem. 28, 849 [1956].

Valyl-AMP und die Valylnucleoside wurden unter den gleichen Bedingungen wie die Valyl-RNA alkalisch verseift. Die Verseifung wurde durch Registrierung der Laugenmenge verfolgt, die von dem Autotitrationsgerät zum Konstanthalten des p_H -Wertes zugegeben wurde.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Reaktion mit Hydroxylamin²⁴⁾ zum Vergleich der Ester herangezogen. Die Reaktion wurde bei p_H 6.0 und 0° in einem 0.1 *m* Kollidin/Perchlorat-Puffer, der 4 *m* in bezug auf Hydroxylamin war, ausgeführt; unter diesen Bedingungen war eine Störung durch die Puffersubstanzen oder durch Hydrolyse nicht zu erwarten. Die Bildung der Hydroxamsäuren wurde mit Hilfe der Eisenchlorid-Reaktion photometrisch verfolgt.

In beiden Versuchsreihen wurden die den Reaktionsablauf wiedergebenden Kurven rechnerisch¹⁹⁾ ausgewertet. In allen Fällen gehorchen die Reaktionen einem Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten und Halbwertszeiten sind aus Tab. 1 zu ersehen. Sie lassen sich mit einer Genauigkeit von $\pm 5\%$ bei der Hydroxylamin-Reaktion und von $\pm 7\%$ bei der alkalischen Verseifung angeben.

Tab. 1. Geschwindigkeit der Verseifung und Hydroxylamin-Reaktion

	Verseifung		Hydroxylamin-Reaktion	
	$10^4 \cdot k$ (sec ⁻¹)	$t_{1/2}$ (Min.)	$10^4 \cdot k$ (sec ⁻¹)	$t_{1/2}$ (Min.)
Valyl-RNA	4.0	29	— *)	— *)
Valyl-AMP	3.6	32	7.2	16
Valyladenosin	6.0	19	5.2	22
Valylguanosin	5.6	21	— *)	— *)
Valylinosin	5.3	22	6.1	19
Valylcytidin	5.5	21	5.6	21
Valyluridin	5.3	22	5.3	22

*) Die Substanzen sind unter den angewandten Bedingungen nicht klar löslich.

Aus den in der Tabelle aufgeführten Ergebnissen lassen sich die folgenden Schlüsse ziehen:

1. Die Verseifungsgeschwindigkeiten der Valyl-RNA und des Valyl-AMP sind sehr ähnlich. Ein wesentlicher Einfluß des RNA-Makromoleküls auf die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung ist demnach nicht anzunehmen. Bereits früher⁵⁾ war in einem halbquantitativen Versuch mit Leucyl-RNA und Leucyl-AMP gezeigt worden, daß auch bei der Hydroxylamin-Reaktion nur geringe Geschwindigkeitsunterschiede auftreten. — Der Aminoacyl-AMP-Ester kann daher anstelle des makromolekularen RNA-Esters für Vergleiche mit Modellsubstanzen verwendet werden.

2. Valyl-AMP wird um den Faktor 1.7 langsamer verseift als Valyladenosin, die Reaktion mit Hydroxylamin dagegen verläuft beim Valyl-AMP eher etwas schneller als beim Valyladenosin. Die Deutung liegt nahe, daß die negativ geladene Phosphatgruppe im Valyl-AMP den nucleophilen Angriff des Hydroxylions, aber nicht den des neutralen Hydroxylamin-Moleküls erschwert; aus sterischen Gründen ist eine solche Abschirmung bei einem 3'-Valyl-AMP wahrscheinlicher als bei der entsprechenden

²⁴⁾ F. LIPMANN und L. C. TUTTLE, J. biol. Chemistry 159, 21 [1945].

2'-Verbindung. Es sei auch erwähnt, daß die Mechanismen²⁵⁾ der beiden Reaktionen wahrscheinlich verschieden sind und eine quantitativ gleiche Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit durch einzelne Strukturelemente daher nicht zu erwarten ist.

3. Die Reaktionsgeschwindigkeiten der Valylnucleoside liegen in der gleichen Größenordnung; demnach ist der Einfluß des Adenins, Guanins, Hypoxanthins, Cytosins und Uracils auf die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung etwa gleich. Um die Größe dieses Einflusses der Purin- und Pyrimidinbasen abschätzen zu können, sollen die Ester anderer Ribosederivate zum Vergleich herangezogen werden.

Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. BUTENANDT danke ich herzlich für die großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit. Frau U. WOLF sei für wertvolle technische Mithilfe besonders gedankt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Aminoacyl-RNA wurde aus Rattenleber isoliert^{26,5)}. Die durch Fällung mit $n/10$ HCl gereinigte Aminoacyl-RNA wurde in Lösung bei p_H 5.0 aufbewahrt. — Die Menge der an die RNA gebundenen Aminosäuren konnte auf folgende Weise bestimmt werden: 2 mg der RNA-Präparation wurden lyophilisiert und in 0.1 ccm 0.05 *m* Trinatriumcitrat-Lösung aufgenommen, die 0.05 mg Ribonuclease (Boehringer) enthielt. Die Lösung wurde 10 Min. bei Raumtemperatur gehalten, durch Zugabe von 0.012 ccm *n* Citronensäure auf p_H 3 gebracht und direkt für die Elektrophorese (0.05 *m* Natriumcitratpuffer, Schleicher & Schüll-Papier 2043 b, 70 V/cm, 2–3 Std.) verwendet. Anschließend wurde das Aminoacyladenosing eluiert; in dem Eluat wurden der Adenosinanteil UV-spektroskopisch und die Aminosäuren mit Ninhydrin²⁷⁾ bestimmt. Die Aminoacyladenosing-Menge schwankt bei verschiedenen RNA-Präparationen zwischen 15 und 30 μ Mol/mg RNA.

Für die Herstellung von ¹⁴C-Valyl-RNA^{26,5)} aus Aminoacyl-RNA wurde ¹⁴C-Valin mit einer spezifischen Aktivität von 3.7 mC/mMol (Amersham, England) verwendet. Das durch Phenolextraktion, Dialyse und Säurefällung gereinigte Produkt enthielt je nach Präparation eine Radioaktivität von 600–800 Imp./Min./mg RNA (gemessen in einem automatischen Gerät der Firma Tracerlab mit einem TGC-14-Zählrohr).

Valylnucleotide und -nucleoside: AMP, IMP, GMP, UMP, CMP (Sigma Chemical Co., USA) wurden in Wasser gelöst, die Lösungen mit Natronlauge auf p_H 7.0 eingestellt und bei 10^{-3} Torr lyophilisiert. Die so erhaltenen Natriumsalze wurden in Analogie zu der Vorschrift für die Darstellung von Aminoacyl-AMP²¹⁾ in Ansätzen von 0.5–4 mMol mit Valylthiophenylester in gereinigtem Dimethylsulfoxyd umgesetzt. Es erwies sich als zweckmäßig, bei den GMP-Ansätzen die Dimethylsulfoxyd-Menge zu verdoppeln und bei den CMP-Ansätzen die Erhitzungsdauer auf 5 Min. zu verkürzen. Die Ausbeuten an Valyl-IMP, -GMP, -UMP, -CMP betragen 11–16%, an Valyl-AMP 18% d. Th. — Zur Darstellung der Valylnucleoside wurde das Rohprodukt der Thiophenolester-Reaktion in 0.05 *m* Natriumacetatpuffer (p_H 5.5) gelöst und über eine Dowex 2x10-Säule (Acetatform) filtriert. Dem Nucleotid-ester enthaltenden Eluat wurde eine Phosphatase-Präparation²⁸⁾ zugesetzt (2 mg auf 1 ccm

²⁵⁾ W. P. JENCKS, J. Amer. chem. Soc. **80**, 4581, 4585 [1958].

²⁶⁾ M. B. HOAGLAND, M. L. STEPHENSON, J. F. SCOTT, L. I. HECHT und P. C. ZAMECNIK, J. biol. Chemistry **231**, 241 [1958].

²⁷⁾ S. MOORE und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry **211**, 907 [1954].

²⁸⁾ Durch Gefriertrocknen des p_H -5.6-Überstandes der Phosphatase-Aufarbeitung nach G. SCHMIDT (S. P. COLOWICK, N. O. KAPLAN, Methods in Enzymology, Bd. 2, S. 523, Academic Press, Inc., New York 1955) erhalten. — Herrn Professor Dr. F. MAY, Urologisches Krankenhaus München, bin ich für die Überlassung von Operationsmaterial zu Dank verpflichtet.

Eluat) und die Lösung 15–20 Stdn. bei 0–5° gehalten. Die Phosphatabspaltung aus den Nucleotidestern ließ sich durch Phosphatbestimmungen²⁹⁾ verfolgen. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung bei 0–5° durch eine Amberlite-IRC 50-Säule filtriert (H⁺-Form, 1 cm Ø, 10 cm Höhe bei Ansätzen bis zu 1 mMol Nucleotid, 1.8 × 8 cm bei den größeren Ansätzen). Die Nucleosidester wurden vom Austauscher zurückgehalten; sie konnten nach Auswaschen der Phosphatase und der freien Nucleoside mit Wasser mit Essigsäure langsam steigender Konzentration (0.01–0.1 *n*) eluiert werden. Aus den Eluaten ließen sich durch Gefrier-trocknen die essigsäuren Salze der Nucleosidester in der mit den oben erwähnten Kriterien bestimmten Reinheit gewinnen. Die Ausbeute der Phosphatase-Reaktion betrug in allen Fällen 85–90% d. Th. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Valyl-nucleoside und -nucleotide in der Elektrophorese (0.05 *m* Citratpuffer, *p*_H 3.0, 70 V/cm) wurde mit der der entsprechenden Basen, Nucleoside und Nucleotide verglichen (Tab. 2). Alle Werte sind bezogen auf Bedingungen, unter denen AMP auf der Startlinie bleibt, Adenosin 10.0 cm zum negativen („–10.0°) und ATP 12.4 cm zum positiven Pol („+12.4°) wandert.

Tab. 2. Relative Wanderungsgeschwindigkeiten in der Papierelektrophorese

	Base	Nucleosid	Valyl-nucleosid	Nucleotid	Valyl-nucleotid
Adenin	–16.5	–10.0	–13.5	0	–8.2
Hypoxanthin	–2.0	–1.3	–9.9	+9.5	–0.15
Guanin	–7.0	–1.0	–9.8	+5.3	–1.6
Uracil	–1.4	–1.2	–10.4	+10.0	–1.3
Cytosin	–22	–14.1	–19.6	0	–9.0

Bei den *Verseifungsversuchen* wurden die RNA-Präparationen (a und b) und die Nucleosidester (c) in jeweils 5 ccm Lösung durch Zugabe von *n*/₃₀ NaOH mit einem Autotitrationsgerät (Firma Radiometer, Kopenhagen) bei *p*_H 9.8 ± 0.1 gehalten. Die Temperatur betrug 30°. Um Störungen durch CO₂-Absorption zu vermeiden, wurde unter Stickstoff gearbeitet. Der Verlauf der Verseifungsreaktionen wurde auf folgende Weise gemessen:

a) Aus der Lösung von 30 mg ¹⁴C-Valyl-RNA wurden in gemessenen Zeitabständen während 120 Min. 15 mal aliquote Teile mit 2 mg RNA entnommen und in je 4 ccm kalte 10-proz. Trichloressigsäure pipettiert. Die RNA-Niederschläge wurden abzentrifugiert, 3 mal mit 5-proz. Trichloressigsäure, 2 mal mit Äthanol und einmal mit Äther gewaschen, dann in 98-proz. Ameisensäure gelöst, auf Aluminium-Plättchen gebracht und getrocknet. Die Radioaktivität wurde in dem erwähnten Zählgerät bestimmt.

b) Aus einer Lösung von 50 mg Aminoacyl-RNA wurden im Laufe von 90 Min. 10 mal aliquote Teile mit je 5 mg RNA entnommen und in 0.1 ccm 0.5 *m* NaH₂PO₄ pipettiert. Nach Zugabe von je 0.02 ccm 1 *m* Phosphatpuffer (*p*_H 7.2) und 0.150 mg Ribonuclease wurden die Lösungen 10 Min. bei 35° gehalten und anschließend 2 mal mit je 1.5 ccm Phenol extrahiert.

Wie auf Grund der Verteilungskoeffizienten (für alle Nucleotide ist $\frac{C_{H_2O}}{C_{Phenol}} > 8.5$; Adenosin 0.1; Valyladenosin 0.1; Valyl-AMP 0.2) zu erwarten war, ließen sich Adenosin und Aminoacyladenosin aus den Lösungen durch zweimaliges Ausschütteln mit je 1.5 ccm Phenol quantitativ extrahieren. Die Phenolphasen wurden mit 0.2 ccm Wasser gewaschen, dann mit je 7 ccm Benzol versetzt und zweimal mit 0.3 ccm *n*/₁₀ Essigsäure ausgeschüttelt. Die Essigsäurelösungen wurden nach zweimaligem Ausäthern lyophilisiert und die Rückstände der Papierelektrophorese unter den erwähnten Bedingungen unterworfen (Abbild.). Die zehn

²⁹⁾ C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, J. biol. Chemistry **66**, 375 [1925].

Adenosin- und Aminoacyladenosingflecke wurden eluiert und die Nucleosid-Mengen gegen einen Papierblindwert UV-spektroskopisch gemessen.

c) Je 10 μ Mol der Valylnucleoside und des Valyl-AMP wurden bei jedem Versuch eingesetzt. Der Laugeverbrauch während der Verseifung wurde durch einen an den Autotitrator angeschlossenen Schreiber fortlaufend registriert.

Die *Reaktion mit Hydroxylamin* wurde in der folgenden Weise ausgeführt: 20 μ Mol der Valylnucleoside und des Valyl-AMP wurden in je 2 ccm einer auf 0° abgekühlten Hydroxylaminlösung gelöst (4 *m* NH₂OH · HCl, 0.1 *m* Kollidin-perchlorat, mit Natronlauge bei 0° auf *p*_H 6.0 eingestellt). In gemessenen Zeitabständen wurden je 0.1 ccm der Lösungen in 2 ccm FeCl₃-Lösung (7.5-proz. FeCl₃ · 6 H₂O in 0.4 *n* HCl) pipettiert. Die Extinktion des entstandenen Hydroxamsäure-Eisenkomplexes wurde bei 546 *m* μ gegen einen Reagenzblindwert im Photometer Eppendorf gemessen; sie ist in jeder Probe über längere Zeit konstant und gut reproduzierbar. Auch der Kurvenverlauf wurde in allen Fällen mehrfach reproduziert.

HANS GEORG ZACHAU und WOLFGANG KARAU

Reaktionsfähige Aminosäureester als Modelle der Aminoacyl-ribonucleinsäure, II¹⁾

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie, München

(Eingegangen am 24. März 1960)

Um den Einfluß zweier Strukturelemente der Ribose auf die Reaktionsfähigkeit der Aminoacyl-ribonucleinsäure zu studieren, wurden als Modelle die Monoester der Essigsäure, des Glycins und Valins mit cyclischen Alkoholen (3-Hydroxy-tetrahydrofuran, Cyclopentanol) und Diolen (*trans*- und *cis*-3.4-Dihydroxy-tetrahydrofuran, *trans*- und *cis*-1.2-Dihydroxy-cyclopentan) synthetisiert und alkalisch verseift sowie mit Hydroxylamin umgesetzt. Aus dem Vergleich der kinetischen Daten ergibt sich, daß die Reaktionsfähigkeit der Esterbindung außer durch die Säurekomponente durch den Ringsauerstoff im Alkohol und — bei den Diolen — durch die nachbarständige Hydroxylgruppe stark beeinflusst wird. Die Beteiligung von Wasserstoffbrücken sowie induktiven und sterischen Effekten an diesen Einflüssen wird diskutiert.

In früheren Arbeiten²⁾ wurde gezeigt, daß der Aminosäure-Ribonucleinsäure-Ester (I) als neuer Typ einer „energiereichen“ Verbindung anzusehen ist. Vom chemischen und biochemischen Standpunkt aus ist es daher interessant, die Strukturelemente zu bestimmen, die die hohe Reaktionsfähigkeit dieses Esters bedingen. In der voran-

¹⁾ I. Mitteil.: H. G. ZACHAU, Chem. Ber. 93, 1822 [1960], vorstehend.

²⁾ Mitteil., Fußnoten^{3, 5-7)}, Chem. Ber. 93, 1822 [1960], vorstehend.