

The atomic distances and angles in the dyestuff anthranilic acid \rightarrow phenyl-methyl-pyrazolone do not correspond well to either type of coordination. In fact this dyestuff has been found to form 1:2-Cr complexes of both types.

The relationship between mixed complexes from two different types of azo-dyestuffs has also been studied. This study has shown that azo-dyestuffs which form 5-6-rings never result in sandwiches, whereas azo-dyestuffs which form 6-6-rings can coordinate perpendicularly in appropriate mixed complexes.

Wissenschaftliche Laboratorien der J. R. GEIGY AG, Basel,
Farbstoffabteilung

127. Eine partikelgebundene Transfer-Ribonucleinsäure aus Rattenleber

von A. Hicklin und F. Leuthardt

Herrn Prof. A. VON MURALT zum 60. Geburtstag gewidmet

(2. IV. 63)

Aus einer früheren Arbeit geht hervor¹⁾, dass sich Mikrosomen aus Rattenleber und Puppen von *Drosophila melanogaster* beim Einbau von Aminosäuren in Proteine verschieden verhalten. Während bei Rattenlebermikrosomen der Zusatz von pH-5-Enzymen den Einbau um das Sechsfache erhöht, wird er bei *Drosophila*-Mikrosomen praktisch kaum verändert. *Drosophila*-Mikrosomen enthalten ein «aktivierendes System», das bei der Präparation weniger leicht entfernt wird als dasjenige der Rattenlebermikrosomen.

STONE²⁾ zeigte, dass Rattenlebermikrosomen mit dem Überstand der pH-5-Enzyme den gleichen Einbau zeigen wie mit den pH-5-Enzymen, obwohl ersterer praktisch keine Lösliche Ribonucleinsäure (sRNA) enthält³⁾. Die Vermutung lag nahe, dass auch Rattenlebermikrosomen einen Teil des «aktivierenden Systems», zum Beispiel Lösliche Ribonucleinsäure enthalten, und dass sie deshalb nur noch gewisse Enzyme, die im Überstand der pH-5-Enzyme ebenfalls enthalten sind, benötigen.

Einbau von Aminosäuren ohne pH-5-Enzymfraktion. Das Ergebnis von STONE²⁾ lässt sich ohne weiteres bestätigen. Der Einbau mit dem Überstand der pH-5-Enzyme ist ebenso gut wie derjenige mit der pH-5-Enzymfraktion (s. Tabelle). Im Überstand der pH-5-Enzyme sind, wenn überhaupt, nur minimale Mengen von sRNA enthalten. Um auszuschliessen, dass nicht zufällige Verunreinigungen der mikrosomalen Partikel einen solchen Einbau ermöglichen, wurden die Mikrosomen besonders sorgfältig gewaschen. Sie wurden, nach der ersten Ultrazentrifugation, mit einem kleinen POTTER-Homogenisator von Hand solange homogenisiert, bis keine

¹⁾ E. JENNY, A. HICKLIN & F. LEUTHARDT, *Helv.* **45**, 2014 (1962).

²⁾ D. STONE & SH. JOSHI, *Biochim. biophysica Acta* **55**, 335 (1962).

³⁾ *Abkürzungen:* sRNA: soluble ribonucleic acid (Transfer-RNA), ATP: Adenosin-5'-triphosphorsäure, GTP: Guanosin-5'-triphosphorsäure, PEP: Phospho-enolpyruvat.

groben Partikel mehr sichtbar waren, und erneut ultrazentrifugiert. In weiteren Untersuchungen wurden mit Na-Desoxycholat behandelte Partikel verwendet⁴⁾. Auch diese weisen in Abwesenheit von pH-5-Enzymen einen guten Einbau auf (Tabelle).

Einbau von Leucin-[¹⁴C] in Proteine und Ribonucleinsäure (heisser Trichloressigsäureextrakt)

Ansatz			Einbau in Protein		Einbau in RNA	
			dpm total	dpm pro mg Mikrosom. Protein	dpm total	dpm pro mg Mikrosom. Protein
Mikrosomen	pH-5-Enzym	Überstand vcm pH-5-Enzym				
+	-	-	2050	230	1380	
+	+	-	7240	830	9400	
+	+	+	7890	900	9800	
+	-	+	6800	780	2040	230
-	+	-	460		8400	
-	+	+	360		6150	
-	-	+	50		-	
Ribosomen*)						
+	+	-	1500	700	1330	
+	-	+	1940	930	1360	650
-	+	+	290		3330	

Ansatz: 0,3 ml Mikrosomen (9 mg Mikrosomen-Eiweiss), 0,2 ml pH-5-Enzyme (4 mg Eiweiss), 0,1–0,2 ml Überstand der pH-5-Enzyme (0,9–1,8 mg Eiweiss), 1 μ Mol ATP, 0,25 μ Mol GTP, 10 μ Mol PEP, 0,02 mg Pyruvatkinase, 5 μ Mol MgCl₂ in total 1 ml Medium A; Leucin-[¹⁴C] 0,26 μ Mol (sp. Akt. 7,7 mC/mMol.).

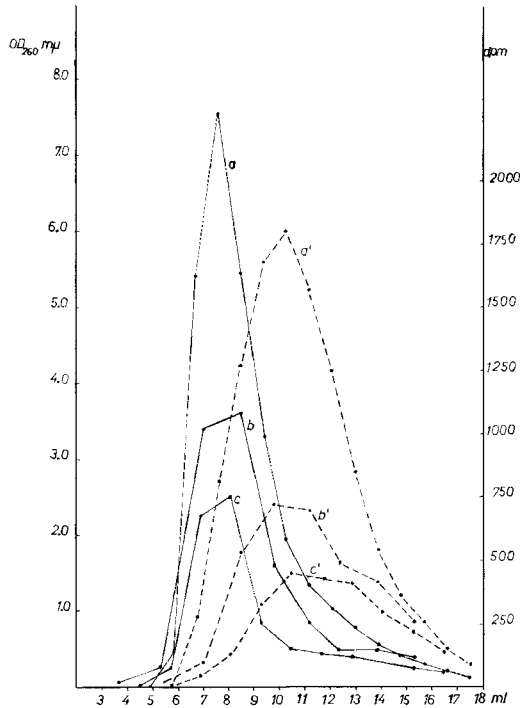
*) Durch Extraktion der Mikrosomen mit Na-Desoxycholat gewonnen.

Nachweis von mikrosomaler Transfer-Ribonucleinsäure. Wie die Tabelle zeigt, findet sich nach Inkubation der Mikrosomen mit Leucin-[¹⁴C] ein Teil der Radioaktivität in einer Fraktion, die mit heisser Trichloressigsäure (5-proz., 90°, 20–30 min) extrahierbar ist. Vorwiegend handelt es sich dabei um an die sRNA der pH-5-Fraktion gebundenes Leucin-[¹⁴C]. Der aus dem Inkubationssystem (Mikrosomen plus pH-5-Enzyme) gewonnene Trichloressigsäureextrakt weist aber eine höhere Aktivität auf, als auf Grund der zugegebenen Menge pH-5-Enzyme zu erwarten wäre (Tabelle). Ein Teil könnte also an die Ribonucleinsäure, die in den Mikrosomen enthalten ist, gebunden sein. Deutlicher werden die Verhältnisse im System: Mikrosomen plus Überstand der pH-5-Enzyme. Da letzterer keine sRNA enthält, muss die gesamte mit heisser Trichloressigsäure extrahierbare Aktivität an mikrosomale Ribonucleinsäure gebunden sein. Dieses System eignet sich deshalb besonders gut für die nähere Charakterisierung dieser Nucleinsäure.

Zur Isolierung der Nucleinsäure wurde ein Ansatz, der Mikrosomen und Überstand der pH-5-Enzyme enthielt, nach der Inkubation sofort mit Phenol extrahiert,

⁴⁾ J. F. KIRSCH, P. SIEKEVITZ & G. E. PALADE, *J. biol. Chemistry* **235**, 1419 (1960).

die Nucleinsäure aus der wässrigen Phase mit Alkohol gefällt, in 0,2M NaCl oder KCl aufgenommen, auf eine Säule von Sephadex G 75 aufgetragen und mit 0,2M NaCl bzw. KCl eluiert. Die optische Dichte bei 260 m μ und die Aktivität der einzelnen Fraktionen wurden bestimmt. Wie die Figur zeigt, ist das Maximum der Radioaktivität deutlich gegenüber dem Maximum der optischen Dichte verschoben. Das Leucin ist nicht an eine hochmolekulare Ribonucleinsäure gebunden. Eine Kontrolle mit sRNA-Leucin-[¹⁴C], welches aus einer pH-5-Enzymfraktion gewonnen wurde, zeigt, dass sich die sRNA auf der Säule wie die gesuchte Substanz verhält. Durch Papierelektrophorese der aktiven Fraktion nach Ribonuclease-Behandlung konnte Adenosylleucin-[¹⁴C] nachgewiesen werden⁵⁾. Die Aminosäuren sind also, wie in der sRNA aus der pH-5-Enzymfraktion, an einen terminalen Adenosylrest



Säulenchromatographie auf Sephadex G 75

- a/a': künstliches Gemisch aus mikrosomaler Nucleinsäure (aus nicht inkubierten Mikrosomen) und sRNA-Leucin-[¹⁴C] aus pH-5-Enzymen.
 b/b' und c/c': Nucleinsäuren aus dem Inkubationssystem Mikrosomen/Überstand der pH-5-Enzyme.
 a/b/c: optische Dichte bei 260 m μ .
 a'/b'/c': Radioaktivität (dpm).

Inkubationssystem: 0,6 ml Mikrosomen (12 mg Mikrosomen-Eiweiss), 0,3 ml Überstand der pH-5-Enzyme (3 mg Eiweiss) 1 μ Mol ATP, 0,25 μ Mol GTP, 10 μ Mol PEP, 0,02 mg Pyruvatkinase, 5 μ Mol MgCl₂, Leucin-[¹⁴C] 0,26 μ M (sp. Akt. 30,2 mC/mMol) in total 1 ml Medium A. Inkubation bei 37° während 10 Min.

⁵⁾ H. G. ZACHAU, G. ACS & F. LIPMANN, Proc. nat. Acad. Sci. USA 44, 885 (1958).

gebunden. Der Einbau in unsere mikrosomale sRNA verläuft äusserst rasch, ohne Verzögerung, und ist in höchstens 3 Minuten bereits maximal. Nach erneuter Isolierung der Ribosomen im Anschluss an die Inkubation finden sich vom sRNA-gebundenen Leucin noch 55% in den Partikeln.

BLOEMENDAHL⁶⁾ beschreibt einen Austausch zwischen markierter sRNA und hochmolekularer mikrosomaler Ribonucleinsäure. Die sRNA soll dabei kovalent gebunden werden. Da es sich um einen Austausch handelt, der von Anfang an die Zugabe von sRNA benötigt, kann unsere partikelgebundene sRNA nicht auf diese Weise während der Inkubation aus hochmolekularer Ribonucleinsäure entstanden sein. Die in den Mikrosomen und Ribosomen lokalisierte sRNA scheint ein wesentlicher Bestandteil dieser Partikel zu sein.

Unsere Befunde stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen von ELSON⁷⁾, der aus Mikrosomen, allerdings im Anschluss an eine längere Dialyse, aktive sRNA isolierte, und von SMITH⁸⁾. Man darf annehmen, dass es sich bei dieser mikrosomalen sRNA um sogenannte Adaptermolekeln handelt, die die entsprechenden Aminosäuren an den durch den Code der «messenger RNA» bestimmten Platz einordnen. Diese Annahme wird durch Befunde von TAKANAMI⁹⁾ bestärkt.

Für den bisher beobachteten, in kurzer Zeit ablaufenden *in-vitro*-Einbau scheint eine nicht partikelgebundene sRNA unnötig zu sein. Möglicherweise wird in einem verbesserten *in-vitro*-System die partikelgebundene sRNA limitierend und muss durch solche aus der pH-5-Enzymfraktion ergänzt werden.

Gerade im Hinblick auf die Verhältnisse bei *Drosophila*¹⁾ und Erbsenkeimlingen¹⁰⁾, bei denen das aktivierende System bei der üblichen Aufarbeitung schlecht von den Mikrosomen getrennt werden kann, drängt sich die Frage auf, ob nicht *in vivo* das ganze peptidsynthetisierende System, sRNA, Aminosäuren aktivierende Enzyme, mit Einschluss der Transfer-Enzyme, partikelgebunden ist und erst bei der Aufarbeitung mehr oder weniger leicht in eine partikelgebundene und eine sogenannte lösliche Fraktion zerfällt. Der Nachweis Aminosäuren aktivierender Enzyme in Mikrosomen von Reticulocyten durch KRUH¹¹⁾ passt durchaus in dieses Bild.

Experimentelles

Lösungen und Reagentien. – *Medium A:* Saccharose 0,25 M, MgCl₂ 0,004 M, KCl 0,025 M, Trihydroxymethyl-aminomethan-HCl-Puffer 0,05 M, pH 7,6. – *Medium B:* Saccharose 0,90 M, MgCl₂ 0,004 M, KCl 0,025 M. – ATP, PEP (krist. Tri-cyclohexyl-ammoniumsalz) und Pyruvatkinase stammten von der Firma BOEHRINGER (Mannheim), das GTP von den PABST LAB. (Milwaukee, Wis.), das Leucin-[¹⁴C] vom RADIOCHEMICAL CENTRE (Amersham, England). Das «Hyamin» (*p*-(diisobutyl-cresoxyethyl)-dimethyl-benzyl-ammonium hydroxide) bezogen wir von der Firma PACKARD Instrument Comp. Inc. Die Szintillatorflüssigkeit bestand aus 4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) (Firma PACKARD) und 100 mg POPOP (1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzol) in 1000 ml Toluol (analysenrein, MERCK A.G.). – Die übrigen Reagentien waren Handelspräparate vom besten erhältlichen Reinheitsgrad.

⁶⁾ H. BLOEMENDAHL, L. BOSCH & M. SLUYSER, *Biochim. biophysica Acta* **41**, 454 (1960).

⁷⁾ D. ELSON, *Biochim. biophysica Acta* **61**, 460 (1962).

⁸⁾ K. C. SMITH, *Biochemistry* **1**, 866 (1962).

⁹⁾ M. TAKANAMI, *Biochim. biophysica Acta* **61**, 432 (1962).

¹⁰⁾ G. C. WEBSTER, *J. biol. Chemistry* **229**, 535 (1957).

¹¹⁾ J. KRUH & J. C. DREYFUS, *Biochim. biophysica Acta* **44**, 55 (1960).

Präparation der Mikrosomen, pH-5-Enzyme, Überstand der pH-5-Enzyme. Im wesentlichen geschah die Präparation nach der Methode von ZAMEČNIK¹²⁾. Die Leber wurde in 2,3 ml Medium A pro g Frischgewicht in einem Glashomogenisator mit lockerem Pistill homogenisiert und anschliessend 10 Min. bei 15000 g zur Entfernung von Zelltrümmern, Kernen und Mitochondrien zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:2 bis 1:3 mit Medium B verdünnt und die Mikrosomen in einer präparativen Ultrazentrifuge (SPINCO, Modell L, Rotor Nr. 40) 90 Min. bei 105000 g sedimentiert. Die Mikrosomen wurden in Medium A aufgenommen, in einem kleinen POTTER-Homogenisator von Hand kurz homogenisiert, mit Medium B auf das vierfache Volumen verdünnt und nochmals 60 Min. bei 105000 g zentrifugiert. Anschliessend wurden die Mikrosomen im Medium A aufgenommen und kurz von Hand homogenisiert.

Die Solubilisierung der Mikrosomen erfolgte nach der Methode von KIRSCH⁴⁾. Das Sediment der 1. Ultrazentrifugation wurde in Medium A aufgenommen (ca. 15 mg Mikrosomen-Eiweiss/ml), kurz homogenisiert, mit Medium B auf das Fünffache verdünnt, die $MgCl_2$ -Konzentration auf 0,009 M gebracht und soviel einer 3-proz. Na-Desoxycholatlösung zugegeben, dass die Na-Desoxycholatmenge 90% der vorhandenen Eiweissmenge ausmachte (Endkonzentration an Na-Desoxycholat ca. 0,25%). Anschliessend wurde 60 Min. bei 105000 g zentrifugiert. Zum Auswaschen des Na-Desoxycholats wurde der Niederschlag in Medium A kurz homogenisiert, mit Medium B auf das vierfache Volumen verdünnt und nochmals 60 Min. bei 105000 g zentrifugiert.

Die pH-5-Enzyme wurden aus dem Überstand der 1. Ultrazentrifugation durch Zugabe von 0,5 N Essigsäure ausgefällt und abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde mit Medium B gewaschen, abzentrifugiert und in Medium A aufgenommen.

Der Überstand der abzentrifugierten pH-5-Enzyme wurde mit 2 N KOH auf pH 7,6 gebracht (= Überstand der pH-5-Enzyme).

Präparation der Ribonucleinsäuren. Die sRNA aus den pH-5-Enzymen wurde nach der Methode von ZAMEČNIK¹³⁾ hergestellt.

Zur Isolierung der mikrosomalen Ribonucleinsäure wurden zum Inkubationssystem (Mikrosomen plus Überstand der pH-5-Enzyme) 3 ml Tri-hydroxymethyl-amino-methan-HCl-Puffer 0,05 M, pH 7,6, mit Äthylendiamin-tetraessigsäure 10^{-4} M und 4 ml 90-proz. Phenol (g/V) zugegeben und bei Zimmertemperatur 60 Min. intensiv gerührt, auf 0–4° abgekühlt, 10 Min. bei 10000 g zentrifugiert und die wässrige Phase sorgfältig abpipettiert. Die Phenolphase wurde nochmals zweimal mit je 4 ml Tri-hydroxymethyl-amino-methan-HCl-Puffer je 5 Min. nachextrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden bei 0–4° dreimal ausgeäthert, mit 0,1 Vol. Kaliumacetat (20-proz., pH 5,0) und 2 Vol. 95-proz. Alkohol versetzt und 30 Min. im Kühlraum stehengelassen. Anschliessend wurde der Niederschlag bei 15000 g während 30 Min. abzentrifugiert und, nach sorgfältigem Auswischen der Zentrifugenbecher, in 1 ml 0,2 M NaCl oder KCl aufgenommen. Das Verhältnis der optischen Dichte $260 m\mu/280 m\mu$ variierte zwischen 1,9 und 2,1.

Chromatographie auf Sephadex G 75. Sephadex G 75 wurde in 0,2 M NaCl oder KCl unter ständigem Rühren gequollen und in eine Säule von ca. 20 ml gepackt. Im Kühlraum wurde die Säule mit 200–300 ml 0,2 M NaCl oder KCl durchgespült. 0,9–1,0 ml Nucleinsäurelösung wurde aufgetragen und mit 0,2 M NaCl bzw. KCl eluiert. Durchflussgeschwindigkeit: 1 ml/5 Min. Es wurden Fraktionen von 1 ml gesammelt.

Eiweisspräparation für die Zählung. Nach Inkubation wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen 10-proz. Trichloressigsäure versetzt und die Fällung 0,5 h im Kühlraum stengelassen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, viermal mit kalter 5-proz. Trichloressigsäure nachgewaschen, 30 Min. bei 90° mit 5-proz. Trichloressigsäure extrahiert, der Überstand abpipettiert und mit demjenigen der kalten Nachwaschung vereinigt. Der Trichloressigsäureextrakt wurde auf dem Wasserbad eingeeengt, der Rückstand in 1–2 ml «Hyamin» aufgenommen, mit 10 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt und in einem PACKARD Tri-Carb Szintillationszähler mit Benzoesäure-¹⁴C als Standard gezählt.

Das Eiweiss wurde durch Behandlung mit 95-proz. Äthanol, dann mit Äther/Äthanol/Chloroform (Vol. Verhältnis 2/2/1) und zweimal mit Äther entwässert und anschliessend im Thermostaten bei 70° getrocknet. Das Trockenpulver wurde in Äther fein suspendiert und auf ein Filterpapier-

¹²⁾ E. B. KELLER & P. C. ZAMEČNIK, J. biol. Chemistry 227, 45 (1956).

¹³⁾ M. B. HOAGLAND, M. L. STEPHENSON, J. F. SCOTT, L. I. HECHT & P. C. ZAMEČNIK, J. biol. Chemistry 237, 241 (1958).

plättchen abgemischt. Die Zählung erfolgte mit einem GEIGER-Rohr mit ultradünnem Fenster und Gasdurchfluss. Die Zählwerte wurden auf unendliche Schichtdicke extrapoliert und auf dpm umgerechnet. Das Eiweiss wurde nach der von BEISENHERZ und Mitarb.¹⁴⁾ modifizierten Biuret-methode bestimmt.

SUMMARY

Incubation of microsomes with the supernatant of pH-5-enzymes is as active in incorporating amino-acids into proteins (controlled by use of leucin-[¹⁴C]) as incubation with the usual system, which is supplied with pH-5-enzymes. Since the supernatant of pH-5-enzymes does not contain any soluble ribonucleic acid (sRNA), all the leucin-[¹⁴C] found in nucleic acids must be bound to microsomal RNA. The behaviour of the isolated microsomal RNA on Sephadex G 75, and of the ribonuclease digest in paper electrophoresis, confirms our suggestion of the presence of an active sRNA fraction in microsomes and ribosomes.

The separation of the protein synthesizing system in a particle bound one and a soluble one may be artificial and due to our methods of preparation.

Biochemisches Institut der Universität Zürich

¹⁴⁾ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZEK, K. H. GABARDE, E. MEYER & G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 86, 555 (1953).

128. Über die UV.-Absorption acylierter Amide und Harnstoffe

1. Mitteilung über chemische Struktur und UV.-Spektroskopie

1. Mitteilung über Struktur und Reaktivität heterocyclischer Verbindungen

von H. G. Leemann, K. Stich, J. Gmünder und A. Lindenmann

(2. IV. 63)

Im Verlaufe synthetischer Arbeiten über Abkömmlinge des Hexahydropyrimidons ist uns aufgefallen, dass das UV.-Spektrum des 7,8-Dihydro-6*H*-pyrimido [2,1-*b*] [1,3] tetrahydrooxazin-2,4-dion-Derivates I¹⁾ demjenigen des *N,N'*-Bis-dibutylacetyl-hexahydropyrimidons (II) sehr ähnlich ist²⁾.

Bezeichnet man in der Formel I und II die Atome derjenigen Kette, welche offenbar für die UV.-Absorption verantwortlich ist, mit den Buchstaben a-e, so gelangt man zu zwei sehr ähnlichen Teilstrukturen, wobei sich Ia von IIa lediglich darin unterscheidet, dass O und N einmal vertauscht sind.

Die erwähnte spektrale Verwandtschaft der beiden Verbindungen I und II ist also bedingt durch den sehr ähnlichen Chromophor, den man allgemein als III formulieren kann, und der dadurch charakterisiert ist, dass in einer Atomkette

¹⁾ J. GMÜNDER & A. LINDENMANN, «7,8-Dihydro-6*H*-pyrimido[2,1-*b*] [1,3]tetrahydrooxazin-2,4-dione, Derivate eines neuen Ringgerüsts», Referat gehalten an der Sommerversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft vom 8. Sept. 1962 in Schuls.

²⁾ Für alle in dieser Arbeit mitgeteilten Messresultate wurde Alkohol als Lösungsmittel verwendet. Über Einzelheiten der Messtechnik siehe K. STICH & H. G. LEEMANN, 2. Mitteilung über chemische Struktur und UV.-Spektroskopie, Helv. 46, 1151 (1963).