

Die Bildung von N-Formyl-methionyl-puromycin in Honigbienen, *Apis mellifera*

Von

Gertrude Kreil-Kiss und Günther Kreil

Aus dem Institut für Chemie der Hochschule für Bodenkultur
und dem Institut für Molekularbiologie der Österreichischen Akademie
der Wissenschaften, Wien

Mit 2 Abbildungen

(Eingegangen am 5. Februar 1970)

Es wird gezeigt, daß intakte Honigbienen nach Injektion von Puromycin und radioaktivem Methionin N-Formyl-methionyl-puromycin synthetisieren. Die Substanzen wurden dabei in das Abdomen oder in den Thorax injiziert, wobei letzteres die besseren Ausbeuten ergab. Durch eine Reihe von Kontrollexperimenten konnte die mögliche Beteiligung von Mikroorganismen an der beobachteten Bildung dieses Puromycinderivats zumindest sehr unwahrscheinlich gemacht werden. Diese Resultate werden vor allem in Hinblick auf die derzeitige Hypothese, daß N-Formyl-methionyl-*tRNA* das Kettenstartsignal der mitochondrialen Proteinsynthese ist, diskutiert.

The Formation of N-Formyl-methionyl-puromycin in the Honey Bee, Apis Mellifera

The synthesis of N-formyl-methionyl-puromycin has been demonstrated in honey bees injected with a solution containing puromycin and radioactive methionine. Injections were made either into the abdomen or into the thorax, the latter procedure giving better yields. A number of control experiments make it very unlikely that microorganisms contribute to any extent to the observed formation of this puromycin derivative in bees. The results are discussed with particular reference to the current hypothesis that mitochondrial protein synthesis uses N-formyl-methionyl-*tRNA* as a chain initiator.

Vergleichende Untersuchungen über die Biosynthese von Proteinen in verschiedenen Organismen führten zu der Erkenntnis, daß dieser im Prinzip immer gleich verlaufende Prozeß in zwei Varianten vorkommt. Ein einfaches Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Typen ist die Größe der Ribosomen, an denen die Synthese abläuft: in Bakterien findet man Ribosomen, die mit 70 s sedimentieren, während im Cyto-

plasma eukaryoter Zellen nur 80-s-Ribosomen vorkommen. Ein weiterer Unterschied zeigte sich bei Untersuchungen über jene Reaktionsschritte, die zu Beginn der Bildung einer neuen Polypeptidkette ablaufen. Die von Marcker und Sanger¹ in *Escherichia coli* entdeckte N-Formyl-Methionyl-*tRNA* (*F-Met-tRNA*) ist wahrscheinlich das universelle Kettenstart-Signal der bakteriellen Proteinbiosynthese. Andererseits konnte eine Beteiligung der *F-Met-tRNA* bei der Proteinsynthese an 80-s-Ribosomen nicht nachgewiesen werden. Der Mechanismus des Kettenstarts ist in diesem Fall noch nicht bekannt.

Am Aufbau der Mitochondrien und auch der Chloroplasten scheinen beide Arten der Proteinsynthese beteiligt zu sein. Diese subzellulären Organellen können einen Teil ihrer Proteine selbst synthetisieren, und zwar nach einem Mechanismus, der dem in Bakterien gefundenen ähnlich ist, wenn auch die experimentellen Daten noch nicht ausreichen, das Ausmaß dieser Analogie zu präzisieren (siehe Übersichtsreferate in ²). Was den Kettenstart betrifft, so scheint *F-Met-tRNA* bei der Proteinbiosynthese der Chloroplasten von *Euglena* beteiligt zu sein³. Kürzlich konnte diese Substanz auch in Mitochondrien aus Hefe, Rattenleber und HeLa-Zellen nachgewiesen werden^{4, 5}.

Die Untersuchungen über den Kettenstart der bakteriellen Proteinbiosynthese wurden durch eine von Bretscher und Marcker⁶ entdeckte Modellreaktion sehr erleichtert. Wie diese Autoren zeigten, kann *F-Met-tRNA* in Gegenwart von 70-s-Ribosomen und einer geeigneten Messenger-*RNA* mit dem Antibiotikum Puromycin reagieren, wobei N-Formyl-methionylpuromycin gebildet wird. Diese Reaktion kann auch *in vivo* beobachtet werden: inkubiert man intakte Bakterien mit Puromycin und radioaktivem Methionin, so synthetisieren diese *F-Met-puromycin*⁷. Da Puromycin die Proteinbiosynthese nicht nur in Bakterien, sondern auch in eukaryoten Zellen hemmt, haben wir nun versucht, diese einfache Reaktion auch in intakten höheren Organismen zu studieren. Unter geeigneten Versuchsbedingungen sollte jedes Kettenstart-Molekül von der Art der in Bakterien gefundenen *F-Met-tRNA* ein entsprechendes Puromycin-Derivat bilden.

¹ K. A. Marcker und F. Sanger, *J. Mol. Biol.* **8**, 835 (1964).

² E. C. Slater, J. M. Tager, S. Papa und E. Quagliariello (Herausgeber), *Biochemical Aspects of the Biogenesis of Mitochondria*, Adriatica Editrice, Bari (1968).

³ J. H. Schwartz, R. Meyer, J. M. Eisenstadt und G. Brawerman, *J. Mol. Biol.* **25**, 571 (1967).

⁴ A. E. Smith und K. A. Marcker, *J. Mol. Biol.* **38**, 241 (1968).

⁵ J. G. Galper und J. E. Darnell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **34**, 205 (1969).

⁶ M. S. Bretscher und K. A. Marcker, *Nature* **211**, 380 (1966).

⁷ H. Bachmayer und G. Kreil, *Biochim. Biophys. Acta* **169**, 95 (1968).

Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Reihe von Experimenten über die Bildung von *F-Met*-Puromycin in intakten Honigbienen, *Apis mellifera*. Einige dieser Resultate wurden bereits präsentiert⁸.

Materialien und Methoden

Verwendete Substanzen

Puromycin-di-hydrochlorid wurde von der Nutritional Biochemicals Corp. (Cleveland, Ohio), Methyl-³H-puromycin von der New England Nuclear Corp. (Boston, Mass.) gekauft. ³⁵S-Methionin, ¹⁴C-Formiat sowie alle anderen radioaktiven Substanzen stammen vom Radiochemical Centre (Amersham, England). Die Synthese von *F-Met*-puromycin erfolgte durch Kondensation von N-Formyl-methionin und Puromycin (freie Base) mittels Dicyclohexyl-carbodiimid in absolutem Dimethylformamid. Eine weitere Reinigung des Kondensationsproduktes erfolgte nicht.

Injektionsbedingungen

Die Honigbienen stammten von Wiener Bienenzüchtern und wurden stets am Tag der Entnahme aus dem Stock verwendet. Das Injektionsmedium enthielt verschiedene Mengen Puromycin-di-hydrochlorid und radioaktives Formiat oder eine radioaktive Aminosäure. Durch Zugabe von KOH wurde ein pH von etwa 6,5 eingestellt. Mit einer 10- μ l-Hamiltonspritze wurden jeder Biene 2—3 μ l dieser Lösung entweder zwischen die Abdominalsegmente oder lateral in den Thorax injiziert. Anschließend wurden die Tiere 20 bis 180 Min. bei 30° gehalten, sodann auf Trockeneis eingefroren und bis zur Weiterverarbeitung unter 0° gelagert.

Extraktion der Puromycinderivate

Die Zerkleinerung der Bienen erfolgte in 0,1*m*-Natriumacetat-Puffer (pH 4,8; 1,5 ml pro Insekt) mit einem Ultra-Turrax (*Janke-Kunkel*, Deutschland). Der pH des entstehenden Homogenates lag zwischen 5,0 und 5,8. Nach Zugabe von unmarkiertem *F-Met*-puromycin als Träger wurde die Suspension dreimal mit einem gleichen Volumen Essigester extrahiert⁹, die vereinigten Extrakte eingedampft und der Rückstand zweimal mit 5 ml 20proz. Methanol bei pH 2,5 reextrahiert. Durch die Re-extraktion kann man die Puromycinderivate von der Hauptmenge der im Essigester vorhandenen Lipide abtrennen.

Identifizierung der Puromycinderivate

Das in 20proz. Methanol lösliche Material wurde eingengt und mittels Hochvoltektrophorese auf Whatman 3MM-Papier bei einem pH von 1,8 (1*m*-Essigsäure, eingestellt mit konz. HCOOH) fraktioniert. Lokalisieren kann man das als Träger zugesetzte *F-Met*-puromycin auf dem getrockneten Pherogramm unter einer UV-Lampe. Das Pherogramm wurde dann in 1,5 bis 2 cm breite Zonen zerschnitten und deren Radioaktivität in einem

⁸ G. Kreil-Kiss und G. Kreil, Abstracts, 5th Meeting of the Federation of European Biochemical Societies, Prag 1968, p. 33.

⁹ P. Leder und H. Bursztyn, Biochem. Biophys. Res. Commun. **25**, 233 (1966).

Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt. Nach Elution des mit dem synthetischen *F-Met*-puromycin wandernden radioaktiven Materials wurde dieses weiter charakterisiert. Die selektive Abspaltung der N-Formyl-Gruppe erfolgte durch Behandeln mit 0,1*m*-methanol. HCl bei 37°. Das entstehende Methionyl-puromycin konnte wieder mittels Papierelektrophorese bei pH 1,8 und 3,5 identifiziert werden. Einzelheiten über diese Aufarbeitung wurden bereits in einer anderen Arbeit veröffentlicht⁷, wobei wir den Methoden von *Bretscher*¹⁰ und von *Leder et al.*⁹ folgten. In einigen Fällen wurden die Puromycinderivate auch durch Papierchromatographie in Butanol/Eisessig/Wasser (4/1/5, v/v/v) charakterisiert.

Ergebnisse

Versuche mit markiertem Formiat

Zunächst untersuchten wir den Einbau von radioaktivem Formiat in Puromycinderivate (Tab. 1). Mit steigender Konzentration von Puromycin im Injektionsmedium stieg auch die Radioaktivität jener Fraktionen, die das synthetische, als Trägermaterial zugesetzte *F-Met*-puromycin enthielten. Weiters konnte gezeigt werden, daß dieses radioaktive Material auch die für Verbindungen vom Typ des *F-Met*-puromycins charakteristische Labilität gegen verdünnte Säure aufwies. Nach Inkubation in 0,1*m*-HCl in Methanol bei 37° waren 70 bis 80% der Radioaktivität flüchtig (Probe B und C in Tab. 1). Diese Resultate machen wahrscheinlich, daß in Bienen nach Injektion von Puromycin und radioaktivem Formiat eine Substanz gebildet wird, die sich hinsichtlich Extrahierbarkeit, elektrophoretischer Mobilität und Spaltbarkeit durch verd. Säuren wie *F-Met*-puromycin verhält.

Tabelle 1. Einbau von ¹⁴C-Formiat in Derivate des Puromycins

Probe	mg Puromycin/ 50 µl Medium	Cpm im <i>F-Met</i> - puromycin	Cpm nach Hydrolyse	
			flüchtig	nicht flüchtig
A	0	240	30	210
B	1	1210	840	370
C	4	3140	2450	690

In je 20 Bienen wurden insgesamt 50 µl Medium injiziert, das 20 µC ¹⁴C-Formiat (spezif. Akt. 43 µC/µMol) und 0, 1 oder 4 mg Puromycin-dihydrochlorid enthielt. Nach der Papierelektrophorese bei pH 1,8 wurde zunächst die Radioaktivität jener Fraktionen bestimmt, in denen das synthetische N-Formyl-methionyl-puromycin wandert. Diese Fraktionen wurden eluiert und weiterverarbeitet. Der Gehalt an N-Formylgruppen ergab sich aus der Abnahme der Radioaktivität nach Hydrolyse der Probe in methanol. HCl. In allen Fällen war ein Teil des radioaktiven Materials auch nach der partiellen Hydrolyse nicht flüchtig. Es ist nicht bekannt, um welche Verbindungen es sich hierbei handelt.

¹⁰ *M. S. Bretscher*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **31**, 289 (1966).

Versuche mit markiertem Methionin

Ähnliche Resultate erhielten wir mit Bienen, denen Puromycin und radioaktives Methionin injiziert wurden. Bei einem typischen Experiment dieser Art enthielt das Injektionsmedium 7 mg Puromycin-dihydrochlorid und 200 μC ^{35}S -Methionin (spezif. Akt. 100 $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$) in 0,1 ml. Je 2—3 μl dieser Lösung wurden insgesamt 15 Bienen injiziert. Nach 1stdg. Inkubation bei 30° wurden die Bienen homogenisiert und

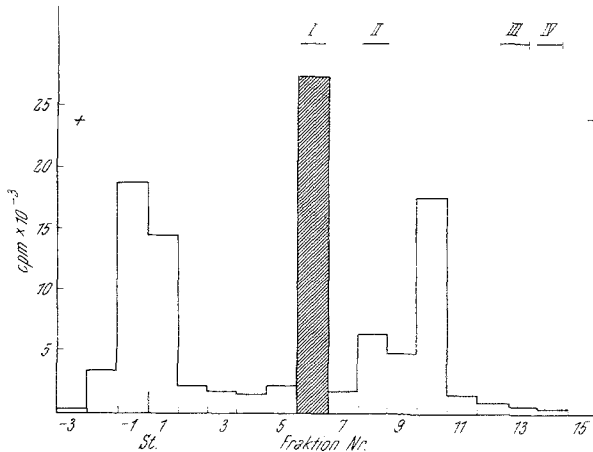


Abb. 1. Fraktionierung des Extrakts mittels Hochvoltektrophorese bei pH 1,8 (40 V/cm, 80 Min., Whatman 3MM-Papier). Abszisse: Je 2 cm breite Streifen, vom Start (St) beginnend nummeriert. Ordinate: Radioaktivität der einzelnen Fraktionen in Imp. pro Min. $\cdot 10^{-3}$. Vergleichssubstanzen: I = *F-Met-puromycin*, II = Methionin, III = *Met-puromycin*, IV = Puromycin

wie beschrieben aufgearbeitet. Die Verteilung der Radioaktivität am Pherogramm ist in Abb. 1 gezeigt, wobei ein deutlicher Gipfel in jener Fraktion auftrat, die das synthetische *F-Met-puromycin* enthielt. Diese Fraktion wurde eluiert, mit methanol. HCl behandelt und dann neuerlich bei pH 1,8 hochvoltektrophoretisch aufgetrennt. Insgesamt 19 600 cpm, das sind etwa 0,08% der eingesetzten Aktivität, zeigen das gleiche elektrophoretische Verhalten wie synthetisches *Met-puromycin* (Abb. 2). Auch bei der Papierelektrophorese bei pH 3,5 und papierchromatographisch verhält sich die radioaktive Substanz wie *Met-puromycin*.

Parallel dazu wurde ein Experiment durchgeführt, bei dem unter sonst gleichen Versuchsbedingungen nur ein Zehntel der Puromycinmenge (0,7 mg/0,1 ml) eingesetzt wurde. Die Ausbeute an radioaktivem *Met-puromycin* betrug in diesem Fall nur 2800 cpm, also ungefähr ein Siebentel des obigen Wertes.

Ein Doppelmarkierungsexperiment mit ^3H -Puromycin und ^{35}S -Methionin (0,7 mg Puromycin-dihydrochlorid, 100 μC ^3H -Puromycin, 100 μC ^{35}S -Methionin pro 0,1 ml Injektionsmedium) ergab außerdem, daß bei der Elektrophorese beide Markierungen zunächst in der *F-Met*-puromycin-Fraktion, nach der Deformylierung sodann in der *Met*-puromycin-Fraktion auftraten. Aus den angeführten Resultaten läßt sich der Schluß ziehen, daß in intakten Bienen nach Injektion von Puromycin und Methionin N-Formylmethionyl-puromycin gebildet wird.

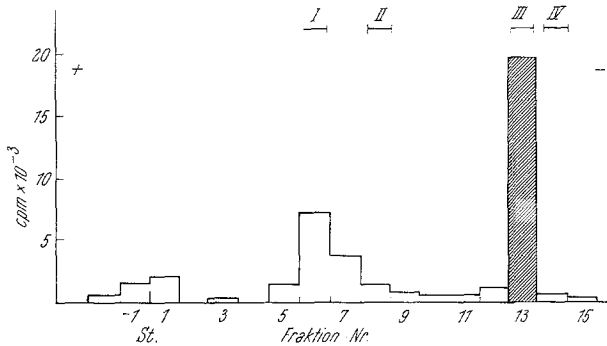


Abb. 2. Re-Elektrophorese der Fraktion 6 aus Abb. 1. Diese Fraktion wurde eluiert, 90 Min. in 0,1*m*-methanol. HCl bei 37° inkubiert und wieder bei pH 1,8 elektrophoretisch aufgetrennt. Abszisse, Ordinate und Vergleichssubstanzen wie in Abb. 1

Bei den meisten Experimenten wurde die Lösung zwischen die Abdominalsegmente injiziert. Später zeigte sich aber, daß bei Injektion in den Thorax der Einbau von Methionin in *F-Met*-puromycin unter sonst gleichen Bedingungen bis auf das Doppelte ansteigt. In einigen Fällen wurden auch Köpfe, Thoraces und Abdomina der Bienen getrennt aufgearbeitet. *F-Met*-puromycin konnte in allen Teilen nachgewiesen werden, doch fand sich der Hauptanteil immer in jenem Segment, in das injiziert worden war. Bei einem Experiment, bei dem in den Thorax injiziert worden war, war das gebildete *F-Met*-puromycin folgendermaßen verteilt: 71% in den Thoraces, 20% in den Hinterleibern und 9% in den Köpfen.

Hinsichtlich der Menge des gebildeten *F-Met*-puromycins traten bei verschiedenen Experimenten große Schwankungen auf. Der Einbau an markiertem Methionin lag zwischen 0,01 und 0,5% der eingesetzten Radioaktivität. Berücksichtigt man die spezif. Aktivität des eingesetzten Methionins, so kann ein Minimalwert für die Menge an synthetisiertem *F-Met*-puromycin berechnet werden. Bei dem oben angeführten Experiment entspricht der Einbau von 0,08% des eingesetzten Methio-

nins ungefähr 0,5 Millimikromolen *F-Met*-puromycin. Die tatsächlich gebildete Menge liegt sicher beträchtlich höher, da das injizierte Methionin durch unmarkiertes Methionin in der Biene verdünnt wird, was aber rechnerisch nicht erfaßt wurde.

Kontrollexperimente

In einer vorhergehenden Arbeit war gezeigt worden, daß intakte Bakterien *F-Met*-puromycin synthetisieren können⁷. Es war daher besonders wichtig, eine bakterielle Herkunft des in intakten Bienen gebildeten *F-Met*-puromycins auszuschließen. Dabei mußten vor allem eine bakterielle Infektion während der Injektion und eine Beteiligung der Darmflora an der beobachteten Synthese als mögliche Fehlerquellen in Betracht gezogen werden. Folgende Kontrollexperimente wurden durchgeführt, um diese Möglichkeiten auszuschließen: 1. Bienen wurden vor der Injektion mehrere Stunden mit starkem UV-Licht bestrahlt, um ihre Oberfläche keimfrei zu machen. Durch diese Bestrahlung wurden die Insekten außerordentlich stimuliert und die Ausbeute an *F-Met*-puromycin lag durchwegs etwas höher als bei nicht bestrahlten Tieren. 2. Bienen wurden durch rasches Einfrieren in flüssigem Stickstoff getötet, langsam wieder auf Zimmertemp. gebracht und dann für das Injektionsexperiment verwendet. Diesen Kälteschock überleben die meisten Bakterien, und tatsächlich konnte nach Inkubation des Darminhaltes solcher durch Einfrieren getöteter Bienen in einem Nährmedium aus Hefeextrakt, Glucose und Salzen innerhalb einer Zehnerpotenz die gleiche Zahl an Keimen gefunden werden wie in den Därmen nicht kältebehandelter Bienen. Während aber beim vorher angeführten Experiment 19 600 cpm in der *Met*-puromycin-Fraktion gefunden wurden, lag beim Kontrollexperiment mit den durch Einfrieren getöteten Bienen der Einbau an Radioaktivität in diese Fraktion unter 100 cpm. Auch bei Verlängerung der Inkubationsdauer bis zu 18 Stunden nach der Injektion konnten in den toten Bienen keinerlei *F-Met*-puromycin gefunden werden. 3. Unmittelbar nach der Injektion wurde Bienen der Hauptteil des Darmes zusammen mit dem Stechapparat und der Giftdrüse exstirpiert. In diesen verstümmelten Tieren werden noch 50 bis 70% des in ganzen Bienen gefundenen *F-Met*-puromycins gebildet.

Versuche mit Chloramphenicol

Das Antibiotikum Chloramphenicol blockiert die bakterielle und die mitochondriale Proteinbiosynthese^{11, 12} und hemmt außerdem die Bildung von *F-Met*-puromycin in intakten Bakterien⁷. Wir haben daher

¹¹ A. M. Kroon, Biochim. Biophys. Acta **72**, 391 (1963).

¹² E. Wintersberger, Biochem. Z. **341**, 409 (1964).

den Einfluß von Chloramphenicol auf die Bildung von *F-Met*-puromycin in Bienen untersucht. Bei diesen Experimenten enthielt das Injektionsmedium neben Puromycin und radioaktivem Methionin auch noch verschiedene Mengen Chloramphenicol. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, konnte keinerlei Hemmwirkung dieses Antibiotikums beobachtet werden. Bei zwei von insgesamt vier Experimenten fanden wir in Gegenwart von Chloramphenicol sogar eine Stimulierung der *F-Met*-puromycin-Synthese. In Tab. 2 findet sich auch das Resultat eines Experimentes mit Cycloheximid, das die cytoplasmatische, nicht aber die mitochondriale Proteinbiosynthese hemmt. Auch diese Substanz hat auf die Bildung von *F-Met*-puromycin in Bienen keinen Einfluß.

Tabelle 2. Der Einfluß von Chloramphenicol und Cycloheximid auf die Bildung von *F-Met*-puromycin

Probe	Chloramphenicol ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)	Cycloheximid ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)	Ausb., (%)
1	—	—	0,063
2	20	—	0,069
3	100	—	0,066
4	—	—	0,084
5	—	37	0,093

Das Injektionsmedium enthielt pro $100 \mu\text{l}$ 7 mg Puromycin, $20 \mu\text{C}$ ^{35}S -Methionin und die angegebene Menge des zweiten Antibiotikums. Die Ausb. war jener Teil der Radioaktivität (in %), der nach Deformylierung des isolierten *F-Met*-puromycins bei der Elektrophorese wie *Met*-puromycin wandert.

Versuche über die Bildung anderer N-Formyl-aminoacyl-puromycine

Unter Anwendung der gleichen Methodik haben wir versucht, Puromycinderivate anderer Aminosäuren als Methionin zu finden. Wir waren besonders an der möglichen Bildung von N-Formyl-glycyl-puromycin interessiert, da im Melittin, einem Polypeptid aus Bienengift, N-Formyl-glycin gefunden worden war¹³. Puromycin und hohe Dosen ^{14}C -Glycin wurden in Bienen injiziert und diese dann in gleicher Weise wie bei den Experimenten mit Methionin aufgearbeitet. Bei einigen Versuchen konnten geringe Mengen (etwa $10^{-3}\%$) des injizierten Glycins in jener elektrophoretischen Fraktion gefunden werden, die das synthetische N-Formyl-glycyl-puromycin enthielt. Infolge der geringen Ausbeute war eine weitere Charakterisierung der Substanz aber nicht möglich.

¹³ G. Kreil und G. Kreil-Kiss, Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 275 (1967).

Bei analogen Experimenten mit anderen radioaktiven Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin) konnte in keinem Fall die Bildung des entsprechenden N-Formyl-aminoacylpuromycins beobachtet werden. Die von uns verwendete Aufarbeitungsmethode würde aber ggf. gebildete N-Acetylderivate dieses Typs nicht erfassen.

Diskussion

Die Hemmung der Proteinbiosynthese durch Puromycin kann sowohl in zellfreien Extrakten als auch in intakten Zellen beobachtet werden. Wir haben daher angenommen, daß sich dieses Antibiotikum generell für *in vivo*-Untersuchungen über den Kettenstartmechanismus bei der Proteinbiosynthese eignen würde. Es ist nämlich zu erwarten, daß unter entsprechenden Versuchsbedingungen Puromycin zunächst die wachsenden Polypeptidketten von den Ribosomen unter Bildung von Peptidyl-puromycinen ablöst¹⁶. Falls die intracelluläre Konzentration des Antibiotikums aber genügend groß ist, so sollte jede weitere Proteinsynthese bereits unmittelbar nach dem Start einer neuen Peptidkette abgebrochen werden. Experimente mit intakten Bakterien, bei denen die Synthese von N-Formyl-methionyl-puromycin aus den Komponenten beobachtet wurde, haben dies bestätigt. Im übrigen ist diese Übertragung des N-Formyl-methionins von einer spezifischen *tRNA* auf das Antibiotikum Puromycin ein der Biosynthese einer Peptidbindung weitgehend analoger Vorgang^{6, 10, 14, 15}.

Die vorliegende Arbeit berichtet über unsere Versuche, diese Methode an komplexeren Systemen auszutesten. Wir haben dabei Honigbienen als Versuchstiere gewählt, weil wir aus Untersuchungen über die Biosynthese des Giftes dieser Insekten bereits wußten, daß diese *in vivo* einen raschen Einbau radioaktiver Aminosäuren in Proteine zeigen. Tatsächlich konnte die Bildung signifikanter Mengen von *F-Met*-puromycin in intakten Bienen, denen Puromycin und radioaktives Methionin injiziert worden war, beobachtet werden. Die Identifizierung dieser Substanz ergab sich zunächst aus der Beobachtung, daß sowohl ¹⁴C-Formiat als auch ³⁵S-Methionin und ³H-Puromycin eingebaut worden waren. Die Verbindung verhält sich außerdem elektrophoretisch und chromatographisch wie synthetisches N-Formyl-methionyl-puromycin und nach ihrer Deformylierung mit verd. Säure wie Methionyl-puromycin.

¹⁴ A. Zamir, P. Leder und D. Elson, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **56**, 1794 (1966).

¹⁵ M. A. Mukundan, J. W. B. Hershey, K. F. Dewey und R. E. Thach, Nature **217**, 1013 (1968).

¹⁶ D. Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. **51**, 585 (1964).

Unser besonderes Augenmerk galt der Möglichkeit, daß das gefundene *F-Met*-puromycin bakteriellen Ursprungs sein könnte. Durch Kontrollexperimente mit durch UV-Licht sterilisierten und mit durch flüssigen Stickstoff getöteten Bienen konnten zunächst von außen eingeschleppte Bakterien ausgeschlossen werden. Gegen eine Beteiligung der Darmbakterien der Bienen an der beobachteten Synthese sprechen folgende Resultate: 1. *F-Met*-puromycin wird in allen Teilen der Biene gefunden. Wurde aber beispielsweise die Injektion in den Thorax verabreicht, so fanden wir nur etwa ein Fünftel des gesamten *F-Met*-puromycins im Abdomen, obwohl sich dort die Hauptmenge des Darms befindet. 2. Nach Exstirpation des Hauptteiles des Darms erniedrigt sich die Ausbeute an *F-Met*-puromycin nur um 30 bis 50%. 3. Chloramphenicol hemmt die Bildung von *F-Met*-puromycin in intakten Bakterien, zeigt diesen Effekt jedoch nicht in den Bienen. 4. Bienen, die durch rasches Einfrieren in flüssigem Stickstoff getötet worden waren, synthetisierten kein *F-Met*-puromycin. Eine Keimzahlbestimmung an Därmen zeigte, daß zwischen 10 und 90% der dort ansässigen Mikroorganismen das Einfrieren überlebten. Diese Resultate machen eine signifikante Beteiligung von Bakterien an der beobachteten Synthese von *F-Met*-puromycin äußerst unwahrscheinlich.

Wir schließen daraus, daß auch in Bienen zumindest bei einem Teil der Proteinbiosynthese *F-Met-tRNA* als Kettenstarter fungiert. Diese Untersuchungen waren bereits abgeschlossen, als von anderen Autoren der Nachweis erbracht wurde, daß *F-Met-tRNA* in Mitochondrien von Hefe, Rattenleber und HeLa-Zellen vorkommt^{4, 5}. Es erscheint uns somit denkbar, daß die Bildung von *F-Met*-puromycin in Bienen auf eine Hemmung der mitochondrialen Proteinbiosynthese durch dieses Antibiotikum zurückzuführen ist. Damit steht auch unsere Beobachtung im Einklang, wonach im Thorax mehr *F-Met*-puromycin als im Abdomen synthetisiert wird, da ersterer besonders reich an Mitochondrien ist. Weitere Hinweise über den subzellulären Bildungsort dieser Verbindung sollten Versuche mit Chloramphenicol bringen, das speziell die mitochondriale Proteinsynthese hemmt. Aus bisher ungeklärten Gründen wird jedoch die Bildung von *F-Met*-puromycin in Bienen durch Chloramphenicol nicht beeinträchtigt.

Teile dieser Arbeit wurden vom National Institute of Health, Bethesda, USA (Grant 1 RO5 TWOO 198), und vom Fonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung in Österreich (Stipendium Nr. 548) finanziert.