

## Untersuchungen über die Thermostabilität der aus Hühnerfibroblasten isolierten Ribonucleinsäuren

Von

Lydia Sverak, R. A. Bonar und J. W. Beard\*

Aus der Abteilung für Chirurgie der Duke University, Medical Center,  
Durham, N.C. 27706, U.S.A.

Mit 4 Abbildungen

(Eingegangen am 12. Juni 1970)

Aus intakten Hühnerfibroblasten können die cytoplasmatischen Ribonucleinsäuren durch Behandlung mit Phenol und Natriumlaurylsulfat bei 2° extrahiert werden. Werden die Nucleinsäuren auf 40° oder darüber hinaus erwärmt und rasch abgekühlt, so ändert sich die Struktur der 28S-Ribosomen-RNS derart, daß sie bereits bei etwa 26S sedimentiert, während die Sedimentationsgeschwindigkeiten der 18S-RNS und der 4S-RNS unverändert bleiben. Darüber hinaus scheint die 28S-RNS gegenüber Spaltung zu kleineren Molekülen besonders empfindlich zu sein; ein wenn auch geringerer Abbau findet selbst in Anwesenheit von Diäthyl-pyrocbonat statt. Eine kleine Menge einer Ribonucleinsäure, die bei etwa 41S sedimentiert, wurde ebenfalls durch Phenol-Extraktion bei 2° freigesetzt. Diese RNS, die höchstwahrscheinlich mit der im Nucleolus befindlichen Stamm-RNS, aus der die 18S- und 28S-RNS hervorgehen, identisch ist, neigt ebenfalls stark zu Fragmentierung durch Erhitzen auf 40° und darüber hinaus.

### *The Thermal Stability of Ribonucleic Acids from Chick Embryo Fibroblasts*

Cytoplasmic ribonucleic acids can be extracted from chick embryo cells with phenol and sodium dodecyl sulfate at 2°. If these ribonucleic acids are heated to 40° and above and chilled, the structure of the 28S ribosomal RNA is changed so that it sediments at about 26S. The 18S and 4S ribonucleic acids are not altered in sedimentation behaviour by heating and cooling. Moreover the 28S RNA is also more susceptible to breakdown to smaller molecules even in the presence of the ribonuclease inhibitor diethyl pyrocarbonate. A small amount of RNA sedimenting at about 41S, probably ribosomal precursor RNA, can also be extracted at 2°. It is also subject to change in

\* Herrn Prof. Dr. *Engelbert Broda* zum 60. Geburtstag in freundschaftlicher Verehrung gewidmet.

sedimentation rate and to fragmentation when heated above 40°.

### Einleitung

Eine verhältnismäßig häufig angewandte Methode zur Gewinnung der gesamten in der Zelle enthaltenen Ribonucleinsäuren (RNS) ist die bei erhöhten Temperaturen durchgeführte Extraktion mit Phenol<sup>1</sup>. Außerdem ist es möglich, einzelne RNS-Arten getrennt zu gewinnen, wenn die Phenol-Extraktion bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen wird<sup>2</sup>. Oft wird auch bei der Extraktion der RNS aus isolierten Zellorganellen Erwärmen auf etwa 60° verwendet<sup>3,4</sup>. Die Anwendung solcher verhältnismäßig hoher Temperaturen führt zur Frage nach der Thermostabilität von RNS. In älteren Untersuchungen wurden hauptsächlich die beim Erwärmen auftretenden Änderungen der Sedimentationskonstante, der Viskosität, der optischen Aktivität und des UV-Spektrums bestimmt<sup>5,6</sup>. Die erhaltenen Ergebnisse führten zur Vorstellung, daß hochmolekulare Ribonucleinsäuren aus Untereinheiten bestehen, die durch Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind<sup>5</sup>. Wenig später hat jedoch *Spirin*<sup>6</sup> die Vermutung ausgesprochen, daß es sich höchstwahrscheinlich um eine enzymatische Spaltung handelte, und die Notwendigkeit der Integrität der gesamten Kette für die biologische Aktivität von Ribonucleinsäuren postuliert. Diese Schlußfolgerung, die ausschließlich kovalente Bindungen voraussetzt, wurde durch mehrere spätere Arbeiten bestätigt<sup>7,8</sup>. Die bei Erwärmen auftretenden Veränderungen betreffen demnach nur die sekundäre und tertiäre Struktur der RNS und sind vollkommen reversibel<sup>6</sup>.

Eigene Versuche, die sich unter anderem mit der gesonderten Gewinnung von cytoplasmatischen und von Kern-RNS aus Hühnerfibroblasten befaßten, ließen vermuten, daß sich die Struktur mancher RNS bereits bei kurzfristigem Erwärmen auf 40° verändert: Die im Dichtegradienten der 28S-Position entsprechende, bei 40° extrahierte RNS war nämlich gegenüber der bei 2° extrahierten, cytoplasmatischen RNS immer um etwa 2 Fraktionen verschoben, während die 18S-RNS stets gut übereinstimmten<sup>9</sup>.

<sup>1</sup> K. Scherrer und J. E. Darnell, Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 486 (1962).

<sup>2</sup> G. P. Georgiev, Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 6, 259 (1967).

<sup>3</sup> S. Penman, J. Mol. Biol. 17, 117 (1966).

<sup>4</sup> S. Penman, C. Vesco und M. Penman, J. Mol. Biol. 34, 49 (1968).

<sup>5</sup> B. D. Hall und P. Doty, J. Mol. Biol. 1, 111 (1959).

<sup>6</sup> A. S. Spirin, Progr. Nucleic Acid Res. 1, 301 (1963).

<sup>7</sup> W. M. Stanley und R. M. Bock, Biochem. 4, 1302 (1965).

<sup>8</sup> G. Bruening und R. M. Bock, Biochim. Biophys. Acta 149, 377 (1967).

<sup>9</sup> L. Sverak, R. A. Bonar, A. J. Langlois und J. W. Beard, Biochim. Biophys. Acta, im Druck.

Eine ähnliche Beobachtung wurde an HeLa-Zellen gemacht<sup>10</sup>, wobei gefunden wurde, daß Erwärmen auf 50—60° zur Abspaltung eines Bruchstückes von etwa 7S von der 28S-RNS zur Folge hatte. Diese Eigenschaft der 28S-Ribosomen-RNS scheint nicht species-spezifisch zu sein, da sie auch bei anderen Zellarten beobachtet wurde. Die daraus resultierende Verminderung des Molekulargewichtes war aber zu geringfügig, um das Sedimentationsverhalten merklich zu verändern.

Vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Verhalten im Dichtegradienten der aus Hühnerfibroblasten isolierten Ribosomen-RNS nach Erwärmen auf verschiedene Temperaturen. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen konnten nur irreversible Veränderungen erfaßt werden.

### Methoden

Die in vorliegender Arbeit verwendete Methode zur getrennten Gewinnung von cytoplasmatischen und nuclearen RNS wurde andernorts ausführlich beschrieben<sup>9</sup>; hier sollen nur die wichtigsten Schritte angeführt werden. Als Zellmaterial dienten Hühnerfibroblasten, die in Polystyrol-Petrischalen gezüchtet wurden<sup>11</sup>. Für die beschriebenen Experimente wurden die Kulturen 4—6 Stdn. mit 5-<sup>3</sup>H-Uridin, beziehungsweise mit 2-<sup>14</sup>C-Uridin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsinieren von den Kulturgefäßen losgelöst, abzentrifugiert, mehrmals mit isotonomischer, gepufferter NaCl-Lösung zentrifugierend gewaschen und schließlich in CO<sub>2</sub>-Äthanol eingefroren. Die sedimentierten gefrorenen Zellen wurden zweimal je 8 Min. mit gleichen Volumina wassergesättigtem Phenol und „Natriumacetat-NLS“-Puffer (0,1M-CH<sub>3</sub>COONa mit 0,5% Natriumlaurylsulfat, pH 5,1—5,2) bei etwa 2—4° extrahiert. Die abgetrennten, vereinigten wäßr. Phasen enthielten die gesamten cytoplasmatischen RNS<sup>9</sup>. Anschließend wurden die Phenol- und Interphase 4 Min. mit frischem Puffer bei 40° extrahiert, wodurch die Kern-RNS isoliert wurden. Aus den entsprechenden wäßr. Phasen wurden die Ribonucleinsäuren mit Äthanol gefällt und für etwa 2 Stdn. bei —20° belassen. Danach wurden die RNS sedimentiert, in 0,1M Acetapuffer, pH 5,0, aufgenommen und durch mehrmalige Alkohol-fällung gereinigt.

Die gereinigten sedimentierten Ribonucleinsäuren wurden in 0,5 ml CH<sub>3</sub>COONa-Puffer aufgenommen und für die Hitzebehandlung in ein Wasserbad von entsprechender Temperatur gebracht. Nach 10 Min. wurden die Lösungen plötzlich in einem Eisbad abgekühlt. In den beschriebenen Versuchen wurden die mit <sup>3</sup>H-Uridin markierten RNS erhitzt, wogegen die mit <sup>14</sup>C-Uridin markierten, die als Kontrollen dienten, während der Versuchsdauer in einem Eisbad belassen wurden. Die hitzebehandelten RNS wurden mit den entsprechenden (<sup>14</sup>C-markierten) Kontrollen vereinigt und anschließend mit Äthanol gefällt. Nach etwa 2 Stdn., bei —20°, wurden die Nucleinsäuren sedimentiert, in 0,1 ml Tris-Puffer (0,025M NaCl, 0,005M

<sup>10</sup> J. J. Pene, E. Knight und J. E. Darnell, *J. Mol. Biol.* **33**, 609 (1968).

<sup>11</sup> A. J. Langlois, D. P. Bolognesi, R. B. Fritz und J. W. Beard, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **131**, 138 (1969).

Tris-HCl, 0,001M EDTA pH 7,0) aufgenommen, über einen linearen Dichtegradienten von 5—20% Saccharose, gelöst im gleichen Puffer, geschichtet, und bei 22 500 UPM in einem Spinco Rotor SW 40 17 Stdn. zentrifugiert. Die Fraktionen wurden vom Boden des Zentrifugenröhrchens in einem Fraktionskollektor aufgefangen. Die Radioaktivität wurde in einem Tri-Carb Flüssigkeit-Szintillations-Spektrometer, Modell 3310, bestimmt. Die Sedimentationskonstanten der Ribonucleinsäuren wurden durch Vergleich ihrer Positionen im Dichtegradienten<sup>12</sup> mit den Positionen der nicht erhitzten cytoplasmatischen 4S-, 18S- und 28S-RNS bestimmt<sup>9</sup>.

### Ergebnisse

Eine regelmäßige Beobachtung war, wie bereits in der Einleitung erwähnt, daß die bei 40° extrahierte „28S“-RNS im Rohrzuckergradienten langsamer sedimentierte als die entsprechende, bei 2° extrahierte cytoplasmatische RNS. Dies bedeutet, daß entweder infolge Erwärmung die Struktur der 28S verändert worden war, oder daß es sich möglicherweise um eine verschiedenartige Nucleinsäure handelte. Zur Klärung dieser Frage wurden Fibroblastenkulturen mit 5-<sup>3</sup>H-Uridin beziehungsweise mit 2-<sup>14</sup>C-Uridin markiert, und die RNS bei 2—4° isoliert. Die <sup>3</sup>H-markierte RNS wurde, in Anwesenheit von NLS und Phenol, 4 Min. in einem Wasserbad von 40° erwärmt, mit der <sup>14</sup>C-markierten RNS vereinigt und wie beschrieben analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 1 (A) dargestellt. Wie ersichtlich, ist die Lage der wärmebehandelten 28S-RNS gegenüber der unbehandelten um etwa 2 Fraktionen verschoben, während die 18S- und die 4S-RNS vollkommen übereinstimmen. In Abb. 1 (B) ist die Verteilung der Radioaktivität auf die bei 2° und bei 40° extrahierten Ribonucleinsäuren wiedergegeben. Diesmal ist die Kern-28S-RNS („40°-RNS“) gegenüber der unbehandelten, bei 2° extrahierten, um etwa 3 Fraktionen verschoben, was möglicherweise dadurch bedingt ist, daß die Kern-RNS durch zweimalige Extraktion bei 40° gewonnen wurde. Wieder stimmen die Positionen der 18S- und 4S-RNS vollkommen überein. In Abb. 1 (B) ist eine Radioaktivität auch im 45S—32S-Gebiet der „40°-RNS“ bemerkenswert.

In Abb. 2 ist das Verhalten gereinigter, bei 2° extrahierter RNS nach Erhitzen auf verschiedene Temperaturen dargestellt. Die gereinigten RNS wurden in 2 ml 0,1M-Natriumacetat-puffer (pH 5,0) aufgenommen, auf 4 Teile aufgeteilt und die <sup>3</sup>H-markierten RNS 10 Min. den angegebenen Temperaturen ausgesetzt, während die <sup>14</sup>C-markierten in einem Eisbad belassen wurden. Danach wurden die erwärmten Lösungen plötzlich abgekühlt, mit den <sup>14</sup>C-markierten RNS vereinigt, mit Äthanol gefällt und, wie beschrieben, analysiert.

Abb. 2 (A) demonstriert die ausgezeichnete Übereinstimmung des Sedimentationsverhaltens der in der Kälte extrahierten cytoplasmatischen

<sup>12</sup> R. G. Martin und B. N. Ames, J. Biol. Chem. **236**, 1372 (1961).

Ribonucleinsäuren. Wie aus Abb. 2 (B) zu entnehmen ist, sedimentierte die erhitzte 28S- wieder langsamer, während die 18S- und die 4S-RNS unverändert blieben. Erwärmen auf 60° verursachte eine weitere Verringerung der Sedimentationskonstante der 28S-RNS [Abb. 2 (C)]. Darüber hinaus war auch die wiedergewonnene Menge dieser RNS wesentlich geringer.

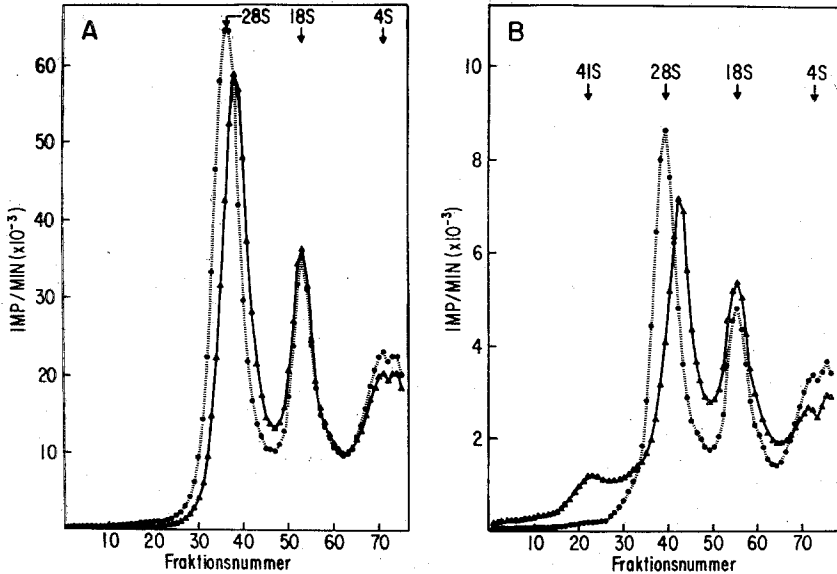


Abb. 1. Sedimentationseigenschaften der Ribosomen-RNS nach Erwärmen. A. Die Gewebekulturen wurden mit 5-<sup>3</sup>H-Uridin bzw. mit 2-<sup>14</sup>C-Uridin markiert und die Nucleinsäuren bei 2° mit „Natriumacetat-NLS“-Puffer und Phenol extrahiert. Die <sup>3</sup>H-markierten RNS wurden auf 40° erwärmt, abgekühlt, mit den <sup>14</sup>C-markierten in Kälte aufbewahrten RNS vereinigt, gemeinsam gereinigt und analysiert. B. Vergleich der bei 2° extrahierten RNS, <sup>14</sup>C-markierten RNS mit den aus der Phenol- und Interphase bei 40° extrahierten <sup>3</sup>H-markierten Ribonucleinsäuren, ●-----● = <sup>14</sup>C; ▲——▲ = <sup>3</sup>H

Auch die Menge der wiedergewinnbaren 18S-RNS scheint geringfügig abgenommen zu haben, obwohl das Sedimentationsverhalten unverändert blieb. Erwärmt man die cytoplasmatischen RNS auf 80°, so werden die bereits bei 60° beobachteten Veränderungen verstärkt, wobei wesentlich geringere Mengen aller Ribonucleinsäuren in Gradienten wiedergefunden wurden.

Es wurde vermutet, daß der Verlust an RNS auf einen durch Spuren noch vorhandenen RNasen verursachten enzymatischen Abbau zurückzuführen ist, weshalb der in Abb. 3 dargestellte Versuch durchgeführt wurde. Als Schutz gegen RNase wurde Diäthyl-pyrocbonat verwendet<sup>13</sup>,

<sup>13</sup> I. Fedoresák und L. Ehrenberg, Acta Chem. Scand. 20, 107 (1966).

und zwar in einer Konzentration von 0,5% bei der Extraktion und Reinigung der Ribonucleinsäuren und 0,2% bei der Temperaturbehandlung. Wie Abb. 3 zeigt, ergab sich bei der Thermobehandlung der cytoplasmatischen RNS in Anwesenheit von Diäthyl-pyrocbonat ein ganz anderes Bild. Die Verschiebung in der 28S-Position der erwärmten RNS war auch in diesem Falle deutlich erkennbar und betrug etwa

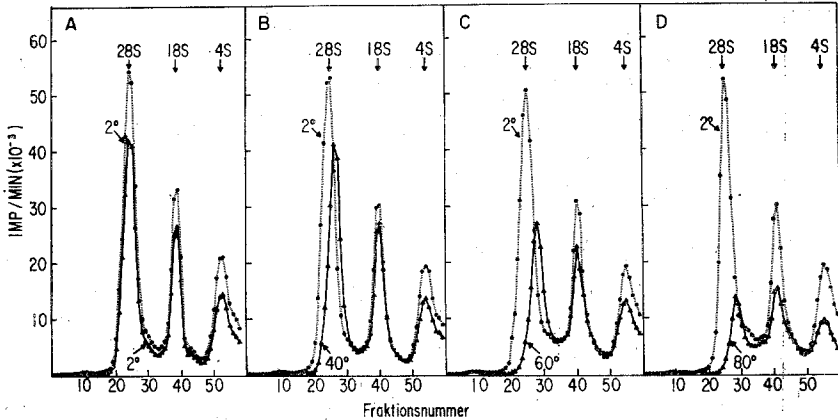


Abb. 2. Analyse der cytoplasmatischen Ribonucleinsäuren im Rohrzuckergradienten nach Erwärmen auf verschiedene Temperaturen. Die in der Kälte extrahierten, durch mehrmalige Alkoholfällung gereinigten RNS wurden in 0,1M-Acetatpuffer gelöst. Während die mit  $^3\text{H}$ -Uridin markierten RNS 10 Min. lang den angegebenen Temperaturen ausgesetzt wurden, wurden die mit  $^{14}\text{C}$ -markierten in einem Eisbad belassen. A. Verteilung nicht behandelter RNS im Dichtegradienten (Kontrolle). B. Vergleich nicht behandelter RNS ( $^{14}\text{C}$ ) mit den auf  $40^\circ$  erwärmten ( $^3\text{H}$ ). C. und D. Ergebnis der Erwärmung auf  $60^\circ$  bzw.  $80^\circ$ . ● — ● =  $^{14}\text{C}$ , ▲ — ▲ =  $^3\text{H}$

2 Fraktionen nach Erhitzen auf  $40^\circ$  [Abb. 3 (B)] und etwa 3 Fraktionen für die „ $60^\circ$ - und  $80^\circ$ -RNS“. Im Gegensatz zu den in Abb. 2 dargestellten Ergebnissen ist aber eine nennenswerte Abnahme der Menge der 28S-RNS erst bei Erhitzen auf  $80^\circ$  feststellbar. Die scheinbare Zunahme der 18S-RNS in Abb. 3 (C) und 3 (D) kann vielleicht auf die viel höheren Werte der Radioaktivität in den entsprechenden Kurvenminima zwischen den beiden Ribosomen-RNS zurückgeführt werden. Vermutlich handelt es sich hierbei nicht um ein Artefakt, da die genannten Minima mit Erhöhung der Temperatur weiter ansteigen. Die 4S-RNS bleibt ebenfalls im wesentlichen unverändert.

Da die Phenol-Extraktion bei etwa  $2^\circ$  nur geringe Mengen nucleolarer Ribonucleinsäuren aus intakten Zellen freisetzt, sind in Abb. 4 die der 41S-RNS entsprechende Gebiete der Abb. 3 vergrößert dargestellt.

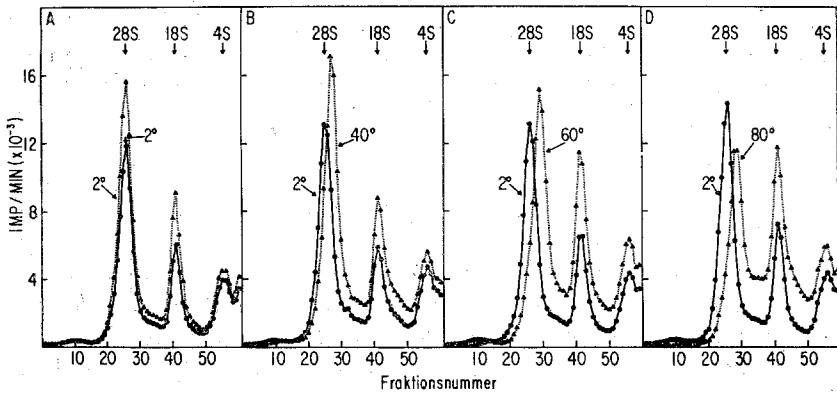


Abb. 3. Wirkung der in Anwesenheit von Diäthyl-pyrocacbonat durchgeführten Hitzebehandlung auf das Sedimentationsverhalten der RNS. Die Ribonucleinsäuren wurden, wie in Abb. 2 beschrieben, isoliert und gereinigt, außer daß Diäthyl-pyrocacbonat als Schutz gegen RNasen verwendet wurde, und zwar in einer Konzentration von 0,5% bei der Extraktion und Reinigung der RNS und 0,2% bei der Thermobehandlung. ●—● =  $^{14}\text{C}$ -markierte, nicht behandelte RNS. ▲—▲ =  $^3\text{H}$ -markierte wärmebehandelte RNS

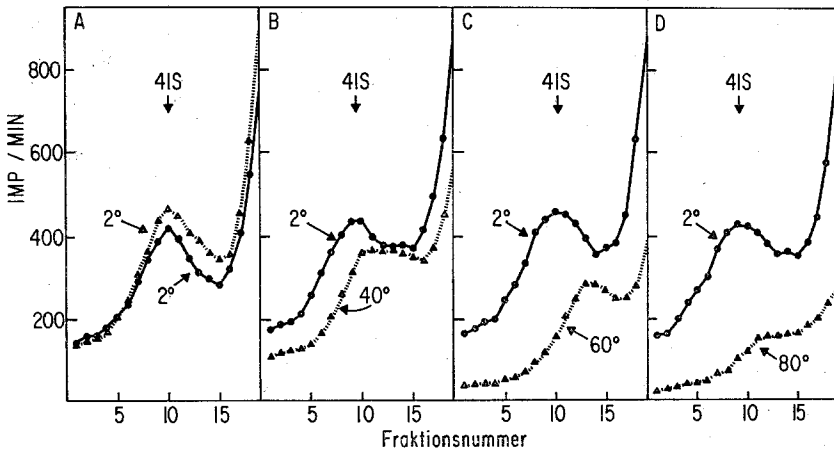


Abb. 4. Vergrößerte Darstellung der den 45S-32S entsprechenden Gebiete der Dichtegradienten aus Abb. 3. ●—● =  $^{14}\text{C}$ -markierte, in Kälte belassene RNS. ▲—▲ =  $^3\text{H}$ -markierte, den angegebenen Temperaturen unterworfenene RNS

Abb. 4 (A) zeigt die übereinstimmende Sedimentationskonstante der in Kälte extrahierten 41S-RNS. Jedoch bereits Erwärmen auf  $40^\circ$  bewirkt

eine merkliche Abnahme der Menge der 41S-RNS und eine Verminderung der Sedimentationskonstante [Abb. 4 (B)]. Erhitzen auf 60° verstärkt die beobachteten Effekte in deutlichem Maße [Abb. 4 (C)] und Behandlung bei 80° scheint die 41S-RNS fast völlig zu zerstören [Abb. 4 (D)].

### Diskussion

Die in vorliegender Arbeit beschriebenen Versuche geben Aufschluß über die Thermostabilität der aus Hühnerfibroblasten gewonnenen löslichen RNS, der Ribosomen-RNS und der 41S-RNS. Das in Abb. 1 angeführte Experiment ergab, daß die geringere Sedimentationsgeschwindigkeit der bei 40° extrahierten Kern-, „28S“-RNS in Wirklichkeit auf eine durch Erwärmen hervorgerufene Veränderung des 28S-Moleküls zurückzuführen ist. Diese Veränderung war nach 10 Min. Erhitzen auf 40° nur teilweise vollzogen, doch gänzlich abgeschlossen nach Behandlung bei 60°. Erwärmen auf 80° bewirkte keine weitere Verringerung der Sedimentationskonstante. Im Gegensatz zur 28S-RNS blieben die Sedimentationseigenschaften der 18S- und der 4S-RNS völlig unverändert (Abb. 2 und 3). Eine ähnliche Beobachtung wurde beim Erwärmen der aus HeLa-Zellen isolierten Ribosomen-RNS gemacht<sup>10</sup>. Die Erniedrigung der Sedimentationskonstante der 28S-RNS, die auf die Veränderung der räumlichen Struktur zurückzuführen ist, war von der Abspaltung einer Polynucleotid-Kette von etwa 7S begleitet. Kein solches Bruchstück konnte von der 16S-RNS und der 45S Kern-RNS freigesetzt werden<sup>10</sup>.

Der beachtliche Verlust an RNS während der Hitzebehandlung (Abb. 2) war offensichtlich auf Abbau durch verunreinigende RNasen zurückzuführen und konnte durch die Verwendung von Diäthylpyrocarbonat fast völlig verhindert werden. Der trotz der Anwesenheit des Inhibitors eintretende Verlust an 28S-RNS bei Erwärmen auf 80° beweist die wesentlich höhere Thermolabilität dieser Ribosomen-RNS-Species. Die gleiche Beobachtung wurde auch an Rattenleber-RNS gemacht<sup>14</sup>, wobei die Hitze-Empfindlichkeit der 28S-RNS dahingehend gedeutet wurde, daß die Polynucleotidkette möglicherweise „versteckte“, durch frühere Nuclease-Wirkung hervorgerufene Bruchstellen aufweist, die erst beim Erwärmen offenbar werden. Eine andere Erklärung wäre, daß manche Phosphodiester-Bindungen besonders leicht hydrolysiert werden können.

Eine kleine Menge der bei 2° aus intakten Zellen extrahierten RNS sedimentierte bei etwa 41S (Abb. 3 und 4), einer Sedimentations-

<sup>14</sup> P. V. Venkov und A. A. Hadjiolov, Biochem. J. **115**, 91 (1969).



geschwindigkeit, die dem Stamm-Molekül der beiden Ribosomen-RNS entspricht<sup>9</sup>. Erwärmen auf 40—60° bewirkte außer einer Verminderung der Sedimentationskonstante eine merkliche Abnahme der Menge der 41S-RNS. Die Verbreiterung des Kurvenmaximums würde für eine Fragmentierung zu mehreren ungleichen Molekülen sprechen.

In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, daß bei der Extraktion der Kern-RNS bei 40° des öfteren eine im Vergleich zur 41S- verhältnismäßig große Menge 32S-RNS gefunden wurde<sup>9</sup>. Es kann durchaus möglich sein, daß Wärmebehandlung zum Teil eine ähnliche Spaltung des 41S-Moleküls hervorruft, wie sie im natürlichen Prozeß bei der Reifung der Ribosomen-RNS vorkommt. Daher könnte die Kürze der Extraktionszeit bei hohen Temperaturen für die Gewinnung der 41S-RNS in möglichst unversehrttem Zustand von entscheidender Bedeutung sein.

Die bisher auf Thermostabilität untersuchten RNS waren aus einem Einzelstrang bestehende, durch H-Brücken zu komplizierten räumlichen Strukturen gefaltete Polyribonucleotide. Diese räumlichen Strukturen können leicht durch Wärmebehandlung zerstört werden, was auf die Thermolabilität von H-Bindungen zurückzuführen ist. Kühlt man aber die Ribonucleinsäuren ab, so kehren sie auf ihre ursprüngliche Form zurück<sup>6</sup>. Außerdem bewirkt Wärmebehandlung mindestens drei zusätzliche, durch Abkühlen nicht umkehrbare Veränderungen der 28S-RNS: A. Ein Bruchstück von etwa 7S wird bei Erhitzen auf 40—60° von der Nucleinsäure-Kette abgespalten<sup>10</sup>. B. Es tritt eine Erniedrigung der Sedimentationskonstante auf etwa 26S ein, was auf eine bleibende Veränderung der räumlichen Struktur schließen läßt (Abb. 1, 2 und 3). C. Offensichtlich tritt ein Abbau des Moleküls ein, der auch in Anwesenheit eines RNase-Inhibitors, Diäthyl-pyrocarbonat, welcher anscheinend die 18S- und 4S-RNS gegen enzymatischen Angriff schützt, stattfindet (Abb. 3).

Anscheinend sind aber die genannten Eigenschaften der schwereren Ribosomen-RNS nicht allgemein gültig, da Erhitzen der 26S-Hefe-RNS keine Verringerung der Sedimentationsgeschwindigkeit hervorruft<sup>15</sup>. Auch konnten bei der *E. Coli*-rRNS keine schwachen Bindungen festgestellt werden<sup>16</sup>. In diesem Zusammenhange mag erwähnt werden, daß sich die Ribosomen-Ribonucleinsäuren verschiedener Organismen auch durch andere Eigenschaften, insbesondere in ihrer Größe, unterscheiden. Dies trifft vor allem für die schwerere Ribosomen-RNS-Komponente zu<sup>17</sup>.

<sup>15</sup> G. Beck, J. P. Beck und J. P. Ebel, Bull. Soc. Chim. Biol. **50**, 2315 (1968).

<sup>16</sup> I. Yu. Mikhailova und A. A. Bogdanov, Dokl. Biochim. **184**, 9 (1969).

<sup>17</sup> U. E. Loening, J. Mol. Biol. **38**, 355 (1968).

### Danksagungen

Vorliegende Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung der Forschungsbeihilfe USPHS C-4752 des National Cancer Institute und des Dorothy Beard Res. Fonds ermöglicht.

Unserem Kollegen Dr. *A. J. Langlois* sind wir für die Züchtung der Zellkulturen zu Dank verpflichtet.

Die Hühnerembryonen stammten von White Leghorn-Eiern, die von Dr. *Roy Luginbuhl* durch das Research Resource Program of the National Cancer Institute geliefert wurden.