

P¹, P³-(5'-Guanosyl-5''-[¹⁴C]adenosyl) triphosphat: Darstellung der Kappenmutterverbindung sowie deren Abbauverhalten gegenüber subzellulären Fraktionen der Rattenleberzelle

P¹, P³-(5'-Guanosyl-5''-[¹⁴C]adenosyl) triphosphate:
Preparation of the Cap Parent Compound and Its Catabolic Properties
towards Rat Liver Subcellular Fractions

Siegmar Bornemann und Eckhard Schlimme

Laboratorium für Biologische Chemie im Fachgebiet Organische Chemie der Universität,
Gesamthochschule, Paderborn, Warburger Straße 100, Bauteil J, D-4790 Paderborn

Z. Naturforsch. 35 c, 57–64 (1980); eingegangen am 12. September/12. November 1979

P¹, P³-(5'-Guanosyl-5''-[¹⁴C]adenosyl) triphosphate, Cap, Rat liver Cell Components, Nuclei,
Mitochondria

We report on the chemical preparation of ¹⁴C-labeled P¹, P³-(5'-guanosyl-5''-adenosyl) triphosphate (**1**) which is the parent compound of 5'-terminal cap structures of most eukaryotic mRNAs.

Incubation experiments of cap (**1**)- and non cap-structured nucleotides as Ap₂A (**2**) as well as their ribose ring opened derivatives (**3**, **4**) with rat liver subcellular fractions show that cap-degrading nucleases being able to unblock 5' termini are present in nuclei but not in mitochondria.

1. Einleitung

Die 5'-terminalen Sequenzbereiche eukaryotischer und bestimmter viraler Messenger-Ribonucleinsäure (mRNA) tragen 5',5'-verknüpfte Dinucleosidtriphosphate als Kappen* („caps“) [1–3].

Die physiologische Bedeutung dieser bisher in Prokaryonten nicht nachgewiesenen 5'-terminalen Kappenstrukturen ist weitgehend unverstanden, wobei es allerdings für zwei wichtige Funktionen experimentelle Untersuchungsbefunde gibt: Einmal spielen sie eine Rolle bei der Bildung des Initiationskomplexes der ribosomalen Proteinsynthese und zum anderen haben Kappen offenbar eine nicht unwichtige Schutzfunktion für die mRNA gegenüber zellulären Nucleasen [5], so daß die mRNA erst nach Abbau dieser Strukturen 5'-Exonucleasen zugänglich wird.

Für die Schutzfunktion kann die Kappe nach Abbaubefunden von Reoviren mRNA gegenüber Weizenkeimextrakten unmethyliert vorliegen, nicht da-

gegen für die Bildung stabiler ribosomaler Komplexe [6]. Deshalb sollte die Zelle Phosphatasen enthalten, die nun ihrerseits kappenspezifisch sind und mithin kappentragende mRNA dem Abbau durch 5'-Exonucleasen zugänglich machen.

Wir sind deshalb der Frage nachgegangen, ob es in der eukaryotischen Zelle unter den Dinucleosidphosphat-spaltenden Enzymen [7–10] solche gibt, die insbesondere 5',5'-Dinucleosidtriphosphate spalten, also möglicherweise auf Dinucleotide vom Kappenstrukturtyp spezialisiert sind. Als Untersuchungs-moleküle wurden verschiedene ¹⁴C-markierte Di-nucleosidphosphate dargestellt und auf ihre Abbau-barkeit gegenüber verschiedenen subzellulären Frak-tionen der Rattenleberzelle untersucht [11]**.

2. Experimentelles

2.1 Methoden

UV-Spektren: Shimadzu UV 200-Spektrometer.

³¹P-NMR-Spektren: Diese wurden protonenent-koppelt in D₂O bei pH 11 mit einem Bruker WP 60 DS (60 MHz) aufgenommen.

** Die Ergebnisse wurden von den Autoren auf der Frühjahrstagung der Gesellschaft für Biologische Chemie in Berlin (1979) vorgestellt.

Sonderdruckanforderungen an Dipl.-Ing. S. Bornemann und Prof. Dr. Dr. E. Schlimme.

0341-0382/80/0100-0057 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht:
Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Enzymatische Analyse: Es wurden folgende Enzyme in den jeweiligen Reaktionsansätzen eingesetzt: (a) Orthophosphorsäuremonoesterphosphohydrolase [Alkalische Phosphatase (APase)], E. C. 3.1.3.1; Reaktionsansatz: 50 µl Trispuffer 0,1 M, pH 8,0; 10 µl MgCl₂ 0,2 M; 20 µl Nucleotidlösung (ca. 30 nmol); 5 µl APase (~ 3,3 nKatal; bezogen auf *p*-Nitrophenylphosphat als Substrat). (b) Oligonucleotid-5'-nucleotidhydrolase [Phosphodiesterase (PDEase, Schlangengift)], E. C. 3.1.4.1; Reaktionsansatz: 40 µl Trispuffer 0,2 M, pH 9,0; 20 µl Nucleotidlösung (ca. 30 nmol); 5 µl PDEase-Suspension (verdünnt 1:10); (~ 13,3 pKatal; bezogen auf Bisnitrophenylphosphat als Substrat). (c) Oligonucleotid-3'-nucleotidohydrolase [Phosphodiesterase (PDEase, Kalbsmilz)], E. C. 3.1.4.18; Reaktionsansatz: 50 µl Citrat-Puffer 0,1 M, pH 6,0; 20 µl Nucleotidlösung (ca. 30 nmol); 5 µl PDEase (~ 0,3 nKatal, bezogen auf Thymidin-3'-nitrophenylphosphat als Substrat). (d) 5'-Ribonucleotidphosphohydrolase [5'-Nucleotidase], E. C. 3.1.3.5; Reaktionsansatz: 40 µl Veronal-Puffer 0,04 M, pH 8,0; 20 µl Nucleotidlösung (ca. 30 nmol); 5 µl 5'-Nucleotidase (~ 1,7 nKatal; bezogen auf 5'AMP als Substrat). 5'-Nucleotidase wurde von Sigma-Chemie, München, sämtliche anderen Enzyme wurden von Boehringer, Mannheim, bezogen.

Chromatographie: Die Säulenchromatographie wurde mit DEAE-Cellulose, HCO₃⁻-Form, (Fa. Whatman) durchgeführt. Für die analytische Dünnschichtchromatographie (DC) wurden folgende Trägerfolien verwendet: (a) Polyethylenimin-imprägnierte Cellulose-Platten (Fa. Macherey und Nagel, Düren); (b) Cellulose-Platten F 1440 LS 254 (Fa. Schleicher und Schüll, Dassel).

Als Substanznachweis diente die UV₂₅₄-Absorption. Als Lösungsmittelsysteme (LS) für die DC wurden eingesetzt: LS I = 0,5 M KNO₃ (pH 5,5); LS II = Ethanol/1 M Ammoniumacetat (7:3, V:V) (pH 6,8) (siehe Tabelle 1).

Dünnschichtelektrophorese: DE-Doppelkammer (Desaga, Heidelberg) mit Kieselgel-Dünnschichtplatten (Woelm, Eschwege). Als Elektrophoresepuffer wurde 0,1 M Natriumcitratpuffer, pH 4,0 verwendet.

Phosphatbestimmung: Diese erfolgte angelehnt an die Methode von Zilversmit und Davis [12].

Radioaktivitätsmessungen: Die Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Tricarb-Scintillationspektrometer der Fa. Packard, Modell 3385, durchgeführt.

2.2 Chemische Synthesen

Zur Synthese der Kappenmutterverbindung P¹,P³-(5'-Guanosyl-5"-adenosyl)triphosphat, Gp₃A, (1) (siehe Abb. 1) wurde Adenosin-5'-monophosphat (5'AMP) und Guanosin-5'-diphosphat (5'GDP) gemäß dem Verfahren von Khorana und Todd [13] zur Darstellung von Pyrophosphaten umgesetzt, wobei in wässrigem Pyridin mit einem auf 5'AMP bezogenen 200fachen Überschuß N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) als Kondensationsmittel gearbeitet wurde. Neben der Zielverbindung Gp₃A (1) entstanden als Nebenprodukte die Substanzen P¹,P³-Di(5'-adenosyl) diphosphat, Ap₂A, (3) sowie P¹,P⁴-Di(5'-guanosyl) tetraphosphat, Gp₄G.

Die Trennung der entstandenen Verbindungen erfolgte säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose mit Triethylammoniumbicarbonat (TBK)-Puffer, pH 7,5, (0–0,5 M) als Elutionsmittel. Abb. 2 zeigt ein typisches Elutionsprofil der Chromatographie eines Gp₃A-Syntheseansatzes.

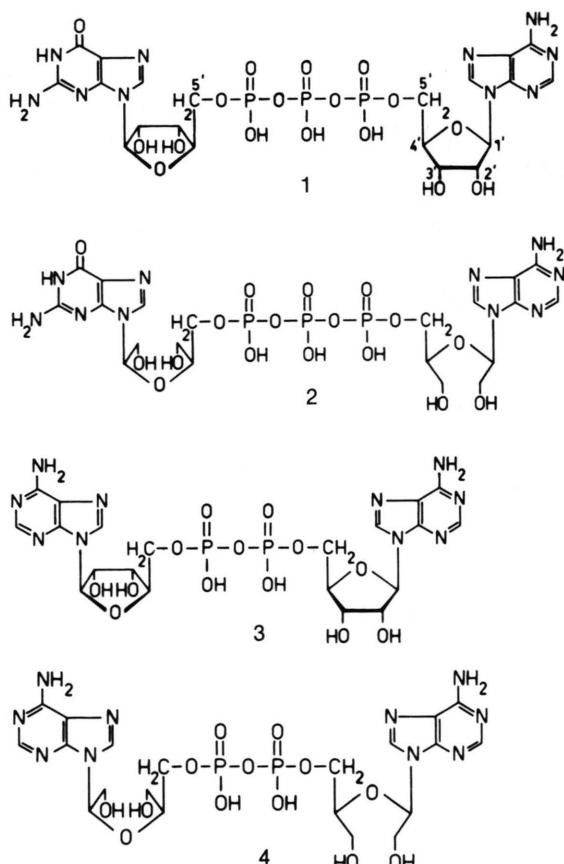


Abb. 1. Formelschema.

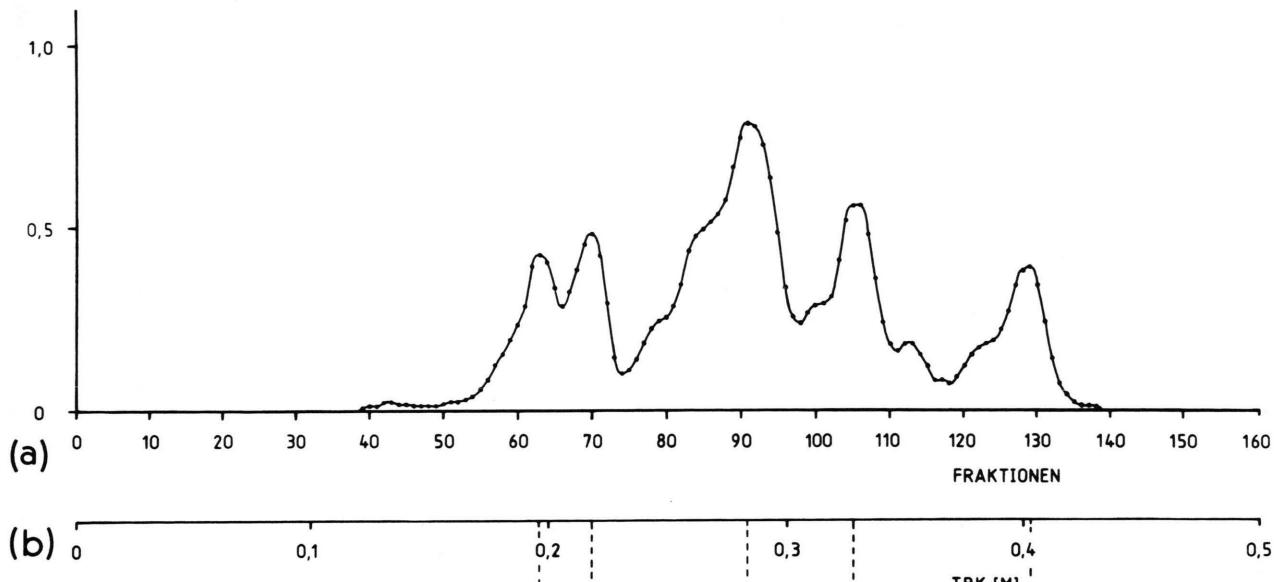


Abb. 2. Elutionsprofil der Chromatographie eines Gp₃A-Reaktionsansatzes. Ordinate: Absorption bis 254 nm; Abszisse: (a) Fraktionen zu je 20 ml; (b) Triethylammoniumcarbonatpuffer [M]. Folgende Substanzen wurden identifiziert: AMP (0,20 M), 3 (0,22 M), GDP (0,28 M), 1 (0,33 M), Gp₄G (0,40).

Die isolierten Verbindungen waren chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich und wurden durch UV- und ³¹P-NMR-Spektroskopie charakterisiert.

Ausgehend von [¹⁴C]5'AMP betrug die durchschnittliche Ausbeute nach Abbau der nicht 5',5'-verknüpften Nucleotide mit Alkalischer Phosphatase zu den entsprechenden Nucleosiden und anschließender Rechromatographie unter den in Abb. 2 genannten Bedingungen, sowie Überführung der Verbindung in die Natriumsalzform und ausschließlicher Verwendung der hochreinen Hauptpeakfraktion an Gp₃[¹⁴C]A 1,5–3 µmol (1–2%).

Die erhaltenen Dinucleosidphosphate Gp₃[¹⁴C]A (1) sowie [¹⁴C]Ap₂[¹⁴C]A (3) und ihre ribosering-offenen Derivate rro(Gp₃[¹⁴C]A) (2) bzw. rro([¹⁴C]Ap₂[¹⁴C]A) (4) (siehe Abb. 1) wurden in die biochemischen Abbauprozesse eingesetzt.

2.2.1 P¹,P³-(5'-Guanosyl-5"-adenosyl)triphosphat (1)

Zunächst wurde das Zielprodukt (1) als nicht markierte Verbindung dargestellt, um eine Bezugs- bzw. Vergleichssubstanz für die Reindarstellung der ¹⁴C-markierten Zielverbindung (1) zu erhalten. Der Reaktionsansatz dieser Gp₃A-Synthese enthielt:

75 mg (187,5 µmol) 5'AMP · Na₂ und 140 mg (300 µmol) 5'GDP · Li₃. Beide Nucleotide wurden in 1 ml dest. Wasser gelöst und zu einer Lösung von 6,2 g DCC (30 mmol) in 20 ml Pyridin gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 11 Tage bei Raumtemperatur gerührt und nach Abtrennung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs aufgearbeitet.

Die Ausbeuten betrugen: 14% Gp₃A (1); 7% Ap₂A (3) und 8% Gp₄G.

2.2.2 P¹,P³-(5'-Guanosyl-5"--[¹⁴C]adenosyl)triphosphat (1)

60 mg (150 µmol) 5'AMP · Na₂, 140 mg (300 µmol) 5'GDP · Li₃ und 58,5 nmol [¹⁴C]5'AMP (1,4 ml der [¹⁴C]AMP-Stammlösung: 0,02 mCi/ml; 479 mCi/mmol; New England Nuclear, Boston, USA) wurden in 1,5 ml dest. Wasser gelöst. Diese Nucleotidlösung wurde zu 6,2 g (30 mmol) DCC in 40 ml Pyridin gegeben. Der Reaktionsansatz wurde 24 Tage bei Raumtemperatur gerührt und nach Abtrennung des ausgefallenen Dicyclohexylharnstoffs aufgearbeitet.

Die Ausbeuten an Gp₃[¹⁴C]A betragen: 10% und nach Rechromatographie und Überführung der Titelverbindung in das Natriumsalz: 1,8%.

Die Öffnung der Ribose zum Produkt rro(Gp₃[¹⁴C]A) (**2**) wird wie für rro ATP beschrieben [14] ausgeführt:

150 nmol Gp₃[¹⁴C]A, die in 500 µl dest. Wasser gelöst vorlagen, wurden mit 200 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 und 100 µl 0,1 M Natriumperjodat (NaJO₄) versetzt. Nach einer 45-minütigen Reaktionszeit wurde überschüssiges Perjodat durch Zugabe von 30 µl 1 M Glucose zerstört. Zu diesem Ansatz wurden 0,5 mg Natriumborhydrid (NaBH₄), gelöst in 100 µl dest. Wasser, sowie 700 µl 2 M Natriumacetatpuffer pH 5,2 gegeben und das Reaktionsgemisch auf pH 7,8 eingestellt. Nach einer Reaktionszeit von 1 Tag wurde der pH-Wert mit 1 N HCl auf pH 5,2 eingestellt und das Reaktionsgemisch säulenchromatographisch aufgearbeitet.

Ausbeute an rro (Gp₃[¹⁴C]A): 127,5 nmol (85%).

2.2.3 P¹,P²-Di(5'-[¹⁴C]adenosyl)diphosphat (**3**)

75 mg (187,5 µmol) AMP · Na₂ und 140 mg (300 µmol) GDP · Li₃ wurden mit 42,0 nmol [¹⁴C]5'AMP in 1,5 ml dest. Wasser gelöst, zu dieser Nucleotidlösung wurden 6,2 g (30 mmol) DCC in 30 ml Pyridin gegeben. 12 Tage wurde dieser Reaktionsansatz bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wurde abgetrennt und der Ansatz säulenchromatographisch aufgearbeitet.

Ausbeute an [¹⁴C]Ap₂[¹⁴C]A: 8%.

Die riboseringoffene Verbindung rro([¹⁴C]Ap₂[¹⁴C]A) (**4**) wurde wie folgt dargestellt:

60 nmol [¹⁴C]Ap₂[¹⁴C]A in 200 µl dest. Wasser wurden mit 100 µl 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 und 50 µl 0,1 M Natriumperjodat versetzt. Überschüssiges Perjodat wurde nach einer Reaktionszeit von 45 min mit 30 µl 1 M Glucose zerstört. Die anschließende Natriumborhydrid-Reduktion wurde wie bei der Darstellung von rro(Gp₃[¹⁴C]A) beschrieben durchgeführt.

Ausbeute an rro([¹⁴C]Ap₂[¹⁴C]A): 48 nmol (80%).

Weitere Daten zur Charakterisierung der Syntheseprodukte (**1**–**4**) sind in Tab. I zusammengestellt.

2.3 Biochemische Experimente

2.3.1 Zellfraktionierung

Die Rattenleber (männliche Ratten, Stamm Wistar, 120–150 g Gewicht, Versuchstierzuchtbetrieb Winkelmann, Nordborchen) wurde in isotonischem

Tab. I. Charakterisierung der Syntheseprodukte **1**–**4**.

Sub- stanz	λ (in H ₂ O)	ε	Hypo- chromi- tät gegenüber 85% H ₃ PO ₄ in ppm)	R _f -Werte Produkte nach PDE-Spaltung	R _r -Werte [min] Produkte nach PDE-Spaltung			P : Di- nucleo- tid (theor. 1 : 1)						
					PDE/AP-Spalt.									
					GDP	AMP	A							
1	256	234	23,3 ^a	14,4	δ = -11,1 [d,P ¹ ,P ³] -22,1 [m,P ²]	0,05 ^b 0,12 ^b	0,01 ^b 0,35 ^b	0,20 ^b 0,52 ^c	0,42 ^c 0,57 ^c	96,0 ^d 29,0 ^d	41,5 ^d 12,0 ^d	33 ^e 19 ^e	2,4 : 1	0,74 : 1
2	256	234	24,4	10,2										
3	260	235	24,8	19,5	δ = -11,0 [s,P ¹ ,P ²]	0,41 ^b 0,49 ^b	0,20 ^b 0,35 ^b	0,48 ^c 0,57 ^c	18,6 ^d 14,2 ^d	12,0 ^d	33 ^e	19 ^e	2,0 : 1	
4	260	235	22,7	25,0										

^a 22,4 nach Lit. [15].

^b System I: KNO₃, 0,5 M pH 5,5 (TLC, PEI-Cellulose).

^c System II: Ethanol/1 M Ammoniumacetat (7 : 3) pH 6,8 (TLC, Cellulose).

^d System III: Anionenaustausch-Liquidchromatographie über Nucleosil 5 SB (Macherey und Nagel, Düren); mobile Phase: 0,1 M KNO₃, 0,02 M K₂HPO₄ pH 2,6; Fließgeschwindigkeit 8 ml/h; 32 atm.; 24 °C; Detektion 254 nm (vgl. auch [16]).

^e System IV: Kationenaustausch-Liquidchromatographie über Beckman M 81; mobile Phase: 0,4 M Ammoniumformiat pH 4,6; Fließgeschwindigkeit 8 ml/h; 40 atm.; 34 °C; Detektion 258 nm [17].

Isolationsmedium bestehend aus 0,22 M Mannit, 0,07 M Sucrose und 0,001 M Triethanolamin × HCl, pH 7,2, bei 4 °C zerkleinert, blutfrei gewaschen, im Potter-Homogenisator aufgeschlossen und durch differentielle Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge die Zellkernfraktion bei 500 × g und die Mitochondrienfraktion bei 15000 × g isoliert [18, 19 und dort zitierte Arbeiten]. Beide subzellulären Fraktionen wurden im Isolationsmedium resuspendiert und ein Proteingehalt zwischen 20 und 40 mg/ml eingestellt. Protein wurde nach der Biuretmethode bestimmt.

2.3.2 Enzymatische Abbauversuche

Die enzymatischen Abbauversuche mit den ¹⁴C-markierten Dinucleosidphosphaten Gp₃A (1), Ap₂A (3), rro(Gp₃A) (2) und rro(Ap₂A) (4) wurden unter

hypotonischen Bedingungen in 170 µl 0,001 M Triethanolamin × HCl-Puffer pH 7,2 bei 25 °C über eine Inkubationszeit von 30 Minuten ausgeführt. Die Ansätze enthielten analog zu Befunden aus früheren Untersuchungen [9] jeweils 0,5–0,6 mg Protein der Zellkern- bzw. Mitochondrienfraktion und 20 bis 30 nmol des jeweils eingesetzten ¹⁴C-markierten Nucleotids (1–4), wobei folgende Aktivitäten vorlagen: (1) und (2) 567 cm × nmol⁻¹, (3) und (4): 365 cpm × nmol⁻¹. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden Aliquots des Ansatzes entnommen, in 15% Perchlorsäure denaturiert und nach Zentrifugation und Neutralisation dünnenschichtchromatographisch ausgewertet (Platte a, LS I siehe Abschnitt 2.1). Die nucleotidhaltigen Flecken wurden zugeordnet, ausgeschnitten und ihre Radioaktivität im Liquidscintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse fußen auf

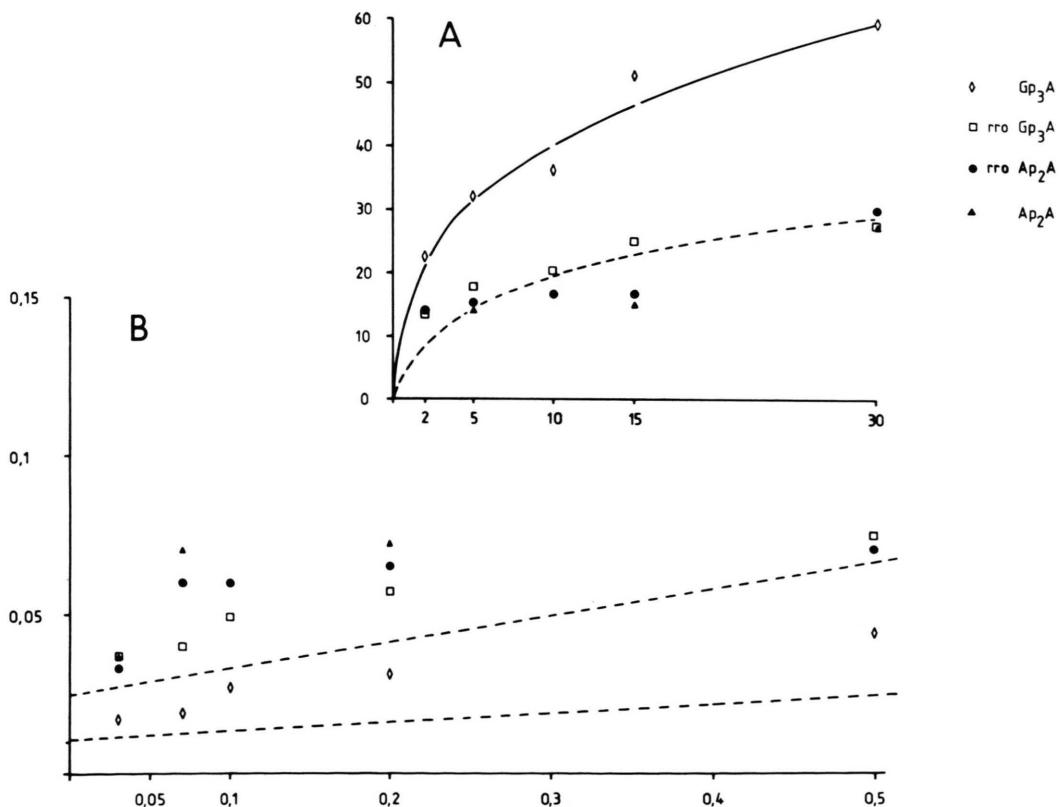


Abb. 3. Abbau der ¹⁴C-markierten Dinucleosidphosphate mit der Nucleusfraktion. A Ordinate: Abbau der Dinucleosidphosphate in [nmol × mg Protein⁻¹]; Abszisse: Zeit in [min]; B Ordinate: Reziproke Auftragung des Abbaus der Dinucleosidphosphate in [mg Protein × nmol⁻¹]; Abszisse: Reziproke Zeit in [min⁻¹]. Die Linearisierung der in Abb. 3A dargestellten Abbaukurven von Gp₃A (◇) führt unter Berücksichtigung des 95% Vertrauensbereiches zu folgender Geraingleichung

$$y = 0,055 (\pm 0,028) x + 0,0177 (\pm 0,007) \quad \text{mit } r = 0,964 \quad \text{bei } n = 5.$$

Die Grenzen des 95% Vertrauensbereiches sind durch die gestrichelten Geraden gekennzeichnet.

Doppelbestimmungen aus jeweils zwei bis vier Versuchsreihen und wurden in nmol × mg Protein⁻¹ umgerechnet. Für die ¹⁴C-markierten Nucleotide (**1**) und (**2**) wurden für die Abbaureihen mit der Zellkernfraktion Stoffbilanzen aufgestellt.

3. Ergebnisse und Diskussion

Gp₃A (**1**) und Ap₂A (**3**) sowie deren ribosering-offene Derivate (**2**, **4**) werden von Nucleasen der Rattenleberzelle gespalten und metabolisiert. Die experimentellen Befunde, die mit der Zellkern- und der Mitochondrienfraktion erhalten wurden, sind in den Abb. 3–6 graphisch wiedergegeben.

Qualitativ fällt beim Vergleich der Abb. 3 A und 6 A die offenbar bessere Spaltbarkeit des Gp₃A (**1**) gegenüber Nucleasen der Zellkernfraktion auf. Zur Prüfung der Signifikanz dieser Beobachtung wurden die Abbaukurven für Gp₃A (**1**) linearisiert (Abbn. 3 B, 6 B). Die beim Abbau mit der Nucleusfraktion für die Verbindungen **2**, **3** und **4** erhaltenen Meßwerte liegen sämtlich außerhalb des 95%-Vertrauensbereiches der Regressionsgeraden für Gp₃A (**1**), d. h. das kappentypische Nucleotid (**1**) verhält sich gegenüber den Nucleotiden (**2**), (**3**) und (**4**) in bezug auf die Spaltbarkeit gegenüber Nucleasen der Zellkernfraktion quantitativ nicht bioisoster [20]. Dagegen tritt ein solcher Befund bei der Analyse mit der

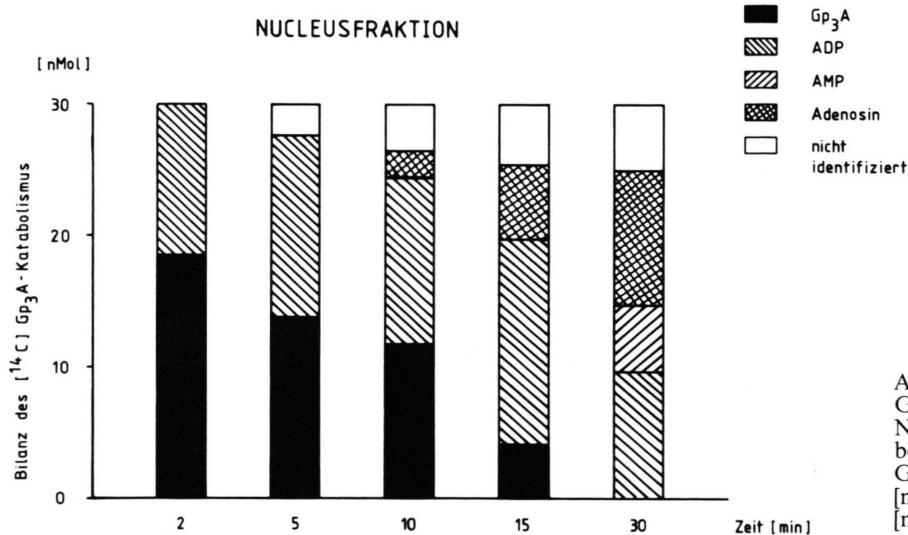


Abb. 4. Stoffbilanz des Gp₃[¹⁴C]A-Abbaus mit der Nucleusfraktion aus Rattenleber. Ordinate: Bildung von Gp₃[¹⁴C]A und Spaltprodukten [nmol]; Abszisse: Reaktionszeit [min].

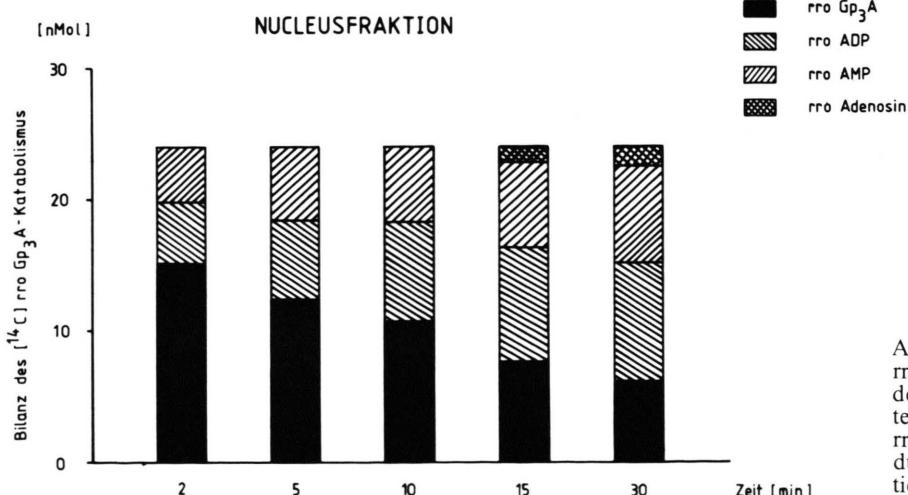


Abb. 5. Stoffbilanz des rro(Gp₃[¹⁴C]A)-Abbaus mit der Nucleusfraktion aus Rattenleber. Ordinate: Bilanz von rro(Gp₃[¹⁴C]A) und Spaltprodukten [nmol]; Abszisse: Reaktionszeit [min].

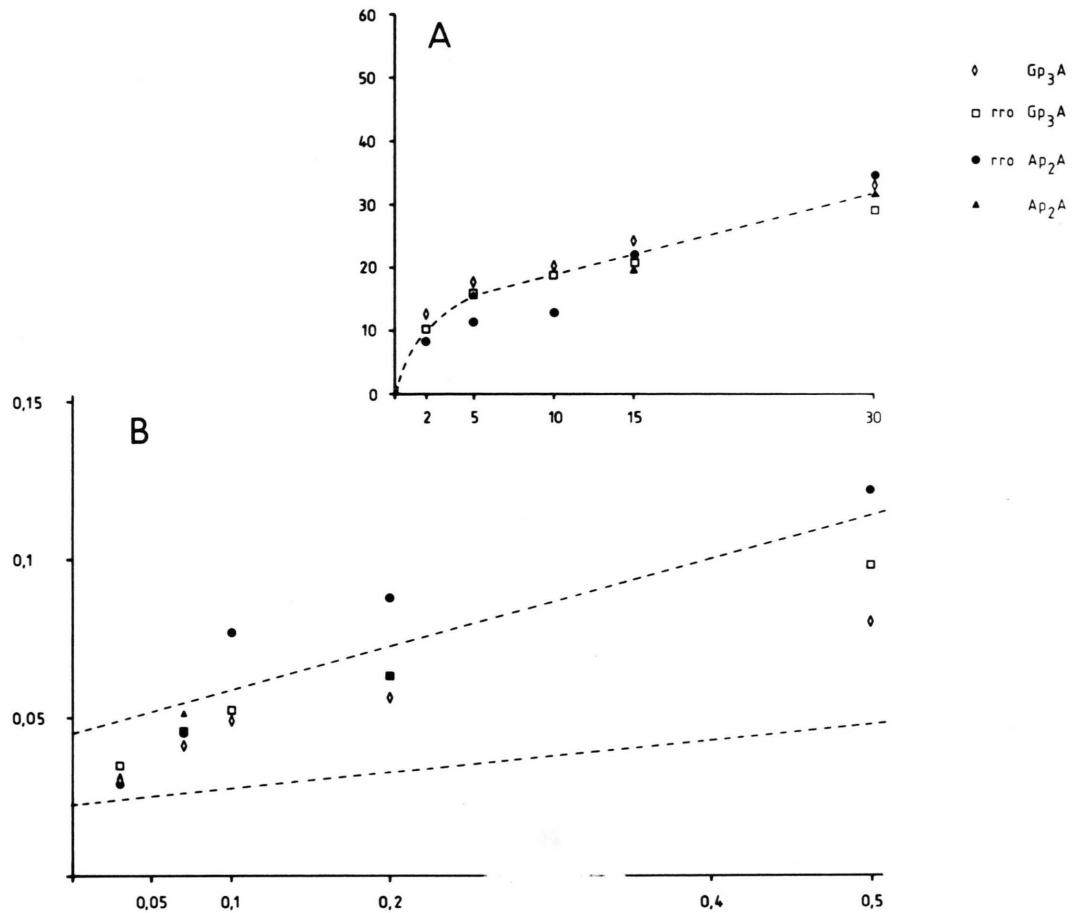


Abb. 6. Abbau der ¹⁴C-markierten Dinucleosidphosphate in der Mitochondrienfraktion. A. Ordinate: Abbau der Dinucleosidphosphate [nmol x mg Protein⁻¹]; Abszisse: Zeit [min]. B. Ordinate: Reziproke Auftragung des Abbaus der Dinucleosidphosphate in [mg Protein x nmol⁻¹]; Abszisse: Konzentration [nmol x mg Protein⁻¹]. Die Linearisierung der in Abb. 6 A dargestellten Abbaukurve von Gp₃A (◇) führt unter Berücksichtigung der 95% Vertrauensbereiche zu folgender Gleichung

$$y = 0,0959 (\pm 0,0455) x + 0,0339 (\pm 0,0113) \text{ mit } r = 0,982 \text{ und } n = 5.$$

Die Grenzen des 95% Vertrauensbereiches sind durch die gestrichelten Linien gekennzeichnet.

Mitochondrienfraktion erhaltenen Abbauergebnisse nicht auf (Abb. 6 B). Die Verbindungen (1), (2), (3) und (4) sind gegenüber Nucleasen der Mitochondrienfraktion bioisoster. Gleichartige Befunde wurden mit dem 500 × g (Homogenat ohne Zellkerne) und dem 15 000 × g-Überstand (Lysosomen, Mikrosomen, Ribosomen und Hyaloplasma) erhalten.

Die Kappenmutterverbindung Gp₃A (1) ist nach den vorliegenden Ergebnissen für Nucleasen des Zellkernes ein bevorzugtes Substrat, wobei neben der 5',5'-ständigen intramolekularen Triphosphatkette für die Wechselwirkung mit den offenbar kap-

penspezifischen Nucleasen intakte Ribofuranosidtriphosphate und Dinucleosidtriphosphat vorliegen müssen. Eine Phosphatkettenlängen-abhängige Nucleasenaktivität wurde in der Literatur berichtet [7, 10]; so wurden in Rattenleberextrakten [7] Ap₄A-spezifische und aus Salinenkrebs (*Artemia salina*) [10] Gp₄G-spezifische Tetraphosphatasen identifiziert. Das Vorhandensein triphosphatspezifischer Nucleasen steht im Einklang mit Befunden von Furuichi, La Fiandra und Shatkin [6], die zeigen konnten, daß für die Erhaltung der Schutzfunktion gegenüber zellulären Nucleasen aus Weizenkeimextrakten Gp₃G-Kappen

von Reoviren-mRNA unmethyliert vorliegen können und somit die Schutzwirkung an die Gp₃G-Struktur gebunden ist. Im Gegensatz dazu ist für die Bildung stabiler Komplexe zwischen kappentragender mRNA und Ribosomen die typische Methylierung der Kappen unerlässlich [6].

Das gleichartige Abbauverhalten kappentypischer (1) und -untypischer (2, 3, 4) Nucleotide bei Inkubation mit der Mitochondrienfraktion zeigt, daß mitochondriale Nucleasen offenbar keine ausgeprägte Kappenspezifität besitzen. Dieser Befund steht im Einklang mit dem Fehlen von Kappen in mitochondrial codierter poly(A)-haltiger RNA aus Hela-Zel-

len [21] und kann somit als weiterer Hinweis gewertet werden, daß mitochondriale mRNA keine 5'-terminalen Kappenstrukturen besitzt und damit 5'-Exonucleasen direkt zugänglich ist. Diese Argumentation steht im Einklang mit Ergebnissen, wonach bisher in Prokaryonten, insbesondere *E. coli*, keine kappentragende mRNA nachzuweisen war [3 und dort zitierte Arbeiten].

Danksagung

Diese Arbeit wurde vom Land Nordrhein-Westfalen und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

- [1] F. Rottman, A. J. Shatkin u. R. P. Perry, *Cell* **3**, 197 (1974).
- [2] J. M. Adams u. S. Cory, *Nature* **255**, 28 (1975).
- [3] A. J. Shatkin, *Cell* **9**, 645 (1976).
- [4] J. Schröder, *Biol. Unserer Zeit* **8**, 88 (1978).
- [5] W. Filipowicz, *FEBS Letters* **96**, 1 (1978).
- [6] Y. Furuichi, A. La Fiandra u. A. J. Shatkin, *Nature* **266**, 235 (1977).
- [7] C. D. Lobaton, C. G. Vallejo, A. Sillero u. M. A. G. Sillero, *Eur. J. Biochem.* **50**, 495 (1975).
- [8] C. D. Lobaton, M. A. G. Sillero u. A. Sillero, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 279 (1975).
- [9] J. Köhrle, J. Lüstorff u. E. Schlimme, *Z. Naturforsch.* **32 c**, 786 (1977).
- [10] C. G. Vallejo, C. D. Lobaton, M. Quintanilla, A. Sillero u. M. A. G. Sillero, *Biochim. Biophys. Acta* **438**, 304 (1976).
- [11] a) S. Bornemann, Diplomarbeit GH Paderborn 1978; b) S. Bornemann u. E. Schlimme, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **360**, 238 (1979).
- [12] D. B. Zilversmit u. A. K. Davis, *J. Lab. Clin. Med.* **35**, 155 (1950).
- [13] H. G. Khorana u. A. R. Todd, *J. Chem. Soc.* **1953**, 2257.
- [14] a) F. von der Haar, E. Schlimme, M. Gomez-Guillen u. F. Cramer, *Eur. J. Biochem.* **24**, 296 (1971); b) K.-S. Boos, E. Schlimme, D. Bojanowski u. W. Lamprecht, *Eur. J. Biochem.* **60**, 451 (1975).
- [15] T. Hata, I. Nakagawa, K. Shimotohno u. K. Miura, *Chem. Letters* **1976**, 987.
- [16] K.-W. Stahl, E. Schlimme u. D. Bojanowski, *J. Chromatogr.* **83**, 395 (1973).
- [17] K.-W. Stahl, E. Schlimme u. G. Schäfer, *J. Chromatogr.* **76**, 477 (1973).
- [18] B. Hagiwara, *Biochim. Biophys. Acta* **46**, 134 (1960).
- [19] C. de Duve, *J. Theor. Biol.* **6**, 33 (1964).
- [20] C. Hansch, *J. Med. Chem.* **19**, 1 (1976).
- [21] K. Grohmann, F. Almarie, S. Crews u. G. Attardi, *Nucleic Acids Res.* **5**, 637 (1978).