

Untersuchungen der durch γ -bestrahlte Chromatinmatrizen ausgelösten RNS-Synthese*

Von

L. K. Mee, J. J. Weiss und C. M. Wheeler

Laboratory of Radiation Chemistry, School of Chemistry,
The University, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, England

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 8. Mai 1970)

1. Es wurde der Einfluß von γ -Bestrahlung auf Chromatin (Kälberthymus und Rattenleber) untersucht, insbesondere hinsichtlich seiner Funktion als Matrix für die Synthese von RNS durch die DNS-abhängige RNS-Polymerase.

2. Es zeigt sich, daß anfänglich Bestrahlung eine geringe Verstärkung der Matrizenaktivität des Chromatins bewirkt, daß aber höhere Dosen diese prägenden Fähigkeiten zunehmend herabsetzen.

3. Kinetische Untersuchungen machen es wahrscheinlich, daß die Verstärkung nicht durch eine Vergrößerung der Anzahl der Plätze, die das Enzym, die RNS-Polymerase, binden können, hervorgerufen wird, wogegen die Herabsetzung bei höheren Dosen von einer wachsenden Anzahl solcher bindender Stellen, die für die RNS-Synthese inaktiv sind, begleitet wird.

4. Es wurde eine Sequenzanalyse der nächsten Nachbarbase der von der Chromatinmatrix synthetisierten RNS vorgenommen. Sie zeigt, daß die Transkription vom Chromatin asymmetrisch ist. Bei bestrahlten Chromatinmatrizen lassen die Veränderungen in der Basenzusammensetzung der synthetisierten RNS auf eine relativ größere Strahlungsempfindlichkeit des Adenin—Thymin-Basenpaares in der Chromatin-DNS schließen.

Studies on RNA Synthesis Primed by γ -irradiated Chromatin Templates

1. The effects of γ -irradiation on chromatin (calf thymus and rat liver) particularly on its function as a template for the synthesis of RNA by DNA-dependent RNA polymerase have been studied.

2. The initial effect of irradiation was found to be some enhancement of the template activity of the chromatin, although at higher doses the priming ability is progressively reduced.

* Herrn Prof. Dr. E. Broda zum 60. Geburtstag gewidmet.

3. Kinetic studies suggest that the enhancement is not due to an increase in the number of enzyme binding sites for the RNA-polymerase, while the inhibition at higher doses is accompanied by an increased number of binding sites which are inactive in RNA synthesis.

4. A nearest neighbour base frequency analysis of the RNA synthesized on the chromatin templates has been made. This indicates that the transcription from the chromatin is asymmetric. With irradiated chromatin templates, changes in base composition of the synthesized RNA suggest a relatively greater radiation sensitivity of the adenine—thymine base pair in the chromatin DNA.

Einleitung

Mehrere Autoren^{1, 2, 3} haben die Rolle des Chromatins als Matrix für die DNS-abhängige RNS-Synthese untersucht. Insbesondere untersuchten sie die Funktion der chromosomalen Proteine bei der Regulierung der Transkription von der DNS. Daß sie eine genetische Funktion haben könnte, macht die Untersuchung des Strahlungseinflusses auf Chromatin besonders interessant. Es wurden einige kinetische Untersuchungen angestellt, um den Mechanismus dieses Einflusses klarzustellen. Bindung von Histonen an die DNS beeinflusst die Zusammensetzung der synthetisierten RNS⁴ deutlich, und da gezeigt werden konnte, daß Bestrahlung die Bindung von Histonen an die DNS beeinflusst⁵, wurde eine Untersuchung der Nachbarbasenfrequenz durchgeführt, um herauszufinden, ob die von bestrahlten Chromatinmatrizen synthetisierten RNS sich von nichtbestrahlten Matrizen synthetisierten RNS in der Basensequenz unterscheiden.

Reagentien und Methoden

Die Nucleosid-5'-triphosphate stammten von Schwartz Bioresearch Inc., Orangeburg (N.Y.), USA. Isotopenmarkierte Verbindungen wurden von folgenden Quellen bezogen: 8-¹⁴C-ATP, ¹⁴C-GTP und α -³²P-ATP vom Radiochemical Centre, Amersham, England; ³H-GTP, ³H-CTP und α -³²P-UTP von Schwartz Bioresearch Inc., New York; α -³²P-CTP und α -³²P-GTP von ICN, Californien.

Extraktion der *E. coli* RNS-Polymerase

Die RNS-Polymerase (EC 2.7.7.6) aus *E. coli* wurde im wesentlichen nach dem Verfahren von Chamberlin und Berg⁶ gewonnen. *E. Coli*-Zellen des

¹ I. Bekhor, G. M. Kung und J. Bonner, J. Mol. Biol. **39**, 351 (1969).

² R. C. C. Huang und P. C. Huang, J. Mol. Biol. **39**, 365 (1969).

³ R. S. Gilmour und J. Paul, J. Mol. Biol. **40**, 137 (1969).

⁴ A. Skalka, A. V. Fowler und J. Hurwitz, J. Biol. Chem. **241**, 588 (1966).

⁵ M. G. Robinson, J. J. Weiss und C. M. Wheeler, Biochim. Biophys. Acta **124**, 181 (1966).

⁶ M. Chamberlin und P. Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. **48**, 81 (1962).

Typs MRE 600, die frei von RNase sind, wurden durch das Microbiological Research Establishment, Porton, England, zur Verfügung gestellt. Die DEAE-Säule wurde statt mit 0,005*M*-Kaliumphosphatpuffer, pH 8,4, mit 0,05*M*-Trispuffer, pH 8,4, gepuffert. Die aus der DEAE-Säule zwischen 0,12*M*- und 0,25*M*-Kaliumchlorid eluierte Fraktion wurde mit Ammoniumsulfat (60% der Sättigung) wieder gefällt, in 0,05*M*-Trispuffer, pH 7,8, der 0,006 Mol/l 2-Mercaptoäthanol enthielt, gelöst und bei -20° in 50proz. Glycerin aufbewahrt. Eine Enzym-einheit ist definiert als die Inkorporierung von 1 μ Mol ^{14}C -AMP pro Stunde mit Kälberthymus als Primer unter den in Tab. 1 genannten Bedingungen.

Bereitung des Chromatins

Wir folgten der von Paul und Gilmour⁷ beschriebenen Methode, in der zuerst Zitronensäurekerne hergestellt werden. Bei Kälberthymus wurden die Kerne mit 0,2*M*-Phosphatpuffer, pH 7, extrahiert und die erhaltene Gelkugel mit 0,001*M*-EDTA gewaschen. Bei Rattenleber verwendeten wir 0,15*M*-NaCl—0,1*M* Tris—HCl-Puffer, pH 7,5, um die Kerne zu extrahieren, und die Gelkugel wurde mit dest. Wasser gewaschen, bis wir ein viskoses Gel erhielten. Das erhaltene Gel wurde in dest. Wasser suspendiert und stellte das Chromatin dar.

Bestrahlung

Wir verwendeten eine 200-Ci- ^{60}Co - γ -Strahlenquelle. Wir bestrahlten Chromatinsuspensionen von 200 μg DNS pro ml. (Aus Bequemlichkeitsgründen wurden die Konzentrationen auf DNS bezogen, unter der Annahme, daß bei 260 nm $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 200$.)

Ergebnisse und Diskussion

Bei der in-vitro-Synthese von RNS von Chromatinmatrizen muß man mit geringen Salzkonzentrationen arbeiten, um eine Ausfällung des Chromatins zu vermeiden. RNS-Polymerase aus *E. coli* ist in diesem System besser zu verwenden als das Enzym aus *M. lysodeicticus*, das bei kleinen Salzkonzentrationen nicht stabil ist. Für die RNS-Synthese ist die Anwesenheit von Mg^{2+} und/oder Mn^{2+} erforderlich. In den Reaktionsgemischen verwendeten wir nur Mg^{2+} . Mn^{2+} ließen wir weg, weil einige Hinweise vorliegen^{8, 9, 10}, daß es möglicherweise die Synthese nichtspezifisch startet.

Das Fortschreiten der durch Chromatin aus Kälberthymus gestarteten RNS-Synthese unterscheidet sich von dem der durch Chromatin aus Rattenleber verursachten Synthese. Im ersten Fall fanden wir eine Konstanz der Synthesegeschwindigkeit bis zu mindestens 4 Std.

⁷ J. Paul und R. S. Gilmour, *J. Mol. Biol.* **34**, 305 (1968).

⁸ A. Stevens, *J. Biol. Chem.* **239**, 204 (1964).

⁹ N. Sternberger und A. Stevens, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **24**, 937 (1966).

¹⁰ B. F. C. Clarke und T. M. Jaouni, *J. Biol. Chem.* **240**, 3379 (1965).

Inkubationszeit, während im zweiten Fall die Geschwindigkeit nach einer Stunde abnahm. Die Gesamtsynthese von RNS durch Chromatin als Matrize ist etwa ein Drittel von der durch die entsprechende DNS gestarteten Synthese.

Tab. 1 und 2 zeigen den Einfluß von γ -Bestrahlung auf die Funktion des Chromatins als Matrize für die RNS-Synthese. Als Maß gilt die Inkorporation der vier Nukleosidvorläufer in das säurelösliche Produkt. Wir fanden, daß im Anfang die Starterfähigkeit der Chromatinmatrize durch γ -Bestrahlung etwas verstärkt wird. Bei höheren Dosen stellten wir eine Hemmung der Matrizenaktivität fest. Ähnliche Effekte traten beim Chromatin aus Kälberthymus und aus Rattenleber auf, wobei diese beim letzteren noch ausgeprägter waren.

Tabelle 1. Einfluß der γ -Strahlung auf die Primer-Fähigkeit von Rattenleberchromatin für die RNS-Synthese

Dosis krad	Menge inkorporiertes Nukleotid ($\mu\mu\text{Mol}/0,25\text{ ml}$)			
	AMP	UMP	GMP	CMP
0	1670	1530	1395	1180
5	1620	2035	2160	1330
10	2200	2170	2220	1770
15	2170	2100	2250	1490
20	1985	1790	1715	1330
40	1495	1190	940	775
80	1370	770	560	555

Das Reaktionsgemisch (0,25 ml) enthielt 10 μMol Trispuffer, pH 7,9, 3 μMol 2-Mercaptoäthanol, 2 μMol MgCl_2 , 0,25 μMol von jedem Nukleosidtriphosphat (unmarkiert), 0,06 μMol markierte Nukleosidtriphosphate (4 μe ^{14}C pro μMol oder 80 μe ^3H pro μMol) und etwa 5 Einheiten *E. coli*-Polymerase. 20 μg Chromatin wurden rasch mit den übrigen Reagentien vermischt, so daß eine feine Suspension entstand. Die Gemische wurden 3 Stdn.

Tabelle 2. Einfluß der γ -Strahlung auf die Primer-Fähigkeit von Kälberthymus-Chromatin für die RNS-Synthese

Dosis krad	Menge inkorporiertes Nukleotid ($\mu\mu\text{Mol}/0,25\text{ ml}$)			
	AMP	UMP	GMP	CMP
0	1900	1750	1520	1445
2,5	2340	1925	1790	1780
5	2180	1870	1725	1760
8	2155	1960	1770	1600
13	1950	1520	1380	1410
19	1910	1460	1250	1170
35	1550	1000	830	690

Die Reaktionsbedingungen sind, wie bei Tab. 1 beschrieben.

bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde durch Kühlen in Eis unterbrochen. 0,2 ml wurden auf Streifen von 3 MM Whatman-paper aufgebracht. Diese Streifen wurden in einem Büchnertrichter mit kalter 2proz. HClO₄ und dann mit Äthanol gewaschen. Die mit Äther getrockneten Streifen wurden mit einem Packard Tri-Carb-Szintillationszähler ausgezählt.

Es wurde berichtet^{11, 12}, daß die Matrizenaktivität des Chromatins verstärkt wird, wenn man den Tieren Hormone verabreicht oder die extrahierten Kerne mit Hormonen behandelt, während ein Hormonzusatz direkt zu dem isolierten Chromatin keinen Einfluß hat. Man erklärte diese Aktivierung des Chromatins als Vergrößerung der Zahl der auf der DNS zur Verfügung stehenden aktiven Zentren für die Transkription durch die RNS-Polymerase-Reaktion.

Kinetische Untersuchungen

Wir untersuchten die Geschwindigkeit der RNS-Synthese in Abhängigkeit von der Matrizenkonzentration und ermittelten aus doppelt-reziproken Darstellungen geschätzte Werte für die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und die Matrizenkonzentration für die halbmaximale Geschwindigkeit.

Bei dem vorliegenden System ändert sich die Matrizenkonzentration für halbmaximale Geschwindigkeit mit der Polymerasekonzentration^{13, 14} und kann daher nicht als direktes Maß für die Enzym—Substrat- (d. h. Matrizen-)Affinität angenommen werden. Es gibt mehrere Hinweise, daß die Assoziation der RNS-Polymerase mit der Matrize irreversibel ist^{15, 16, 17}.

In einer früheren Arbeit¹⁸ haben wir gezeigt, daß bei konstanter Enzymkonzentration die für halbmaximale Geschwindigkeit notwendige Matrizenkonzentration umgekehrt proportional der Anzahl der Stellen ist, die die RNS-Polymerase binden können.

Abb. 1 zeigt, daß eine Dosis von 10 krad an das Chromatin die maximale Reaktionsgeschwindigkeit um etwa 75% vergrößert, während

¹¹ J. Bonner, M. E. Dahmus, D. Fambrough, R. C. C. Huang, K. Marushige und D. Y. H. Tjan, *Science* **159**, 47 (1968).

¹² J. C. Madix und E. Bresnick, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **28**, 445 (1967).

¹³ K. Marushige und J. Bonner, *J. Mol. Biol.* **15**, 160 (1966).

¹⁴ W. B. Wood und P. Berg, *J. Mol. Biol.* **9**, 452 (1964).

¹⁵ P. Berg, R. D. Kornberger, H. Fancher und M. Diekmann, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **18**, 932 (1965).

¹⁶ C. F. Fox, R. I. Gumpert und S. B. Weiss, *J. Biol. Chem.* **240**, 2101 (1965).

¹⁷ H. Bremer und M. W. Konrad, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51**, 801 (1964).

¹⁸ J. P. Goddard, J. J. Weiss und C. M. Wheeler, *Biochim. Biophys. Acta*, **199**, 126, 139 (1970).

die Matrizenkonzentration für halbmaximale Geschwindigkeit die gleiche ist wie bei nichtbestrahltem Chromatin. Man kann daraus schließen, daß die verstärkte Matrizenaktivität *nicht* eine Folge der Vergrößerung der Anzahl der für die Transkription zur Verfügung stehenden Zentren ist.

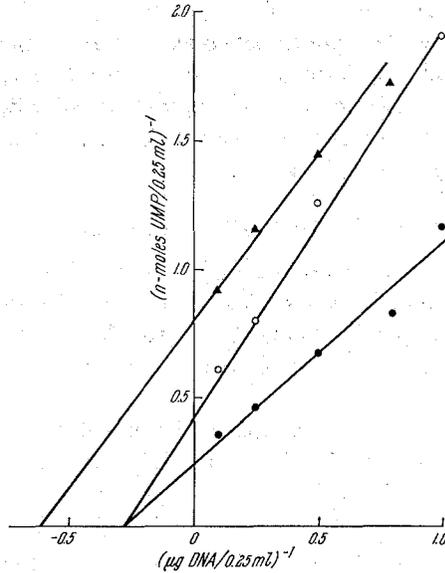


Abb. 1. Einfluß der Rattenleberchromatin-Konzentration auf die Geschwindigkeit der RNS-Synthese. ○: 0 krad, ●: 10 krad, ▲: 80 krad

Marushige und *Bonner*¹³ zeigten, daß die Matrizenkonzentration für halbmaximale Geschwindigkeit bei Rattenleberchromatin und Rattenleber-DNS gleich ist, was darauf hinweist, daß die Häufigkeit und Zugänglichkeit der Stellen, die die RNS-Polymerase binden können, in beiden gleich ist. Die Herabsetzung der Transkription beim Chromatin wird der Komplexbildung der chromosomalen Proteine, Histone und Nihthistone mit der DNS zugeschrieben, obwohl keine Sequenzspezifität bei der Histon—DNS-Wechselwirkung beobachtet werden konnte^{7, 19}.

Selektive Entfernung der Proteine durch steigende Salzkonzentrationen steigert die Starterfähigkeiten des Chromatins^{7, 13, 20}. Durch γ -Bestrahlung von Desoxyribonucleoprotein (DNP) werden zwar nur kleine Mengen Protein tatsächlich in Freiheit gesetzt, aber es wurde

¹⁹ *E. W. Johns* und *J. A. V. Butler*, *Nature* **204**, 853 (1964).

²⁰ *G. P. Georgiev*, *L. N. Ananieva* und *J. V. Kozlov*, *J. Mol. Biol.* **22**, 365 (1966).

gezeigt⁵, daß bestrahltes DNP leichter deproteiniert wird. Der plausibelste Grund für die verstärkte Matrizenaktivität von γ -bestrahltem Chromatin scheint also die Dissoziation eines Teils der chromosomalen Proteine, insbesondere der Histone, von der DNS zu sein.

Die bei höheren Dosen beobachteten Veränderungen dürften auf Schädigungen der DNS selbst zurückzuführen zu sein, die im Chromatin in einem gewissen Ausmaß durch die assoziierten Proteine bei geringeren Dosen geschützt ist²¹. Aus Abb. 1 sieht man, daß eine Dosis von 80 krad die maximale Geschwindigkeit um 40% verringert. Weiters nimmt die Matrizenkonzentration für halbmaximale Geschwindigkeit ab, was bedeutet, daß die Zahl der aktiven Zentren, die die RNS-Polymerase binden können, abnimmt, obwohl das an diese Zentren gebundene Enzym bei der RNS-Synthese inaktiv ist. Die gleichen Erscheinungen wurden an γ -bestrahlter DNS beobachtet^{22, 23, 24}.

Untersuchung der Basensequenz

Es wurde festgestellt, daß die Reihenfolge der Nukleotide in der synthetisierten RNS durch den DNS-Primer festgelegt ist^{25, 26}. Eine vollständige Analyse der nächsten Nachbarn²⁷ wurde durchgeführt, um die Basensequenz der von normalen und von bestrahlten Chromatinmatrizen synthetisierten RNS zu bestimmen. Die für die nächsten Nachbardinucleotidpaare erhaltenen Werte der von Rattenleberchromatin synthetisierten RNS sind in Tab. 3 enthalten.

Die Reaktionsgemische waren bei Tab. 1 beschrieben. Jedes enthielt 5 μ c von jedem einzelnen α -³²P-markierten Nukleosidtriphosphat (80 μ c/Mol). Nach einer Inkubationsdauer von 3 Stdn. bei 37° wurden 1 ml kalte 2proz. HClO₄ und 0,8 mg RNS als Träger zugesetzt. Der Niederschlag von RNS wurde mit kalter 2proz. HClO₄ und dann mit Äthanol gewaschen; schließlich wurde er mit Äther getrocknet. Es wurden weitere 0,8 mg RNS als Träger zugesetzt. Dann wurde die RNS mit 0,3M-KOH innerhalb von 18 Stdn. bei 37° zu den 2',3'-Mononukleotiden abgebaut. Nach dem Neutralisieren wurden die Nukleotide in einem 0,05M-Formiatpuffer, pH 3,7, durch Elektrophorese bei 3000 V innerhalb von 2½ Stdn. getrennt. Die Banden wurden mit UV-Licht identifiziert, ausgeschnitten und mit einem Szintillationszähler bestimmt.

²¹ G. Scholes, *Progr. Biophys. & Mol. Biol.* **13**, 98 (1963).

²² F. K. Zimmerman, H. Kröger und T. Lücking, *Biochem. Z.* **342**, 115 (1965).

²³ H. Harrington, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **51**, 59 (1964).

²⁴ J. J. Weiss und C. M. Wheeler, *Biochim. Biophys. Acta* **145**, 68 (1967).

²⁵ S. B. Weiss und T. Nakamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **47**, 694 (1961).

²⁶ S. B. Weiss und T. Nakamoto, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **47**, 1400 (1961).

²⁷ J. Josse, A. D. Kaiser und A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **236**, 864 (1961).

Tabelle 3. Nachbarbasenhäufigkeit in von Rattenleber-Chromatinmatrizen synthetisierter RNS

Nachbarbasen-Sequenz	Rattenleberchromatinprimer							
	0 krad		10 krad		15 krad		80 krad	
ApA, UpU	0,097	0,086	0,104	0,082	0,103	0,082	0,124	0,079
CpA, UpG	0,066	0,071	0,062	0,069	0,062	0,069	0,051	0,063
GpA, UpC	0,073	0,062	0,073	0,056	0,074	0,056	0,071	0,054
CpU, ApG	0,071	0,074	0,074	0,073	0,068	0,076	0,073	0,079
GpU, ApC	0,061	0,051	0,061	0,051	0,061	0,052	0,059	0,056
GpG, CpC	0,058	0,054	0,058	0,063	0,057	0,061	0,060	0,060
UpA	0,049		0,047		0,047		0,041	
ApU	0,066		0,068		0,073		0,073	
CpG	0,012		0,012		0,012		0,012	
GpC	0,048		0,046		0,046		0,045	

Aus der berechneten Basenzusammensetzung sieht man, daß die Korrespondenz der Basenpaare etwas mangelhaft ist, da Adenin nicht gleich Uracil und Guanin nicht gleich Cytosin ist⁴ (Tab. 1).

Shalka, Fowler und *Hurwitz*⁴ untersuchten die Häufigkeitsverteilung der nächsten Nachbarn in einer von einem Rattenleber-DNS-Primer unter Bedingungen der Hemmung durch Histone synthetisierten DNS und fanden, daß sie ungleiche Mengen von Adenin und Uracil bzw. Guanin und Cytosin enthielt. Als Ursache hierfür nahmen sie ungleiche Kopierung der Komplementärsequenz des DNS-Primers an. *Marushige* und *Bonner*¹³ kamen zu ähnlichen Schlüssen bei Inkorporierungsversuchen an Rattenleberchromatin, und erklärten sie als Folge asymmetrischer Transkription.

Einige Veränderungen der Basenpaare der von γ -bestrahltem Chromatin synthetisierten DNS sind offensichtlich (Tab. 3), so eine größere Abweichung in der relativen Häufigkeit der Basenpaare von ApA, UpU. Diese Veränderungen spiegeln sich in der Zusammensetzung der synthetisierten RNS wider, in der das Verhältnis Adenin zu Uracil verändert ist, während das von Guanin zu Cytosin weniger stark beeinflusst wird. Man kann daraus schließen, daß das Adenin—Thymin-Basenpaar der DNS der Chromatinmatrix leichter durch γ -Strahlung geschädigt wird. Eine Untersuchung des Einflusses von γ -Bestrahlung auf Desoxyribonucleinsäuren verschiedener Basenzusammensetzung zeigte, daß die Strahlenempfindlichkeit mit abnehmendem Adenin—Thymin-Gehalt sinkt²⁸. Die Veränderung der Basensequenz, die bei der Analyse von RNS, die von DNS-Matrizen verschiedener Herkunft synthetisiert worden waren, festgestellt wurde²³, zeigt, daß die Produkte der Bestrahlung

²⁸ *A. Rafi, J. J. Weiss* und *C. M. Wheeler*, *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 230 (1968).

purindirigierend sind; solche Veränderungen müßten das Verhältnis Adenin zu Uracil beeinflussen.

Weiss und *Wheeler*²⁹ fanden in früheren Arbeiten über die Primerfähigkeit von bestrahltem Kälberthymus-DNP eine anfängliche Abnahme dieser Fähigkeit, der bei höheren Dosen eine Verstärkung folgte, während *Lloyd*, *Nicholson* und *Peacocke*³⁰ durchwegs eine Abnahme feststellten. Diese Untersuchungen wurden mit DNP durchgeführt, das im wesentlichen nach der Methode von *Zubay* und *Doty*³¹ erhalten wurde. Bei dieser Darstellung ist die DNS von Histonen begleitet, aber frei von Nihthiston-proteinen. Solche Unterschiede zwischen früheren Ergebnissen und den von uns hier erhaltenen rühren wahrscheinlich von verschiedenen Herstellungsmethoden der verwendeten Chromatine her. Jedenfalls war Chromatin in allen Fällen widerstandsfähiger gegen Strahlung als die DNS. Zur vollständigen Erklärung der Einflüsse von γ -Strahlung auf Chromatin und seine Funktion als Matrix für die RNS-Synthese muß man eine Aufklärung der Rolle abwarten, die die chromosomalen Proteine und die mit der DNS assoziierten RNS bei der Regulierung der Transkription spielen.

Diese Forschungsarbeit wurde von der Nuffield Foundation und dem Northern Council of the British Empire Cancer Campaign for Research unterstützt. Beiden Organisationen sei an dieser Stelle gedankt.

²⁹ *J. J. Weiss* und *C. M. Wheeler*, *Nature* **203**, 291 (1964).

³⁰ *P. H. Lloyd*, *B. H. Nicholson* und *A. R. Peacocke*, *Biochem. J.* **104**, 999 (1967).

³¹ *G. Zubay* und *P. Doty*, *J. Mol. Biol.* **1**, 1 (1959).